

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**SYSTEMISCHE ENTZÜNDUNG BEI CHRONISCHER
NIERENINSUFFIZIENZ –
DIE ROLLE DER DARMFLORA**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Marie Sophie Jorinde Kesper

Marburg

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Lutz T. Weber

Priv.-Doz. Dr. med. Torsten Olszak

Priv.-Doz. Dr. med. Bärbel Lange-Sperandio

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. vet. Kirstin Andersen

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 04.05.2017

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2013 bis September 2015 in der Abteilung für klinische Biochemie der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Betreut wurde die Arbeit durch Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders und Dr. med. vet. Kirstin Andersen.

Förderung: Die vorliegende Arbeit wurde durch das Programm Förderung für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Ludwig-Maximilians-Universität unter der Leitung von Prof. Dr. med. Jürgen Heesemann gefördert. M.S.K. erhielt zusätzlich eine ideelle und finanzielle Förderung von der Studienstiftung des deutschen Volkes.

Publikation der Ergebnisse: Aus der Promotion ging folgende Originalarbeit als Veröffentlichung hervor:

Andersen K*, **Kesper MS***, Marschner JA, Konrad L, Ryu M, Kumar Vr S, Kulkarni OP, Mulay SR, Romoli S, Demleitner J, Schiller P, Dietrich A, Müller S, Gross O, Ruscheweyh HJ, Huson DH, Stecher B, Anders HJ

Intestinal Dysbiosis, Barrier Dysfunction, and Bacterial Translocation Account for CKD-Related Systemic Inflammation.

J Am Soc Nephrol, 2016. DOI: 10.1681/asn.2015111285

**K.A. and M.S.K. contributed equally to this work*

Die Arbeit wurde präsentiert: 09/2014 als Poster auf dem 6. Kongress für Nephrologie der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie in Berlin (6. – 9. September 2014):

Die Rolle der Darmflora und des leaky gut bei der systemischen Entzündung in chronischer Niereninsuffizienz. M.S. Kesper, K. Andersen, H.-J. Anders

Erklärung: Von der Vielzahl der hier aufgeführten Methoden habe ich alle bis auf die folgenden alleine oder unter Anleitung durchgeführt: 1. Die 16sRNA Stuhlanalyse wurde mit Proben der laboreigenen Mäuse in Kooperation mit dem mikrobiologischen Labor von Frau Prof. Dr. Bärbel Stecher durchgeführt, die Sequenzierung und statistische Analyse der Daten erfolgte in Kooperation mit Prof. Dr. Huson vom Institut für Bioinformatik der Universität Tübingen. 2. Die Bestimmung der GFR erfolgte durch Julian Marschner (PhD Student des Labors). Zudem möchte ich erwähnen, dass die Gerätschaften für die ECIS Experimente freundlicherweise vom Walter Straub Institut für Pharmakologie und Toxikologie der LMU München zur Verfügung gestellt wurden. Die Bedienung des Messgerätes sowie die Ausführung der Intervention führte ich zusammen mit Jana Demleitner durch (PhD Studentin des Walter Straub Institutes). Darüber hinaus wurden die TEM-Schnitte in Kooperation mit Frau PD Dr. Susanna Müller vom Pathologischen Insitut der LMU angefertigt.

Keine Blume,
nur ein Strauss aus alten Worten
die ich neben Krümeln
in der Tiefe meiner Tasche fand.
Meinen nichts
als das
was du in ihrem Klang verortest,
nichts, was nicht schon einmal
in dir widerklang.
Worte, neben Krumen mitgetragen
naschten von den Resten süßen Glücks,
rieben sich an Steinchen und an Schalen,
bringen Strand und Früchte dir zurück.
Lesen, bis die Worte etwas malen,
bis das gleiche Bild dir immer neu entsteht:
Himmel, Landschaft, Meere,
eine Blume,
die in dich schon längst ist eingewebt.

(H.- J. Kesper)

Für Ursula, Elfriede und Frances

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1. Chronische Niereninsuffizienz Definition und Epidemiologie.....	1
1.1.1. Das Alport Syndrom und murine Modelle	4
1.2. Das Immunsystem	4
1.2.1. Angeborenes (innates) Immunsystem	7
1.2.2. Erworbenes (adaptives) Immunsystem	9
1.3. Systemische Entzündung in chronischer Niereninsuffizienz	12
1.4. Darmflora und Darmbarriere	15
1.4.1. Entwicklung und Funktionen der Darmflora	15
1.4.2. Eubiose oder Dysbiose? Darmflora, Immunsystem und verschiedene Erkrankungen	17
1.5. Projekthypothese und Zielsetzung	20
2. MATERIAL UND METHODEN	23
2.1. Material	23
2.1.1. Tabelle 3: Tiere und Tierhaltung	23
2.1.2. Tabelle 4: Einwegmaterialien	23
2.1.3. Tabelle 5: Laborgerätschaften	24
2.1.4. Tabelle 6: Assays und Kits	25
2.1.5. Tabelle 7: Chemikalien, Reagenzien und Lösungen	26
2.1.6. Tabelle 8: Pufferzusammensetzungen	27
2.1.7. Tabelle 9: Zelllinien	27
2.1.8. Tabelle 10: Oligonukleotidprimer für qPCR	28
2.1.9. Tabelle 11: Antikörper Durchflusszytometrie und Immunhistologie	28
2.2. Methoden	29
2.2.1. Tierversuche (Zucht, Haltung, Genotypisierung, GFR und Versuchsaufbau)	29
2.2.2. Mikrobiologische Untersuchungen (CFUs, GFP-E.coli und 16S-rRNA Sequenzierung)	33
2.2.3. Kolorimetrische Assays	37
2.2.4. Immunologische Methoden (ELISA und Durchflusszytometrie)	40
2.2.5. Molekularbiologische Methoden (RNA Isolation, cDNA Herstellung und real-time PCR)	45
2.2.6. Histopathologische Untersuchungen (Licht- und Elektronenmikroskopie)	48
2.2.7. Zellkulturexperimente und funktionelle Analysen mittels ECIS	50
2.2.8. Statistische Methoden	51

3.	Ergebnisse	52
3.1.	Uräme <i>Col4α3</i> ^{-/-} Mäuse zeigen systemische Entzündung sowohl auf zellulärer als auf humoraler Ebene	52
3.2.	Chronische Niereninsuffizienz bei <i>Col4α3</i> ^{-/-} Mäusen ist mit qualitativer und quantitativer Dysbiose assoziiert	57
3.3.	Neutrophileninfiltration und erhöhte Produktion von sekretorischem IgA belegen eine lokalisierte Entzündungsreaktion im Dünndarm.....	60
3.4.	Erhöhte Endotoxinwerte im Serum von <i>Col4α3</i> ^{-/-} Mäusen als mögliches Zeichen einer Barriestörung	63
3.5.	Keine Hinweise auf eine strukturelle Barriestörung des Dünn- oder Dickdarmes auf mikroskopischer Ebene bei <i>Col4α3</i> ^{-/-} Mäusen.	64
3.6.	Erhöhung der Albuminkonzentration im Faeces von <i>Col4α3</i> ^{-/-} Mäuse sowie teilweise veränderte Expression der <i>tight junction</i> Proteine	66
3.7.	Oral verabreichte GFP-markierte E.coli lassen sich in Lebergewebe von <i>Col4α3</i> ^{-/-} Mäusen nachweisen.	68
3.8.	Serum von <i>Col4α3</i> ^{-/-} Mäusen löst in vitro eine Barriestörung von murinen Colon26 Zellen aus ...	70
3.9.	Bei Suppression der Darmflora mit Antibiotika zeigen <i>Col4α3</i> ^{-/-} Mäuse eine Restitution der systemischen Entzündungsaktivität	72
3.10.	Eradikation der Darmflora bei <i>Col4α3</i> ^{-/-} Mäusen hat keinen Einfluss auf die Progression der Nierenerkrankung.....	76
4.	DISKUSSION	79
4.1.	Intestinale Dysbiose und das Verhältnis von T _{regs} zu TH ₁₇ -Zellen.....	80
4.2.	Intestinale Entzündung und Dysbiose vs. Translokation von Bakterien.....	84
4.3.	Grenzen der Studie	89
4.4.	Mikrobiota: Ein Therapieansatz in chronischer Niereninsuffizienz?	90
5.	Zusammenfassung	94
6.	Literaturverzeichnis	95
7.	Abkürzungsverzeichnis	108
8.	Eidesstattliche Versicherung: Marie Sophie Jorinde Kesper	111
9.	Danksagung	113

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Jahresvergleich chronische Niereninsuffizienz.....	2
Abbildung 2: Diagnoseverteilung der Patienten bei Therapiebeginn.....	3
Abbildung 3: Barrieremechanismen des Körpers	5
Abbildung 4: Funktionen des angeborenen Immunsystems	9
Abbildung 5: Zellen des adaptiven Immunsystems und ihre Rezeptoren	10
Abbildung 6: Ätiologie und Folgen der systemischen Entzündung in chronischer Niereninsuffizienz	14
Abbildung 7: Funktionen der Darmflora.....	17
Abbildung 8: Mögliche Einflussfaktoren und Konsequenzen von eubiotischer und dysbiotischer Mikrobiota.....	19
Abbildung 9: Hypothese	22
Abbildung 10: Anschauungsbeispiel der Agarosegelelektrophorese	31
Abbildung 11: Versuchsgruppen.....	32
Abbildung 12: Standardkurve GFP-E.coli	36
Abbildung 13: Onset time SLP	39
Abbildung 14: Funktionsprinzip von ECIS	51
Abbildung 15: Immunphänotypisierung <i>Col4α3</i> ^{-/-} Mäuse mittels Durchflusszytometrie	53
Abbildung 16: Systemische Entzündung in <i>Col4α3</i> ^{-/-} Mäusen.....	54
Abbildung 17: Humorale Immunantwort bei <i>Col4α3</i> ^{-/-} Mäusen.	54
Abbildung 18: Leukozyteninfiltration in den Nieren <i>Col4α3</i> ^{-/-} Mäuse.....	55
Abbildung 19: Leukozyteninfiltration in den Nieren <i>Col4α3</i> ^{-/-} Mäuse (2)	56
Abbildung 20: Chronische Niereninsuffizienz in <i>Col4α3</i> ^{-/-} Mäusen.....	58
Abbildung 21: Quantitative Dysbiose bei <i>Col4α3</i> ^{-/-} Mäusen.	59
Abbildung 22: Qualitative Dysbiose bei <i>Col4α3</i> ^{-/-} Mäusen.....	59
Abbildung 23: Durchflusszytometrie Dünndarmzellen	60
Abbildung 24: Lokale Immunantwort im Dünndarm.....	61
Abbildung 25: Vermehrt coliforme Bakterien in <i>Col4α3</i> ^{-/-} Mäusen	62
Abbildung 26: Anschauungsbeispiel qualitativer Dysbiose	62
Abbildung 27: Endotoxinämie in <i>Col4α3</i> ^{-/-} Mäusen	63
Abbildung 28: Mikroskopische Darmbarriere.....	65

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 29: Albuminkonzentration im Faeces.....	67
Abbildung 30: Expressionsniveau der <i>tight junctions</i> des Ileums.....	67
Abbildung 31: Bakterielle Translokation über die Darmbarriere von <i>Col4α3</i> ^{-/-} Mäuse.....	69
Abbildung 32: In vitro Barrierestörung durch urämes Serum von <i>Col4α3</i> ^{-/-} Mäusen	71
Abbildung 33: Darmflorasuppression unter antibiotischer Therapie.....	73
Abbildung 34: Restitution der systemischen Entzündungsaktivität nach antibiotischer Therapie (1)	74
Abbildung 35: Restitution der systemischen Entzündungsaktivität nach antibiotischer Therapie (2)	75
Abbildung 36: Fehlender Einfluss der Antibiotikatherapie auf die Progression der Nierenerkrankung (1)	77
Abbildung 37: Fehlender Einfluss der Antibiotikatherapie auf die Progression der Nierenerkrankung (2)	78
Abbildung 38: Schematische Darstellung der Arbeitsergebnisse (1).....	88
Abbildung 39: Schematische Darstellung der Arbeitsergebnisse (2).....	88

1. EINLEITUNG

1.1. Chronische Niereninsuffizienz Definition und Epidemiologie

Die chronische Niereninsuffizienz ist mit einer Prävalenz von 13% [3] ein häufiges Krankheitsbild und bezeichnet den irreversiblen und progredienten Verlust der Nierenfunktion bis hin zum Organversagen. Gemäß den KDIGO 2012 Leitlinien (*Kidney Disease: Improving Global Outcomes*) wird die chronische Niereninsuffizienz über eine Verminderung der GFR $<60\text{ml}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ für ≥ 3 Monaten und/oder über Zeichen einer Nierenschädigung (strukturell oder funktionell) definiert [4]. Die unterschiedlichen Stadien der Erkrankung werden sowohl anhand der noch erhaltenen Restfunktion in Bezug auf die glomeruläre Filtration sowie anhand der bestehenden Albuminurie eingeteilt.

Tabelle 1: Stadieneinteilung nach GFR und (National Kidney Foundation, NKF) [5]

				Albumin Kategorie		
				A1	A2	A3
				Normal	Moderat	Stark
				/leicht erhöht	erhöht	erhöht
				<30mg/g	30-300mg/g	>300mg/g
				GFR Kategorie (ml/min/1.73m)	G1	≥ 90
G2	60-89	Mild eingeschränkt	32,9		2,2	0,3
G3a	45-59	Mild/moderat eingeschränkt	3,6		0,8	0,2
G3b	30-44	Moderat /schwer eingeschränkt	1,0		0,4	0,2
G4	15-29	Schwer eingeschränkt	0,2		0,1	0,1
G5	< 15	Nierenversagen	0,0		0,0	0,1

Farben zeigen das Risiko an, dass eine chronische Niereninsuffizienz vorliegt: grün: Niedriges Risiko (liegen keine zusätzlichen krankheitsrelevanten Auffälligkeiten in Struktur oder Funktion der Nieren vor, so besteht keine Evidenz für das Vorliegen einer chronischen Niereninsuffizienz); gelb: moderat erhöhtes Risiko; orange: hohes Risiko; rot: sehr hohes Risiko. Die dazugehörigen Ziffern in den Feldern zeigen die (prozentuale) Verteilung der erwachsenen Bevölkerung der USA innerhalb dieser Gruppen an. Für Deutschland gibt es aktuell keine vergleichbaren Zahlen.

Neben der glomerulären sind auch die tubulären und endokrinen Funktionen der Niere vermindert, welche zum komplexen Gesamtbild der chronischen Niereninsuffizienz beitragen. So kommt es nicht nur zum Versagen der exkretorischen Nierenfunktion und damit verbundenen Störungen im Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Base-Haushalt, sondern auch zum Urämiesyndrom, bei dem durch toxisch wirkende nicht ausgeschiedene Metabolite andere Organe geschädigt werden. Darüber hinaus nimmt auch die inkretorische Nierenfunktion ab, sodass es unter anderem zur renalen Osteopathie (Vitamin D Mangel) und renalen Anämie (Erythropoetin Mangel) kommen kann.

Bei Fortschreiten der Erkrankung und folglich schwindender Restfunktion kann es zum terminalen Nierenversagen mit der Notwendigkeit zur Nierenersatztherapie, der Dialyse, kommen.

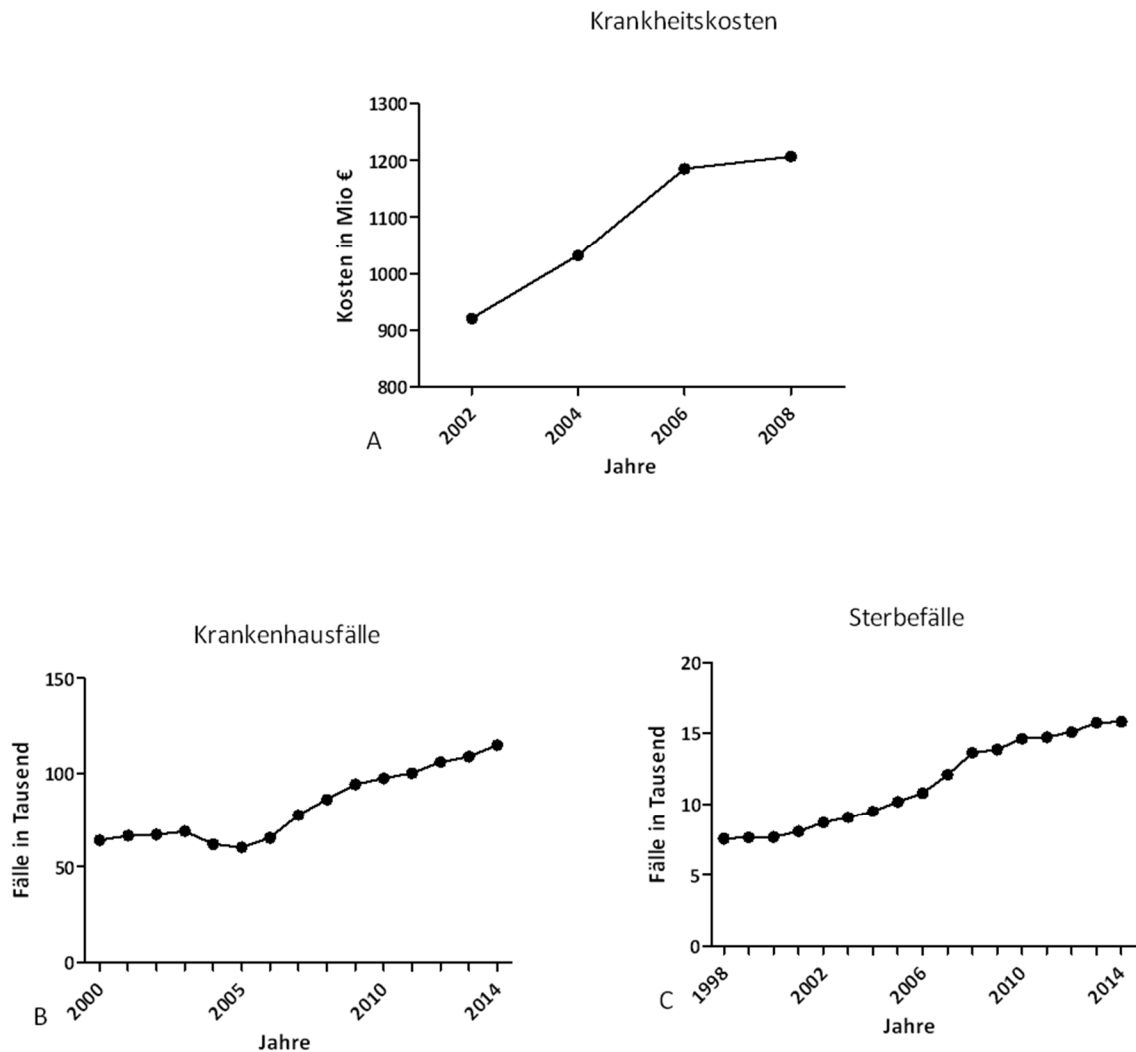


Abbildung 1: Jahresvergleich chronische Niereninsuffizienz (ICD10: N17-N19) Daten gemäß dem statistischen Bundesamt, Zweigstelle Bonn. [6]

Allein in Deutschland sind fast 70.000 Patienten dialysepflichtig [7]. Dies bedeutet neben Einbußen in der Lebensqualität und der erhöhten psychosozialen Belastung für den einzelnen Patienten auch eine erhebliche Herausforderung für das sozio-ökonomische System, sodass sich bei stetig steigenden Prävalenzen die Krankheitskosten entsprechend mehreren (Abbildung 1 A-B). Hinzu kommen die Komorbiditäten, die häufig kardiovaskulären und infektiösen Ursprungs sind [8, 9] und die zu einer erheblich verminderten Lebenserwartung unter Dialysepatienten sowie zu weiteren Belastungen für das Gesundheitssystem beitragen (Abbildung 1 C).

Die Ursachen für eine chronische Niereninsuffizienz sind vielfältig. Am häufigsten wird aufgrund einer diabetischen oder hypertensiven Nephropathie bei terminaler Niereninsuffizienz eine Nierenersatztherapie begonnen (Abbildung 2). Die Behandlungsziele sollten demnach neben der Prävention einer chronischen Niereninsuffizienz (durch geeignete Behandlung der Grunderkrankung), die Früherkennung, und schließlich bei bereits vorhandener Erkrankung, die Verhinderung oder zumindest Verlangsamung einer Progression beinhalten.

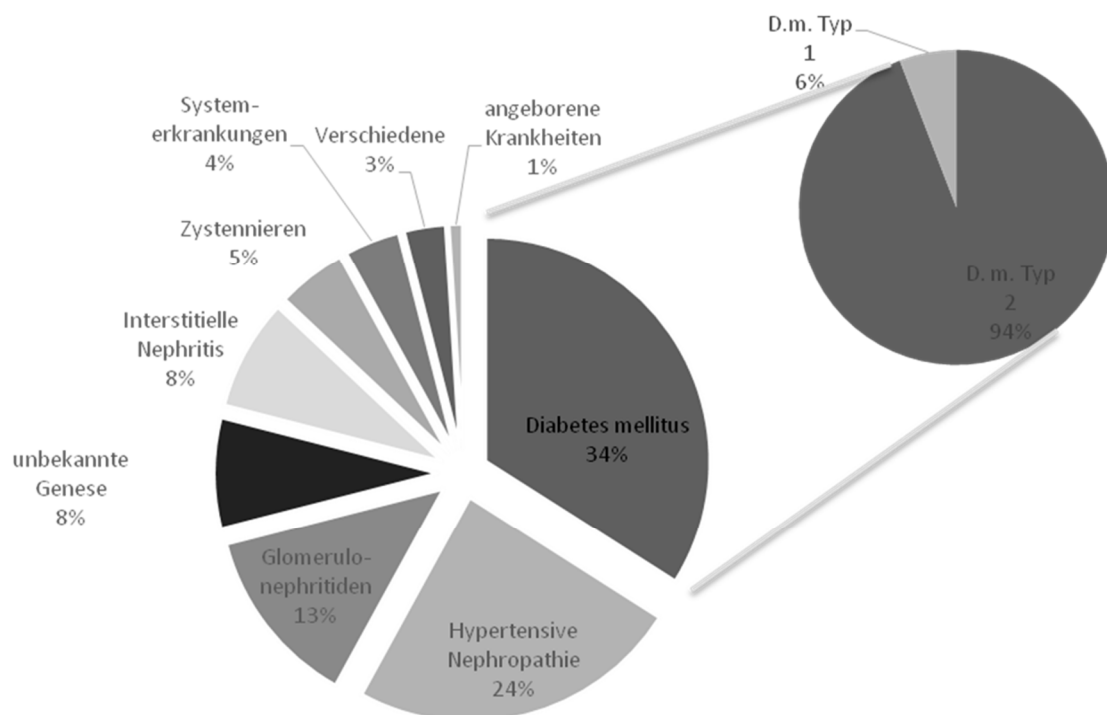


Abbildung 2: Diagnoseverteilung der Patienten bei Therapiebeginn (Inzidenz) im Jahr 2006; n = 6.863 Patienten; Quasi-Niere; (Modifiziert nach [2])

1.1.1. Das Alport Syndrom und murine Modelle

Das Alport Syndrom (AS) ist eine progrediente hereditäre Erkrankung, die durch Mutationen im Kollagen Typ 4 Gen, die $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ - oder $\alpha 5$ -Kette betreffend, über Schädigungen der glomerulären Basalmembran (GBM) zu einer chronischen Niereninsuffizienz führt [10]. Diese ist durch Hämaturie und Proteinurie gekennzeichnet und kann im Verlauf neben der terminalen Niereninsuffizienz zu Innenohrschwerhörigkeit und bilateralem Lenticonus führen [10]. Das pathomorphologische Korrelat ist hierbei der durch die Mutation gestörte Aufbau der GBM, die teils verdickt, teils verdünnt und fragmentiert erscheint [11]. Des Weiteren kommt es in späteren Stadien, neben einem fibrotischen Umbau der Glomeruli, zu tubulären Schäden und einer Leukozyteninfiltration [12, 13]. Zum Krankheitsbild des Alport-Syndroms führen drei verschiedene Vererbungsmodi. Neben einem X-chromosomal-dominanten Erbgang, der ca. 85% aller Fälle ausmacht und die $\alpha 5$ -Kette betrifft [14, 15], existieren autosomal-rezessive (10-15%) und -dominante Formen (bis zu 5%), bei denen der Defekt in $\alpha 3$ - und $\alpha 4$ -Kette liegt [16-18]. Insgesamt macht das AS ca. 0,3 – 2,3% aller zum terminalen Nierenversagen führenden Erkrankungen aus [11].

Zum weiteren Studium der Erkrankung oder allgemein der chronischen Niereninsuffizienz existieren verschiedene murine Tiermodelle für das AS. Es werden sowohl autosomal-rezessive [19] also auch X-chromosomal-dominante Modelle verwendet [20]. Das autosomal-rezessiven Modell, den Col4 $\alpha 3$ Locus betreffend, wurde sowohl im 129/SvJ als auch im C57BL/6J Hintergrund beschrieben [19, 21]. Dabei sind die Krankheitsprogression und der Zeitpunkt, an dem erste strukturelle und funktionelle Veränderungen auftreten, abhängig vom Hintergrund. Dementsprechend zeigen Mäuse im 129/SvJ Hintergrund im Vergleich zu C57BL/6J teilweise eine um das Dreifache verkürzte Lebensdauer auf [21].

1.2. Das Immunsystem

Unsere Körper sehen sich tagtäglich mit einer Vielzahl an Mikroorganismen konfrontiert, die uns umgeben, mit uns durch Hautkontakt, die Nahrung oder schlichtweg das Atmen in Berührung kommen oder sogar als Dauermieter auf und in uns residieren [22]. Zu diesen Mikroorganismen gehören neben Bakterien auch Viren, Pilze und Protozoen.

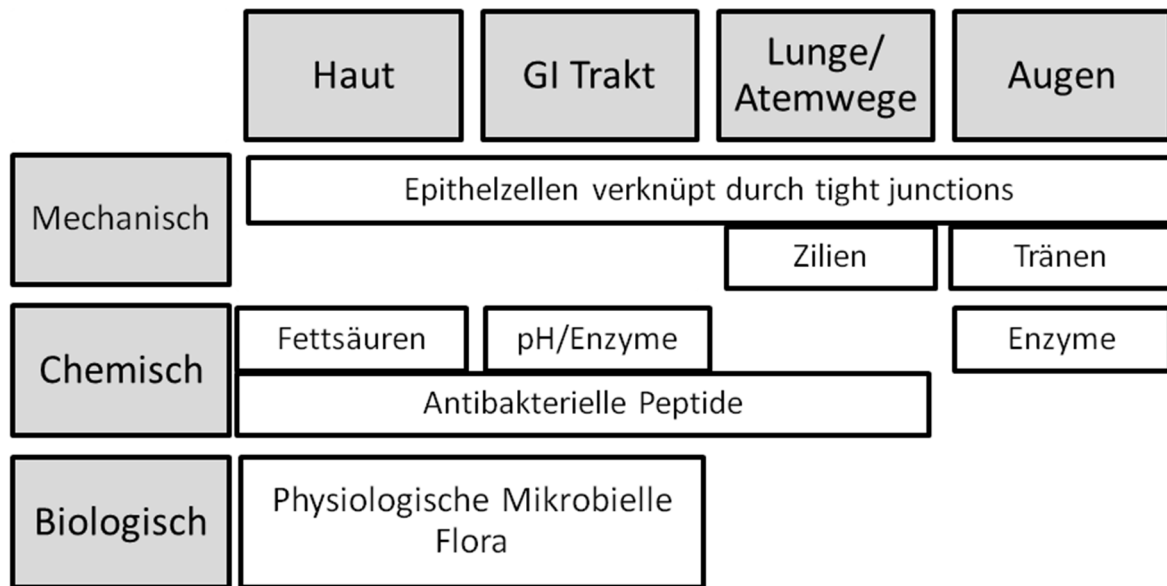


Abbildung 3: Barrieremechanismen des Körpers modifiziert nach [23]; mechanische, chemische und biologische Faktoren verhindern das primäre Eindringen von außen in den menschlichen Organismus. GI Trakt: Gastrointestinal Trakt;

Die Balance dabei, zwischen „fremd“ und „selbst“ zu differenzieren und darüber hinaus mit fremden, aber für uns ungefährlichen und teils nützlichen Mikroorganismen zusammen zu leben, während eigene für uns nicht mehr nützliche oder sogar gefährliche Zellen eliminiert werden, wird durch unser Immunsystem geleistet. Dieses setzt sich aus verschiedenen Mitspielern zusammen: den zellulären und humoralen (frei gelösten) Stoffen des Blutes und der Lymphe sowie dem hämatopoetischen Gewebe und den lymphatischen Organen [24]. Unterstützt wird es bei der Abwehr durch die natürlichen Barrieren unseres Körpers, den mechanischen, wie unserer Haut, den chemischen, wie der Magensäure und den biologischen, wie anderen Mikroorganismen (Abbildung 3). Wenn diese überwunden sind, bleibt das Immunsystem als letztes Bollwerk unserer Abwehr. Betrachtet man nun die Häufigkeit, mit der wir tatsächlich durch einen Erreger erkranken, oder schlimmer, dies nicht unbeschadet überstehen, in Relation zu der großen Anzahl an Mikroorganismen, wird die Stärke dieses Bollwerkes deutlich. Akademisch können zwei Anteile des Immunsystems unterschieden werden. Das unspezifische, angeborene Immunsystem und das spezifische, erworbene. Biologisch betrachtet ergänzen sich diese, agieren eng zusammen und sind deshalb nicht immer scharf zu trennen [23].

Tabelle 2: Unterschiede des angeborenen und erworbenen Immunsystems bezüglich Funktionsweise und zellulärer und humoraler Bestandteile (geändert nach [25] und [22])

	Angeborenes Immunsystem	Adaptives Immunsystem
Rezeptoren	Keimbahn codiert Rekombinationen nicht nötig	In einzelnen Gensegmenten codiert Somatische Rekombinationen nötig
Vermehrungsverhalten	Nicht klonal Alle Zellen einer Klasse identisch	Klonal Alle Zellen einer Klasse unterschiedlich
Mustererkennung	Konservierte molekulare Muster (LPS, Peptidoglykan, Mannose)	Details molekularer Strukturen (Proteine, Peptide, Saccharide)
„Selbst/Fremd“ Diskrimination	Perfekt (über den evolutionären Verlauf selektiert)	Störanfällig (findet in den einzelnen somatischen Zellen statt)
Immunantwort	Sofortige Aktivierung der Effektorzellen, kein immunologisches Gedächtnis	Verzögerte Aktivierung der Effektorzellen aber Gedächtnisausbildung
Lösliche Komponenten	Komplement, Defensine, Lysozym, Akute Phase Proteine (Pentraxine) Interferone	Antikörper (klonale Produktion)
Zellen	Granulozyten, dendritische Zellen, Monozyten/ Makrophagen, NK-Zellen, Mastzellen, Epithelzellen	B-Zellen T-Zellen (CD 8+ Zytotoxische T-Zellen, CD4+ T-Helfer-Zellen)

Allgemein gesagt jedoch ist das angeborene Immunsystem für die frühe und schnelle Phase der Immunantwort zuständig, die jedoch immer gleich abläuft. Das erworbene Immunsystem gewährleistet im Austausch für eine längere Latenzzeit eine spezifischere Abwehr, die durch somatische Gen-Rekombinationen von Rezeptoren entsteht. Diese Spezifität kann in Form von aus B-Zellen differenzierten Gedächtniszellen gespeichert werden und bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Agens zu einer schnelleren Bekämpfung desselben führen [24]. Weitere Unterscheidungsmerkmale sowie Bestandteile sind in Tabelle 2 dargestellt. Insgesamt kann in den zwei folgenden Kapiteln 1.2.1. und 1.2.2. in Relation zur Größe und Komplexität des Themas, nur ein kleiner, zusammenfassender und vereinfachter Überblick, angepasst den Erfordernissen dieser Arbeit, gegeben werden.

1.2.1. Angeborenes (innates) Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist das historisch ältere Konzept. Vor 500 bis 600 Millionen Jahren zur Zeit, als aus Einzellern Vielzeller wurden, wurde der Grundstein für das heutige Immunsystem gelegt [22]. Sollten also oben genannte Barrieren überwunden werden, leistet das innate Immunsystem mit seinen zellulären und humoralen Faktoren erste Hilfe. Gewisse Anteile dieser Barrieren, im Speziellen die Epithelzellen und zum Beispiel die durch sie sezernierten Defensine, werden dabei selbst zur äußeren Abwehr des angeborenen Immunsystems gezählt [23]. Die darauffolgende innere Abwehr teilt sich in vier Funktionsbereiche ein: 1. eingedrungene Mikroorganismen zu erkennen, 2. mittels Phagozytose oder Zytotoxizität zu beseitigen, 3. sollte letzteres nicht primär möglich sein, die Ausbreitung einer Infektion zu verhindern und eine Entzündungsreaktion zu induzieren sowie 4. das adaptive Immunsystem zu aktivieren [26] (Abbildung 4).

Das Erkennen der Erreger läuft dabei per Schlüssel-Schloss-Prinzip ab. Pathogen-assoziierte molekulare Muster, sogenannte PAMPs (pathogen associated molecular patterns), werden von einem festen Arsenal an Keimbahn-codierten Rezeptoren, sogenannten PRRs (pattern recognition receptors), erkannt. Die PRRs befinden sich dabei meist auf der Zelloberfläche, können aber auch in löslicher Form oder im Zellinnern vorliegen, werden in verschiedene Untergruppen eingeteilt und können neben PAMPs auch andere Moleküle erkennen [23]. PAMPs, auf der anderen Seite, sind spezifisch für die Pathogene, da sie sich an keinen körpereigenen Zellen finden lassen, sodass eine erste Diskriminierung zwischen „fremd“ und „selbst“ möglich ist [25]. Eine wichtige Gruppe der PRRs sind die Toll-like-Rezeptoren (TLRs), die unterschiedliche Strukturen auf Bakterien, Viren und Protozoen erkennen können [27]. So bindet zum Beispiel TLR4 Lipopolysaccharid (LPS), ein Produkt gram-negativer Bakterien, welches erstmals von Richard Pfeiffer entdeckt und als „Endotoxin“ bezeichnet wurde [28]. Das Pendant gram-positiver Bakterien ist Peptidoglykan, ein Zellwandbestandteil, der unter anderem von TLR der Klasse 2 erkannt wird [26]. Die Aktivierung eines TLR durch einen PAMP kann eine Vielzahl von Effekten auslösen. Weitere Immunzellen können durch die Produktion von pro-entzündlichen Zytokinen, wie TNF α oder IL-6 rekrutiert werden. Zudem kann dies zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führen, der die Entzündungskaskade initiiert. Die lokale Entzündung kann dann mit rubor, calor, tumor, dolor und functio laesa in Erscheinung treten, während wir die systemische anhand von Entzündungsmarkern zum Beispiel den akute-Phase-Proteinen, wie dem C-reaktiven-Protein im Blut messen können [29].

Je nach Effektorzelle, auf der sich der TLR befindet, können außerdem unterschiedliche direkte Abwehrmechanismen erfolgen. So können z.B. Makrophagen oder andere Fresszellen mittels Phagozytose (aus dem Griechischen: phagein „fressen“ und cýtos „Zelle“) den Angreifer eliminieren, indem sie den pathologischen Organismus umschließen und über Bildung eines Vesikels in sich aufnehmen, um ihn dann abzubauen. Neutrophile Granulozyten können darüber hinaus Mikroorganismen dadurch unschädlich machen, dass sie zytotoxischen Substanzen, wie Lysozym, Kollagenase oder Myeloperoxidase, aus ihren namensgebenden Granula freisetzen. Des Weiteren können sie durch besonders potente Stimuli wie LPS vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bilden und freisetzen und somit weitere Pathogene beseitigen. Dieser als oxidativer Burst bezeichnete Vorgang schädigt neben den gewünschten Erregern auch das umliegende Gewebe [23].

Eine weitere wichtige Komponente des angeborenen Immunsystems ist das Komplementsystem, was sich aus verschiedenen löslichen, in der Leber synthetisierten Faktoren zusammensetzt [30]. Diese können zum einen Erreger opsonieren (schmackhaft machen), das heißt sich an deren Oberfläche anlagern, um so Effektorzellen zu aktivieren und die Phagozytose der Erreger zu erleichtern. Zum anderen können sie durch Zusammenschluss mehrerer Faktoren selbst zytotoxisch wirksam werden. Den Zusammenschluss mehrerer Faktoren bezeichnet man als Membran-Angriffs-Komplex, da er die Zellwände der Mikroorganismen durch Porenbildung destabilisieren und die Zellen so lysieren kann. Darüber hinaus können durch das Komplementsystem via Chemotaxis nicht nur weitere Zellen des angeborenen Immunsystems rekrutiert werden, es ist auch an der Aktivierung der erworbenen Immunität zum Beispiel über den CR2 Rezeptor (Komplementrezeptor 2 entspricht CD21) der B-Zellen beteiligt [31]. CD steht dabei für *Cluster of Differentiation* und bezeichnet eine Gruppe von Glykoproteinen der Zelloberfläche, die zur Immunphänotypisierung genutzt werden können und unterschiedlichen Funktionen haben [32]. Neben den B- Zellen zählen noch die dendritischen Zellen (DC) und die Makrophagen zur Gruppe der antigenpräsentierenden Zellen (APC). Diese beiden können ebenfalls über Rezeptoren an ihrer Oberfläche mit den Komplementfaktoren interagieren und durch sie zur Phagozytose der opsonierten Zielstruktur aktiviert werden (CR3/CD11b, CR4/CD11c). Mit der namensgebenden Funktion der Antigenpräsentation stellen die Makrophagen und insbesondere die DC die wichtigste Brücke zum adaptiven Immunsystem dar [33].

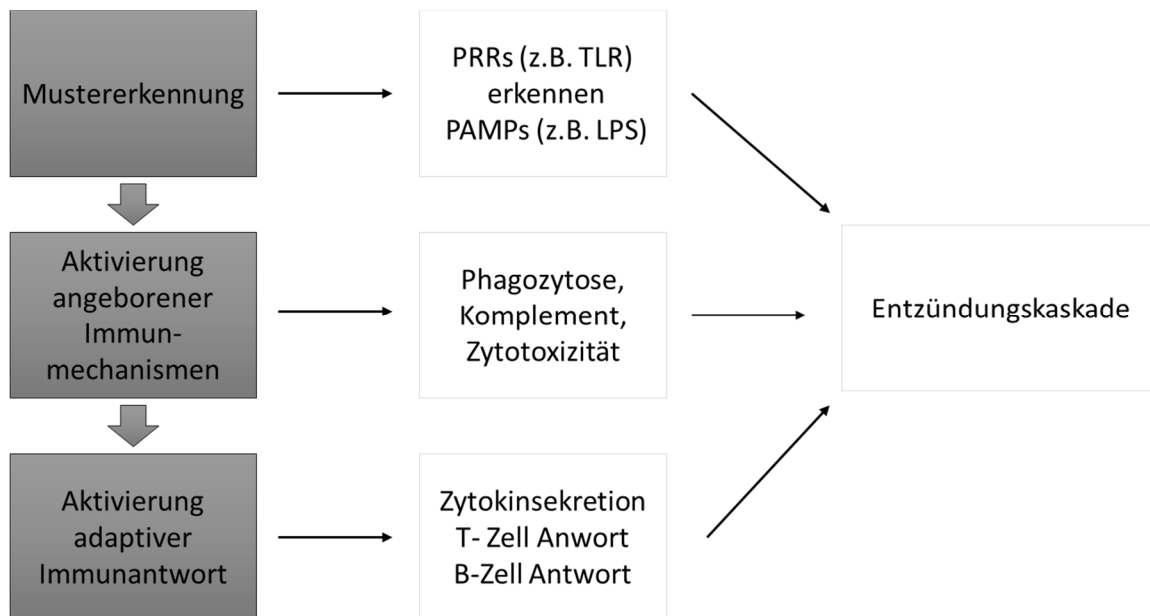


Abbildung 4: Funktionen des angeborenen Immunsystems (geändert nach [26])

1.2.2. Erworbenes (adaptives) Immunsystem

Das erworbene Immunsystem ist gut 200 Millionen Jahre jünger als das angeborene und hat sich im Rahmen der Phylogenese der Wirbeltiere entwickelt [22]. Seine Hauptaufgaben sind ähnlich denen des innaten Immunsystems. Neben dem Erkennen und Beseitigen von Erregern, pathologisch veränderten oder infizierten Zellen, ist das adaptive Immunsystem darüber hinaus noch für das immunologische Gedächtnis zuständig. Seine dafür benötigten Hauptakteure auf zellulärer Ebene sind die Lymphozyten: aus dem Knochenmark stammende und dort ausgereifte B-Zellen und die im Thymus ausreifenden T-Zellen. Letztere werden in zwei Hauptgruppen unterteilt: CD8 positive zytotoxische-T-Zellen (CTL) und CD4 positive T-Helferzellen (THC). Während B-Zellen in der Lage sind, Antigene direkt zu binden, um eine spezifische Immunantwort auszulösen, benötigen T-Zellen die Hilfe anderer Zellen, welche ihnen die Antigene aufbereiten. Dies geschieht mit Proteinkomplexen auf der Zelloberfläche, die körpereigene Antigene darstellen, welche vom T-Zell-Rezeptor erkannt werden können [26]. Für die adaptive Immunantwort spielen zwei verschiedene Ausführungen dieser Proteinkomplexe eine Rolle, bei denen es sich um Genprodukte der MHC bzw. HLA Region (Major Histocompatibility Complex, Human Leukocyte Antigen) auf Chromosom 6 handelt. MHC-Klasse-I Komplexe befinden sich auf allen kernhaltigen Zellen unseres Körpers und können von CTL erkannt werden, während MHC-Klasse II Komplexe nur auf spezifischen antigenpräsentierenden Zellen zu finden sind und von THC gebunden werden können.

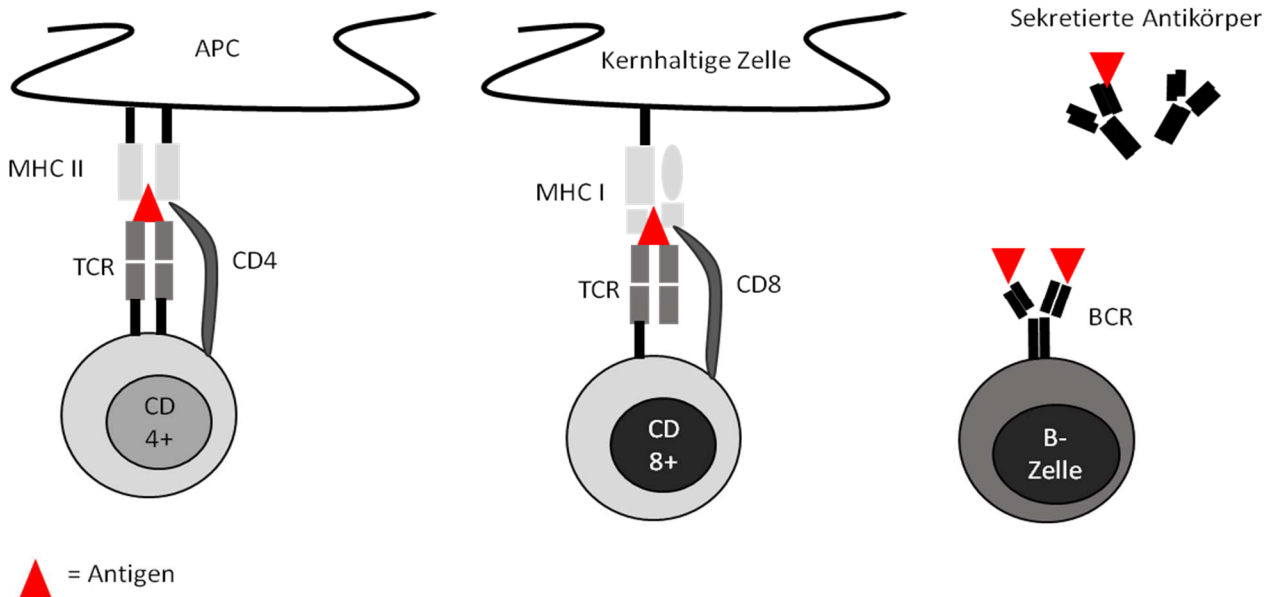


Abbildung 5: Zellen des adaptiven Immunsystems und ihre Rezeptoren; TCR= T-Zell-Rezeptor, BCR= B-Zell-Rezeptor, APC= Antigen-präsentierende-Zelle, CD4+=CD4 positive T-Zellen, CD8+= CD8 positive T-Zellen. (Selbst erstellte Abbildung)

Diese Bindung funktioniert also nach doppeltem Schlüssel-Schloss-Prinzip: Der T-Zell-Rezeptor erkennt das spezifische Antigen, während die CD-Komponente ihren zugehörigen MHC/HLA-Komplex erkennt (Abbildung 5). Je nach T-Zelle erfolgen daraufhin unterschiedliche Effekte. Die aus allen kernhaltigen Zellen vorhandenen MHC I Komplexe präsentieren fortlaufend Peptide, die in der Regel jedoch, da sie aus dem zelleigenen Metabolismus stammen, zu keiner T-Zell-Bindung und dementsprechender Reaktion führen. Ist die Zelle mit einem Virus infiziert, so werden, korrespondierend zu dem nun im Dienste der Virusreplikation stehenden Zellmetabolismus, Virus-spezifische Peptide präsentiert. Bei einer Bindung von einem passenden TCR löst dies bei der CTL die Freisetzung von Granula bestehend aus Perforinen und Granzym aus, was die Zielzelle schädigt und zur Apoptose zwingt. Die CTLs sind somit ihr eigener Effektor. Demgegenüber fällt den THCs, wie der Name bereits vermuten lässt, eine eher regulatorische Rolle zu, da sie APCs und andere Effektorzellen sowohl stimulieren als auch supprimieren können [22].

