

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

Charakterisierung der Interaktion zwischen Stuhlmikrobiom und autosomal dominanter polyzystischer Nierenerkrankung (ADPKD)

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

vorgelegt von
Fabian Wöstmann
aus Troisdorf

promoviert am 19. Oktober 2023

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
Druckjahr 2023

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

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. nat. med. R.-U. Müller

2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. J. J. Vehreschild

Erklärung

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

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

Herr Univ-Prof. Dr. Roman-Ulrich Müller

Frau Dr. Franziska Grundmann

Frau Prof. Dr. Maria J.G.T. Vehreschild

Herr Dr. Fedja Farowski

Frau Dr. Susanne Brodesser (Dipl. Chem.)

Herr Dr. Till Baar (M.Sc.)

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

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

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Daten wurden unter meiner Mitarbeit, in der Klinik für Innere Medizin II, der Uniklinik Köln ermittelt. Ich betreute die Probensammlung, führte die entsprechenden Aufklärungen durch und unterstützte die Mitarbeiter*innen des Studienzentrums in der Weiterverarbeitung, Organisation und Lagerung, der Proben. Zudem entwickelte ich, gemeinsam mit meinem Doktorvater Herrn Prof. Roman-Ulrich Müller und meiner Betreuerin Frau Dr. Franziska Grundmann, die primären Fragestellungen und die Strategie der grundlegenden Auswertung im Zusammenhang mit den klinischen Daten. Die in dieser Arbeit präsentierten statistischen Auswertungen sind unter Supervision von Herrn Till Baar (M.Sc.), des Instituts für Medizinische Statistik und Bioinformatik der Universität zu Köln, von mir selbst ausgeführt worden.

Die dieser Arbeit zugrunde liegende Sequenzierung und bioinformatischen Analysen der Stuhlproben wurden durch die Arbeitsgruppe „Klinische Mikrobiomforschung“, der Klinik I für Innere Medizin der Uniklinik Köln unter Leitung von Frau Professor Dr. Maria J.G.T. Vehreschild durchgeführt. Die bioinformatischen Analysen erfolgten dabei führend durch Herrn Dr. Fedja Farowski,

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Messungen der massenspektrometrischen Untersuchungen des Serums wurden durch die Lipidomics/Metabolomics Facility im Exzellenzcluster CECAD unter Leitung von Frau Dr. Susanne Brodesser erhoben.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 133/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 19.10.2023

Unterschrift: 

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Universitätsprofessor Dr. Thomas Benzing bedanken für die Möglichkeit diese innovative Doktorarbeit aus seiner Klinik schreiben zu dürfen.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Roman-Ulrich Müller für die Themastellung und die herausragende Unterstützung über die gesamte Dauer der Promotion.

Meiner Betreuerin Frau Dr. Franziska Grundmann danke ich besonders für die regelmäßige gute Beratung, ihre Anregungen und die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens.

Außerdem bin ich Frau Prof. Dr. Maria J.G.T. Vehreschild, Frau Dr. Susanne Brodesser und Herrn Dr. Fedja Farowski dankbar, deren Analysen diese Arbeit möglich gemacht haben und die darüber hinaus stets für Rückfragen erreichbar waren. Weiterhin danke ich Herrn Dr. Till Baar, der mir bei Fragen und Problemen der Statistik zur Seite stand.

Bei meiner gesamten Familie, insbesondere jedoch meiner Frau Svenja Wöstmann möchte ich mich für den anhaltenden, liebevollen und vielschichtigen Rückhalt bedanken, ohne den diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre. Meinen Eltern Charlotte und Bernd Wöstmann gebührt außerordentlicher Dank, da Sie mich auf meinen Weg seit jeher begleiteten und unterstützten.

Für Charlotte, Bernd, Svenja und Pauline

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
1. ZUSAMMENFASSUNG	11
2. EINLEITUNG	12
2.1 Autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung	12
2.1.1. Pathogenese.....	12
2.1.2. Diagnose und Risikostratifizierung	13
2.1.3. Therapie	17
2.2 Das Mikrobiom	19
2.2.1. Das intestinale Mikrobiom.....	21
2.2.2. Das Mikrobiom im Kontext chronischer Nierenerkrankungen.....	23
2.2.3. Übersicht der bestehenden Literatur zur Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms im Rahmen chronischer Nierenerkrankungen.	24
2.3 Intestinal gebildete Urämietoxine	25
2.4 Das intestinale Mikrobiom bei ADPKD	28
2.4.1. Charakterisierung des Stuhl mikrobioms von Patient*innen mit einer ADPKD	29
2.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit.....	29
3. MATERIAL UND METHODEN	30
3.1 Studiendesign	30
3.2 Auswahl der Probanden und Probandinnen	31
3.2.1. ADPKD Kohorte.....	31
3.2.2. Kontroll-Kohorte.....	32
3.3 Probengewinnung.....	33
3.3.1. ADPKD Kohorte.....	33
3.3.2. Kontroll-Kohorte.....	33
3.4 Auswahl der klinischen Parameter.....	34
3.5 Mikrobiomanalyse.....	35
3.5.1. Präanalytik und Sequenzierung.....	35

