

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Th. Benzing

Inflammatorische Zytokine bei autosomal dominanter polyzystischer Nierenerkrankung

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Katharina Lettenmeier
aus Bad Neustadt an der Saale

promoviert am 20. Dezember 2023

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
2023

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. R.-U. Müller
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. B. Brachvogel

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten.

Frau Prof. Dr. Esther Mahabir-Brenner

Herr Prof. Dr. Roman-Ulrich Müller

Frau Dr. Franziska Grundmann

Frau Dr. rer.nat. Sita Arjune.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Der dieser Arbeit zugrunde liegenden Datensatz wurde mir von der Klinik für Innere Medizin II durch Herr Professor Dr. Roman-Ulrich Müller zur Verfügung gestellt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Messergebnisse wurden im Labor des CECADs (Nephrolab) von Frau Serena Greco-Torres sowie im Labor des ZMMK's durch das Team von Frau Professorin Dr. Esther Mahabir-Brenner ermittelt

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind durch Herrn Mohammed Majjouti ausgeführt worden.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichtete mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 09.05.23

Unterschrift: 

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Roman-Ulrich Müller für eine ausgezeichnete fachliche und stets optimistische Betreuung bedanken. Großer Dank gilt auch dem gesamten Studienzentrum der Inneren Medizin II in Kooperation mit dem Nephrolab Köln, sowie allen Mitarbeiter:innen, die eine Nutzung der Geräte und eine Bereitstellung des Untersuchungsmaterials ermöglicht haben. Hier danke ich besonders Frau Serena Greco-Torres für die herzliche Zusammenarbeit und Frau Sita Arjune für die konstante Unterstützung.

Ebenso bedanke ich mich herzlich bei dem Zentrum für Molekulare Medizin Köln unter der Schirmherrschaft von Frau PD. Dr. Ester Mahabir-Brenner, die mir eine Einführung in die Immunphänotypisierung gegeben und an der Weiterverarbeitung unserer Proben beteiligt waren.

Außerdem möchte ich mich bei allen Patienten und Patientinnen bedanken, die durch ihr Einverständnis und die Teilnahme an der Studie die Grundlage der Untersuchungen gebildet haben.

Zuletzt bedanke ich mich auch bei meiner Familie, Studienkolleg:innen und Freund:innen, sowie bei Matthias Schwarz für eine gute persönliche Unterstützung.

Für das Team

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
Zusammenfassung	9
1. Einleitung	10
1.1 Definition	10
1.1.1. Pathophysiologie	11
1.1.2. Extrarenale Manifestationen	12
1.1.3. Diagnostik	13
1.1.4. Therapie	15
1.2 Inflammation und Fibrose	16
1.2.1. Biomarker: Chemokine / Zytokine	16
1.3 Bead-based-multiplex-Immunoassays	18
1.4 Fragestellungen und Ziel der Arbeit	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Materialliste	21
2.2 Patient:innenkollektiv	21
2.3 Klinische Parameter	22
2.3.1. Demografische Daten und klinische Eigenschaften	22
2.3.2. Begleitsymptomatik	23
2.3.3. Laborparameter	23
2.3.4. Genetik	24
2.3.5. Medikamenteneinnahme	24
2.4 Methodik	24
2.4.1. Probengewinnung - Asservierung Blut	24
2.4.2. Probengewinnung - Asservierung Urin	25
2.4.3. Multiplex-Immunoassay	25
2.4.4. Vorbereitung der Testung	25
2.4.5. Durchführung der Testung	26
2.4.6. Auswertung der Testplatten	27
2.4.7. Umgang mit Ergebnissen unterhalb des Detektionsminimums	28
2.4.8. Bestimmung des Parameterminimums	29
2.5 Literaturrecherche	30
2.6 Statistische Auswertung	30

3. Ergebnisse	33
3.1 Auswahl der Studienteilnehmer:innen	33
3.2 Deskriptive Statistik	33
3.2.1. Geschlechter- und Altersverteilung	36
3.2.2. Verteilung der Mayo-Klassen und CKD-Stadien in der ADPKD-Kohorte	38
3.2.3. Darstellung der Genotyp Verteilung	40
3.2.4. Zytokin-Messergebnisse	42
3.2.5. Deskriptive Darstellung der Messergebnisse der ADPKD- und Kontroll-Kohorte	42
3.2.6. Urinproben	43
3.2.7. Doppelte Messungen	44
3.2.8. Mittelwert Vergleiche	45
3.3 Statistische Auswertung	46
3.3.1. Korrelation der Zytokinkonzentrationen innerhalb der ADPKD-Kohorte	46
3.3.2. Korrelation der Zytokinkonzentrationen innerhalb der Kontroll-Kohorte	47
3.3.3. Vergleich der Zytokinkonzentrationen zwischen ADPKD- und Kontroll-Kohorte	48
3.3.4. Einfluss von Geschlecht und Alter auf die Zytokinkonzentrationen der ADPKD- und Kontroll-Kohorte	49
3.3.5. Geschlecht	49
3.3.6. Alter	50
3.3.7. Einfluss der Mayo-Klassen auf die Zytokinexprimierung	52
3.3.8. Einfluss der Nierenfunktion auf die Zytokinexprimierung	54
3.3.9. Regressionsanalyse von TNF- α	55
4. Diskussion	57
4.1 Studienfrage	57
4.2 Studienkohorte	58
4.2.1. Kontroll-Kohorte	59
4.2.2. Diagnostische Parameter	59
4.3 Multiplex-Immunoassay	60
4.3.1. Stärken Schwächen der Methode	60
4.4 Diskussion der Ergebnisse	62
4.4.1. Einschränkungende Faktoren der Ergebnisse	62
4.4.2. Bedeutung der Ergebnisse	64
4.5 Ausblick / Offene Fragen	70
5. Literaturverzeichnis	72
6. Anhang	79

6.1	Abbildungsverzeichnis	79
6.2	Tabellenverzeichnis	80

Abkürzungsverzeichnis

eGFR (CKD-EPI) – geschätzte Glomeruläre Filtrationsrate mit Berechnungsgrundlage der <i>Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration</i>	CIR – Ergebnis innerhalb des Testbereich
ADPKD – autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung	<OOR - Messergebnisse liegt komplett außerhalb der Zytokinmesswertspanne
ARPKD – autosomal rezessive polyzystische Nierenerkrankung	DL – Detektionslimit
PC1 – Polyzystin 1	UDL – Unterhalb des Detektionslimits
PC2 – Polyzystin 2	Th1 – T1 Helfer Zelle
PKD1 – Polyzystische Nierenkrankheit 1	Th17 – T17 Helfer Zelle
PKD2 – Polyzystische Nierenkrankheit 2	Th2 – T2 Helfer Zelle
ESRD – Endstage Renal Disease	CD4+ - Cluster of Differentiation 4
TRPP2 - transienten Rezeptorpotential Polyzystin 2	IgG - Immunglobulin G
PLD – Polyzystische Lebererkrankung	KIM-1 - Kidney Injury Molekül-1
htTKV – Körpergrößen (height-adjusted) angepasstes totales Nierenvolumen	GANAB - Glucosidase II Alpha Subgruppe Gen
CKD – Chronische Nierenerkrankung	NFκB - Nukleärer Faktor κB
cAMP - zyklischen Adenomonophosphat	ROS - Reaktive Sauerstoffspezies
IL-1b – Interleukin 1 beta	plgR – polymerischer Immunglobulin Rezeptor
IL-2 – Interleukin 2	STAT6 - Signal Transducer and Activator of Transcription 6
IL-4 – Interleukin 4	JAK – Januskinase
IL-6 – Interleukin 6	akt/mTOR-Kaskade – Serin / Threonin - Proteinkinase /- mechanistic target of rapamycin- Kaskade
IL-8 – Interleukin 8	Id2 - Inhibitor of DNA binding/differentiation 2
IL-10 – Interleukin 10	Cdk2 - cyclin-dependent kinase 2
IL-13 – Interleukin 13	ERK - extracellular signal-regulated kinases
IL-18 – Interleukin 18	MAPK - mitogen-activated protein kinase
IFN-γ - Interferon gamma	ELISA - Enzyme-linked Immunosorbent Assay
TNF-α - Tumornekrose Faktor alpha	CRISP - Consortium for Radiologic Imaging Studies of Polycystic Kidney Disease
MCP-1 – Makrophagen Chemoattraktor Protein1	NGAL - Neutrophilen-Gelatinase-assoziertes Lipocalin
CCL2 – Chemokine Ligand 2	NAG - N-acetyl-beta-D-glucosaminidase
CC - Chemotaktische Zytokine	SIADH - Syndrom der inadäquaten Antidiuretischen Hormon-Sekretion
b2MG - b2 Mikroglobulin	
HFABP - Heart-type Fatty Acid Binding Protein	

Zusammenfassung

Die autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung ist eine genetische Ziliopathie, die im Erwachsenenalter zu einem progredienten Nierenversagen führt. Inflammation und die mit dieser assoziierte Fibrose spielen bei der Pathogenese eine wichtige Rolle. Im Verlauf der letzten Jahre wurde eine zunehmende Zahl an Inflammationsmarkern wie MCP-1 und TNF- α identifiziert, welche mit der Entstehung und dem Voranschreiten der ADPKD in Verbindung stehen. Ziel dieser Arbeit war es, mögliche proinflammatorische Biomarker in ADPKD-Patient:innen zu identifizieren und anhand von klinischen Charakteristika zu bewerten.

In einer explorativen Pilot-Studie wurden IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IFN- γ , MCP-1 und TNF- α Serumkonzentrationen, mit Hilfe eines *Multiplex-Immunoassays* an 233 Erwachsenen zwischen 20 und 70 Jahre des Kölner ADPKD Registers untersucht und mit einer in Alter und Geschlecht korrespondierenden gesunden Kontrollgruppe verglichen. Die notwendigen Patient:innendaten wurden dem elektronischen Dokumentationsprogramm Orbis des Uniklinikums Köln sowie dem Kölner ADPKD Register Datenbank entnommen. Der Fokus lag auf klinischen Eigenschaften mit nephrologischem Schwerpunkt und klassischen Parametern der ADPKD.

Wir stellten fest, dass die IL-6, IL-8, MCP-1 und TNF- α Konzentrationen der ADPKD-Patient:innen (TNF- α 21,27pg/l; $p \leq 0,0001$) signifikant höher waren als die der Kontrollproband:innen (TNF- α 12,97 pg/l). Zusätzlich zeigten wir einen Einfluss des männlichen Geschlechts auf die MCP-1 und TNF- α Konzentrationen der ADPKD und der Kontrollgruppe (MCP-1 $m=83,07$ pg/l, $w=67,78$ pg/l; $p \leq 0,01$). Eine weitere Erkenntnis war die Korrelation einer steigenden TNF- α Konzentration mit steigendem CKD-Stadium ($F(7,216) = 5,544$, $p < 0,0001$).

Inflammatorische Biomarker wie TNF- α können in Zukunft eine wichtige Rolle in der Identifizierung von Hoch-Risiko ADPKD-Patient:innen spielen. Dazu müssen weitere prospektive Studien an jüngeren ADPKD-Patient:innen durchgeführt werden, um die prädiktive Kapazität dieser Werte besser zu charakterisieren. So können rechtzeitig präventive Maßnahmen ergriffen werden, um das Fortschreiten der Erkrankung einzuschränken.

1. Einleitung

1.1 Definition

Die autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) ist die häufigste hereditäre Nierenerkrankung mit einer genetischen Prävalenz von 1:1000¹. Sie ist charakterisiert durch die progrediente Entwicklung bilateraler Nierenzysten². Der Gendefekt, der dieser Krankheit zugrunde liegt, stört das normale differenzierte Erscheinungsbild des Nierenepithels und ist unter anderem durch eine Ansammlung von intrazellulärem zyklischen Adenomonophosphat (cAMP) bedingt. Dies hat den Verlust von mitotischer Polarität, erhöhtem Zellumsatz und Apoptose sowie Zystenbildung zur Folge³. Die Entstehung von multiplen Zysten im renalen Parenchym ist der vorherrschende Phänotyp von ADPKD, jedoch sind Leber und Pankreaszysten, zerebrale Aneurysmen, Gefäßanomalien und andere seltene Phänotypen ebenso mit ADPKD assoziiert⁴. Als Folge der renalen Zystenbildung ist ADPKD die viert häufigste Nierenerkrankung, die in einem Nierenersatzverfahren endet⁵.

Die ADPKD gehört zur heterogenen Gruppe polyzystischer Erkrankungen und zählt zu den Ziliopathien. Ein Bestandteil dieser sind ebenso die autosomal rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD), welche häufig schon intrauterin diagnostiziert wird, und das von-Hippel-Lindau-Syndrom, welches mit verschiedenen Tumorentitäten einhergeht⁶. ADPKD wird grundsätzlich homogen vererbt und beruht auf Mutationen im *PKD1* und *PKD2* Gen. *PKD1* und *PKD2* codieren jeweils für das korrespondierende ziliäre Protein Polycystin 1 und 2 (PC1 und PC2)⁷. Die *PKD1* Mutation liegt auf Chromosom 16 und macht mit 85% den Großteil der ADPKD Erkrankungen aus. Die restlichen 15% sind Mutationen des *PKD2* Gens, welches auf Chromosom 4 liegt⁸. Auch wenn die Mehrheit der Patient:innen eine Mutation in den jeweiligen Genen zeigt, konnten in den letzten Jahren noch weitere seltener auftretende Varianten in den Genloci *GANAB*⁹ und *DNAJB11*¹⁰ identifiziert werden.

ADPKD ist die führende monogenetische renale Systemerkrankung und für 5-10% aller Fälle eines terminalen Nierenversagens verantwortlich¹¹. Die unterschiedlichen Verläufe der ADPKD lassen sich zum Teil durch genetische Heterogenität, epigenetische Modifikationen und Transkriptionsregulationen der verschiedenen *PKD-Genloci* erklären¹². Dabei wird in trunkierende und nicht-trunkierende Mutationen unterschieden. 70% aller *PKD1* Mutationen und sogar 80% aller *PKD2* Mutationen sind momentan in der ADPKD-Mutations-Datenbank als trunkierende Mutationen gelistet¹³. Aus einer Studie von Cornec-LeGall aus dem Jahr 2013 geht hervor, dass zwei Drittel der 342 *PKD1* Mutation-positiven Stammbäume und fast 95% der 95 *PKD2* Mutation-positiven Stammbäume Träger:innen einer trunkierenden Mutation

sind. Darunter inkludiert sind „*nonsense*“ Mutationen, Leserastermutationen, Spleiß-Mutationen sowie „*large rearrangements*“ Mutationen¹⁴.

Selbst innerhalb der Gruppe von Patient:innen mit Mutationen in *PKD1*, welche mit einem schnelleren Fortschreiten der Erkrankung vergesellschaftet ist, unterscheidet sich die Schwere der Krankheitsverläufe insofern, als dass Patient:innen mit einer trunkierenden *PKD1* Mutation einen schneller fortschreitenden Verlauf als Patient:innen mit nicht-trunkierende Mutationen haben³. Träger:innen nicht-trunkierender Mutationen wie „*in-frame-Deletions*“ Mutationen und „*missense*“ Mutationen erreichen in der Studie von Corneec-LeGall das terminale Nierenversagen zwölf Jahre später¹⁴. *PKD1* Patient:innen erreichen das terminale Nierenversagen in einem mittleren Alter von 54 Jahren. In diesem Alter haben 50% der *PKD2* Patient:innen noch eine bessere Nierenfunktion. Das terminale Nierenversagen erreichen sie erst rund 20 Jahre später¹⁵.

1.1.1. Pathophysiologie

Die Gene *PKD1* und *PKD2* kodieren für Polycystin 1 (PC1) auf Chromosom 16 und Polycystin 2 (PC2) auf Chromosom 4¹⁶. PC1 ist ein Glykoprotein welches ein großes extrazelluläres N-Terminal, multiple transmembran Domänen sowie einen zytoplasmatischen *C-Tail* besitzt¹⁷. PC2 ist ein nicht-selektiver Calcium-permeabler Kationenkanal, der familiär dem transienten Rezeptorpotential Polyzystin 2 (TRPP2) zugehörig ist¹³. Sie befinden sich als Rezeptor-Kanal-Komplex in den Tubulusepithel Zellen des primären Ziliums der Niere¹⁸. Kommt es nun flussbedingt zu einem Abknicken der Zilie, führt dies zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums¹⁹.

ADPKD-Patient:innen besitzen eine Keimzellmutation im *PKD1* oder *PKD2* Gen, wodurch sie nur noch ein funktionierendes Gen in jeder Zelle besitzen. Dies wird als „First Hit“ beschrieben. Im Laufe des Lebens tritt in einer gewissen Anzahl an Nephron-Zellen eine zweite somatische Mutation auf, der sogenannte „Second Hit“. Diese führt zum Verlust des zweiten Allels. Die nun PKD (-/-) Zellen proliferieren vermehrt und es kommt zur Zystogenese. Die Zysten verteilen sich im Nierenmark sowie in der Nierenrinde und besitzen ein exophytisches Wachstum²⁰. Asymmetrisches Wachstum zwischen den Nieren existiert zwar, jedoch ist es äußerst selten. In den meisten Fällen vergrößern sich die Nieren bilateral symmetrisch^{20,21}.

Grantham et. al (1987) konnte aus seiner Forschung zu Zystenpathophysiologie schlussfolgern, dass es sich bei Zysten um untypische benigne Raumforderungen handelt, welche hauptsächlich aus Flüssigkeit anstatt Zellen bestehen²². Er fand heraus, dass die meisten Zysten von den Ursprungstubuli diskonnektiert sind und somit nur durch interstitielle

Flüssigkeitssekretion wachsen können¹¹. Die Flüssigkeitssekretion ist abhängig von dem Transport von Chlorid in die Zyste durch den „*cystic-fibrosis-transmembrane-conductance-regulator*“, welcher durch cAMP aktiviert wird. Obwohl die Menge der Chlorid Sekretion gering ist, ist sie größer als die Absorption der Zystenlösung, was zu einem progredienten Wachstum der Zyste beiträgt²³.

In Anbetracht der letzten Erkenntnisse über cAMP als Antreiber von Flüssigkeitssekretion untersuchten Davidow et. al (1996) den Effekt von cAMP und cAMP Agonisten auf die Proliferation von normalen Nierenepithel-Zellen und Zystenepithel-Zellen, als zweiten Mechanismus des Zystenwachstums²⁴. Hier zeigte sich, dass cAMP Agonisten die Zellproliferation bei normalen Nierenzellen inhibieren und gleichzeitig die Zellproliferation von Nierenzysten bei ADPKD über die *Extracellular signal-regulated Kinase* (ERK) aktivieren²⁴. Die Mehrheit der Zysten entwickelt sich separat von ihrem Ursprungstubulus und vergrößert sich mit Hilfe dieser transepithelialen Sekretion oder durch die ERK aktivierte Zellproliferation²⁵.

Im finalen Stadium der Krankheit wird das Ausmaß der Erkrankung deutlich. Das Zystenwachstum hat sein Maximum erreicht, wodurch das Nierenvolumen massiv zugenommen hat, sodass die benachbarten organischen Strukturen komprimiert werden. Dazu gehören Harnleiter, Arterien, Venen, Kapillaren, Lymphbahnen und das übriggebliebene vitale Nierengewebe. Die glomeruläre Filtration, das glomerulotubuläre Feedback und der medulläre Gegenstrommechanismus fallen dem erhöhten Gewebedruck zum Opfer. Die Niere kann ihrer physiologischen Arbeit nicht mehr nachgehen²³. Hieraus erklärt sich, dass ADPKD-Patient:innen mit einer großen Anzahl an Nierenzysten, wie sie häufig bei *PKD1*-Patient:innen zu sehen sind, schon 20 Jahre früher ESRD erreichen als *PKD2*-Patient:innen, die generell eine kleinere Zahl an Zysten bei geringerem Nierenvolumen entwickeln^{15,26}.

1.1.2. Extrarenale Manifestationen

ADPKD ist eine Systemerkrankung. PC1 und PC2 sind Proteine, die in verschiedensten Gewebsstrukturen essenzielle Aufgaben übernehmen, weshalb die ADPKD mit diversen extrarenalen Pathologien vergesellschaftet ist. Dazu gehört die polyzystische Lebererkrankung (PLD) sowie vaskuläre Anomalien. Nahezu alle ADPKD-Patient:innen entwickeln mit zunehmenden Alter Leberzysten. Sie sind die häufigste extrarenale Manifestation der ADPKD^{27,28}.

Unter der PLD versteht man multiple, im ganzen Leberparenchym verstreute Leberzysten, die aufgrund einer biliären Zellhyperplasie entstehen. Cholangiozyten exprimieren in der Leber

PC1 und PC2. Kommt es, wie in den Tubuluszellen der Niere, zu einer erheblichen Minimierung oder dem kompletten Funktionsverlust der Polyzystin Proteine, führt dies zu einer Cholangiozytenproliferation und somit zur Zystogenese^{27,29}.

Eine weitere wichtige extrarenale Manifestation sind kardiovaskuläre Anomalien wie arterielle Aneurysmen, Herzklappenfehler und intrakranielle Aneurysmen¹⁵. Aktuell wird davon ausgegangen, dass eine verminderte Expression von PC1 und PC2 in den Endothelzellen und glatten Muskelzellen der meisten Gefäße, vor allem Aorta und Hirnarterien, für diese Pathologien ursächlich sind²⁵. In Endothelzellen sind PC1 und PC2 für die Regulierung der intraluminalen Scherkräfte verantwortlich, indem sie Kalzium oder Stickstoffmonoxid freisetzen³⁰. Kommt es nun zu einer Haploinsuffizienz der Proteine, fehlt die Mechanosensitivität in den jeweiligen Gefäßen und begünstigt die Aneurysmabildung³¹.

Weitere mögliche Folgen von ADPKD sind die intrarenalen und perinephritischen Blutungen nach leichtem abdominellem Trauma.

1.1.3. Diagnostik

Die positive Familienanamnese ist die wichtigste Komponente im Screening auf ADPKD. Erstsymptome die darauf hinweisen können sind das Auftreten von Bluthochdruck, plötzlich einsetzenden Nierenschmerzen gefolgt von Hämaturie, oder der zufälligen Befund einer Nephromegalie in der Bildgebung³². Die Hypertonie ist eines der ersten Symptome der ADPKD, da die Zystogenese mit einer Steigerung der Nierendurchblutung und der Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) einhergeht³³. Da die Ultraschalldiagnostik die weitverbreitetste Möglichkeit für ein Screening auf ADPKD ist, wurden sogenannte Ravine-Kriterien aufgestellt. Dafür gilt: Patient:innen unter dem 30. Lebensjahr mit einer positiven Familienanamnese müssen mindestens zwei Nierenzysten, uni oder bilateral, vorweisen, um die Ravine-Kriterien zu erfüllen. Patient:innen welche sich zwischen dem 30 und 59 Lebensjahr befinden, benötigen mindestens zwei Nierenzysten pro Niere. Jenseits dem 60. Lebensjahr sind sogar vier bilaterale Nierenzysten notwendig, um ADPKD diagnostizieren zu können^{6,34}. Heutzutage ist jedoch aufgrund der höheren Sensitivität von Ultraschall und MRT davon auszugehen, dass Patient:innen mit Zystennieren bereits im Alter ab 60 Jahren mehr als 10 Zysten aufweisen³⁵.

Da die Zystogenese und das Zystenwachstum zwischen den einzelnen Patient:innen enorm variiert, können Patient:innen mit einer hohen Krankheitslast immer noch eine adäquate Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) aufweisen. Das macht die GFR zu einem unsicheren Krankheitsverlaufsmarker. Diverse Studien haben ebenso ihre Funktion hinterfragt, da von atypischen Patient:innen mit großem Zystenvolumen aber normaler Nierenfunktion berichtet

wird. Gleichzeitig gibt es Patient:innen mit kleinen Nierenzysten und stark eingeschränkter GFR³⁶. Häufig treten klinische Symptome wie Hypertonie, Mikro- und Makrohämaturie und urologische Komplikationen (z.B. Flankenschmerzen) weit vor dem GFR-Verlust auf^{37,38}. Dies bedeutet, dass Zystenwachstum weit vor einem labortechnisch sichtbaren Nierenschaden auftritt^{20,39,40,41}. Längsschnittstudien zeigten, dass bei fast allen Patient:innen die GFR sehr lange in einem normalen Bereich verbleibt und bei *PKD2* Patient:innen die eGFR deutlich später abfällt⁴². Erst im weiteren Krankheitsverlauf beginnt ein unwiderruflicher Verlust der Nierenfunktion, welcher in einer dialysepflichtigen Niereninsuffizienz endet²³.

Neben der Nierenfunktion ist das Nierenvolumen der wichtigste Parameter des Erkrankungsverlaufes der ADPKD und kann auch bei normaler Nierenfunktion bereits zur Abschätzung der Progredienz eingesetzt werden³⁹. In der „*Consortium for Radiologic Imaging Studies*“ (CRISP) Studie wurden MRT-Bilder von erwachsenen Patient:innen über eine Periode von drei Jahren ausgewertet. Hier konnte eine Zunahme des totalen Nierenvolumens (TKV) bei gleichzeitiger Abnahme der geschätzten Glomerulären Filtrationsrate (eGFR) festgestellt werden²⁶. Mittlerweile gibt es die CRISP III Studie, die seit 14,5 Jahren prospektiv Patient:innen betreut und weiterhin zeigt, dass die htTKV (*height adjusted Total Kidney Volume*) mit einem GFR Verlust von 30% einhergeht⁴³.

Bis dato gibt es noch keinen Biomarker, um das Voranschreiten der Erkrankung von ADPKD-Patient:innen zu klassifizieren. Das hat viele Gründe. Wie oben beschrieben gibt es unterschiedliche Phänotypen dieser Erkrankung, weshalb Krankheitsverläufe sehr verschieden sein können. Um in klinischen Studien ADPKD-Patient:innen zu klassifizieren, und das Krankheitsprogressionsrisiko zu evaluieren, wurde die Mayo-Klassifikation entworfen⁴². Die ADPKD-Patient:innen werden anhand des htTKV, Alters und Geschlechts in fünf Klassen, Mayo-Klassen 1A-1E, eingeteilt. Patient:innen in Mayo-Klassen 1A und 1B besitzen ein atypisches Nierenwachstum mit niedrigem Risiko einer schnellen Krankheitsprogression. Mayo-Klassen 1D und 1E gehen jedoch mit einem erhöhten Risiko eines rapiden Krankheitsverlaufs einher. Mayo-Klasse 1C Patient:innen können zu beiden Verläufen neigen, weshalb hier zusätzlich nach Anzeichen einer schnellen Krankheitsprogression, wie bspw. Tendenzen eines GFR Abfalls, gesucht werden muss⁴⁴. Das TKV korreliert zusätzlich mit verschiedenen Krankheitsmanifestationen wie Hypertonie, Schmerz, Hämaturie und Proteinurie, wodurch es bisher der bester Progressionsmarker ist. Er muss jedoch größen- sowie altersadaptiert betrachtet werden, weshalb die htTKV als Prädiktor verwendet wird⁴⁵. Die Bestimmung des htTKV ist somit nützlich, wenn sie medizinische Entscheidungen wie Therapieplanung oder den Eintritt in klinische Studien beeinflussen soll^{25,42}. Die Messung des htTKV ist hierbei im Gegensatz zur GFR in frühen

Stadien der ADPKD gut geeignet, um den Krankheitsverlauf zu beobachten³⁹. Indessen ist die aktuelle Mayo-Klassifikation nur für Patient:innen mit einem klassischen Krankheitsverlauf und diffusem Zystenwachstum (Klasse 1) nutzbar. Dies beruht darauf, dass der Großteil von ADPKD-Patient:innen (90-95%) der Klasse 1 zugehörig ist. Sie wird auch als „*typische*“ Nierendarstellung bezeichnet, da die Niere bilateral diffus Zysten exprimiert und keine Anzeichen von Nierenatrophie sichtbar sind. In die Klasse 2, 5-10% der Erkrankten, fallen alle Nieren, welche ein unilaterales, asymmetrisches, oder segmentales Zystenwachstum aufweisen (2A). Sie gelten dadurch als „*atypisch*“. Ganz selten ist eine massive Parenchymatrophie darstellbar, diese Nieren werden als Klasse 2B klassifiziert.

1.1.4. Therapie

Aufgrund von Neuerkenntnissen in der Pathophysiologie sowie dem erweiterten Verständnis zellulärer Mechanismen der ADPKD konnten neue Medikamente entwickelt und im Rahmen von *Drug-Repurposing* bereits bekannte Medikamente als mögliche Behandlungsoptionen erschlossen werden⁴⁴.