Je nach Funktionsmechanismus, produzierten und stimulierenden Cytokinen sowie Effektorzellen werden dabei diverse THC unterschieden. Bisher sind sieben verschiedene Subtypen von THC bekannt [34], wobei die TH₁-, TH₂-, TH₁₇-, sowie die regulatorischen T-Zellen (T_{regs}) bisher am besten beschrieben wurden. TH₁-Zellen, die unter anderem INF γ produzieren,

rufen bei intrazellulären Infektionen durch Viren und Bakterien eine zellvermittelte Immunantwort durch die Aktivierung natürlicher Killerzellen, CTLs und Phagozyten hervor. TH₂ Zellen spielen eine wichtige Rolle bei Infektionen durch Helminthen sowie extrazellulären Bakterien und bedingen vor allem eine humorale Immunantwort (antikörpervermittelt) durch Stimulation von B-Zellen [24]. TH₁₇ Zellen setzen chemotaktisch aktive Substanzen frei (z.B. IL-17), die Granulozyten zum Ort des Geschehens locken und dort über die Induktion einer lokalen Entzündungsreaktion insbesondere extrazelluläre Bakterien und Pilze bekämpfen. Eine Vielzahl von Autoimmunerkrankungen ist mit einer Überproduktion von TH₁₇-Zellen assoziiert [35, 36]. Die CD25⁺ und FOXP3⁺ (*Forkhead-Box-Protein P3*) T_{regs}, inhibieren eine Immunantwort über die Produktion inhibitorischer Cytokine wie IL-10 oder TGF-β (*transforming growth factor beta*). Bei FOXP3 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der auch zum Nachweis von regulatorischen T-Zellen dient [37]. B-Zellen können mit ihrem Rezeptor (BCR), der einem membranständigen Immunglobulin/Antikörper entspricht, Antigene direkt binden (Abbildung 5). Bindet eine noch naive B-Zelle erstmalig ihr passendes Antigen, benötigt sie in der Regel die Co-Stimulation durch eine passende T-Helferzelle. Nach Antigenkontakt wird selbiges internalisiert, um dann auf einem MHC-II-Komplex prozessiert einer THC präsentiert zu werden. Bei der Interaktion zwischen beiden ist neben der Bindung über den MHC-Komplex die Bindung der B-Zelle mit ihrem CD40-Oberflächenantigen an den CD40-Liganden der T-Zelle von besonderer Bedeutung. Durch die T-Zelle wird die B-Zelle befähigt, zu einer Plasma-Zelle auszureifen und sich klonal zu vermehren, um anschließend den passenden Antikörper, gegebenenfalls nach einem Klassenwechsel, multiple Male zu bilden, sowie zu einer Gedächtnis-Zelle zu differenzieren. Zudem kann eine B-Zelle allein, also T-Zell unabhängig, von ihrem passenden Antigen aktiviert werden. In diesem Fall handelt es sich um aus repetitiven Epitopen bestehende Antigene, die zwar über eine Aktivierung der B-Zelle zu einer Antikörperproduktion führen, nach der allerdings keine Gedächtniszellen ausgebildet werden [22].

Die große Artenvielfalt der BCR/TCR ist zu groß, um in unserem Genom fest verankert zu sein, weshalb sie bei Bildung der Zellen durch somatische Rekombination verschiedener Rezeptoranteile entstehen. Diese Variabilität (10⁹ mögliche Rezeptorkombinationen) unterliegt jedoch einer strengen Auslese. Lediglich Lymphozyten, die einen funktionalen Rezeptor aufweisen, verlassen das Knochenmark oder den Thymus in die freie Blutbahn. Dies wird als positive Selektion bezeichnet. Darüber hinaus gibt es eine negative Selektion, bei der

Zellen eliminiert werden, die fälschlicherweise „selbst“ als „fremd“ erkennen. B-Zellen können daraufhin noch ihren Rezeptor modifizieren, was als *receptor-editing* bezeichnet wird und sie vor dem Zelltod rettet [38]. T-Zellen werden jedoch bei Bindung ihrer zellgebundenen – Rezeptoren an körpereigene Antigene apoptotisch abgebaut [39]. Nach ihrer Ausreifung wandern sie über die Blutbahn in die sekundären lymphatischen Organe und warten auf den ersten Kontakt mit ihrem passenden Antigen.

1.3. Systemische Entzündung in chronischer Niereninsuffizienz

Kardiovaskuläre Ereignisse und Infektionen sind die häufigsten Komorbiditäten im Rahmen einer chronischen Niereninsuffizienz und für 70% der Todesfälle in dieser Patientengruppe verantwortlich [8, 9]. Eine mögliche Erklärung für diese Verbindung in Bezug auf die kardiovaskulären Vorfälle wurde bereits in den späten 1990er Jahren gefunden. Stenvinkel et al. zeigten, dass in Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ein systemischer Entzündungszustand herrscht, welcher wiederum auch unabhängig von der Ätiologie zu einem erhöhten Risiko für Atherosklerose und somit zu vermehrten kardiovaskulären Vorfällen führt [40-42]. Dieser Zusammenhang konnte in späteren Studien erneut gezeigt werden, ebenso wie eine Korrelation der Schwere der chronischen Niereninsuffizienz mit derer koronarer Verkalkungen [43, 44]. Zunächst wurde die systemische Entzündung vor allem anhand erhöhter Werte des C-reaktiven-Proteins gemessen, welches auch einen prädiktiven Wert für die Mortalität schwer niereninsuffizienter Patienten darstellt [45]. Im weiteren Verlauf zeigte sich jedoch, dass es sich bei dem entdeckten Phänomen um eine weitaus komplexere Störung des Immunsystems, sowohl des adaptiven als auch des erworbenen Schenkels handelt, die einerseits aus einer zu starken Aktivierung, andererseits aus einer immunsuppressiven Komponente besteht [46].

Die übermäßige Aktivierung zeigt sich anhand einer Vermehrung verschiedener pro-entzündlicher Zytokine, wie IL-1, IL-6 oder TNF- α ; wobei hohe IL-6 Werte, wie auch ein niedriger Serum-Albumin-Spiegel mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko assoziiert sind [47, 48]. Zudem zeigt sich eine inverse Assoziation der Höhe der GFR der urämen Patienten und der Ausprägung der systemischen Entzündung (gemessen an der Höhe pro-entzündlicher Marker, wie IL-6, TNF- α oder CRP), sowie eine positive Assoziation in Bezug auf den Serum-Albumin-Spiegel [49]. Diese systemische Entzündung mit Hyperzytokinämie konnte nicht nur

in Erwachsenen, sondern auch in Kindern mit chronischer Niereninsuffizienz nachgewiesen werden [50]. Die immunsuppressive Komponente zeigt sich klinisch mit erhöhten *Non-Responder-Raten* im Rahmen von Impfungen oder vermehrt falsch-negativen Testergebnissen des Tuberkulin-Hauttests im Sinne einer Dysfunktion des angeborenen Immunsystems [51]. Die zugrundeliegenden T-Zell Reifungs- und Funktionsstörungen werden dabei auch auf eine Beeinträchtigung der antigenpräsentierenden-Zellen zurückgeführt [52-54]. Ein entstehendes Ungleichgewicht zwischen TH₁ und TH₂ Zellen spielt dabei wiederum eine wichtige Rolle in der Progression der Artherosklerose [55]. All diese Entdeckungen haben dazu geführt, dass die vor 15 Jahren noch als „neuer“ Risikofaktor geahndete chronische Entzündung inzwischen ihren festen Platz in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz gefunden hat. Doch woher rührt diese Entzündung und welche weiteren Auswirkungen hat sie?

Neben den kardiovaskulären Erkrankungen begünstigt die chronische Entzündung noch das Auftreten der renalen Anämie und Osteopathie [56-58] sowie des sogenannten Malnutritionssyndroms (engl. MICS *malnutrition-inflammation-cachexia syndrome* [59]). Dieses wurde ursprünglich auch für die häufig vorherrschende Hypoalbuminämie in chronischer Niereninsuffizienz verantwortlich gemacht, welche jedoch nach neueren Erkenntnissen auch direkt durch die Entzündung bedingt ist [60]. Die Unterernährung kann dabei sowohl durch eine zentrale Wirkung der Hyperzytokinämie erklärt werden als auch durch die veränderte Ernährung bei chronischer Niereninsuffizienz sowie den vermehrten Energieverbrauch der Entzündung.

Die Ätiologie der systemischen Entzündung in chronischer Niereninsuffizienz scheint multifaktoriell zu sein (siehe Abbildung 6). Bisher wurden diverse Risikofaktoren mit diesem Zustand in Verbindung gebracht, wobei noch keiner allein zur Erklärung genügte [2, 61]. Initial ging man von einer Immunantwort aus, die durch Kontakt des Blutes mit denen zur Dialyse verwendeten Materialien ausgelöst wird [62]. Für diese Hypothese sprachen diverse Studien, die eine Aktivierung von Immunzellen an Membranen oder verunreinigte Dialysatflüssigkeiten verantwortlich machten [63-65]. Zudem konnte eine erhöhte mRNA Expression pro-entzündlicher Zytokine direkt nach der Dialyse nachgewiesen werden [66]. Dafür jedoch, dass andere oder zumindest zusätzliche Faktoren eine Rolle spielen müssen, spricht zweierlei: Zum einen, dass trotz verbesserter Dialysetechniken mit biokompatiblen Membranen, nicht

toxischen Sterilisierungsgeräten und hoch aufgereinigten Dialysatflüssigkeiten, das Phänomen persistiert. Zum anderen, dass man bereits bei Patienten in späteren Erkrankungsstadien, die noch keine Dialyse erhalten haben, Zeichen der systemischen Entzündung findet [40, 67]. Die seitdem identifizierten Faktoren werden sowohl der eigentlichen Erkrankung, als auch der durch sie ausgelösten Urämie sowie genetischen und Umweltfaktoren zugeordnet. Für die Hyperzytokinämie werden neben einer erhöhten Produktion auch eine verringerte renale Elimination verantwortlich gemacht, denn auch anti-entzündliche Zytokine, wie beispielsweise IL-10, können vermehrt sein [55, 68]. Die vorherrschende Azidose und der durch die Urämie bedingte oxidative Stress tragen ihrerseits zum entzündlichen Geschehen bei [69, 70]. Dialyse Patienten sind neben den bereits genannten Risikofaktoren zusätzlich durch Thrombosen und Infektionen der Katheter oder anderer verwendeter Zugänge gefährdet [71]. Als weiterer Risikofaktor wurde eine schlechte Mundhygiene und Periodontitis bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz identifiziert, diese gehen mit erhöhten Entzündungswerten und schlechteren Überlebenschancen einher [72, 73].

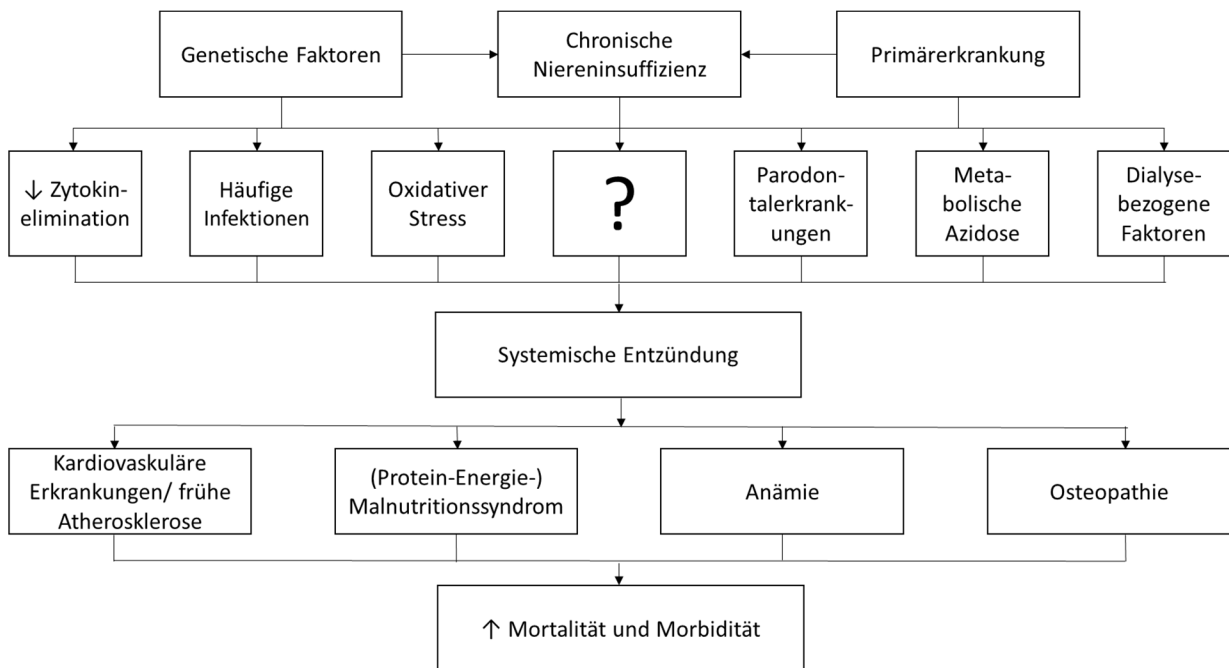


Abbildung 6: Ätiologie und Folgen der systemischen Entzündung in chronischer Niereninsuffizienz. Geändert nach [2]. Gibt es weitere Faktoren, die zusätzlich oder sogar vollständig die systemische Entzündung erklären können? Könnte das fehlende Glied in der Kette die intestinale Mikrobiota sein?

Neben diesen und weiteren Theorien ist in den letzten Jahren ein weiteres Phänomen als Ursache der chronischen Entzündung in den Vordergrund gerückt: die in Patienten mit einer Niereninsuffizienz vorherrschende Endotoxämie. Von CKD Stadium 2 bis 5 kommt es zu einem Anstieg von Endotoxin im Serum von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz [74]. Dies lässt als Quelle der Entzündung einen endogenen Mitspieler vermuten, einer, dessen möglicher Einfluss lange missachtet wurde: Die Darmflora.

1.4. Darmflora und Darmbarriere

Die Darmflora oder auch intestinale Mikrobiota beschreibt die Grundgesamtheit aller, den menschlichen Magen-Darm-Trakt besiedelnden Mikroorganismen. Laut neueren Berechnungen ist das stets angegebene Verhältnis von 10:1 [75] bezüglich der Anzahl aller den menschlichen Körper besiedelnden Mikroorganismen zu eigenen Zellen vermutlich zu hoch geschätzt und liegt eher bei 1:1 [76]. Die Gesamtheit der intestinalen Mikrobiota wird aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen häufig als Organ innerhalb eines Organes bezeichnet [77]. Diese sowohl für den Menschen als auch die Mikroorganismen vorteilhafte Verbindung und gegenseitige Abhängigkeit entwickelte sich über eine langjährige Ko-Evolution und Ko-Adaptation weiter und stellt nun ein bewährtes Konzept dar [78, 79]. Die Mikrobiota trägt sowohl zur Ernährung, metabolischen Vorgängen und einer intakten Immunfunktion des Menschen bei [80, 81]. Eine Störung dieses Gleichgewichtes kann also weitreichende Folgen für den Menschen und seine Gesundheit haben. Eine genauere Betrachtung dieser Funktionen, sowie den gesundheitlichen Konsequenzen einer Veränderung der Darmflora erfolgt in den Kapitel 1.4.1. und 1.4.2.

1.4.1. Entwicklung und Funktionen der Darmflora

Unmittelbar nach der Geburt beginnt die Kolonisation des bis dato noch sterilen fetalen Darmes. Allein zu diesem Zeitpunkt können bereits, abhängig vom Geburtsmechanismus, Unterschiede bemerkt werden. In den ersten Lebenstagen kommen weitere Faktoren, wie die Ernährung, die Hygiene und eine gegebenenfalls begonnene Medikation hinzu, die ihrerseits die Darmflorazusammensetzung beeinflussen können [82]. Meist handelt es sich um *Enterobacteriae* und *Bifidobacteriae*, die als Pioniere den Magendarmtrakt erobern. Diese erste Besiedelung hat weitreichende Folgen. Über eine Veränderung der Genexpression

kommt es zu einem Selektionsvorteil für die bereits vorhandenen Bakterien: Das Darmepithel produziert vermehrt die erwünschten Metabolite dieser Pioniere, womit die oben erwähnte Ko-Adaptation beginnt und selbige ihre Stellung im Darm ausbauen können [83, 84]. Im Verlauf des Lebens verändert sich die Darmflora weiter und kann beeinflusst von Lebensstil (z.B. Stress, Ernährung, Medikation) sowie Alter des Wirtes unterschiedliche Zusammensetzungen zeigen [85, 86]. Auch wenn durch diese Einflüsse zwischen verschiedenen Individuen eine große Variation entsteht [87], die teilweise so individuell ist, wie ein genetischer Fingerabdruck [88], so zeichnen sich doch gewisse Regelmäßigkeiten innerhalb einer Spezies ab. Dominierend sind im menschlichen Magen-Darm-Trakt vor allem Bakterien, allerdings lassen sich auch Archaea und Eukarionten nachweisen. *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria* und *Fusobacteria* sind die bisher identifizierten bakteriellen Stämme [89], wobei die ersten zwei annähernd 99% der Gesamtmasse ausmachen [90]. So kann man vereinfacht drei Gruppen, sogenannte Enterotypen beim Menschen unterscheiden, je nachdem ob *Bacteroides*, *Prevotella* oder *Ruminococcus* vorherrschen [91]. Im Allgemeinen, aber auch in Abhängigkeit des Enterotypes, kann die Mikrobiota das Darmepithel bei seinen vielfältigen Aufgaben unterstützen. Zu dessen Hauptaufgaben gehört zuallererst die Barrierefunktion. Das einschichtige Epithel ist dabei durch Zellkontakte, sogenannte *tight junctions* verknüpft [92], die sicher stellen, dass die Vielzahl an Mikroorganismen auf der luminalen Seite des Epithels auch dort bleibt, während Nahrung absorbiert, also über diese Barriere transportiert wird. Neben den dazu zur Unterstützung sezernierten Zytokinen und antimikrobielle Peptiden, produziert das Darmepithel auch Hormone, die die Nahrungsaufnahme regulieren [93].

Die Hauptfunktionen der Darmflora gehen mit denen des Epithels Hand in Hand und können in vier große Kategorien zusammengefasst werden (Abbildung 7). Allein durch die Existenz der Kommensalen Bakterien wird es pathogenen Keimen erschwert, den Magen-Darm-Trakt zu besiedeln, da sie um Nährstoffe konkurrieren [94-96]. Hinzu kommt die oben beschriebene veränderte Genexpression zu Gunsten der nicht-pathogenen Stämme. Darüber hinaus produzieren kommensale Bakterien Laktat als Stoffwechselabbauprodukt, welches in größeren Mengen das Wachstum selbst herunter reguliert [97]. Neben diesen direkt protektiven Funktionen üben die Bakterien indirekt über verschiedene Signalwege Einfluss auf

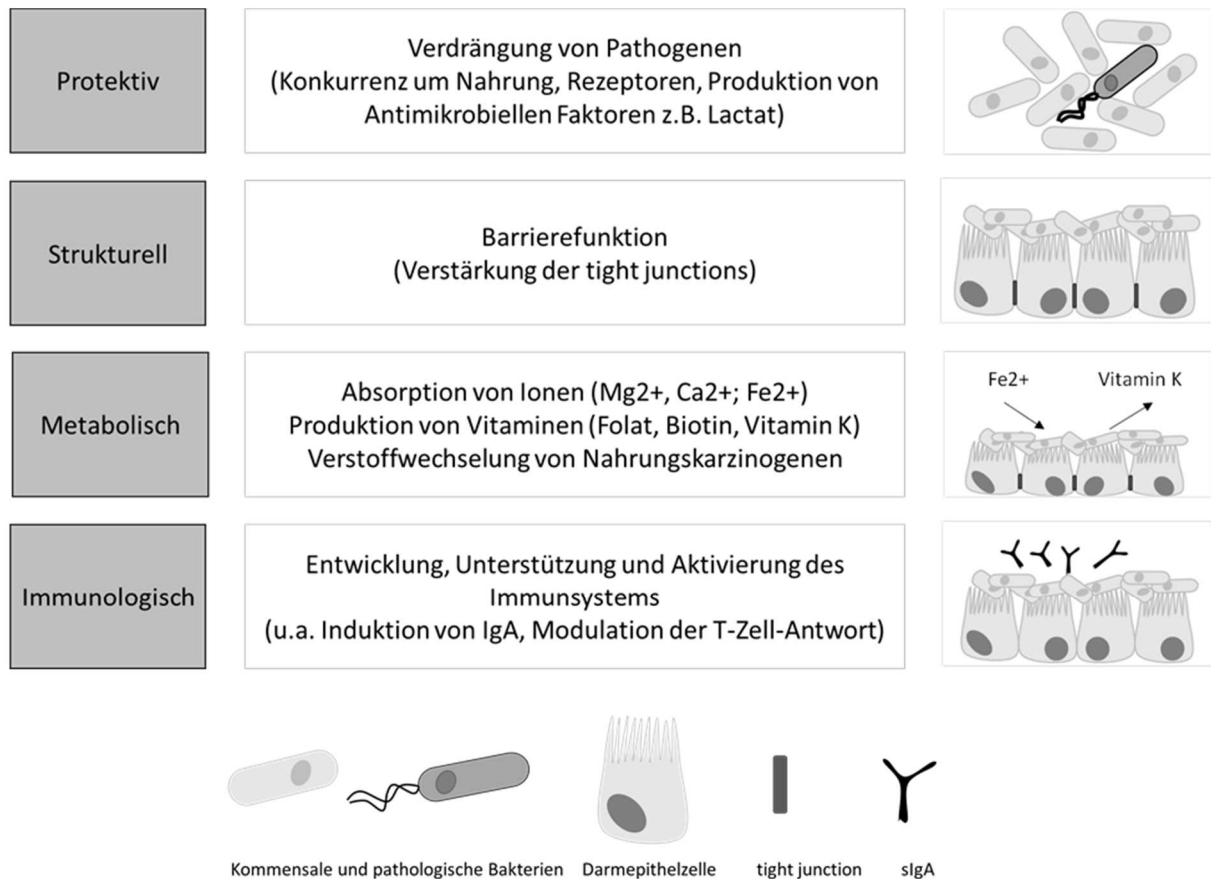


Abbildung 7: Funktionen der Darmflora (geändert gemäß [97, 98])

die Stärke und Ausprägung der *tight-junction*-Komplexe zwischen den Epithelzellen aus und verbessern so die strukturelle Darmbarriere [99]. Des Weiteren unterstützt die Mikrobiota den Darm bei metabolischen Aufgaben, indem unverdauliche Bestandteile für die Absorption aufbereitet werden [77]. Auf diese Weise kommt es sowohl durch Freisetzung von Vitaminen und Nährstoffen zu einer besseren Nahrungsverwertung als auch beispielsweise über die Produktion von kurzkettigen Fettsäuren zur Darmepithelproliferation und -differenzierung [100]. Besonders die immunologischen Funktionen demonstrieren sich eindrucksvoll an Studien mit pathogen-freien Mäusen (GFM für engl. *germ-free-mice*). Diese Tiere zeigen neben verminderter Produktion von Verdauungsenzymen, verminderter Muskelwanddicke und Gefäßversorgung auch immunologische Defizite im Sinne von geringerer Zytokinproduktion, niedrigeren Immunglobulinkonzentrationen im Serum und daraus resultierenden höheren Infektionsraten [100].

1.4.2. Eubiose oder Dysbiose? Darmflora, Immunsystem und verschiedene Erkrankungen

Auch das Verhältnis des Immunsystems zur intestinalen Mikrobiota ist demnach wechselseitig vorteilhaft (symbiotisch) geprägt. Auf der einen Seite dieser Symbiose steht dabei das

Darmepithel, welches kommensale Bakterien toleriert und deren Zusammensetzung und Menge kontrolliert. Auf der anderen stehen die Mikroorganismen selbst, die neben den oben genannten Funktionen helfen, das intestinale und das systemische Immunsystem zu formen [98, 101, 102]. Aufgrund der Möglichkeit jedoch, dass dieses Zusammenleben nicht nur vorteilhaft, sondern auch, wenn aus dem Gleichgewicht gebracht, pathologisch sein kann, bezeichnete Theodor Rosebury diese Verbindung vor 50 Jahren bereits als Amphibiose. Der optimale Zustand bezüglich Menge und Zusammensetzung der Mikroorganismen wird dabei als Eubiose bezeichnet. Demgegenüber steht die Dysbiose, die sowohl in qualitativen, d.h. im Rahmen der Artenvielfalt (Diversität) oder in quantitativen Veränderungen fußen kann [79].

Die Annahme, dass Darmkeime auch einen Einfluss auf das systemische Immunsystem haben, beruht auf Beobachtungen, dass neben lokalen Veränderungen wie kleineren Payer-Patches, auch die Follikel in Milz und Lymphknoten bei GFM verkleinert sind [103]. Dabei scheinen die Mikroben Einfluss auf die T-Zell-Differenzierung sowohl lokal als auch systemisch zu haben, insbesondere auf die von TH₁₇- und FOXP3⁺ regulatorischen T-Zellen [104-106]. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind noch nicht vollständig geklärt. Dendritische Zellen und Makrophagen, die in der Lamina Propria liegen, können nach Stimulation durch Bakterien, bakterielle Bestandteile oder Stoffwechselprodukte die Differenzierung induzieren. Je nach vorherrschender Bakterienart werden dann vermehrt TH₁₇ oder T_{regs} gebildet [37, 107, 108]. Das Verhältnis der beiden zueinander hat dabei eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des symbiotischen Gleichgewichts. Bei zu geringen Zahlen an regulatorischen T-Zellen beginnen TH-Zellen vermehrt TCR zu exprimieren, die spezifisch für kommensale Bakterien sind [109]. Binden dann TH₁₇-Zellen an selbige, so produzieren diese pro-entzündliche Zytokine, wie IL-17 oder 22 [110], die neben ihren antimikrobiellen Effekten auch die vermehrte Bildung von *tight junctions* einleiten [111]. Eine ebenfalls enge Verbindung besteht zwischen der Mikrobiota und sIgA produzierenden Plasma-Zellen. Diese sezernieren in Abhängigkeit der vorhandenen Bakterien, teils durch Stimuli von kommensalen dazu angeregt, mehr oder weniger sIgA in den intestinalen Mukus [112-114]. Dieser wiederum ist ein wichtiger Bestandteil der Schutzfunktion des Darmepithels vor einer übermäßigen entzündlichen Antwort auf die residenten Bakterien. Neben seinen gelösten antimikrobiellen Stoffen ist er zudem ein einfacher Abstandhalter zwischen den PAMP-tragenden Bakterien und den PRRs (z.B. NOD2) des Epithels [115]. Deren Expression, vor allem die von TLR, kann im Rahmen einer Eubiose herabreguliert werden [28], sodass es lediglich zu einer geringen,

steten physiologischen Entzündung kommt, die das bestehende Gleichgewicht aufrechterhält [116, 117]. Die beispielsweise TLR4 (PAMP =LPS) exprimierenden Epithelzellen [118, 119] zeigen zudem unterschiedlich starke Entzündungsantworten, je nachdem, ob sich der Rezeptor und damit auch das Bakterium auf der luminalen oder basalen Seite befindet [120].

Bei einem vermehrten oder inadäquaten Kontakt durch pathogene Keime wird eine Entzündungsreaktion induziert [121]. Die dadurch anfallenden Entzündungsprodukte können einen Überlebensvorteil für sonst nur gering repräsentierte Arten darstellen und somit zu einer Nischenbildung führen; eine Dysbiose entsteht. Dabei kommt es gehäuft zu einem *Shift* von Anaerobiern zu fakultativ anaerob-aeroben gram-negativen Bakterien wie den *Enterobacteriae* im Speziellen *E.coli* [122]. Darüber hinaus gibt es viele weitere Faktoren, die mit dem Erhalt oder Wiedererlangen einer Eubiose oder einer Neigung zur Dysbiose assoziiert sind. Diese sind in Abbildung 8 dargestellt.

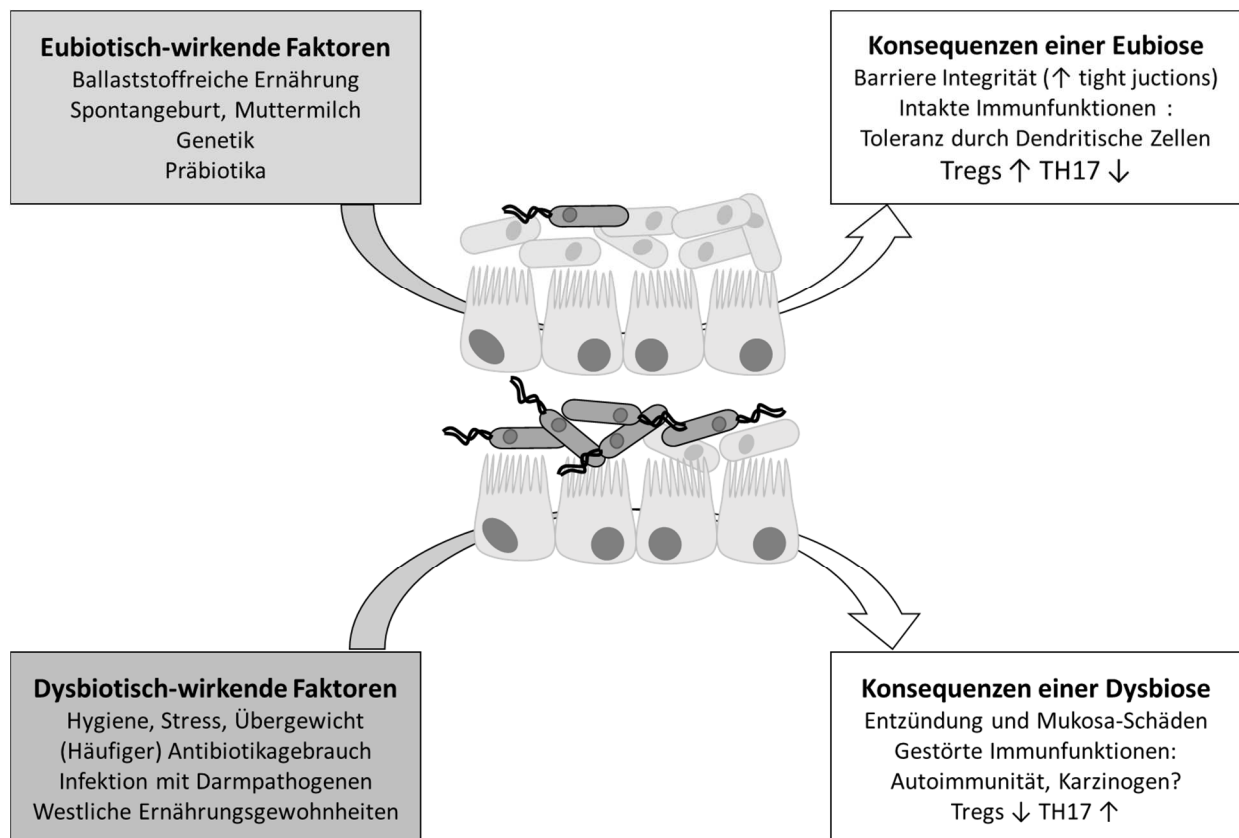


Abbildung 8: Mögliche Einflussfaktoren und Konsequenzen von eubiotischer und dysbiotischer Mikrobiota: Aufgeführt sind bisher in Studien mit Eubiose und Dysbiose assoziierten Einflussfaktoren sowie beobachtete Konsequenzen selbiger. Eigens erstellte Abbildung nach Vorbild von [123]

Eine dysbiotische Konstellation wurde inzwischen mit diversen Erkrankungen in Verbindung gebracht, intestinalen aber auch extra-intestinalen und ist mit Veränderungen des Immunsystems, wie verminderten Tregs und erhöhten Th17-Zellen assoziiert [123]. Eines der am besten untersuchten Phänomene ist dabei die entstehende Dysbiose nach einer Antibiotikabehandlung [124]. Einen Sonderfall stellt darunter die pseudomembranösen Colitis dar. Zu dieser Erkrankung kommt es, wenn im Rahmen einer antibiotischen Behandlung kommensale Bakterien zu Grunde gehen und die sonst durch sie kontrollierten *Clostridien* (*C.difficile*) die Oberhand gewinnen [124]. Auch entzündliche Darmerkrankungen, wie der M. Crohn, zeigen eine übermäßige Entzündungsreaktion mit konsekutiver Dysbiose, die auf einer mangelnden Akzeptanz der kommensalen Flora bei veränderten NOD2-Rezeptoren zurückgeführt wird [125, 126]. Zu den untersuchten extra-intestinalen Erkrankungen gehören inzwischen neben dem Metabolischen Syndrom, chronischer Herzinsuffizienz und Asthma auch eine Reihe von Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel Zöliakie, Diabetes mellitus Typ 1 oder Multiple Sklerose [127-133].

1.5. Projekthypothese und Zielsetzung

Die systemische Entzündung in chronischer Niereninsuffizienz ist ein Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen und der damit verbundenen erhöhten Morbidität und Mortalität in Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Die Pathogenese dieser Entzündung, auch wenn eine Reihe von assoziierten Faktoren identifiziert werden konnte, wird nach wie vor nur teilweise verstanden (Abbildung 6).

Auch wenn Simenhoff und Kollegen bereits in den 70er Jahren eine dysbiotische Flora in urämen Patienten beschrieben hatten [134, 135], so wurde diesem Phänomen, vor allem in Bezug auf die Ätiologie der systemischen Entzündung, lange keine Beachtung geschenkt. Eine Barrierestörung des Darmepithels mit konsekutiver Translokation von Bakterien und bakteriellen Bestandteilen von luminal nach basal, wurde bereits im Zusammenhang mit einer systemischen Entzündung in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, portaler Hypertension und chronischer Herzinsuffizienz beschrieben [128, 136, 137]. Um diese sonst nicht vorhandene Durchlässigkeit des Darmes zu beschreiben, wird gehäuft der Begriff *leaky gut* verwendet [138].

Für die beschriebene Dysbiose in chronischer Niereninsuffizienz birgt die Erkrankung diverse Risikofaktoren. Bei sinkender GFR kommt es zu einer erheblichen Volumenbelastung [139]. Diese führt zu einem intestinalen Wandödem [140] und dem Einstrom von Serumbestandteilen, wie beispielsweise Harnstoff in das Darmlumen [141]. Ferner konnte im Rahmen von postmortalen Studien an Dialysepatienten eine intestinale Entzündung nachgewiesen werden [142]. Hinzu kommt die metabolische Azidose, die zu Veränderungen des Mikromilieus beitragen kann. Auch über eine veränderte Ernährung, Zusatzstoffe, wie Eisen und den häufigen Antibiotikagebrauch, lassen sich eine intestinale Nischenbildung mit Wachstum pathogener Keime, also folglich die Entstehung einer Dysbiose erklären [143].

Die in chronischer Niereninsuffizienz vorherrschende Endotoxämie, die von CKD Stadium 3-5 ansteigt und ebenfalls mit erhöhter Morbidität und Mortalität assoziiert ist, lässt die Vermutung, dass die Darmflora Quelle der systemischen Entzündung ist, naheliegend erscheinen [74, 144]. Hinzu kommen neuere Studien, die bakterielle DNA im Blut von uräemischen Patienten nachweisen konnten [145].

Um den Zusammenhang zwischen chronischer Niereninsuffizienz, Dysbiose und systemischer Entzündung aufzuzeigen, verwendeten wir mit COL-IV- $\alpha_3^{-/-}$ Mäusen ein genetisches Modell für die chronische Niereninsuffizienz, da dieses keine Interventionen bezüglich Nahrung, Toxine oder Operationen benötigt, die die Darmflora beeinflussen könnten. In diesem Modell wollten wir neben einer Immunphänotypisierung zur Klassifizierung der systemischen Entzündung auch Untersuchungen der Mikrobiota in Bezug auf eine mögliche qualitative und quantitative Dysbiose durchführen. Darüber hinaus strebten wir den Nachweis einer Barriervedysfunktion sowohl strukturell als auch funktionell mittels Translokationsexperimenten an. Das Kernstück der Arbeit, um die tatsächliche Verbindung zwischen systemischer Entzündung und intestinaler Mikrobiota aufzuweisen, liegt dabei in der experimentellen Eradikation der Darmflora, im Sinne einer *Proof of concept* Studie.

Unsere Hypothese war dabei, dass die in chronischer Niereninsuffizienz vorherrschenden metabolischen Veränderungen eine Dysbiose und lokale, intestinale Entzündung bedingen, die zum Phänomen des *leaky gut* mit Translokation von Bakterien und bakteriellen Bestandteilen führen und für die systemische Entzündung in chronischer Niereninsuffizienz verantwortlich sind.

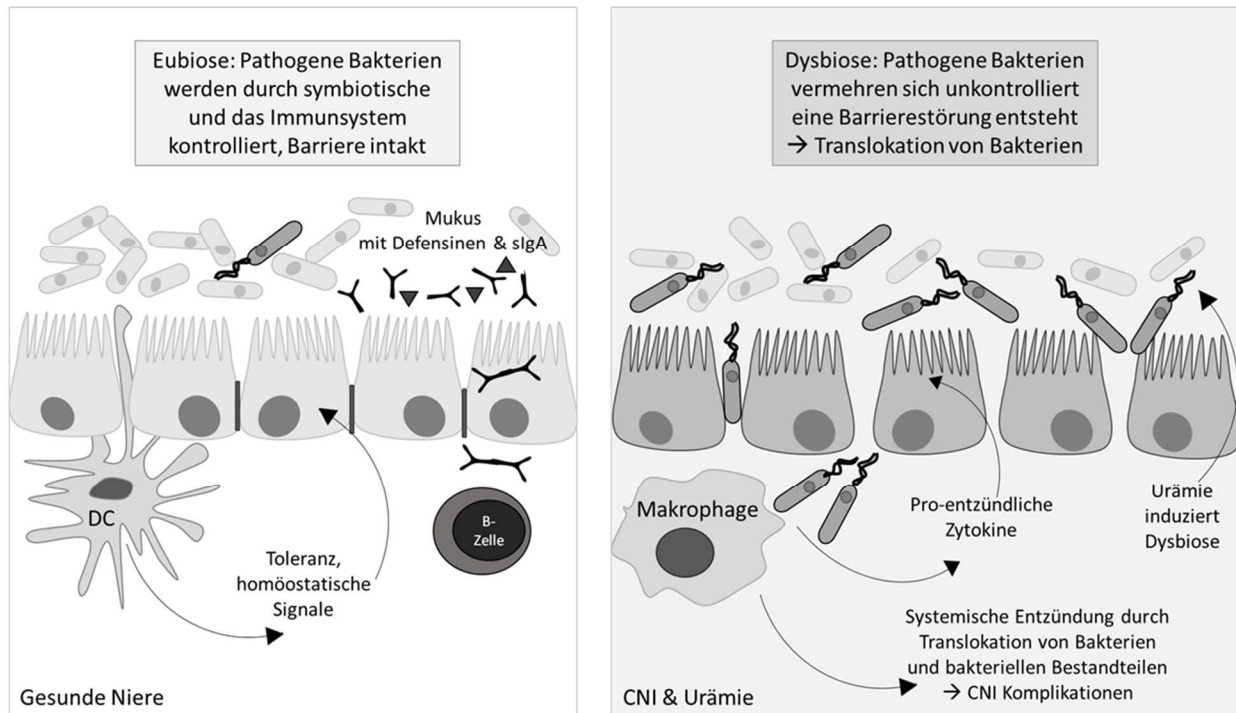
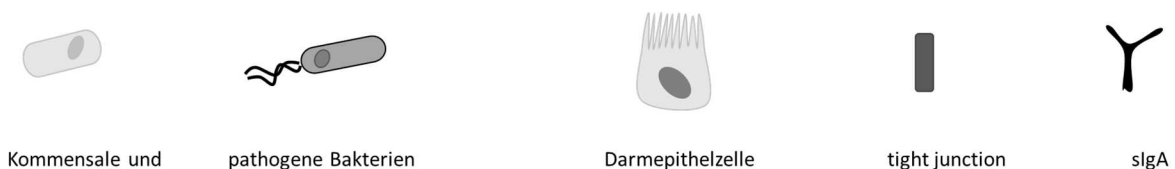


Abbildung 9: Hypothese: Zusammenhang zwischen chronischer Nierenerkrankung, Dysbiose und systemischer Entzündung. Links: in einem Körper mit gesunden Nieren herrscht eine Eubiose. Immunsystem, Darmflora und Darmbarriere koexistieren in einer friedlichen Symbiose. Rechts: In einem Körper mit chronischer Niereninsuffizienz führen die metabolischen und diätischen Veränderungen zu einer Dysbiose und lokalen Entzündung im Darm, dies führt zu einer Barrierefunktionsstörung mit folgender Translokation von Bakterien und bakteriellen Bestandteilen über das Darmepithel. Eine systemische Entzündung wird induziert, die Komplikationen beispielsweise kardiovaskulären Ursprungs bedingt. (Eigens erstellte Abbildung gemäß Inhalten von [1])



2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Tabelle 3: Tiere und Tierhaltung

Tier/Gerät	Hintergrund/Bezeichnung	Hersteller /Zur Verfügung gestellt von
Käfige	Makrolone Typ II	Techniplast, Hamburg
Tierfutter		Ssniff Spezialdiäten, Soest
COL-IV- $\alpha_3^{-/-}$ Mäuse	SV129	PD Dr. med. O. Gross, Göttingen

2.1.2. Tabelle 4: Einwegmaterialien

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Eppendorf-Tubes/Falcons	1,5ml; 2ml; 15ml; 50ml	TPP, Trasadingen, CH
Eppendorf-Tubes, pyrogen-frei	1,5ml sterile, pyrogen free	nerbe plus, Winsen/Luhe, D
FACS Plastikkölbchen	FACS tubes	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
Histologie- Einbettkassetten	Embedding cassettes „biopsy“	ISOLAB, Wertheim, D
Objektträger	SuperFrost+® Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Kanülen	Mikrolance 3 20,26, 30G	BD, Fraga, E
Ösen (Einmalösen)	Einmalimpfeschlingen (blau)	Nunc GmbH, Wiesbaden, D
Pipettenspitzen	Sapphire 10, 200, 1000 μ l	Grainer Bio-One, Frickenhausen, D
Pipettenspitzen, pyrogen-frei	Filter Tips, 100 μ l, 1000 μ l sterile, pyrogen-free	nerbe plus, Winsen/Luhe, D
qPCR Platten/Folie	LightCycler 480 Multiwell-Platte 96 mit Klebefolie	Roche, Basel, CH
Serologische Pipetten	5ml; 10ml; 25ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Skalpelle	Disposable Scalpel	Feather Safety Razor Co., LTD,
Spatel (Einmalspatel)	L-Shape Spreader sterile	VWR, Leuven, Belgien Osaka, J
Spritzen	Diskardit II 1, 2, 5ml	BD, Fraga, E
Sterile Einwegpinzetten	Pinzette-steril	Angiokard Medizintechnik GmbH & Co.KG, Friedeburg, D
Steriles Filtersieb (Zellisolation)	MACS Pre-Separation Filter 30 μ m; Cell strainer 100/70 μ m	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D; BD Falcon, Franklin Lakes, US
Zellkulturschalen 6- /12-/ 96-Well-Platten Zellkultur	Zellkulturtestplatte 6 / 12 /96F	Sowohl von: TPP, Trasadingen, CH als auch von: Nunc, Wiesbaden, D
96-Well-Platten ELISA	NUNC-Immunoplate F96, Maxisorp	Thermo Scientific, Waltham, US

2.1.3. Tabelle 5: Laborgerätschaften

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Analysesoftware, Durchflusszytometer	CellQuest Software Pharmingen	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Analysesoftware	FlowJo software	TreeStar, Ashland, US
Autoklaven		Webeco, Selmsdorf, D
Brutschrank	Heracell 150; Heracell Typ B5060 EC-CO 2	Heraeus Sepatech, Osterode, D
Durchflusszytometer	FACSCalibur™	BD Bioscience, Heidelberg, D
Elektr. Pipettierhilfe	Easypet; Pipetus; Research Pro 5-100µl	Eppendorf AG, Hamburg, D; Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D; Eppendorf AG, Hamburg, D
ELISA-Reader	Tecan, GENios Plus	Tecan, Crailsheim, D
Gelelektrophorese- Kammer	Gelelektrophorese-Kammer	PeqLab Biotechnologie, Erlangen, D
Gavage	Reusable Animal Oral Gavage	Cadence Science, Staunton, USA
(Gewebe)homogenisator	Ultra Turrax T25	IKA GmbH, Staufen, D
Kamera	Canon 450	Canon 450
Konfokalmikroskop	Olympus BX 61	Olympus, Hamburg, D
Kryomikrotom	Jung CM 3000	Leica, Solms, D
Magnetrührer	IKAMAG REO	IKA-Werke GmbH&Co.KG, Staufen, D
Manueller Dispenser	Multipette Plus	Eppendorf AG, Hamburg, D
Manuelle Pipettierhilfe	Research Plus 30-300µl	Eppendorf AG, Hamburg, D
Manuelle Pipettierhilfen	Pipetman 2, 10, 20, 100, 200, 1000µl	Gilson, Middleton, WI, US
Mikroskop	Leitz DM RBE	Leica Microsystems, Wetzlar, D
Mikroskop-Imaging	CellP software	Olympus, Hamburg, D
pH-Meter	pH-Meter WTW	WTW GmbH, Weilheim, D
Photometer	Photometer DU 530	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Pipetten	PipetmanR	Gilson, Middleton, WI, USA
Plate-Washer	Microplate-Washer ELx50	Biotek, Bad Friedrichshall, D
qPCR Gerätschaften	Nano Drop 1000; LightCycler 480 Real-Time PCR System	PEQLAB Biotechnology, Erlangen D; Roche, Basel, CH
Rotormischer	Heavy Duty Rotator	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, D
SDS-Gelelektrophorese- Kammer	MiniVE, vertical electrophoresis system	Amersham Bioscience, Glattbrugg, CH
SDS Gelelektrophorese Spannungsquelle	Power-PAC 3000	BioRad, München, D
Sonicator	Sonifier® B-12	Branson Sonic Power Company, Danbury, USA
Sterile Werkbänke	SterilGard Hood Class II,	Baker Company, Sanford, Maine, US;