3.5.2.	Bioinformatische Auswertung	36
3.6	Analyse der Urämie Toxine	37
3.7	Statistische Auswertung	37
4.	ERGEBNISSE.....	38
4.1	Merkmale der Studienpopulation.....	38
4.1.1.	Merkmale der ADPKD Kohorte	39
4.2	Ergebnisse der Mikrobiomanalyse	41
4.2.1.	Bioinformatische Analyse	43
4.2.2.	Ergänzende Dependenzanalysen	48
4.3	Ergebnisse der Massenspektrometrischen Messungen	52
4.4	Dependenzanalysen.....	53
4.4.1.	Dependenzanalyse: Unterschiede der Serumkonzentrationen der Urämie Toxine in den beiden untersuchten Kohorten	53
4.4.2.	Dependenzanalyse: Abhängigkeit der Urämietoxine von der eGFR	54
4.4.3.	Dependenzanalyse: Abhängigkeit der Urämie Toxine vom Alter der Proband*innen	56
4.4.4.	Dependenzanalyse: Abhängigkeit der Urämie Toxine von Risikofaktoren für rasch progrediente Verläufe einer ADPKD.....	57
4.4.5.	Dependenzanalyse: Korrelation der signifikanten OTUs mit den Urämie Toxinen ...	61
5.	DISKUSSION.....	65
5.1	Interpretation der eigenen Ergebnisse	65
5.1.1.	Einordnung der Ergebnisse unter Berücksichtigung der bestehenden Literatur.....	65
5.1.2.	Identifikation spezifischer Veränderungen des intestinalen Mikrobioms bei Patient*innen mit einer ADPKD.....	67
5.1.3.	Identifikation spezifischer Veränderungen im Stuhl von Patient*innen mit einer ADPKD, unter Berücksichtigung klinischer Risikoprofile.....	70
5.1.4.	Assoziationen zu den Urämietoxinen.....	75
5.2	Fazit.....	78
5.3	Limitationen	79
6.	LITERATURVERZEICHNIS	80

7.	ANHANG	95
7.1	Abbildungsverzeichnis	95
7.2	Tabellenverzeichnis	96
8.	VORABVERÖFFENTLICHUNG VON ERGEBNISSEN.....	98

Abkürzungsverzeichnis:

ADPKD	<i>Autosomal dominant polycystic kidney disease</i> , autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung (1)
IS	Indoxylsulfat (1)
UT	Urämietoxine (1)
eGFR	<i>Estimated glomerular filtrationrate</i> , Geschätzte Glomeruläre Filtrationsrate (2.1)
PC	Polycystin (2.1.1)
PKD1	<i>Polycystic kidney disease gene 1</i> , polyzystische Nierenerkrankung Gen 1 (2.1.1)
PKD2	<i>Polycystic kidney disease gene 2</i> , polyzystische Nierenerkrankung Gen 2 (2.1.1)
ADPLD	<i>Autosomal dominant polycystic liver disease</i> , autosomal dominante polyzystische Lebererkrankung (2.1.1)
PC1	Polycystin Protein 1 (2.1.1)
PC2	Polycystin Protein 2 (2.1.1)
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin (2.1.1)
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> , Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (2.1.1)
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat (2.1.1)
TKV	Nierengesamtvolumen, <i>Total Kidney Volume</i> (2.1.2)
HtTKV	<i>Height adjusted total kidney volume</i> , Größenadaptiertes Nierengesamtvolumen, (2.1.2)
AD(H)PKD	Deutsches ADPKD Tolvaptan Therapie Register (2.1.2)
AVP	Arginin - vasopressin (2.1.3)
V2R	Vasopressinrezeptor Typ 2 (2.1.3)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion (2.2)
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i> , Sequenzierung der nächsten Generation (2.2)
SCFA	<i>Short chain fatty acids</i> , Kurzkettige Fettsäuren (2.2.1)
Sp.	Spezies (Singular) (2.2.1)
T _{reg}	Regulatorische T-Zellen (2.2.2)
T _{eff}	CD4 ⁺ Effektor T-Zellen (2.2.2)
URS	Urämische Retentionssolute (2.2.2)
Spp.	Spezies (Plural) (2.2.3)
IES	Indole-3-Essigsäure (2.3)
pCS	p-Cresyl-Sulfat (2.3)
TMAO	Trimethylaminoxid (2.3)
PAG	Phenylacetylglutamin (2.3)