Das zum Zeitpunkt dieser Studie einzig zugelassene Medikament in Deutschland ist Tolvaptan. Tolvaptan gehört zu der Familie der Vaptane und kompromittiert die Funktion von Vasopressin, indem es an dessen Rezeptoren bindet. Gleichzeitig hemmt es den Einbau von Aquaporin-2 in den Sammelrohrzellen und verursacht eine Reduktion der Konzentration des cAMP im Gewebe⁴. Tolvaptan wurde bis zur Behandlung von ADPKD-Patient:innen in niedrigeren Dosierungen für die Behandlung von Hyponatriämien bei Patient:innen mit Herzinsuffizienz, Leberzirrhose oder dem Schwarz-Bartter-Syndrom, bzw. Syndrom der inadäquaten ADH-Sekretion (SIADH), genutzt. Torres et. al (2012) hat in der TEMPO 3:4 Studie, Tolvaptan mit einem Placebo verglichen und fand heraus, dass Tolvaptan über einen Einnahmezeitraum von drei Jahren die Zunahme des TKV um ungefähr 50% reduziert⁴⁶.

Andere Medikamentengruppen, welche in klinischen Studien evaluiert worden sind, z.B. *mechanistic-target-of-rapamycin*-Inhibitoren (mTOR-Inhibitoren) und Somatostatinanaloga⁴⁷. Diese haben es aber letztlich aufgrund fehlender Wirksamkeitsnachweise nicht bis zur Zulassung geschafft. Trotz der unglaublichen Fortschritte in der Therapie von ADPKD-Patient:innen kann man sagen, dass die aktuell bekannten therapeutischen Optionen insofern limitiert sind, als dass es bisher keine kurative Therapie gibt und Therapieziele vor allem Symptomkontrolle und Verlangsamung der Krankheitsprogression sind⁴.

1.2 Inflammation und Fibrose

Inflammatorische Prozesse gehören zu den Schutzmechanismen des Körpers und sind an jeder Immunantwort beteiligt. Inflammation ist durch die typischen Hautzeichen Rötung, Wärme, Schmerz und Schwellung definiert und gehört zum angeborenen Immunsystem. Fibrose ist charakterisiert durch die vermehrte Produktion und Ablagerung von Kollagen, begleitet von gleichzeitigem Abbau von Bindegewebe nach einer Gewebsverletzung, und führt so zur Narbenbildung. Generell kann man sagen, dass eine erhöhte Inflammations- und Fibroseaktivität die ADPKD verschlimmert, beide Prozesse aber nicht zu den primären Verursachern der ADPKD gehören⁴⁸. Jedoch können manche inflammatorischen und fibrotischen Zellen und Moleküle die Nierenfunktion beeinflussen und somit die Progression der ADPKD vorantreiben⁴⁸. Dazu gehören Chemokine, Zytokine, angiogene Faktoren, interstitielles Kollagen und andere Matrix Proteine, die vom intraluminalen Epithel der Zysten exprimiert werden⁴⁸.

Ebenso wurde exploriert, dass die meisten Zysten bei erwachsenen Patient:innen mit ADPKD die gleichen Biomarker exprimieren wie die Zellen im jeweiligen Sammelrohr^{49,50}. Die biochemischen Proliferationsmarker werden von den Zystenepithel-Zellen nur minimal mehr exprimiert als in Zellen von differenzierten Nierentubuli²³. M1 und M2 Makrophagen werden bei Gewebsverletzungen in das jeweilige Gewebe rekrutiert und versuchen mit ortsständigen Fibroblasten die wahrgenommene Verletzung zu kontrollieren, in dem sie für Fibrosierung und Produktion von Zytokinen sorgen²⁵. Daraus resultiert ein positiver Feedbackmechanismus. Die stetig wachsenden Zysten komprimieren sich nun gegenseitig oder werden selbst von Nachbar tubuli unter Druck gesetzt, was zu einer zusätzlichen Chemokin- und Zytokin-Produktion sowie zur umfangreichen tubulointestinalen Fibrose führt^{41,51}.

1.2.1. Biomarker: Chemokine / Zytokine

Zytokine sind wichtige Immunmediatoren, die den Großteil des Kommunikationsnetzwerks des Immunsystems ausmachen. Zytokine regulieren die Zellantwort sowie die Zellreifung bestimmter Zellpopulationen. Sie halten die Balance zwischen zellulärer und humoraler Immunantwort, weshalb sie einer der wichtigsten Prognosefaktoren von Gesundheit und Krankheit sind⁵². Die Dysregulation dieser komplexen Signalwege ist häufig das früheste Zeichen eines pathologischen Ereignisses⁵³. Die Suche nach Markern, die einen frühen Nierenschaden detektieren und ein mögliches Ziel für spezifische Interventionen zur frühzeitigen Eingrenzung der Krankheitsprogression sein können, ist besonders gefragt, da das Komplikationsrisiko von ADPKD bis hin zur terminalen Niereninsuffizienz mit voranschreitendem Alter zunimmt.

Da es bisher keinen perfekten, vorzugsweise leicht und günstig zu messendem Marker in etwa Urin oder Blut gibt, haben sich in den letzten Jahrzehnten verschiedene Forschungsgruppen die Rolle der Inflammation und daran beteiligte Zytokine und Chemokine in ihrem Zusammenhang zu ADPKD untersucht⁵⁴. Einer dieser Pioniere war K. Gardner. Er stellte sich 1991 die Frage, ob Zytokine an der Pathogenese von ADPKD beteiligt sind⁵⁵. Daraufhin konnte Gardner in den Zystenflüssigkeiten von ADPKD-Patient:innen Interleukin 1 beta (IL-1b), Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α), Interleukin 2 (IL-2) und andere Immunproteine feststellen⁵⁵.

Mittlerweile sind verschiedene Faktoren bekannt, die bei der Pathogenese von PKD eine Rolle spielen. Einer dieser Faktoren ist die angeborene Immunität. Hierzu gehören Makrophagen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass in Zystennieren vermehrt Makrophagen zu finden sind, die proinflammatorische Zytokine aktivieren, welche für Tubuluszellverletzung, Proliferation und Zystogenese verantwortlich sind⁵⁶⁻⁵⁸. Makrophagen können in M1- und M2-Makrophagen aufgeteilt werden, wobei man grob sagen kann, dass M1-Makrophagen für die Eliminierung von intrazellulären Bakterien zuständig sind und proinflammatorisch agieren, M2-Makrophagen jedoch eher gegenteilig antiinflammatorisch handeln⁵⁹. Bei ADPKD-Patient:innen überwiegen M2-Makrophagen, was in verschiedenen Studien in-vivo an anderen chronischen Nierenerkrankungen sowie in-vitro an orthologen ADPKD Mausmodellen gezeigt werden konnte^{58,60}. Das ist insofern relevant, da M2-Makrophagen einen Einfluss auf die Krankheitsprogression in PKD durch Zystenepithelzellproliferation, Zystenwachstum und Fibrosierung nehmen können⁵⁷. IFN- γ ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches das Signalmolekül von Klasse M1a Makrophagen ist. Interferon gamma (IFN- γ) reguliert hierbei die Sezernierung von IL-1b, TNF- α , Interleukin 6 (IL-6) sowie Monozyten Chemoattractor Protein 1 (MCP-1)⁵⁹. M2-Makrophagen werden hauptsächlich durch Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 13 (IL-13) stimuliert. IL-4 hat den genau gegenteiligen Effekt von IFN- γ , denn IFN- γ steigert die Phagozytose und das Attackieren von intrazellulären Pathogenen, IL-4 reduziert beides⁵⁹. TNF- α ist ein von M1-Makrophagen sezerniertes proinflammatorisches Protein, welches eine Schlüsselfunktion in der Immunantwort und Inflammation ausübt. Des Weiteren hat TNF- α Einfluss auf die Renin Synthese, in dem es als Kontrollinstanz bei Gefäßproliferation und Gefäßkontraktion fungiert⁶¹. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass es nach hypertensiven Stress, makroskopischen und mikroskopischen Nierenverletzungen zu einer vermehrten TNF- α -Freisetzung kommt. Gefäßproliferation und hypertensiver Stress sind beides Pathologien, die auch mit ADPKD assoziiert sind⁵².

Die Migration von Monozyten aus dem Blut durch das Gefäßendothel ist ein Standardverfahren der immunologischen Überwachung von Geweben, neben der Antwort auf

Inflammation. Die Ausschüttung von Chemokinen erfolgt als Antwort auf ein Signal wie z.B. die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen. Die Hauptfunktion von Chemokinen ist die Regulation von Zell Trafficking. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Monozyten, Neutrophilen und Lymphozyten. MCP-1 (CCL2) gehört zu der Familie der CC Chemokine (*Chemotactic Cytokines*). Sie sind ein potenter chemotaktischer Faktor für Monozyten. CCL2 ist das erste Humane CC Chemokin, das je entdeckt wurde. Es liegt auf Chromosom 17, besteht aus 76 Aminosäuren und ist 13 kDa groß⁵³. Es hat noch 3 weitere Geschwister, MCP-2,-3,-4. Diese Chemokine binden an einen spezifischen Oberflächen Transmembran-Rezeptor, welcher mit einem heterotrimerischen G-Protein gekoppelt ist. Seine Aktivierung führt zur Initiierung einer intrazellulären Signalkaskade, die die Migration in Richtung der Chemokin Quelle auslöst. CCL2 wird von verschiedenen Zelltypen entweder konstitutiv oder nach Induktion durch oxidativen Stress, Zytokinen oder Wachstumsfaktoren produziert. Diese Zelltypen (Endothelzellen, Fibroblasten, Epithelzellen, glatte Muskelzellen, Mesangiumzellen, Astrozyten, Monozyten und Mikrogliazellen) sind wichtig für die antivirale Immunantwort im peripheren Gewebe und im Blut⁶². Jedoch sind Monozyten und Makrophagen die Hauptquelle von CCL2 und können dadurch die Migration und Infiltration von Monozyten, T-Gedächtniszellen und natürlichen Killerzellen am Ort des Geschehens regulieren⁵³. CCL2 verstärkt ebenso die Sekretion des antiinflammatorischen IL-4 aus T-Zellen, wodurch die zelluläre Immunantwort durch Mastzellhemmung beendet und die Initiierung der humoralen Phase eingeleitet wird⁵⁹.

In einer Studie von Nichols et. al (2004) konnten proangiogene Zytokine und Wachstumsfaktoren (vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (VEGF), MCP-1, Angiogenin, Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin 8 (IL-8)) in Leberzysten von ADPKD-Patient:innen nachgewiesen werden²⁷. Es zeigt sich, dass Wachstumsfaktoren wie VEGF und IL-8 in autokriner und parakriner Funktion aus Zellen sezerniert werden. Sie unterstützen dadurch das Zystenwachstum, in dem sie *Matrix-Remodelling*, Epithel-Proliferation und Angiogenese induzieren²⁷. Die beiden Zytokine IL-6 und IL-8 sind wichtige Mediatoren und Aktivatoren unseres angeborenen Immunsystems. IL-6 ist hierbei mit der direkten inflammatorischen Reaktion verknüpft⁶³. IL-8 verstärkt andererseits die Rekrutierung von Neutrophilen, führt zur chemotaktischen Stimulation von Endothelzellen sowie zur Proliferation von glatten Muskelzellen⁶³. In dieser Studie wurden die Einflüsse folgende Zytokine: IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, TNF- α , INF- γ und MCP-1 bei ADPKD-Patient:innen untersucht.

1.3 Bead-based-multiplex-Immunoassays

Die Luminex-Technologie oder *Bead-based-multiplex-Immunoassays*, haben sich in den letzten Jahren als wichtige Technologie für die Messung von Zytokinen und die Darstellung

diverser Zytokinmuster erwiesen. Sie ermöglichen die umfassende Darstellung des komplexen zellulären Signalnetzwerks des Immunsystems⁶⁴.

Zur Durchführung eines *Immunoassays* wird ein je nach Studienfrage angepasstes Testkit durch den jeweiligen Hersteller zur Verfügung gestellt. Jedes Testkit beinhaltet *Plastik-Beads*, welche mit fluoreszierender Farbe in verschiedenen Rot- und Infrarotstufen gefärbt wurden, wodurch jedes *Bead* eine individuell fluoreszierende Färbung besitzt. Die *Beads* einer einzelnen Identität, also mit derselben fluoreszierenden Färbung, werden an ihrer *Beadoberfläche* mit einem spezifischen *Capture-Antikörper* des gewünschten Zytokins konjugiert. Dadurch können individualisierte Zytokinsets gebildet werden, welche anschließend mit den jeweilig zu testenden biologischen Proben inkubiert und gewaschen werden. Anschließend wird ein Gemisch aus Detektions-Antikörpern, welche ebenso mit einer bestimmten Nachweisfarbe konjugiert wurden, in das *Bead-Proben-Gemisch* gegeben. Das Besondere der Detektions-Antikörper ist, dass sie für verschiedene Zytokine spezifisch sind. Der Nachweisfarbstoff ist jedoch bei allen Detektions-Antikörpern gleich⁶⁴. Im Anschluss wird das Gemisch erneut inkubiert und gewaschen und kann anschließend als *Single-Bead-Suspension* in einer Durchflussskammer, vergleichbar mit einer Durchflusszytometrie, analysiert werden. Ein roter Laser erregt die ursprünglich rot und infrarot fluoreszierenden Farben, wodurch das *Bead* zu seiner jeweiligen Klasse identifiziert werden kann. Anschließend erregt ein grüner Laser den nun an das *Bead* gebundenen Detektions-Antikörper, wodurch es ein Licht mit einer bestimmten Wellenlänge reflektiert. Die daraus entstandene Farbe, Intensität und Wellenlänge können somit auf die genauen Konzentrationen der gebundenen Zytokine im Testsubstrat schließen. Somit hat jedes *Bead*, welches durch die Durchflussskammer fließt, folgende Komponente: Einen an die *Bead-Oberfläche* konjugierten zytokinspezifischen *Capture-Antikörper*, eine an den *Capture-Antikörper gebundene* Menge des jeweiligen Zytokins aus der biologischen Probe und ein Detektions-Antikörper mit seinem Reporterfarbstoff, ebenso spezifisch für das entsprechende Zytokin⁶⁴. Die detaillierte Methodik ist unter dem Punkt 2.4.3 veranschaulicht.

Die Luminex-Immunoassays besitzen einen höheren Durchsatz an Proben pro Testung, was sich in einer kürzeren Arbeitsdauer widerspiegelt. Durch die Möglichkeit der Individualisierung der Test-Kits können präzise eigenständige Untersuchungen durchgeführt werden. Zusätzlich benötigen die Immunoassays nur ein niedriges Probenvolumen (50 µl). Daraus resultiert, dass aus einer Probe weitaus mehr Daten generiert werden können als bei anderen Verfahren⁶⁵.

1.4 Fragestellungen und Ziel der Arbeit

In den letzten Jahren haben sich viele Studien mit dem Verständnis der Pathophysiologie von ADPKD beschäftigt. Inflammation und Fibrose wurden als Kernmechanismen für das Voranschreiten dieser destruktiven Erkrankung erkannt und das Zusammenspiel von Chemokinen und Zytokinen als Verursacher identifiziert. Die Suche nach einem Marker, welcher eine frühe Vorhersage über die Progressionsgeschwindigkeit treffen und gleichzeitig ein mögliches Ziel für gezielte Therapien sein kann, steht im Mittelpunkt aktueller Forschung. Ebenso erhofft man sich durch das Verstehen der molekularen Sequenzen, welche die Zystenexpansion speisen, zielgerichtete Therapien zu kreieren, um das Zystenwachstum zu verlangsamen und den Krankheitsprogress zu stoppen. Die Bestimmung verschiedener humaner Zytokine in ADPKD erkrankten Personen könnte mit Hilfe bekannter klinischer Parameter dazu beitragen, frühe Nierenschäden zu detektieren, um den Ausgang dieser progredienten Nierenerkrankung positiv zu verändern.

In dieser Studie wird die Rolle von verschiedenen Chemokinen und Zytokinen, die mit der Progression von ADPKD im Zusammenhang stehen, in Bezug auf diverse klinischen Parametern dargestellt. Im Einzelnen sollen folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- Unterscheiden sich Zytokinmuster zwischen ADPKD-Patient:innen und gesunden Kontrollproband:innen?
- Spiegelt das Zytokinlevel das Stadium der ADPKD wider und gibt es Unterschiede zwischen den einzelnen Stadien? Sind Zytokine mit anderen Markern der Progression assoziiert?
- Welche klinischen Einflussgrößen bestimmen die Zytokinlevel bei ADPKD?

2. Material und Methoden

2.1 Materialliste

Folgende Reagenzien und Geräte wurden verwendet:

Detektions-Antikörper Diluent HB	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Standard Diluent HB	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Sample Diluent HB	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Assay Buffer	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Wash Buffer	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Streptavidin-PE	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Doppelt destilliertes H ₂ O	Aus der Leitung
Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Micotiterplatter 96 Well	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Safe-Lock Röhrchen 1,5ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	VWR, Darmstadt, Germany
Dichtungsband	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Handheld Magnetic Washer	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Bio-Plex 200 System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Bio-Plex Pro Human Cytokine Assay	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Zentrifuge Modell Z216MK	Hermlle Labortechnik, Wehingen, Deutschland
Rüttelplatte	IKA® MTS 2/4 multiwell plate shaker, Sigma-Aldrich Chemistries GmbH, Taufkirchen, Germany
Bio-Plex 200 Washing station	Bio-Plex Pro™ Wash Station, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Vortex (Vornado™ Vortex Mixer, 115V)	Benchmark Scientific, Edison, USA

2.2 Patient:innenkollektiv

Für diese Studie wurden retrospektiv 351 Patient:innen aus dem AD(H)PKD Register der Uniklinik Köln ausgewählt (ADPKD in Clinical Trials, NCT02497521) von welchen in dem Zeitraum von 11.11.2015 – 04.04.2018 eine Serumprobe vorhanden war. Die Patient:innen befanden sich zwischen dem 20. und 70. Lebensjahr, waren bereits mit ADPKD diagnostiziert und bereits mindestens einmal im Studienzentrum der Inneren Medizin II vorstellig.

Die Proband:innen unserer Kontrollgruppe setzten sich wie folgt zusammen: Wir wählten 30 randomisierte Personen aus einer Kohorte gesunder Proband:innen (registriert bei DRKS/

DRKS00014637) aus. Alle Teilnehmer:innen dieser Studie waren zum Zeitpunkt der Probenentnahme in einem guten klinischen Allgemeinzustand und hatten keine Zeichen einer akuten Infektion, waren kardiologisch und nephrologisch nicht vorerkrankt und nahmen bis auf ggf. L-Thyroxin keine Dauermedikamente ein. Diese 15 Frauen und 15 Männer befanden sich innerhalb derselben Altersspanne (20-70 Lebensjahr) wie unsere Studiengruppe. Die Proband:innen gaben zum Zeitpunkt ihres Studieneintritts diverse Blut-, Stuhl- und Urinproben ab, die unter identischen Konditionen und Protokollen wie die unserer ADPKD-Kohorte verarbeitet wurden.

Es lag sowohl eine schriftliche Einverständniserklärung von allen Studienteilnehmer:innen als auch ein positives Ethikvotum zur Verwendung von Bioproben aus beiden Kohorten für die beschriebenen Messungen vor (ist der Dissertation beigelegt).

2.3 Klinische Parameter

Die Studiengruppe wurde nach Mayo-Klassifikation, CKD-Stadium, htTKV, eGFR, Bluthochdruck, urologischen Vorerkrankungen, Genetik, Medikamenteneinnahme und laborchemischen Parametern eingeteilt. Die notwendigen Patient:innendaten wurden aus der vorliegenden elektronischen Patient:innenakte des Dokumentationsprogramm Orbis der Universitätsklinik Köln sowie der Kölner ADPKD Register Datenbank entnommen. Die eingeschlossenen Parameter beinhalten folgende Kategorien: Demographische Daten, Begleitsymptome, Labor und Medikamenteneinnahme.

2.3.1. Demografische Daten und klinische Eigenschaften

Die demographischen Daten umfassten die Variablen Alter und Geschlecht. Als Studienparameter wurde die Mayo-Klassen (1A, 1B, 1C, 1D, 1E) und das Stadium des Chronischen Nierenversagens (CKD) verwendet. Die Einteilung der Mayo-Klassen erfolgte entweder durch ein im Rahmen des Registereinschlusses durchgeführtes MRT oder anhand einer aktuellen durch den niedergelassenen Nephrologen angeordneten Bildgebung. Die Bildgebung wurden in Zusammenarbeit mit der Radiologie der Uniklinik Köln bearbeitet und volumetriert. Die Berechnung der Mayo-Klasse erfolgte unter Verwendung des *Kidney Volume Calculator* anhand der Ellipsoidgleichung⁶⁶.

Die CKD-Stadien werden nach entsprechender Leitlinie, publiziert durch den Internationalen Verband „*Kidney Disease – Improving Global Outcomes (KDIGO)*“, in CKD-G- und A-Klassen unterschieden. Die G-Klassen sind durch die eGFR definiert. G1 steht hier für eine normale Nierenfunktion $GFR \geq 90$ ml/min, G2 für $GFR 90-60$ ml/min, G3 wird in 3a) $45-60$ ml/min und

3b) 30-45 ml/min unterteilt, G4 15-30 ml/min, und G5 mit GFR <15 ml/min steht für ein totales Nierenversagen. Die CKD-A Klasse entspricht der gemessenen Albuminurie pro Tag und wird in drei Klassen eingeteilt. A1 ergibt einer Albuminurie von <30mg/Tag, A2 zwischen 30-300mg/Tag und A3 >300mg/Tag. Um ein möglichst breites und ausgeglichenes Patient:innenkollektiv darzustellen, wurden die Patient:innen in fünf Altersgruppen unterteilt. Gruppe 1: jünger als 30 Jahre, Gruppe 2: zwischen 30-39,9 Jahren, Gruppe 3: 40-49,9 Jahren, Gruppe 4: 50-59,9 Jahren und Gruppe 5: Patient:innen über dem 60 Lebensjahr. Ziel war es, ein ausgeglichenes Verhältnis an Frauen und Männern in unserer Studienpopulation abzubilden.

2.3.2. Begleitsymptomatik

Die arterielle Hypertonie ist definiert als dauerhaft über 140/90mmHg erhöhte Blutdruckwerte. Patient:innen mit einer positiven Hypertonie-Anamnese wurden wie folgt klassifiziert:

- Erstdiagnose vor dem 35. Lebensjahr
- Erstdiagnose ab dem 35. Lebensjahr
- Alter zum Zeitpunkt der Diagnose unbekannt

Nach diesem Prinzip wurde auch die urologische Symptomatik integriert.

- Erstdiagnose vor dem 35. Lebensjahr
- Erstdiagnose ab dem 35. Lebensjahr
- Alter zum Zeitpunkt der Diagnose unbekannt

Die urologische Symptomatik wurde definiert in: Hämaturie, Flankenschmerzen, Zysteninfektion und Nierensteine. Eine weitere Begleitsymptomatik sind Leberzysten. Da Leberzysten häufig im Rahmen des aggressiven Phänotyp *PKD1* auftreten, wurden diese als Begleitsymptomatik mit abgefragt.

2.3.3. Laborparameter

Im Rahmen der Erstvorstellung erfolgte eine Routine Blut- und Urin-Abnahme, die durch die Abteilung für klinische Chemie der Universitätsklinik Köln nach entsprechenden Standard ausgewertet wurde. Folgende Parameter spielen in unserer Studie eine Rolle:

- Proteinurie
- Leukozytenzahl im Urin
- eGFR zum Zeitpunkt der Probenentnahme.

Die eGFR wurde nach der CKD-EPI Formel berechnet.

2.3.4. Genetik

Genetisch differenzierten wir unsere Studiengruppe in:

- *PKD1* trunkierend
- *PKD1* nicht-trunkierend
- *PKD2*
- nicht bekannt

Unter „nicht bekannt“ wurden Patient:innen zusammengefasst, die eine andere Mutation z.B. *PKHD*, *GANAB* besitzen, Patient:innen ohne nachgewiesene Mutation und Patient:innen ohne Angaben in unserer Datenbank. Die Genetik wurde entweder anamnestisch erfasst oder es erfolgte eine Testung durch die Humangenetische Abteilung der Universitätsklinik Köln.

2.3.5. Medikamenteneinnahme

Im Rahmen der Erstvorstellung erfolgte eine Medikamentenanamnese. Die Medikamente, welche zum Zeitpunkt der Serumabnahme eingenommen wurden, sind wie folgt gruppiert:

- Cholesterinsenker, z.B. Statine
- Schmerzmedikation, z.B. nicht steroidale Antirheumatika, Opioide
- Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS)

Als zusätzliche Variable wurde Tolvaptan zum Zeitpunkt der Probenentnahme hinzugefügt.

2.4 Methodik

Sämtliche Informationen über die beschriebenen Testverfahren stammen vom jeweiligen Hersteller und den im jeweiligen Kit enthaltenen Bedienungsanleitungen, wenn nicht anders angegeben.

2.4.1. Probengewinnung - Asservierung Blut

Die Blutproben (3-5ml) wurden bei der Erstvorstellung von einer Studienassistentin abgenommen und durch die Abteilung für Klinische Chemie der Universitätsklinik Köln wie folgt prozessiert: Die Proben wurden für 15 Minuten bei 4°C 1000x zentrifugiert, anschließend wurde das überstehende Serum abgenommen und als 50µl Aliquot inklusive eines 1-2ml Restbestandes bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren. Nach Einverständnis der Patient:innen zur Studienteilnahme und in Kooperation mit dem Nephrolab Köln wurden die Proben anschließend von der Technischen Laborassistentin über Eis aufgetaut. Davon wurden anschließend ein 50µl Aliquot sowie ein Restaliquot mit ca. 1-2,5ml abgefüllt, beschriftet und bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.4.2. Probengewinnung - Asservierung Urin

Die Urinproben (ca. 150ml Mittelstrahl Urin) wurden ebenfalls am Tag der Erstvorstellung abgenommen und innerhalb von einer Stunde nach Entnahme abgeholt und in das Nephrolab Köln gebracht. Dort wurde initial 3ml Vollurin separiert und bei -80°C gelagert. Die restlichen etwa 120ml wurden nach der Zugabe von 1,2ml PMSF 100mM; 1,2 ml EGTA 200mM + NaN₃ 600mM bei 17.000 G, bei 4°C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt in 50µl Aliquots abgefüllt und bei -80°C aufbewahrt.

2.4.3. Multiplex-Immunoassay

Die Konzentrationsbestimmung der Zytokine IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IFN- γ , TNF- α , MCP-1 erfolgte in Kooperation mit dem Zentrum für Molekulare Medizin Köln (AG Mahabir-Brenner). Die Aliquots wurden auf Eis in das Zentrum gebracht, dort ebenso bei -80°C zwischengelagert und innerhalb von fünf Tagen verarbeitet. Die Testung der acht Urin und der 233 Serumproben erfolgte mit einem individualisierten *Bio-Rad Bio-Plex Pro Human Cytokine Assay* durch das Bio-Plex-200-System. Jede Probe wurde als Duplikat getestet. Die Proben wurden auf sieben Platten verteilt.

2.4.4. Vorbereitung der Testung

Um eine erfolgreiche Testung zu generieren, wurden folgende Maßnahmen getroffen: Das Bio-Plex-200-System wurde kalibriert und durchlief sein „Warmup“. *Assay Buffer*, *Wash Buffer*, Detektion Antikörper HB, Standard Diluent HB und Sample Diluent wurden auf Raumtemperatur gebracht und alle anderen Reagenzien auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Proben über Eis aufgetaut, mit dem Sample Diluent im Verhältnis 1:4 verdünnt und 15 Minuten bei 1000xg zentrifugiert. Währenddessen erfolgte die Präparation des *Wash Buffer*. Der *Wash Buffer* wurde von einer Konzentration 10X Stammlösung auf 1X Gebrauchslösung verdünnt. Dann nahmen wir 60ml des konzentriertem *Wash Buffers* und verdünnten diesen mit 540ml doppelt destilliertem Wasser. Nun folgte die Vorbereitung der humanen Zytokin Standards. Dafür wurden die Standard Vials mit 250µl Standard Diluent aufgelöst. Hierbei war auf Rückstände am Deckel zu achten, die gegebenenfalls mit aufgenommen werden mussten. Im Anschluss wurde das Vial für 5 Sekunden gevortext und anschließend 30 Minuten auf Eis inkubiert.

Die Herstellung der acht Standards erfolgte wie folgt: In Röhrchen 1 (S1) wurde 250µl Standard Gebrauchslösung pipettiert. S1 war somit fertig und musste nicht verdünnt werden. In den Röhrchen 2-8 und Röhrchen „Blank“ wurden nun jeweils 150µl Standard Diluent pipettiert. Hierauf folgte die Ansetzung der Standards 2-8, indem wir 50µl aus dem vorherigen

Standard (50µl aus S1 in S2) in den darauffolgenden Standard pipettiert (siehe Abbildung 2). Um eine vollständige Mischung zu garantieren, wurden die einzelnen Standards 10x pipettiert und fünf Sekunden gevortext.