Material und Methoden

	A/B3; Microflow, biological safety cabinet Klasse 2	Nunc GmbH, Wiesbaden, D
Thermomixer	Thermomixer 5436; Thermocycler UNO-II	Eppendorf, Hamburg, D; Biometra, Göttingen, D
UV-Licht		Bachofer Laborgeräte, Reutlingen, D
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, US
Waagen	BP 110 S; Mettler PJ 3000	Sartorius, Göttingen, D; Mettler-Toledo, Greifensee, CH
Wasserbadinkubator	Wasserbad HI 1210	Leica Microsystems, Solms, D
Zählkammer	Neubauer Zählkammer	Roth, Karlsruhe, D
Zentrifugen	Minifuge T; Zentrifuge Heraeus, Sepatech Biofuge A ; Centrifuge 5415 C; Centrifuge 5417 R ; Centrifuge 5418 C; Universal 16;	VWR Internation, Darmstadt, D; Heraeus Sepatech, Osterode, D; Eppendorf, Hamburg, D; Hettich, Bäch, CH;

2.1.4. Tabelle 6: Assays und Kits

Verwendung	Kit Bezeichnung	Hersteller
Albumin in Urin und Faeces	Mouse Albumin Elisa Quantitation Set	Bethyl Laboratories Inc., USA
Bakterielles Endotoxin im Serum	LAL- Chromogenic Endpoint Assay	Hycult Biotech, Uden, Niederlande
DNase für RNA Isolation	RNAse-freies DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden, D
Harnstoffbestimmung	Urea FS	Diagnostic Systems, 65558 Holzheim, D
Intrazelluläre Färbung	Cytofix/Cytoperm Plus	BD, Franklin Lakes, US
Isolation genomischer DNA Faeces	QIAamp DNA Stool Mini Kit	Qiagen, Germantown, MD, USA
GFR Bestimmung	FITC Sinistrin clearance kinetics transkutanes Detektorsystem	Pharma & Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Kreatininbestimmung	Creatinine FS	Diagnostic Systems, 65558 Holzheim, D
Peptidoglycan-Detektion	SLP Reagent Set	Wako Chemicals GmbH, Neuss, D
RNA Isolation	Ambion PureLink RNA Mini Kit	Life technologies GmbH, Darmstadt, D
Serum Amyloid P/ Pentraxin 2 Serum	Quantikine [®] ELISA Mouse Pentraxin 2/SAP Immunoassay	R&D Systems, Inc, Minneapolis, USA
slgA im intestinalen Mucus	ELISA Kit for Secretory IgA ELISA Kit for Secretory IgA	Uscn Life Science Inc., Houston, USA Cloud-Clone Corporation, Houston, USA

2.1.5. Tabelle 7: Chemikalien, Reagenzien und Lösungen

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller /Zusammensetzung
Genotypisierung	<i>DirectPCR® Lysis Reagent Tail</i> Agarosepulver; DNA Ladder Low range; Loading Dye (6x); Ethidiumbromid; Proteinkinase K; Xylencyanol; Bromphenolblau; Primer	Peqlab , Erlangen, D Invitrogen, Karlsruhe, D; Fermentas, St. Leon-Rot, D; Metabion, Martinsried D; Merck, Darmstadt, D; Roth, Karlsruhe, D
Antibiotika	Ampicillin-T (Chevita, Charge 5382), Neomycin (Charge 11020430) Metronidazol (Charge 11020430)	Hauseigene Apotheke Großhadern LMU Klinikum, München, D
Antikoagulation	EDTA	PAN Biotech KG, Berlin, D
ELISA	Natronlauge (NaOH); TMB Substrate Reagent Set di-Hydrogensulfat (H2SO4)	Merck, Darmstadt, D BD Biosciences, San Diego, USA Roth, Karlsruhe, D
Lösung	Aqua ad injectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Gewebelagerung	RNAlater	Qiagen GmbH, Hilden, D
Histologie	Formalin; Paraffin; Xylol; Ethanol; Hämatoxylin; Ammoniumpersulfat (APS) Periodic acid-Schiff (PAS)-Reagenz H ₂ O ₂ Antigen-Demaskierungslösung, Avidin, Biotin, ABC-Substrat-Lösung	Merck, Darmstadt, D Bio-Rad, München, D Bio-Optica, Mailand, Italien BD Biosciences, San Diego, CA, USA Vector, Burlingame, CA, USA
MacCONKEY Agar	Mac-Conkey-Agar	Roth, Karlsruhe, D
Narkose	Medetomedin 1 mg/ml (0,5 mg/kg) Midazolam 5mg/ml (5,0 mg/kg) Fentanyl 0,05 mg/ml (0,05mg/kg)	Pfizer, Berlin, D Roche, Mannheim, D Jansen, Oberriet, Schweiz
Reverse Transkription	Acrylamid; Hexanucleotide; 25mM dNTPs; RNAsin 0,1M DTT; 5x First strand Buffer; Superscript II	Ambion, Darmstadt, D; Roche, Mannheim, D GE Healthcare, München, D Promega, Mannheim, D Invitrogen, Karlsruhe, D
RNA Isolation	Ethanol zur Analyse	Merck, Darmstadt, D
Röntgenentwickler	Developer; Rapid fixer	AGFA, Mortsel, B
RT-PCR	SYBR Green Dye; Taq DNA- Polymerase; 10xPE-Puffer; 1,25mM dNTPs; 25mM MgCl ₂	Applied Biosystems, Norwalk, US; New England BioLabs, Ipswich, US;
Sonstige Chemikalien	Glycerin; H ₂ SO ₄ ; Tris; Acrylamid , Tryptophan Hefe (Bacto-Yeast-Extract) Agar-Agar HCl; NaCl; DMSO; Urea; APS; Natriumazid; Na ₂ HPO ₄ ; KH ₂ PO ₄ ;	Roth, Karlsruhe, D BD Biosciences, Sparks, USA Serva, Heidelberg, D Merck, Darmstadt, D

Material und Methoden

	KCl; MgCl; Methanol; H ₂ O ₂ 30%; MgCl ₂ ; CaCl ₂ ;	
	Tween-20	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
	SDS	TEMED BioRad, München, D
Supplement; Blockierung	BSA (Bovines Serum Albumin)	Roche Diagnostics, Mannheim, D
	FCS (Fetales Kälberserum)	Biochrom KG, Berlin, D
Zellisolation, (1x)	Wasch-Puffer Dulbecco's PBS	PAN Biotech KG, Aidenbach, D
Zellkulturmedium	RPMI 1640; RPMI Glutamax	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.1.6. Tabelle 8: Pufferzusammensetzungen

Anwendung	Puffer Bezeichnung	Zusammensetzung/Hersteller
Agarose Gel	TBE-Puffer	55g Borsäure, 108g Tris, 5,84g EDTA, 10l H ₂ O
Durchflusszytometrie	FACS Puffer DPBS:	500ml; BSA: 1g; Natriumazid: 0,1%
	Annexin binding Puffer BD	Puffer BD Pharmingen, Heidelberg, D
ELISA	0,05M Natrium-Bicarbonat-Puffer	NaHCO ₃ : 2,1g; Na ₂ CO ₃ : 2,645g; auf 500ml
	PBS (10x)	NaCl: 80,0g; Na ₂ HPO ₄ : 11,6g; KH ₂ PO ₄ : 2,0g; KCl: 2,0g; auf 1L mit Wasser; titrieren (pH7,0)
	Tris-NaCl (10x)	Tris: 60,57g; NaCl: 81,816g auf 1L (pH 8,0)
Leukozytenisolation	10x HBSS ohne Ca/Mg	4g KCl; 0,6g KH ₂ PO ₄ ; 80g NaCl; 0,621g Na ₂ HPO ₄ auf 1L (pH7,4)
Dünndarm	100x HgPg	59,6g HEPES; 500ml RPMI Glutamax (pH 7,5)
	10x HEPES bicarbonate buffer	23,8g HEPES; 21g NaBic; auf 1L H ₂ O (pH 7,2)
	Kollagenase Lösung	500ml RPMI Glutamax; 55ml FCS; 5,5ml 10xHgPg; 1ml 0.5M MgCl ₂ ; 1ml 0.5M CaCl ₂ ad 1mg/ml Kollagenase
	DTE	50ml 10HBSS; 50ml 10xHEPES-bic-buffer; 50ml FCS; 350ml H ₂ O
	Harvest medium	500ml RPMI Glutamax; 25ml FCS; 5ml 100xHgPg
	CMF solution	50ml 10x HBSS; 50ml 10x HEPES-bic-buffer; 25ml FCS; 375ml H ₂ O
	EDTA Solution	50ml 10xHBSS; 5ml 100x HgPg; 1,3ml 0.5M EDTA; 455ml H ₂ O

2.1.7. Tabelle 9: Zelllinien

Zelllinie	Bezeichnung	Hersteller /Zur Verfügung gestellt von
Colon-26	Murine colon carcinoma cell line	CLS Cell Lines Service GmbH, Eppenheim, D

2.1.8. Tabelle 10: Oligonukleotidprimer für qPCR

Primer		Sequenz
IL-1 β	forward primer:	5'-CACTGTCAAAAGGTGGCATT-3'
	reverse primer:	5'-TTCCTTGTGCAAGTGTCTGAAG-3'
IL-6	forward primer:	5'TGATGCACTTGCAGAAAACA3'
	reverse primer:	5'-ACCAGAGGAAATTTCAATAGGC-3'
Occludin	forward primer:	5'-GATTCTCTGACCTTGAGTGTG-3'
	reverse primer:	5'-TAGGTGGATATCCCTGACCC-3'
PTX2/SAP	forward primer:	5'-AGCTGCTGCTGCATACCCT-3'
	reverse primer:	5'-CAGATTCTCTGGGGAACACAA-3'
TNF α	forward primer:	5'-CCACCACGCTCTTCTGTCTAC-3'
	reverse primer:	5'-AGGGTCTGGGCCATAGAACT-3'
18s	forward primer:	5'- GCAATTATCCCATGAACG -3'
	reverse primer:	5'- AGGGCCTCACTAAACCATCC -3'
ZO-1	forward primer:	5'-AATGTATAGCACGGACAGTAGAC-3'
	reverse primer:	5'-TCTCTGCTGGCTTGTITTC-3'

2.1.9. Tabelle 11: Antikörper Durchflusszytometrie und Immunhistologie

Verwendung	Bezeichnung/ Zielstruktur	Hersteller	
Durchflusszytometrie	Anti-Maus CD3 ϵ FITC (clone 145-2C11);	Becton Dickinson BD, Heidelberg, D	
	Anti-Maus CD4 APC (clone RM4-5);		
	Anti-Maus CD8 PerCP (clone 53-6.7);		
	Anti-Maus CD69 PE (clone H1.2F3);		
	Anti-Maus CD11c PE (clone HL3,);		
	Anti-Maus CD25 PerCP; (clone PC61);		
	Anti-Maus CD86 FITC (clone GL1);		
	Anti-Maus IL-17 APC (ebio17B7)		
	Anti-Maus CD11b APC (553312)		
	Anti-Maus IFN- γ PE		
	Anti-Maus Ly6C FITC (clone AL-21);		
	Anti-Maus Ly6G FITC (clone 1A8);		
	Anti-Maus CD45 PE (clone 30-F11);		BioLegend, San Diego, CA AbD SeroTec, Düsseldorf, D
	Anti-Maus FOXP3 PE (clone 150D);		
	Anti-Maus F4/80 APC (clone MCA);		
	Anti-Maus Ly6B.2/ 7/4 PE (MCA 77);		
Immunhistologie	Ratte Anti-Mensch CD3 (MCA1477)	Serotec, Oxford, UK	
	Ratte Anti- Maus F4/80 (MCA497G)		
	Ratte Anti-Maus Ly6B.2 (Alloantigen)		
	Hase Anti-occludin (ab64482); Ziege anti-ZO-1 (ab190085)	Abcam, Inc., Cambridge, USA	

2.2. Methoden

2.2.1. Tierversuche (Zucht, Haltung, Genotypisierung, GFR und Versuchsaufbau)

Alport Zucht und Haltung

Als Modell für ein progredientes chronisches Nierenversagen wählten wir Col4 α 3-defiziente (Col4 α 3^{-/-}) Mäuse, die zusammen mit ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern im identischen Sv129 Hintergrund gezüchtet wurden. Dieses Modell wurde erstmals durch Dominic Cosgrove beschrieben [19, 21]. Er brachte eine Neomycin-Phosphotransferase-Cassette in Exon 5 des Col4 α 3-Gens ein. Durch diese wird die NC1-Domäne des Kollagens durchbrochen und so eine Transkription der α 3-Kette des Kollagen-IVs verhindert, was einer autosomal-rezessiven Form des Alport-Syndroms entspricht. Dieses geht bei den Mäusen mit Glomerulosklerose und interstitieller Fibrose einher, welche zum terminalen Nierenversagen mit Urämie und daraus resultierend zum Tod mit etwa 9-10 Lebenswochen führt Cosgrove, Meehan [19]. Aufgrund der kurzen Lebenserwartung können für die Verpaarung ausschließlich heterozygote Tiere (Col4 α 3^{+/-}) verwendet werden, weshalb jeweils Zuchtpaare von einem männlichen und zwei weiblichen Col4 α 3^{+/-} Mäusen gebildet wurden. Die dabei entstehenden Genotypen folgen in ihrer Häufigkeit den Mendel'schen Regeln (Col4 α 3^{-/-}: Col4 α 3^{+/-} : Col4 α 3^{+/+} im Verhältnis 1:2:1). Alle Tiere wurden unter spezifischen pathogen-freien Haltungsbedingungen gezüchtet: Ihre Käfige, mit Sterilfilterdeckeln versehen, wurden im Autoklaven sterilisiert, ebenso wie darin enthaltenes Futtermittel, Wasser, Einstreu und Nestwatte. Bei Bedarf, spätestens jedoch alle sieben Tage wurden diese komplett ausgetauscht. Die Haltung von maximal 5 Tieren pro Käfig erfolgte in einem 12-stündigen Hell/Dunkel-Rhythmus mit freiem Zugang zu Futter und Wasser. Alle tierexperimentellen Verfahren wurden entsprechend der Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und vorab durch die Regierung von Oberbayern genehmigt. Bis zum Startzeitpunkt der Versuche wurden die Mäuse *ge-co-housed*. Das heißt, dass sie bis zur Geschlechtsreife, beginnend ab der vierten Woche, gemeinsam mit Mutter, Vater und Wurfgeschwistern in einem Käfig lebten. Ab der vierten Woche wurden sie geschlechter-getrennt, aber mit gleichaltrigen Versuchstieren, unabhängig von ihrem Genotyp gehalten.

Genotypisierung

Mit vier Wochen wurden die Mäuse geschlechtergetrennt in neue Käfige gesetzt. Bei diesem Vorgang wurden sie mit Ohrlöchern markiert und erhielten eine fortlaufende Versuchsnummer. Zudem wurde bei diesem Schritt eine Gewebeprobe der Schwanzspitze von ca. 2mm zur Genotypisierung entnommen. Diese wurde bis zur vollständigen Lyse des Gewebes 4 Stunden bei 56°C in 200µl *DirectPCR® Lysis Reagent Tail* oder PBNB Puffer mit 1µl Proteinkinase K (20 mg/ml) schüttelnd inkubiert. Im Anschluss an eine kurze Zentrifugation (12.000 rcf x 2 min) wurde der Überstand, der die freie Tier-DNA enthielt, abpipettiert. Daraufhin erfolgte zur Amplifikation der DNA eine PCR, für die ein Mastermix angesetzt wurde. Die Genotypisierung wurde wie beschrieben [146] durchgeführt.

Vereinfacht wurden dabei folgende Schritte verfolgt: 1µl des Gewebelysates, die DNA des jeweiligen Versuchstieres enthaltend, wurde zu einem Mastermix, bestehend aus Wasser, 2,5µl 10x-PE-Puffer, 4,0µl 1,25mM dNTP, 0,2µl Taq-DNA-Polymerase (5.000 U/ml) und 0,5/1µl des zugehörigen Primers pipettiert, einen Gesamtansatz von 24/24,5 µl ergebend. (Primer 1: *Col4α3 forward*: oIMR0642 Tm=60°C 5'- CCT gCT AAT ATA ggg TTC gAg -3'; Primer 2: *Col4α3 reverse*: oIMR0643 Tm= 58°C 5' CCA ggC TTA AAg ggA AAT CC 3'; Primer 3: *neomycin resistance gene* oIMR1100 Tm= 61°C 5'- gCT ATC Agg ACA Tag CgT Tgg -3'). Als Kontrolle wurden Proben mit bereits bekanntem Genotyp mitgeführt (je *Col4α3 +/+* und *Col4α3 -/-*) sowie eine Negativkontrolle mit Wasser anstelle von DNA. Auf eine Präinkubationszeit von 15min bei 94°C zur initialen DNA-Linearisierung folgte der eigentliche PCR-Zyklus mit folgenden Einstellungen: 94°C (30 sec) 61°C (60 sec: Primerbindung), 72°C (90 sec: DNA-Synthese mit Taq-Polymerase), 30 Iterationen. Im Anschluss wurde erneut bei 72°C inkubiert (10 min: Komplettierung aller Einzelstränge). Daraufhin wurden in je eine Tasche eines Agarosegels (2g Agarosepulver pro 100ml TBE Puffer aufkochen mit 8µl 1%-Ethidiumbromid in einer Form mit Taschenkamm erhärten lassen) 4µl eines PCR Ansatzes mit 4µl 6x Ladepuffer pipettiert (3ml Glycerol; 0,5ml 5% Bromphenolblau; 0,5ml 5% Xylencyanol; H₂O auf 6ml). In die erste Tasche wurde anstelle der Proben ein DNA-Marker (DNA ladder) zum Längenvergleich der Banden pipettiert. Anschließend wurde an das in TBE-Puffer eingelegte Agarosegel eine Spannung (200V/30min) angelegt, unter der die negativ geladenen DNA-Fragmente je nach Basenpaarmenge und dem daraus resultierendem Widerstand unterschiedlich weit zum Pluspol wandern. Zur Analyse der DNA-Banden wird das die Doppelhelices interkalierende Ethidiumbromid mit UV-Licht angeregt und so sichtbar.

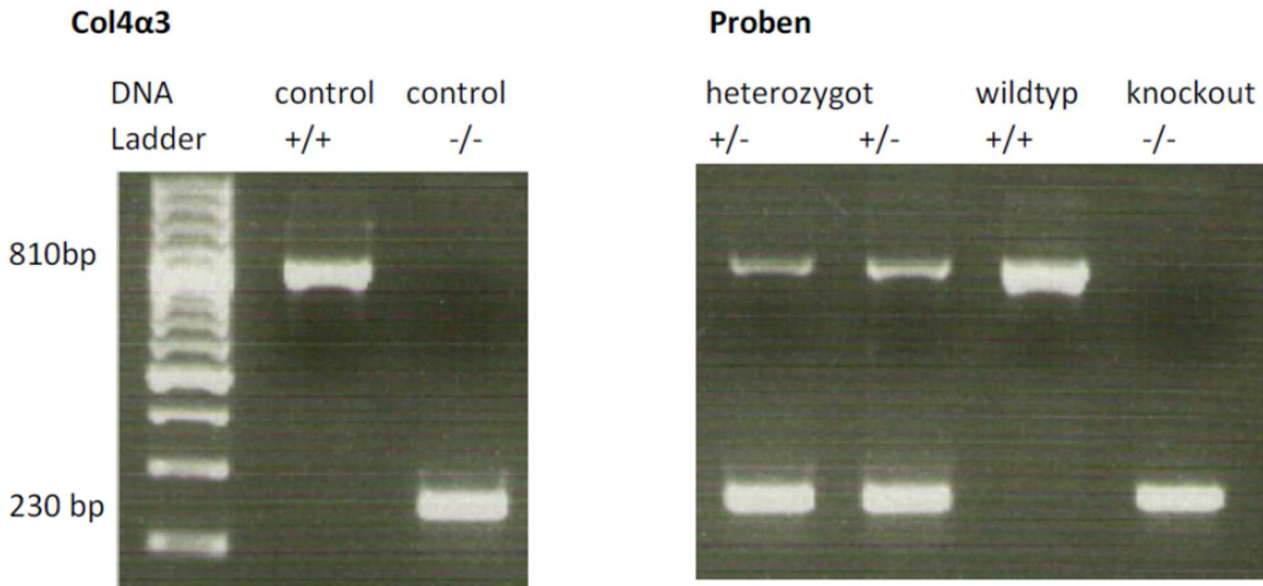


Abbildung 10: Anschauungsbeispiel der mit Agarosegelelektrophorese durchgeführten Genotypisierung: DNA ladder und Positivkontrollen sowie Banden von vier Proben. Col4α3 +/+ bei 810bp, Col4α3 +/- sowohl 810bp als auch 230bp; Col4α3 -/- bei 230bp

Versuchsaufbau

Mit sechs Wochen wurden die Col4α3-defizienten Tiere gewichts- und geschlechtsgenormt in zwei Gruppen unterteilt. Selbiges geschah mit den Wildtyp-Tieren. Eine Gruppe wurde gewichtsadaptiert mit einer Tripel-Therapie aus 25 mg/kg Körpergewicht (KG) Neomycin, 60 mg/kg/KG Ampicillin und 25 mg/kg/KG Metronidazol behandelt. Die Antibiotika wurden hierbei in Aqua ad injectabilia gelöst und mittels Gavage enteral verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt eine ebenfalls gewichtsadaptierte Wassermenge (Aqua ad injectabilia). Ab diesem Zeitpunkt wurden die Tiere nicht nur geschlechtergetrennt gehalten, sondern auch entsprechend ihrer Behandlung. Dies erfolgte, damit bei Ingestion der Fäkalien keine Kontrolltiere mit Antibiotika behandelt wurden. Tiere mit unterschiedlichen Genotypen wurden jedoch auch weiterhin *ge-co-housed*. Die Therapie wurde über 12 Tage alle 24 Stunden immer zur gleichen Uhrzeit (8:00 ± 1 Stunde) verabreicht.

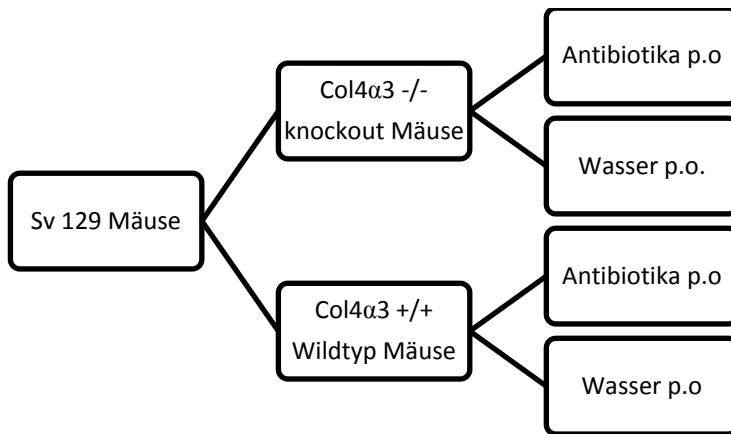


Abbildung 11: Versuchsgruppen: Unterteilung der Mäuse in Untergruppen nach Genotyp und Intervention

An Tag 13 erhielten alle vier Gruppen 10^9 GFP-markierte-E.coli oral per Gavage. 48 Stunden später (geschätzte Zeit für die Überquerung der Bakterien über die geschädigte Darmwand) wurden alle Tiere getötet und die Organe entnommen.

Versuchsabschluss: Präparation, Probenentnahme und -konservierung

Innerhalb des Versuches wurden jeweils an Tag 0 sowie an Tag 7 Proben entnommen. Dazu wurde sowohl Blut über die Schwanzvene entnommen als auch Faeces und Urin gesammelt. Letzteres geschah durch vorsichtige Massage der Harnblase. Nicht gleich verwendete Proben wurden bei -20°C bzw. -80°C gelagert. Die Probenentnahme an Tag 14 erfolgte in tiefer Anästhesie. Diese wurde gewichtsadaptiert intraperitoneal verabreicht. Sobald die Narkose ausreichend tief war wurde zunächst lediglich der Thorax eröffnet und unter sterilen Konditionen eine finale Blutentnahme direkt aus dem Herzen durchgeführt. Unmittelbar nach dem Kreislaufstillstand wurde auch das Abdomen eröffnet. Das Peritoneum wurde separat durchtrennt nach Abpräparation oberer Schichten, wobei zur sterilen Entnahme der Organe (Nieren, Leber, Milz) ein Besteckwechsel durchgeführt wurde. Erst im Anschluss wurde der Darm, nachdem er sowohl proximal als auch distal abgebunden wurde, entnommen. Die einzelnen ungleich getrennten Bestandteile wurden separiert, gereinigt und für die jeweilige Verwendung aufbereitet. Nicht sofort verwendete Proben wurden je nach Bedarf bei -20°C beispielsweise in RNAlater, bzw. bei -80°C gelagert. Zudem wurden Probenanteile in Histologiekassetten in Formalin (1,8%) zunächst für 24 Stunden konserviert. Für die histologischen Schnitte wurden die verschiedenen Organteile anschließend in Paraffinblöcken eingebettet.

Bestimmung der Glomerulären Filtrationsrate (GFR)

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) ist beim Menschen der entscheidende Parameter zur Determination der Schwere einer chronischen Nierenerkrankung [5]. Die GFR kann invasiv durch Infusion einer Testsubstanz (z.B. Inulin), die lediglich glomerulär filtriert jedoch weder tubulär sezerniert noch resorbiert wird, gemessen werden. Daneben gibt es weitere weniger invasive Verfahren wie die Kreatininclearance, die vereinfacht gesehen über das Verhältnis der Kreatininkonzentration im Urin zu der im Serum errechnet oder aber mathematisch mittels einer Formel abgeschätzt werden kann (eGFR für engl. *estimated*) [139]. Zur Bestimmung der GFR der Mäuse wurde ein Kit verwendet, das sich einer modifizierten Form der ersten der aufgeführten Techniken bedient. Dies unterscheidet sich im wesentlichen von der aufgeführten Technik durch eine geringere Invasivität bei gleichen Ergebnissen bezüglich Reproduzierbarkeit und Validität [147-149]. Die Versuche wurden hierbei gemäß Herstellerangaben sowie gemäß [150] durchgeführt. Verallgemeinert wurden dabei folgende Schritte durchgeführt: Den Tieren wurde 120mg/kg FITC-Sinistrin in die Schwanzvene appliziert, welches lediglich glomerulär filtriert, nicht aber tubulär sezerniert oder resorbiert wird und sich somit uneingeschränkt für die GFR-Bestimmung eignet [150]. Anstelle jedoch der für gewöhnlich nötigen 6-fachen Blutabnahme binnen 90min kann bei dem hier verwendeten miniaturisierten Imager, bestehend aus einer Licht-emittierenden Diode, die Plasma-Konzentration des FITC-Sinistrin transkutan gemessen werden, was zu einer erheblichen Stressreduktion seitens der Mäuse führt. Nach einer Messzeit von 1-2 Stunden können die Fluoreszenzkurven des verwendeten Photodetectors am PC ausgelesen werden. Dabei kann über den Abfall der Fluoreszenz in Relation zur Zeit die Plasma-Halbwertszeit des FITC-Sinistrins bestimmt und über einen Umrechnungsfaktor diese als GFR der Mäuse dargestellt werden ($\mu\text{l}/\text{min}$)[151]. Die Bestimmung der GFR erfolgte durch Julian Marschner (PhD Student des Labors).

2.2.2. Mikrobiologische Untersuchungen (CFUs, GFP-E.coli und 16S-rRNA Sequenzierung)

Agarplatten gießen

LB (lysogeny broth)-Agar

LB bezeichnet ein Medium welches als Agar wie folgt hergestellt wird: 10g Tryptophan, 10g NaCl und 5g Hefe wurden mit 1L Milipore H₂O in 1,5-Liter Flaschen aufgefüllt und 3% Agar

hinzugefügt. Die Flaschen wurden abgedeckt und bei 121°C autoklaviert. Nachdem der fertige Agar etwas abgekühlt war, wurden jeweils 25ml in sterile Petrischalen gegossen. Um eine Kontamination zu vermeiden, wurden die Platten mit der Lösung zum Aushärten und Abkühlen unter den Abzug gestellt. Bis zur Verwendung wurden die Platten bei 4°C gelagert. Ohne Agar kann die Lösung als flüssiges Medium verwendet werden.

MacConkey-Agar

50g der MacConkey Mischung von mibius wurden mit 1 Liter Millipore H₂O aufgefüllt und bei 121°C 15 Minuten den Herstellerangaben nach autoklaviert. Das Gießen und Aushärten der Platten erfolgte analog zu den Abläufen im LB-Protokoll.

LB-Ampicillin

Die Medium-Mischung erfolgte wie im obenstehenden Protokoll. Nach der Erhitzung aber vor dem Gießen der Platten wurden 2ml Ampicillin zu 1l Agar hinzugegeben (2µl Ampicillin/

1ml LB-Agar = 100µg/ml). Anschließend konnten die Platten gegossen werden.

Colony Forming Units

Die Menge der Bakterien wurde anhand der CFUs mittels Ausplattieren von Faeces und Organsuspensionen auf Agarplatten bestimmt. Da es sich bei dem MacConkey-Agar um einen selektiven Nährboden handelt, konnte man nicht nur Rückschlüsse auf die Quantität, sondern auch auf die Qualität der wachsenden Bakterien ziehen. Hierbei stellen sich Laktose-negative Kolonien als farblos dar, wohingegen Laktose-positive Bakterien rote CFU mit einem trüben Hof bilden, der durch die pH-Erniedrigung bei ausfallenden Gallensäuren entsteht (Tabelle 12).

Faeces

Für die Faeces-Suspension wurde der gewonnene Kot nach Bestimmung des Gewichts direkt in 500µl PBS und durch mehrmaliges Vortexen in Lösung gebracht. Je nach Versuchstag und Behandlung der Tiere wurde diese Suspension auf ein Verdünnungsverhältnis von 1:4, 1:200 oder 1:20.000 gebracht. Diese Verhältnisse hatten sich in einem Vorversuch als geeignet erwiesen, um die tatsächliche Bakterienmenge durch Zählen der Einzelkolonien zu bestimmen, ebenso wie ein optimales Gewicht des Faeces zwischen 30 und 80 mg. Von der jeweiligen Verdünnung wurden 50µl mit einem Einmalspatel jeweils auf einer LB-Agarplatte

Tabelle 12 : MacConkey bakterielles Wachstumsmuster modifiziert nach: © Version 21-01-2003 Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany

Kolonien Aussehen	Mikroorganismen
Farblos, transparent	Salmonella, Shigella u. a.
Groß, rot, trüber Hof	Escherichia coli
Groß, rosa, schleimig	Enterobacter, Klebsiella
Winzig klein, vereinzelt wachsend, opak	Enterokokken, Staphylokokken, u. a.

und einer MacConkey-Agarplatte, sowie an Tag 14 zusätzlich auf einer LB-Ampicillin-Platte ausplattiert. Im Anschluss wurden die Platten bei 37°C für 16-18 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die entstandenen Kolonien wurden nach Aussehen kategorisiert und dementsprechend einzeln sowie in ihrer Gesamtmenge ausgezählt. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und des Faecesgewichtes wurde die finale CFU-Zahl pro Gramm Faeces berechnet.

Organe

Nach Entnahme der Organe wurden diese gewogen und in PBS auf Eis bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Danach wurden sie über einen 100µm Filter in einen 50ml Falcon prozessiert. Durch mehrmaliges Nachspülen mit PBS wurde eine vollständige Suspension aller den Filter passierenden Organanteile gewährleistet. Anschließend wurde die Suspension 7 min bei 4°C und 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt. Je nach Organ wurde mit unterschiedlichen Mengen an PBS resuspendiert und 50µl unverdünnt bzw. 1:4 auf verdünnt jeweils LB, MacConkey sowie LB-Ampicillin ausplattiert. Nach 16-18 Stunden Inkubation im Brutschrank konnte durch Auszählen der Kolonien die Bakterienanzahl pro mg Organ bestimmt werden.

GFP-E.coli

Mit Einmalösen wurde von denen bei -80°C gelagerten Bakterien (E.coli GFP K12 – MG 1655 pM979 Ampicillin und Streptomycin resistent) ein Drei-Ösen-Ausstrich auf einer LB Platte mit 100µg/ml Ampicillin/LB zur Gewinnung von Einzelkolonien durchgeführt. Die Platte wurde für 16-18 Stunden bei 37°C inkubiert. Von den entstandenen Einzelkolonien wurde eine mit einer Einmalöse aufgenommen und in einen Falcon mit 50ml LB Medium, versetzt mit 100µl Ampicillin, eingepft. Der Falcon wurde im Schüttler für 16-18 Stunden bei 37°C inkubiert.

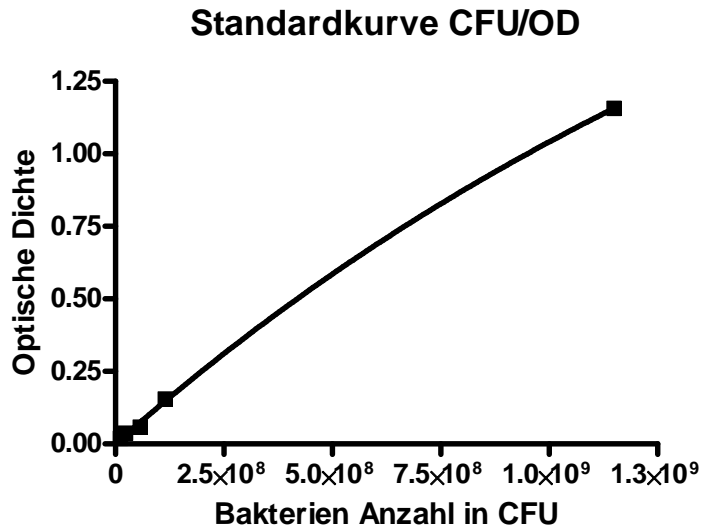


Abbildung 12: Standardkurve GFP-E.coli

Für die Translokationsversuche sollte jede Maus 10^9 Bakterien oral verabreicht bekommen. Zur Bestimmung der Konzentration und des benötigten Volumens wurde eine Standardkurve erstellt, die das Verhalten der optischen Dichte des Mediums zu der absoluten Zahl der Bakterien in Lösung zeigt. Hierfür wurden verschiedene Verdünnungen photometrisch gemessen sowie auf Agarplatten (LB-Ampicillin) ausplattiert und ausgezählt. Unter Verwendung dieser Standardkurve konnte aus der gemessenen optischen Dichte des Mediums die Konzentration der Bakterien errechnet werden. Zur Messung wurden jeweils 2 ml des inkubierten Mediums und 2 ml einer Leerwertkontrolle (reines LB Medium) sowie gegebenenfalls verschiedener Verdünnungen in Einmalküvetten pipettiert. Diese wurden nach Einstellung des Leerwertes drei Mal gemessen. Aus dem arithmetischen Mittel der drei Messwerte wurden die bakterielle Konzentration und das benötigte Volumen für 10^9 Bakterien errechnet.

16S-rRNA-Gen-basierte Identifikation bakterieller Kolonien im Faeces

Zur Untersuchung der qualitativen und quantitativen Veränderungen der Darmflora bedienen wir uns einer weiteren Methode: der Analyse genomischer DNA mittels 16S-rRNA-Sequenzierung. Diese Methodik wurde in den 1970er Jahren von Carl Woese beschrieben [152, 153]. Anhand dieser können die im Stuhl enthaltenen Bakterien bezüglich ihrer Klasse (Taxonomie) und ihres Stammes unterschieden werden. Die Analysen wurden in Bezug auf die durch den Ökologen Robert Whittaker geprägten Begriffe α - und β -Diversität (Vielfalt)

durchgeführt. α -Diversität ist ein Maß für die Artenvielfalt eines Lebensraumes, beschreibt also in unserem Fall die Anzahl der vorkommenden Arten des intestinalen Traktes einer Maus desselben Genotyps und kann demnach zum Vergleich über die Zeit desselben herangezogen werden. Die β -Diversität hingegen beschreibt den Vergleich der Artenvielfalt verschiedener Lebensräume miteinander, kann also genutzt werden um Faeces von Mäusen verschiedenen Genotyps zu analysieren. Die genomische DNA wurde mittels Kit aus frisch-gesammelten Faeces Proben von 3 und 9 Wochen alten Col4 α 3^{-/-} Mäusen und Kontrolltieren extrahiert. Die gesuchten variablen Genregionen der 16S rRNA wurden wie beschrieben mittels PCR amplifiziert [154] und anschließend analysiert [155]. Die beschriebene β -Diversität wurde mittels UniFrac Analyse durchgeführt. Diese ermöglicht das Vergleichen der Quantität (*weighted UniFrac*) und Qualität (*unweighted UniFrac*) der Bakterien verschiedener Proben [156]. Die Analysen wurden in Kooperation mit dem mikrobiologischen Labor von Frau Prof. Dr. Bärbel Stecher durchgeführt, die Sequenzierung und statistische Analyse der Daten erfolgte in Kooperation mit Prof. Dr. Huson vom Institut für Bioinformatik der Universität Tübingen.

2.2.3. Kolorimetrische Assays

Kreatinin

Zur Quantifizierung der Niereninsuffizienz der Mäuse benutzten wir den Albumin/Kreatinin Quotienten im Urin, um den renalen Verlust von Proteinen anhand des Albumins zu zeigen. Bei dem aus dem Muskel stammende Kreatinin handelt es sich um ein Abfallprodukt, das glomerulär filtriert wird. Der im Serum gemessene Kreatininspiegel wird zur Abschätzung der GFR herangezogen. Erhöhte Werte sprechen dabei für eine verminderte glomeruläre Filtration und somit eine eingeschränkte Nierenfunktion. Um eine valide Aussage über die Quantität des renalen Proteinverlustes treffen zu können, kann anstelle des aufwändigen 24-Stunden-Sammelurins die Albuminkonzentration im Urin in Relation zur Kreatininkonzentration berechnet werden. Somit werden störende Verdünnungseffekte eliminiert. Die Kreatininmenge im Urin der Versuchstiere wurde dabei mittels eines kolorimetrischen Assays im Urin bestimmt. Zur Bestimmung wurde ein kommerziell erhältliches Kit von DiaSys verwendet, welches mit der kinetischen Jaffé-Methode arbeitet. Das Funktionsprinzip der Methode macht sich die Tatsache zu Nutzen, dass Kreatinin in alkalischer Lösung mit Pikrinsäure einen Farbkomplex von orangeroter Farbe bildet. Die hierbei entstehende

Farbänderung, die sich proportional zur Kreatininkonzentration verhält, wird durch das zweimalige Bestimmen der Extinktion spektrophotometrisch im Abstand von einer Minute gemessen.

Die Proben wurden nach den Angaben im Kit aufbereitet, die Substratreaktion mit denen im Kit vorhandenen Reagenzien (Reagenz 1: Natriumhydroxid und Reagenz 2: Pikrinsäure) eingeleitet und im Abstand von einer Minute zwei Messungen der Extinktion durchgeführt. Anhand der Farbänderung im definierten Zeitintervall wurden die Konzentrationen mittels Standardkurve und folgender Formel errechnet:

$$C_{Krea} [mg/dl] = \frac{\Delta E Probe - \Delta E Leerwert}{\Delta E Standard - \Delta E Leerwert} \times C_{Krea-Standard} [mg/dl]$$

Harnstoff

Harnstoff (oder Urea) ist neben Kreatinin ein wichtiger Marker in der Diagnostik der Niereninsuffizienz. Er entsteht als Abbauprodukt aus dem Proteinstoffwechsel im Harnstoffzyklus und kann anschließend durch die Nieren ausgeschieden werden. Zur Messung der Harnstoffkonzentration im Serum der Versuchstiere wurde ebenfalls ein kolorimetrisches Assay verwendet. Hierbei wird durch die im Kit enthaltene Urease, Harnstoff in Ammonium und CO₂ gespalten, welches in alkalischer Lösung mit einem Chromogen zu einer blaugrünlischen Lösung reagiert. Analog zur Kreatinin-Bestimmung wird über die Farbänderung und mithilfe einer Standardkurve die gesuchte Konzentration ermittelt. Das Kit wurde entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

Limulus-Amebocyte-Lysate

Bei diesem Assay wird auf das Vorhandensein von bakteriellem Endotoxin in der zu untersuchenden Probe getestet. Endotoxin, ein Produkt gram-negativer Bakterien, wird mittels Limulus-Amebocyte-Lysate (LAL) detektiert, welches aus dem Blut von Pfeilschwanzkrebse gewonnen wird (Limulus). Durch das Hinzugeben von LAL zu einer Endotoxin-haltigen Probe wird das enzymatische Abspalten von p-nitrandine getriggert, was einen Umschlag der Lösung ins Gelbe sowie eine Koagulation bewirkt [157]. Nachdem die

Reaktion mittels Ethansäure gestoppt wurde, kann die Adsorption bei 405nm spektrophotometrisch gemessen werden. Die Messungen wurden anhand der im Kit beschriebenen Anleitung mit Plasma der Mäuse durchgeführt. Insbesondere wurde auf ein Endotoxin-freies Milieu geachtet und nur Endotoxin-freies Wasser und speziell Endotoxin-freie Pipettenspitzen verwendet. Die Konzentrationen wurden analog zu den bisherigen Assays, durch Anlegen einer Verdünnungsreihe für eine Standardkurve, errechnet.

Peptidoglykan

SLP (Silkworm larvae plasma) detektiert sowohl Peptidoglykan, ein Bestandteil bakterieller Zellwände, als auch 1,3- β -D-glucan, ein Baustein vieler Zellwände von Pilzen und Hefen. Das Testprinzip beruht auf der Produktion von Melanin, welches durch die Aktivierung der Prophenol-Oxidase durch die Reaktion von Peptidoglykan mit dem SLP-Reagent hervorgerufen wird. In vivo dient dies der Seidenraupe als Verteidigungsmechanismus [158]. Die Durchführung des Tests erfolgte streng nach Herstellerangaben. Die Auswertung der Messungen, die alle 60 sec über 90min bei 650nm im ELISA Reader durchgeführt wurden, erfolgte ebenfalls gemäß den Richtlinien des Protokolls. Hierfür wurde die sogenannte „onset-Time“ benötigt, also der Zeitpunkt, bei dem die Farbänderung linear zur Zeit verläuft. Mit dieser wurde in Bezug auf eine logarithmische Standardkurve die gesuchte Konzentration ermittelt (Abbildung 13).

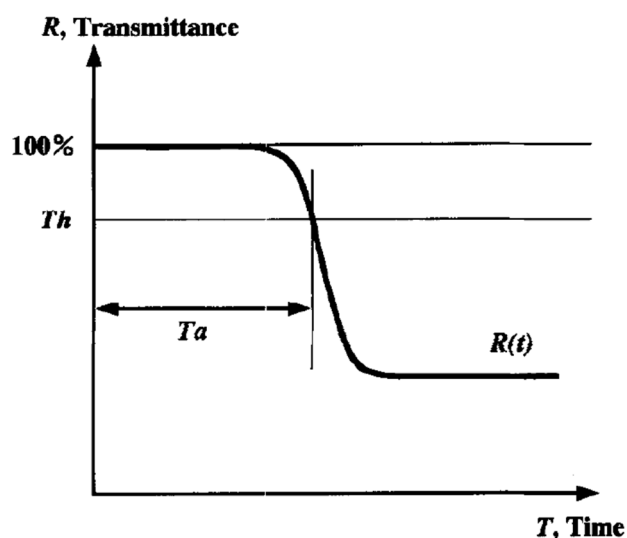


Abbildung 13: Onset time SLP nach [158]

2.2.4. Immunologische Methoden (ELISA und Durchflusszytometrie)

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Analyse der Proteinmengen in Urin, Faeces und intestinalem Mukus wurde eine immunologische Nachweismethode verwendet: der ELISA. Das Prinzip des ELISAs beruht auf dem Nachweis des gesuchten Antigens (z.B. des Proteins) mit Hilfe eines Antikörper und einer enzymatisch getriggerten Farbreaktion. In dieser Arbeit kommt das Prinzip eines sogenannten Sandwich-ELISAs zur Anwendung [159]. Zunächst wird auf eine 96-well-Microtiterplatte der Antikörper gegen das gesuchte Antigen aufgetragen. Dieser bindet an die Oberfläche der Platte. Nach Blockade aller unspezifisch-bindenden Antikörper, werden die zu untersuchenden Proben aufgetragen und es bilden sich Antigen-Antikörper-Komplexe. Nun wird ein zweiter Antikörper hinzugefügt, der spezifisch an den Antigen-Antikörper-Komplex bindet. An diesen zweiten Antikörper (detection-antibody) ist ein Enzym gekoppelt, das bei Vorhandensein seines Substrates einen Farbumschlag triggert. Nachdem durch Waschen der Platte alle ungebundenen Antikörper samt Enzym entfernt wurden, kann das Substrat hinzugefügt werden, welches von dem gebundenen Enzym Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) umgesetzt wird und dadurch zu einem Farbumschlag führt. Die Reaktion wird anschließend mit Schwefelsäure (H₂SO₄) gestoppt und der Farbumschlag kann photometrisch gemessen werden. Dieser ist dabei proportional zu der Menge des an den zweiten Antikörper gebundenen Enzyms, welches der Menge der Antigen-Antikörper-Komplexen entspricht. Mit Hilfe von einer Verdünnungsreihe einer bekannten Standardkonzentration kann durch die gemessene Absorption die absolute Antigenmenge in den gewünschten Proben errechnet werden.