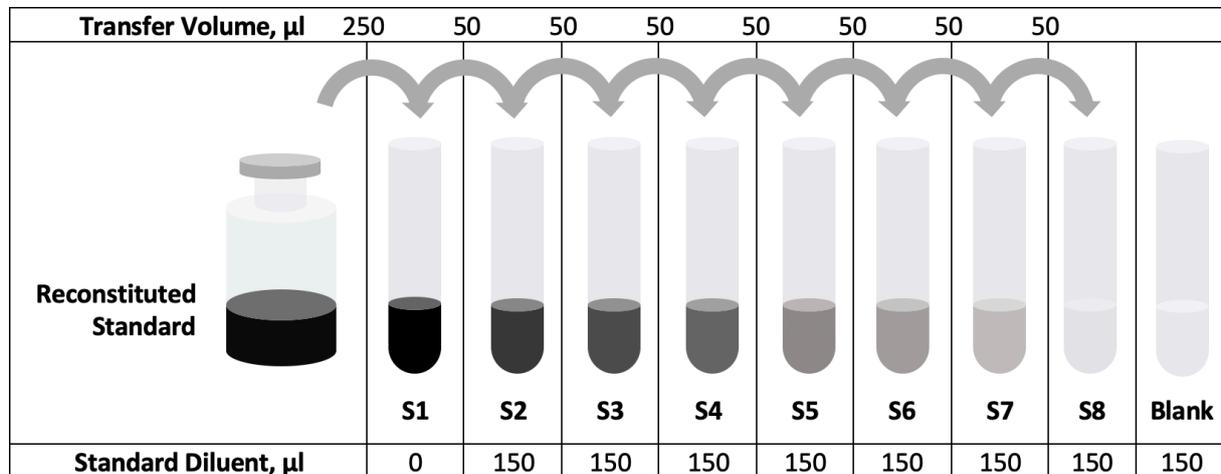


Abbildung 1: Vorbereitung der Zytokin Standards.

Das Bild ist modifiziert nach Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA⁶⁷

Der letzte Schritt bezüglich der Vorbereitung war das Herrichten der magnetischen *Beads*. Auch hier verdünnen wir 10X der Stammlösung auf 1X Gebrauchslösung. Dafür wurde das *Beads-Vial* (10X) für 30 Sekunden gevortext und 570µl dieser *Bead-Lösung* mit 5130µl Assay-Buffer in ein separates Röhrchen aufgefüllt.

2.4.5. Durchführung der Testung

Das Vial mit der *Beads-Gebrauchslösung* wurde für 10-20 Sekunden gevortext und mittels Multikanalpipette in ein passendes Reservoir überführt. Danach wurden 50µl *Bead-Gebrauchslösung* pro Well auf die Mikrotiterplatte pipettiert, die Platte für zwei Minuten im Handwascher platziert und anschließend zweimal mit jeweils 100µl *Wash Buffer* pro Well gewaschen. Nach diesem Wasch Zyklus wurden 50µl/Well der Standards, *Blanks* und Proben pipettiert und die Platte mit einer Folie zugeklebt. Die versiegelte Platte wurde nun bei Raumtemperatur für 30 Minuten bei 850rpm (+/- 50rpm) geschüttelt. In dieser Zeit wurde der Detektions-Antikörper vorbereitet, auch hier wurde dasselbe Verdünnungsverhältnis (10X Stammlösung auf 1X Gebrauchslösung) verwendet. Deshalb wurde 300µl Detektions-Antikörper mit 2700µl Detektions-Antikörper Diluent in einem separaten Röhrchen aufgefüllt. Nach dem die Platte nach 30 Minuten von der Rüttelplatte entfernt werden konnte, wurde sie nun dreimal mit jeweils 100µl *Wash Buffer* pro Well manuell per Hand gewaschen. Anschließend wurde die Detektions-Antikörper-Gebrauchslösung kurz gevortext und 25µl der

Lösung in jedes Well pipettiert. Die Platte wurde wieder mit einer Folie verklebt und wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur bei 850rpm (+/- 50rpm) geschüttelt. Die Wartezeit wurde genutzt um die Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) Gebrauchslösung herzustellen. Die Stammlösung 100X wurde dafür auf 1X Gebrauchslösung verdünnt. Zuerst wurde die konzentrierte Stammlösung fünf Sekunden gevortext und kurz zentrifugiert. Danach wurden 60µl SA-PE Stammlösung mit 5490µl Assay-Buffer in einem separaten Röhrchen verdünnt. Das fertige Röhrchen wurde anschließend lichtgeschützt aufbewahrt. Nach 30-minütigem Schütteln erfolgte das dreimalige manuelle Waschen mit 100µl *Wash Buffer/Well*. Die SA-PE-Gebrauchslösung wurde kurz gevortext und 50µl Gebrauchslösung pro Well auf die Platte pipettiert. Die Platte wurde wieder mit Folie versiegelt und 10 Minuten bei Raumtemperatur bei 850rpm (+/- 50rpm) geschüttelt. Hierauf folgte zum letzten Mal das dreimalige manuelle Waschen mit 100µl *Wash Buffer/Well*. Im vorletzten Schritt wurde nochmal 125µl Assay Buffer/Well pipettiert, die Platte anschließend mit Folie beklebt und 30 Sekunden bei Raumtemperatur bei 850rpm (+/- 50rpm) geschüttelt. Die Platte war nun fertig und konnte mit Bio-Plex 200 System ausgewertet werden. Dieser Prozess wurde für alle sieben Platten wiederholt.

2.4.6. Auswertung der Testplatten

Die fertigen sieben Platten (mit der Seriennummer: LX10013203401; Assay Lot: 64222530; Standard Lot: 64186300; Ablaufdatum: 10 April 2022) konnten nun mittels Bio-Plex 200 System durch die Bio-Plex Manager Software ausgewertet werden. Die Ausgabe erfolgte pro Platte als Excel-Datei. Für die Quantifizierung der Probe wird eine Standardkurve bzw. Kalibrationsgerade, bestehend aus sieben Verdünnungsstufen erstellt. Die Konzentration der Probe muss innerhalb der Standardkonzentrationen liegen, um adäquat quantifiziert werden zu können. Zur Veranschaulichung siehe Abbildung 2, welche die Standardkurven für die TNF- α Konzentration darstellt.

Standardkurve TNF- α Platte 1-7

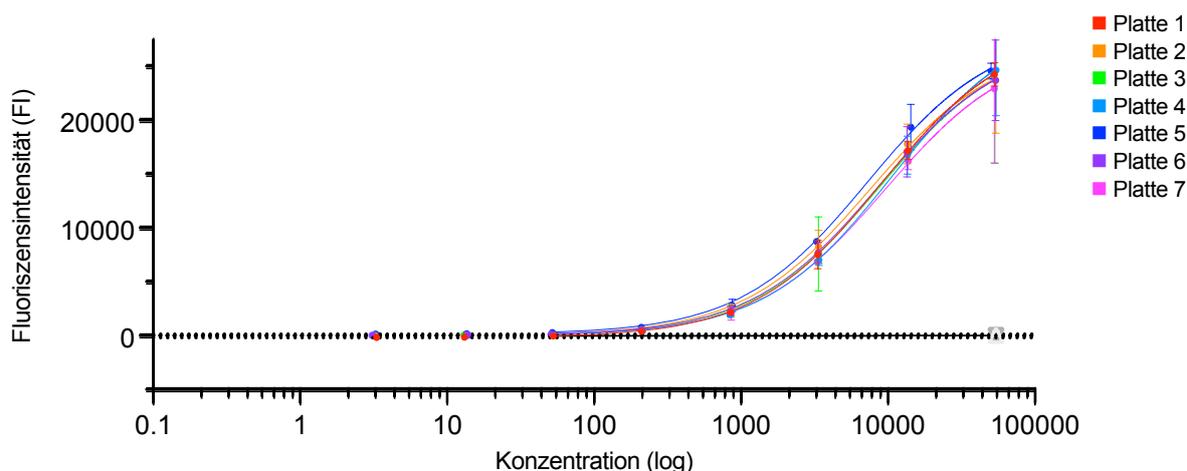


Abbildung 2: Standardkurve der TNF- α Konzentration Platte 1-7 in pg/L

Die Standardkurve beinhaltet TNF- α Konzentrationen der ADPKD- und der Kontroll-Kohorte.

TNF- α , Tumor Nekrose Faktor alpha

2.4.7. Umgang mit Ergebnissen unterhalb des Detektionsminimums

Bei einer Vielzahl der Messergebnisse wurden Messwerte bestimmt, welche unterhalb des vom Hersteller bestimmten Ergebnisspektrums liegen. Diese Messwerte befinden sich an der unteren Messwertgrenze und stellen sich als mit einem Sternchen markierten Zahlenwert dar. Das bedeutet, dass die Konzentration dieser Messwerte niedriger als der Standard, aber vom Messgerät als Konzentration detektierbar ist. Diese Messwerte werden als „*under the Detectionlimit*“ (UDL) beschreiben. Zusätzlich gibt es Messergebnisse, die komplett außerhalb der jeweiligen Zytokinmesswertspanne liegen. Diese Werte werden von dem Bio-Plex 200 Gerät nicht mehr als Zahlenwert dargestellt, sondern mit einem Sonderzeichen „Out Of Range“ (<OOR) ersetzt. Um eine Verzerrung der Testergebnisse durch Elimination dieser Werte zu vermeiden, wird sich für folgende Lösung entschieden: Für Parameter mit mehr als 50% der erreichten Ergebnisse unter dem Detektionsminimum (UDL+<OOR) wird dieser (UDL) mit in die Statistik einbezogen (s. Tabelle 1). Für Zytokine mit weniger als 50% der Ergebnisse unter dem Detektionsminimum werden die UDL Ergebnisse nicht mit einbezogen und mit dem in Tabelle 2 aufgelisteten Parameterminimum ersetzt. Bei IL-4 ergibt die Testung nur einen aussagekräftigen Wert innerhalb Zytokinmesswertspanne, wodurch dieser Parameter nicht mit in die Statistik aufgenommen wird. In die initiale Ergebnisdiskussion wird dieser Wert jedoch miteingeschlossen. Die Zytokin-Messwerte sind alle in pg/L angegeben. Zusätzlich werden Zytokine mit einem <OOR von über 90% der Gesamtmessergebnisse nicht in die weitere statistische Analyse mit aufgenommen.

>50% UDL Ergebnisse	<50% UDL Ergebnisse	Unverwertbar, da N < 10%
IL-1b	IL-8	IL-4
IL-2	IFN- γ	IL-2 (Kontrolle)
IL-6	MCP-1	IL-1b (Kontrolle)
IL-10	TNF- α	IL-10 (Kontrolle)
IL-13		IL-13 (Kontrolle)

Tabelle 1: Gruppeneinteilung

In Spalte 1 sind Zytokine aufgelistet, in denen mehr als 50% der Messergebnisse unterhalb des Detektionslimits (**UDL**) lagen. Spalte 2 zeigt die Gruppe in denen mehr als 50% der Messergebnisse innerhalb des Testbereichs lagen. In Spalte 3 sind die Zytokine gelistet, welche aufgrund von fehlenden Messergebnissen innerhalb der Messwertspanne, N<10% ausgeschlossen werden mussten.

IL-1b, Interleukin 1b; IL-2, Interleukin 2; IL-4, Interleukin 4; IL-6, Interleukin 6; IL-8, Interleukin 8; IL-10, Interleukin 10; IL-13, Interleukin 13; IFN- γ , Interferon Gamma; MCP-1, Monozyten Chemoattraktor Protein 1; TNF- α , Tumor Nekrose Faktor Alpha

2.4.8. Bestimmung des Parameterminimums

Um die <OOR-Werte mit in die Statistik einzubeziehen, werden bei Zytokinen mit mehr als 50% <OOR-Werten, die UDL-Werte angenommen und die restlichen <OOR-Werte mit 10% des Detektionslimits (Mittelwert aus dem verdünntesten Standard aller Platten) als OOR Wert ersetzt. Bei den Zytokinen mit weniger als 50% <OOR-Werten werden die UDL-Werte ausgeschlossen und alle mit dem regulären Detektionslimit ersetzt.

Biomarker	Detektionslimit (pg/l)	10% des DL (pg/l)	CIR/ UDL*/OOR ADPKD (N)	CIR/UDL*/OOR Kontrolle (N)
IL-1b	0,29	0,03	2/8/223	0/1/29
IL-2	1,53	0,15	2/27/204	0/1/29
IL-4	0,19	0,02	1/3/229	0/0/30
IL-6	0,36	0,04	96/34/103	6/12/12
IL-8	0,87	∅	229/4/0	24/4/2
IL-10	1,38	0,14	5/38/190	0/2/28
IL-13	0,34	0,03	3/62/167	0/7/28
IFN- γ	0,86	∅	159/67/6	18/10/2
MCP-1	0,54	∅	233/0/0	30/0/0
TNF- α	3,21	∅	195/28/4	17/12/1

Tabelle 2: Parameterminimum

Die UDL Ergebnisse von IL-1b, IL-2, IL-6, IL-10, IL-13 wurden übernommen und die fehlenden OOR-Werte mit 10% des Detektionslimit ersetzt. Die UDL Ergebnisse und die OOR- Werte der Zytokine IL-8, INF- γ und TNF- α wurden mit dem Detektionslimit ersetzt.

DL, Detektionslimit; UDL, Unterhalb des Detektionslimits; CIR, Ergebnis liegt im Testbereich; OOR, Ergebnis liegt nicht im Testbereich; IL-1b, Interleukin 1b; IL-2, Interleukin 2; IL-4, Interleukin 4; IL-6, Interleukin 6; IL-8, Interleukin 8; IL-10, Interleukin 10; IL-13, Interleukin 13; IFN- γ , Interferon Gamma; MCP-1, Monozyten Chemoattraktor Protein 1; TNF- α , Tumor Nekrose Faktor Alpha

2.5 Literaturrecherche

Die Literaturrecherche fand über PubMed, Livivo und Web of Science von Juli 2018 bis Dezember 2021 statt. Folgende Schlüsselwörter wurden bei der Suche verwendet: "Autosomal dominant polycystic kidney disease", "ADPKD", "Cysts/*diagnosis/, epidemiology/*genetics", "Cytokine/Pathophysiology", "Fibrosis/Immunology", "Inflammation/*pathology", "Polycystic Kidney", "Autosomal Dominant/ *diagnosis/ *genetics" und "Autosomal dominant kidney disease UND human cytokines". Der Fokus lag auf kürzlich erschienen Publikationen mit dem Schwerpunkt Zytokine und ihre Rolle im Krankheitsverlauf von ADPKD.

2.6 Statistische Auswertung

Im Anschluss an die deskriptive Evaluation der oben genannten Parameter erfolgt die statistische Auswertung mit IBM SPSS 28 im Zusammenspiel mit einer statistischen Beratung im Rahmen der Graduiertenschule durch das Institut für Medizinische Statistik und Bioinformatik (IMSB) sowie die grafische Darstellung mit GraphPad9.

Nachdem der Großteil der Messungen in der Kontrollgruppe sowie der ADPKD-Kohorte gemäß Analyse mittels Shapiro-Wilk-Test in nicht-normalverteilten Datensätzen resultiert (Shapiro-Wilk-Test $<0,05$), erfolgten die im folgenden dargestellten Tests:

Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman

Mit der Rangkorrelation nach Spearman wird der Frage nachgegangen, ob es eine Korrelation innerhalb der Zytokin Variablen „IL-1b; IL-2; IL-6; IL-8; IL-10; IL-13; IFN- γ ; MCP-1; TNF- α “ der ADPKD-Kohorte und der Kontrollgruppe gibt. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rank beurteilt die monotone Beziehung zwischen zwei kontinuierlichen Variablen. Die Nullhypothese H_0 lautet hier: Es gibt keinen Zusammenhang zwischen den einzelnen Zytokinen in der ADPKD- Gruppe als auch in der Kontrollgruppe.

Mann-Whitney-U-Test

Mit dem Mann-Whitney-U-Test wird der Frage nachgegangen, ob die Gruppen „Patient“ und „Kontrolle“ sich hinsichtlich ihrer Zytokinkonzentrationen unterscheiden. Dieser Test kann

immer nur 2 Gruppen miteinander vergleichen und testet in diesem Fall zwischen den unabhängigen Gruppen 1. Patient und 2. Kontrolle. Die Nullhypothese H_0 lautet hier: Es gibt keinen Unterschied in Bezug auf die Zytokinkonzentration zwischen ADPKD-Patient:innen und Kontrollproband:innen. Untersucht wird ebenso, ob sich die Gruppen „weiblich“ und „männlich“ in den Untergruppen, ADPKD-Kohorte und der Kontrollgruppe hinsichtlich der Zytokinkonzentrationen unterscheiden. Auch in diesem Fall werden die zwei unabhängigen Untergruppen 1.männlich und 2. weiblich miteinander verglichen. Die Nullhypothese H_0 lautet hier: Es gibt keinen Unterschied bezüglich der Zytokinkonzentrationen zwischen weiblichen und männlichen ADPKD-Patient:innen/Kontrollproband:innen.

Kruskal-Wallis-Test

Mit dem Kruskal-Wallis-Test wird der Frage nachgegangen, ob sich die zentralen Tendenzen der unabhängigen Stichproben (Zytokinkonzentration) in der Studien- und Kontroll-Kohorte durch die stetige Variable Alter unterscheiden. Die Nullhypothese H_0 lautet: Es gibt in Bezug auf die zentralen Tendenzen keinen Unterschied in den verschiedenen Altersgruppen der Kontroll-und Testkohorte. Ein weiterer Aspekt, der beleuchtet wird, ist, ob es einen Unterschied in der Zytokinkonzentration der ADPKD-Kohorte je nach Mayo-Klasse gibt. Hier lautete die Nullhypothese H_0 : Es gibt keinen Unterschied in den Zytokinkonzentrationen der ADPKD-Kohorte je nach Mayo-Klasse. Des Weiteren untersuchen wir mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests, ob die Nierenfunktion in Form des CKD-G-Stadiums einen Einfluss auf die Zytokinkonzentration hat. Hier lautete die Nullhypothese H_0 : Es gibt keine Unterschiede in der Zytokinkonzentration der ADPKD-Kohorte anhand des CKD-G-Stadiums. Abschließend betrachten wir die Testplatten und Ihren Einfluss auf die Zytokinkonzentrationen. Hier lautete die Nullhypothese H_0 : Es gibt keinen Unterschied in der Zytokinkonzentration der ADPKD-Kohorte je nach Testplatte.

Dunn-Bonferroni-Tests

Mit Hilfe des post-hoc Test können die jeweiligen signifikanten Untergruppen dieser Fragestellungen identifiziert werden. Das Level für statistische Signifikanz wird auf einen p-Wert von $<0,05$ gesetzt. Die Effektstärke r der signifikanten Ergebnisse wird mittels Cohen⁶⁸ getestet. Cohen ist in die folgenden Effektgrenzen definiert:

- 0,1-0,3 (schwach)
- 0,3-0,5 (mittel)
- $>0,5$ (stark).

Multiple Lineare Regression

Mit der Multiplen Regressionsanalyse wird der Frage nachgegangen, ob es einen Zusammenhang zwischen den drei Prädiktoren (Mayo-Klasse, Geschlecht, CKD-Stadium) und der abhängigen Variable (TNF- α) gibt. Die Nullhypothese H_0 lautet: Es gibt keinen Einfluss der drei Prädiktoren auf die abhängige Variable.

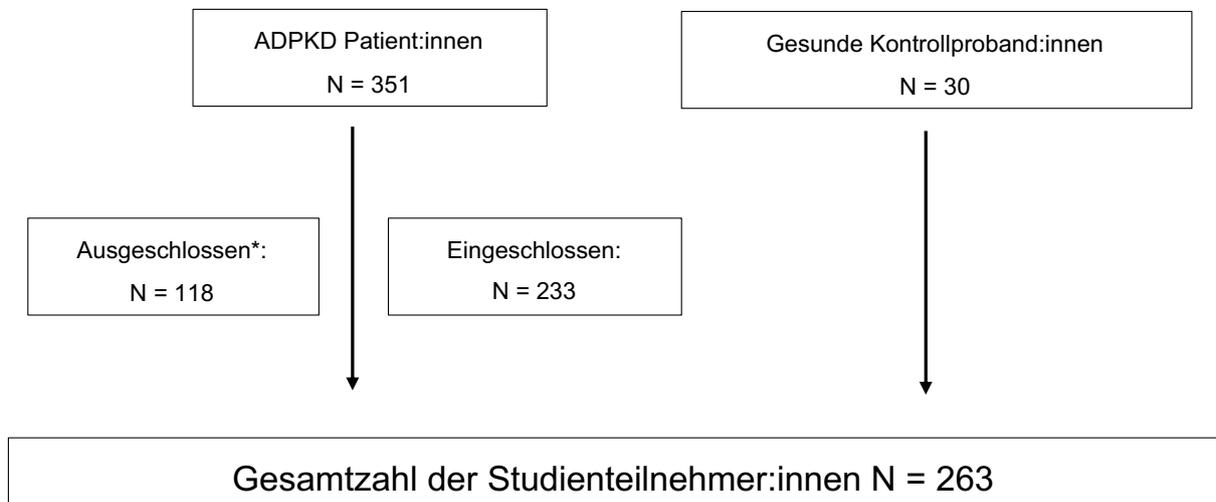
Die Grenzwerte für die Rangbildung der Gruppen gelten im Allgemeinen für die Auswertung der gesamten Studie. Sowohl für die Tests auf Ungleichheiten als auch auf die Korrelationstests wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ bestimmt. Demzufolge gilt: Wenn $p < 0,05$, wird die Nullhypothese abgelehnt und die Alternativhypothese (H_1) angenommen. Wenn $p \geq 0,05$ wird die Nullhypothese angenommen.

Die Signifikanzlevel sind wie folgt eingeteilt: * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$, **** $<0,0001$.

3. Ergebnisse

3.1 Auswahl der Studienteilnehmer:innen

Zunächst wurden 80 ADPKD-Patient:innen aufgrund von fehlenden Daten (Proteinurie / fehlende Labornummer) aus der Studie ausgeschlossen. Es verblieben 125 weibliche und 108 männliche ADPKD-Patient:innen in der Studie. Die restlichen 271 Patient:innen wurden nach Alter, Geschlecht, Mayo-Klasse und CKD-Stadium in ähnlich große Gruppen sortiert. Die Untersuchungsmethode mittels *Luminex-Immunoassay* ließ aufgrund von Kapazitätsgründen nur die Testung von 273 Proben zu (7 Platten mit je 96 Valves, 18 Standards, Doppeltestung). Diese 273 Plätze teilten wir wie folgt auf: 233 ADPKD-Patient:innen, 30 Kontrollproband:innen, 8 Urinproben von 8 weiblichen ADPKD Patientinnen und 2 doppelte Testungen auf unterschiedlichen Testplatten als Kalibrator.



*Einschlusskriterien: vorhandene Serumprobe, keine akute Infektion, Leukozyten (E9/l) <15

Abbildung 3: Studienpopulation

ADPKD, autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung

3.2 Deskriptive Statistik

Die ADPKD-Kohorte besteht aus 233 Patient:innen, die Kontrollgruppe aus 30 Proband:innen und wurde der ADPKD-Kohorte entsprechend Alter und Geschlecht zugeordnet. Hinsichtlich der basalen Charakterisierung der Patient:innen wurde der Fokus auf ADPKD entscheidende Parameter gelegt. Insbesondere liegt der Fokus auf der Darstellung der Nierenfunktion und dessen Einflussgrößen sowie der Veranschaulichung der unterschiedlichen Krankheitsstadien. Diese werden gesammelt in Tabelle 3 aufgeführt.

Das Alter der ADPKD-Kohorte zeigt einen Median von 45,32 Jahren und eine Altersspanne von 18 bis 69,9 Jahren. Die Kontrollgruppe weist einen Median von 43,71 Jahren und eine Altersspanne von 22,42 bis 66,33 Jahren auf. Ein Großteil der Patient:innen (37,8%) sind in der Mayo-Klasse 1C klassifiziert und befinden sich im CKD-Stadium G2 (35,6%), A1 (67,4%). Tolvaptan nehmen zum Zeitpunkt des Studieneintritts nur 11,6% der ADPKD-Patient:innen ein. Die Mehrheit der Studienpopulation zeigt eine zufriedenstellende Nierenfunktion mit einer durchschnittlichen eGFR von 64ml/min/1.73m². In dieser Studienkohorte weist 85,8% zum Zeitpunkt des Studieneintritts eine arterielle Hypertonie auf. Die Patient:innen sind bei der Befragung gebeten worden, das Alter zum Zeitpunkt ihrer Hypertonie-Erstdiagnose anzugeben. Hier zeigt sich, dass 103 Patient:innen der Hypertoniepatient:innen vor und 97 Patient:innen nach dem 35.Lebensjahr mit einer arteriellen Hypertonie diagnostiziert wurden. 91,8% stehen außerdem unter einer antihypertensiven Therapie. Davon nehmen 76,0% RAAS-Blocker (ACE-Hemmer, AT1-Blocker) ein. In diesem ADPKD-Patient:innenkollektiv zeigt sich, dass 72,5% über frühe urologische Symptome klagen, diese traten bei 97 Patient:innen vor und 71 Patient:innen nach dem 35 Lebensjahr auf. Leberzysten wurden bei 85 ADPKD-Patient:innen in entsprechenden Bildgebungen beschrieben.

Charakteristika	ADPKD	Kontrolle	N
Alter (Jahre), min / max	18,0 / 69,90	22,42 / 66,33	263
Median [Q1, Q3]	45,42 [36,29; 52,08]	43,71 (31,11-53,98)	
weiblich, N (%)	125 (53,6%)	15 (50%)	263
männlich, N (%)	108 (46,4%)	15 (50%)	
Mayo-Klasse	N (%)		
1A	3 (1,3%)		233
1B	55 (23,6%)	∅	
1C	88 (37,8%)		
1D	60 (25,8%)		
1E	27 (11,6%)		
htTKV [ml/m], min / max	229,70 / 5866,10		231
Median [Q1, Q3]	883,60 [524,00; 1334,50]	∅	
CKD G - eGFR	N (%)		
1 eGFR > 90 ml/min/1.73m²	55 (23,6%)		233
2 eGFR 60-89 ml/min/1.73m²	83 (35,6%)		
3a eGFR 45-59 ml/min/1.73m²	47 (20,2%)	∅	
3b eGFR 30-44 ml/min/1.73m²	2 (0,9%)		
4 eGFR 15-29 ml/min/1.73m²	46 (19,7%)		
5 eGFR 15-0 ml/min/1.73m²			
CKD A - Albuminurie	N (%)		
1 <30mg/Tag	157 (67,4%)		218
2 30-300mg/Tag	56 (24,0%)	∅	
3 >300mg/Tag	5 (2,1%)		
eGFR [ml/min/1.73m²], min/max	27 / 126		233
Median [Q1, Q3]	64,00 [46,00; 88,00]	∅	
Genotyp	N (%)		
<i>PKD1 trunkierend</i>	71 (30,5%)		233
<i>PKD1 nicht-trunkierend</i>	35 (15,0%)	∅	
<i>PKD2</i>	37 (15,8%)		
<i>Nicht bekannt</i>	90 (38,9%)		
Arterielle Hypertonie	N (%)		
ja, nein	200 (85,8%), 33 (14,2%)	∅	233
<35 LJ, ≥35 LJ	103 (44,2%), 97 (41,6%)		
Urologische Symptome	N (%)		
ja, nein	169 (72,5%), 64 (27,5%)	∅	233
<35 LJ, ≥35 LJ, Alter unbk.	97 (41,6%), 71 (30,5), 1 (0,4%)		
Leberzysten	N (%)		
ja, nein, nicht bekannt	85 (36,5%), 35 (15,0%), 113 (48,5%)	∅	233

Tolvaptan	N (%)	∅	233
ja, nein	27 (11,6%), 206 (88,4%)		
Antihypertensiva	N (%)	∅	233
ja, nein	214 (91,8%), 19 (8,2%)		

Tabelle 3: Darstellung der demografischen Daten und klinischen Eigenschaften der ADPKD- und Kontroll-Kohorte

htTKV, height adjusted Total Kidney Volume; CKD, Chronische Nierenerkrankung; eGFR, geschätzte Glomeruläre Filtrationsrate; RAAS, Renin Angiotensin Aldosteron System, ADPKD, autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung

3.2.1. Geschlechter- und Altersverteilung

Um eine möglichst ausgeglichene Kohorte darzustellen und eine repräsentative Studienpopulation abzubilden, wurde eine ähnliche Anzahl an männlichen und weiblichen Patient:innen ausgewählt. Die Kohorte besteht aus 108 männlichen ADPKD Patienten und 125 weiblichen ADPKD-Patientinnen (siehe Abbildung 4).