Muriner Albumin ELISA

Die Konzentrationsmessungen des Albumins in Urin und Faeces der Mäuse führten wir mit einem ELISA-Kits gemäß den Herstellerangaben durch. Dabei unterschieden sich lediglich die verwendeten Standardkonzentrationen sowie die Probenaufbereitung für Urin und Faeces. Die Albuminkonzentrationen dienten hierbei wie bereits oben aufgeführt zur Bestimmung des Albumin-Kreatinin-Quotienten und so zur Bestimmung des Ausmaßes der glomerulären Schädigung. Im Falle der fäkalen Albuminkonzentration stellte sich die Frage eines Verlustes von Albumin über die Darmbarriere als Zeichen einer erhöhten Permeabilität.

Urin

Zur Bestimmung der optimalen Verdünnungen wurde der Urin zunächst unter Zuhilfenahme eines chromatographischen-Nachweis-Stix untersucht. Je nach zu erwartender Proteinmenge wurden danach die Verdünnungen hergestellt. Die Mikrotiterplatte wurde mit Antikörpern der Ziege gegen Mausalbumin beschichtet und 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden überschüssige Antikörper abgewaschen und eine Blockierlösung aufgetragen. Alle unspezifisch bindenden Antikörper wurden mit dem darin enthaltenen BSA (bovine serum Albumin) blockiert und konnten später die Ergebnisse nicht verfälschen. Nach erneutem Waschvorgang wurden jeweils gleiche Mengen der Proben bzw. Standardkonzentrationen aufgetragen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Vor dem Auftragen des zweiten Antikörpers, an den das Enzym (HRP) gekoppelt ist, wurde die Platte erneut gründlich gewaschen. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur und erneutem Waschvorgang wurde TMB (Tetramethylbenzidin, ein Chromogen) hinzugegeben, welches von der HRP enzymatisch gespalten wird und zu einem blauen Farbumschlag führt. Sobald in der Standardverdünnungsreihe eine Progredienz des Farbumschlages von hohen zu niedrigen Konzentrationen sichtbar wurde, wurde die Reaktion mit Schwefelsäure gestoppt, was zu einem Farbwechsel ins Gelbe führte. Im Anschluss wurde die Absorption der Proben, des Standards und eines Leerwertes bei 492nm in einem Microplatereader gemessen. Die Absorptionen der Verdünnungsreihe wurden auf einer Standardkurve gegen die entsprechenden Konzentrationen aufgetragen und die unbekannte Albuminmenge der Proben aus ihren jeweiligen Extinktionswerten berechnet.

Faeces

Der Faeces wurde zur Erstellung einer geeigneten Suspension mit Hilfe eines Sonicators in 0,5ml PBS zerkleinert. Futterreste und grobe Rückstände wurden anschließend durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 3500rpm und 4°C von der Lösung getrennt. Der Überstand wurde partikelfrei abgenommen und zur Weiterverwendung verdünnt. Der Ablauf des ELISAs entspricht ab diesem Punkt dem oben beschriebenen Albumin-ELISA.

Muriner sIgA ELISA

Zur Evaluation der lokalen Entzündungsvorgänge im Dünndarm bestimmten wir unter Verwendung eines ELISAs die Menge des sekretorischen IgAs im intestinalen Mukus. Hierzu

wurde ein ein-Zentimeter langes Stück des terminalen Ileums entnommen und in eine mit 300µl PBS befüllte sterile Petrischale gelegt, wo es mit je 150µl drei Mal von jeder Seite durchspült wurde, um die im Mukus enthaltenen Bestandteile zu lösen. Die 300µl wurden 20 min. bei 1000g zentrifugiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Dies wurde, ebenso wie der folgende Versuch, nach denen im Kit enthaltenen Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei war die enthaltene Platte bereits vorab mit einem coating-antibody versehen worden, sodass als erster Schritt die aufbereiteten Proben aufgetragen wurden. Im Gegensatz zu dem oben beschriebenen ELISA ist bei diesem die HRP nicht direkt an den zweiten Antikörper gebunden. Hier wurde, unter Einhaltung der Vorschriften des Kits bezüglich Waschen und Inkubieren (37°C) der Platten, zunächst ein detection-antibody hinzugegeben, der über eine konjugierte Bindung mit einem Biotin Molekül verbunden war. An dieses konnte dann in einem nächsten Schritt ein Avidin-Molekül binden, das die für die Farbreaktion benötigte HRP gebunden hatte. Diese Bindungsmethode wird auch ABC-Methode genannt (Avidin-Biotin-Complex). Von dem entstandenen Komplex konnte das zugegebene TMB-Substrat proportional zur vorhandenen IgA Menge umgesetzt werden. Unmittelbar nach dem Stoppen der Reaktion mit Schwefelsäure wurde die Absorption bei 450nm spektrophotometrisch gemessen und die IgA Menge der Proben korrespondierend zu den anderen ELISAs bestimmt.

Serum Amyloid P /Pentraxin-2 ELISA

Zur Bestimmung der systemischen Entzündungsaktivität wurde die Menge des Pentraxin-2 eines Glykoproteins bestimmt, welches ebenfalls als Serum Amyloid P bekannt ist. Dabei handelt es sich um ein akut-Phase-Protein, das murine Äquivalent zum C-reaktiven-Protein des Menschen. Der Versuch wurde nach den Herstellerangaben des verwendeten Kits durchgeführt. Im Kit war, wie im oben beschriebenen IgA-ELISA, eine bereits mit einem *coating-antibody* versehene Platte enthalten. Zur Durchführung wurden Endotoxin-freie Pipettenspitzen und Eppendorf-Kölbchen verwendet. Nach mehreren Waschschritten, ähnlich der beschriebenen Protokolle, wurde die Extinktion bei 450nm gemessen. Die Proben wurden wie vom Hersteller beschrieben aufbereitet, als Dubletten pipettiert und bei teilweise hämolytischem Plasma, Leerwertkontrollen der Eigenadsorption durchgeführt. Diese Werte wurden dann, sofern vom eigentlichen Leerwert abweichend, von den gemessenen Extinktionen abgezogen. Anhand einer Standardkurve wurden die gesuchten PTX-2 Konzentrationen ermittelt.

Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie analysiert alle in einer Suspension befindlichen Zellen und kann diese gemäß verschiedener Kriterien unterscheiden und in einem Graphen optisch aufbereitet sortieren. Hierbei kann das Durchflusszytometer nicht nur zwischen Größe und Granularität der jeweiligen Zelle differenzieren, sondern auch, wenn zuvor markiert, anhand von oberflächlichen oder intrazellulären, fluoreszierenden Zielstrukturen. Die in der Suspension befindlichen Zellen werden von dem Durchflusszytometer eingesogen und einzeln durch eine Kapillare geschickt. Dieses Prinzip, wofür der laminare Strom der die Zellen umgebenden Flüssigkeit benötigt wird, nennt sich hydrodynamische Fokussierung. Um die Zellen entsprechend Größe und Granularität zu sortieren, werden diese, wenn sie sich in der Kapillare befinden, mit Laserlicht beschossen. Korrespondieren zu den Eigenschaften der Zelle entstehen verschiedene Beugungs- und Streumuster des Laserlichtes, die als Forward Scatter (Größe) und Sideward Scatter (Granularität) detektiert werden. Neben dieser nativen Differenzierung zwischen den einzelnen Zellen können diese zudem mittels Markierung unterschiedlicher Zielstrukturen sowohl an der Zelloberfläche als auch im Zellinnern unterschieden werden. Hierbei werden für die Zielstruktur spezifische Antikörper mit einem Farbstoff markiert, der, wenn mit dem Laserlicht beschossen, selbst eine Lichtemission aussendet. Diese kann wiederum von Detektoren des Gerätes erfasst werden. In dem hier verwendeten Gerät können parallel 4 verschiedene Farbmarkierungen erkannt und analysiert werden. Dementsprechend können vier zusätzliche Zielstrukturen adressiert und die Zellpopulation anhand dieser optisch sortiert werden, sofern sie mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden[160-162].

Für die hier vorliegende Arbeit wurden Milzzellen, Leberzellen, Nierenzellen und Dünndarmleukozyten untersucht. Die für die Durchflusszytometrie verwendeten Teile von Milz, Leber und Nieren wurden dabei gleich aufbereitet. Für die Dünndarmleukozyten wurde ein eigenes Protokoll verwendet [163].

Isolation von Milz-, Leber- und Nierenzellen

Um die Organzellen in Einzelzellsuspension zu bringen, wurden diese zunächst mithilfe eines Spritzenstempels durch einen 70µm Filter passiert. Dieses geschah unter Spülen mit PBS in einen 50ml Falcon. Nun erfolgte die weitere Aufbereitung der Zellen, die mehrere Waschschriffe mit PBS, Pelletieren durch Zentrifugation sowie ein Lysieren der roten

Blutkörperchen mit Lysepuffer beinhalten. Im Anschluss wurden die Zellen durch einen weiteren, diesmal 30µm Filter passiert und nach erneutem Zentrifugieren und Verwerfen des Überstandes in 2-5ml FACS-Puffer (*fluorescence activated cell sorting*) resuspendiert.

Isolation von Dünndarmleukozyten

Die Isolation folgte streng den Angaben des Protokolls von Sheridan et al. [163]. Vereinfacht wurden folgende Schritte durchgeführt: Zur Aufbereitung der Zellen musste der Darm zunächst von Faeces gereinigt werden und anhaftendes Fett und Mediastinum entfernt werden. Dazu wurden die Darmabschnitte gespült und anschließend auf einem mit CMF befeuchtetes Papier präpariert, um ein Austrocknen des Darmes zu verhindern. Anschließend wurden die Darmstücke mit 30ml CMF (4°C) gespült und mit DTE bei 37°C schüttelnd inkubiert. Der Überstand, der neben Epithelzellen auch intraepitheliale Leukozyten enthält, wurde über einen 70µm Filter prozessiert, pelletiert und in 1 ml *harvest medium* resuspendiert. Die Darmstücke wurden nun zweimal mit 6,5ml EDTA Lösung bei 37°C für 30 min schüttelnd inkubiert, der Überstand jeweils verworfen und im Anschluss die EDTA-Lösung mit *harvest medium* (14ml, 5 min, 37°C, Schüttelinkubation) entfernt. Nachdem das *harvest medium* entfernt und die Kollagenase-Lösung frisch zubereitet und auf 37°C erhitzt worden war, wurden die Darmabschnitte darin mit je 8,5ml bei 37°C für 30min schüttelnd inkubiert. Erst jetzt wurden die Darmstücke in Lösung über einen 70µm Filter mit Hilfe eines Spritzenstempels zerkleinert und mit *harvest medium* in einen 50ml Falcon gespült. Diese Lösung wurde nun mit dem zuvor isolierten Überstand, die intraepithelialen Leukozyten enthaltend, vermengt und gemeinsam pelletiert. Nach zweimaligem Waschen und pelletieren (4°C, 150000rpm, 7min) wurden die Zellen in 1ml FACS Puffer resuspendiert.

Färbungen und T-Zell-Stimulation

Vor der Analyse wurden pro geplante Färbung je 100µl der Einzelzellsuspensionen in einen FACS-Tube pipettiert. Bei extrazellulären Färbungen konnten nun die zugehörigen Antikörper in ihrer jeweiligen Konzentration, nach Herstellerangaben einfach hinzugefügt und für 40-60min bei 4°C inkubiert werden. An einen letzten Waschschrift und erneute Resuspension der Pellets mit FACS-Puffer schloss sich die Analyse an. Im Falle von intrazellulären Färbungen, wie FoxP3 und IL-17, folgten auf die extrazellulären Färbungsschritte eine Fixation sowie eine Permeabilisation der Zellmembran mit dem Cytifix/Cytoperm Kit.

Tabelle 13: Gesuchte Zelltypen und ihre Antikörperkombinationen

Färbung	Gesuchte Zellpopulation	Gefärbte Organe	FITC	PE	Percp	APC
A	Aktivierte T-Zellen	Darm und Milz	CD3	CD69	CD8	CD4
A (2)	T-Zellen	Niere	CD3	CD45	CD8	CD4
B	Regulatorische T-zellen	Darm, Milz, Niere	CD3	FOXP3	CD25	CD4
C	Aktivierte dendritische Zellen	Darm, Milz, Niere, Leber	Ly6C	CD11c		CD11b
D	Aktivierte Makrophagen	Darm, Milz, Niere	CD86	CD11c		F4/80
E	Neutrophile und Monozyten	Darm, Milz, Niere	Ly6G	7/4 (Ly6B)		
F	TH-17 und TH-1 Zellen	Darm, Milz, Niere	CD3	IFN- γ	CD4	IL17

Zur Charakterisierung der T-Zellen wurden Co-Färbungen bestehend aus CD3, CD4, CD8, CD69 bzw. CD3, CD4, CD8, CD45 für T-Helferzellen, zytotoxische Zellen und deren Aktivierungsstatus (CD69) verwendet. Entsprechend ergaben sich für T-Helferzellen (CD3+CD4+), regulatorische T-Zellen (CD3+CD4+CD25+FoxP3+), Th1-Zellen (CD3+CD4+ IFN γ +), Th17-Zellen (CD3+CD4+IL17+), zytotoxische T-Zellen (CD3+CD8+), autoreaktive T Zellen (CD3+CD4-CD8-) die in Klammern angegebenen Muster. Aktivierte Makrophagen und dendritische Zellen wurden über Co-Färbungen aus F4/80, CD86, CD11b, CD11c und Ly6C ermittelt. Neutrophile und Monozyten aus Ly6G und Ly6B(7/4)

Anschließend konnten die Zellen mit den jeweiligen Antikörpern inkubiert werden. An einen Waschschrift mit folgender Resuspension konnte sich auch hier die Analyse anschließen. Für die T-Zell-Stimulation wurden die Zellsuspensionen mit PBS bei 37°C für 4,5 Stunden mit PMA (50ng/ml) und Ionomycin (1 μ g/ml) inkubiert, bevor die entsprechenden Färbungen erfolgten. Eine Übersicht über die verwendeten Färbungen bietet Tabelle 13.

2.2.5. Molekularbiologische Methoden (RNA Isolation, cDNA Herstellung und real-time PCR)

RNA Isolation und Quantifizierung durch Spektrometrie

Die Organproben zur RNA Gewinnung wurden nach Entnahme in RNAlater bei -20°C bis zu ihrer Verwendung konserviert. Zur Isolation von RNS wurde das *Ambion Pure-Link RNA Mini* – Kit verwendet und die Arbeitsschritte gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Für diese Arbeit wurde RNS aus Leber, Milz und Darm isoliert. Nach Auftauen der Proben wurden diese je nach Organ und Probenmenge in 500 μ l bis 2ml Lyse-Puffer (10 μ l/ml) transferiert und mittels eines elektrischen Homogenisators zerkleinert. Dieser wurde zwischen den einzelnen Proben mit 70%-Alkohol und destilliertem Wasser gereinigt. Hiernach wurde das Homogenisat zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und im Verhältnis 1:1 mit 70% Ethanol durch Vortexen gemischt. Anschließend wurde die Lösung (maximal 700 μ l pro Schritt) auf die aus dem Kit stammenden Säulen pipettiert und über diese prozessiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, sofern mehr als 700 μ l vorhanden waren. Das Zentrifugat wurde dabei jeweils verworfen, da sich die zu isolierende RNA zu diesem Zeitpunkt auf der Säule befand. Nun

erfolgten mehrere Waschschritte mit denen im Kit enthaltenen Waschpuffern, wobei der Waschpuffer jeweils über die Säule zentrifugiert wurde, ebenso wie die Inkubation der Probe mit DNase (80µl pro Probe). Dieser Schritt ist besonders bei den verwendeten Darmanteilen wichtig, um eine Kontamination mit beispielsweise bakterieller DNA zu verhindern. Anschließend wurden die Säulen, ohne sie erneut mit Flüssigkeit zu beladen, zum Trocknen zentrifugiert, um die Proben später nicht zu verdünnen. Im letzten Schritt wurde die an die Säulenmembran gebundene RNA mit 35µl RNase freiem Wasser für eine Minute darin gelöst und dann durch Zentrifugation in einem neuen, im Kit gelieferten Röhrchen, aufgefangen. Die so erhaltenen Proben wurden auf Eis gelagert und vor der Weiterverarbeitung die Reinheit (260nm/280nm) und die Konzentration mittels einer Spectrophotometer (Nano Drop-1000) gemessen.

Reverse Transkription der mRNA zu cDNA

Zur Quantifizierung der RNA, um Rückschlüsse auf Expressionslevel bestimmter Gene ziehen zu können, muss diese zunächst in eine stabilere und besser zu analysierende Form gebracht werden. Hierbei schreibt man die isolierte RNA in eine entsprechende komplementäre DNA, kurz cDNA (*complementary DNA*), um. Je nach Organ und Fragstellung wurden hierbei zwischen 0,5 und 2µg RNA umgeschrieben. Dazu wurde aus der Konzentration die zu pipettierende Menge errechnet und auf die gewünschte (z.B. 2µg/20µl) Konzentration verdünnt. Diese Verdünnung wurde anschließend zunächst zur Linearisierung der Stränge bei 65°C für 5 Minuten und dann zusammen mit einem *Mastermix* (8µl 5x-Puffer, 0,8µl 25mM dNTPs, 2µl 0,1M DTT, 0,5µl linearem Acrylamid (15µl/ml), 0,43µl Hexanucleotiden, 1µl RNAsin (40U/µl) und 0,87 µl SuperScript II RT) für 90 Minuten bei 42° C schüttelnd inkubiert. Um die Reaktion zu beenden, wird anschließend das Gemisch für 5min bei 85°C inkubiert und so die RT denaturiert. Als Kontrolle wurde zudem jede RNA-Probe mit H₂O anstelle der reversen Transkriptase inkubiert und anschließend in der qPCR mitgemessen, um eine vorangegangene Verunreinigung durch anderweitige DNA auszuschließen. Diese Ansätze werden RT- genannt.

Real-time PCR

Die *real-time* PCR oder auch q(quantitative)PCR ist eine Methode, um das Expressionslevel bestimmter Gene eines Zielgewebes zu detektieren. In dieser Arbeit konnte so später ein Vergleich zwischen den verschiedenen Genotypen und ihren Versuchsuntergruppen gezogen

werden. Um eine Quantifizierung zu ermöglichen, wird mit einem sich an doppelsträngige-DNA anlagernden, fluoreszierenden Farbstoff (SYBR Green) gearbeitet. Parallel zu der ablaufenden PCR, bei der sich das gewünschte Produkt exponentiell vervielfältigt, steigen also auch die Emissionen, die von ebendiesem Farbstoff ausgehen, welche sich proportional zur Menge des Primerproduktes verhalten. Die Anzahl der Zyklen, die benötigt werden, bis ein Schwellenwert (*cycle threshold*, ct) überschritten wird, wird mittels logarithmischer Skalierung dazu verwendet, auf die in der Probe enthaltene cDNA-Menge eines gesuchten Genes zu schließen. Um zu verhindern, dass unterschiedliche Ausgangsmengen der gesamten cDNA der Probe zu falschen Rückschlüssen führen, werden zusätzlich sogenannte *housekeeping*- oder *reference*-Gene, in dieser Arbeit 18S ribosomale RNA, als Kontrolle eingesetzt. In Relation zu deren, in jeder Zelle eines Organes konstanter, Expression wurden die gesuchten Expressionslevel bestimmt. Zu 10 µl SYBR-Green- Master-Mix (10 ml bestehend aus: 1,21ml H₂O, 2ml Taq-Puffer (10x), 2,4ml 25mM MgCl₂, 150µl 25mM dNTPs, 4ml PCR Optimizer, 200µl BSA (20mg/ml), 40µl SYBR Green) wurden je 0,6µl der, vorher 1:10 verdünnten, Vorwärts- (*forward*) und Rückwärtsprimer (*reverse*), 0,16µl der Taq-Polymerase, 6,64µl A.d. und 2µl Probe (ebenfalls 1:10 mit DEPC-H₂O verdünnt, um Ribonukleasen zu deaktivieren) pipettiert. Als Negativkontrolle wurde sowohl anstelle des *Master-Mixes* Wasser pipettiert als auch neben den RT+ Proben, RT- Proben (s.o.) verwendet. Alle Proben wurden stets im Doppel in eine spezielle 96-Kammer-PCR-Platte pipettiert, welche anschließend mit einer Folie luftdicht verschlossen und bei 4°C zwei Minuten mit 280 rcf zentrifugiert wurde, um sicherzustellen, dass bei solch kleinen Mengen der gesamte Reaktionsansatz am Boden der Platte zu liegen kam. Im Anschluss konnte die qPCR mit dem Roche LightCycler® 480 mit folgenden Reaktionsschritten durchgeführt werden: Präinkubation bei 95° C für 5 Minuten, dann iterativ 15 Sekunden 95° C, gefolgt von 45 Sekunden 65° C, bei 40 Wiederholungen. Zum Abschluss erfolgte die Schmelzkurvenanalyse, indem erneut eine fünfminütige Inkubation bei 95° C gefolgt von einer konstanten Temperaturerhöhung von 65° C auf 95° C durchgeführt wurde. Ct-Werte wurden verwendet, wenn sie den 35. Zyklus nicht überschritten und außerdem die RT- und Wasser-Proben kein Signal zeigten. Zudem erfolgte die Analyse der *Melting-Peaks*, bezüglich der Spezifität der Primer für das zu amplifizierende Gen. Alle Schritte wurden nach den MIQE-Richtlinien für qPCR durchgeführt [164].

2.2.6. Histopathologische Untersuchungen (Licht- und Elektronenmikroskopie)

Lichtmikroskopie

Zur Evaluation des Nierenschadens, aber auch zur Veranschaulichung und Bestätigung der in der Durchflusszytometrie gewonnenen Ergebnisse wurden histologische und immunhistochemische Färbungen von Nieren, Milz, Darm und Leber durchgeführt. Dazu wurden die Organe in Histologiekassetten in einer Mischung aus Formalin und PBS über Nacht eingelegt, um am nächsten Tag in Paraffin eingebettet zu werden. Anschließend wurden mit dem Kryomikrotom 2 µm dicke Schnitte angefertigt und diese auf Ammoniumpersulfat-beschichteten Objektträgern (12 h, 37° C) getrocknet. Darmabschnitte wurden aufrecht eingebettet, um die Schnitte senkrecht zur Zirkumferenz anfertigen zu können. Die getrockneten Schnitte wurden mit Xylol behandelt, das noch enthaltene Paraffin wurde mit einer absteigender Alkoholreihe entfernt. Diese Nativschnitte konnten nun ihrer jeweiligen Färbung zugeführt werden.

Periodsäure Schiff Färbung (PAS)

Die PAS Färbung diente einerseits der Visualisierung der geschädigten Nieren der Col4α3 -/- Mäuse gegenüber gesunder Kontrolltiere. Des Weiteren ließ sie eine Übersicht über das Gesamtbild anderer Organe zu, die immunhistochemisch gefärbt wurden. Dabei wurden die Schnitte gemäß Herstellerangaben zunächst mit Perjodsäure-Lösung (4g Perjodsäure auf 200ml destilliertes Wasser) und nach einer Spülung mit Schiff'schem Reagenz inkubiert. An eine Gegenfärbung schloss sich ein kurzes Xylolbad und die Eindeckelung des Präparates an (Pertex).

Immunhistochemische Färbungen: Leukozyten

Sowohl in der Niere, der Milz als auch im Darm wurden verschiedene Färbungen zur Darstellung der Immunreaktion ausgewählt. Dabei wurde für T-Zellen ein CD3-Antikörper (Ratten-Anti- CD3-AK, 1:50), für Neutrophile ein Ly6B-Antikörper (Ratten-Anti-Maus-Neutrophilen-Ak ,1:50) und für Makrophagen ein F4/80-Antikörper (Ratten-Anti-F4/80-Ak, 1:50) verwendet.

Immunhistochemische Färbungen: tight junctions

Die Untersuchung der Darmbarriere wurde auf histologischer Ebene mittels Färbungen der Zellkontakte durchgeführt. Dafür wurden zwei Schlüssel-Proteine des *tight junction* Komplexes ausgewählt: Occludin (Hase-Anti-occludin 1:50) und ZO-1 (zonula occludens 1, Ziege anti-ZO-1 1:200). Zur Färbung wurden die Schnitte nach Entparaffinierung zunächst in eine Wasserstoffperoxid-Methanol-Lösung (1:1) zur endogenen Peroxidase-Blockierung für 20min eingelegt. An einen Waschschrift mit PBS, eine Antigen-Demaskierung (Vectashield™-Lösung) und die Blockade unspezifischer Bindungen mittels Avitin und Biotin schloss sich dann jeweils nach Herstellerangaben die Inkubation mit dem jeweiligen Primär- und Sekundärantikörper an. Daraufhin wurden die Schnitte noch gegengefärbt (Methylgrün) sowie analog zur PAS Färbung entwässert und eingedeckelt.

Transmissionselektronenmikroskopie

Mit der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), einem mikroskopisches Verfahren, das bereits 1932 beschrieben wurde [165], können kleinste Strukturen von Objekten mit Hilfe von Elektronenstrahlen begutachtet werden. In dieser Arbeit dient sie der Betrachtung der Darmzellwände der Mäuse, insbesondere der interzellulären Verbindungen, den *tight junctions*. Die ausgewählten Darmfragmente wurden hierzu zunächst in 6,25% Glutaraldehyd bei 4°C fixiert und bis zur weiteren Aufbereitung für die TEM gelagert. Zur Weiterverarbeitung wurden die Proben nun zunächst mit Saccharosepuffer und destilliertem Wasser gewaschen, anschließend für 2 Stunden in 2% Osmiumlösung fixiert, mit 50% Aceton gespült und dann über eine aufsteigende Acetonreihe (70-90-100%) einer Aceton/EPON Lösung zugeführt, um dann von purer EPON-Lösung schlussendlich in Gelatine kapseln eingebracht zu werden. Die Autopolymerisierung erfolgte bei 60°C über Nacht. Die Schnitte wurden mit dem Mikrotom zunächst als Semidünnschnitte (1µm) zur Auswahl eines geeigneten Gewebeareales, später mit dem Ultramikrotom als Ultradünnschnitte angefertigt. Sie wurden nach Einlagerung in gesättigter Uranylacetat-/Methanollösung (70%) mit Bleicitratlösung (5min) kontrastiert und waren nach erneutem Spülen und Lufttrocknung bereit für die Begutachtung. Die TEM-Schnitte wurden in Kooperation mit Frau PD Dr. Susanna Müller vom Pathologischen Institut der LMU angefertigt und ausgewerte

2.2.7. Zellkulturexperimente und funktionelle Analysen mittels ECIS

ECIS® Funktionsprinzip

Für in vitro Testungen bezüglich Auswirkungen der Urämie auf das intestinale Darmepithel wurden Messungen mit ECIS® durchgeführt. ECIS steht für *electric cell substrate impedance sensing* und ist eine Methode die Integrität der Barriere einer Zellpopulation zu beurteilen, indem sie die Impedanz in Echtzeit über selbige misst. Bei ECIS werden die Zellen direkt auf kleine Elektroden einer dem Gerät zugehörigen 8-Kammer-Platte gesät. Über diese Elektroden wird dann ein Wechselstrom (I) gesendet und das Potential (V) also die Spannung (U) gemessen, so erhält man nach dem Ohm'schen Gesetz die Impedanz (Z) der Darmepithelzellen, diese entspricht dem Widerstand (R) bei Verwendung von Wechselstrom statt Gleichstrom [166].

$$R = \frac{U}{I} \quad \rightarrow \quad Z = \frac{V}{I}$$

Zellkultur, Zellzählung, Versuchsaufbau

In dieser Arbeit wurden murine colon-26 Zellen von Eppenheim als Modell für das einschichtige Darmepithel ausgewählt. Diese wurden in RPMI Glutamax Medium mit 10% dialysiertem FCS gezüchtet, um spätere Interferenzen bezüglich der Intervention mit dem Serum der Mäuse zu vermeiden. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage. Das Lösen zum Splitten, Weiterverwenden für ECIS oder Einfrieren der Zellen erfolgte mit Accutase (2,5ml für 5min). Die Zellen wurden unter Zuhilfenahme der Neubauer-Zählkammer gezählt und 1x10⁶ Zellen/1ml dialysiertem FCS mit 10% DMSO in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die ECIS Experimente wurden pro Kammer 600.000 Zellen benötigt. Zum Messen standen zeitgleich zwei 8-Kammer-Platten zur Verfügung, von denen in je 7 Kammern Zellen gesät wurden. Eine Kammer blieb jeweils als Kontrolle frei von Zellen. Vor dem Aussähen der Zellen wurden die Kammern für 10min mit Cystein und danach über Nacht mit 0,01% Kollagen (Typ 1) gecoated. Anschließend wurden die 600.000 Zellen in 400µl Medium in die Kammern gegeben und für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte zunächst ein vorsichtiger Mediumwechsel,

um die inzwischen adhärennten Zellen nicht wieder zu lösen, bei dem anstelle der 400µl, 360µl Medium zurückgegeben wurden, um später die Intervention zu ermöglichen.

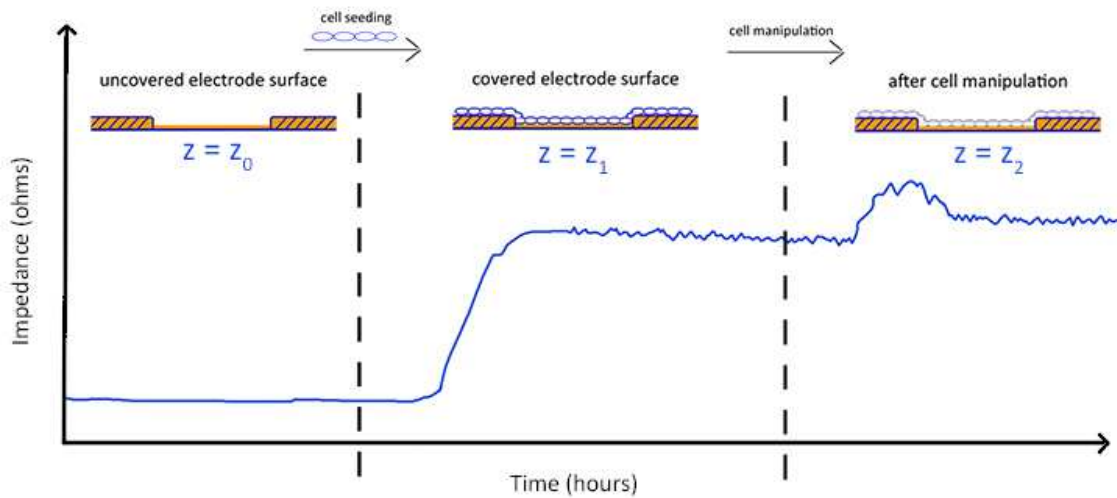


Abbildung 14: Funktionsprinzip von ECIS: Die Impedanz kann sowohl über die Zeit als auch nach Interventionen konstant gemessen werden [166]

Nun erfolgte der Anschluss der Platten an das ECIS Gerät, ein Frequenztest sowie eine einstündige Vormessung. Nur Kammern, die in diesem Zeitraum eine stabile Impedanzmessung zeigten, wurden später für die Testung verwendet. Nach einer Stunde erfolgte die Intervention mit 40µl Serum von Wildtyp oder Col4α3 -/- Mäusen. Die Auswirkungen der Intervention wurden als Impedanzänderung für weitere 18 Stunden gemessen. Die Bedienung des Messgerätes sowie die Ausführung der Intervention führte ich zusammen mit Jana Demleitner durch (PhD Studentin des Walter Straub Institutes für Pharmakologie und Toxikologie der LMU München).

2.2.8. Statistische Methoden

Die in dieser Arbeit als Ergebnisse präsentierten Daten stellen graphisch das arithmetische Mittel der jeweiligen Genotypen und ihrer Versuchsgruppen mit zugehöriger Standardabweichung als \pm SEM (*standard error of the mean*) dar. Zur Berechnung der statistischen Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen wurden sowohl der zweiseitige t-test als auch der Mann-Whitney U Test verwendet. Beim Vergleich mehrerer Gruppen wurde der ANOVA-Test herangezogen. Die Testungen wurden sowohl mit Microsoft Excel 2010 und 2013 als auch mit Graphpad Prism 5 durchgeführt. Das Signifikanzniveau wird dabei wie folgt dargestellt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3. ERGEBNISSE

3.1. Uräme *Col4α3*^{-/-} Mäuse zeigen systemische Entzündung sowohl auf zellulärer als auf humoraler Ebene

Zur Bestimmung der systemischen Entzündungsaktivität bei urämen *Col4α3*^{-/-} Mäusen wurden auf zellulärer Ebene Milz, Leber, Nieren und Dünndarm mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Ergebnisse wurden zudem teilweise durch immunhistologische Färbungen der jeweiligen Organe bestätigt. Die Untersuchung der Milz, als lymphatisches Organ, diente dabei als Spiegel für die systemische Entzündungsreaktion [167]. Hierbei zeigten sich signifikant vermehrt aktivierte CD4 und CD8 positive T-Lymphozyten, Aktivierungsmarker CD69 (Abbildung 15-A-B), sowie INF γ produzierende TH1 und IL-17 produzierende TH17 Zellen. Im Gegensatz dazu war die Anzahl der regulatorischen (FOXP3 positiven) T-Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollen vermindert (15-C). Darüber hinaus zeigte sich eine Erhöhung der Zahl der CD11b⁺ und Ly6B⁺ dendritischen Zellen und Makrophagen sowie der aktivierten CD11c positiven Antigen-präsentierenden-Zellen mit dem Aktivierungsmarker CD86 (15-E-F). Diese Ergebnisse ließen sich auch histologisch bestätigen (siehe Abbildung 16).

Die humorale Immunantwort wurde neben der Bestimmung des SAPs im Serum zudem auf Transkriptionsebene durch die Untersuchung der RNA-Expressionslevel verschiedener Zytokine der Leber durch qPCR untersucht. Auch hier zeigten sich erhöhte Spiegel des akuten-Phase-Proteins: SAP/PTX2 war sowohl im Serum als auch auf Transkriptionsebene erhöht (siehe Abbildung 17).

Gemeinsam weisen die in den Abbildungen 15-17 dargestellten Veränderungen darauf hin, dass, wie bereits beim Menschen bekannt, chronische Niereninsuffizienz bei urämen *Col4α3*^{-/-} Mäusen mit systemischer Entzündung assoziiert ist.

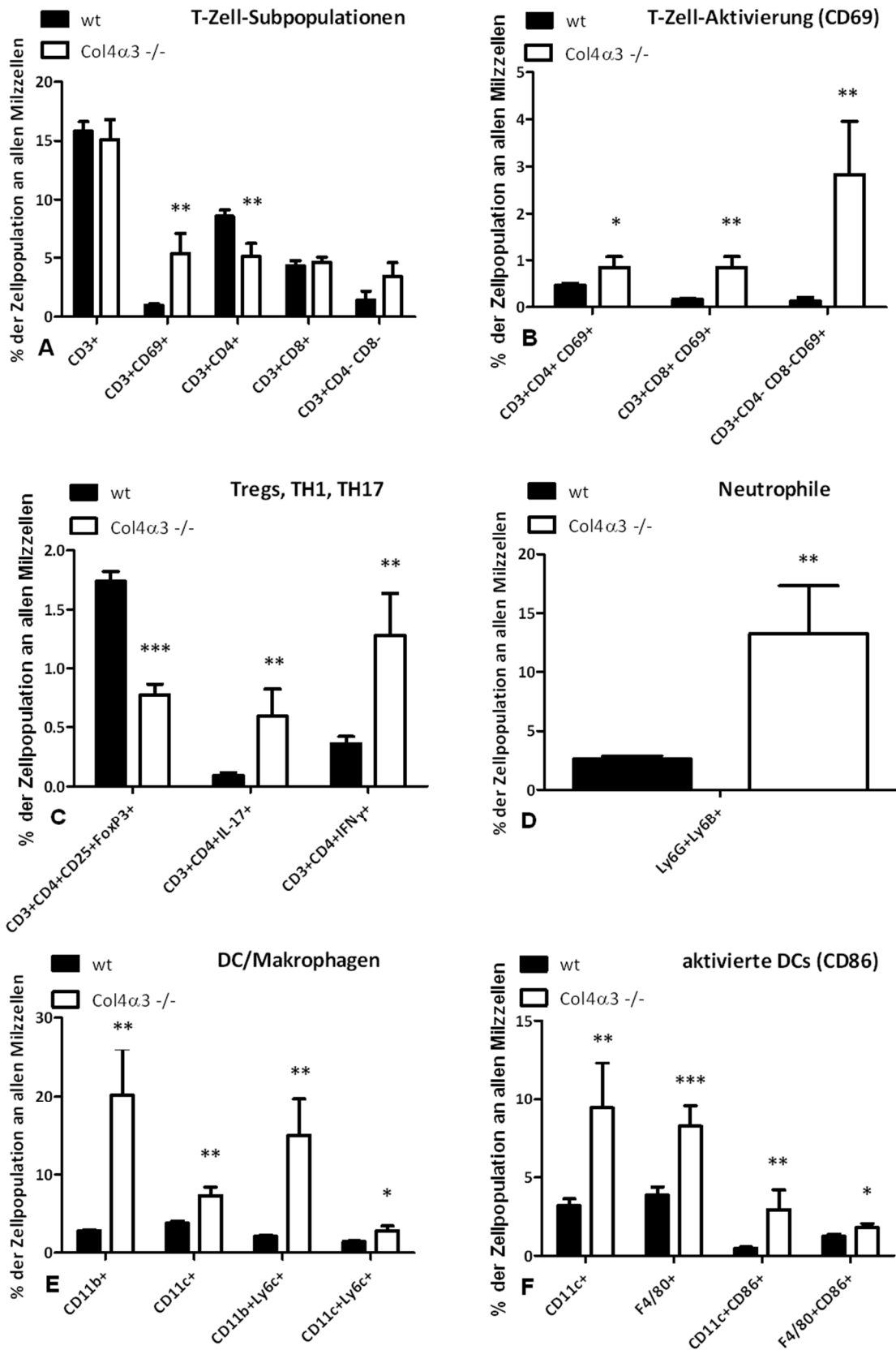


Abbildung 15: Immunphänotypisierung *Col4α3*^{-/-} Mäuse mittels Durchflusszytometrie. F: APC= antigenpräsentierende Zellen; (F4/80: Makrophagen, CD11c: DCs). Jeweils 9 Wochen alte Mäuse, n=5; *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; p-Wert aus t-Test in Bezug zu *Col4α3*^{+/+} Tieren.

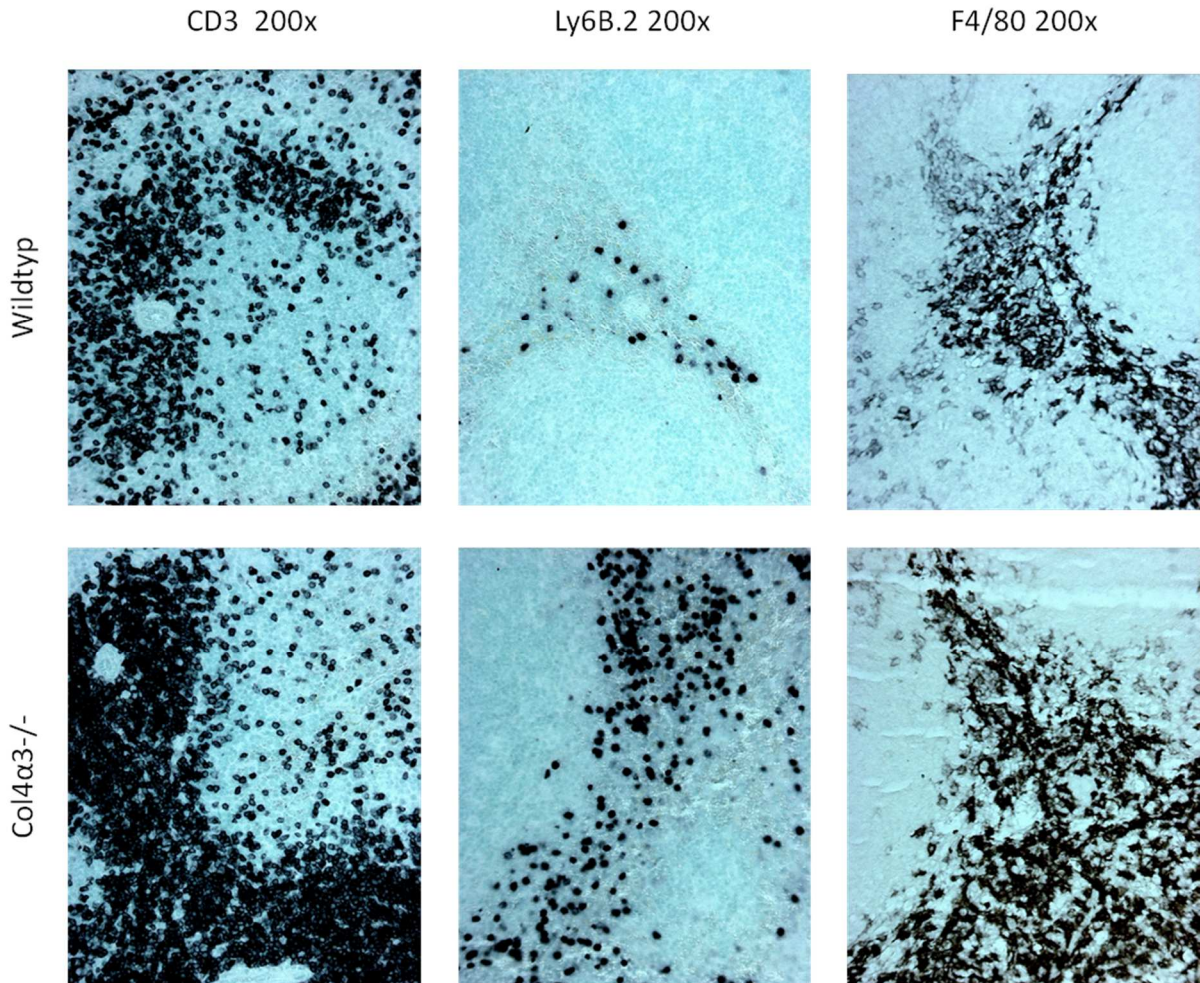


Abbildung 16: Systemische Entzündung in *Col4α3*^{-/-} Mäusen. Anschaulich gemacht durch immunohistochemische Färbungen der Milz (9 Wochen alt) CD3: T-Zellen; Ly6B.2: Neutrophile; F4/80: Makrophagen.

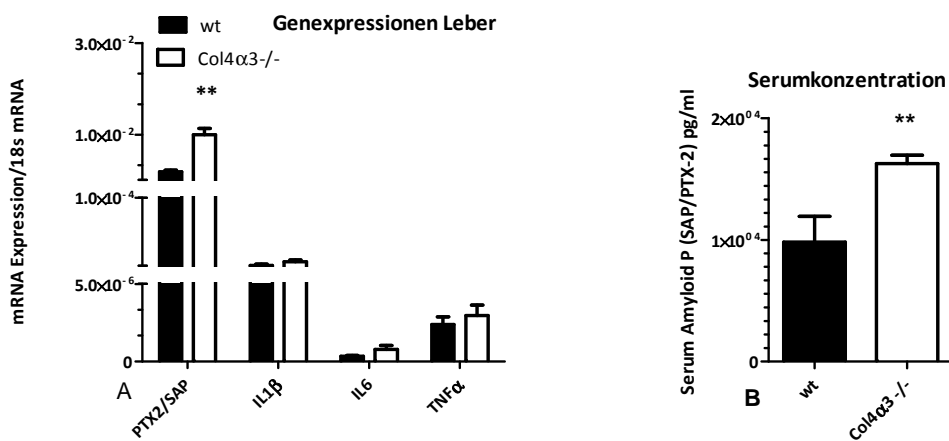


Abbildung 17: Humorale Immunantwort bei *Col4α3*^{-/-} Mäusen: A: mRNA Expressionslevel verschiedener pro-entzündlicher Zytokine. SAP= Serum Amyloid P, IL= Interleukin, TNF= Tumornekrosefaktor; B: Serumkonzentration von SAP/PTX-2. Jeweils 9 Wochen alte Mäuse, n=5; *=p<0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001; p-Wert aus t-Test in Bezug zu *Col4α3*^{+/+} Tieren.

Um vor einer Intervention den *status quo* der renalen Entzündung zu bestimmen, wurden ebenfalls durchflusszytometrische Untersuchungen der Nierenzellen durchgeführt. Im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren zeigten die *Col4a3*^{-/-} Mäuse erhöhte CD3 und CD45 positive T-Lymphozyten, TH17 und regulatorische T-Zellen. Zudem waren CD11b und CD11c positive Antigen-präsentierende-Zellen und aktivierte F4/80 positive Makrophagen (Aktivierungsmarker CD86) sowie Ly6G und 7/4 (Ly6B) positive Neutrophile signifikant vermehrt. Dies ließ sich auch an angefertigten immunhistologischen Schnitten bestätigen. Insgesamt konnten also die für das Alport-Syndrom typischen Leukozyteninfiltrationen auch in diesen *Col4a3*^{-/-} Mäusen nachgewiesen werden.