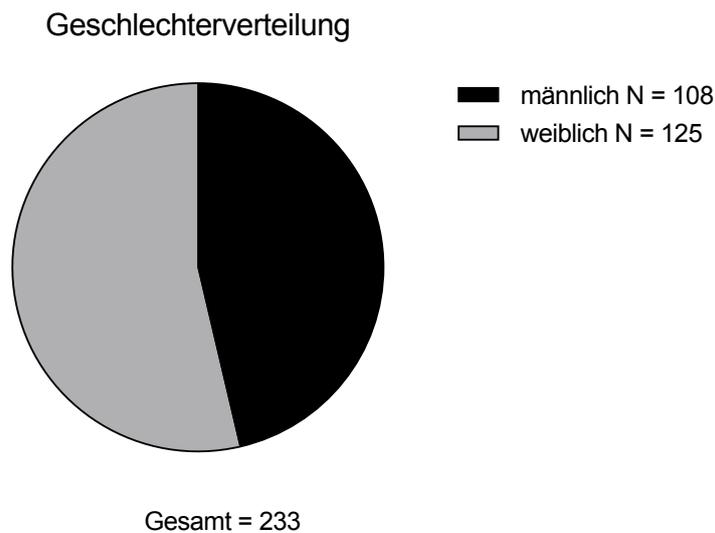


Abbildung 4: Geschlechterverteilung der ADPKD-Kohorte

Die Altersverteilung der Studien- und Kontroll-Kohorte wird als Boxplot in *Abbildung 5* dargestellt. Die Tertilen der Kontrollgruppe befinden sich bei 31,13, Median 43,75 und 53,98 Jahren. Die Verteilung der ADPKD-Kohorte zeigt sich mit der unteren Tertile bei 36,3, der Median 45,42 und die obere Tertile bei 52,08 Jahren.

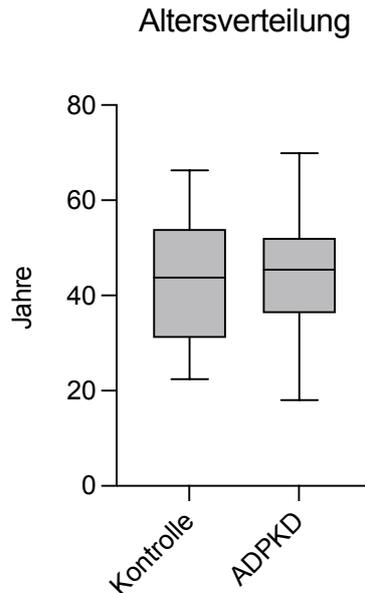


Abbildung 5: Altersverteilung: ADPKD-Kohorte vs. Kontroll-Kohorte

Die Whiskers stellen das Minimum und das Maximum der Altersspanne dar. In der Kontrolle befand sich das Minimum bei 22,42 und das Maximum bei 66,33 Jahren. Die jüngste ADPKD-Patient:inn war 18,0 Jahre alt und der älteste 69,90 Jahre alt.

ADPKD, autosomal dominante polyzystische Nierenkrankheit

In der folgenden Abbildung 6 sind die ADPKD-Patient:innen nach Geschlecht in den jeweils fünf Altersgruppen, 20 - 70 Jahre dargestellt. Das mediane Alter der Frauen entspricht 45,42, während das der Männer 45,33 Jahre entspricht. Die größte Altersgruppe der Frauen sind die 40-49,9-Jährigen, während es bei den Männern, die 50-59,9-Jährigen sind.

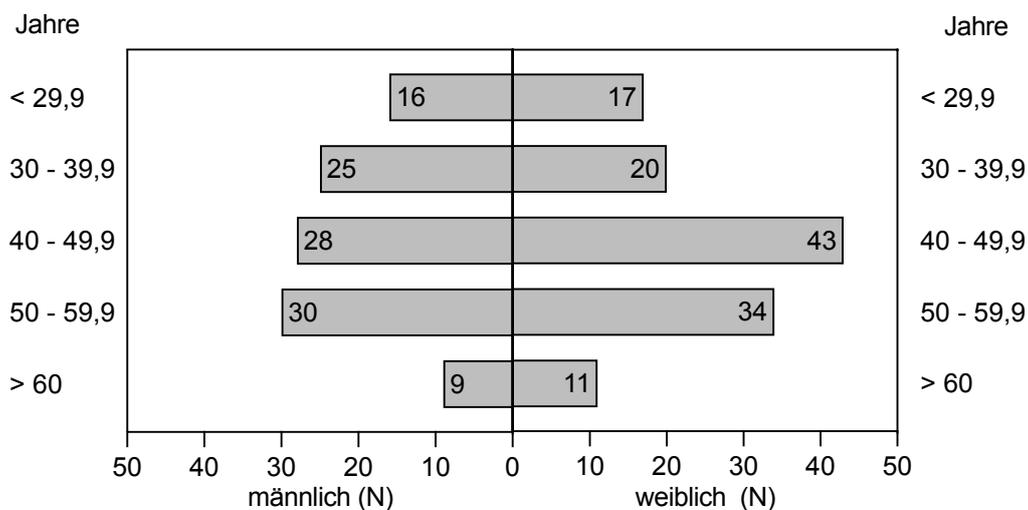


Abbildung 6: Altersverteilung der ADPKD-Kohorte nach Geschlecht

3.2.2. Verteilung der Mayo-Klassen und CKD-Stadien in der ADPKD-Kohorte

Um einen Überblick über den Grad der Erkrankungsschwere der ADPKD-Patient:innen zu gewinnen, werden sie in die Mayo-Klassen, 1A – 1E, eingeteilt. Wobei 1A/B Patient:innen ein niedrigeres Risiko und 1D/E Patient:innen ein erhöhtes Risiko für einen rapiden Krankheitsverlauf haben. 37,7% der ADPKD-Kohorte befinden sich in der mittleren Klasse (1C), welche sowohl schnell als auch langsam fortschreitende Krankheitsverläufe umfasst. (Siehe *Abbildung 7*)

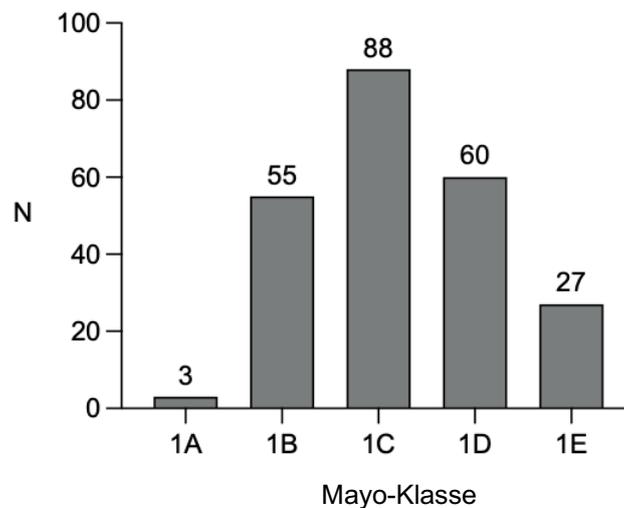


Abbildung 7: Verteilung der Mayo-Klassen innerhalb der ADPKD-Kohorte

Um die Geschlechterverteilung innerhalb der Mayo-Klassen darzustellen folgt eine erneute Subgruppierung. Die Differenzierung ergibt, dass ca. 89% (N=96) der Männer in den mittleren und höheren Klassen 1C - 1E zu finden sind, während sich 37% der Frauen (N=46) in den niedrigeren Mayo-Klassen 1A - 1B befinden. Die Gesamtverteilung ist in *Abbildung 8* dargestellt.

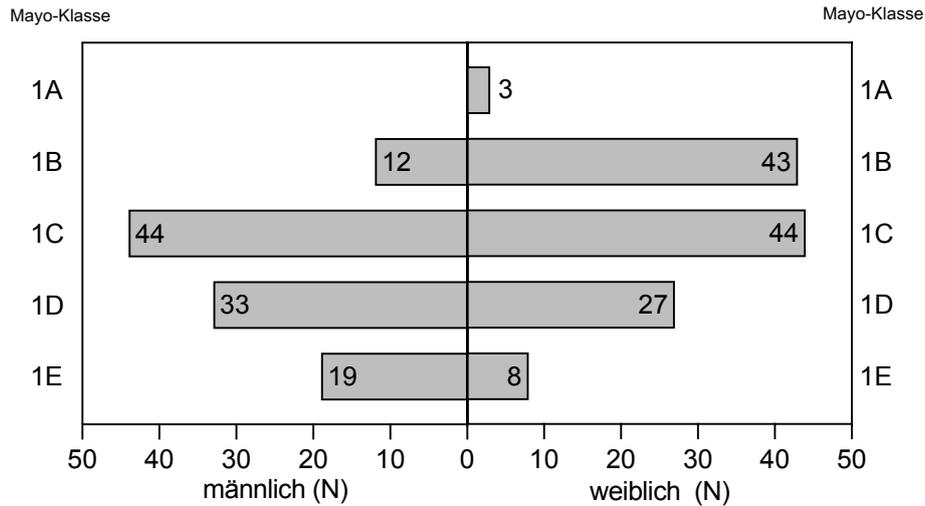


Abbildung 8: Verteilung der Mayo-Klassen nach Geschlecht

männlich N=108, weiblich N=125

Eine weitere Einteilung der ADPKD-Patient:innen erfolgt durch die CKD-Stadien. Die Verteilung der CKD-Stadien in der ADPKD-Kohorte, CKD G1 (N=52) und G2 (N=77) sowie CKD A1 (N=157) stellen sich als dominierende Stadien in dieser Kohorte dar, siehe Abbildung 9. Das bedeutet, dass die Mehrheit dieser Patient:innen noch eine gute bis leicht moderat erniedrigte Nierenfunktion besitzen.

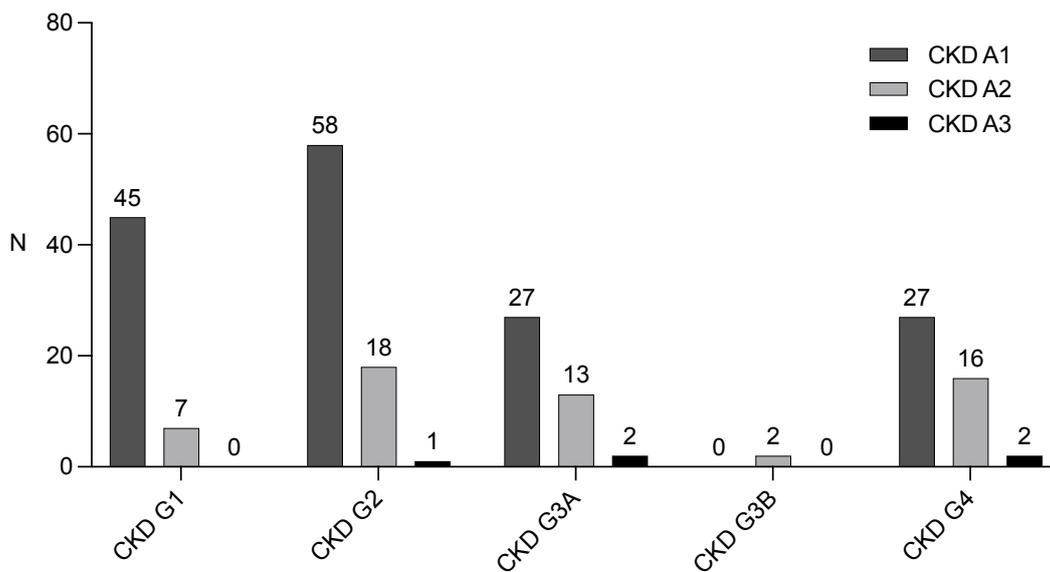


Abbildung 9: Verteilung der CKD-Stadien in der ADPKD-Kohorte

N=218

CKD, Chronische Nierenkrankheit

3.2.3. Darstellung der Genotyp Verteilung

Die fehlerhaften Gene der ADPKD begründen sich auf Mutationen im *PKD1* oder *PKD2* Gen. Die *PKD1* betreffenden Mutationen werden in trunkierend und nicht-trunkierende differenziert. ADPKD-Patient:innen, welche eine andere Genlokation wie zum Beispiel *GANAB* besitzen oder bisher keine Mutation nachgewiesen wurde, oder noch nicht genetisch getestet wurden, werden unter nicht bekannt zusammengefasst. In Abbildung 10 ist die Genotyp Verteilung der Studienkohorte dargestellt. Jeweils ein Drittel unserer ADPKD-Kohorte tragen *PKD1* trunkierende Mutationen, ein Sechstel *PKD2* und *PKD1* nicht-trunkierende Mutationen. Das letzte Drittel besteht aus Patient:innen mit nicht bekanntem Genotyp. Da ein Großteil trunkierende *PKD1* Mutationen sind, können wir in unsere Kohorte von schwereren Krankheitsverläufen ausgehen.

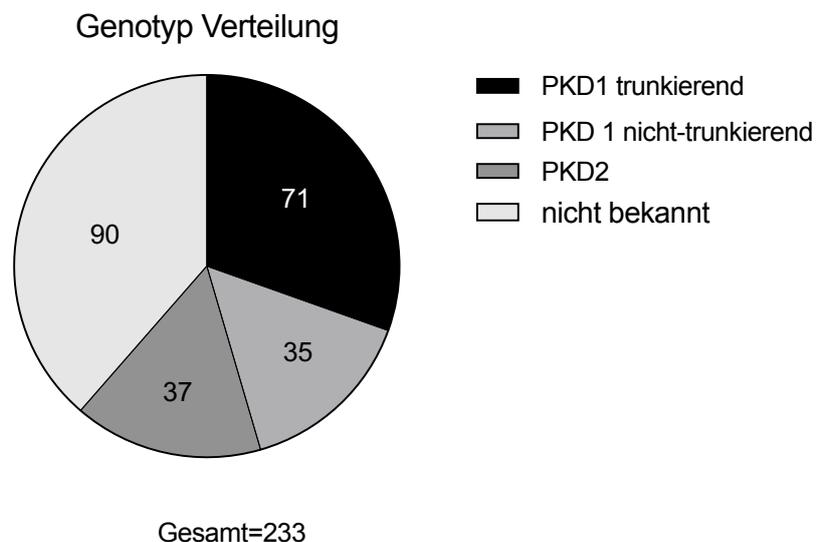


Abbildung 10: Aufteilung der ADPKD-Kohorte nach Genotyp

PKD1, Polyzystische Nierenerkrankung 1; *PKD2*, Polyzystische Nierenerkrankung 2

Abbildung 11 stellt die Verteilung der fünf Mayo-Klassen innerhalb der einzelnen Genotypen dar. Die ADPKD-Patient:innen mit einer *PKD1* trunkierend Mutation, weisen anteilig die größte Anzahl an 1D und 1E Patient:innen auf. Die Patient:innen mit einer *PKD2* Mutation befinden sich häufiger in den weniger progredienten Mayo-Klassen 1B und 1C.

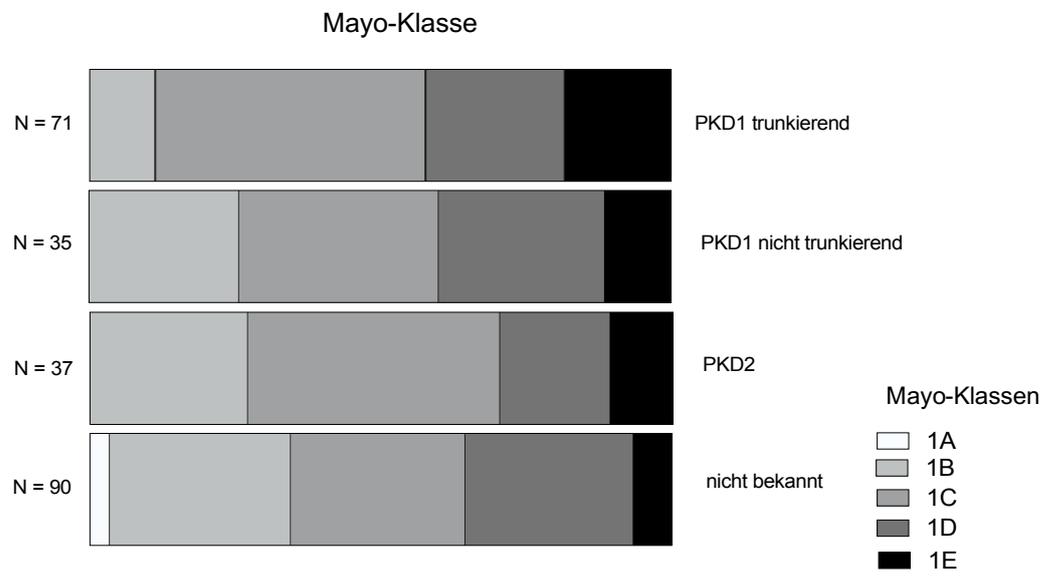


Abbildung 11: Verteilung der Mayo-Klassen innerhalb der verschiedenen Genotypen
 PKD1, Polyzystische Nierenerkrankung 1; PKD2, Polyzystische Nierenerkrankung 2

3.2.4. Zytokin-Messergebnisse

3.2.5. Deskriptive Darstellung der Messergebnisse der ADPKD- und Kontroll-Kohorte

Die Messergebnisse der ADPKD-Kohorte stellen sich wie folgt dar: IL-1b, IL-2, IL-4, IL-10 und IL-13 besitzen einen Großteil an UDL- und <OOR Messwerten, weshalb die Mediane und Quartile durch den Ersatzwert definiert sind. Die Biomarker IL-6, IL-8, MCP-1, INF- γ , TNF- α werden von den Ersatzwerten weniger beeinflusst, wie sich durch den Scatterplot in Abbildung 12 gut darstellen lässt. In der Kontrollgruppe kommt es unter den IL-4 Werten zu keinem Messwert oberhalb des Detektionslimits, weshalb dieser Parameter unter den Kontrollen ausgeschlossen werden muss.

ADPKD	IL-1b	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	IL-13	IFN- γ	MCP-1	TNF- α
N	233	233	233	232	233	233	231	232	233	228
Samplingerror	0	0	0	1	0	0	2	1	0	5
Minimum	0,03	0,07	0,02	0,02	0,87	0,12	0,01	0,86	6,03	3,21
25% Perzentile	0,03	0,15	0,02	0,44	9,81	0,14	0,03	0,86	49,3	15,74
Median	0,03	0,15	0,02	1,16	17,84	0,14	0,03	4,63	71,38	21,27
75% Perzentile	0,03	0,15	0,02	1,97	36,64	0,14	0,09	6,8	104,7	27,71
Maximum	70	21,65	2,89	48,11	2329	111	9,8	407,8	3758	260,9
Spannweite	69,97	21,58	2,87	48,09	2328	110,9	9,79	406,9	3752	257,7
Mittelwert	0,38	0,52	0,035	1,81	39,99	1,08	0,19	8,26	102,8	23,43
Std. Abweichung	4,6	2,01	0,19	3,64	155,2	7,45	0,91	33,26	258,5	21,95
SEM	0,3	0,13	0,01	0,24	10,17	0,49	0,06	2,18	16,94	1,45

Kontrolle	IL-1b	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	IL-13	IFN- γ	MCP-1	TNF- α
N	30	30	1	30	30	30	30	30	30	30
Minimum	0,03	0,15	∅	0,01	0,87	0,14	0,03	0,86	4,07	3,21
25% Perzentile	0,03	0,15	∅	0,04	3,68	0,14	0,03	0,86	33,07	3,21
Median	0,03	0,15	∅	0,23	6,07	0,14	0,03	3,93	50,52	12,97
75% Perzentile	0,03	0,15	∅	1,03	10,05	0,14	0,04	5,31	78,78	16,63
Maximum	0,12	0,15	∅	2,17	46,35	1,87	0,37	8,34	119,1	25,17
Spannweite	0,09	0	∅	2,16	45,48	1,73	0,34	7,48	115	21,96
Mittelwert	0,03	0,15	∅	0,6	9,528	0,2	0,07	3,75	56,46	11,14
Std. Abweichung	0,02	0	∅	0,73	11,04	0,32	0,08	2,62	28,71	7,71
SEM	0,003	0	∅	0,13	2,02	0,06	0,02	0,48	5,24	1,41

Tabelle 4: Deskriptive Statistik der Zytokin-Messwerte der ADPKD- und Kontroll-Kohorte

Alle Messwerte werden in pg/l dargestellt

IL-1b, Interleukin 1b; IL-2, Interleukin 2; IL-4, Interleukin 4; IL-6, Interleukin 6; IL-8, Interleukin 8; IL-10, Interleukin 10; IL-13, Interleukin 13; IFN- γ , Interferon Gamma; MCP-1, Monozyte Chemoattraktor Protein 1, TNF- α , Tumor Nekrose Faktor Alpha; SEM, Standard Error of Mean

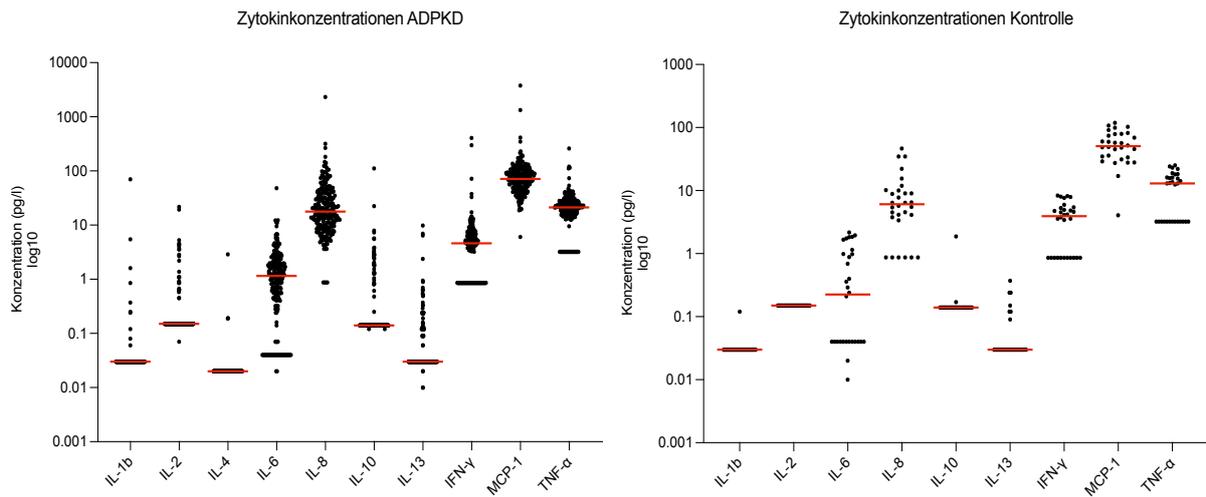


Abbildung 12: Scatterplot der Zytokinkonzentrationen der ADPKD und Kontroll-Kohorte

A) Darstellung der Zytokinkonzentrationen der ADPKD-Kohorte als Scatterplot, N= 233. Die Mediane sind durch die rote Linie gekennzeichnet. **B)** Die Zytokinkonzentrationen der Kontroll-Kohorte, N= 30, mit roter Linie gekennzeichneten Medianen. IL-4 ist aufgrund von N=0, nicht in der Auswertung dargestellt.

ADPKD, *autosomal Dominante Polyzystische Nierenkrankheit*; IL-1b, *Interleukin 1b*; IL-2, *Interleukin 2*; IL-4, *Interleukin 4*; IL-6, *Interleukin 6*; IL-8, *Interleukin 8*; IL-10, *Interleukin 10*; IL-13, *Interleukin 13*; IFN-γ, *Interferon Gamma*; MCP-1, *Monozyten Chemoattraktor Protein 1*, TNF-α, *Tumor Nekrose Faktor Alpha*

3.2.6. Urinproben

Ebenso erfolgt die Testung von acht Urinproben von Patientinnen im Alter zwischen 38 und 47 Jahren aus der ADPKD-Kohorte. Eine Urinprobe dieser acht Patientinnen zeigt messbare Werte über den Detektionslimit. Die restlichen Urinproben zeigen keine Ergebnisse. Die Charakteristika der Patientin und der Vergleich der Ergebnisse zwischen der Serum- und Urinprobe sind in

dargestellt.

CHARAKTERISTIKA DER PATIENTIN BM_089:	
Mayo-Klasse	1C
CKD Stadium	G1 A1
Genotyp	PKD1-nicht trunkierend
htTKV	551ml/m
Leberzysten	ja
arterielle Hypertonie	ja ≥35 Lebensjahr
Medikamente	ACE-Hemmer
Frühe urologische Symptome	Flankenschmerzen ≥ 35 Lebensjahr
Leukozyten	9 x1E9/l

Medium	IL-1b	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	IL-13	IFN-γ	MCP-1	TNF-α
Urin	44,54	125,41	15,16	47,05	143,12	138,71	30,86	104,66	38,67	192,22
Serum	0,03	0,15	0,19	0,07	0,87	0,14	0,03	0,86	56,88	6,2

Tabelle 5: Patientinnen Charakteristika der Patientin BM_089

Urin und Serum Messergebnisse der Patientin BM_089. Alle Messwerte sind in pg/l aufgeführt.

htTKV, Größenadaptiertes Nierenvolumen; CKD, Chronische Nierenerkrankung; eGFR, geschätzte Glomeruläre Filtrationsrate; IL-1b, Interleukin 1b; IL-2, Interleukin 2; IL-4, Interleukin 4; IL-6, Interleukin 6; IL-8, Interleukin 8; IL-10, Interleukin 10; IL-13, Interleukin 13; IFN-γ, Interferon Gamma; MCP-1, Monozyten Chemoattraktor Protein 1, TNF-α, Tumor Nekrose Faktor Alpha

3.2.7. Doppelte Messungen

Um herauszufinden, ob unterschiedliche Testplatten einen Einfluss auf die Messwerte haben, wurden die Sera zweier ADPKD-Patientinnen auf zwei verschiedenen Testplatten gemessen. Patientin BM_176 auf Platte 1 und 7, Patientin BM_075 auf Platte 5 und 7. Die Unterschiede sind Tabelle 6: Ermittlung der Mittelwerte der doppelten Messungen zu entnehmen. Anschließend wurden die Mittelwerte der beiden Testplatten verwendet, um die Patientinnen in die Gesamtauswertung einzuschließen. Die Mittelwerte sind in Abbildung 13 dargestellt.

	IL-1b	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	IL-13	IFN-γ	MCP-1	TNF-α
Platte	BM_176, weiblich, 43,92 Jahre									
1	0,03	0,15	0,19	0,95	71,59	0,14	0,03	3,9	78,63	15,87
7	0,03	0,15	0,19	0,48	89,67	0,14	0,03	7,49	102,05	3,21
<i>Mittelwert</i>	0,03	0,15	0,19	0,715	80,63	0,14	0,03	5,7	90,34	9,54
Platte	BM_075, weiblich, 65,33 Jahre									
5	0,03	0,15	0,19	0,28	7,38	0,14	0,03	3,91	46,72	16,81
7	0,03	0,15	0,19	0,36	7,31	0,14	0,03	4,54	64,14	16,79
<i>Mittelwert</i>	0,03	0,15	0,19	0,32	7,35	0,14	0,03	4,23	55,43	16,8

Tabelle 6: Ermittlung der Mittelwerte der doppelten Messungen

IL-1b, Interleukin 1b; IL-2, Interleukin 2; IL-4, Interleukin 4; IL-6, Interleukin 6; IL-8, Interleukin 8; IL-10, Interleukin 10; IL-13, Interleukin 13; IFN- γ , Interferon Gamma; MCP-1, Monozyten Chemoattraktor Protein 1, TNF- α , Tumor Nekrose Faktor Alpha

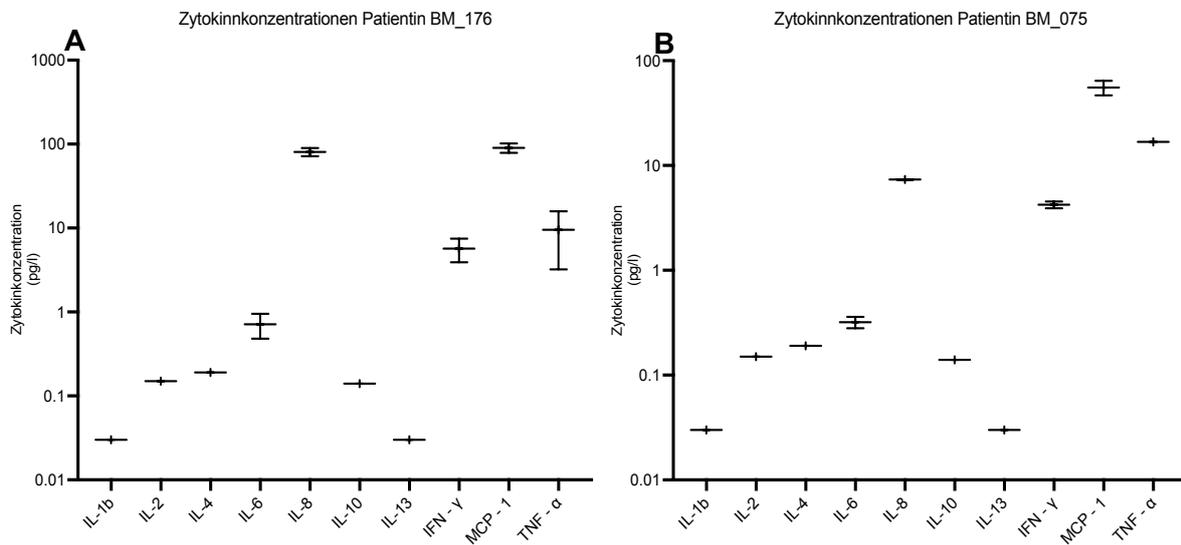


Abbildung 13: Darstellung der doppelten Messungen der ADPKD-Patientinnen

A) BM_176, die Mittelwerte sind mit einem Kreuz markiert, IL-6, IFN- γ und TNF- α zeigen die größten Unterschiede in Zytokinkonzentration je Platte. **B)** BM_075, die Mittelwerte sind mit einem Kreuz markiert, MCP-1 zeigt hier den ausschlaggebendsten Konzentrationsunterschied.