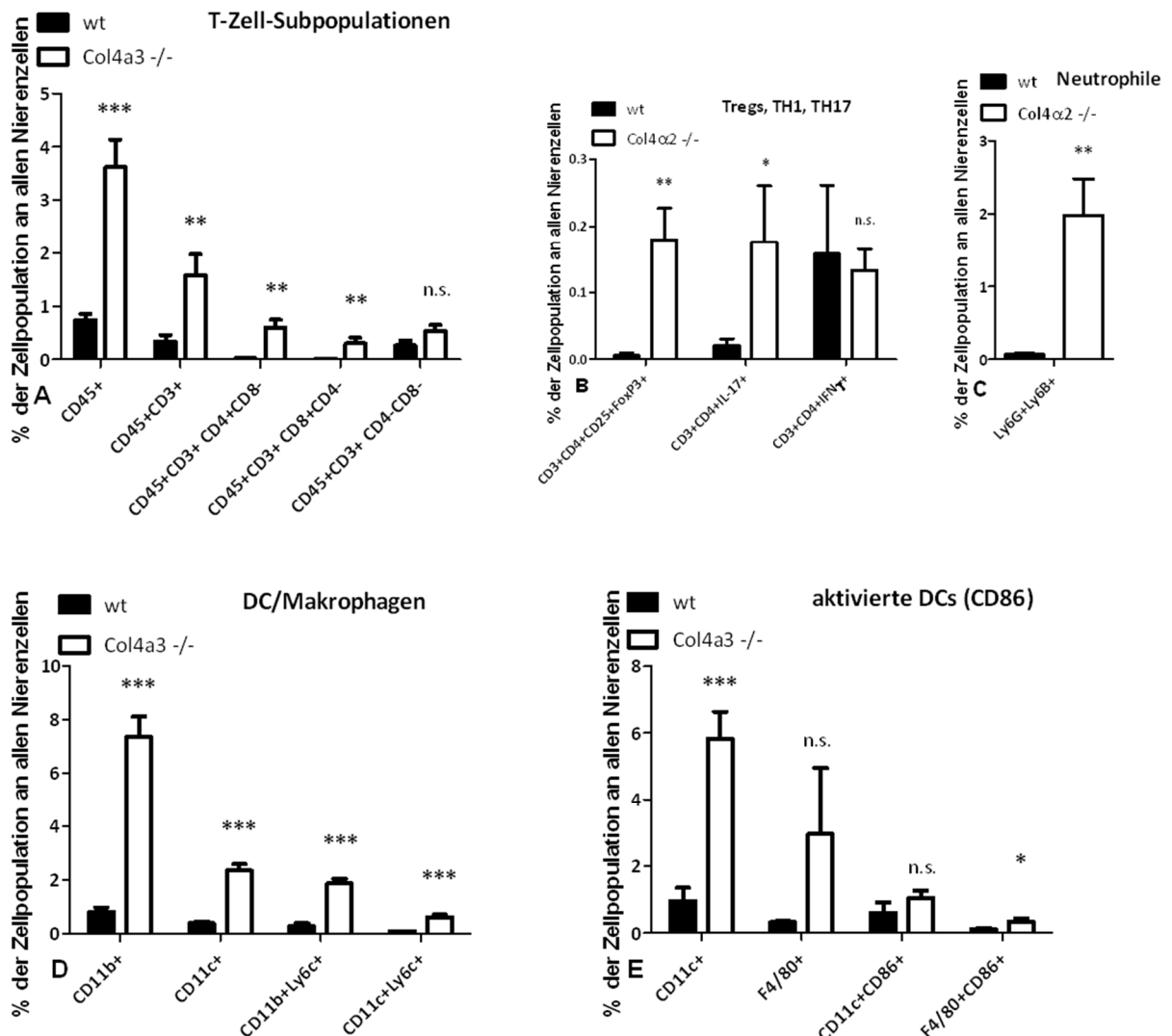


Abbildung 18: Leukozyteninfiltration in den Nieren *Col4a3*^{-/-} Mäuse: Ergebnisse der Durchflusszytometrie von Nierenzellen. E: APC = antigenpräsentierende Zellen, CD11c Marker für dendritische Zellen, F4/80 Marker für Makrophagen, CD86 Aktivierungsmarker. Jeweils 9 Wochen alte Mäuse, Wildtyp: n=5; *Col4a3*^{-/-}: n=3 *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; p-Wert aus t-Test in Bezug zu *Col4a3*^{+/+} Tieren

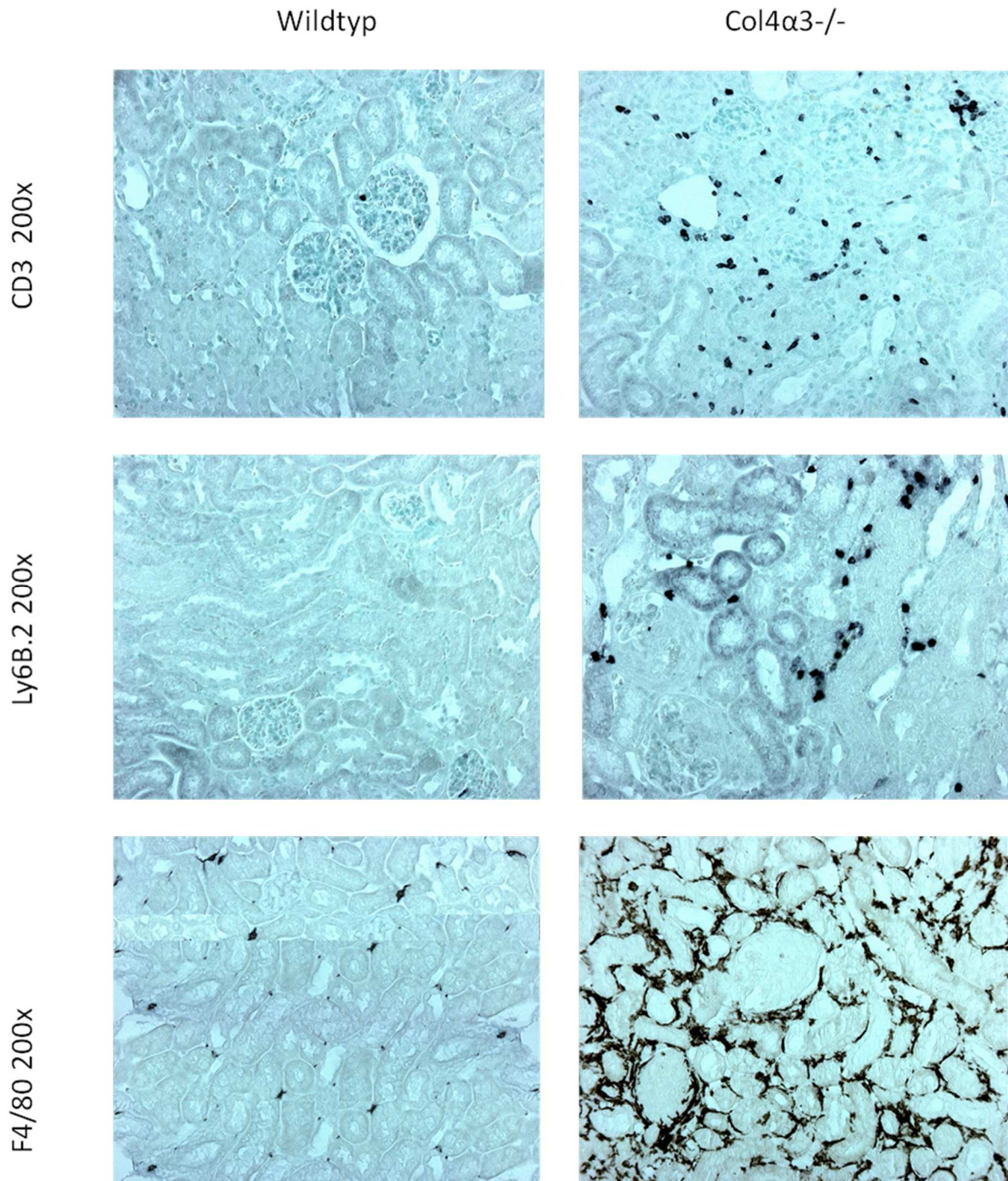


Abbildung 19: Leukozyteninfiltration in den Nieren Col4 α 3^{-/-} Mäuse (2): Immunhistologische Bilder zur Veranschaulichung der lokalen Entzündungsaktivität in den Nieren Col4 α 3^{-/-} Mäuse im Vergleich zu gesunden Kontrollen. 9 Wochen alte Tiere; Färbungen mit CD3 für T-Zellen; Ly6B.2 für Neutrophile; F4/80 für Makrophagen

3.2. Chronische Niereninsuffizienz bei *Col4α3*^{-/-} Mäusen ist mit qualitativer und quantitativer Dysbiose assoziiert

Als Grundlage für eine mögliche Verbindung zwischen der bereits beschriebenen systemischen Entzündung bei der chronischen Niereninsuffizienz und einer Dysbiose in diesem Modell, wurden in *Col4α3*^{-/-} Mäusen beide Phänomene zunächst nebeneinander untersucht. Die chronische Niereninsuffizienz wurde hierbei anhand von Serumharnstoffwerten, Proteinurie (Albumin/Kreatinin-Quotient) und GFR über den Krankheitsverlauf klassifiziert. Zudem wurden die Nieren histologisch (PAS-Färbung) untersucht. Hierbei zeigte sich die Progredienz der Erkrankung, sowohl an steigenden Harnstoffwerten im Serum (Abbildung 20-A), steigender Proteinmengen im Urin (B) und fallenden GFR-Werten (C). Im Vergleich zu gesunden Kontrollen waren diese Werte stets signifikant. Auch in den histologischen Untersuchungen ließen sich, verglichen mit den Wildtyp-Tieren, sklerotische Glomeruli sowie tubuläre Schäden nachweisen (D).

Um sowohl qualitative als auch quantitative Veränderung der intestinalen Mikrobiota untersuchen zu können und so eine Dysbiose festzustellen, wurden CFUs auf nicht-selektiven und selektiven Nährböden ausgezählt. Die dabei ermittelten Werte wurden jeweils in Relation zur untersuchten Stuhlmenge gesetzt. Es zeigte sich eine signifikante quantitative Dysbiose der *Col4α3*^{-/-} Mäuse bei fortschreitender Erkrankung (Abbildung 21).

Des Weiteren wurden Sequenzanalysen der im Stuhl enthaltenen bakteriellen 16S-rRNA durchgeführt. Hierbei wurden sowohl α - als auch β -Diversität in 3- und 9 Wochen alten Tieren betrachtet. Bezüglich der α -Diversität zeigte sich lediglich eine Tendenz hinsichtlich einer größeren Variabilität von bakteriellen Spezies beim Vergleich von 3- und 9-Wochen alten *Col4α3*^{-/-} Mäusen, jedoch keine Unterschiede zu gesunden Kontrollen. Bei der Untersuchung der β -Diversität zeigten sich signifikante Unterschiede bezüglich der unterschiedlichen mikrobiellen Populationen in *Col4α3*^{-/-} Mäusen und Wildtyp-Tieren. 9 Wochen alte uräme Tiere zeigten erhöhte Zahlen an *Alcaligenaceae*- β -*Proteobacteria*, *Verrucomicrobiaceae*, *Bacteroidetes*-*Bacteroidaceae*, *Bacteroidetes*-*Porphyromonadaceae* und signifikant niedrigere Zahlen bezüglich der Familie der *Bacteroidetes*-*Bacteroidales* verglichen mit gesunden Kontrollen (Abbildung 22). Zusammenfassend ist also die in diesem Mausmodell für Urämie auftretende Entzündung mit einer qualitativen und quantitativen Dysbiose assoziiert.

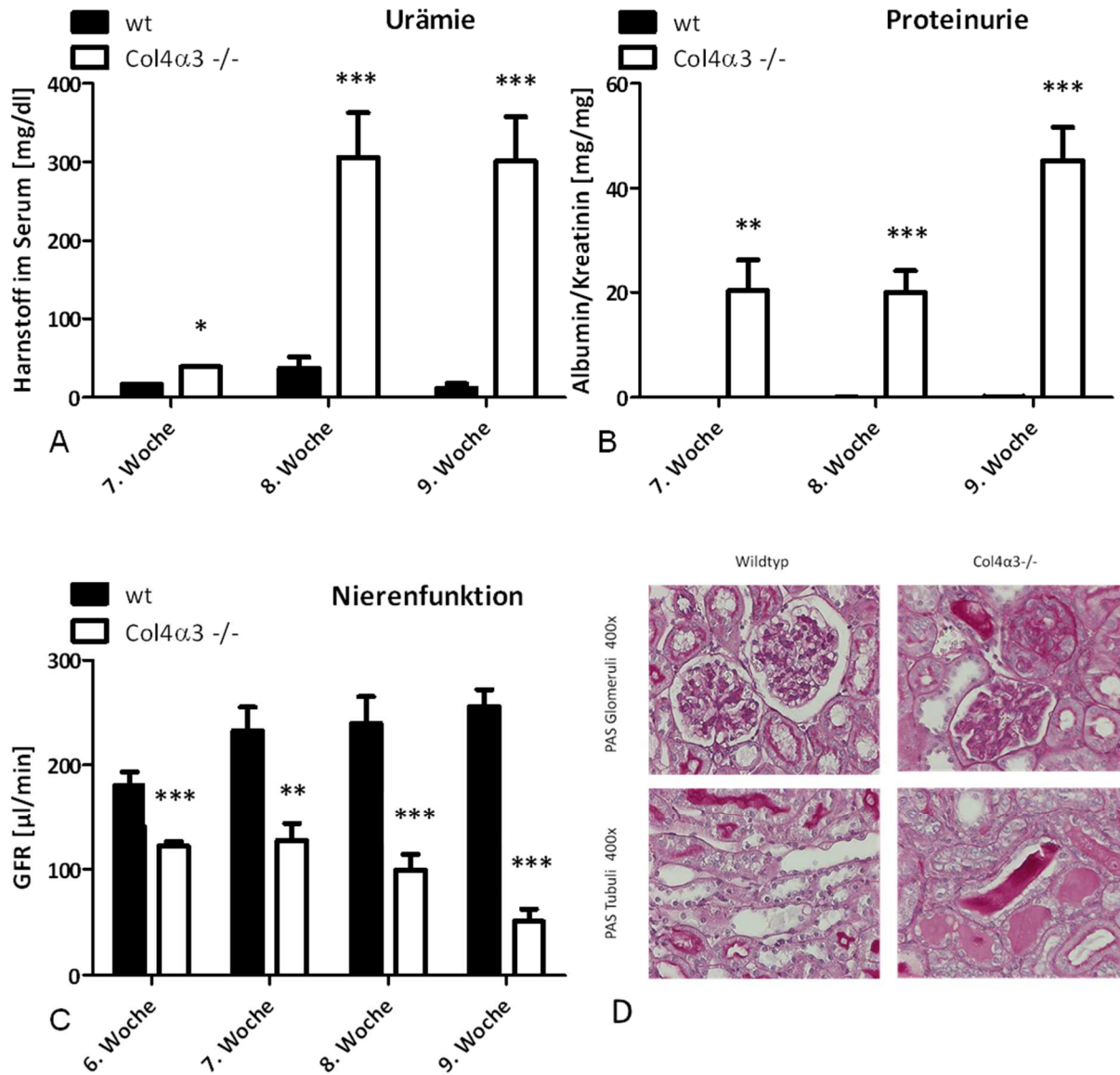


Abbildung 20: Chronische Niereninsuffizienz in *Col4α3*^{-/-} Mäusen: A-C: Nierenfunktionsparameter im Zeitverlauf. A: Serumharnstoffwerte steigen über die Zeit. B: Progrediente Proteinurie gemessen am Albumin/Kreatinin-Ratio. C: GFR= Glomeruläre Filtrationsrate, Abnahme über die Zeit. 6-9 Wochen alte Tiere, n=5; *=p<0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001; p-Wert aus t-Test in Bezug zu *Col4α3*^{+/+} Tieren. D: PAS Färbung der Nieren 9 Wochen alter *Col4α3*^{-/-} und gesunder Mäuse als Anschauungsbeispiel für den glomerulären und tubulären Schaden. Zu sehen ist eine Glomerulosklerose sowie Veränderungen der Tubuli mit kaum noch erkennbarem Lumen.

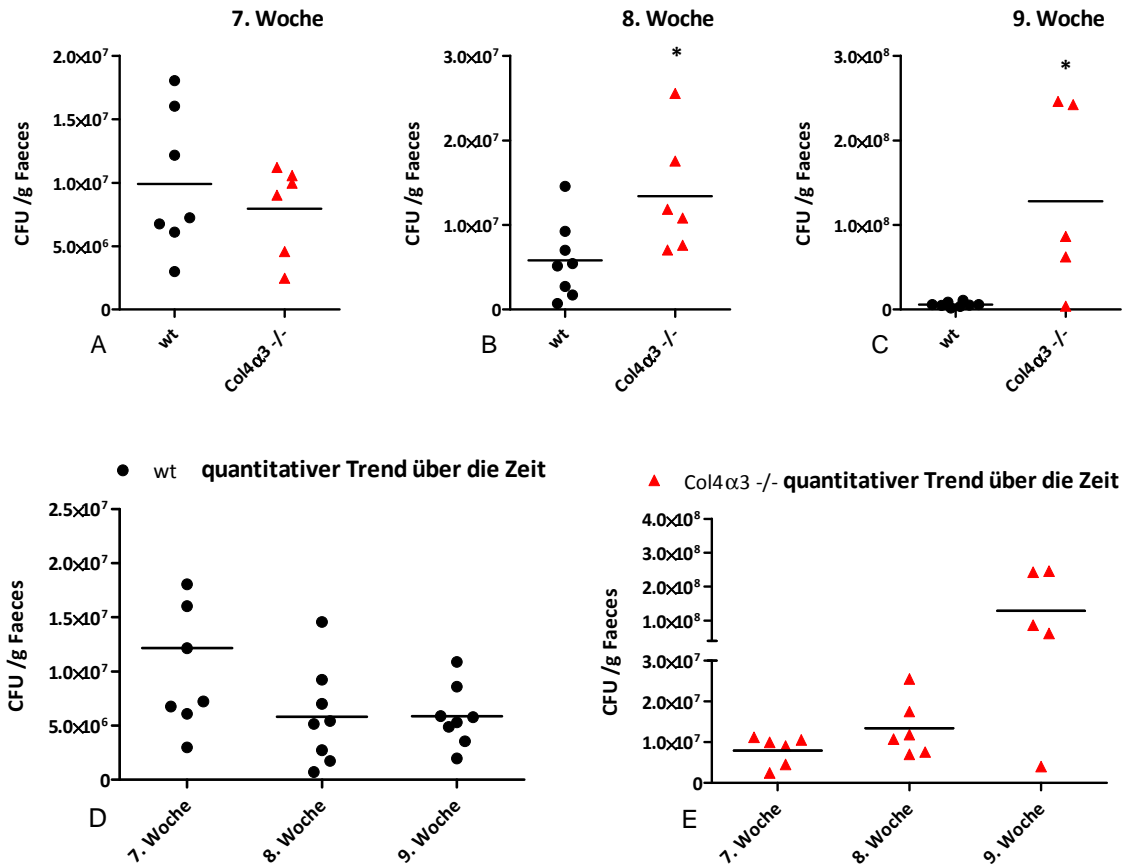


Abbildung 21: Quantitative Dysbiose bei *Col4α3-/-* Mäusen: A-C Entwicklung einer quantitativen Dysbiose der urämen Tiere im Vergleich zu gesunden Kontrollen. D-E: Trend der CFUs über die Zeit gemäß Genotyp. 6-9 Wochen alt, n=5; *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; p-Wert aus t-Test in Bezug zu *Col4α3+/+* Tieren.

16S-rRNA Faeces Sequenzierung

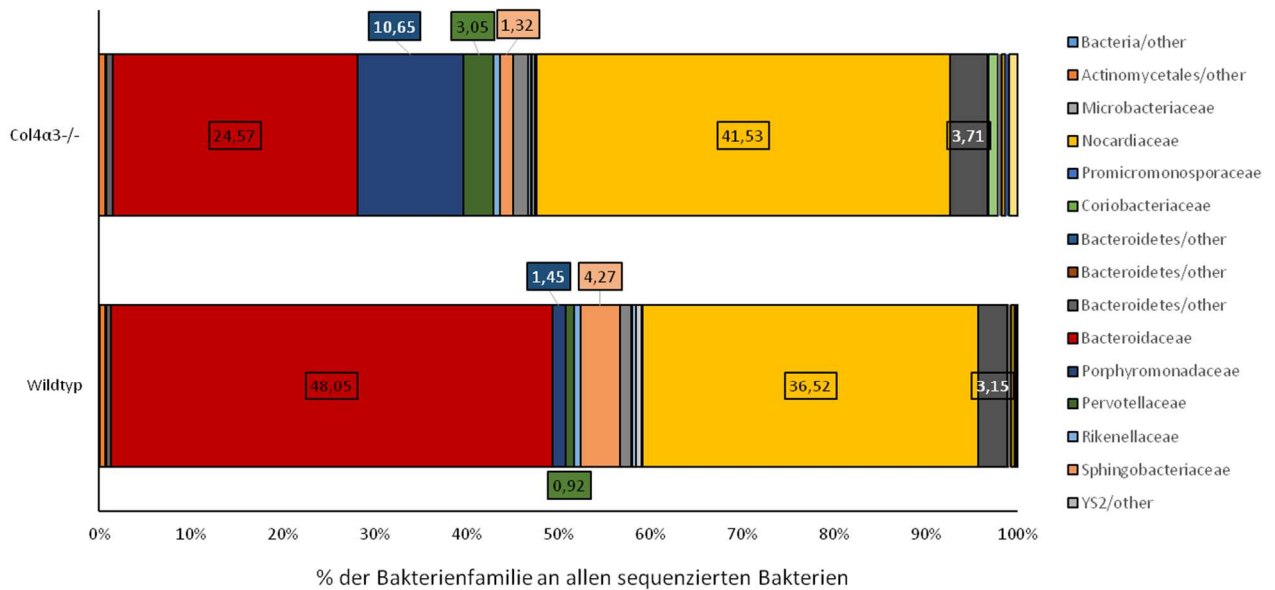


Abbildung 22: Qualitative Dysbiose bei *Col4α3-/-* Mäusen: Verteilung der unterschiedlichen bakteriellen Phyla im Faeces von 9 Wochen alten urämen Tieren und gesunden Kontrollen. Gemessen mit 16S-rRNA Sequenzierung. n=5; *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; p-Wert aus t-Test in Bezug zu *Col4α3+/+* Tieren

3.3. Neutrophileninfiltration und erhöhte Produktion von sekretorischem IgA belegen eine lokalisierte Entzündungsreaktion im Dünndarm

Neben der Analyse von Milz und Nieren wurden auch durchflusszytometrische und immunhistologische Untersuchungen der Leukozyten des Dünndarmes durchgeführt. Dies diente der Evaluation der lokalen Entzündungsantwort der mukosaständigen weißen Blutzellen. Bezüglich der Lymphozyten zeigten sich neben einer vereinzelt Subpopulation CD3+CD8+ Zellen keine weiteren signifikanten Veränderungen (Tabelle 14). Jedoch lag eine Neutrophileninfiltration (signifikant vermehrte Ly6G und Ly6B positive Zellen) bei *Col4α3*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu gesunden Kontrollen vor (Abbildung 23-B). Zudem waren die für die Immunantwort wichtigen APCs und Makrophagen (CD11c und F4/80 positiv) signifikant vermehrt in chronisch niereninsuffizienten Tieren (A).

Zur weiteren Betrachtung der lokalen Immunaktivität im Darm untersuchten wir die Menge des sekretorischen IgAs im intestinalen Mukus. Dieses wird auf der intestinalen Seite von dort ansässigen B Zellen produziert und über die Darmepithelien ins Lumen sekretiert. Hierbei zeigten sich erhöhte luminale sIgA Konzentrationen in *Col4α3*^{-/-} Mäusen verglichen mit gesunden Wildtyp-Tieren (Abbildung 24-B).

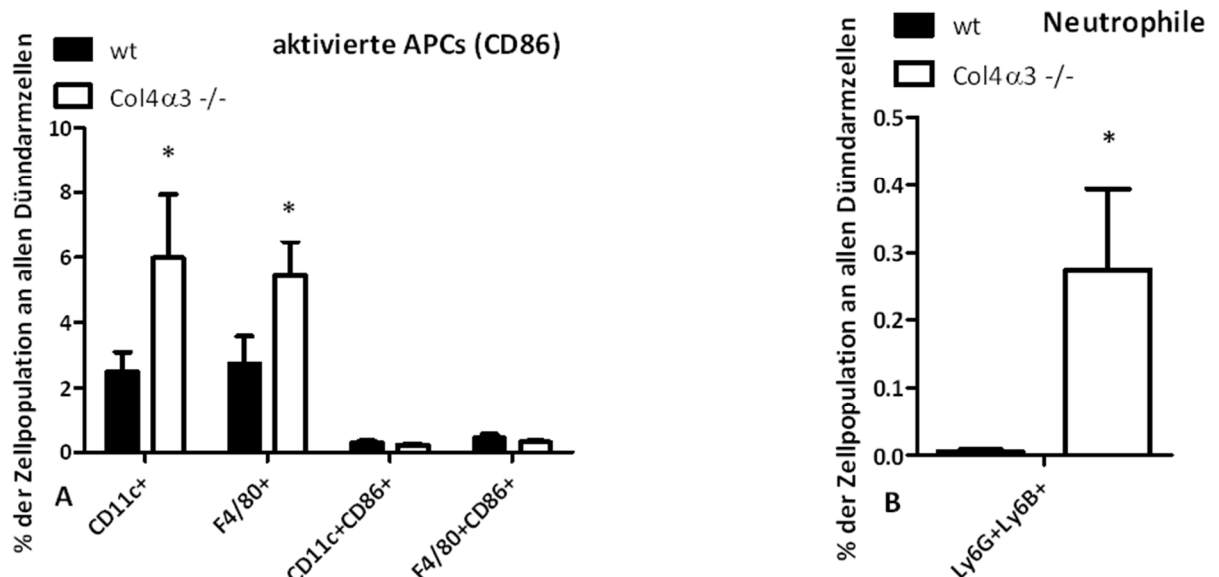
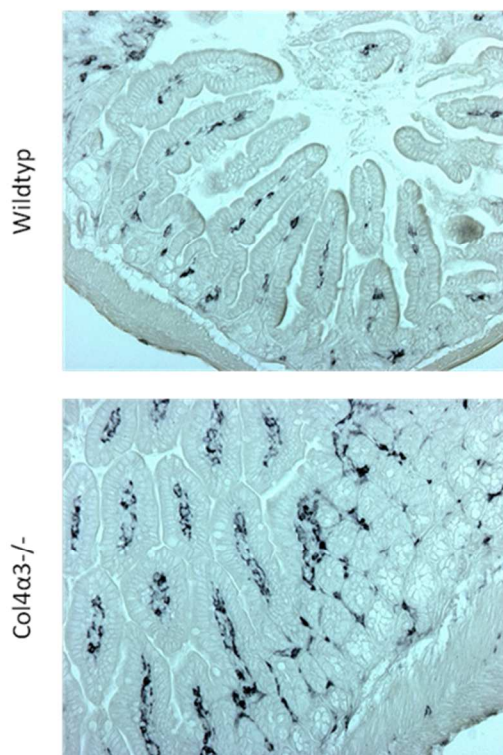


Abbildung 23: Durchflusszytometrie Dünndarmzellen: lokale Entzündungsantwort im Dünndarm. APC= antigenpräsentierende Zellen, n=5; *=p<0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001; p-Wert aus t-Test in Bezug zu *Col4α3*^{+/+} Tieren.

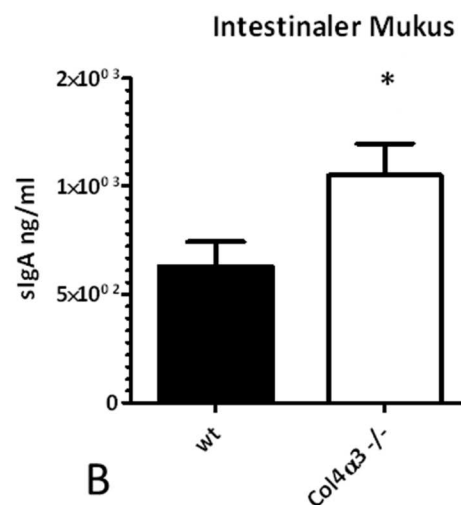
Tabelle 14: T-Zellen der Durchflusszytometrie des Dünndarms: % der Zellpopulation an allen Dünndarmzellen \pm SEM 9 Wochen alte Mäuse. n=5; *=p<0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001; p-Wert aus t-Test in Bezug zu *Col4 α 3*^{+/+} Tieren.

Zellpopulation	Wildtyp	Col4 α 3 ^{-/-}
CD3+	15,45 \pm 1,60	14,40 \pm 0,85
CD3+CD69+	3,06 \pm 1,21	3,78 \pm 1,17
CD3+CD4+	4,71 \pm 1,70	2,91 \pm 0,42
CD3+CD8+	1,75 \pm 0,41	0,77 \pm 0,18 *
CD3+CD4 ⁻ CD8 ⁻	7,14 \pm 1,65	9,56 \pm 1,48
CD3+CD4 ⁺ CD69+	1,18 \pm 0,50	0,91 \pm 0,44
CD3+CD8 ⁺ CD69+	0,54 \pm 0,11	0,47 \pm 0,09
CD3+CD4 ⁻ CD8 ⁻ CD69+	1,09 \pm 0,57	2,12 \pm 1,23
CD3+CD4+CD25+FoxP3+	0,29 \pm 0,09	0,30 \pm 0,15
CD3+CD4+IFN γ +	0,51 \pm 0,11	0,24 \pm 0,09
CD3+CD4+IL-17+	0,41 \pm 0,17	0,11 \pm 0,05

F4/80 200x



A



B

Abbildung 24: Lokale Immunantwort im Dünndarm: A: F4/80 Färbung des Ileums 9 Wochen alter urämer und gesunder Mäuse als Anschauungsbeispiel der erhöhten Konzentration von Makrophagen (siehe Abbildung 22A).

B: sekretorisches IgA im intestinalen Mukus des Ileums: Aus einer Spülung des Ileums gewonnener Mukus zeigt signifikant unterschiedliche Konzentrationen des sekretorischen IgAs zwischen urämen und gesunden Mäusen. 9 Wochen alte Tiere, n=5; *=p<0,05; p<0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001; p-Wert aus t-Test in Bezug zu *Col4 α 3*^{+/+} Tieren.

Neben den in 3.2 durchgeführten Untersuchungen bezüglich einer quantitativen Dysbiose wurde Faeces auch auf MacConkey Agar ausplattiert. Dieser macht eine Unterscheidung zwischen Laktose-fermentierenden- und nicht-fermentierenden-Bakterien möglich. Siehe auch Tabelle 12. Da eine lokale Entzündung im Intestinaltrakt auch mit einem übermäßigen Wachstum von coliformen Bakterien assoziiert ist [122], verglichen wir den Faeces urämer *Col4α3*^{-/-} Mäuse mit dem gesunder Kontrollen. Hierbei zeigte sich eine signifikant erhöhte Menge coliformer Bakterien im Stuhl *Col4α3*-defizienter-Mäuse über den Studienverlauf (Abbildung 25-Abbildung 26).

Zusammenfassend kann man also von einer erhöhten lokalen Immunaktivität sowie Zeichen für entzündliche Veränderungen im Intestinaltrakt von *Col4α3*^{-/-} Mäusen im Gegensatz zu gesunden Kontrollen sprechen.

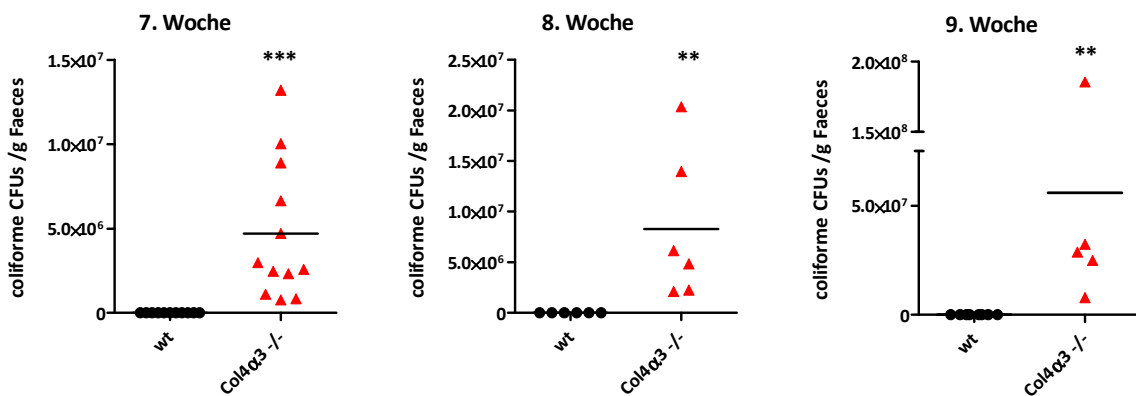


Abbildung 25: Vermehrt coliforme Bakterien in *Col4α3*^{-/-} Mäusen: qualitative Dysbiose im Sinne eines Shifts zu vermehrt Laktose-positiven, coliformen Bakterien bei *Col4α3*^{-/-} im Vergleich zu Wildtyp Tieren 7-9 Wochen alt, n=5; *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; p-Wert aus t-Test in Bezug zu *Col4α3*^{+/+} Tieren

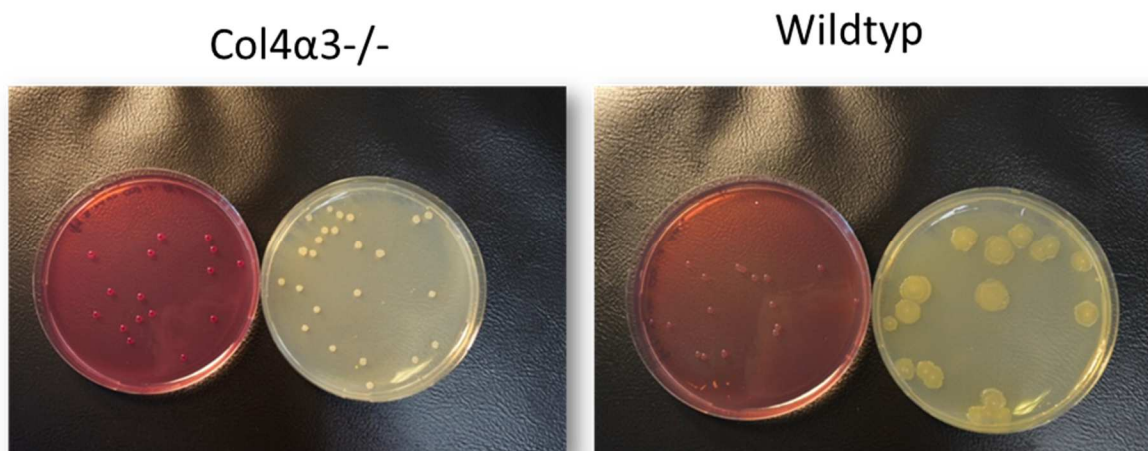


Abbildung 26: Anschauungsbeispiel qualitativer Dysbiose. MacConkey-Platten (jeweils links) zeigen unterschiedliche Kolonien bezüglich der Laktose-Fermentation. Am ehesten coliforme Bakterien.

3.4. Erhöhte Endotoxinwerte im Serum von *Col4α3*^{-/-} Mäusen als mögliches Zeichen einer Barrierestörung

Eine der Rationales der aufgestellten Hypothese waren neben den erhöhten Entzündungswerten die gemessenen Endotoxinwerte im Serum von chronisch iereninsuffizienten Patienten [74]. Zum Nachweis von bakteriellem Endotoxin im Serum von *Col4α3*^{-/-} Mäusen wurde sowohl ein Limulus Amebocyte Lysate (LAL)- Assay als auch ein Peptidoglycan-Assay durchgeführt. Im Gegensatz zum LAL-Assay, welches Endotoxin gram-negativer Bakterien nachweist, kann Peptidoglycan neben (gram-positivem) bakteriellen auch mykotischen Ursprungs sein.

9 Wochen alte Tiere mit einer ausgereiften chronischen Niereninsuffizienz zeigten erhöhte Endotoxinwerte im Serum im Vergleich mit gesunden Kontrollen (Abbildung 27-A). Bezüglich der Peptidoglycan-Messungen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen *Col4α3*^{-/-} Mäusen und Wildtypkontrollen (B). Zusammenfassend konnten also auch für dieses Mausmodell erhöhte bakterielle Serumendotoxinwerte, wie bereits beim Menschen, nachgewiesen werden.

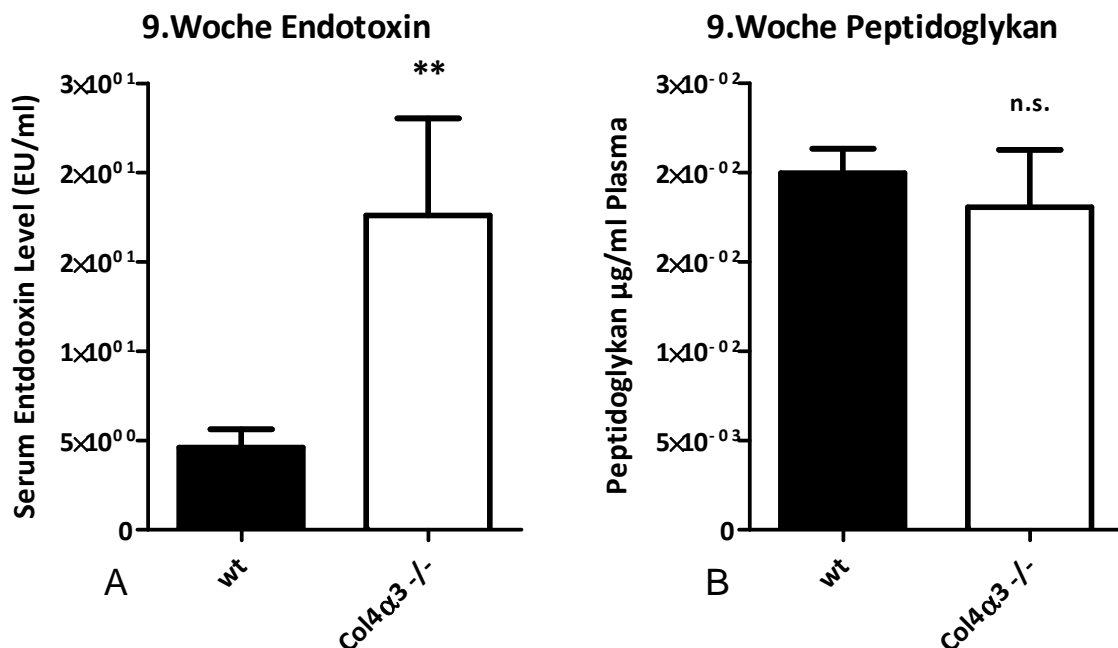


Abbildung 27: Endotoxinämie in *Col4α3*^{-/-} Mäusen: A: signifikant höhere Endotoxinspiegel bei 9 Wochen alten urämen *Col4α3*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu gesunden Kontrollen. B: keine Unterschiede im Peptidoglykanspiegel bei 9 Wochen alten urämen *Col4α3*^{-/-} Mäusen verglichen mit Wildtyp Tieren, n=5; *=p<0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001; p-Wert aus t-Test in Bezug zu *Col4α3*^{+/+} Tieren

3.5. Keine Hinweise auf eine strukturelle Barrierestörung des Dün- oder Dickdarmes auf mikroskopischer Ebene bei *Col4α3*^{-/-} Mäusen.

Zur Evaluation einer möglichen Barrierestörung wurde die Darmbarriere zunächst mikroskopisch untersucht. Dazu wurden neben zur Übersicht angefertigten PAS-Färbungen, immunhistologische Untersuchungen zweier Schlüsselproteine der *tight junctions* durchgeführt: Occludin und ZO-1. Diese Untersuchungen wurden sowohl mit Dün- als auch mit Dickdarmgewebe der *Col4α3*^{-/-} Mäuse und entsprechender Wildtyp-Tiere durchgeführt. Darüber hinaus wurden zur genaueren Strukturanalyse der Zellkontakte diese auch mittels Elektronenmikroskopie im Colon untersucht, um etwaige minimale Veränderungen im Sinne einer Barrierestörung festzustellen.

Weder in der allgemeinen Histologie, noch in der Immunhistologie oder der Elektronenmikroskopie konnten strukturelle Veränderungen der Darmbarriere festgestellt werden. Immunhistochemisch wurde dabei neben Intensitätsunterschieden bezüglich der Menge der Proteine auch auf eine eventuelle Internalisierung (Verschiebung der Proteine nach intrazellulär) geachtet. In beiden Fällen, wie auch in der Elektronenmikroskopie, bei der die ultrastrukturellen Einzelteile der *tight junctions* betrachtet werden konnten, zeigten sich keine Unterschiede zwischen urämen und gesunden Tieren (Abbildung 28).

Mikroskopisch ließen sich keine Hinweise für einen *leaky gut* finden. Eine Erklärung für die systemische Entzündung und Endotoxinämie fehlte somit nach wie vor, weshalb weitere Untersuchungen der Darmbarriere nötig waren.

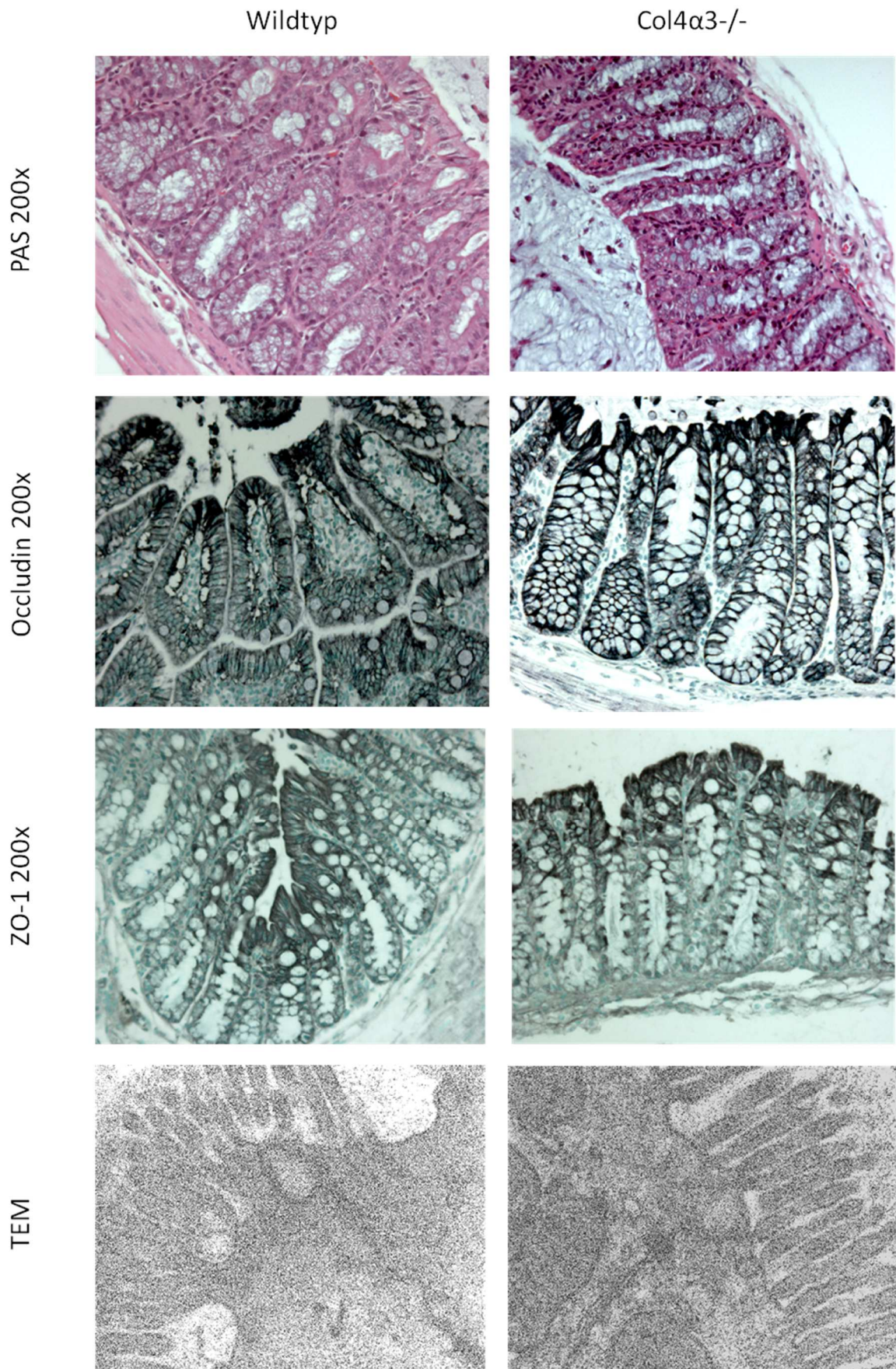


Abbildung 28: Mikroskopische Darmbarriere: PAS und immunhistologische Färbung von Dünndarmgewebe 9 Wochen alter *Col4 α 3^{-/-}* Mäuse sowie gesunden Kontrollen; zudem Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Colons beider Genotypen

3.6. Erhöhung der Albuminkonzentration im Faeces von *Col4α3*^{-/-} Mäuse sowie teilweise veränderte Expression der *tight junction* Proteine

Durch die Volumenbelastung des Körpers bei der chronischen Niereninsuffizienz kommt es, beim Versuch diese auszugleichen, zu einem Einstrom von harnstoffhaltigem Plasma in das gastrointestinale Lumen [141]. Für ein erniedrigtes Serumalbumin in urämen Patienten wird neben einer Malnutrition auch die chronische Entzündung verantwortlich gemacht [60]. Wir stellten uns daher die Frage, ob neben dem Einstrom von Harnstoff auch größere Moleküle wie beispielsweise Albumin mit einem Gewicht von über 60 kDalton durch eine mögliche Barrierestörung den Weg in das intestinale Lumen finden. Hierzu wurde analog zur Bestimmung der Albuminkonzentration im Urin ein ELISA durchgeführt, um die Menge des Albumins im Faeces der Mäuse zu ermitteln. Zudem wurden die RNA Expressionslevel der Schlüsselproteine der *tight junctions* im Darmgewebe ermittelt.