IL-1b, Interleukin 1b; IL-2, Interleukin 2; IL-4, Interleukin 4; IL-6, Interleukin 6; IL-8, Interleukin 8; IL-10, Interleukin 10; IL-13, Interleukin 13; IFN- γ , Interferon Gamma; MCP-1, Monozyten Chemoattraktor Protein 1, TNF- α , Tumor Nekrose Faktor Alpha

3.2.8. Mittelwert Vergleiche

Der Vergleich der Mittelwerte zwischen den Platten 1-7 für die Zytokinkonzentrationen von MCP-1, IFN- γ und TNF- α zeigt einige signifikante Unterschiede. Es fällt auf, dass die Platte 1 in der INF- γ -Konzentration signifikant niedrigere Konzentrationen als die restlichen Platten darstellt. Ebenso gibt es Auffälligkeiten in den Mittelwerten der TNF- α -Konzentrationen. Diese weisen auf Platte 4 signifikant hohe und bei Platte 3 signifikant niedrige Mittelwerte auf. Die Ergebnisse des Kruskal-Wallis Test innerhalb der Platten 1-7 dieser Zytokine sind in der Abbildung 14 veranschaulicht.

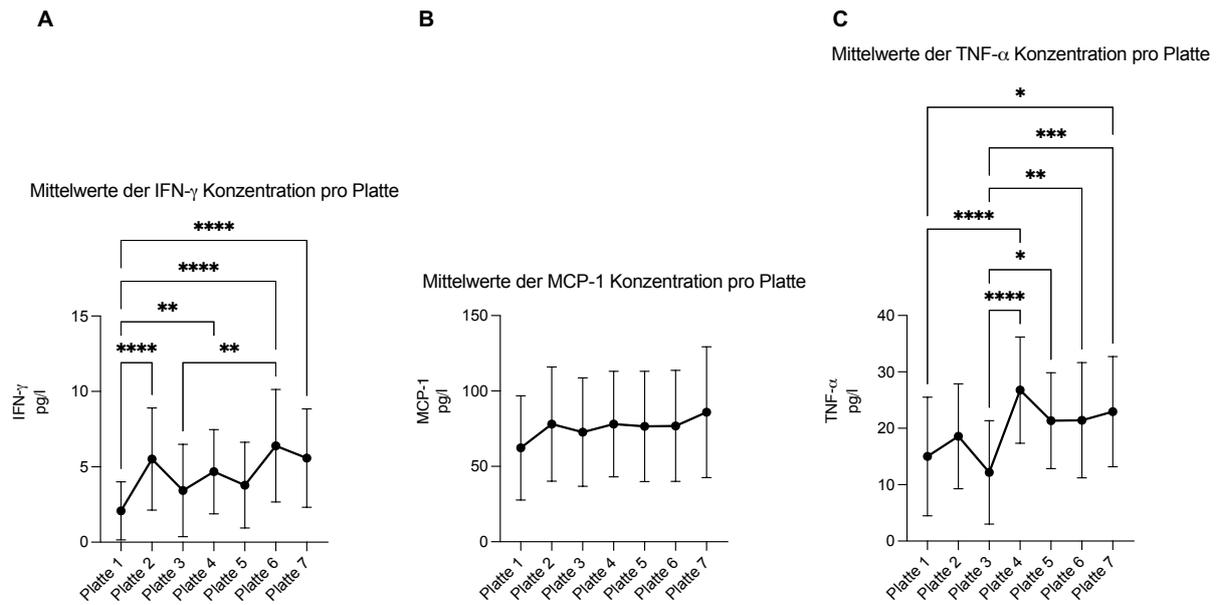


Abbildung 14: Mittelwertvergleiche von TNF- α , IFN- γ und MCP-1 pro Platte innerhalb der ADPKD-Kohorte

A) Darstellung der Mittelwerte der IFN- γ Konzentration im Plattenvergleich. Die verbundenen Punkte sind die Mittelwerte der IFN- γ Konzentration pro Platte, die Whiskers stellen die Standarddeviation dar. **B)** Darstellung der Mittelwerte der MCP-1 Konzentration im Plattenvergleich. **C)** Darstellung der Mittelwerte der TNF- α Konzentration im Plattenvergleich.

IFN- γ , Interferon Gamma; MCP-1, Monozyten Chemoattraktor Protein 1; TNF- α , Tumor Nekrose Faktor alpha

3.3 Statistische Auswertung

3.3.1. Korrelation der Zytokinkonzentrationen innerhalb der ADPKD-Kohorte

Um zu ermitteln, ob es innerhalb der Zytokinexpression der ADPKD-Patient:innen Zusammenhänge gibt, wurden diese miteinander ins Verhältnis gesetzt. In der berechneten Spearman-Korrelation stellt sich zwischen MCP-1 und IFN- γ ein positiver Zusammenhang dar, $r=0,79$, p -Wert: $<0,0001$ siehe Abbildung 15.

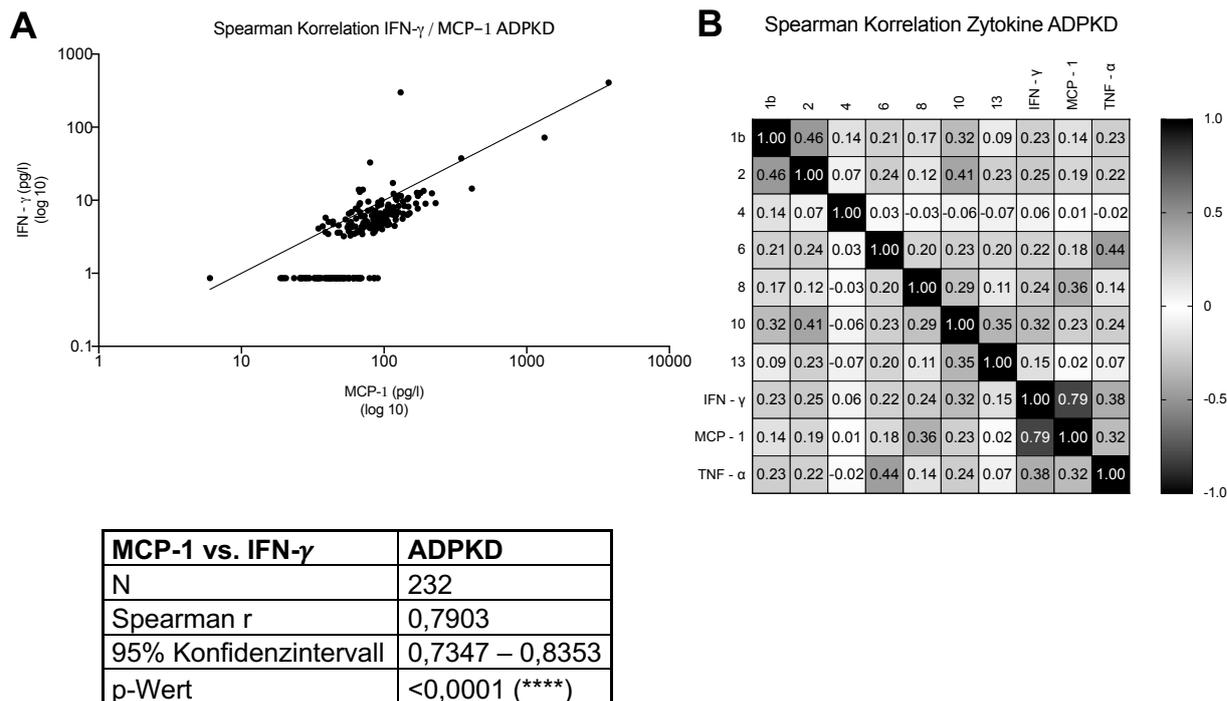


Abbildung 15: Korrelation von MCP-1 zu IFN- γ Konzentrationen innerhalb der ADPKD-Kohorte

A) Eine lineare Regressionslinie durch X wurde zwischen den Messwerten berechnet. Sie zeigt einen gemeinsamen Anstieg der Zytokinkonzentration. **B)** Die Heatmap veranschaulicht den gemeinsamen Konzentrationsanstieg von MCP-1 und IFN- γ . Die p-Werte sind der Tabelle zu entnehmen.

ADPKD, autosomal Dominante Polyzystische Nierenkrankheit; IL-1b, Interleukin 1b; IL-2, Interleukin 2; IL-4, Interleukin 4; IL-6, Interleukin 6; IL-8, Interleukin 8; IL-10, Interleukin 10; IL-13, Interleukin 13; IFN- γ , Interferon Gamma; MCP-1, Monozyten Chemoattraktor Protein 1, TNF- α , Tumor Nekrose Faktor Alpha

3.3.2. Korrelation der Zytokinkonzentrationen innerhalb der Kontroll-Kohorte

Infolgedessen führten wir eine Spearman-Korrelation innerhalb der Kontroll-Kohorte durch, um herauszufinden ob die zuvor beschriebene Korrelation in der ADPKD-Kohorte auch in der Kontroll-Kohorte zu finden ist. Auch hier zeigt sich ein proportionaler Anstieg von INF- γ und MCP-1, $r = 0,8$, p-Wert: <0,0001, dargestellt in Abbildung 16.

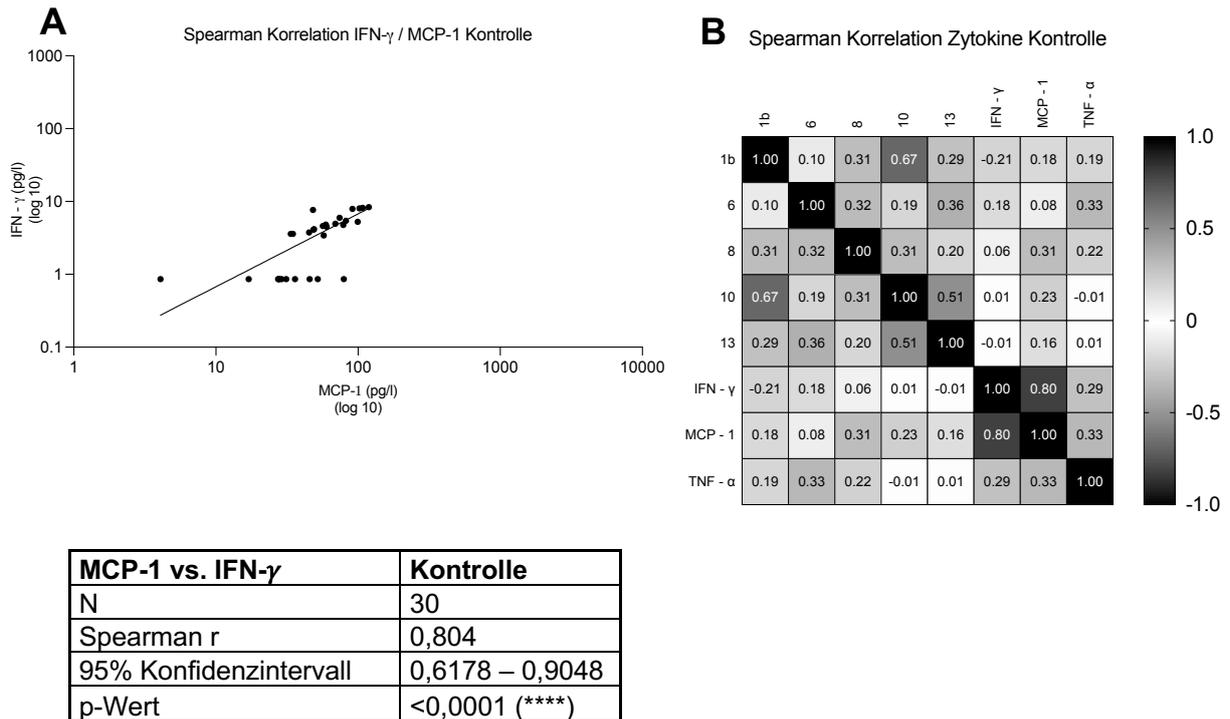


Abbildung 16: Korrelation von MCP-1 zu IFN- γ Konzentrationen innerhalb der Kontroll-Kohorte

A) Eine lineare Regressionslinie durch X wurde zwischen den Messwerten berechnet. Es ist ein gemeinsamer Anstieg der Zytokinkonzentration zu beobachten. **B)** Die Heatmap stellt den gemeinsamen Konzentrationsanstieg von IFN- γ und MCP-1 dar. Die p-Werte sind der Abbildung zu entnehmen.

ADPKD, autosomal Dominante Polyzystische Nierenkrankheit; IL-1b, Interleukin 1b; IL-6, Interleukin 6; IL-8, Interleukin 8; IL-10, Interleukin 10; IL-13, Interleukin 13; IFN- γ , Interferon Gamma; MCP-1, Monozyten Chemoattraktor Protein 1, TNF- α , Tumor Nekrose Faktor Alpha

3.3.3. Vergleich der Zytokinkonzentrationen zwischen ADPKD- und Kontroll-Kohorte

Unterschiede in der Zytokinexpression zwischen der ADPKD-Kohorte und der Kontroll-Kohorte wurden aufgrund eines nicht parametrischen Datensatzes mittels Mann-Whitney-U-Test berechnet. Die Kontrollproband:innen weisen in IL-6, IL-8, MCP-1 und TNF- α signifikant niedrigere Messwerte als die ADPKD-Patient:innen auf. Der exakte Mann-Whitney-U-Test für IL-6 ergibt ein U=1980, Z=-3,884 und ein p-Wert: <0,001. Die anderen Ergebnisse sind der Tabelle in Abbildung 17 zu entnehmen. Die Effektstärken nach Cohen⁶⁸ liegen zwischen 0,20 und 0,33 und sind daher als schwach bis mittelstark zu werten.

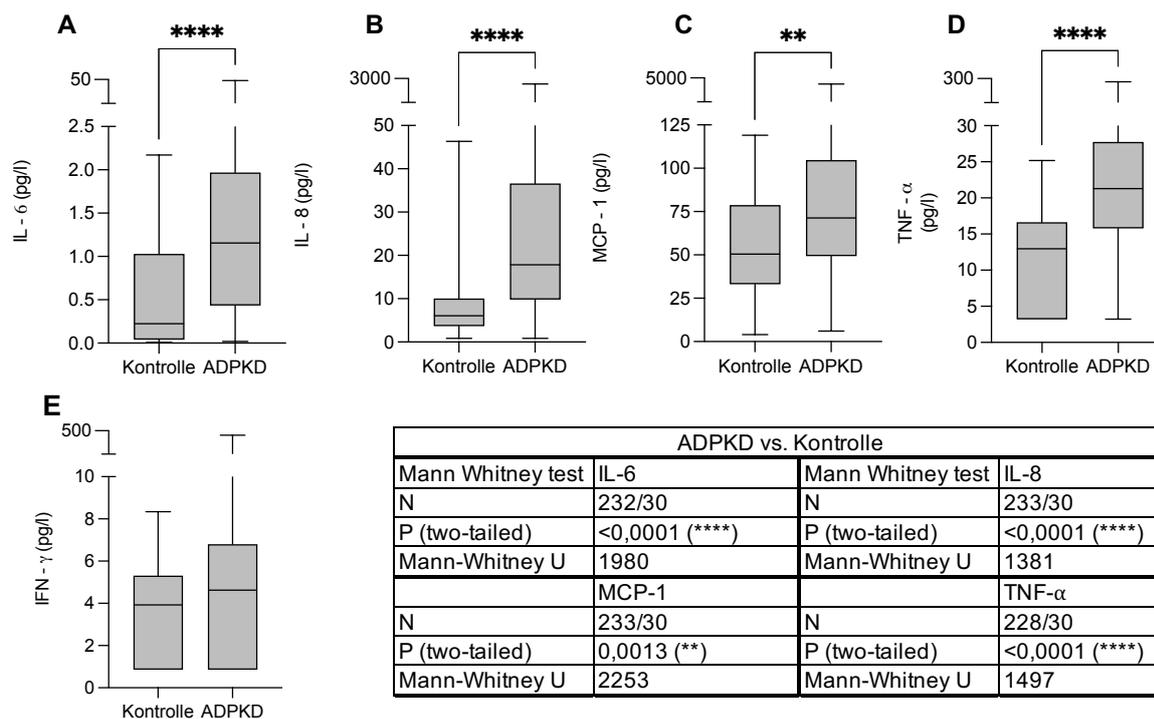


Abbildung 17: Unterschiede in den Zytokinkonzentrationen von Kontroll- vs. ADPKD-Kohorte

A) Die Mittellinie in jeder Box repräsentiert den Median. Die obere und untere Linie steht für die 25. und 75. Perzentile. Die „Whiskers“ strecken sich zu den jeweiligen Extremen in Form von Minimum und Maximum. Die Mediane von IL-6 der Kontrolle N=30 (0,2250 pg/l) und ADPKD N=232 (1,155 pg/l) zeigen signifikante Unterschiede. **B)** Die Mediane von IL-8 der Kontrolle (6,065 pg/l) und ADPKD Gruppe (17,84) unterscheiden sich signifikant. **C)** Der Median von MCP-1 weist signifikante Unterschiede in der Kontroll- (50,52 pg/l) und der ADPKD Kohorte (71,38 pg/l) auf. **D)** Die TNF- α Mediane der Kontrolle N=30 (12,97 pg/l) und der ADPKD N=228 (21,27 pg/l) sind ebenso signifikant unterschiedlich. Die p-Werte sind in der Tabelle der Abbildung abzulesen. **E)** Bei IFN- γ ist kein signifikanter Unterschied sichtbar. IL-1b, IL-2, IL-4, IL-10, IL-13 der Kontrollgruppe sind aufgrund von einer zu geringen Messwert Anzahl (N<10%) nicht inkludiert und konnten daher nicht verglichen werden.

ADPKD, autosomal Dominante Polyzystische Nierenkrankheit; IL-6, Interleukin 6; IL-8, Interleukin 8; MCP-1, Monozyten Chemoattraktor Protein 1, TNF- α , Tumor Nekrose Faktor Alpha; IFN- γ , Interferon Gamma

3.3.4. Einfluss von Geschlecht und Alter auf die Zytokinkonzentrationen der ADPKD- und Kontroll-Kohorte

3.3.5. Geschlecht

Um zu überprüfen, ob es Unterschiede in der Zytokinexpression zwischen Männern und Frauen gibt, führen wir bei nicht parametrischen Voraussetzungen einen Mann-Whitney-U Test durch. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den männlichen und weiblichen ADPKD-Patient:innen in den MCP-1 Konzentrationen, U=5326,50, Z=-2,774, p-Wert: 0,006, in dem männliche ADPKD-Patient:innen höhere Konzentrationen von MCP-1 präsentieren. Ebenso ist der Unterschied des MCP-1 Konzentration bei den weiblichen und männlichen Kontrollproband:innen signifikant, U=63,00, Z=-2,035, p-Wert: 0,04. Zusätzlich

stellt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Mann und Frau in den TNF- α Konzentrationen der ADPKD-Patient:innen und Kontrollproband:innen dar. Auch hier weisen Männer signifikant höhere TNF- α Messwerte als Frauen auf. Die ADPKD-Kohorte zeigt ein $U=5013$ $Z=-2,925$, p -Wert: 0,003, die Kontroll-Kohorte ein $U=52,00$, $Z=-2,618$, p -Wert: 0,008. In **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** sind die jeweiligen Mediane der einzelnen Gruppen aufgezeichnet. Es wird deutlich, dass die Mediane der ADPKD-Kohorte deutlich höher sind als jene der Kontrollgruppe. Gleichzeitig zeigen die Männer beider Gruppen deutlich höhere Messwerte als die der Frauen auf, sodass von einem geschlechtlichen Einfluss auf die Zytokinkonzentrationen gesprochen werden kann.

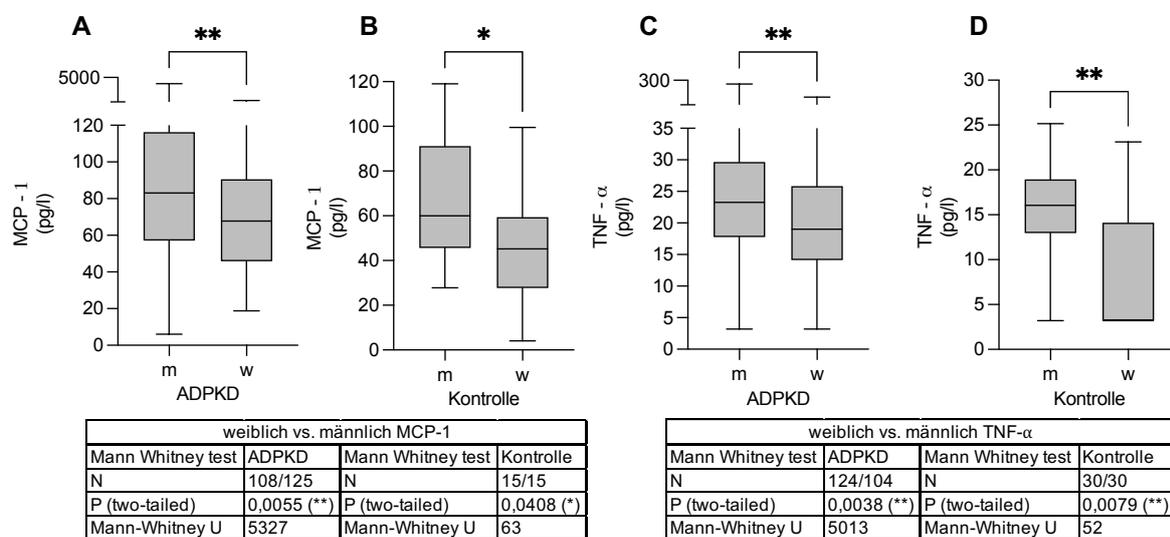


Abbildung 18: Geschlechtliche Unterschiede der MPC-1 und TNF- α Konzentrationen in der ADPKD- und Kontroll-Kohorte

A) Die Mittellinie in jeder Box repräsentiert den Median. Die obere und untere Linie steht für die 25. und 75. Perzentile. Die „Whiskers“ strecken sich zu den jeweiligen extremen in Form von Minimum und Maximum. MCP-1 weist signifikante Unterschiede zwischen Männern und Frauen in der ADPKD Gruppe auf. Der Median ist, $m=83,07$, $w=67,78$. **B)** In der Kontrollgruppe ist der Median, $m=59,95$, $w=45,22$ gleichfalls signifikant. **C)** TNF- α zeigt signifikante Unterschiede in der ADPKD-Kohorte zwischen männlichen und weiblichen Patienten, Median: $m=23,28$ $w=19,00$. **D)** In der Kontrollgruppe, $N=30$, sind diese Beobachtungen in TNF- α ebenso zu sehen, Median: $m=16,05$, $w=3,21$.

ADPKD, autosomal Dominante Polyzystische Nierenkrankheit; MCP-1, Monozyten Chemoattraktor Protein 1, TNF-

3.3.6. Alter

Der Kruskal-Wallis-Test wird ausgewählt, um einen möglichen Einfluss des Alters auf die Zytokinkonzentration darzustellen. Dieser ergibt, dass das Alter der Patient:innen die Zytokinlevel weder in der Kontrolle- noch in der ADPKD-Kohorte signifikant beeinflusst. Die Graphen sind den Abbildung 19 und Abbildung 20 zu entnehmen.

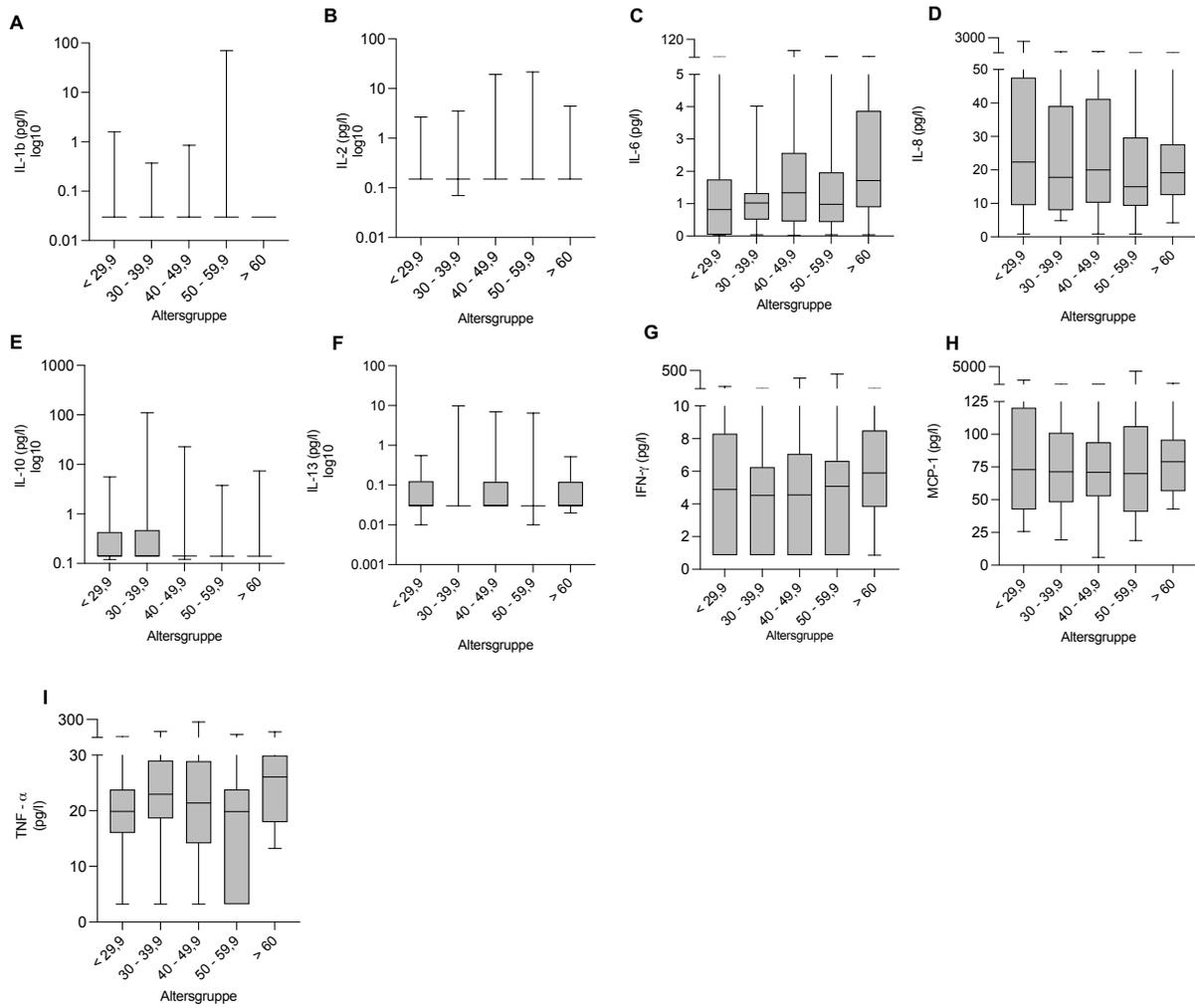


Abbildung 19: Nicht signifikante Unterschiede der Zytokinkonzentrationen zwischen den Altersgruppen der ADPKD-Kohorte

ADPKD, autosomal Dominante Polyzystische Nierenkrankheit; IL-1b, Interleukin 1b; IL-2, Interleukin 2; IL-6, Interleukin 6; IL-8, Interleukin 8; IL-10, Interleukin 10; IL-13, Interleukin 13; IFN- γ , Interferon Gamma; MCP-1, Monozyten Chemoattraktor Protein 1; TNF- α , Tumor Nekrose Faktor Alpha

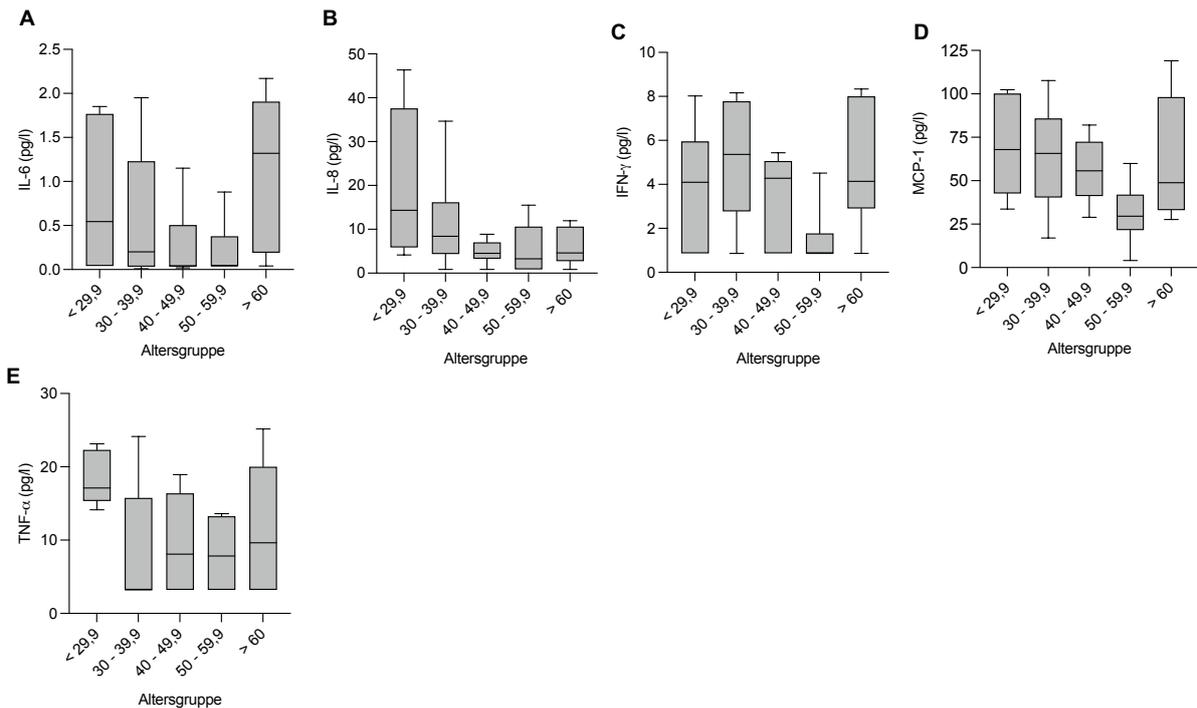


Abbildung 20: Nicht signifikante Unterschiede der Zytokinkonzentrationen zwischen den Altersgruppen der Kontroll-Kohorte

A-E) IL-1b, IL-2, IL-4, IL-10, IL-13 sind aufgrund von einer zu geringen Anzahl an Messwerten (N<10) nicht inkludiert.