Zu Beginn der Versuche (Lebenswoche 7) unterschieden sich die Albuminkonzentrationen im Faeces der *Col4α3*^{-/-} Mäuse nicht von denen der Kontroll-Tiere. Mit Fortschreiten der Erkrankung (Zunahme der Urämie und Abnahme der GFR in Lebenswoche 8, siehe 3.2) zeigten die urämen *Col4α3*^{-/-} Mäuse jedoch erhöhte Albuminwerte im Faeces verglichen mit gesunden Kontrollen (Abbildung 29). Darüber hinaus fanden sich vereinzelt (Ileum) signifikant herabgesetzte Expressionslevel der Schlüsselproteine der *tight junctions* (Occludin) im Dünndarm von urämen Mäusen (Abbildung 30).

Diese Ergebnisse zeigen, dass neben erhöhten Harnstoffkonzentrationen auch Albumin im intestinalen Mukus bzw. Faeces von chronisch niereninsuffizienten Mäusen erhöht ist, sowie dass es vereinzelt zur verminderten Expression von *tight junction* Proteinen im Darm kommt.

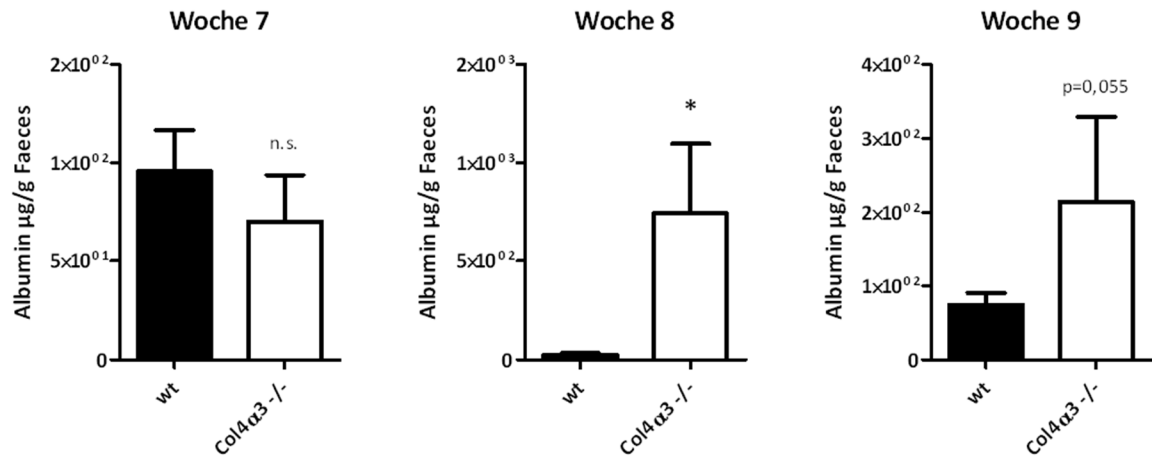


Abbildung 29: Albuminkonzentration im Faeces: Vergleich der Albuminkonzentration im Faeces von 7-9 Wochen alten *Col4α3*^{-/-} Mäusen sowie gesunden Kontrollen. n=5; *=p<0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001; p-Wert aus t-Test in Bezug zu *Col4α3*^{+/+} Tieren

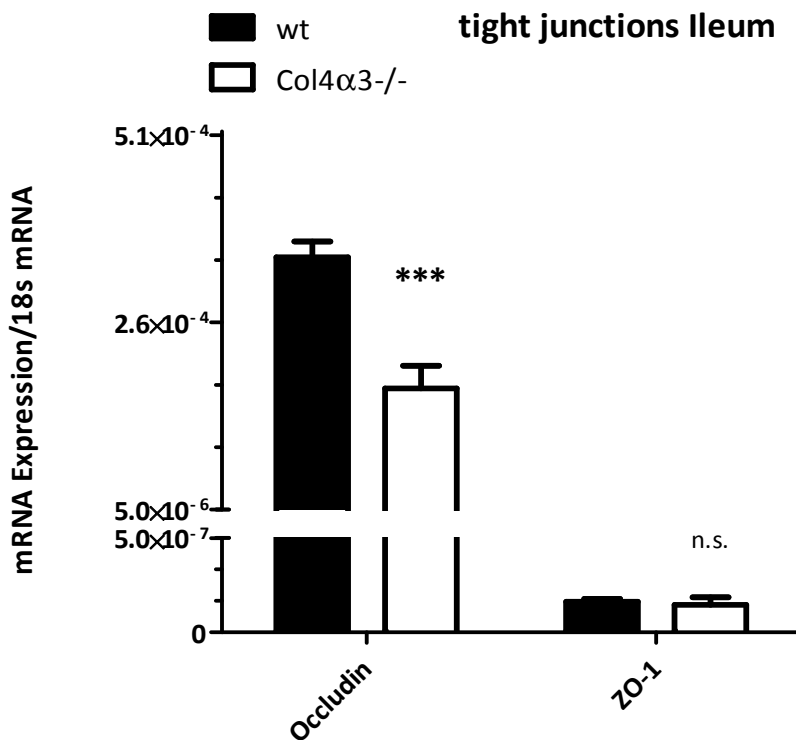


Abbildung 30: Expressionsniveau der *tight junctions* des Ileums: Verglichen wurden Occludin und ZO-1, zwei Schlüsselproteine der Zellkontakte im Darmepithel des Ileums von 9 Wochen alten *Col4α3*^{-/-} Mäusen sowie gesunden Kontrollen. n=5; *=p<0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001; p-Wert aus t-Test in Bezug zu *Col4α3*^{+/+} Tieren

3.7. Oral verabreichte GFP-markierte E.coli lassen sich in Lebergewebe von *Col4α3*^{-/-} Mäusen nachweisen.

Um die tatsächliche Translokation von lebenden Bakterien nachzuweisen, wurden bei Versuchsabschluss Suspensionen von Milz-, Leber- und Nierenzellen auf Agarplatten (LB und McConkey) ausplattiert. Zusätzlich bekamen die Mäuse 48h vor Versuchsabschluss 10^9 GFP-markierte-E.coli oral per Gavage verabreicht. Diese waren Ampicillin-resistent, weshalb Milz-, Leber- und Blutbestandteile zusätzliche auf mit Ampicillin versetzten LB Nährböden ausplattiert wurden. Des Weiteren wurden, um die lokale Immunantwort zu beurteilen, durchflusszytometrische Analysen des Lebergewebes durchgeführt.

Bereits in Vorversuchen unseres Labors konnten Bakterien in Leber, Milz und Lymphknoten von *Col4α3*^{-/-} Mäusen nachgewiesen werden (Daten nicht aufgeführt). Dies ließ sich in Leber, Milz und Niere bestätigen, wobei die CFU Zahlen der Leber im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant waren (Abbildung 31-A). Darüber hinaus konnten GFP-E.coli in 40% der Lebern *Col4α3*^{-/-} Mäuse nachgewiesen werden, jedoch keine in gesunden Kontrollen (B). Der Nachweis erfolgte anhand der selektiven, mit Antibiotika versetzten Nährböden sowie durch die Fluoreszenz unter dem Mikroskop. Auch auf LB-Ampicillin Agarböden von ausplattierten Milz- und Blutbestandteilen der *Col4α3*^{-/-} Tiere fanden sich die grün fluoreszierenden Kolonien (C-D), nicht jedoch auf den Nährböden gesunder Kontrollen. In letzteren war der Unterschied jedoch nicht signifikant. Zudem zeigte sich in der Durchflusszytometrie der Leber ein Trend in Richtung mehr aktivierter dendritischer Zellen und Makrophagen der *Col4α3*^{-/-} Mäuse, welcher sich immunhistologisch bestätigen ließ (Abbildung 31 E-F).

Die Ergebnisse dieses Versuches können nun in Summe eine Translokation von lebenden Bakterien über die Darmbarriere in urämen Mäusen nachweisen. Dies gelingt insbesondere über die eigens für diesen Nachweis gastral (via Gavage) verabreichten GFP-markierten (grün fluoreszierenden) E.coli.

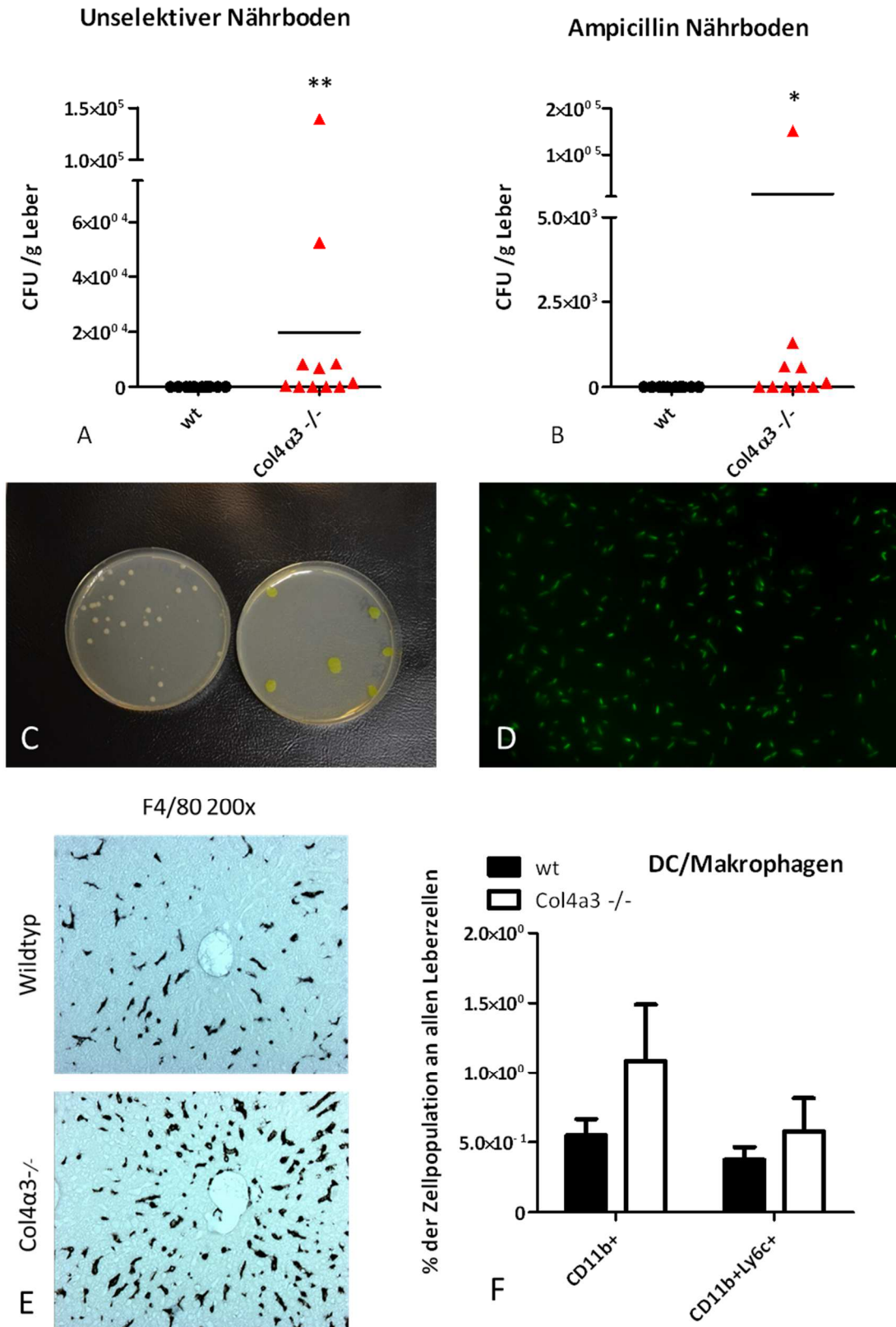


Abbildung 31: Bakterielle Translokation über die Darmbarriere von *Col4a3*^{-/-} Mäusen: A/B: lebende Bakterien in Lebern von *Col4a3*^{-/-} Mäusen gemessen in CFUs pro g Leber auf nicht-selektivem bzw. selektivem (Ampicillin) Nährboden B: Messung der grün fluoreszierenden CFUs; als Anschauungsbeispiel sind in C GFP-E.coli neben normalen Kolonien dargestellt. D zeigt diese unter dem Fluoreszenzmikroskop. E-F: Makrophagen in der Leber: immunhistochemisch (E) und mittels Durchflusszytometrie (F) 9 Wochen alte Tiere, n=5; *=*p*<0,05; **=*p*<0,01; ***=*p*<0,001; *p*-Wert aus t-Test in Bezug zu *Col4a3*^{+/+} Tieren

3.8. Serum von *Col4 α 3*^{-/-} Mäusen löst in vitro eine Barrierestörung von murinen Colon26 Zellen aus

Im Anschluss an den Nachweis der Translokation stellte sich nun die Frage der Pathogenese selbiger. Laut unserer Hypothese müsste die Urämie nicht nur zu der in diesem Modell bereits festgestellten Dysbiose, sondern auch zu dem Phänomen des *leaky gut* führen. Um dies zu überprüfen, führten wir in vitro Experimente mit einer murinen Kolonzelllinie durch. Diese sollte als Modell für das einschichtige Darmepithel dienen. Da es im Rahmen der chronischen Nierenerkrankung durch die Volumenüberladung zum Einströmen von Serumbestandteilen in das intestinale Lumen kommt [141], führten wir eine Intervention mit Serum von 9 Wochen alten *Col4 α 3*^{-/-} Mäusen und dem gesunder Kontrollen durch. Die Harnstoffkonzentration des Serums *Col4 α 3*^{-/-} Mäuse betrug dabei ein knappes 10-faches von dem gesunder Wildtyp-Tiere (Abbildung 32-A). Mittels ECIS (siehe 2.2.7.) wurden die Veränderungen der Impedanz gemessen.

Es zeigte sich ein Impedanzabfall in denen mit urämen Serum intervenierten Kammern. Dieser war im Vergleich mit den Kontroll-Seren behandelten Kammern signifikant, bei denen die Impedanz der behandelten Zellen sogar zunahm (Abbildung 32-B). Der Impedanzabfall wird dabei als Störung der Barrierefunktion gewertet, da weniger Widerstand bei Anlegen des Wechselstroms entsteht [166].

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Inhaltstoffe des urämen Serums *Col4 α 3*^{-/-} Mäuse ein in-vitro-Modell einer Darmbarriere durchlässiger machen. Dies entspricht den angestellten Überlegungen zur Pathogenese der Translokation.

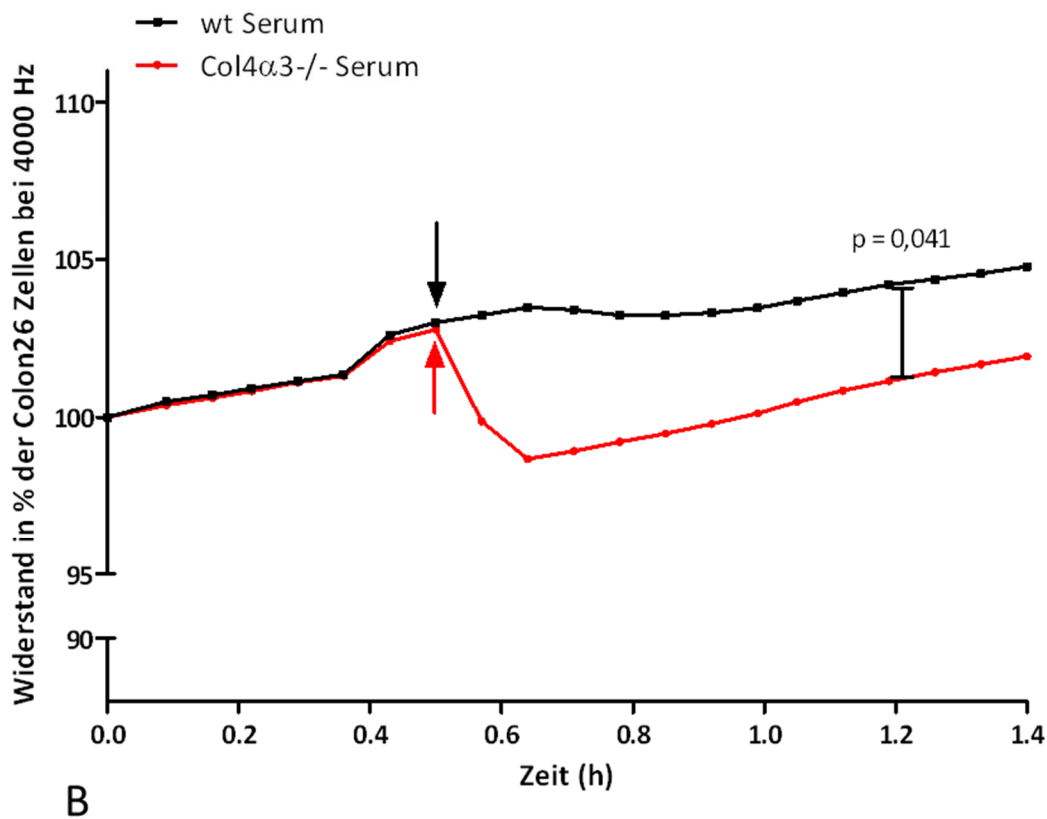
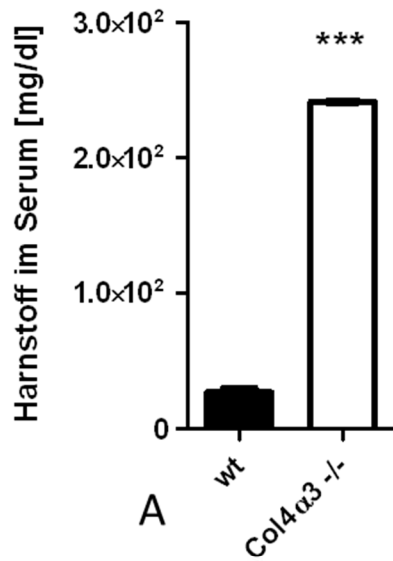


Abbildung 32: In vitro Barrierestörung durch urämes Serum von *Col4α3*^{-/-} Mäusen: A: mittlere Harnstoffkonzentration der zur Intervention verwendeten Seren *Col4α3*^{-/-} Mäuse und Wildtypkontrollen. B: ECIS Messungen. Impedanzänderung gemessen an 100% Ausgangsimpedanz. Pfeile markieren den Zeitpunkt der Intervention. Davor stete leichte Zunahme der Impedanz. Danach Abfall der Impedanz der mit dem Serum *Col4α3*^{-/-} Mäuse behandelten Colon26 Zellen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Messungen bei 4000 Hz. Dargestellt ist der Mittelwert der Impedanz der einzelnen Kammern je nach Genotyp. Verwendet wurde Serum von 9 Wochen alten Tieren, p-Wert aus t-Test in Bezug zu *Col4α3*^{+/+} Tieren

3.9. Bei Suppression der Darmflora mit Antibiotika zeigen *Col4α3*^{-/-} Mäuse eine Restitution der systemischen Entzündungsaktivität

Um den Einfluss der Darmflora noch besser betrachten zu können, entschieden wir uns, diese mit einer antibiotischen Triple-Therapie bestehend aus Ampicillin, Neomycin und Metronidazol zu supprimieren. *Col4α3*^{-/-} Mäuse wurden in zwei Gruppen unterteilt und erhielten gewichtsadaptierte Mengen der Antibiotika oder als Vergleichsgruppe Wasser für 12 Tage ab der 7. Lebenswoche (6 Wochen alt). Selbiges geschah mit *Col4α3*^{+/+} Wildtyp Tieren. In diesem Fall sollte die Fragestellung im Sinne einer *Proof of Concept* Studie den Zusammenhang zwischen dysbiotischer Darmflora und systemischer Entzündung aufweisen.

An Tag 0 und Tag 7 der Experimente wurde zunächst der Erfolg der Therapie durch Ausplattieren von Faeces definiert. Hier zeigte sich sowohl bei *Col4α3*^{-/-} Mäusen sowie Wildtyp Tieren eine signifikante Reduktion der CFU (Abbildung 33).

Die systemische Entzündung wurde erneut sowohl anhand von humoralen und zellulären Veränderungen qualifiziert. Hierbei zeigte sich zunächst eine signifikant verminderte Konzentration von Endotoxin im Serum von behandelten *Col4α3*^{-/-} Mäusen (Abbildung 35-D). Die aus Lebergewebe mit qPCR gemessenen Entzündungsmarker (IL-6 und Pentraxin-2/Serum-Amyloid-P) waren nach Behandlung ebenfalls signifikant herunterreguliert (B). Auch die zellulären Veränderungen der Milz, die wir durchflusszytometrisch untersuchten, zeigten sich bei supprimierter Darmflora reversibel (Abbildung 34). Dies traf sowohl auf die aktivierten T-Zellen, TH1, TH17 und T_{regs}, als auch auf die aktivierten dendritischen Zellen und Makrophagen zu. Auch in der Histologie ließen sich diese Veränderungen bestätigen (Abbildung 35-A). Lokal im Darm zeigten sich lediglich F4/80 positive Makrophagen signifikant vermindert (wt: 2,74 ±1,05 SEM vs. *Col4α3*^{-/-} 5,46±1,33 SEM). Weitere Veränderungen waren durchflusszytometrisch nicht festzustellen. Die Veränderungen in Bezug auf die sIgA Produktion zeigten sich jedoch reversibel (Abbildung 35-C).

Die Ergebnisse zeigen eindrucksvoll die Restitution der systemischen Entzündungsaktivität bei signifikanter Reduktion der Darmflora durch eine antibiotische Therapie.

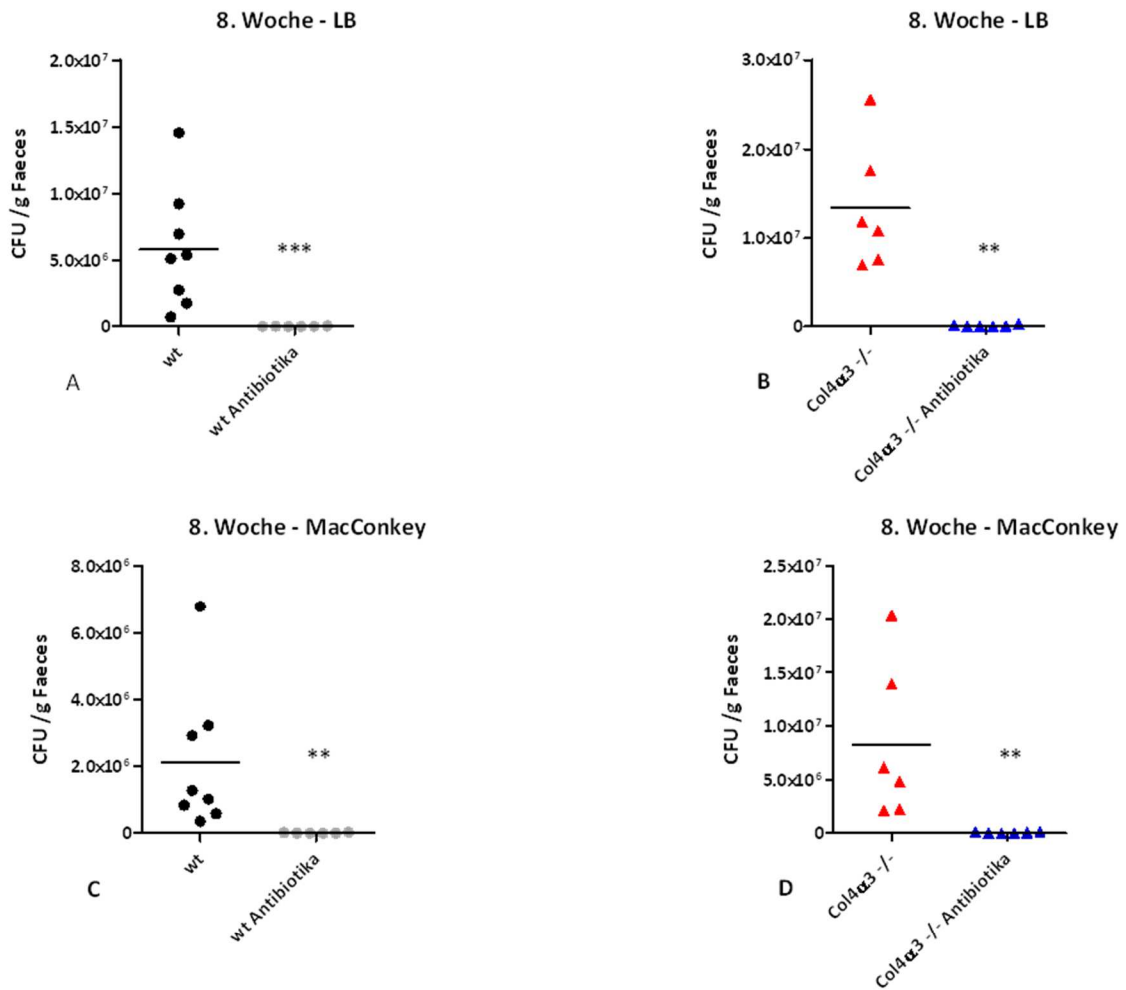


Abbildung 33: Darmflorasuppression unter antibiotischer Therapie: Unter der Triple-Therapie mit Ampicillin, Metronidazol und Neomycin zeigten die behandelten Tiere, sowohl Wildtyp (A) als auch *Col4α3*^{-/-} Mäuse (B), eine signifikante Reduktion der Keimzahl im Faeces gemessen an CFU/g Faeces. Dies zeigte sich nicht nur auf unselektivem LB-Nährböden (A-B), sondern auch auf selektiven MacConkey-Nährböden (C-D). E: Anschauungsbeispiel der Keimzahlreduktion nach antibiotischer Therapie auf MacConkey-Nährböden. 8 Wochen alte Tiere, nach 7 von 12 Tagen antibiotischer Therapie n=5; *=p<0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001; p-Wert aus t-Test in Bezug zu mit Kontroll-Wasser behandelten *Col4α3*^{-/-} Mäusen.

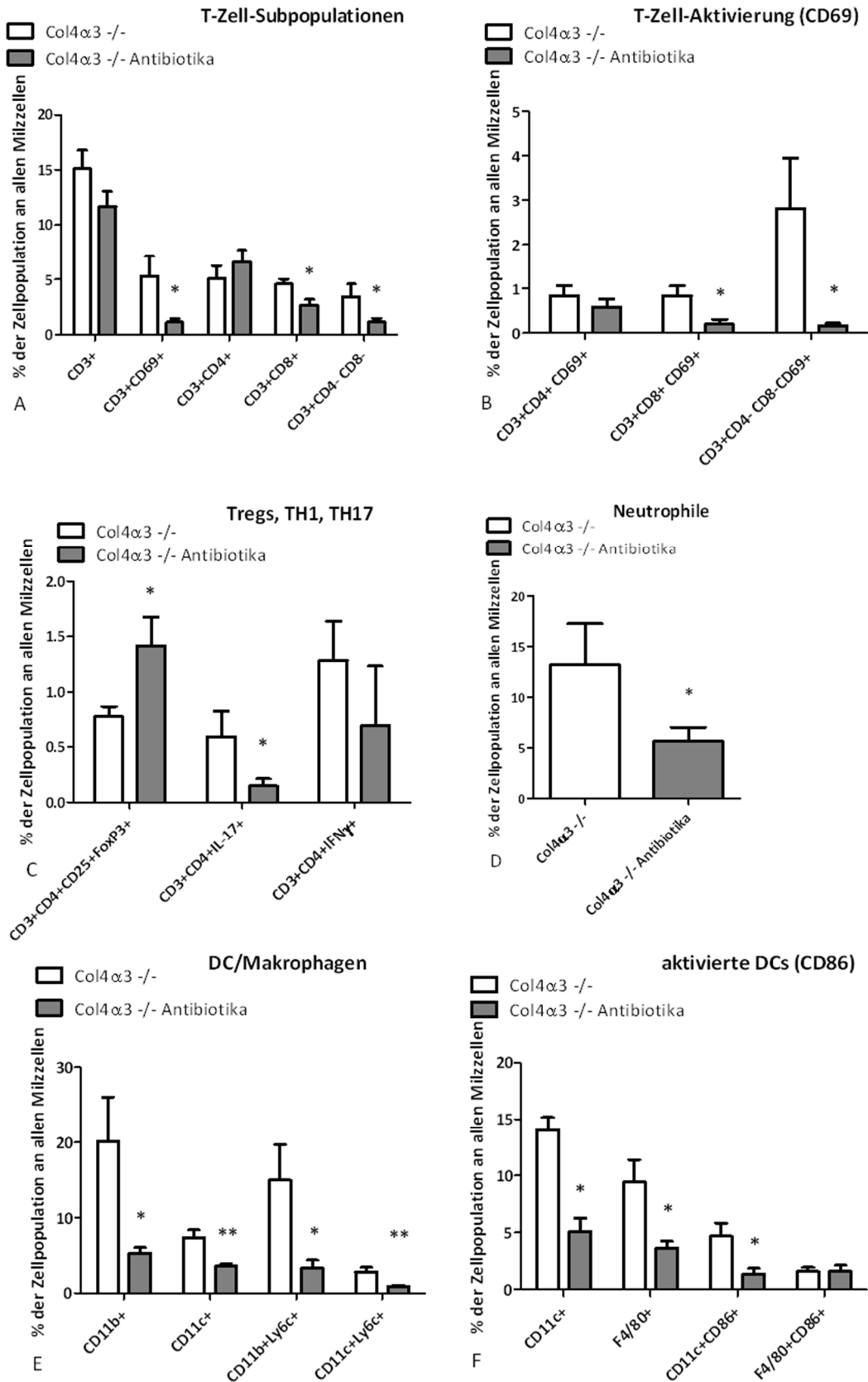


Abbildung 34: Restitution der systemischen Entzündungsaktivität nach antibiotischer Therapie (1): Korrektur der durchflusszytometrisch gemessenen erhöhten Entzündungsmarker der Milz durch antibiotische Therapie. Umkehr des Treg/Th17 Verhältnisses (C). 9 Wochen alt. n=5; *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; p-Wert aus t-Test in Bezug zu mit Kontroll-Wasser behandelten *Col4α3^{-/-}* Mäusen.

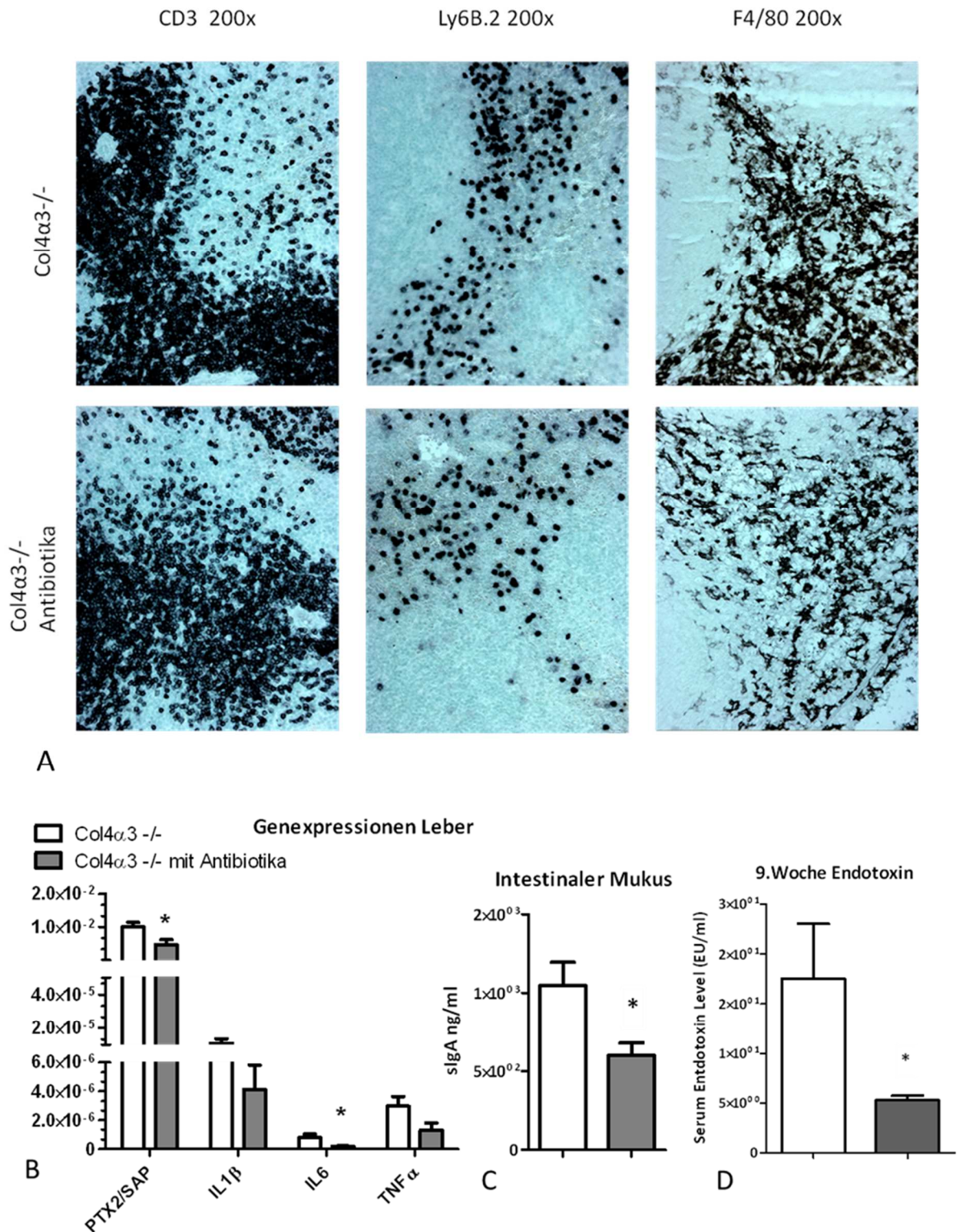


Abbildung 35: Restitution der systemischen Entzündungsaktivität nach antibiotischer Therapie (2): A: Anschauungsbeispiel der immunhistochemischen Färbungen der Milz (9 Wochen alter Tiere) CD3: T-Zellen; Ly6B.2: Neutrophile; F4/80: Makrophagen. B: mRNA Expressionslevel verschiedener proentzündlicher Zytokine. Nach antibiotischer Therapie teilweise reduziert. C: Menge des slgAs im intestinalen Mukus zeigt signifikante Reduktion nach Therapie. D: Serum-Endotoxin signifikant reduziert nach antibiotischer Therapie. Jeweils 9 Wochen alte Mäuse, n=5; *=p<0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001; p-Wert aus t-Test in Bezug zu mit Kontroll-Wasser behandelten Col4α3^{-/-} Mäusen.

3.10. Eradikation der Darmflora bei *Col4α3*^{-/-} Mäusen hat keinen Einfluss auf die Progression der Nierenerkrankung

Nach der erfolgreichen Elimination der systemischen Entzündung in *Col4α3*^{-/-} Mäusen stellte sich als nächstes die Frage, ob diese auch einen Einfluss auf die Schwere oder Progression der Niereninsuffizienz hat. Hierzu wurden Serum-Harnstoffwerte, Proteinurie, Glomerulosklerose und die im Rahmen des Alport-Syndroms bekannten entzündlichen Veränderungen der Niere nach Behandlung betrachtet.

Sowohl Urämie als auch Proteinurie zeigten keinerlei Veränderungen. Auch die lokale Entzündung der Niere, wie auch entstehende tubuläre Veränderungen und Glomerulosklerose blieben unverändert. Überlebensstudien wurden nicht durchgeführt, da diese tierschutzrechtlich nicht durchführbar waren.

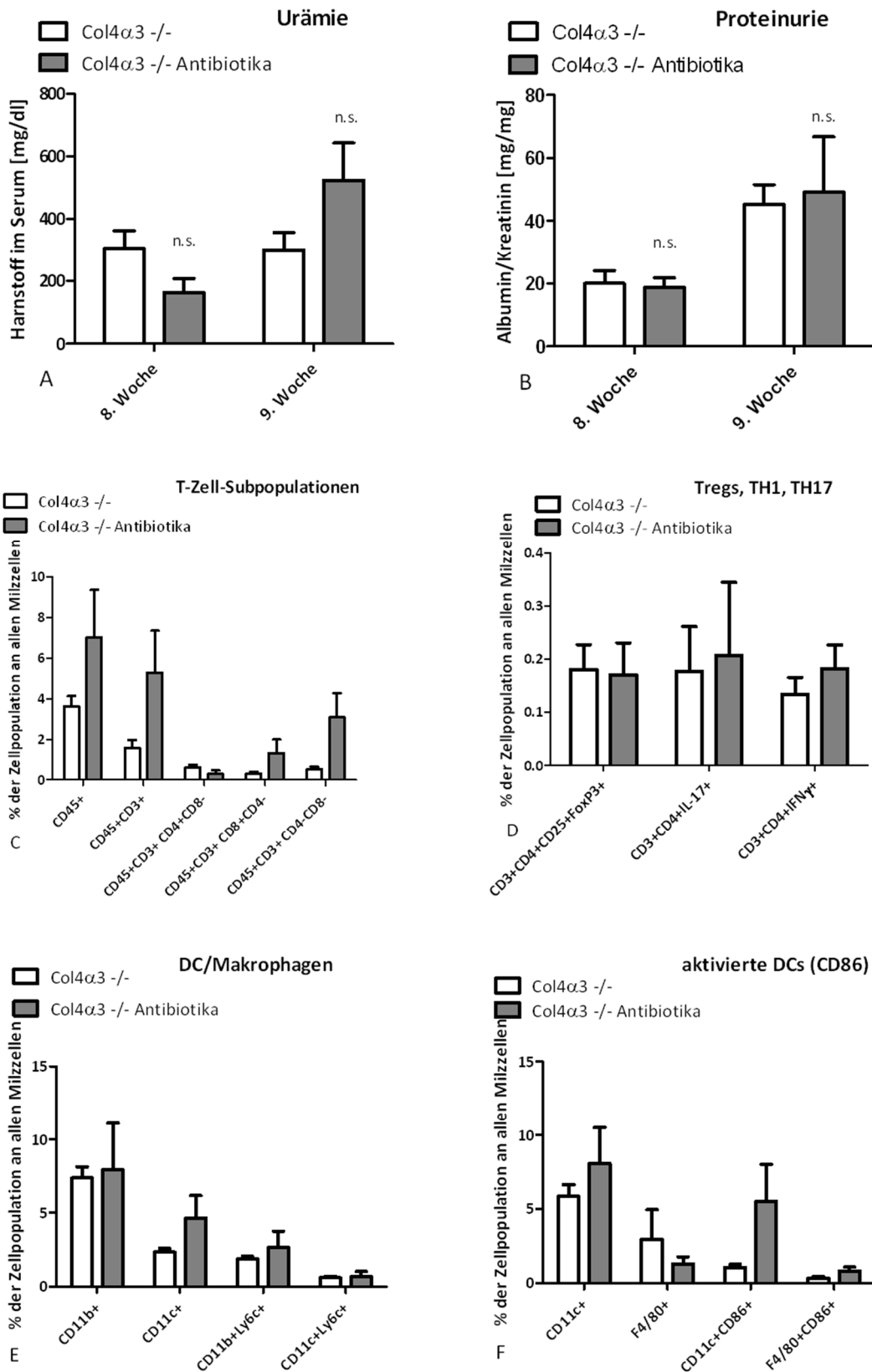


Abbildung 36: Fehlender Einfluss der Antibiotikatherapie auf die Progression der Nierenerkrankung (1): Keine Veränderungen bezüglich Urämie oder Proteinurie (A-B) sowie der Leukozyteninfiltration in der Niere (C-F); 9 Wochen alte Tiere. n=5 in A-B; n=3 in C-F; *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; p-Wert aus t-Test in Bezug zu mit Kontroll-Wasser behandelten Col4 α 3-/- Mäusen.

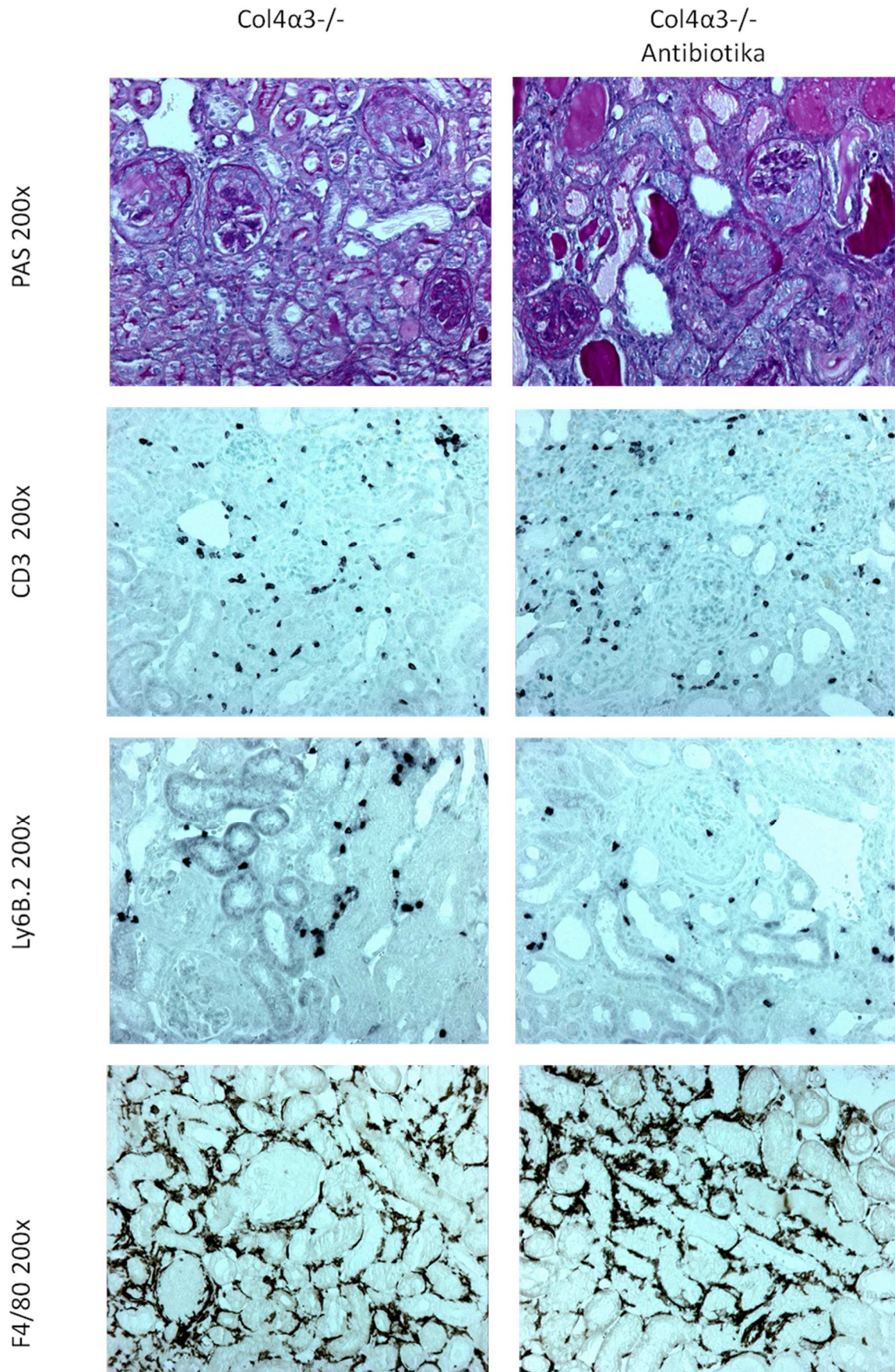


Abbildung 37: Fehlender Einfluss der Antibiotikatherapie auf die Progression der Nierenerkrankung (2): Anschauungsbeispiel (immun)histologischer Schnitte der Niere von behandelten und unbehandelten 9 Wochen alten Col4 α 3^{-/-} Tieren. CD3: T-Zellen; Ly6B.2: Neutrophile; F4/80: Makrophagen.

4. DISKUSSION

Die Hypothese dieser Arbeit basiert auf drei Fragen. Erstens: Kommt es im Rahmen einer chronischen Niereninsuffizienz bei *Col4α3*^{-/-} Mäusen zu der bereits beim Menschen beschriebenen systemischen Entzündung sowie zu einer intestinalen Dysbiose? Zweitens: Besteht in *Col4α3*^{-/-} Mäusen eine Störung der Barrierefunktion des Darms, die zu einer Translokation von Bakterien oder bakteriellen Bestandteilen über selbige führt? Und Drittens: Sind Dysbiose und bakterielle Translokation für die systemische Entzündung in chronischer Niereninsuffizienz verantwortlich?

In Bezug auf die erste Frage konnte diese Arbeit eindrücklich zeigen, dass es in *Col4α3*^{-/-} Mäusen zu einer ausgeprägten systemischen Entzündung, sowohl auf zellulärer als auch auf humoraler Ebene, kommt. Diese wird von einer intestinalen Dysbiose begleitet, die sowohl quantitativ, als auch qualitativ, im Vergleich zu gesunden Kontrollen besteht. Bezüglich der zweiten Fragestellung konnte neben einer intestinalen Entzündungsreaktion in *Col4α3*^{-/-} Mäusen die bakterielle Translokation anhand funktioneller Experimente nachgewiesen werden. Hierbei konnten neben bakteriellem Endotoxin im Serum auch lebende Bakterien in der Leber der urämen Mäuse nachgewiesen werden, die zuvor oral verabreicht worden waren. Die dritte Frage wurde durch die signifikante Reduktion der Darmflora in *Col4α3*^{-/-} Mäusen beantwortet. In therapierten Tieren kam es zu einer Restitution der systemischen Entzündungsaktivität. Unseres Wissens nach sind wir die erste Arbeitsgruppe, die diesen Zusammenhang tatsächlich nachweisen konnte und können nun schlussfolgern, dass die intestinale Dysbiose und bakterielle Translokation für die systemische Entzündung in chronischer Niereninsuffizienz verantwortlich sind.