IL-1b, Interleukin 1b; IL-2, Interleukin 2; IL-4, Interleukin 4; IL-6, Interleukin 6; IL-8, Interleukin 8; IL-10, Interleukin 10; IL-13, Interleukin 13; IFN- γ , Interferon Gamma; MCP-1, Monozyten Chemoattraktor Protein 1

3.3.7. Einfluss der Mayo-Klassen auf die Zytokinexpression

Der Kruskal-Wallis-Test wird ausgewählt, um Unterschiede zwischen den verschiedenen Mayo-Klassen der ADPKD-Patient:innen darzustellen. Nur TNF- α zeigt hier signifikante Unterschiede. Mit Hilfe eines Post-hoc-Test (Dunn-Bonferroni-Tests) sind die jeweils signifikant unterschiedlichen Untergruppen identifiziert worden. Die Gruppen 1B N=53 und 1D N=58, Z=3,470, r=0,33, p-Wert: ** 0,0052 und die Gruppen 1B und 1E N=26, Z=3,212, r=0,36, p-Wert: * 0,0132 sind signifikant (siehe Abbildung 21). Die restlichen Zytokine zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mayo-Klassen und sind in Abbildung 22 dargestellt.

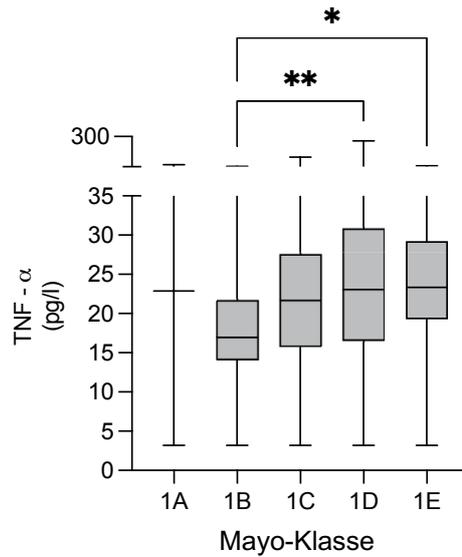


Abbildung 21: Unterschiede der TNF- α Konzentration innerhalb der Mayo-Klassen

Die Mittellinie in jeder Box repräsentiert den Median. Die obere und untere Linie steht für die 25. und 75. Perzentile. Die „Whiskers“ strecken sich zu den jeweiligen extremen in Form von Minimum und Maximum.

TNF- α , Tumor Nekrose Faktor Alpha

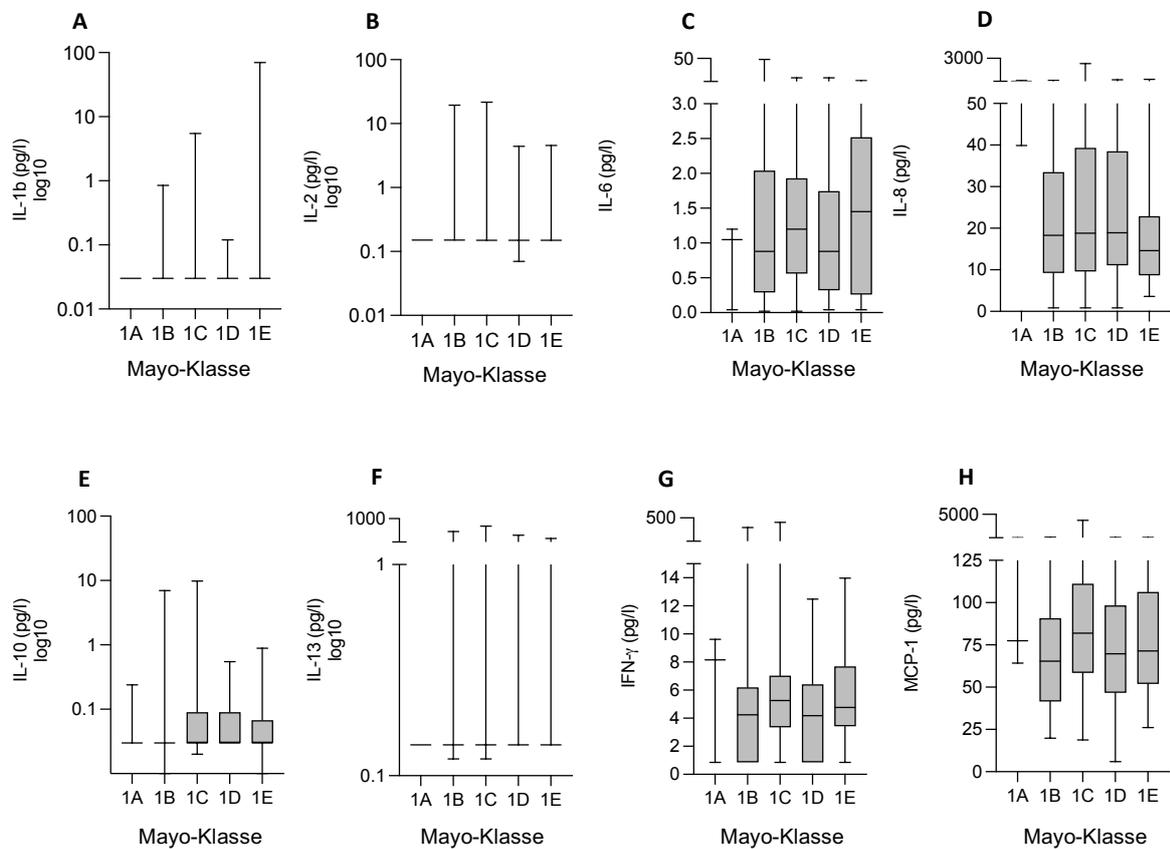


Abbildung 22: Nicht signifikante Unterschiede der Zytokinkonzentrationen zwischen den Mayo-Klassen der ADPKD-Kohorte.

A-H) In der ADPKD-Kohorte zeigten folgende Zytokine, IL-1b, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IFN- γ und MCP-1, im Kruskal-Wallis-Test nicht signifikante Unterschiede zwischen den Mayo-Klassen.

ADPKD, autosomal Dominante Polyzystische Nierenkrankheit; IL-1b, Interleukin 1 beta; IL-2, Interleukin 2; IL-6, Interleukin 6; IL-8, Interleukin 8; IL-10, Interleukin 10; IL-13, Interleukin 13; IFN- γ , Interferon Gamma; MCP-1, Monozyten Chemoattraktor Protein 1

3.3.8. Einfluss der Nierenfunktion auf die Zytokinexprimierung

Die Nierenfunktion in Form der CKD-G Klassen sind mit den Zytokinkonzentrationen der ADPKD-Kohorte in Zusammenhang gesetzt worden. Um den Einfluss der Nierenfunktion auf die Zytokinproduktion zu evaluieren, wird anhand des CKD-G-Stadium der Kruskal-Wallis-Test berechnet. Es folgt ein Post-hoc-Tests (Dunn-Bonferroni-Tests) um spezifische Interaktionen darzustellen. Hier zeigt sich, dass IL-6 Konzentrationen im „CKD-1“ und „CKD-4“ Stadium ($Z=3,755$, p-Wert: 0,0017, $r=0,38$), sowie im „CKD-2“ und „CKD-4“-Stadium ($Z=3,788$, p-Wert: 0,0016, $r=0,33$) signifikant unterscheiden. Die Effektstärke nach Cohen⁶⁸ der beiden signifikanten Untergruppen erweist sich als stark. Innerhalb der TNF- α Konzentrationen finden sich ebenso mehrere signifikante Untergruppen. Auch hier unterscheiden sich „CKD-1“ und „CKD-4“ ($Z=3,848$, p-Wert: 0,0012, $r=0,39$), „CKD-1“ mit „CKD-3a“ ($Z=4,309$, $p=0,0002$, $r=0,43$), „CKD-2“ mit „CKD-3a“ ($Z=3,4$, p-Wert: 0,0067, $r=0,30$) und „CKD-2“ mit „CKD-4“ ($Z=2,91$, p-Wert: 0,0361, $r=0,26$) signifikant. In Abbildung 23 werden die jeweiligen Mediane der einzelnen Gruppen der jeweiligen Zytokine dargestellt. Sie veranschaulichen den Anstieg der Zytokinkonzentration mit steigendem CKD-Stadium und somit fallender GFR. Die restlichen Zytokine zeigen keine statistisch signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 24).

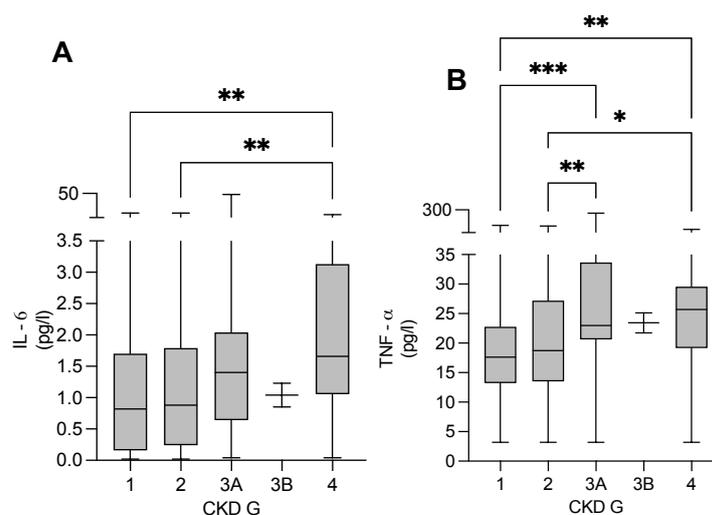


Abbildung 23: Signifikante Unterschiede der IL-6 und TNF- α Konzentration je CKD-G-Stadium

A) Die Mittellinie in jeder Box repräsentiert den Median. Die obere und untere Linie steht für die 25. und 75. Perzentile. Die „Whiskers“ strecken sich zu den jeweiligen extremen in Form von Minimum und Maximum. Darstellung der IL-6 Konzentration der einzelnen CKD-G-Stadien, signifikante Unterschiede sind durch Sternchen verdeutlicht. **B)** Die TNF- α Konzentrationen der CKD-G-Stadien wird ebenso in Boxplots dargestellt. Signifikante Unterschiede sind mit Sternchen markiert.

* p -Wert $\leq 0,05$; ** p -Wert $\leq 0,01$; *** p -Wert $\leq 0,001$; **** p -Wert $\leq 0,0001$

ADPKD, Autosomal Dominante Polyzystische Nierenkrankheit; CKD, Chronische Nierenschädigung; MCP-1, Monozyte Chemoattraktor Protein 1, TNF- α , Tumor Nekrose Faktor Alpha

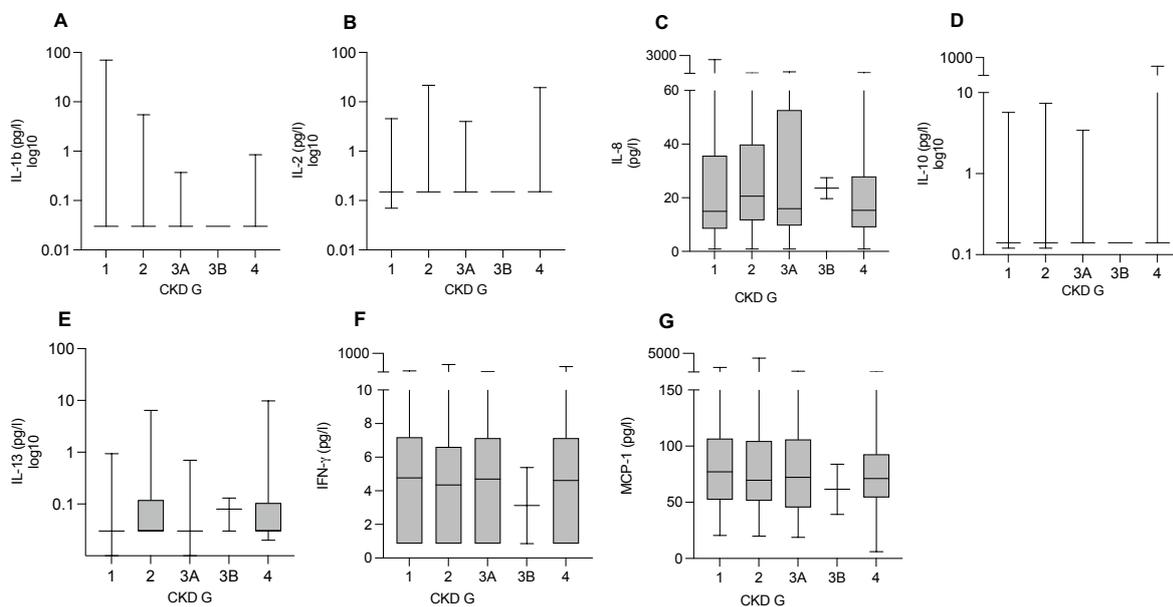


Abbildung 24: Nicht signifikanten Unterschiede der Zytokinkonzentrationen je CKD-G-Stadium

ADPKD, Autosomal Dominante Polyzystische Nierenkrankheit; IL-2, Interleukin 2; IL-8, Interleukin 8; IL-10, Interleukin 10; IL-13, Interleukin 13; IFN- γ , Interferon Gamma; MCP-1, Monozyten Chemoattraktor Protein 1

3.3.9. Regressionsanalyse von TNF- α

Im Laufe der statistischen Auswertung der Zytokinmesswerte zeigt sich, dass TNF- α in der ADPKD-Kohorte in drei Fragestellungen signifikante Ergebnisse erzielt. Um zu evaluieren, welches der drei signifikanten Ergebnisse von TNF- α , Geschlecht, Mayo-Klasse, CKD-Stadium, den größten Einfluss auf die ZytokinKonzentration nimmt, wird eine multiple Regressionsanalyse durchgeführt.

Die multiple Regressionsanalyse bestätigt, dass das Gesamtmodell einen signifikanten Einfluss auf die TNF- α Konzentration hat, $F(7, 216) = 5,544$ $p < 0,0001$, $N = 224$. Jedoch zeigt unter den Parametern: CKD-G-Stadium, Mayo-Klasse sowie das Geschlecht, die unabhängige

Variable CKD-G den stärksten signifikanten Einfluss. Wie schon im zuvor durch geführten Kurskal-Wallis-Test konnte auch hier mit steigendem CKD-G-Stadium eine steigende TNF- α Konzentration beobachtet werden. Im CKD-G1-Stadium fällt die TNF- α Konzentration um 8,72 pg/l, p-Wert: <0,0001, im Vergleich zum Referenzstadium CKD-G4. Ebenso fällt die TNF- α Konzentration im CKD-G2-Stadium um 6,52 pg/l, p-Wert: 0,0009. Die gesamte Regression hat mit einem R-Quadrat von 0,15 nur eine schwache Varianz. R-Quadrat gibt an das 15% der Varianz der abhängigen Variable TNF- α von der multiplen Regression erklärt werden können.

Varianzanalyse	SS	DF	MS	F (DFn, Dfd)	p-Wert	Anpassungsgüte	
Regression	4018	7	574	F (7, 216) = 5,544	<0,0001	Freiheitsgrade	216
Geschlecht	293	1	293	F (1, 216) = 2,830	0,094	R ²	0,15
Mayo-Klasse	370	3	123,3	F (3, 216) = 1,191	0,314	Adjustiertes R ²	0,125
CKD-G	2636	3	878,8	F (3, 216) = 8,487	<0,0001		

Tabelle 7: Multiple Regressionsanalyse

Es ist zu erkennen, dass das Modell als Ganzes signifikant ist ($F(7,216) = 5,544$, $p < 0,0001$). Weshalb eine detaillierte Analyse fortgesetzt werden kann.

CKD, Chronische Nierenschädigung; SS, Quadratsumme; DF, Freiheitsgrad; MS, Mittlere Quadratsumme,

Parameter Estimates	Variable	Estimate	Standardfehler	95% Konfidenzintervall	t	p-Wert
β_0	Intercept	27,18	2,684	21,89 bis 32,47	10,12	<0,0001
β_1	Geschlecht (m)	2,428	1,443	-0,4168 bis 5,272	1,682	0,094
β_2	Mayo-Klasse 1C	-3,27	2,305	-7,813 bis 1,273	1,419	0,1574
β_3	Mayo-Klasse 1D	-1,276	2,441	-6,086 bis 3,535	0,5226	0,6018
β_4	Mayo-Klasse 1A/1B	-3,89	2,552	-8,919 bis 1,139	1,524	0,1289
β_5	CKD-G1	-8,715	2,102	-12,86 bis -4,572	4,146	<0,0001
β_6	CKD-G2	-6,517	1,931	-10,32 bis -2,711	3,375	0,0009
β_7	CKD-G3a/b	-0,8411	2,162	-5,103 bis 3,421	0,389	0,6977

Tabelle 8: Vergleich der Koeffizienten

Auflistung der Variablen der multiplen Regressionsanalyse im Vergleich zum Referenzstadium CKD-G4. Steigt diese um die Einheit 1 fällt die TNF- α Konzentration bei CKD-G1 und G2 signifikant ab. Die hohen T-Test Ergebnisse bestätigen das die Nullhypothese verworfen werden kann CKD-G1 (4,146) und CKD-G2 (3,375). Es ist anzunehmen das es einen Zusammenhang zwischen CKD-G1 und G2 mit TNF- α gibt.

CKD, Chronische Nierenschädigung; m, männlich; /t /; T-Test der Regression

4. Diskussion

Seit Jahren ist das Verständnis von molekularen Mechanismen ein Grundsatz in der Forschung von chronischen und genetischen Erkrankungen⁶⁹⁻⁷¹. Neben der Erkenntnis über die Pathophysiologie dient es auch der Identifizierung von möglichen Krankheitsantreibern oder Zielobjekten von möglichen neuen Therapieinterventionen, welche den Krankheitsverlauf verändern oder stoppen könnten²⁷. Daher müssen neue Biomarker entdeckt werden, die allein oder in Kombination mit anderen konventionellen Risikomarkern die Rate der Krankheitsprogression der ADPKD beeinflussen können und auf alle ADPKD-Patient:innen anwendbar sind^{42,72}. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass gewisse Zytokinkonzentrationen bei ADPKD-Patient:innen höher als in der Kontroll-Kohorte sind. Ebenso konnte ein geschlechtlicher Einfluss auf die Zytokinmesswerte in beiden Studiengruppen dargestellt werden. In der ADPKD-Kohorte wurde zusätzlich ein Anstieg der Zytokinkonzentration mit zunehmenden Nierenfunktionsverlust beschrieben.

4.1 Studienfrage

Im Rahmen dieser Studie wurden durch die Quantifizierung von molekularen Biomarkern ihre Rolle in Krankheitsentstehung und -verlauf bei ADPKD-Patient:innen untersucht. Insgesamt wurden 233 ADPKD-Patient:innen aus der Kölner ADPKD-Kohorte und 30 gesunde Proband:innen aus der Kölner Alterungsstudie auf zehn Biomarker getestet und miteinander verglichen. Diese zehn Biomarker, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IFN- γ , MCP-1 und TNF- α , wurden mit Hilfe eines individualisierten Bio-Rad Bio-Plex Pro Human Zytokin Assay durch das Bio-Plex 200 System aus den Serumproben der ADPKD-Patient:innen und der Kontrollgruppe getestet. Die ADPKD-Patient:innen befanden sich in einem Alter von 20- >60 Jahren und wurden zusätzlich nach Geschlecht, Mayo-Klassen und CKD-Stadium differenziert. Die Kontrollproband:innen wurden in Hinsicht auf Alter und Geschlecht der ADPKD-Kohorte ausgewählt und zugeordnet. Da Inflammation und Fibrose einen unmittelbaren Einfluss auf den Krankheitsverlauf der ADPKD haben, entschlossen wir uns, Inflamationsbiomarker zu untersuchen und in den Zusammenhang mit dieser Krankheit zu setzen⁴⁸. Die Zytokine wurden untereinander und im Vergleich mit der Kontroll-Kohorte getestet. Hierbei konnten wir TNF- α als leitendes Zytokin unserer Kohorte identifizieren. Ebenso bestätigte sich die Korrelation von IFN- γ mit MCP-1. Ein geschlechtlicher Einfluss auf TNF- α und IL-6 war ebenso zu beobachten.

4.2 Studienkohorte

Die mit einer Anzahl von 233 ADPKD-Patient:innen große Studienkohorte ermöglichte uns, die ADPKD in großem Umfang zu beleuchten. Trotz der großen Kohorte konnten wir bei Differenzierungen in Untergruppen, wie zum Beispiel CKD-Stadien oder Mayo-Klassen, die Entstehung von kleinen Subgruppierungen nicht vermeiden. Ein Beispiel hierfür wäre die Mayo-Klasse 1A mit einem Stichprobengröße von 3. In solchen Fällen würde sich in zukünftigen Studien ein Zusammenschluss in 1A und 1B als „niedriger Schweregrad“, 1C als „intermediärer Schweregrad“ und 1D und 1E als „höchster Schweregrad“ anbieten.

Die Studie ist meiner Kenntnis nach die Einzige, die retrospektiv ADPKD-Patient:innen auf Biomarker im Serum untersucht. Vergleichbar große Studien mit ähnlicher Fragestellung wurden bisher hauptsächlich an Urinproben durchgeführt. Eine dieser Studien wurde von Messchendorp et al. (2018) verfasst. Sie untersuchte 104 ADPKD-Patient:innen auf Biomarker im Urin⁶⁹. Der Fokus lag auf bekannten Markern der Nierenschädigung wie Albumin, Immunglobulin Gamma (IgG), Kidney Injury Molekül-1 (KIM-1), N-acetyl-b-D-glucosaminidase (NAG), b2 Mikroglobulin (b2MG), Heart-type Fatty Acid Binding Protein (HFABP) und MCP-1. Parikh et al. (2012) beschäftigte sich ebenso mit dieser Thematik. Sie untersuchten 107 ADPKD-Patient:innen auf Marker für tubulären Nierenschaden wie Interleukin 18 (IL-18) und Neutrophilen-Gelatinase-assoziiertes Lipocalin (NGAL)⁷³. Die oben genannten Studien^{74,75} bezogen sich in den letzten Jahren hauptsächlich auf Marker von tubulären Zellschäden, weniger auf Inflammationsmarker wie in dieser Studie. Ebenso waren die getesteten ADPKD-Kohorten oft kleiner, besaßen ein niedrigeres Durchschnittsalter und wiesen eine besser erhaltene Nierenfunktion auf. Während das mittlere Alter bei Messchendorp et al. (2018) bei 40 Jahren und der Anteil weiblicher Probandinnen bei 39% lag, waren die Patient:innen der Kohorte dieser Studie mit durchschnittlich 45 Jahren und 53% Frauenanteil grundsätzlich älter und der Anteil weiblicher Probandinnen war höher. Die Studienkohorte von Parikh et al. (2012) umfasste 107 Patient:innen, davon waren 58,8% der Patient:innen weiblich, das mittlere Alter betrug 32,1 Jahre. Zusätzlich wiesen die Patient:innen jener Studie eine mittlere eGFR von 89,39 ml/min/1,73m² und htTKV von 1080 ml/m auf. Die Patient:innen dieser Studie zeigten eine schlechtere mittlere Nierenfunktion von 64 ml/min/1,73m und eine bessere mittlere htTKV von 883 ml/m.

Die großen Unterschiede in den Studienpopulationen machen es schwer, diese 3 Kohorten zu vergleichen. Zusätzlich erschwert die dünne Studienlage zu dieser spezifischen Studienfrage die Einordnung unserer Ergebnisse in die aktuelle Studiensituation. Die obengenannten Studien stimmen darin überein, dass Marker des tubulären Nierenschadens in Kombination

mit Inflammationsmarkern eine gute Methode sind, um zukünftig ADPKD-Patient:innen zu identifizieren und ein Fortschreiten der Erkrankung vorherzusagen^{69,73}.

4.2.1. Kontroll-Kohorte

Um unsere Ergebnisse in Zusammenhang mit der ADPKD zu setzen, war die Etablierung einer Kontroll-Kohorte wichtig. Die Kontrollgruppe, N=30, wurde der ADPKD-Kohorte nach Alter und Geschlecht zugeordnet. Mit ihrer Hilfe konnten Einflussfaktoren identifiziert und ein Vergleich zwischen Gesunden und ADPKD-Patient:innen ermöglicht werden. Eine größere Anzahl an Kontroll-Proband:innen sowie eine detaillierte Differenzierung weiterer Laborparameter könnte mehr Einflüsse aufdecken und Subgruppierungen vermeiden.

4.2.2. Diagnostische Parameter

Aufgrund des destruktiven Erkrankungsverlauf von ADPKD ist die Identifizierung von möglichen Antreibern dieser Krankheit in Form von Biomarkern das Ziel diverser Forschungsgruppen^{54,60,73,76}. Diese neuen Marker sollen allein oder in Kombination mit anderen konventionellen Risikomarkern die Rate der Krankheitsprogression der ADPKD vorhersagen und als mögliche Therapieansatz dienen⁷². Die htTKV hat sich in den letzten Jahren zu einem dieser Marker entwickelt. Zusammen mit Patient:innenalter und Geschlecht bilden sie die Mayo-Klassifikation. In den größten ADPKD Studien (CRISP und HALT) wurde bewiesen, dass die htTKV dafür geeignet ist das Fortschreiten der Erkrankung zu überwachen^{42,77}. Jedoch ist auch sie nicht fehlerfrei. Indessen ist die aktuelle Mayo-Klassifikation nur für Patient:innen mit einem klassischen Krankheitsverlauf und diffusem Zystenwachstum (Klasse 1) nutzbar. Das hat zur Folge, dass Patient:innen mit asymmetrischem Zystenwachstum und großen oberflächlichen Zysten einer höheren Mayo-Klasse zugeordnet werden. Aktuell wird die Etablierung einer Neuberechneten htTKV zur Inklusion von Klasse 2 Patient:innen diskutiert, welche exophytische Zysten (Zysten, welche an der Nierenoberfläche sitzen und somit kein vitales Nierengewebe verdrängen) in der Volumetrierung (dreidimensionale Ausmessung der Niere anhand von CT/MRT Bildern) einschließen würde⁷⁷. Hierbei kommt es gleichzeitig zur Reklassifizierung von Klasse 1 Patient:innen mit exophytischen Zysten, welche dadurch in niedrigeren Mayo-Klassen eingeteilt werden würden⁷⁷. Eine Studie von Bae et al. (2020) ergab, dass eine Exklusion dieser Zysten in der Nierenvolumetrie einen Unterschied von einer Mayo-Klasse ausmacht. Zusätzlich sind unter Klasse 2 Patient:innen häufiger *PKD2* Mutationen zu finden⁷⁷. Da mehr als die Hälfte unserer Studienteilnehmer:innen, N=127, aus *PKD2* und nicht genetisch klassifizierten Patient:innen besteht, könnte das bedeuten, dass ein Großteil der Kohorte

niedrigeren Mayo-Klassen angehörig ist. Die statistischen Auswertungen hingehend der Mayo-Klassifikation gilt es deshalb zu hinterfragen.