Aus diesen Ergebnissen entstehen nun weitere Fragen, die in der folgenden Diskussion behandelt werden sollen. Im Speziellen möchte ich dabei auf das Verhältnis der T_{regs} zu den TH₁₇ Zellen, auf die Entstehung der Dysbiose und Barriere Dysfunktion sowie auf die klinische Bedeutung der Ergebnisse und die Limitationen der Arbeit eingehen.

4.1. Intestinale Dysbiose und das Verhältnis von T_{regs} zu TH₁₇-Zellen

Der Vermutung, dass die Darmflora Quelle der systemischen Entzündung in chronischer Niereninsuffizienz sein könnte, wurde lange kaum Beachtung geschenkt. Auch im Rahmen von anderen Krankheitsbildern wurde die Darmflora als potentieller Mitspieler in Diskussionen lange negiert. Als im Jahr 2005 der Nobelpreis für Medizin an Robin Warren und Barry Marshall für die Rolle von *Helicobacter pylori* in der gastroduodenalen Ulcuserkrankung ging, zeigte sich erstmals deutlich, dass wir Krankheitsursachen nicht nur in Erregern oder in uns selbst, sondern tatsächlich in der Interaktion von Wirt und den ihn besiedelnden Mikroorganismen suchen müssen [97]. Diese und weitere Erkenntnisse im Bereich der Mikrobiota-Forschung läuteten eine neue Ära ein, in der die Darmflora in verschiedensten Zusammenhängen untersucht wurde. Ein wiederkehrendes Muster war dabei wie auch in unserem Modell eine entzündliche Aktivität, die mit einer dysbiotischen Flora korreliert. Dabei muss zwischen lokalen intestinalen entzündlichen Veränderungen und systemischer Entzündung differenziert werden. Unsere *Col4a3*^{-/-} Mäuse zeigten eine starke systemische Entzündungsreaktion. Dabei fand sich neben vermehrten aktivierten T-Zellen, dendritischen Zellen, Makrophagen und Neutrophilen auch ein verschobenes TH₁₇:T_{reg} Verhältnis zu Gunsten der TH₁₇ Zellen (siehe 3.1.), ein Phänomen, welches häufig mit Dysbiose vergesellschaftet ist [104, 123]. In den letzten Jahren ist die Entstehung von TH₁₇ und T_{regs}, ihre Beziehung zur intestinalen Mikrobiota und untereinander in den Fokus der Forschung gerückt [35, 37, 107, 110, 111, 168]. Im Folgenden möchte ich daher beide Zellpopulationen sowie zwei wichtige Mediatoren im Rahmen der aktuellen Forschungslage betrachten.

TH₁₇-Zellen

Von besonderem Interesse war in diesen Publikationen stets die Bildung von TH₁₇-Zellen und den von ihnen produzierten Zytokinen, die mit diversen entzündlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden [169-171]. In Mausmodellen für systemische Arthritis und Multiple Sklerose konnte in *germfree* Mäusen neben erniedrigten TH₁₇-Zell-Populationen auch eine verminderte Krankheitsaktivität bemerkt werden [133, 172]. Die Vermutung lag also nah, dass die Differenzierung von TH₁₇-Zellen zu Teilen Mikrobiota-abhängig geschieht und eine wichtige Rolle in der Ausprägung der Krankheit spielt. Ivanov et. al fand durch selektive Antibiotikagabe in Mäusen heraus, dass beispielsweise *segmented filamentous bacteria* (SFB) eine vermehrte Differenzierung von naiven T-Zellen zu TH₁₇ Zellen induzieren können [104,

173]. Das Verständnis der Rolle der TH₁₇-Zellen bleibt trotz vieler neuer Erkenntnisse zurzeit lückenhaft. Zu den sich mehrenden Assoziationen in Bezug auf entzündliche Erkrankungen zeigen auch Studien positive anti-entzündliche Effektorfunktionen, wie die induzierte vermehrte Expression von *tight junction* Proteinen [111]. Dennoch scheint es, dass sobald sich einmal das Gleichgewicht verschoben hat, es durch positive Rückkopplung sowie ausbleibender negativer Gegenregulation zu einer chronischen entzündlichen Aktivität durch TH₁₇-Zellen kommen kann [110, 174].

T_{regs}

Insbesondere für die negative Gegenregulation sind die anti-entzündlichen T_{regs} als Kontrapart zu den eher pro-entzündlichen TH₁₇-Zellen wichtig. Während beide T-Zell-Populationen initial TGF- β zur Differenzierung benötigen, werden bei erhöhter Expression von pro-entzündlichen Zytokinen, wie beispielsweise IL-6, vermehrt TH₁₇ Zellen gebildet [175, 176]. T_{regs}, die sowohl thymischen als auch peripheren Ursprungs sein können, benötigen zur Differenzierung IL-2 und können später anti-entzündlichen Zytokine wie IL-10 produzieren [110]. Nach Suppression der Darmflora in den *Col4a3*^{-/-} Mäusen zeigte sich bei signifikant erniedrigten IL-6-Expressionsleveln auch eine Umkehr des Verhältnisses von TH₁₇:T_{regs} sowie eine Restitution der Entzündungsaktivität in Bezug auf die andere Zellpopulationen (siehe 3.9.) Abgesehen von den unterschiedlichen zur Differenzierung benötigten Zytokinen können TH₁₇- beziehungsweise regulatorischer T-Zellen die Entstehung der jeweils anderen auch direkt unterdrücken und tragen somit weiter zum antiproportionalen Verhalten der beiden Zellpopulationen bei [107, 177].

Kommt es nun wie auch in unserem Mausmodell zu einer zu niedrigen Zahl von T_{regs}, so führt dies zu einer erhöhten Expression von TCR auf THC gegen kommensale Bakterien, welche eine über das physiologische Maß reichenden intestinalen Entzündung bedingt. Die Produkte dieser Entzündungsreaktion wiederum können pathogenen Bakterienpopulationen zu einem Überlebensvorteil gereichen und die Entstehung einer Dysbiose insbesondere mit Enterobacteriaceae weiter befeuern [122]. Zu dieser coliformen Dysbiose, die sich auch in unseren *Col4a3*^{-/-} Mäusen fand, kamen eine erhöhte sIgA-Konzentration im intestinalen Mukus, eine Neutrophileninfiltration sowie eine erhöhte Zahl an dendritischen Zellen und Makrophagen (siehe 3.3.).

slgA - Mediator der intestinalen Homöostase (1)

Die Produktion von slgA durch basale Plasmazellen kann im Allgemeinen T-Zell abhängig oder unabhängig erfolgen [114]. SlgA ist dabei ein wichtiger Faktor für die Homöostase der Mikrobiota [178]. Bei einer zu geringen Konzentration kann es zu schweren Infektionen und entzündlichen Reaktionen kommen [112, 179]. Entsprechend reagiert das gesunde Immunsystem bei einem mikrobiellen Ungleichgewicht mit Mikrobiota-spezifischen IgAs [113, 180, 181]. Dies ist ein dynamischer Prozess: Je komplexer die Zusammensetzung der Mikrobiota, desto vielfältiger die spezifischen slgAs [182]. Ein weiterer interessanter Zusammenhang ist, dass die von Ivanov beschriebenen SFB TH₁₇-vermittelt eine erhöhte Produktion von slgA bewirken können [183]. In unseren *Col4a3*^{-/-} Mäusen fand sich im intestinalen Mukus eine erhöhte Konzentration an slgA, deren direkte Ursache unklar ist. Aufgrund der neuen Forschungserkenntnisse liefert jedoch die zeitgleich vorhandene Dysbiose und die erhöhte Zahl an TH₁₇-Zellen eine Erklärung: Demnach könnte die erhöhte slgA Konzentration als reaktiver Versuch verstanden werden, die Dysbiose zu kontrollieren. Die TH₁₇-Zellen führen so einerseits zu einer verstärkten lokalen Entzündung, können jedoch über die Aktivierung von slgA produzierenden B-Zellen zur Wiederherstellung der intestinalen Homöostase beitragen.

SCFAs - Mediator der intestinalen Homöostase (2)

Eine weitere wichtige Mediatorfunktion insbesondere in Bezug auf T_{regs} stellen kurzkettige Fettsäuren dar, sogenannte SCFAs (englisch für: *short chain fatty acids*). Diese entstehen im Kolon durch Fermentation von für den Wirt nicht weiter verdaubarer faserreicher Kost. Zu dieser eigentlichen Funktion als Energiequelle für die residenten Bakterien und Darmepithelzellen kommt ihre immunologisch-regulatorische Bedeutung hinzu. SCFAs inhibieren Histon-Deacetylasen (HDAC), die die Funktion und Expansion von hämatopoetischen und nicht hämatopoetischen Zellen beeinflussen können [174]. Dabei führt die Inaktivierung von HDAC über eine verminderte Expression von *nuclear factor -κB* (NF-κB) zur vermehrten Produktion von Zellen mit einem toleranten, nicht-entzündlichen Phänotyp [184]. Inzwischen konnte dieser anti-entzündliche Effekt sowohl in Bezug auf Makrophagen und dendritische Zellen als auch auf T-Zell Funktion und Differenzierung gezeigt werden. Insbesondere führt die vermehrte Inhibition von HDACs durch SCFAs zur gesteigerten Produktion von FOXP3 positiven T_{regs} und damit zur Aufrechterhaltung der intestinalen

immunologischen Homöostase [184-186]. Die verminderte Einnahme faserreicher Kost oder weniger SCFAs produzierende Bakterien im Rahmen einer Dysbiose können somit zu einer niedrigeren Zahl an T_{regs} führen und eine lokale intestinale Entzündung begünstigen [174].

Auch solch ein lokaler Entzündungsprozess ist ein weiteres Phänomen, welches häufig mit einer dysbiotischen Darmflora korreliert. In chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beispielsweise führt die gestörte Wechselwirkung zwischen Mikrobiota und Darmepithel zu einer übermäßigen lokalen Entzündung und Dysbiose [87, 126]. Bereits 1985 wurde eine solche intestinale Entzündung *post mortem* in Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz beschrieben [142]. Auch eine intestinale Dysbiose konnte in Studien nicht nur in Mausmodellen der chronischen Niereninsuffizienz, sondern auch im Menschen nachgewiesen werden [135, 187]. Dabei handelte es sich teils um eine quantitative, teils um eine qualitative Dysbiose. In urämen Patienten fand dabei beispielsweise eine starke aerobe und anaerobe Kolonisation des in gesunden Kontrollen sonst kaum besiedelten Dünndarmes statt [188]. Darüber hinaus zeigte sich eine Verschiebung hinsichtlich der bakteriellen Subpopulationen: Hämodialysierte Patienten zeigten geringere Zahlen der symbiotischen *Bifidobacteriaceae*, dafür aber höhere für *Clostridium perfringens* [189]. Zudem wurde ein erhöhtes Risiko für Infektionen mit *C. difficile* beschrieben [190].

Auch wenn die Korrelation der chronischen Niereninsuffizienz mit der intestinalen Dysbiose und der systemischen Entzündung gehäuft beschrieben wurde, so bleibt dennoch eine wichtige Frage in diesen Studien offen. Da es sich bei der Verbindung zwischen Immunsystem und intestinaler Mikrobiota um eine wechselseitige Beziehung handelt, bleibt ungeklärt, welches der beiden Phänomene das andere bedingt oder ob es sich alternativ um eine zufällige Korrelation zweier durch die chronische Niereninsuffizienz verursachten Zustände handelt [191]. Durch die Suppression der Darmflora und die konsekutive Restitution der Entzündungsaktivität konnten wir diese Frage beantworten: Die systemische Entzündung in unseren Mäusen ist durch die intestinale Dysbiose sowie deren bakterielle Translokation bedingt (siehe 3.9. sowie Abbildung 38 und Abbildung 39). Lokal führt die intestinale Entzündung zwar zur Aufrechterhaltung der Dysbiose, auf systemischer Ebene ist jedoch die Entzündung von der dysbiotischen Mikrobiota und deren Translokation abhängig.

Wie jedoch kommt es initial zur intestinalen Dysbiose und ist diese oder die Translokation der Bakterien die Hauptursache für die systemische Entzündung?

4.2. Intestinale Entzündung und Dysbiose vs. Translokation von Bakterien

Wenn wir nun, wie in unserer Hypothese vorausgesetzt, davon ausgehen, dass die Entstehung der Dysbiose den initialen Schritt darstellt, wie kommt es dann zu dieser? Darauf liefert diese Arbeit nur indirekt Antworten. Bei Suppression der Darmflora, also auch Minimierung der Dysbiose kommt es zur Restitution der Entzündungsaktivität. Andere Studien jedoch konnten diverse Faktoren erarbeiten, die zu einer Veränderung der Darmflora in chronischer Niereninsuffizienz beitragen und unsere Ergebnisse gut ergänzen. Diese lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Urämie-assoziierte- und iatrogene-Faktoren. Die iatrogenen Faktoren sehen neben dem gehäuften Gebrauch von Antibiotika und Phosphatbindern die veränderte Diät der urämen Patienten in der Schuld. Um insbesondere eine Hyperkaliämie zu vermeiden, müssen Patienten häufig auf Gemüse und Obst wie Bananen, Orangen oder Avocados verzichten, die jedoch neben ihrem hohen Kaliumgehalt auch faserreich sind und somit zu einer symbiotischen Flora beitragen würden [192]. Insbesondere wäre hierbei der verminderte Anfall von in 4.1. beschriebenen SCFAs zu beachten. Die in unserem Mausmodell vorliegende Dysbiose entsteht jedoch ohne all diese Faktoren, da die Mäuse keine veränderte Diät oder sonstigen Therapeutika erhalten. Da es kaum Daten zur intestinalen Mikrobiota in noch unbehandelten Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz gibt, kann man lediglich annehmen, dass die iatrogenen Faktoren eher zu einer Verschlechterung oder Aufrechterhaltung der Dysbiose beitragen, nicht aber alleine ursächlich sind. Zu den Urämie-assoziierten Faktoren zählen unter anderem nicht-ausgeschiedene Metabolite, wie Harnstoff, Harnsäure oder Oxalat. Durch die Volumenüberladung in chronischer Niereninsuffizienz, die darüber hinaus zu einem Wandödem und verminderter Durchblutung des Darmes führt, gelangen diese retenierten Stoffe ins intestinale Lumen [141, 193] und können so eine Dysbiose hervorrufen und das intestinale Epithel schädigen. Harnstoff, welcher zwar zur Überwachung der Nierenfunktion gemessen wird, aber lange als nicht-toxisch galt, kann von Bakterien, die eine Urease-Funktion besitzen, im Darmlumen zu Ammoniak abgebaut werden $[\text{CO}(\text{NH}_2)_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{NH}_3]$ $[\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NH}_4\text{OH}]$. Dieses kann über einen Anstieg des intestinalen pH-Wertes eine Enterokolitis induzieren [142, 194]. Harnsäure und Oxalat gelangen nicht nur wie Harnstoff passiv ins Darmlumen, sondern werden aktiv sezerniert. Dies trägt zwar zu niedrigen Serumspiegeln der sonst über die Niere ausgeschiedenen Metabolite bei, kann aber ebenfalls das Darmepithel schädigen [195-197]. Hinzu kommt, dass Harnstoff-, Harnsäure-, oder Oxalat-verstoffwechelnde Bakterien einen Überlebensvorteil haben, es

kommt also über eine Nischenbildung zu Dysbiose, die durch die entzündlichen Metabolite im Rahmen der Colitis weiter vorangetrieben wird [187, 198]. Zusätzlich finden sich in chronisch niereninsuffizienten Patienten, nebst einem dysbiotischen Shift zu vermehrt Urease-positiven Bakterien [187], vermehrt Phyla, die an der Produktion von weiteren Urämie-Toxinen beteiligt sind [199]. Zwei wichtige Vertreter der Urämie-Toxine intestinalen Ursprungs sind p-cresol und indoxyl-sulfat [200], die wiederum mit der Mortalitätsrate, der systemischen Entzündung in chronischer Niereninsuffizienz und ihren kardiovaskulären Folgen assoziiert werden [199, 201-203].

In der zweiten großen Frage dieser Arbeit geht es um eine mögliche Störung der Darmbarriere, die durch eben diese Dysbiose und lokale Entzündung hervorgerufen sein soll. Die Translokation von Bakterien und bakteriellen Bestandteilen würde eine adäquate Erklärung für die systemische Entzündung in chronischer Niereninsuffizienz liefern. Grund für diese Annahme war primär die Endotoxämie in urämen Patienten. Neben den steigenden Entzündungsparametern können im Serum von niereninsuffizienten Patienten erhöhte Endotoxinwerte gemessen werden, die mit Progredienz der Erkrankung weiter ansteigen [74]. Endotoxin, welches als Produkt gram-negativer Bakterien in großen Mengen im Darmlumen anfällt, wird bei gesunden Menschen nur in geringer Menge in die intestinalen Kapillaren transportiert (zwischen 1 und 200 pg/ml Serum) [204-206]. In unseren *Col4a3*^{-/-} Mäusen konnten wir eindrucksvoll, bei signifikant erhöhten Endotoxinwerten im Serum (siehe 3.4.), lebende Bakterien in der Leber sowie die Translokation von oral verabreichten GFP-markierten *E.coli* nachweisen (siehe 3.7.). Im Rahmen der Obduktionen an Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz fanden sich neben einer entzündlich veränderten Darmwand mit niedrigen Villi vertieften Krypten und entzündlichen Zellinfiltraten in der Lamina propria, auch ganze Bakterien in mesenterialen Lymphknoten [142]. Offen bleibt jedoch auch hier der Translokationsmechanismus, der grundsätzlich transzellulär oder parazellulär möglich wäre. Magnusson et al. konnten bereits in den 90er Jahren eine erhöhte Permeabilität des Darmepithels für großmolekulare Polyethylenglykole sowohl in urämen Menschen als auch in Ratten nachweisen [207, 208]. Als Ursache vermutete er einen parazellulären Mechanismus. Dieser könnte bei degradierten *tight junctions* die vermehrte Translokation von Endotoxin und diese von ganzen Bakterien erklären [209-211]. Im Jahr 2013 konnten Vaziri und Kollegen zunächst in vitro die Zerstörung von Schlüsselproteinen der *tight junctions* (claudin-1, occludin und ZO-1) in Kolonzellen durch Harnstoff zeigen. Sie verwendeten hierfür

Harnstoffkonzentrationen wie in prä-dialysierte Patienten [198]. Unsere ECIS Experimente, die ebenfalls mit Kolonzellen durchgeführt wurden, sind dazu eine gute Ergänzung, da wir zeigen konnten, dass Komponenten des Serums urämer 9 Wochen alter *Col4α3*^{-/-} Mäuse in der Lage sind, *in vitro* zu einer Störung der Darmbarriere zu führen (siehe 3.8.). Zudem konnten Vaziri et al. in urämen Ratten eine Degradation von eben diesen Schlüsselproteinen in Magen, Jejunum und Ileum [212] sowie in weiteren Experimenten im Kolon nachweisen [213]. Mittels *real-time PCR* konnten wir nur vereinzelt erniedrigte Expressionslevel der *tight-junction*-Proteine in unseren Mäusen nachweisen (siehe 3.6). Vaziri und Kollegen hatten teilweise signifikant erhöhte Expressionslevel in ihren Experimenten gemessen und dies als transkriptionelle Reaktion auf die zerstörten Proteine gewertet [213]. Darüber hinaus konnten wir histologisch, sowie immunhistologisch mit Färbungen von Occludin und ZO-1 keine Anzeichen für eine Störung der Darmbarriere finden. Auch ultrastrukturell stellten sich die Zellkontakte des Kolons *Col4α3*^{-/-} Mäuse ohne signifikanten Veränderungen gegenüber gesunden Tieren dar (siehe 3.5.). Dies bedeutet, dass zwar eine Translokation von Bakterien und bakteriellen Bestandteilen stattfindet, wie wir an unseren Mäusen sowie andere Studien an Menschen und Ratten zeigen konnten [145, 214], dass jedoch die Antwort auf die Frage nach dem Translokationsmechanismus noch nicht abschließend geklärt ist. Hierbei stellt sich nun die Frage, ob ähnlich der aktiven Sekretion von Oxalat, es andersherum zu einer transzellulären Passage von Bakterien über die Darmbarriere kommen könnte. In unseren *Col4α3*^{-/-} Mäusen konnten wir zeigen, dass Albumin, ein großmolekulares Protein, im Faeces von 8 Wochen alten Tieren erhöht war (siehe 3.6.). Neal et al. schlugen einen transzellulären Mechanismus via TLR4 vor, über den auch physiologisch geringe Mengen von Endotoxin transportiert wurden. Sie konnten zeigen, dass *in vivo* lebende Bakterien ähnlich einem Phagozytoseprozess von Enterozyten internalisiert und dann per Phagosom auf die basale Seite der Zelle transportiert werden [204]. Sun et al. konnten in Ratten neben einer bakteriellen Translokation eine vermehrte Expression von TLR4 und eine gestörte Phagozytose von GFP-gelabelten *E.coli* beobachten [215]. Wie kommt es nun zu diesen widersprüchlichen Ergebnissen? Die in den Studien verwendeten unterschiedlichen Mausmodelle erschweren einen direkten Vergleich. Im Gegensatz zu dem von uns verwendetem genetischen Modell, bei dem die Mäuse spontan eine chronische Niereninsuffizienz entwickeln, entstehen durch interventionelle Modelle zusätzliche mögliche Bias. Das häufig verwendete Modell der 5/6-Nephrektomie, bei dem operativ eine chronische

Niereninsuffizienz induziert wird, könnte auch durch eine zeitweise operativ bedingte Minderperfusion des Darms zu einer Zerstörung der *tight junctions* führen [216]. Ebenso wäre bei den verwendeten Futtermodellen, die eine chronische Niereninsuffizienz mittels Kristallopathie induzieren, nicht nur eine Futter-bedingte-Dysbiose, sondern auch eine direkte Schädigung der Proteine durch die Kristalle denkbar [217]. Eine weitere Möglichkeit wäre zudem, dass es sich lediglich um eine passagere Störung der Darmbarriere handelt, die wir mit unseren verwendeten Methoden nicht darstellen konnten. Um die Frage, ob es sich um einen trans- oder parazellulären Translokationsmechanismus und ob es sich um eine passagere oder endgültige Schädigung handelt, definitiv zu beantworten, sind demnach weitere Studien nötig.

Ebenfalls offen bleibt zum jetzigen Zeitpunkt, zu welchen Teilen die systemische Entzündung auf die intestinale Dysbiose und zu welchen Teilen auf die bakterielle Translokation zurückzuführen ist. Da Darmepithel und intestinale Flora eine enge und wechselseitige Beziehung führen, ist diese Frage auch schwer zu beantworten. Betrachtet man das Ganze vereinfacht, so kann eine Dysbiose alleine bereits zur übermäßigen Aktivierung des Immunsystems führen und man könnte die vermehrte Produktion von TH₁₇-Zellen sowie die verminderte von Tregs erklären. Eine Translokation wiederum könnte über das vermehrte systemische Zusammentreffen von PAMPs und PRRs zu einer Ausschüttung von pro-entzündlichen Zytokinen zur chronischen Aktivierung des Immunsystems führen (IL-6 → vermehrte Produktion von TH₁₇-Zellen) (siehe 4.1.). Um die genauen Mechanismen dieses komplexen systemischen Entzündungszustandes zu verstehen, sind demnach ebenfalls weitere Studien von Bedarf. Dennoch können wir zu diesem Zeitpunkt bereits schlussfolgern, dass die intestinale Dysbiose und bakterielle Translokation für die systemische Entzündung in chronischer Niereninsuffizienz verantwortlich sind (siehe Abbildung 38).

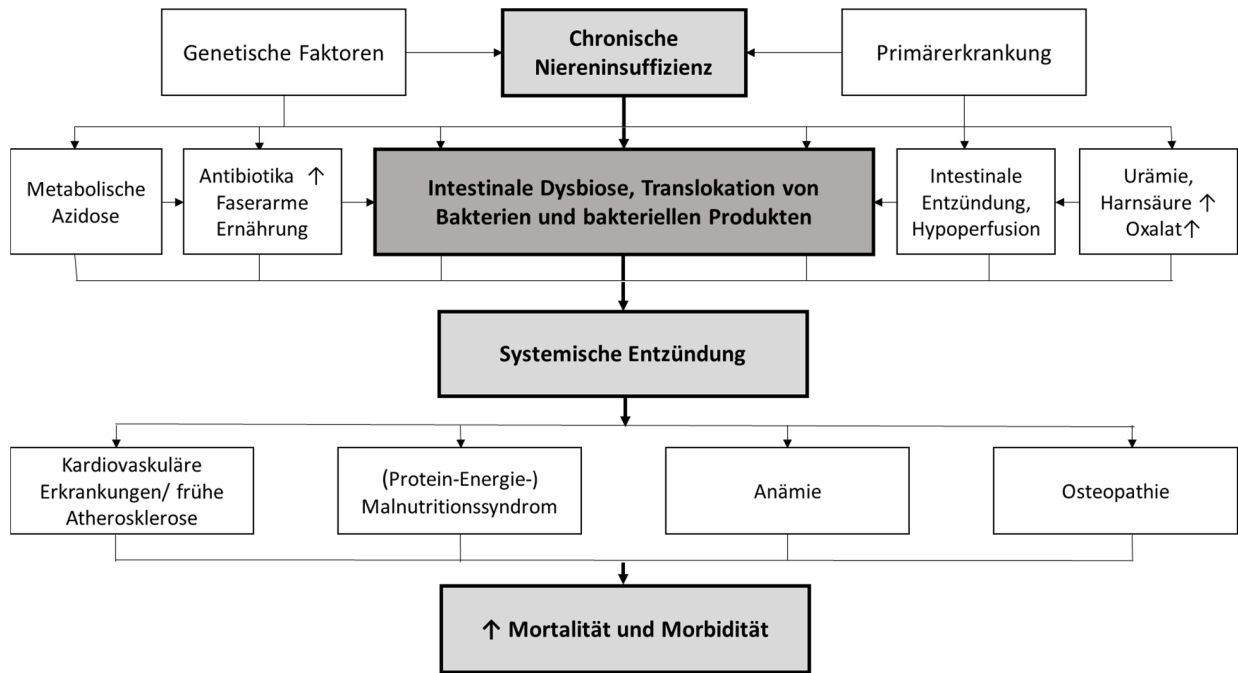


Abbildung 38: Schematische Darstellung der Arbeitsergebnisse (1): geänderte Abbildung 6: Ätiologie und Folgen der systemischen Entzündung in chronischer Niereninsuffizienz (nach [4])

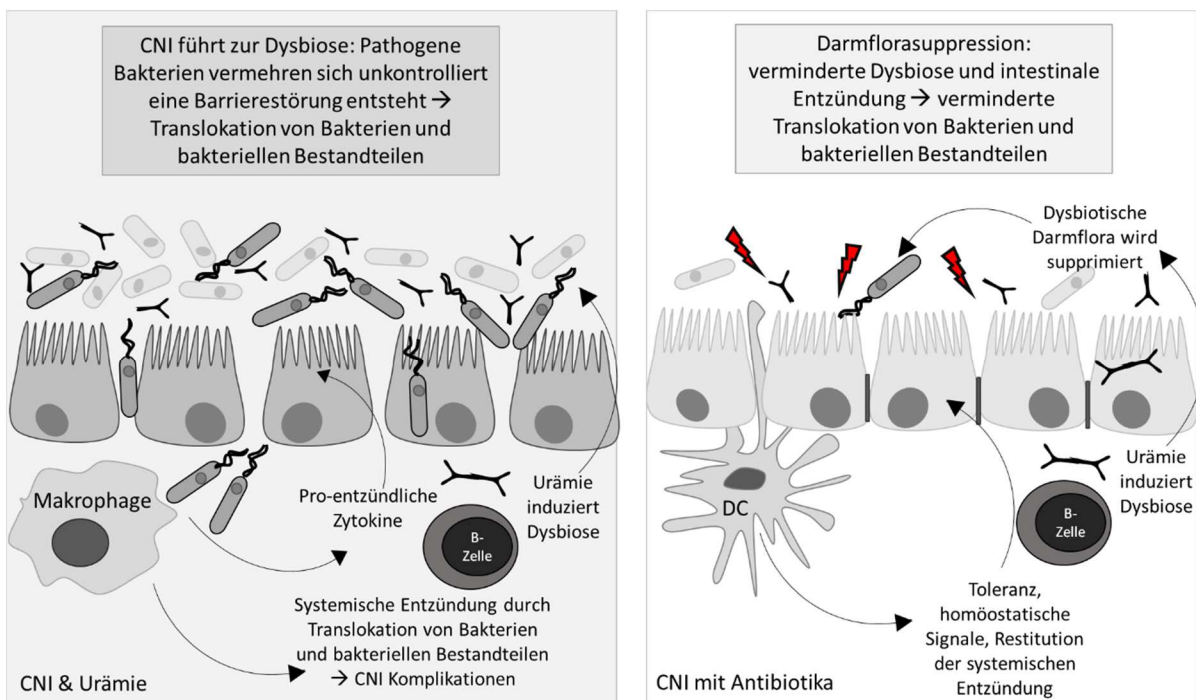


Abbildung 39: Schematische Darstellung der Arbeitsergebnisse (2): Darstellung der Kausalität zwischen systemischer Entzündung und Dysbiose in chronischer Niereninsuffizienz. Ergebnis der *Proof of Concept* Studie. Geänderte Abbildung 9. (Eigens erstellte Abbildung gemäß Inhalten von [1])



4.3. Grenzen der Studie

Bevor wir uns mit der Bedeutung dieser Arbeit beschäftigen erfolgt eine Betrachtung der Limitationen selbiger. Diese sollten bei dem darauffolgenden Ausblick nicht außer Acht gelassen werden.

Grenzen der Studie

Die vorliegende Arbeit weist einige wichtige Limitationen auf. Da es sich um ein genetisches Mausmodell handelt, welches stets der Verpaarung von heterozygoten Tieren bedurfte, waren zum Erhalt einer angemessenen Studienzahl ($n \geq 5$) einige Wurfzyklen durchzuführen. Dennoch bietet dieses Mausmodell gegenüber anderen viele Vorteile. Dass sich die Niereninsuffizienz spontan entwickelt, verhindert, dass es durch die Intervention, ob operativ oder diätisch, zu einem Bias bezüglich der zu messenden Variablen kommt. Dennoch können die gewonnenen Ergebnisse nicht 1:1 auf den Menschen übertragen werden. Zudem repräsentiert das Modell mit dem Alport-Syndrom ($Col4\alpha3^{-/-}$) nur eine kleine Gruppe der für die chronische Niereninsuffizienz ursächlichen Erkrankungen. Somit werden viele Ko-Faktoren, die möglicherweise beim Menschen essentiell sind, nicht beachtet. Ohne diese zusätzlichen Ko-Faktoren bietet das Modell jedoch einen sehr selektiven Blick auf die entstehende chronische Entzündung. Aussagen bezüglich des Überlebens können aus dieser Studie nicht getroffen werden, da dies sowohl tierschutzrechtlich als auch aufgrund der schnellen Progredienz der Erkrankung in diesem Hintergrund nicht möglich war. Größere Lücken weist die Arbeit bezüglich der Translokation auf. Zwar kann diese nachgewiesen werden, jedoch bleiben wir eine Aussage den Mechanismus betreffend schuldig. Lediglich in vitro konnten wir den direkten Effekt des urämen Serums nachweisen, welches nicht ohne weiteres auf das Tiermodell oder den Menschen übertragbar ist. Eine größere Aussagekraft dieser Arbeit wäre noch durch die Bestätigung der Ergebnisse in einem anderen Mausmodell zu erreichen. Hierzu sind insbesondere die durch Vaziri et al. durchgeführten Untersuchungen eine gute Ergänzung [187, 197, 198, 213, 218, 219].

Was jedoch bedeuten diese Ergebnisse klinisch für Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz? Können sie zum Erreichen der formulierten Behandlungsziele beitragen: der Prävention, Früherkennung oder Verhinderung/ Verlangsamung einer Progression der Erkrankung?

4.4. Mikrobiota: Ein Therapieansatz in chronischer Niereninsuffizienz?

In Mausmodellen für Multiple Sklerose und systemischer Arthritis, die wie unter 4.1. beschrieben mit erhöhten Zahlen an Th₁₇-Zellen assoziiert waren, führte eine antibiotische Therapie durch eine verminderte Entzündung zu einer mildereren Krankheitsaktivität [220, 221]. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Intervention diente jedoch der Fragestellung im Sinne eine *proof of concept* Studie und ist daher nicht als Therapieoption zu sehen. Eine dauerhafte Suppression der Darmflora zur Restitution der Entzündungsaktivität in urämen Patienten wäre nicht nur schwer realisierbar, weitere Studien weisen zudem auf eine längerfristige Reduktion der mikrobiellen Vielfalt mit entsprechenden negativen Konsequenzen hin [222, 223]. Dennoch zeigt uns diese Arbeit, dass wir mit der Modulation der Darmflora eine interessante neue Möglichkeit der Therapie in Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz gefunden haben. Der folgende Abschnitt soll eine kleine Übersicht über die bisherigen therapeutischen Ansätze geben, die Darmflora zu verändern.

Prebiotika

Prebiotika oder auch Präbiotika sind für den Wirt unverdauliche Stoffe, die selektiv die Aktivität oder das Wachstum bestimmter Bakterien steigern können [224, 225]. Inulin, Fruktio-Oligosaccharide, Galakto-Oligosaccharide, Soya-Oligosaccharide und Pyrodextrine sind einige der bekanntesten Vertreter, die das Wachstum von beispielsweise *Bifidobacteriae* und *Lactobacilli* fördern und dadurch das von *Bacteroides*, *Clostridiae* oder *Enterobacteriae* hemmen [226]. Speziell konnte unter der Einnahme von p-inulin eine verminderte systemische Entzündungsaktivität in diabetischen Mäusen nachgewiesen werden [227, 228]. Durch die Gabe von Prebiotika könnten in Konkurrenz zu den in urämen Patienten bestehenden Überlebensvorteilen für pathogene Keime (siehe 4.2), die Nischen für eubiotische Bakterien, durch ein vermehrtes Angebot ihrer Metabolite, vergrößert werden. Im Rahmen von Studien konnte bereits ein positiver Effekt von Prebiotika in Mausmodellen oder Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz gezeigt werden. So war der Konsum faserreicher Kost durch uräme Patienten mit niedrigeren Entzündungswerten und verringerter Mortalität assoziiert [192]. Des Weiteren konnten Prebiotika die Serumkonzentration der schädlichen Urämietoxine kolonalen Ursprungs (indoxyl sulfat und p-cresyl) in hämodialysierten Patienten signifikant senken [229, 230]. Ebenfalls waren mit der Gabe von Prebiotika niedrigere Serum-Harnstoffwerte sowie eine bessere Lebensqualität

assoziiert [231, 232]. Die in unseren Mäusen vorhandene Dysbiose entstand ohne Therapie der chronischen Niereninsuffizienz (Nahrungsrestriktionen, Antibiotika, Phosphatbinder etc.) und lässt daher vermuten, dass die Quelle für die Dysbiose in den Folgen der Erkrankung selbst liegt. Dies würde eine dauerhafte prebiotische Therapie oder Ernährungsumstellung nach sich ziehen, da bei Auslassen eine Rückkehr zur dysbiotischen Flora befürchtet werden müsste.

Probiotika

Probiotika bezeichnen lebende Mikroorganismen, die oral in adäquater Menge verabreicht, eine gesundheitliche Verbesserung für den Wirt bedeuten sollen [233]. Diese Mikroorganismen, wie beispielsweise *Bifidobacteriae* [234] können zu einer Veränderung der Darmflorazusammensetzung und der entzündlichen Aktivität im Wirt führen [235, 236]. Ähnlich der Prebiotika konnten auch bei Probiotika positive Effekte in urämen Patienten und entsprechenden Mausmodellen verzeichnet werden. In 5/6-Nephrektomie-Ratten verlangsamte sich die Progression der chronischen Niereninsuffizienz und verlängerte sich das Überleben bei Gabe von *Bacillus pasteurii* [237]. Einen Einfluss auf das Überleben, die Progression oder Schwere der chronischen Nierenerkrankung konnten wir in unseren behandelten *Col4 α 3*^{-/-} Mäusen nicht feststellen (siehe 3.10.). Allerdings bietet dazu auch der verwendete Hintergrund und die kurze Überlebensdauer von 9 Wochen in diesem Modell wenig Spielraum. Darüber hinaus zeigten sich bei der Verwendung von Probiotika verminderte Serumkonzentrationen von Urämietoxinen und Harnstoff [188, 238] sowie in ApoE^{-/-} Mäusen eine verminderte Atheroskleroseeigung bei Therapie mit *Lactobacillus acidophilus* [239]. In einer randomisierten doppelblinden Studie zeigten sich zudem unter Probiotikagabe Serumendotoxin und pro-entzündliche Zytokine vermindert (TNF- α , IL-6) sowie anti-entzündliche erhöht (IL-10) [240]. Yacoub et al. fanden bei der Analyse von Daten des *National health and Nutrition Survey* (NHANES), dass häufiger Yoghurt- oder Probiotikakonsum mit einem erniedrigten Risiko für proteinurische Nierenerkrankung assoziiert ist [241]. Jedoch ist auch im Falle von Probiotika mit einem Erfolg nur bei längerfristiger Gabe oder Aufrechterhaltung der Modulation durch zusätzliche Gabe von Prebiotika zu rechnen.

Synbiotika

Genau diese Kombination aus Pro- und Prebiotika wird aufgrund der synergetischen Wirkung als Synbiotika bezeichnet. In Bezug auf die chronische Niereninsuffizienz konnte bereits in

mehreren teils randomisierten Studien eine signifikante Reduktion von p-cresol durch Synbiotika gezeigt werden [242, 243].

FMT

Die Eskalation der modulatorischen Therapie der Darmflora stellt die Stuhltransplantation (*fecal microbiota trabsplantation* kurz FMT) dar. Für dieses, in der Therapie von *Clostridium difficile* Infektionen bereits arriviertes und effektives Verfahren [244, 245] gibt es in Bezug auf die chronische Niereninsuffizienz bisher nur wenige Daten. Einzelne Fallbeschreibungen konnten jedoch die Eradikation von pathogenen Keimen in urämen Patienten nachweisen [246].

Da es sich bei der Beziehung zwischen chronischer Niereninsuffizienz und Mikrobiota um ein bidirektionales Verhältnis handelt, sind die oben genannten Therapien der Dysbiose vielversprechend. Bei niedrigeren Konzentrationen von Urämie-Toxinen und einer geringeren entzündlichen Komponente könnte das Auftreten von Komplikationen verhindert oder gegebenenfalls die Progression der Erkrankung verlangsamt werden [247]. Allerdings ist wie bereits erwähnt zu beachten, dass bei dieser Beziehung die chronische Niereninsuffizienz die Quelle der Dysbiose ist und diese mit der Translokation die Quelle der systemischen Entzündung bleiben. Bei bestehender chronischer Niereninsuffizienz muss man somit davon ausgehen, dass eine dauerhafte Veränderung der Darmflorazusammensetzung, also das Erreichen eines eubiotischen Status, aktuell nur bei ebenfalls dauerhafter Therapie, ob mit Pro- Pre- oder Synbiotika, möglich ist. Vorstellbar wäre demnach aktuell eine initiale FMT mit einer anschließenden Erhaltungstherapie mit Prebiotika. Auch die in unseren *Col4 α 3*^{-/-} Mäusen gesehene Restitution der Entzündungsaktivität wurde auch durch eine anhaltende antibiotische Korrektur der Dysbiose erreicht.

HDAC Inhibition / SCFAs

Ein weiterer möglicher therapeutischer Ansatz bezieht sich auf die unter 4.1 genannten SCFAs und ihre Fähigkeit zur HDAC-Inhibition. SCFAs können einerseits direkt verabreicht werden. Andererseits kann ihre Konzentration indirekt, über die vermehrte Aufnahme faserreicher Kost oder die Gabe von SCFAs-produzierender Bakterien, gesteigert werden. Zudem gibt es bereits Medikamente, die HDAC inhibieren. Insbesondere in der Psychiatrie werden diese seit vielen Jahren eingesetzt. Auch in verschiedenen Mausmodellen für entzündliche

Erkrankungen konnte die anti-entzündlichen Effekte der HDAC-Inhibition nachgewiesen werden [184, 248, 249]. In Mäusen mit Kolitis führte die Inhibition von HDAC9 zu vermehrten T_{regs} und einer mildereren Symptomatik [250]. Faserreiche Kost konnte nicht nur eine bestehende Entzündung im Kolon vermindern, sondern auch über regulatorische T-Zellen eine asthmatische Aktivität in Mäusen verbessern [249]. Ein weiterer Grund warum es sich bei SCFAs oder anderen HDAC-Inhibitoren um eine vielversprechende Therapieoption handelt, ist ihr Einfluss auf die intestinalen Epithelzellen. SCFAs stärken die Barriere, indem Epithelzellen vermehrt Mukus und Muzine produzieren [251-253]. Bei Besiedelung mit *Bifidobacteriae*, welche Acetat, ein SCFA produzieren, wird die Widerstandsfähigkeit gegen pathogene Keime, vermutlich über Stärkung der *tight junctions*, gesteigert [254].

Adsorptionsmittel

Neben diesen vor allem auf die Therapie der durch die systemische Entzündung induzierten Komplikationen abzielenden Interventionen, gibt es eine weitere, die eventuell das Potential hat, die Progression der chronischen Niereninsuffizienz zu verlangsamen. Der Hoffnungsträger heißt AST-20, ein Aktivkohle-Präparat, welches durch intestinale Bindung die systemische Aufnahme von indoxyl-sulfat verhindert [255, 256]. Dieses wird nicht nur mit dem Auftreten von kardiovaskulären Komplikationen assoziiert, sondern auch durch die Produktion von ROS mit einer Verschlechterung der Nierenfunktion [219, 247, 257]. Entsprechend konnte in Mausmodellen neben einer verlangsamten Progression der Nierenerkrankung auch eine verminderte systemischer Entzündung und reduzierter oxidativer Stress beobachtet werden [255, 258-260].

Welche Behandlungsziele können somit verbessert werden? In Bezug auf die Prävention gibt es bisher lediglich eine positive Assoziation zwischen Yoghurt-/Probiotika-Konsum und dem verminderten Auftreten von proteinurischem Nierenversagen [241]. Zur Früherkennung liefern diese und andere Arbeiten bisher keine neuen Erkenntnisse. Der größte Beitrag dieser und ähnlicher Arbeiten liegt in der Erkenntnis der Herkunft der systemischen Entzündung sowie den damit verknüpften Therapiemöglichkeiten der Komplikationen selbiger. Ob es über die Therapie der Dysbiose und/oder die Reduktion der Urämietoxine reziprok zu einer Verlangsamung der Progression der Niereninsuffizienz beim Menschen kommen kann bleibt abzuwarten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die metabolischen Veränderungen in chronischer Niereninsuffizienz bedingen eine Dysbiose und lokale, intestinale Entzündung, welche zusammen zum Phänomen des *leaky gut* mit Translokation von Bakterien und bakteriellen Bestandteilen führen und für die systemische Entzündung in chronischer Niereninsuffizienz verantwortlich sind.

Um diese Hypothese zu untersuchen, verwendeten wir *Col4α3*^{-/-} Mäuse, die spontan eine chronische Niereninsuffizienz entsprechend dem Alport-Syndrom beim Menschen entwickeln und führten eine Immunphänotypisierung sowie funktionelle und strukturelle Untersuchungen der Darmbarriere im Vergleich zu gesunden Wurfgeschwistern durch (*Col4α3*^{+/+}).

Die urämen 9 Wochen alten *Col4α3*^{-/-} Mäuse zeigten eine ausgeprägte systemische Entzündung mit erhöhten Pentraxin-2 Werten im Serum, vermehrten aktivierten CD4 und CD8 positiven T-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen, vermehrten TH₁- und TH₁₇-Zellen sowie verminderten regulatorischen T-Zellen. Diese systemische Entzündung war mit einer qualitativen und quantitativen Dysbiose, intestinalen Entzündung mit Neutrophileninfiltration und erhöhten sIgA Konzentrationen im Mukus, Translokation von lebenden Bakterien über die Darmbarriere in die Leber sowie erhöhtem bakteriellem Endotoxin im Serum assoziiert.

Um die Kausalität zwischen systemischer Entzündung und Dysbiose zu überprüfen, führten wir in einer Gruppe *Col4α3*^{-/-} Mäuse mit einer antibiotischen Therapie eine signifikante Reduktion der Darmflora durch. Diese Eradikation führte zu signifikant verminderten Endotoxinwerten im Serum und einer Restitution der systemischen Entzündung.