Ebenso ist die Therapie mit dem einzigen zu diesem Zeitraum zugelassenen Medikament „Tolvaptan“ von der Mayo-Klassifikation abhängig⁷⁸. Zugelassen wurde dieses Medikament für Patient:innen im CKD-Stadium 1 mit gleichzeitigem Vorliegen einer Mayo-Klasse 1D oder 1E und zudem bei Patient:innen in den CKD-Stadien 2 und 3, wenn eine Mayo-Klasse von 1C, 1D oder 1E vorhanden ist⁷⁸. Da dieses Medikament mit gewissen Nebenwirkungen und Alltagseinschränkungen einhergeht, könnte eine Reklassifizierung bedeuten, dass die Therapie mit Tolvaptan zu diesem Zeitpunkt noch nicht nötig gewesen wäre⁷⁸. Nur 11,8% der ADPKD-Patient:innen nahmen zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses Tolvaptan ein.

4.3 Multiplex-Immunoassay

Wir testeten die zehn Biomarker mit einem *Multiplex-Immunoassay-System* von Bio-Rad. *multiplex-Immunoassays* beruhen auf einem *Beads* gestützten Durchflusszytometrie Mechanismus. Mit Hilfe dieser *Beads*, welche für ein bestimmtes Zytokin kodieren und mit einer Farbe markiert sind, konnten spezifische Konzentrationen von unterschiedlichen Zytokinen in einer organischen Probe identifiziert werden. Die Testung erfolgte an 3 Tagen auf sieben 96-Well-Platten. Alle Proben wurden doppelt getestet und der Mittelwert für die Gesamtauswertung benutzt. Zusätzlich untersuchten wir acht Urinproben und testeten zwei Patient:innen doppelt, um eine mögliche Plattenvariabilität auszuschließen.

4.3.1. Stärken Schwächen der Methode

Multiplex-Immunoassays haben sich als wichtiges Testwerkzeug für die Zytokinmessung in physiologischen und pathologischen Prozessen bewiesen, da sie die Auswertung von kompletten Zytokinmustern ermöglichen und eine umfassendere Darstellung des komplexen zellulären Signalnetzwerks der Zytokine/Chemokin Kaskaden bieten⁶⁴. IFN- γ , IL-1b und TNF- α sind Proteine der proinflammatorische Kaskade und fungieren über die Nukleärer Faktor κ B (NF κ B) und Januskinase - *Signal Transducer and Activator of Transcription* (JAK-STAT) Kaskaden. Gleichzeitig wurde mit Hilfe von IL-4, IL-10 und IL-13 die antiinflammatorischen und profibrotischen Moleküle observiert⁷¹. Der *Multiplex-Immunoassay* machte es möglich, in Proben mit geringen Probenvolumina gleichzeitig eine große Anzahl an Biomarkern zu analysieren. Daraus resultiert eine Zeitersparnis, wodurch Kosten und Ressourcen eingespart werden konnten. Ein weiterer Vorteil der *Multiplex-Immunoassays* ist ihre Individualisierung⁶⁴. Dies erspart unnötiges Testen von nicht-studienrelevanten Markern und ermöglicht so eine höhere Wirtschaftlichkeit. Ebenso steht die Testgenauigkeit der *Multiplex-Immunoassay*

Methode der von herkömmlichen Testmethoden wie ELISA nicht nach und wurde für diese Testmethoden validiert⁶⁵.

Ein Nachteil der Testung unserer Proben mit einem *Bead-based-multiplex-Immunoassay* - System könnte sein, dass es eine erhöhte Variabilität durch die Manufaktur, die Produktnummer, die durchführenden Tester:innen und somit der Ergebnisse gibt⁶⁵. Im Vorhinein konnten einige dieser Variabilitätsfaktoren umgangen werden, indem die Testdurchführung von einem erfahrenen Laborassistenten sowie ein Testsystem der Firma Bio-Rad verwendet wurde, die sich auf *Multiplex-Immunoassays* spezialisiert hat. Um die Variabilität weitergehend einzuschränken, durchliefen die individualisierte *Bead Sets* vor der Anwendung eine hausinterne Qualitätskontrolle. Die komplexe Mischung der diversen Antikörper, *Beads* und Nachweis-Antikörper sind ein einschränkender Faktor bei umfangreichem *Multiplexing*. Da alle Antikörper hoch spezifisch und sensitiv sein müssen, um Kreuzaktivitäten mit den Standards zu unterbinden, ist eine hohe Qualitätskontrolle umso wichtiger⁶⁵.

Ein weiterer Einflussfaktor, der zu einer Messvariabilität führen kann, sind menschliche Auto-Antikörper. Diese menschlichen Auto-Antikörper können die Zytokinkonzentrationen verfälschen, indem sie für eine unspezifische Bindung sorgen⁶⁴. Um dieses Risiko zu minimieren, gibt es antikörpereliminierende Verfahren, die vor der Testung stattfinden können. Aktuell werden in Studien drei eliminierende Verfahren beschrieben, die durch die Beseitigung der Auto-Antikörper spezifischere Testergebnisse erzielen⁷⁹. Da Auto-Antikörper bei der ADPKD nicht bekannt sind, haben wir auf diese Verfahren verzichtet. Retrospektiv ist dazuzusagen, dass das Vorkommen von Auto-Antikörpern im Rahmen von Systemerkrankungen nicht selten ist und auch in dieser Studie einen möglichen Einfluss gehabt haben könnte. In einer Studie von Olsan et al. (2011) wurde gezeigt, dass die Aktivierung der STAT6 Kaskade mit einer erhöhten Expression von polymerischem Immunglobulin-Rezeptor (pIgR) einhergeht. Zusätzlich induzieren IFN- γ und TNF- α die Expression von pIgR in Epithel-Zellen und wurden in ADPKD Zystenflüssigkeit festgestellt, sowie in unsere Studie vermehrt im Serum nachgewiesen⁸⁰. Es ist davon auszugehen, dass wenn pIgR auf ADPKD Zystenepithel-Zellen zu finden sind, diese an die Rezeptoren bindenden Antikörper vermehrt in ADPKD-Patient:innen vorhanden sind. Eine Beeinflussung der Testgenauigkeit durch diese Antikörper ist deshalb nicht auszuschließen.

Die Testung der Zytokine mit dem *Multiplex-Immunoassay* wurde anhand von Serumproben der ADPKD-Patient:innen durchgeführt. Die Blutentnahme dieser Serumprobe fand am Tag des Einschusses in das ADPKD Registers statt und wurde anschließend weiterverarbeitet und bei -80 Grad aliquotiert gelagert. Das früheste Einschussdatum eines Studienteilnehmers war

2016. Da der genaue Nachweis von Zytokinen und Chemokinen auch mit dem Alter und der Gefrierzeit der Probe zusammenhängt, empfiehlt es sich für genaueste Messergebnisse, die Proben so frisch wie möglich weiterzuverarbeiten und zu testen. Li et al. (2008) verzeichneten in seiner Studie höhere Konzentrationen an TNF- α im Serum von ADPKD-Patient:innen im Vergleich zu anderen Studien, in dem sie die Untersuchung an frischen Serumproben (im Gegensatz zu gefrorenen Serumproben) durchführten⁵². Es gilt zu hinterfragen, ob die *Multiplex-Methode* und die Zytokinkonzentrationen durch eine lange Gefrierzeit beeinflusst werden.

Das besondere dieser Studie, nämlich eine große Anzahl an Zytokinen und ihre Zusammenhänge mit ADPKD zu untersuchen, ist gleichzeitig auch eine der größten Herausforderungen in der Forschung von Inflammations-assoziierten Krankheiten. Es gibt allein mehr als 50 Chemokine mit jeweils 20 Rezeptoren, sodass es nicht praktikabel wäre, sie alle in einer experimentellen Studie zu untersuchen, da die Testung aller Chemokine und Rezeptoren zu Unübersichtlichkeit führen und durch multiple Signalkaskaden und gegenseitiger Induktion fehlende Präzision nach sich ziehen kann. Vielmehr ist es vorteilhafter, einzelne Schlüsselmomente zu untersuchen, die der Auslöser einer Abwärtsspirale sein könnten. Daher könnte sich das Fokussieren auf weniger Zytokine positiv auf das Verstehen möglicher Induktoren auswirken⁵³.

4.4 Diskussion der Ergebnisse

In dieser Studie wurde der Frage nachgegangen, ob es signifikante Unterschiede zwischen den Zytokinkonzentrationen von ADPKD-Patient:innen und Kontroll-Proband:innen gibt, durch was diese beeinflusst werden und ob ein Zytokin mit der Krankheitsprogression von ADPKD in Verbindung gebracht werden kann. Wir konnten unsere H_0 -Hypothese ablehnen und unsere H_1 -Hypothese: Es gibt signifikante Unterschiede zwischen der ADPKD-Kohorte und der Kontroll-Kohorte annehmen, da vier Zytokine signifikante Unterschiede zu den gesunden Kontrollproband:innen zeigten. Zwei weitere Zytokine zeigten signifikante Unterschiede innerhalb der beiden Geschlechter. Die Krankheitsprogression und die Höhe der Nierenschädigung konnte ebenfalls als Einflussfaktor auf die Zytokinkonzentration identifiziert werden.

4.4.1. Einschränkende Faktoren der Ergebnisse

Die Rohdaten der *Multiplex-Immunoassay* Testung enthielten einige Werte, die unterhalb der Testmessspanne lagen (<OOR). Das kann verschiedene Gründe haben. Eine Möglichkeit wäre, dass die Probe kein Analyt beinhalten, das Level des Analyten unterhalb des

Detektionslimits des Geräts lag, oder das Testmedium zu verdünnt war. Bei fünf Zytokinen machten diese <OOR Werte mehr als 50% aus. Um mit diesen fehlenden Werten adäquat umzugehen, entschieden wir uns, die <OOR Werte mit dem Mittelwert des verdünntesten Standards aus allen Platten zu ersetzen, wodurch wir eine Verzerrung der Ergebnisse durch ein Ersetzen mit 0 oder 1 vermeiden wollten. Es gilt zu diskutieren, ob durch das Einsetzen von mehr als der Hälfte desselben Wertes nicht auch eine Verzerrung stattgefunden hat, da in der statistischen Auswertung keines der fünf Zytokine mit über 50% ersetzen Werten eine statistische Signifikanz zeigte. Um diese Verzerrung komplett zu vermeiden wäre ein Lösungsansatz nur Daten im darstellbaren Konzentrationsbereich zu verwenden. Das würde zwar die Anzahl der erfolgreichen Proben minimieren und niedrige Messergebnisse in Schwellenbereichen unterschlagen, aber keine statistische Verzerrung bedeuten⁶⁴.

Ein Grund warum <OOR Werte auftreten können, ist ein zu niedriger Proteingehalt in der Serumprobe. Das kann passieren, wenn die organische Probe zu sehr verdünnt wurde⁶⁴. In der Bedienungsanleitung jedes Testkits werden Verdünnungsfaktoren vorgeschlagen, welche auf den Werten von gesunden Proband:innen basieren⁸¹. Aufgrund der pathologischen Beschaffenheit einer einzelnen Probe kann ein anderer Verdünnungsfaktor erforderlich sein, um den Messwert in den sichtbaren Bereich des Messgeräts zu heben. Ein weiteres Zeichen, dass die Daten nicht vollständig fehlerfrei waren, zeigte sich anhand von neun „*Samplingerrors*“. „*Samplingerrors*“ sind Fehler im Messgeschehen, die ein Testergebnis nicht aussagekräftig machen. In dieser Testung sind drei Arten von „*Samplingerrors*“ aufgetreten. Sie betrafen zum einen den „*Bead Count*“, also die Anzahl der *Beads pro Well*, ein anderes Mal die falsche „*Bead Region*“ sowie einen zu hohen „Konzentrationsvarianten“. Sie können auftreten, wenn die Testproben mit anderen organischen Materialien in Kontakt kommen, die Kühlzeit nicht eingehalten wurde, oder die *Beads* zu lange Licht ausgesetzt wurden⁸¹. Weitere Gründe wären eine nicht ausreichende Kalibrierung des Messgeräts, eine falsch eingestellte Rüttelplatte oder Zentrifuge, wodurch die *Beads* sich nicht trennen konnten und aneinander klumpten⁶⁵. Die obengenannten Fehler beruhen auf Handhabungsfehlern. Diesem wollten wir vorbeugen, indem die Testung von einem erfahrenen wissenschaftlichen Mitarbeiter mit umfangreicher Erfahrung in der Benutzung dieses Geräts durchgeführt wurde. Folgende Maßnahmen könnten die Fehlerquote reduzieren: Dreifache Testung der einzelnen Proben sowie Verkürzung der Gefrierdauer der Testproben⁵².

Die Aussagekraft der Daten wird außerdem durch einen potenziellen Einfluss der Testplatten geschwächt (siehe Plattenvergleiche im Anhang). Obwohl der Plattenbelegungsplan initial dafür gesorgt hatte, dass jede Platte ein ausgeglichenes Verhältnis an Geschlecht, Alter, CKD-Stadien und Mayo-Klassen hatte, zeigten sich im Mittelwertvergleich der sieben Testplatten

von IFN- γ und TNF- α , signifikante Unterschiede. Dies hat zur Folge, dass die signifikanten Ergebnisse der beiden Zytokine unter dem Aspekt beurteilt werden muss, dass ein Einfluss der einzelnen Testplatten nicht ausgeschlossen werden konnte. Um die Signifikanz der Ergebnisse zu verifizieren, müsste in weiteren Studien mit einem anderem Testverfahren, z.B. ELISA, die signifikanten Aussagen nochmals überprüft werden.

4.4.2. Bedeutung der Ergebnisse

Das Ziel dieser Studie ist es, die Rolle von Zytokinen in der ADPKD zu verstehen und mögliche Einflussfaktoren zu identifizieren. Hierfür führten wir verschiedene statistische Tests durch, die im nachfolgenden Abschnitt im Zusammenspiel mit der aktuellen Literatur diskutiert werden.

Korrelation der Zytokine innerhalb der ADPKD- und Kontroll-Kohorte:

Um gegenseitige Zusammenhänge darzustellen, korrelierten wir die getesteten Zytokine der beiden Kohorten untereinander. Es zeigte sich in der ADPKD- und Kontroll-Kohorte, dass IFN- γ positiv mit MCP-1 korreliert (siehe Abschnitt **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** und **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). IFN- γ zählt mit IL-4 zu den Makrophagenaktivatoren. Makrophagen wurden in den letzten Jahren als wichtige Krankheitsantreiber von ADPKD identifiziert^{56-58,82}. IFN- γ aktiviert die proinflammatorische Kaskade, IL-4 die antiinflammatorische Kaskade. TNF- α und MCP-1 gehören zu der proinflammatorischen Kaskade der M1a und M1b Monozyten⁵³. Die IFN- γ Ausschüttung führt somit zum Anstieg der MCP-1 Konzentration. In unsere Studie konnten wir in der ADPKD- und Kontroll-Kohorte zeigen, dass es proinflammatorische Einflussfaktoren im Krankheitsgeschehen der Zystennierenerkrankung gibt. In bisherigen Studien wurden diese Marker primär im Urin untersucht, um auf ein lokales Inflammationsgeschehen hinzuweisen⁸². Diese Studie zeigte mit dem Nachweis einer erhöhten Biomarkerkonzentration im Serum, dass bei ADPKD von einer systemischen Inflammation auszugehen ist.

Der Vergleich von Zytokinkonzentrationen Kontroll- vs. ADPKD-Kohorte:

Um mögliche Konzentrationsunterschiede der Zytokine zwischen ADPKD-Patient:innen und Kontrollproband:innen darzustellen, verglichen wir die Mediane aller Zytokine dieser Gruppen miteinander. IL-6, IL-8, MCP-1 und TNF- α zeigten signifikante Konzentrationsunterschiede zwischen den beiden Kohorten. Die Mediane der ADPKD-Patient:innen dieser vier Zytokine überstiegen deutlich jene der gesunden Proband:innen (siehe 3.3.3.).

In einer Studie von Zimmerman et al. (2020) wurden gesunde humane Nierenzellen mit Nierenzellen von ADPKD-Patient:innen mit zystischen und nicht-zystischen Nephrone

verglichen. Hier zeigte sich, dass zystischen Nierenzellen vermehrt für Gene codieren, welche dafür zuständig sind, Inflammationsmarker wie Zytokine/Chemokine und Komplementfaktoren zu überexprimieren⁸³. Einige dieser Gene kodieren für IL-6, IL-8 und MCP-1. ADPKD geht somit mit einer höheren Expression von IL-6, IL-8 und MCP-1 einher, was die Ergebnisse dieser Studie unterstützen. Unter entzündlichen Konditionen fungiert IL-8 als Chemoattraktor. Es rekrutiert Immunzellen wie Neutrophile und diverse weitere Granulozyten zum Ort der Inflammation, wo es proinflammatorische Effekte wie Phagozytose induziert⁸⁴. Zusätzlich dient IL-8 als angiogener Faktor, der die Zellproliferation stimuliert. Diese IL-8 spezifischen Eigenschaften verstärken den fibrotischen Inflammationszustand der ADPKD. TNF- α ist ein potenter Induktor von Chemokinen, wie zum Beispiel MCP-1. TNF- α reguliert über die Serin/Threonin-Proteinkinase/ *mechanistic target of rapamycin*- Kaskade (aKt/mTOR) und der *extracellular signal-regulated kinases/mitogen activated protein kinases/ cyclin-dependent kinase 2 mediated Inhibitor of DNA binding/differentiation 2* (ERK/MAPK/Cdk2 mediated Id2) Signalkaskade die epitheliale Zystenproliferation⁸³. Dies spiegelt die Ergebnisse dieser Studie wider, indem eine signifikant höhere TNF- α Konzentration bei ADPKD-Patient:innen dargestellt wurde.

Der Einfluss des Geschlechts auf die Zytokinkonzentration:

Anschließend wurden mögliche geschlechtliche Einflussfaktoren der Zytokinkonzentrationen beleuchtet. Die *Multiplex-Immunoassay* Testung ergab eine signifikant höhere MCP-1 und TNF- α Konzentration für Männer als für Frauen sowohl in der der ADPKD als auch der Kontroll-Kohorte. Generell zeigten die männlichen ADPKD Patienten ein höheres medianes Zytokinprofil (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden..**).

Geschlechtshormone wie Östrogene regulieren reaktive Sauerstoff Spezies (ROS) in Mitochondrien. Immunologische Signalwege wie ROS werden unter anderem von TNF- α reguliert und über die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen beeinflusst⁸⁵. Die Geschlechtshormone binden an spezifische Zellmembran-, Nukleus- assoziierte Rezeptoren, der Immunzellen und beeinflussen dadurch die Genexpression dieser Zytokine. Östrogenrezeptor - α und - β sowie Androgenrezeptoren befinden sich abgekapselt an Hitze-Schock-Proteinen, gebunden im Zytoplasma. Obwohl Geschlechtshormonrezeptoren meistens intrazellulär exprimiert werden, sind sie in Immunzellen auf der Zelloberfläche zu finden. Dort sind sie Teil der immunologischen Synapse während der Antigenpräsentation. Von Östrogen ist bekannt, dass es die Fähigkeit besitzt, Antikörperantworten von Impfungen, Infektionen oder Autoantigenen durch die Aktivierung von B-Zellen zu beeinflussen⁸⁵. Je nach Höhe der Östrogenkonzentration kann es proinflammatorisch über vermehrte Typ1-T-Helfer Zellen (Th1) und Typ17-T-Helfer Zellen (Th17) Expression durch NF κ B agieren. Oder es kann

antiinflammatorischen Reaktion unterstützen, indem es dendritische Zellen und antiinflammatorische Regulatorische Typ2-T-Helfer Zellen (Th2) aktiviert⁸⁶. Es wird davon ausgegangen, dass Östrogen und Progesteron die Aktivierung von T-Regulator Zellen verstärken. Regulatorische T-Zellen sorgen für das Wiederkehren der immunologischen Homöostase, indem sie nach erfolgreicher Immunreaktion die Immunantwort beenden. Dadurch sind regulatorische T-Zellen Schlüsselzellen in der Immunantwort wichtig für die Prävention von Autoimmunreaktionen⁸⁵.

Über den Einfluss von Testosteron auf Immunreaktionen oder Inflammationskrankheiten gibt es weniger investigative Studien als zu den primär weiblichen Hormonen⁸⁶. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass durch den von Mitochondrien exprimierten Östrogenrezeptor- α , Frauen mehr vor kardiovaskulären Krankheiten geschützt sind als Männer⁸⁵. Sowohl die CRISP-Studie von Irazabal et al. (2015), als auch eine große ADPKD Studie aus der Schweiz von Kistler A. D. et al (2009) sowie eine Studie von Chen D. et al (2014) berichteten von vermehrten schwereren ADPKD Krankheitsverläufen unter männlichen Patienten^{39,42,87}.

Dass es einen geschlechtlichen Einfluss von ADPKD gibt, steht nicht zur Frage. Dass es ebenso einen geschlechtlichen Einfluss auf die Zytokinexpression gibt, konnten wir darstellen. Dies könnte sich wie folgt erklären: Eine niedrigere Östrogenkonzentration, welche mit Th-1-Zellaktivierung assoziiert ist, aktiviert bei Männern über NF κ B die proinflammatorische Kaskade, was dadurch zu höheren Zytokinkonzentrationen führt. Gleichzeitig besitzen Frauen eine höhere Östrogenkonzentration, was eine vermehrte Aktivierung der antiinflammatorischen Kaskade über Th-2-Zellen mit niedriger Zytokinkonzentrationen zur Folge hat. Zusätzlich ist Östrogen ein Negativregulator von den TNF- α ausschüttenden CD4⁺ T-Lymphozyten⁸⁸. Diese von Elanor N. Fish (2008) beschriebenen Mechanismen können die Konzentrationsunterschiede von TNF- α und MCP-1 in Männern und Frauen erklären⁸⁸. Ob hierdurch jedoch die höhere Krankheitsprogression mit schwerem Verlauf bei männlichen ADPKD Patienten auch bewiesen werden kann, muss in weiterführenden experimentellen Studien nachgegangen werden.

Der Einfluss der Nierenfunktion und Rate der Krankheitsprogression auf die Zytokine:

Bei den klinischen Eigenschaften der ADPKD-Patient:innen zeigte die Mayo-Klassifikation und das CKD-Stadium signifikante Unterschiede in den Zytokinkonzentrationen. Im ersten Teilabschnitt möchte ich auf den Einfluss der Mayo-Klassifikation eingehen.

In dieser Studie konnten wir statistische Zusammenhänge zwischen einzelnen Mayo-Klassen und der TNF- α Konzentration feststellen (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden..**). Wir beobachteten, dass höhere Mayo-Klassen, sprich Patient:innen mit einem progredienten Krankheitsverlauf, höhere TNF- α Konzentration besaßen, als Patient:innen mit langsameren Krankheitsverlauf, also niedriger Mayo-Klassen. Vor allem die Untergruppen der Mayo Klassen 1B zu 1D und 1B zu 1E wiesen signifikante Unterschiede auf. Um den Unterschied in Mayo-Klassen zu bewerten, ist es wichtig darzustellen, dass die Mayo-Klasse das htTKV in Abhängigkeit von Alter, und Geschlecht beschreibt. In dieser Studie konnten wir beleuchten, dass es signifikante Unterschiede in der TNF- α Konzentration zwischen höheren und niedrigen Mayo-Klassen gibt. Ihre Assoziationen zu der Rate der Krankheitsprogression ist zusätzlich interindividuell unterschiedlich⁷². Im Laufe der Jahre wurde ein großes Augenmerk auf TNF- α und sein Zusammenspiel mit der Pathophysiologie der ADPKD gelegt. Die TNF- α -Konzentrationen steigen mit vermehrter Makrophageninfiltration in das renale Gewebe. TNF- α wurde zusätzlich in Nierenzysten nachgewiesen und ist dadurch mit einem progredienten Zystenwachstum assoziiert⁵⁵. Daraus schließt sich, dass mit steigendem Alter und somit vermehrter Infiltration von Makrophagen die TNF- α -Konzentration zunimmt und somit auch das Nierenvolumen durch vermehrt induzierte Zystogenese steigt⁵². Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen, das höhere Mayo-Klassen, welche generell ein größeres Nierenvolumen besitzen, höhere TNF- α Konzentrationen aufweisen. In einer Studie von Li et al. (2008) wurden embryonische Mäusenierenkulturen mit TNF- α behandelt, was daraufhin die Zystogenese induzierte. Ebenso zeigte dieselbe Studie, dass die Hemmung von TNF- α mit einem TNF- α Inhibitor wie Etanercept der Zystenbildung vorbeugte⁵². Bei voranschreitender ADPKD Erkrankung und dadurch zunehmen der Zystogenese kommt es zu einer Nierenvolumen Zunahme. Dargestellt in der Mayo-Klassifikation müssten somit Patient:innen in einer hohen Mayo-Klasse aufgrund großer Nierenvolumen auch hohe TNF- α Konzentrationen vorweisen. Diese Studie konnte zeigen das höhere Mayo-Klassen, somit auch vermehrtes Zystenwachstum, mit einer höheren TNF- α Konzentration einhergeht. Ob eine medikamentöse Zystenwachstum Hemmung bei ADPKD-Patient:innen wie durch Li et al. (2008) beschrieben wurde eine möglicher Interventionspunkt ist gilt es in zukünftigen Studien heraus zu finden.

Im zweiten Teilabschnitt betrachten wir die signifikanten Unterschiede in TNF- α und IL-6 Konzentration je nach CKD-G-Stadium. Die CKD-G-Stadien repräsentieren die aktuelle Nierenfunktion in Form der eGFR. Es ließ sich feststellen, dass ADPKD-Patient:innen mit einem höheren CKD-G-Stadium und somit niedrigerer GFR signifikant höhere TNF- α und IL-6 Konzentrationen vorwiesen, als Patient:innen mit höherer GFR. Bei den IL-6

Konzentrationen zeigten die Untergruppen CKD-G1 zu G4 sowie CKD-G2 zu G4 signifikante Unterschiede. Der Biomarker TNF- α wies in den Gruppen CKD-G1 zu G4, G1 zu G3a, G2 zu G4 und G2 zu G3a bedeutsame Divergenzen auf. Eine Studie von Romanova et al. (2020) bestätigte unsere Ergebnisse, denn sie bewies, dass die IL-6 Konzentrationen bei Patient:innen mit CKD über 50-mal so hoch wie die von Gesunden waren. Gleichmaßen waren die TNF- α Konzentrationen 6-12-mal höher als die der gesunden Proband:innen⁷⁰. Auch in dieser Studie fand ein Vergleich von ADPKD-Patientinnen mit Gesunden statt, siehe Abbildung 17. Die IL-6 Konzentrationen in dieser Studienkohorte waren bei ADPKD-Patient:innen fünfmal höher als die der Kontroll-Kohorte. Die TNF- α Konzentrationen erwiesen ebenfalls bei Erkrankten eine doppelt so hohe Konzentration wie in der Kontroll-Kohorte. Die Zusammenführung von etablierten Parametern, wie CKD-Stadien und Mayo-Klasse, mit Inflammationsmarkern in dieser Studie haben gezeigt, dass es eine Überschneidung zwischen etablierten Markern und neuen Biomarkern gibt. Dennoch sind weitere prospektive Studien mit größeren Kohorten und jüngeren Patient:innen nötig, um diese Unterschiede im weiteren Krankheitsverlauf zu verifizieren.

Da TNF- α signifikante Ergebnisse in den Unterpunkten, Geschlecht, CKD-Stadium und Mayo-Klassifikation zeigte, führten wir eine multiple lineare Korrelation von TNF- α mit den variablen Faktoren CKD-G, männliches Geschlecht und Mayo-Klassen durch. TNF- α ist ein primär proinflammatorisches Zytokin und als potenzieller Mediator an vielen renalen Krankheiten, wie zum Beispiel akuter und chronischer Nierenkrankheit⁸⁹ sowie PKD⁹⁰, beteiligt. Eine Erhöhung der TNF- α Konzentration wurde in einigen Studien mit der Progression von ADPKD assoziiert^{52,90}. Um Herauszufinden ob die signifikanten Ergebnisse von einer bestimmten Variable am meisten beeinflusst werden, führten wir die Regressionsanalyse durch. In dieser Studie zeigte TNF- α die stärkste Korrelation mit dem CKD-G-Stadium. Eine Multiple Lineare Regressionsanalyse bewies eine unabhängige Korrelation von TNF- α mit CKD-G-Stadium, nach Adjustierung für Mayo-Klassifikation und Geschlecht. Somit können wir davon ausgehen, dass die signifikanten Ergebnissen in den Mayo-Klassen und dem Geschlecht primär auf die Nierenfunktion zurückzuführen sind.

Der Einfluss des Alters auf die Zytokinkonzentration:

In dieser Studienpopulation konnte weder in der ADPKD-Kohorte noch in der Kontroll-Kohorte ein Zusammenhang zwischen Alter und Zytokinkonzentration beobachtet werden. Obwohl höheres Alter mit einer verstärkten inflammatorischen Aktivität durch erhöhte Level von TNF- α und IL-6 assoziiert ist, konnten wir dies nicht beobachten^{89,91}. Epidemiologische Studien weisen darauf hin, dass niederschwellige chronische Inflammationszustände mit zunehmendem Alter Krankheiten des älteren Menschen wie Atherosklerose antreiben und mit

einer erhöhten Sterblichkeit einhergehen⁹¹. Im Zusammenspiel mit der ADPKD sind ältere Patient:innen häufiger in schweren Krankheitsstadien anzutreffen. Obwohl es im Alter zu einer Stagnierung des Nierenvolumens kommt, sinkt die GFR weiter⁸⁷. Das Alter und das Krankheitsstadium werden massiv vom Genotyp geprägt. Ein passendes Beispiel dafür stellt diese Studienkohorte dar, denn 27 Patient:innen waren der Mayo-Klasse 1E angehörig, besaßen somit alle eine sehr hohe Krankheitsprogression. Das mittlere Alter dieser 27 Patient:innen lag bei 36,95 Jahren, somit 9 Jahre unter dem allgemeinen Kohortendurchschnitt. Diese hohe Krankheitsprogression und das junge Alter erklärt sich durch die Genotypen dieser Patient:innen. 13 Patient:innen besaßen eine bestätigte *PKD1* trunkierende Mutation, vier eine *PKD1* nicht-trunkierende Mutation, weitere vier Patient:innen besaßen die milde *PKD2* Mutation, die restlichen sechs wiesen eine andere Mutation nach oder waren bisher nicht genetisch sequenziert worden. Insofern lässt sich erklären, dass das Alter nicht gleich mit der Schwere des Krankheitsverlauf zu setzen ist. Auch wenn steigendes Alter mit einem höheren Grundinflammationszustand einhergeht⁹¹, kann es möglich sein, dass die Genetik die Effekte des Alters aushebt oder sogar die Altersbedingte Inflammation beschleunigt. Auch hierfür sind weitere Langzeitstudien nötig, um eine wissenschaftlich fundierte Aussage zu treffen.

Zytokinkonzentrationen im Urin:

Abschließend testeten wir Urinproben von acht ADPKD Patientinnen mit derselben Methodik, um Unterschiede zu den Serumproben darzustellen. Viele der oben zitierten Studien beziehen sich auf die Untersuchungen von Biomarkern im Urin der ADPKD-Patient:innen. Es ist sehr einleuchtend, Biomarker in dem Ausscheidungsprodukt des betroffenen Organs zu vermuten, weshalb auch wir mit einer kleinen Stichprobe von acht Patientinnen eine *Multiplex-Immunoassay* Testung des Urins durchführten. Die Urin Testung von acht ADPKD-Patientinnen erbrachte bis auf einer Patientin keine auswertebaren Ergebnisse. In der Produktinformation von Bio-Rad ist die humane *Multiplex-Immunoassay* Methode nicht für Urin validiert, wodurch die fehlenden Messwerte erklärbar sind. Da es sich um eine kleine Stichprobe handelt, können die Ergebnisse dieser Untersuchung schwer auf die gesamte Studienpopulation und Testmethode übertragen werden. Mögliche Einflussfaktoren wie eine lokale Infektion der Harnwege als Grund für die positive Urinprobe unserer Patientin konnten ausgeschlossen werden. In einer Studie von Plesiński et al. (2019) wurde IL-18 als möglicher Biomarker im Urin von Kindern mit Nierenzysten getestet. Hier zeigte sich, dass sich die IL-18 Konzentration im Urin der erkrankten Kinder kaum von den gesunden Kindern unterschied⁹². Das kann am frühen Krankheitsstadium der Kinder liegen mit bislang niedrigen Inflammationszuständen oder der initialen Kumulierung von Zytokinen in den Zysten, bevor sie durch den Urin ausgeschieden werden⁵⁵. Nichtsdestotrotz hat die Routinetestung von

Zytokinen im Urin als Biomarker Limitationen. Denn bei Multiorganerkrankungen, wozu die ADPKD zählt, kann die Zytokinkonzentration im Urin nicht nur auf einen zunehmenden renalen Schaden zurückgeführt werden, sondern auch von anderen Gefäß- und Gewebsuntergängen in Lunge und Herz beeinflusst sein⁷⁶.

4.5 Ausblick / Offene Fragen

Die aktuelle Evidenz suggeriert, dass Inflammation im sehr frühen Krankheitsstadium der ADPKD möglicherweise schon vor der Zystenbildung beginnt und mit der Krankheitsprogression korreliert. Die zugrundeliegenden Mutationen und die dadurch dysfunktionalen PC1/2 sind zweifelslos die Hauptursache der Zystogenese, jedoch spielt die Inflammation eine sehr wichtige Rolle in der Progression dieser Zystenkrankheit^{57,58,76}. In dieser Studie konnte bestätigt werden, dass die Nierenfunktion Einfluss auf die Zytokinexpression von IL-6 und TNF- α und somit die Inflammation hat. Jedoch wurden keine Kontroll-Patient:innen mit ADPKD-Patient:innen mit leicht reduzierter Nierenfunktion verglichen. Um den Einfluss der Inflammation zu beweisen, sollten sich zukünftige Studien mit dieser Thematik befassen und der Frage nachgehen, ob ein geringer Nierenfunktionsverlust sich in erhöhten Inflammationsmarkern widerspiegelt. Sollte dies der Fall sein, könnten diese Marker als potenzielle Interventionsziele dienen.

Proinflammatorische Zellen als mögliches therapeutisches Ziel zu betrachten, birgt einige Herausforderungen. Zwar wurde in experimentellen Studien gezeigt, dass die Reduzierung der Makrophagenanzahl bei ADPKD mit einer verminderten Fibrosierung des Nierenparenchyms, einer verbesserten Nierenfunktion und gleichzeitig verlangsamtem Zystenwachstum einhergeht. Jedoch sind aktive und chronische Inflammationskaskaden parallel aktiv, die vor allem in späten Stadien der PKD wichtige Funktionen einnehmen, sodass eine Balance zwischen guter und schlechter Inflammation aufrechterhalten werden muss⁷⁶. Da viele Zytokine nicht nur eine Funktion in der Immunantwort haben, sondern auch wichtige Rollen in verschiedenen Signalkaskaden, z.B. Apoptose und Granulopoese⁷¹, spielen, sollte man in zukünftiger Forschung das Regulieren und oder das Blockieren von diesen proinflammatorischen Biomarkern durch Therapeutika mit starker Vorsicht betrachten⁴⁸. Es wird eine enorme Herausforderung sein, diese Zytokine als mögliche therapeutische Ziele zu betrachten, ohne schwerwiegende Nebenwirkungen davonzutragen⁵³.

Eine weitere Möglichkeit, eine bessere Aussage zur Krankheitsprogression und zu möglichen Risikomarkern zu treffen, ist, ADPKD-Patient:innen bereits in frühen Krankheitsstadien zu untersuchen. Viele der aktuell diskutierten Biomarker wurden an ADPKD-Patient:innen in weit

fortgesetzten Krankheitsstadien getestet. Ob sie also mit den Folgen der chronischen Nierenkrankheit oder ADPKD spezifischen Prozessen zusammenhängen, ist unklar⁹³. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist das Verstehen der pathologischen Prozesse, welche die Zystogenese am Krankheitsbeginn speisen. Diese Prozesse können nur an Patient:innen in frühen Krankheitsstadien untersucht werden⁹².

Eine Alternativstrategie zur langfristigen Erhaltung einer guten Nierenfunktion wäre eine frühzeitige Identifizierung von Schlüsselereignissen. Erfolgreiche Interventionen am Krankheitsbeginn können hilfreich sein, spätere Konsequenzen wie morphologische Nierenschäden, die zur Krankheitsprogression führen, zu vermeiden⁵³. Hierfür müssen zwei Konditionen erfüllt sein: ADPKD-Biomarker müssten erstens akkurat sein und zweitens in frühen Krankheitsstadien das Risiko für Nierenversagen vorhersagen können⁹³. Ein großer Vorteil der frühen Identifizierung von Risikopatient:innen wäre eine Verlangsamung der Krankheitsentwicklung, was nicht nur Patient:innen eine verbesserte Lebensqualität bieten, sondern auch einer Reduzierung von krankheitsbedingten Kosten für die Gesellschaft bedeuteten würde⁴.

5. Literaturverzeichnis

1. Lanktree, M. B. & Chapman, A. B. New treatment paradigms for ADPKD: Moving towards precision medicine. *Nat Rev Nephrol* **13**, 750–768 (2017).
2. Müller, R. U. & Benzing, T. Management of autosomal-dominant polycystic kidney disease - State-of-the-art. *Clin Kidney J* **11**, I2–I13 (2018).
3. Willey, C. J. *et al.* Prevalence of autosomal dominant polycystic kidney disease in the European Union. *Nephrology Dialysis Transplantation* **32**, 1356–1363 (2017).
4. Testa, F. & Magistroni, R. ADPKD current management and ongoing trials. *J Nephrol* **33**, 223–237 (2020).
5. Spithoven, E. M. *et al.* Renal replacement therapy for autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) in Europe: Prevalence and survival - An analysis of data from the ERA-EDTA Registry. *Nephrology Dialysis Transplantation* **29**, iv15–iv25 (2014).
6. Haumann, S., Burgmaier, K., Bergmann, C., Müller, R. U. & Liebau, M. C. Hereditary cystic kidney diseases: autosomal dominant and autosomal recessive polycystic kidney disease (ADPKD and ARPKD). *Medizinische Genetik* **30**, 422–428 (2018).
7. Brill, A. L. & Ehrlich, B. E. Polycystin 2: A calcium channel, channel partner, and regulator of calcium homeostasis in ADPKD. *Cell Signal* **66**, 109490 (2020).
8. Grantham, J. J. Clinical Practice. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* **359**, 1477–1485 (2008).
9. Porath, B. *et al.* Mutations in GANAB, Encoding the Glucosidase II α Subunit, Cause Autosomal-Dominant Polycystic Kidney and Liver Disease. *Am J Hum Genet* **98**, 1193–1207 (2016).
10. Cornec-Le Gall, E. *et al.* Monoallelic Mutations to DNAJB11 Cause Atypical Autosomal-Dominant Polycystic Kidney Disease. *Am J Hum Genet* **102**, 832–844 (2018).
11. Torres, V. E. & Ong, A. C. M. Cellular signaling in PKD: foreword. *Cell Signal* **71**, (2020).
12. Zhang, L. *et al.* RNA helicase p68 inhibits the transcription and post-transcription of Pkd1 in ADPKD. *Theranostics* **10**, 8281–8297 (2020).
13. Bergmann, C. ARPKD and early manifestations of ADPKD: the original polycystic kidney disease and phenocopies. doi:10.1007/s00467-013-2706-2.
14. Gall, E. C. *le et al.* Type of PKD1 mutation influences renal outcome in ADPKD. *Journal of the American Society of Nephrology* **24**, 1006–1013 (2013).

15. Hateboer, N. *et al.* Comparison of phenotypes of polycystic kidney disease types 1 and 2. *Lancet* **353**, 103–107 (1999).
16. Cornec-Le Gall, E. *et al.* Genetics and Pathogenesis of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: 20 Years On. *OFFICIAL JOURNAL Hum Mutat* **35**, 1393–1406 (2014).
17. Zhang, Z. *et al.* A common intronic single nucleotide variant modifies PKD1 expression level. *Clin Genet* **102**, 483–493 (2022).
18. Wegehaupt, O. BAG2, BAT3, DNAJB11, GNB2L1 und SERPINH1 interagieren in einem Netzwerk mit dem Polycystin-1-TRPP2-Signalmodul. (2016).
19. Nauli, S. M. *et al.* Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet* **33**, 129–137 (2003).
20. Grantham, J. J. *et al.* *Volume Progression in Polysystic Kidney Disease. J.K* vol. 66160 www.nejm.org (2006).
21. DALGAARD, O. Z. Bilateral polycystic disease of the kidneys; a follow-up of 284 patients and their families. *Dan Med Bull* **4**, 128–133 (1957).
22. Grantham, J. J., Geiser, J. L. & Evan, A. P. Cyst formation and growth in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* **31**, 1145–1152 (1987).
23. Grantham, J. J., Mulamalla, S. & Swenson-Fields, K. I. Why kidneys fail in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* **7**, 556–566 (2011).
24. Davidow, C. J., Maser, R. L., Rome, L. A., Calvet, J. P. & Grantham, J. J. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mediates transepithelial fluid secretion by human autosomal dominant polycystic kidney disease epithelium in vitro. *Kidney Int* **50**, 208–218 (1996).
25. Bergmann, C. *et al.* HHS Public Access. *Nat Rev Dis Primers* **4**, 1–58 (2019).
26. Harris, P. C. *et al.* Cyst number but not the rate of cystic growth is associated with the mutated gene in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology* **17**, 3013–3019 (2006).
27. Nichols, M. T. *et al.* Secretion of cytokines and growth factors into autosomal dominant polycystic kidney disease liver cyst fluid. *Hepatology* **40**, 836–846 (2004).
28. Cornec-Le Gall, E., Torres, V. E. & Harris, P. C. Genetic complexity of autosomal dominant polycystic kidney and liver diseases. *Journal of the American Society of Nephrology* **29**, 13–23 (2018).
29. Watnick, T. J. *et al.* Somatic mutation in individual liver cysts supports a two-hit model of cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Mol Cell* **2**, 247–251 (1998).

30. Liu, D. *et al.* A Pkd1-Fbn1 genetic interaction implicates TGF- β signaling in the pathogenesis of vascular complications in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **25**, 81–91 (2014).
31. Sharif-Naeini, R. *et al.* Polycystin-1 and -2 dosage regulates pressure sensing. *Cell* **139**, 587–596 (2009).
32. Grantham, J. J. Clinical Practice. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* **359**, 1477–1485 (2008).
33. Chapman, A. B. *et al.* The HALT polycystic kidney disease trials: Design and implementation. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **5**, 102–109 (2010).
34. Dicks, E., Parfrey, P., Cramer, B., Coto, E. & Torra, R. Unified Criteria for Ultrasonographic Diagnosis of ADPKD. 205–212 (2009) doi:10.1681/ASN.2008050507.
35. Pei, Y. *et al.* Imaging-based diagnosis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology* **26**, 746–753 (2015).
36. Antiga, L. *et al.* Computed Tomography Evaluation of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Progression: A Progress Report. *Clin J Am Soc Nephrol* **1**, 754–760 (2006).
37. Gabow, P. A. *et al.* The clinical utility of renal concentrating capacity in polycystic kidney disease. *Kidney Int* **35**, 675–680 (1989).
38. Chapman, A. B., Johnson, A. M., Gabow, P. A. & Schrier, R. W. Overt proteinuria and microalbuminuria in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology* **5**, 1349–1354 (1994).
39. Kistler, A. D. *et al.* Increases in kidney volume in autosomal dominant polycystic kidney disease can be detected within 6 months. *Kidney Int* **75**, 235–241 (2009).
40. Sise, C. *et al.* Volumetric determination of progression in autosomal dominant polycystic kidney disease by computed tomography. *Kidney Int* **58**, 2492–2501 (2000).
41. King, B. F., Reed, J. E., Bergstralh, E. J., Sheedy, P. F. & Torres, V. E. Quantification and longitudinal trends of kidney, renal cyst, and renal parenchyma volumes in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology* **11**, 1505–1511 (2000).
42. Irazabal, M. v. *et al.* Imaging classification of autosomal dominant polycystic kidney disease: A simple model for selecting patients for clinical trials. *Journal of the American Society of Nephrology* **26**, 160–172 (2015).

43. Yu, A. S. L. *et al.* Baseline total kidney volume and the rate of kidney growth are associated with chronic kidney disease progression in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Kidney Int* **93**, 691–699 (2018).
44. Müller, R. U. *et al.* An update on the use of tolvaptan for autosomal dominant polycystic kidney disease: Consensus statement on behalf of the ERA Working Group on Inherited Kidney Disorders, the European Rare Kidney Disease Reference Network and Polycystic Kidney Disease Inte. *Nephrology Dialysis Transplantation* **37**, 825–839 (2022).
45. Torres, V. E. *et al.* Analysis of baseline parameters in the HALT polycystic kidney disease trials. *Kidney Int* **81**, 577–585 (2012).
46. Grantham, J. J. *et al.* Tolvaptan suppresses monocyte chemotactic protein-1 excretion in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation* **32**, 969–975 (2017).
47. Tanifuji, C. *et al.* Beneficial effects of combination therapy with olmesartan and azelnidipine in murine polycystic kidneys. *Kidney Blood Press Res* **32**, 239–249 (2009).
48. Mun, H. & Park, J. H. Inflammation and fibrosis in ADPKD. *Adv Exp Med Biol* **933**, 35–44 (2016).
49. Gardner, K. D., With, K. D., Gardner, J. R. & Grantham, J.J. Composition of Fluid in Twelve Cysts of a Polycystic Kidney *J Am Soc Nephrol* vol. 9 (1998).
50. Huseman, R., Grady, A., Welling, D. & Grantham, J. Macropuncture study of polycystic disease in adult human kidneys. *Kidney Int* **18**, 375–385 (1980).
51. Formica, C. & Peters, D. J. M. Molecular pathways involved in injury-repair and ADPKD progression. *Cell Signal* **72**, 109648 (2020).
52. Li, X. *et al.* A Tumor Necrosis Factor-Alpha-Mediated Pathway Promoting Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Nature Med* **14**, 863–868 (2008).
53. Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S. & Sawaya, B. E. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. *Journal of Interferon and Cytokine Research* **29**, 313–325 (2009).
54. Viau, A. *et al.* Tubular STAT3 limits renal inflammation in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology* **31**, 1035–1049 (2020).
55. Gardner, K. D., Burnside, J. S., Elzinga, L. W. & Locksley, R. M. Cytokines in fluids from polycystic kidneys. *Kidney Int* **39**, 718–724 (1991).
56. Kurt A. Zimmerman, Jifeng Huang, Lan He, Dustin Z. Revell, Zhang Li, Jung-Shan Hsu, Wayne R. Fitzgibbon, E. Starr Hazard, Gary Hardiman, Michal Mrug,

- P. Darwin Bell, Bradley K. Yoder, T. S. Interferon Regulatory Factor-5 in Resident Macrophage Promotes Polycystic Kidney Disease. *Physiol Behav* **176**, 139–148 (2017).
57. Swenson-Fields, K. I. *et al.* Macrophages promote polycystic kidney disease progression. *Kidney Int* **83**, 855–864 (2013).
 58. Karihaloo, A. *et al.* Macrophages promote cyst growth in polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **22**, 1809–1814 (2011).
 59. Rees, A. J. Monocyte and macrophage biology: An overview. *Semin Nephrol* **30**, 216–233 (2010).
 60. Anders, H.-J. & Ryu, M. Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis. *Kidney Int* **80**, 915–925 (2011).
 61. Todorov, V., Müller, M., Schweda, F. & Kurtz, A. Tumor necrosis factor- α inhibits renin gene expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **283**, 1046–1051 (2002).
 62. Kurts, C., Heymann, F., Lukacs-Kornek, V., Boor, P. & Floege, J. Role of T cells and dendritic cells in glomerular immunopathology. *Semin Immunopathol* **29**, 317–335 (2007).
 63. Merta, M. *et al.* Cytokine profile in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Biochem Mol Biol Int* **41**, 925–931 (1997).
 64. Khalifian, S., Raimondi, G. & Brandacher, G. The Use of Luminex Assays to Measure Cytokines. *Journal of Investigative Dermatology* (2015) doi:10.1038/jid.2015.36.
 65. Tighe, P., Negm, O., Todd, I. & Fairclough, L. Utility, reliability and reproducibility of immunoassay multiplex kits. *Methods* **61**, 23–29 (2013).
 66. Research, M. F. and M. E. and. Imaging classification of ADPKD: A simple model for selecting patients for clinical trials. *Mayo Foundation and Medical Education and Research* (2013).
 67. Assays, F. & Format, N. Bio-Plex Pro TM Mouse Cytokine, Chemokine, and Growth Factor Assays. *Growth (Lakeland)*.
 68. Cohen, J. Statistical Power Analysis. *Journal of Clinical Psychiatry* **1**, 98–101 (1992).
 69. Messchendorp, A. L. *et al.* Urinary Biomarkers to Identify Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Patients With a High Likelihood of Disease Progression. *Kidney Int Rep* **3**, 291–301 (2018).
 70. Romanova, Y. *et al.* Proteomic analysis of human serum from patients with chronic kidney disease. *Biomolecules* **10**, 1–18 (2020).

71. O'Shea, J. J. & Murray, P. J. Cytokine Signaling Modules in Inflammatory Responses. *Immunity* **28**, 477–487 (2008).
72. Messchendorp, A. L. *et al.* Urinary Biomarkers to Identify Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Patients with a High Likelihood of Disease Progression. *Kidney Int Rep* **3**, 291–301 (2018).
73. Parikh, C. R. *et al.* Evaluation of urine biomarkers of kidney injury in polycystic kidney disease. *Kidney Int* **81**, 784–790 (2012).
74. Petzold, K. *et al.* Urinary biomarkers at early ADPKD disease stage. *PLoS One* **10**, (2015).
75. Meijer, E. *et al.* Association of urinary biomarkers with disease severity in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease: A cross-sectional analysis. *American Journal of Kidney Diseases* **56**, 883–895 (2010).
76. Karihaloo, A. Role of Inflammation in Polycystic Kidney Disease. in *Polycystic Kidney Disease* (ed. Li, X.) 335–373 (Codon Publications, 2015). doi: 10.15586/codon.pkd.2015.ch14.
77. Bae, K. T. *et al.* Expanded imaging classification of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology* **31**, 1640–1651 (2020).
78. European Medicines Agency. European Medicines Agency (EMA): European Public Assessment Report Jinarc® (Tolvaptan): Product Information: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002788/WC500187921.pdf.
79. de Jager, W., Prakken, B. J., Bijlsma, J. W. J., Kuis, W. & Rijkers, G. T. Improved multiplex immunoassay performance in human plasma and synovial fluid following removal of interfering heterophilic antibodies. *J Immunol Methods* **300**, 124–135 (2005).
80. Olsan, E. E. *et al.* Signal transducer and activator of transcription-6 (STAT6) inhibition suppresses renal cyst growth in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 18067–18072 (2011).
81. Bio-rad. Bio-Plex Manager Software. *Multiplex Suspension Arrays* (2015).
82. Cassini, M. F. *et al.* Mcp1 promotes macrophage-dependent cyst expansion in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology* (2018) doi:10.1681/ASN.2018050518.
83. Zimmerman, K. A., Hopp, K. & Mrug, M. Role of chemokines, innate and adaptive immunity. *Cell Signal* **73**, 109647 (2020).

84. Lee, E. J. *et al.* Blockade of interleukin-8 receptor signalling inhibits cyst development in vitro, via suppression of cell proliferation in autosomal polycystic kidney disease. *Nephrology* **19**, 471–478 (2014).
85. di Florio, D. N., Sin, J., Coronado, M. J., Atwal, P. S. & Fairweather, D. L. Sex differences in inflammation, redox biology, mitochondria and autoimmunity. *Redox Biology* vol. 31 101482 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101482> (2020).
86. Buskiewicz, I. A., Huber, S. A. & Fairweather, D. L. *Sex Hormone Receptor Expression in the Immune System. Sex Differences In Physiology* (Elsevier Inc., 2016). doi:10.1016/B978-0-12-802388-4.00004-5.
87. Chen, D. *et al.* Clinical characteristics and disease predictors of a large Chinese cohort of patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *PLoS One* **9**, (2014).
88. Fish, E. N. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nat Rev Immunol* **8**, 737–744 (2008).
89. Vielhauer, V. & Mayadas, T. N. Functions of TNF and its Receptors in Renal Disease: Distinct Roles in Inflammatory Tissue Injury and Immune Regulation. *Semin Nephrol* **27**, 286–308 (2007).
90. Zhou, J. X., Fan, L. X., Li, X., Calvet, J. P. & Li, X. TNF α signaling regulates cystic epithelial cell proliferation through Akt/mTOR and ERK/MAPK/Cdk2 mediated Id2 signaling. *PLoS One* **10**, (2015).
91. Bruunsgaard, H., Pedersen, M. & Pedersen, B. K. Aging and proinflammatory cytokines. *Curr Opin Hematol* **8**, 131–136 (2001).
92. Plesiński, K. *et al.* Angiotensinogen and interleukin 18 in serum and urine of children with kidney cysts. *JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* **20**, (2019).
93. Janssens, P. *et al.* Enhanced MCP-1 Release in Early Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Kidney Int Rep* **6**, 1687–1698 (2021).

6. Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vorbereitung der Zytokin Standards.....	26
Abbildung 2: Standardkurve der TNF- α Konzentration Platte 1-7 in pg/L.....	28
Abbildung 3: Studienpopulation.....	33
Abbildung 4: Geschlechterverteilung der ADPKD-Kohorte	36
Abbildung 5: Altersverteilung: ADPKD-Kohorte vs. Kontroll-Kohorte.....	37
Abbildung 6: Altersverteilung der ADPKD-Kohorte nach Geschlecht	37
Abbildung 7: Verteilung der Mayo-Klassen innerhalb der ADPKD-Kohorte	38
Abbildung 8: Verteilung der Mayo-Klassen nach Geschlecht	39
Abbildung 9: Verteilung der CKD-Stadien in der ADPKD-Kohorte.....	40
Abbildung 10: Aufteilung der ADPKD-Kohorte nach Genotyp	40
Abbildung 11: Verteilung der Mayo-Klassen innerhalb der verschiedenen Genotypen	41
Abbildung 12: Scatterplot der Zytokinkonzentrationen der ADPKD und Kontroll-Kohorte	43
Abbildung 13: Darstellung der doppelten Messungen der ADPKD-Patientinnen.....	45
Abbildung 14: Mittelwertvergleiche von TNF- α , IFN- γ und MCP-1 pro Platte innerhalb der ADPKD-Kohorte	46
Abbildung 15: Korrelation von MCP-1 zu IFN- γ Konzentrationen innerhalb der ADPKD-Kohorte	47
Abbildung 16: Korrelation von MCP-1 zu IFN- γ Konzentrationen innerhalb der Kontroll-Kohorte	48
Abbildung 17: Unterschiede in den Zytokinkonzentrationen von Kontroll- vs. ADPKD-Kohorte	49
Abbildung 18: Geschlechtliche Unterschiede der MPC-1 und TNF- α Konzentrationen in der ADPKD- und Kontroll-Kohorte.....	50
Abbildung 19: Nicht signifikante Unterschiede der Zytokinkonzentrationen zwischen den Altersgruppen der ADPKD-Kohorte.....	51
Abbildung 20: Nicht signifikante Unterschiede der Zytokinkonzentrationen zwischen den Altersgruppen der Kontroll-Kohorte.....	52
Abbildung 21: Unterschiede der TNF- α Konzentration innerhalb der Mayo-Klassen	53
Abbildung 22: Nicht signifikante Unterschiede der Zytokinkonzentrationen zwischen den Mayo-Klassen der ADPKD-Kohorte	54
Abbildung 23: Signifikante Unterschiede der IL-6 und TNF- α Konzentration je CKD-G-Stadium	55
Abbildung 24: Nicht signifikanten Unterschiede der Zytokinkonzentrationen je CKD-G-Stadium	55

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gruppeneinteilung	29
Tabelle 2: Parameterminimum	30
Tabelle 3: Darstellung der demografischen Daten und klinischen Eigenschaften der ADPKD- und Kontroll-Kohorte	36
Tabelle 4: Deskriptive Statistik der Zytokin-Messwerte der ADPKD- und Kontroll-Kohorte	42
Tabelle 5: Patientinnen Charakteristika der Patientin BM_089	44
Tabelle 6: Ermittlung der Mittelwerte der doppelten Messungen	45
Tabelle 7: Multiple Regressionsanalyse	56
Tabelle 8: Vergleich der Koeffizienten	56