Somit können wir schlussfolgern, dass Urämie mit einer intestinalen Entzündung und Dysbiose vergesellschaftet ist und dass diese sowie eine bakterielle Translokation für die systemische Entzündung in chronischer Niereninsuffizienz verantwortlich sind.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Anders, H.J., K. Andersen, and B. Stecher, *The intestinal microbiota, a leaky gut, and abnormal immunity in kidney disease*. *Kidney Int*, 2013. **83**(6): p. 1010-6.
2. Akchurin, O.M. and F. Kaskel, *Update on inflammation in chronic kidney disease*. *Blood Purif*, 2015. **39**(1-3): p. 84-92.
3. Coresh, J., et al., *Prevalence of chronic kidney disease in the United States*. *JAMA*, 2007. **298**(17): p. 2038-47.
4. NKF, N.K.F., *KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease* http://www.kdigo.org/clinical_practice_guidelines/pdf/CKD/KDIGO_2012_CKD_GL.pdf. *Kidney International*, 2013. **3**(1).
5. NKF, N.K.F., *Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease*. *Kidney international*, 2012. http://www.kdigo.org/clinical_practice_guidelines/pdf/CKD/KDIGO_2012_CKD_GL.pdf.
6. Statistisches Bundesamt, Z.B. *Krankenhausstatistik, Todesursachenstatistik, Krankheitskostenrechnung*. Gesundheitsberichtserstattung des Bundes 2014; Available from: <http://www.gbe-bund.de/stichworte/Niereninsuffizienz.html>.
7. Nephrologie, D.G.f., *Dialyse* <http://www.dgfn.eu/presse/downloadbereich/dialyse.html>, 2014.
8. Foley, R.N., P.S. Parfrey, and M.J. Sarnak, *Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease*. *Am J Kidney Dis*, 1998. **32**(5 Suppl 3): p. S112-9.
9. Sarnak, M.J. and B.L. Jaber, *Mortality caused by sepsis in patients with end-stage renal disease compared with the general population*. *Kidney Int*, 2000. **58**(4): p. 1758-64.
10. Hudson, B.G., S.T. Reeders, and K. Tryggvason, *Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(35): p. 26033-6.
11. Hudson, B.G., et al., *Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(25): p. 2543-56.
12. Heidet, L. and M.C. Gubler, *The renal lesions of Alport syndrome*. *J Am Soc Nephrol*, 2009. **20**(6): p. 1210-5.
13. Jedlicka, J., et al., *Interstitial inflammation in Alport syndrome*. *Hum Pathol*, 2010. **41**(4): p. 582-93.
14. Atkin, C.L., et al., *Mapping of Alport syndrome to the long arm of the X chromosome*. *Am J Hum Genet*, 1988. **42**(2): p. 249-55.
15. Barker, D.F., et al., *Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome*. *Science*, 1990. **248**(4960): p. 1224-7.
16. Lemmink, H.H., et al., *Mutations in the type IV collagen alpha 3 (COL4A3) gene in autosomal recessive Alport syndrome*. *Hum Mol Genet*, 1994. **3**(8): p. 1269-73.
17. Mochizuki, T., et al., *Identification of mutations in the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome*. *Nat Genet*, 1994. **8**(1): p. 77-81.

18. Pescucci, C., et al., *Autosomal-dominant Alport syndrome: natural history of a disease due to COL4A3 or COL4A4 gene*. *Kidney Int*, 2004. **65**(5): p. 1598-603.
19. Cosgrove, D., et al., *Collagen COL4A3 knockout: a mouse model for autosomal Alport syndrome*. *Genes Dev*, 1996. **10**(23): p. 2981-92.
20. Rheault, M.N., et al., *Mouse model of X-linked Alport syndrome*. *J Am Soc Nephrol*, 2004. **15**(6): p. 1466-74.
21. Gross, O., et al., *Stem cell therapy for Alport syndrome: the hope beyond the hype*. *Nephrol Dial Transplant*, 2009. **24**(3): p. 731-4.
22. L. Rink, A.K., H. Haase, *Immunologie für Einsteiger*. © Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2015.
23. Murphy, K., et al., *Janeway's immunobiology*. 8th ed. 2012, New York: Garland Science. xix, 868 p.
24. Dembic, Z., *Cytokines of the immune system : the role of cytokines in disease related to immune response*. 2015, Boston, MA: Elsevier. pages cm.
25. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 197-216.
26. Williams, A., T. Hussell, and C. Lloyd, *Immunology : mucosal and body surface defences*, in *Basic Concepts in Immunology, The Innate Immunesystem, The Adaptive Immesystem*. 2012, Wiley-Blackwell: Chichester, West Sussex ; Hoboken, NJ. p. 1-67.
27. O'Neill, L.A., D. Golenbock, and A.G. Bowie, *The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2013. **13**(6): p. 453-60.
28. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(5): p. 373-84.
29. Dinarello, C.A., *Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response*. *N Engl J Med*, 1984. **311**(22): p. 1413-8.
30. Pontoglio, M., et al., *Hepatocyte nuclear factor 1alpha controls the expression of terminal complement genes*. *J Exp Med*, 2001. **194**(11): p. 1683-9.
31. Carroll, M.C., *The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity*. *Annu Rev Immunol*, 1998. **16**: p. 545-68.
32. Mason, D., *Leucocyte typing VII : white cell differentiation antigens : proceedings of the Seventh International Workshop and Conference held in Harrogate, United Kindom*. 2002, Oxford: Oxford University Press. Ixiv, 945 p.
33. Reis e Sousa, C., *Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity*. *Curr Opin Immunol*, 2004. **16**(1): p. 21-5.
34. Baumjohann, D. and K.M. Ansel, *MicroRNA-mediated regulation of T helper cell differentiation and plasticity*. *Nat Rev Immunol*, 2013. **13**(9): p. 666-78.
35. Korn, T., et al., *IL-17 and Th17 Cells*. *Annu Rev Immunol*, 2009. **27**: p. 485-517.
36. van der Meer, J.W. and M.G. Netea, *A salty taste to autoimmunity*. *N Engl J Med*, 2013. **368**(26): p. 2520-1.
37. Chen, Z., et al., *FOXP3 and RORgammat: transcriptional regulation of Treg and Th17*. *Int Immunopharmacol*, 2011. **11**(5): p. 536-42.
38. Nemazee, D., *Receptor editing in B cells*. *Adv Immunol*, 2000. **74**: p. 89-126.
39. Klein, L., et al., *Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(12): p. 833-44.
40. Stenvinkel, P., et al., *Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure*. *Kidney Int*, 1999. **55**(5): p. 1899-911.
41. Wanner, C., C. Drechsler, and V. Krane, *C-reactive protein and uremia*. *Semin Dial*, 2009. **22**(4): p. 438-41.

42. Zimmermann, J., et al., *Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients*. *Kidney Int*, 1999. **55**(2): p. 648-58.
43. Kramer, H., et al., *Association between chronic kidney disease and coronary artery calcification: the Dallas Heart Study*. *J Am Soc Nephrol*, 2005. **16**(2): p. 507-13.
44. Budoff, M.J., et al., *Relationship of estimated GFR and coronary artery calcification in the CRIC (Chronic Renal Insufficiency Cohort) Study*. *Am J Kidney Dis*, 2011. **58**(4): p. 519-26.
45. Bazeley, J., et al., *C-reactive protein and prediction of 1-year mortality in prevalent hemodialysis patients*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2011. **6**(10): p. 2452-61.
46. Kato, S., et al., *Aspects of immune dysfunction in end-stage renal disease*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2008. **3**(5): p. 1526-33.
47. Cohen, S.D., et al., *Cytokine patterns and survival in haemodialysis patients*. *Nephrol Dial Transplant*, 2010. **25**(4): p. 1239-43.
48. Honda, H., et al., *Serum albumin, C-reactive protein, interleukin 6, and fetuin a as predictors of malnutrition, cardiovascular disease, and mortality in patients with ESRD*. *Am J Kidney Dis*, 2006. **47**(1): p. 139-48.
49. Gupta, J., et al., *Association between albuminuria, kidney function, and inflammatory biomarker profile in CKD in CRIC*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2012. **7**(12): p. 1938-46.
50. Goldstein, S.L., J.C. Leung, and D.M. Silverstein, *Pro- and anti-inflammatory cytokines in chronic pediatric dialysis patients: effect of aspirin*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2006. **1**(5): p. 979-86.
51. Eleftheriadis, T., et al., *Disturbances of acquired immunity in hemodialysis patients*. *Semin Dial*, 2007. **20**(5): p. 440-51.
52. Sester, U., et al., *T-cell activation follows Th1 rather than Th2 pattern in haemodialysis patients*. *Nephrol Dial Transplant*, 2000. **15**(8): p. 1217-23.
53. Meuer, S.C., et al., *Selective blockade of the antigen-receptor-mediated pathway of T cell activation in patients with impaired primary immune responses*. *J Clin Invest*, 1987. **80**(3): p. 743-9.
54. Ando, M., et al., *Impairment of innate cellular response to in vitro stimuli in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis*. *Nephrol Dial Transplant*, 2005. **20**(11): p. 2497-503.
55. Stenvinkel, P., et al., *IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly*. *Kidney Int*, 2005. **67**(4): p. 1216-33.
56. Wagner, M., et al., *Endogenous erythropoietin and the association with inflammation and mortality in diabetic chronic kidney disease*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2011. **6**(7): p. 1573-9.
57. Panuccio, V., et al., *Pro-inflammatory cytokines and bone fractures in CKD patients. An exploratory single centre study*. *BMC Nephrol*, 2012. **13**: p. 134.
58. Feroze, U., et al., *Insights into nutritional and inflammatory aspects of low parathyroid hormone in dialysis patients*. *J Ren Nutr*, 2011. **21**(1): p. 100-4.
59. Kalantar-Zadeh, K., et al., *Revisiting mortality predictability of serum albumin in the dialysis population: time dependency, longitudinal changes and population-attributable fraction*. *Nephrol Dial Transplant*, 2005. **20**(9): p. 1880-8.
60. de Mutsert, R., et al., *Association between serum albumin and mortality in dialysis patients is partly explained by inflammation, and not by malnutrition*. *J Ren Nutr*, 2009. **19**(2): p. 127-35.

61. Carrero, J.J. and P. Stenvinkel, *Inflammation in end-stage renal disease--what have we learned in 10 years?* Semin Dial, 2010. **23**(5): p. 498-509.
62. Henderson IS, K.K., Dinarello CA, Shaldon S, *Hemodialysis hypotension: the interleukin hypothesis.* Blood Purif, 1983. **1**: p. 3-8.
63. Carrero, J.J. and P. Stenvinkel, *Persistent inflammation as a catalyst for other risk factors in chronic kidney disease: a hypothesis proposal.* Clin J Am Soc Nephrol, 2009. **4 Suppl 1**: p. S49-55.
64. Memoli, B., et al., *Changes of serum albumin and C-reactive protein are related to changes of interleukin-6 release by peripheral blood mononuclear cells in hemodialysis patients treated with different membranes.* Am J Kidney Dis, 2002. **39**(2): p. 266-73.
65. Schindler, R., et al., *Short bacterial DNA fragments: detection in dialysate and induction of cytokines.* J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(12): p. 3207-14.
66. Friedrich, B., et al., *Acute effects of hemodialysis on cytokine transcription profiles: evidence for C-reactive protein-dependency of mediator induction.* Kidney Int, 2006. **70**(12): p. 2124-30.
67. Barreto, D.V., et al., *Plasma interleukin-6 is independently associated with mortality in both hemodialysis and pre-dialysis patients with chronic kidney disease.* Kidney Int, 2010. **77**(6): p. 550-6.
68. Rosengren, B.I., et al., *Isolation of interstitial fluid and demonstration of local proinflammatory cytokine production and increased absorptive gradient in chronic peritoneal dialysis.* Am J Physiol Renal Physiol, 2013. **304**(2): p. F198-206.
69. Kim, H.J. and N.D. Vaziri, *Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure.* Am J Physiol Renal Physiol, 2010. **298**(3): p. F662-71.
70. Prats, M., et al., *Oxidative stress markers in predicting response to treatment with ferric carboxymaltose in nondialysis chronic kidney disease patients.* Clin Nephrol, 2014. **81**(6): p. 419-26.
71. Nassar, G.M., *Preventing and treating inflammation: role of dialysis access management.* Semin Dial, 2013. **26**(1): p. 28-30.
72. Buhlin, K., et al., *Oral health and pro-inflammatory status in end-stage renal disease patients.* Oral Health Prev Dent, 2007. **5**(3): p. 235-44.
73. Kshirsagar, A.V., et al., *Periodontal disease adversely affects the survival of patients with end-stage renal disease.* Kidney Int, 2009. **75**(7): p. 746-51.
74. McIntyre, C.W., et al., *Circulating endotoxemia: a novel factor in systemic inflammation and cardiovascular disease in chronic kidney disease.* Clin J Am Soc Nephrol, 2011. **6**(1): p. 133-41.
75. Sekirov, I. and B.B. Finlay, *Human and microbe: united we stand.* Nat Med, 2006. **12**(7): p. 736-7.
76. Sender, R., S. Fuchs, and R. Milo, *Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans.* Cell, 2016. **164**(3): p. 337-40.
77. Bocci, V., *The neglected organ: bacterial flora has a crucial immunostimulatory role.* Perspect Biol Med, 1992. **35**(2): p. 251-60.
78. Cerf-Bensussan, N. and G. Eberl, *The dialog between microbiota and the immune system: shaping the partners through development and evolution.* Semin Immunol, 2012. **24**(1): p. 1-2.
79. Iebba, V., et al., *Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota.* New Microbiol, 2016. **39**(1): p. 1-12.

80. Hooper, L.V., T. Midtvedt, and J.I. Gordon, *How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine*. *Annu Rev Nutr*, 2002. **22**: p. 283-307.
81. Tremaroli, V. and F. Backhed, *Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism*. *Nature*, 2012. **489**(7415): p. 242-9.
82. Gronlund, M.M., et al., *Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1999. **28**(1): p. 19-25.
83. Xu, J. and J.I. Gordon, *Honor thy symbionts*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(18): p. 10452-9.
84. Hooper, L.V., et al., *Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine*. *Science*, 2001. **291**(5505): p. 881-4.
85. Hopkins, M.J., R. Sharp, and G.T. Macfarlane, *Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles*. *Gut*, 2001. **48**(2): p. 198-205.
86. Rawls, J.F., et al., *Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection*. *Cell*, 2006. **127**(2): p. 423-33.
87. Frank, D.N., et al., *Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(34): p. 13780-5.
88. Eckburg, P.B., et al., *Diversity of the human intestinal microbial flora*. *Science*, 2005. **308**(5728): p. 1635-8.
89. Zoetendal, E.G., M. Rajilic-Stojanovic, and W.M. de Vos, *High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota*. *Gut*, 2008. **57**(11): p. 1605-15.
90. Mariat, D., et al., *The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age*. *BMC Microbiol*, 2009. **9**: p. 123.
91. Arumugam, M., et al., *Enterotypes of the human gut microbiome*. *Nature*, 2011. **473**(7346): p. 174-80.
92. Farquhar, M.G. and G.E. Palade, *Junctional complexes in various epithelia*. *J Cell Biol*, 1963. **17**: p. 375-412.
93. Williams, A., T. Hussell, and C. Lloyd, *Immunology : mucosal and body surface defences*, in *Immunology of the Gastrointestinal Tract*. 2012, Wiley-Blackwell: Chichester, West Sussex ; Hoboken, NJ. p. 133-155.
94. Momose, Y., K. Hirayama, and K. Itoh, *Competition for proline between indigenous Escherichia coli and E. coli O157:H7 in gnotobiotic mice associated with infant intestinal microbiota and its contribution to the colonization resistance against E. coli O157:H7*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2008. **94**(2): p. 165-71.
95. Momose, Y., K. Hirayama, and K. Itoh, *Effect of organic acids on inhibition of Escherichia coli O157:H7 colonization in gnotobiotic mice associated with infant intestinal microbiota*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2008. **93**(1-2): p. 141-9.
96. Leatham, M.P., et al., *Precolonized human commensal Escherichia coli strains serve as a barrier to E. coli O157:H7 growth in the streptomycin-treated mouse intestine*. *Infect Immun*, 2009. **77**(7): p. 2876-86.
97. O'Hara, A.M. and F. Shanahan, *The gut flora as a forgotten organ*. *EMBO Rep*, 2006. **7**(7): p. 688-93.
98. Kamada, N. and G. Nunez, *Regulation of the immune system by the resident intestinal bacteria*. *Gastroenterology*, 2014. **146**(6): p. 1477-88.

99. Ulluwishewa, D., et al., *Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components*. J Nutr, 2011. **141**(5): p. 769-76.
100. Shanahan, F., *The host-microbe interface within the gut*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2002. **16**(6): p. 915-31.
101. Kamada, N., et al., *Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(5): p. 321-35.
102. Molloy, M.J., N. Bouladoux, and Y. Belkaid, *Intestinal microbiota: shaping local and systemic immune responses*. Semin Immunol, 2012. **24**(1): p. 58-66.
103. Macpherson, A.J. and N.L. Harris, *Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(6): p. 478-85.
104. Ivanov, II, et al., *Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine*. Cell Host Microbe, 2008. **4**(4): p. 337-49.
105. Atarashi, K., et al., *ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation*. Nature, 2008. **455**(7214): p. 808-12.
106. Atarashi, K., et al., *Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species*. Science, 2011. **331**(6015): p. 337-41.
107. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
108. Sun, C.M., et al., *Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1775-85.
109. Powrie, F., et al., *Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice*. Int Immunol, 1993. **5**(11): p. 1461-71.
110. Littman, D.R. and A.Y. Rudensky, *Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation*. Cell, 2010. **140**(6): p. 845-58.
111. Weaver, C.T., et al., *The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin*. Annu Rev Pathol, 2013. **8**: p. 477-512.
112. Peterson, D.A., et al., *IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis*. Cell Host Microbe, 2007. **2**(5): p. 328-39.
113. Kubinak, J.L., et al., *MyD88 signaling in T cells directs IgA-mediated control of the microbiota to promote health*. Cell Host Microbe, 2015. **17**(2): p. 153-63.
114. Honda, K. and D.R. Littman, *The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease*. Nature, 2016. **535**(7610): p. 75-84.
115. Meyer-Hoffert, U., et al., *Secreted enteric antimicrobial activity localises to the mucus surface layer*. Gut, 2008. **57**(6): p. 764-71.
116. Cario, E., *Toll-like receptors and gastrointestinal diseases: from bench to bedside?* Curr Opin Gastroenterol, 2002. **18**(6): p. 696-704.
117. Hayden, M.S., A.P. West, and S. Ghosh, *NF-kappaB and the immune response*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6758-80.
118. Abreu, M.T., M. Fukata, and M. Arditi, *TLR signaling in the gut in health and disease*. J Immunol, 2005. **174**(8): p. 4453-60.
119. Fukata, M., et al., *Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. **288**(5): p. G1055-65.
120. Neish, A.S., *Microbes in gastrointestinal health and disease*. Gastroenterology, 2009. **136**(1): p. 65-80.

121. Haller, D., *Intestinal epithelial cell signalling and host-derived negative regulators under chronic inflammation: to be or not to be activated determines the balance towards commensal bacteria*. Neurogastroenterol Motil, 2006. **18**(3): p. 184-99.
122. Winter, S.E., et al., *Host-derived nitrate boosts growth of E. coli in the inflamed gut*. Science, 2013. **339**(6120): p. 708-11.
123. Kranich, J., K.M. Maslowski, and C.R. Mackay, *Commensal flora and the regulation of inflammatory and autoimmune responses*. Semin Immunol, 2011. **23**(2): p. 139-45.
124. McFarland, L.V., *Antibiotic-associated diarrhea: epidemiology, trends and treatment*. Future Microbiol, 2008. **3**(5): p. 563-78.
125. Amendola, A., et al., *Nod2 deficiency is associated with an increased mucosal immunoregulatory response to commensal microorganisms*. Mucosal Immunol, 2014. **7**(2): p. 391-404.
126. Strober, W., et al., *Cellular and molecular mechanisms underlying NOD2 risk-associated polymorphisms in Crohn's disease*. Immunol Rev, 2014. **260**(1): p. 249-60.
127. Parekh, P.J., L.A. Balart, and D.A. Johnson, *The Influence of the Gut Microbiome on Obesity, Metabolic Syndrome and Gastrointestinal Disease*. Clin Transl Gastroenterol, 2015. **6**: p. e91.
128. Verbrugge, F.H., et al., *Abdominal contributions to cardiorenal dysfunction in congestive heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2013. **62**(6): p. 485-95.
129. Olszak, T., et al., *Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function*. Science, 2012. **336**(6080): p. 489-93.
130. Schippa, S., et al., *A distinctive 'microbial signature' in celiac pediatric patients*. BMC Microbiol, 2010. **10**: p. 175.
131. Wen, L., et al., *Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1109-13.
132. Ochoa-Reparaz, J., et al., *Role of gut commensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2009. **183**(10): p. 6041-50.
133. Lee, Y.K., et al., *Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108 Suppl 1**: p. 4615-22.
134. Simenhoff, M.L., et al., *Amine metabolism and the small bowel in uraemia*. Lancet, 1976. **2**(7990): p. 818-21.
135. Simenhoff, M.L., et al., *Bacterial populations of the small intestine in uremia*. Nephron, 1978. **22**(1-3): p. 63-8.
136. Maloy, K.J. and F. Powrie, *Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease*. Nature, 2011. **474**(7351): p. 298-306.
137. Lutz, P., et al., *Spontaneous bacterial peritonitis: The clinical challenge of a leaky gut and a cirrhotic liver*. World J Hepatol, 2015. **7**(3): p. 304-14.
138. Fink, M.P., *Leaky gut hypothesis: a historical perspective*. Crit Care Med, 1990. **18**(5): p. 579-80.
139. Herold, G., *Innere Medizin*. 2013. p. 600-656.
140. Colombo, P.C., et al., *Inflammatory activation: cardiac, renal, and cardio-renal interactions in patients with the cardiorenal syndrome*. Heart Fail Rev, 2012. **17**(2): p. 177-90.
141. Lee, Y.T., *Urea concentration in intestinal fluids in normal and uremic dogs*. J Surg Oncol, 1971. **3**(2): p. 163-8.
142. Vaziri, N.D., et al., *Pathology of gastrointestinal tract in chronic hemodialysis patients: an autopsy study of 78 cases*. Am J Gastroenterol, 1985. **80**(8): p. 608-11.

143. Lau, W.L., K. Kalantar-Zadeh, and N.D. Vaziri, *The Gut as a Source of Inflammation in Chronic Kidney Disease*. Nephron, 2015. **130**(2): p. 92-8.
144. Poesen, R., et al., *Associations of Soluble CD14 and Endotoxin with Mortality, Cardiovascular Disease, and Progression of Kidney Disease among Patients with CKD*. Clin J Am Soc Nephrol, 2015. **10**(9): p. 1525-33.
145. Wang, F., et al., *Gut bacterial translocation is associated with microinflammation in end-stage renal disease patients*. Nephrology (Carlton), 2012. **17**(8): p. 733-8.
146. Ninichuk, V., et al., *Delayed chemokine receptor 1 blockade prolongs survival in collagen 4A3-deficient mice with Alport disease*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(4): p. 977-85.
147. Schock-Kusch, D., et al., *Reliability of transcutaneous measurement of renal function in various strains of conscious mice*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e71519.
148. Schock-Kusch, D., et al., *Transcutaneous measurement of glomerular filtration rate using FITC-sinistrin in rats*. Nephrol Dial Transplant, 2009. **24**(10): p. 2997-3001.
149. Schock-Kusch, D., et al., *Transcutaneous assessment of renal function in conscious rats with a device for measuring FITC-sinistrin disappearance curves*. Kidney Int, 2011. **79**(11): p. 1254-8.
150. Schreiber, A., et al., *Transcutaneous measurement of renal function in conscious mice*. Am J Physiol Renal Physiol, 2012. **303**(5): p. F783-8.
151. Yu, W., R.M. Sandoval, and B.A. Molitoris, *Rapid determination of renal filtration function using an optical ratiometric imaging approach*. Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **292**(6): p. F1873-80.
152. Fox, G.E., et al., *Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(10): p. 4537-41.
153. Woese, C.R. and G.E. Fox, *Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(11): p. 5088-90.
154. Andersen, K., et al., *Intestinal Dysbiosis, Barrier Dysfunction, and Bacterial Translocation Account for CKD-Related Systemic Inflammation*. J Am Soc Nephrol, 2016.
155. Gronbach, K., et al., *Endotoxicity of lipopolysaccharide as a determinant of T-cell-mediated colitis induction in mice*. Gastroenterology, 2014. **146**(3): p. 765-75.
156. Lozupone, C., et al., *UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison*. ISME J, 2011. **5**(2): p. 169-72.
157. Nymark, M., et al., *Serum lipopolysaccharide activity is associated with the progression of kidney disease in finnish patients with type 1 diabetes*. Diabetes Care, 2009. **32**(9): p. 1689-93.
158. Tsuchiya, M., et al., *Detection of peptidoglycan and beta-glucan with silkworm larvae plasma test*. FEMS Immunol Med Microbiol, 1996. **15**(2-3): p. 129-34.
159. Lequin, R.M., *Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. Clin Chem, 2005. **51**(12): p. 2415-8.
160. Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., Myrtek, D., *Der Experimentator: Immunologie*. 2014, Springer. p. 73-101.
161. Universität Mainz, I.f.T. *Was ist Durchflusszytometrie?* 2016; Available from: <http://www.unimedizin-mainz.de/toxikologie/facs-und-array-core-facility/was-ist-zytometrie.html?type=98>.
162. Bioscience, B. *Einführung in die Durchflußzytometrie*. 2000; Available from: <http://genome.tugraz.at/GrundlBiomTechnik/FACS.pdf>.

163. Sheridan, B.S. and L. Lefrancois, *Isolation of mouse lymphocytes from small intestine tissues*. Curr Protoc Immunol, 2012. **Chapter 3**: p. Unit3 19.
164. Bustin, S.A., et al., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clin Chem, 2009. **55**(4): p. 611-22.
165. M. Knoll, E.R., *Das Elektronenmikroskop*. Zeitschrift für Physik A, 1932. **78**: p. 318-339.
166. Applied BioPhysics, I., *ECIS Theory*. <http://www.biophysics.com/ecis-theory.php>.
167. Tiron, A. and C. Vasilescu, *[Role of the spleen in immunity. Immunologic consequences of splenectomy]*. Chirurgia (Bucur), 2008. **103**(3): p. 255-63.
168. Diller, M.L., et al., *Balancing Inflammation: The Link between Th17 and Regulatory T Cells*. Mediators Inflamm, 2016. **2016**: p. 6309219.
169. Ahern, P.P., et al., *The interleukin-23 axis in intestinal inflammation*. Immunol Rev, 2008. **226**: p. 147-59.
170. Cua, D.J., et al., *Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain*. Nature, 2003. **421**(6924): p. 744-8.
171. McKenzie, B.S., R.A. Kastelein, and D.J. Cua, *Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway*. Trends Immunol, 2006. **27**(1): p. 17-23.
172. Wu, H.J., et al., *Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells*. Immunity, 2010. **32**(6): p. 815-27.
173. Ivanov, II, et al., *Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria*. Cell, 2009. **139**(3): p. 485-98.
174. Rooks, M.G. and W.S. Garrett, *Gut microbiota, metabolites and host immunity*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(6): p. 341-52.
175. Zhou, L., et al., *IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways*. Nat Immunol, 2007. **8**(9): p. 967-74.
176. Veldhoen, M., et al., *TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells*. Immunity, 2006. **24**(2): p. 179-89.
177. Zhou, L., et al., *TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function*. Nature, 2008. **453**(7192): p. 236-40.
178. Pabst, O., V. Cerovic, and M. Hornef, *Secretory IgA in the Coordination of Establishment and Maintenance of the Microbiota*. Trends Immunol, 2016. **37**(5): p. 287-96.
179. Friman, V., et al., *Increased frequency of intestinal Escherichia coli carrying genes for S fimbriae and haemolysin in IgA-deficient individuals*. Microb Pathog, 2002. **32**(1): p. 35-42.
180. Bunker, J.J., et al., *Innate and Adaptive Humoral Responses Coat Distinct Commensal Bacteria with Immunoglobulin A*. Immunity, 2015. **43**(3): p. 541-53.
181. Palm, N.W., et al., *Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease*. Cell, 2014. **158**(5): p. 1000-10.
182. Lindner, C., et al., *Diversification of memory B cells drives the continuous adaptation of secretory antibodies to gut microbiota*. Nat Immunol, 2015. **16**(8): p. 880-8.
183. Hirota, K., et al., *Plasticity of Th17 cells in Peyer's patches is responsible for the induction of T cell-dependent IgA responses*. Nat Immunol, 2013. **14**(4): p. 372-9.
184. Smith, P.M., et al., *The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis*. Science, 2013. **341**(6145): p. 569-73.
185. Arpaia, N., et al., *Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation*. Nature, 2013. **504**(7480): p. 451-5.
186. Furusawa, Y., et al., *Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells*. Nature, 2013. **504**(7480): p. 446-50.

187. Vaziri, N.D., et al., *Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora*. *Kidney Int*, 2013. **83**(2): p. 308-15.
188. Simenhoff, M.L., et al., *Biomodulation of the toxic and nutritional effects of small bowel bacterial overgrowth in end-stage kidney disease using freeze-dried Lactobacillus acidophilus*. *Miner Electrolyte Metab*, 1996. **22**(1-3): p. 92-6.
189. Hida, M., et al., *Inhibition of the accumulation of uremic toxins in the blood and their precursors in the feces after oral administration of Lebenin, a lactic acid bacteria preparation, to uremic patients undergoing hemodialysis*. *Nephron*, 1996. **74**(2): p. 349-55.
190. Aronsson, B., et al., *Clostridium difficile-associated diarrhoea in uremic patients*. *Eur J Clin Microbiol*, 1987. **6**(3): p. 352-6.
191. Butto, L.F. and D. Haller, *Dysbiosis in intestinal inflammation: Cause or consequence*. *Int J Med Microbiol*, 2016. **306**(5): p. 302-9.
192. Krishnamurthy, V.M., et al., *High dietary fiber intake is associated with decreased inflammation and all-cause mortality in patients with chronic kidney disease*. *Kidney Int*, 2012. **81**(3): p. 300-6.
193. Kooman, J.P., F.M. van der Sande, and K.M. Leunissen, *Role of sodium and volume in the pathogenesis of hypertension in dialysis patients. Reflections on pathophysiological mechanisms*. *Blood Purif*, 2004. **22**(1): p. 55-9.
194. Kang, J.Y., *The gastrointestinal tract in uremia*. *Dig Dis Sci*, 1993. **38**(2): p. 257-68.
195. Hatch, M., R.W. Freel, and N.D. Vaziri, *Intestinal excretion of oxalate in chronic renal failure*. *J Am Soc Nephrol*, 1994. **5**(6): p. 1339-43.
196. Hatch, M. and N.D. Vaziri, *Enhanced enteric excretion of urate in rats with chronic renal failure*. *Clin Sci (Lond)*, 1994. **86**(5): p. 511-6.
197. Vaziri, N.D., R.W. Freel, and M. Hatch, *Effect of chronic experimental renal insufficiency on urate metabolism*. *J Am Soc Nephrol*, 1995. **6**(4): p. 1313-7.
198. Vaziri, N.D., J. Yuan, and K. Norris, *Role of urea in intestinal barrier dysfunction and disruption of epithelial tight junction in chronic kidney disease*. *Am J Nephrol*, 2013. **37**(1): p. 1-6.
199. Wong, J., et al., *Expansion of urease- and uricase-containing, indole- and p-cresol-forming and contraction of short-chain fatty acid-producing intestinal microbiota in ESRD*. *Am J Nephrol*, 2014. **39**(3): p. 230-7.
200. Aronov, P.A., et al., *Colonic contribution to uremic solutes*. *J Am Soc Nephrol*, 2011. **22**(9): p. 1769-76.
201. Ito, S. and M. Yoshida, *Protein-bound uremic toxins: new culprits of cardiovascular events in chronic kidney disease patients*. *Toxins (Basel)*, 2014. **6**(2): p. 665-78.
202. Bammens, B., et al., *Free serum concentrations of the protein-bound retention solute p-cresol predict mortality in hemodialysis patients*. *Kidney Int*, 2006. **69**(6): p. 1081-7.
203. Rossi, M., et al., *Protein-bound uremic toxins, inflammation and oxidative stress: a cross-sectional study in stage 3-4 chronic kidney disease*. *Arch Med Res*, 2014. **45**(4): p. 309-17.
204. Neal, M.D., et al., *Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier*. *J Immunol*, 2006. **176**(5): p. 3070-9.
205. Wiedermann, C.J., et al., *Association of endotoxemia with carotid atherosclerosis and cardiovascular disease: prospective results from the Bruneck Study*. *J Am Coll Cardiol*, 1999. **34**(7): p. 1975-81.
206. Goto, T., et al., *Endotoxin levels in sera of elderly individuals*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1994. **1**(6): p. 684-8.

207. Magnusson, M., et al., *Increased intestinal permeability to differently sized polyethylene glycols in uremic rats: effects of low- and high-protein diets*. Nephron, 1990. **56**(3): p. 306-11.
208. Magnusson, M., et al., *Impaired intestinal barrier function measured by differently sized polyethylene glycols in patients with chronic renal failure*. Gut, 1991. **32**(7): p. 754-9.
209. de Almeida Duarte, J.B., et al., *Bacterial translocation in experimental uremia*. Urol Res, 2004. **32**(4): p. 266-70.
210. Goncalves, S., et al., *Associations between renal function, volume status and endotoxaemia in chronic kidney disease patients*. Nephrol Dial Transplant, 2006. **21**(10): p. 2788-94.
211. Szeto, C.C., et al., *Endotoxemia is related to systemic inflammation and atherosclerosis in peritoneal dialysis patients*. Clin J Am Soc Nephrol, 2008. **3**(2): p. 431-6.
212. Vaziri, N.D., et al., *Chronic kidney disease causes disruption of gastric and small intestinal epithelial tight junction*. Am J Nephrol, 2013. **38**(2): p. 99-103.
213. Vaziri, N.D., et al., *Disintegration of colonic epithelial tight junction in uremia: a likely cause of CKD-associated inflammation*. Nephrol Dial Transplant, 2012. **27**(7): p. 2686-93.
214. Wang, F., et al., *Gut bacterial translocation contributes to microinflammation in experimental uremia*. Dig Dis Sci, 2012. **57**(11): p. 2856-62.
215. Sun, L., et al., *Macrophages Are Involved in Gut Bacterial Translocation and Reversed by Lactobacillus in Experimental Uremia*. Dig Dis Sci, 2016. **61**(6): p. 1534-44.
216. Rahman, S.H., et al., *Intestinal hypoperfusion contributes to gut barrier failure in severe acute pancreatitis*. J Gastrointest Surg, 2003. **7**(1): p. 26-35; discussion 35-6.
217. Mulay, S.R., et al., *Cytotoxicity of crystals involves RIPK3-MLKL-mediated necroptosis*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 10274.
218. Vaziri, N.D., et al., *Effect of uremia on structure and function of immune system*. J Ren Nutr, 2012. **22**(1): p. 149-56.
219. Vaziri, N.D., Y.Y. Zhao, and M.V. Pahl, *Altered intestinal microbial flora and impaired epithelial barrier structure and function in CKD: the nature, mechanisms, consequences and potential treatment*. Nephrol Dial Transplant, 2016. **31**(5): p. 737-46.
220. Guarner, F., *Hygiene, microbial diversity and immune regulation*. Curr Opin Gastroenterol, 2007. **23**(6): p. 667-72.
221. Toivanen, P., *Normal intestinal microbiota in the aetiopathogenesis of rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2003. **62**(9): p. 807-11.
222. Perez-Cobas, A.E., et al., *Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach*. Gut, 2013. **62**(11): p. 1591-601.
223. Manichanh, C., et al., *Reshaping the gut microbiome with bacterial transplantation and antibiotic intake*. Genome Res, 2010. **20**(10): p. 1411-9.
224. Gibson, G.R., et al., *Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics*. Nutr Res Rev, 2004. **17**(2): p. 259-75.
225. Gibson, G.R. and M.B. Roberfroid, *Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics*. J Nutr, 1995. **125**(6): p. 1401-12.
226. Silk, D.B., et al., *Clinical trial: the effects of a trans-galactooligosaccharide prebiotic on faecal microbiota and symptoms in irritable bowel syndrome*. Aliment Pharmacol Ther, 2009. **29**(5): p. 508-18.
227. Cani, P.D., et al., *Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance*. Diabetes, 2007. **56**(7): p. 1761-72.

228. Gibson, G.R., et al., *Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin*. Gastroenterology, 1995. **108**(4): p. 975-82.
229. Sirich, T.L., et al., *Effect of increasing dietary fiber on plasma levels of colon-derived solutes in hemodialysis patients*. Clin J Am Soc Nephrol, 2014. **9**(9): p. 1603-10.
230. Meijers, B.K., et al., *p-Cresyl sulfate serum concentrations in haemodialysis patients are reduced by the prebiotic oligofructose-enriched inulin*. Nephrol Dial Transplant, 2010. **25**(1): p. 219-24.
231. Bliss, D.Z., et al., *Supplementation with gum arabic fiber increases fecal nitrogen excretion and lowers serum urea nitrogen concentration in chronic renal failure patients consuming a low-protein diet*. Am J Clin Nutr, 1996. **63**(3): p. 392-8.
232. Al-Mosawi, A.J., *Acacia gum supplementation of a low-protein diet in children with end-stage renal disease*. Pediatr Nephrol, 2004. **19**(10): p. 1156-9.
233. Fuller, R., *Probiotics in man and animals*. J Appl Bacteriol, 1989. **66**(5): p. 365-78.
234. Rastall, R.A., et al., *Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: an overview of enabling science and potential applications*. FEMS Microbiol Ecol, 2005. **52**(2): p. 145-52.
235. Konstantinov, S.R., et al., *S layer protein A of Lactobacillus acidophilus NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(49): p. 19474-9.
236. van Baarlen, P., et al., *Differential NF-kappaB pathways induction by Lactobacillus plantarum in the duodenum of healthy humans correlating with immune tolerance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(7): p. 2371-6.
237. Ranganathan, N., et al., *Probiotic amelioration of azotemia in 5/6th nephrectomized Sprague-Dawley rats*. ScientificWorldJournal, 2005. **5**: p. 652-60.
238. Prakash, S. and T.M. Chang, *Microencapsulated genetically engineered live E. coli DH5 cells administered orally to maintain normal plasma urea level in uremic rats*. Nat Med, 1996. **2**(8): p. 883-7.
239. Chen, L., et al., *Lactobacillus acidophilus ATCC 4356 attenuates the atherosclerotic progression through modulation of oxidative stress and inflammatory process*. Int Immunopharmacol, 2013. **17**(1): p. 108-15.
240. Wang, I.K., et al., *The effect of probiotics on serum levels of cytokine and endotoxin in peritoneal dialysis patients: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. Benef Microbes, 2015. **6**(4): p. 423-30.
241. Yacoub, R., et al., *Association between probiotic and yogurt consumption and kidney disease: insights from NHANES*. Nutr J, 2016. **15**: p. 10.
242. Rossi, M., et al., *Synbiotics Easing Renal Failure by Improving Gut Microbiology (SYNERGY): A Randomized Trial*. Clin J Am Soc Nephrol, 2016. **11**(2): p. 223-31.
243. Guida, B., et al., *Effect of short-term synbiotic treatment on plasma p-cresol levels in patients with chronic renal failure: a randomized clinical trial*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2014. **24**(9): p. 1043-9.
244. Rohlke, F. and N. Stollman, *Fecal microbiota transplantation in relapsing Clostridium difficile infection*. Therap Adv Gastroenterol, 2012. **5**(6): p. 403-20.
245. Persky, S.E. and L.J. Brandt, *Treatment of recurrent Clostridium difficile-associated diarrhea by administration of donated stool directly through a colonoscope*. Am J Gastroenterol, 2000. **95**(11): p. 3283-5.
246. Singh, R., et al., *Donor feces infusion for eradication of Extended Spectrum beta-Lactamase producing Escherichia coli in a patient with end stage renal disease*. Clin Microbiol Infect, 2014. **20**(11): p. O977-8.

247. Khoury, T., et al., *The gut-kidney axis in chronic renal failure: A new potential target for therapy*. Hemodial Int, 2016.
248. Maslowski, K.M. and C.R. Mackay, *Diet, gut microbiota and immune responses*. Nat Immunol, 2011. **12**(1): p. 5-9.
249. Thorburn, A.N., et al., *Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 7320.
250. Tao, R., et al., *Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells*. Nat Med, 2007. **13**(11): p. 1299-307.
251. Willemsen, L.E., et al., *Short chain fatty acids stimulate epithelial mucin 2 expression through differential effects on prostaglandin E(1) and E(2) production by intestinal myofibroblasts*. Gut, 2003. **52**(10): p. 1442-7.
252. Gaudier, E., et al., *Butyrate specifically modulates MUC gene expression in intestinal epithelial goblet cells deprived of glucose*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **287**(6): p. G1168-74.
253. Wrzosek, L., et al., *Bacteroides thetaiotaomicron and Faecalibacterium prausnitzii influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent*. BMC Biol, 2013. **11**: p. 61.
254. Fukuda, S., et al., *Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate*. Nature, 2011. **469**(7331): p. 543-7.
255. Ito, S., et al., *Reduction of indoxyl sulfate by AST-120 attenuates monocyte inflammation related to chronic kidney disease*. J Leukoc Biol, 2013. **93**(6): p. 837-45.
256. Niwa, T., *Role of indoxyl sulfate in the progression of chronic kidney disease and cardiovascular disease: experimental and clinical effects of oral sorbent AST-120*. Ther Apher Dial, 2011. **15**(2): p. 120-4.
257. Al Khodor, S. and I.F. Shatat, *Gut microbiome and kidney disease: a bidirectional relationship*. Pediatr Nephrol, 2016.
258. Bolati, D., H. Shimizu, and T. Niwa, *AST-120 ameliorates epithelial-to-mesenchymal transition and interstitial fibrosis in the kidneys of chronic kidney disease rats*. J Ren Nutr, 2012. **22**(1): p. 176-80.
259. Nakamura, T., et al., *Oral adsorbent AST-120 ameliorates tubular injury in chronic renal failure patients by reducing proteinuria and oxidative stress generation*. Metabolism, 2011. **60**(2): p. 260-4.
260. Shibahara, H. and N. Shibahara, *Cardiorenal protective effect of the oral uremic toxin absorbent AST-120 in chronic heart disease patients with moderate CKD*. J Nephrol, 2010. **23**(5): p. 535-40.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APC	Antigen-presentig-cell/ Antigen-präsentierende-Zelle
AS	Alport Syndrom
BSA	Bovines Serum-Albumin
BCR	B-Zell-Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
CFU	Colony-forming-units
CKD	Chronic kidney disease
CNV	Chronischen Nirenversagen
CR	Komplement-Rezeptor
CRP	C-reaktives-Protein
CT	Cycle threshold
CTL	Zytotoxische-T-Zelle/ cytotoxic T-lymphocyte
DC	Dendritische Zelle
DEPC	Diethyldicarbonat
D.m.	Diabetes mellitus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECIS	electric cell substrate impedance sensing
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetales bovines Serum
FOXP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSGS	Fokal segmentale Glomerulosklerose
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GFM	Germfree mice
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HLA	Human Leukocyte Antigen
HRP	horseradish peroxidase
IL-(6)	Interleukin z.B. Interleukin-6
INF-(γ)	Interferon, z.B. Interferon- γ
kDa	Kilo dalton
KG	Körpergewicht
LB	lysogeny broth
LAL	Limulus-Amebocyte-Lysate
LPS	Lipopolysaccharid
M.	Morbus (z.B. M. Crohn)
MHC	Major Histocompatibility Complex
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK	natürliche Killerzellen

Abkürzungsverzeichnis

NOD	Nucleotide-binding oligomerisation domain-containing protein 2
OD	Optical density
PAMPs	pathogen associated molecular patterns
PAS	Perjodsäure Schiff
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PRRs	pattern recognition receptors
PTX	Pentraxin (z.B. PTX-2)
(real-time) PCR	(Real-time) Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RPM	Rounds per minute
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SCFAs	Kurzkettige Fettsäuren/ Short chain fatty acids
SEM	Standard error of the mean
SFB	Segmented filamentous bacteria
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TGF- β	Transforming growth factor β
THC	T-helper-cell/T-Helfer-Zelle
TLRs	Toll-like-Rezeptoren
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tregs	regulatorische T-Zellen
vs	Versus
ZO-1	Zonula Occludens 1

8. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG: MARIE SOPHIE JORINDE KESPER

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

SYSTEMISCHE ENTZÜNDUNG BEI CHRONISCHER NIERENINSUFFIZIENZ – DIE ROLLE DER DARMFLORA

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

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

Ort, Datum

Marie Sophie Jorinde Kesper

9. DANKSAGUNG

Zu allererst möchte ich einen herzlichen Dank an meinen Betreuer Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Anders richten, dessen Zielstrebigkeit und Verlässlichkeit ich den Abschluss dieser spannenden Arbeit zu verdanken habe. In einem so großen Projekt, das zunächst nur aus offenen Enden zu bestehen schien, bin ich ihm für diese Zielstrebigkeit, wie auch seine fachliche Kompetenz sehr dankbar.

Zudem möchte ich den übrigen Labormitgliedern und meiner Betreuerin Kirstin Andersen danken. Insbesondere möchte ich dabei Onkar Kulkarni, Shrikant Mulay, Sanstosh Kumar und Simone Romoli sowohl für ihre geduldige Einweisung in diverse Methoden als auch ihren steten Rat und Tat in vielen weiteren Belangen danken. Ohne ihre Hilfe und die aufmunternden Gespräche in so mancher Mittagspause mit ihnen oder Moritz, Lukas, John, Satish, Alexander, Maciej und Dana wäre ich nicht so weit gekommen. Dan Draganovici und Janina Mandelbaum möchte ich für die Hilfe bei der Anfertigung histologischer Schnitte und bei der Genotypisierung der Mäuse danken.

Darüber hinaus möchte ich der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Bärbel Stecher für die Durchführung der 16S-rRNA Sequenzierung, der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Alexander Dietrich für die Hilfe bei den ECIS Experimenten und Frau PD Dr. Susanna Müller für die Hilfe bei der TEM danken.

Mein ganz persönlicher Dank geht an meine Freunde und Mitbewohner, für die vielen Unternehmungen an schönen Tagen und die offenen Ohren in schwierigen Phasen.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, Geschwistern und meinem Freund, ohne deren Liebe, Hilfe, Unterstützung und Zusammenhalt ich diese Arbeit nicht hätte schreiben können. Danke, dass ihr bei jedem meiner Schritte an mich geglaubt habt.

„Man muss immer nur an den nächsten Schritt denken, an den nächsten Atemzug, an den nächsten Besenstrich. Dann macht es Freude; das ist wichtig, dann macht man seine Sache gut. Und so soll es sein.“

(Momo, Michael Ende)