TGF-β1	<i>Transforming growth factor beta-1</i> , Transformierender Wachstumsfaktor Beta-1 (2.3)
TIMP-1	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase-1</i> , Inhibitoren der Metalloproteinase-1 (2.3)
AhR	<i>Aryl Hydrocarbon</i> Rezeptor (2.3)
HIF	Hypoxie induzierter Faktor (2.3)
PTHrP	Parathormon-Rezeptor (2.3)
PTH	Parathormon (2.3)
OTU	Operationale Taxonomische Einheiten (2.4)
RKD	Studie zur Aufklärung seltener Nierenerkrankungen (3.1)
BMI	<i>Body-Mass-Index</i> , Körpermasseindex (3.4)
LDA	<i>Linear Discriminant Analysis</i> , lineare Diskriminanzanalyse (3.5.2)
LEfSe	„ <i>Linear discriminant analysis effective size</i> “ (3.5.2)
LC	<i>Liquid chromatography</i> , Flüssigkeitschromatographie (3.6)
ESI	<i>Electron spray ionisation</i> , Elektronenstoß Ionisation (3.6)
MS	Massenspektrometer (3.6)
MS/MS	Tandem Massenspektrometer (3.6)
MRM	Multi Reaction Monitoring (3.6)
LDA score	Logarithmischer Wert der linearen Diskriminanzanalyse (3.7)
LPS	Lipopolysaccharide (5.1.1)
CRP	C-reaktives-Protein (5.1.1)
LAL	<i>Limulus amoebocyte lysate</i> (5.1.1)
CCL5	C-C Motif Chemokine 5 (5.1.2)
IRGN	<i>Infection related Glomerulonephritis</i> , infektiös bedingte Glomerulonephritis (5.1.2)
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (5.1.3)

1. Zusammenfassung

Die autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) ist die häufigste vererbte chronische Nierenerkrankung^{1,2}. Der unvermeidliche Progress der Erkrankung mit zunehmendem Nierenfunktionsverlust, chronisch, rekurrierenden Schmerzen sowie die potenzielle Übertragung auf Nachkommen stellt für die Betroffenen und ihre Familien eine immense Belastung dar. Eine Identifikation der Einflussfaktoren, welche eine rasche Erkrankungsprogression begünstigen und gegebenenfalls therapeutisch modulierbar sind, ist ein wichtiges Forschungsziel im Feld. Hierbei ist das intestinale Mikrobiom eines der vielversprechendsten neuen Gebiete. Kulturunabhängige Charakterisierungen gewähren mittlerweile einen Einblick in die enorme Diversität, funktionelle Kapazität sowie die durch natürliche Faktoren oder Krankheit bedingte Dynamik des intestinalen Mikrobioms³. Insbesondere Produkte des bakteriellen Metabolismus gewinnen durch ihre gesundheitsförderlichen, als auch schädlichen Effekte zunehmend an Aufmerksamkeit.

Diese Arbeit charakterisiert als Pilotstudie das intestinale Mikrobiom sowie Metabolite des bakteriellen Stoffwechsels bei ADPKD-Patient*innen. In den Analysen des Stuhlmikrobioms von Patient*innen mit einer ADPKD, konnten spezifische Veränderungen gefunden werden, die mit nachteiligen Effekten auf die Gesundheit des Wirts assoziiert sind (Enterobacterales, Enterobacteriaceae). Gleichzeitig fand sich eine reduzierte Anzahl von Mikrobiota, die mit vorteilhaften Auswirkungen auf ihren Wirt assoziiert sind (Bifidobacterales, Bifidobacteriaceae). Patient*innen mit einer ADPKD und einem früh aufgetretenem arteriellen Hypertonus wiesen zudem eine Zunahme, überwiegend gesundheitsschädlicher Mikroorganismen (Phylum Proteobacteria) und eine Reduktion der Gesundheit zuträglicher Tannerellaceae auf. Alle untersuchten Urämietoxine (UT) wiesen einen inversen Zusammenhang zur Nierenfunktion auf. Hinsichtlich möglicher Assoziationen der UT, mit den in den Subgruppenanalysen identifizierten abundanten Taxa, konnte nur für die Familie der Peptococcaceae eine direkte Verbindung zu den Serumkonzentrationen des Indoxylsulfats (IS) hergestellt werden.

Bislang findet sich nur eine Studie mit Bezug zum intestinalen Mikrobiom bei ADPKD⁴. In dem hier dargestellten Projekt konnten bereits viele Überschneidungen gefunden werden, sodass ADPKD spezifische Veränderungen des intestinalen Mikrobioms hochwahrscheinlich sind. Hinsichtlich eines Einflusses intestinal gebildeter UT, findet sich zum aktuellen Zeitpunkt keine Studie an Menschen mit einer ADPKD. Vor dem Hintergrund der kleinen Kohorte lassen sich aus dieser Arbeit keine endgültigen, kausalen Schlüsse ableiten. Weiteren Studien des intestinalen Mikrobioms unter Einbeziehung intestinal gebildeter UT kommt nun eine herausragende Bedeutung zu, um Kausalitäten in der Pathogenese der ADPKD und etwaige Einfluss nehmende Faktoren festzustellen. Diese Arbeit stellt eine entsprechende Grundlage zur Verfügung.

2. Einleitung

2.1 Autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung

Die autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) ist die häufigste vererbare chronische Nierenerkrankung und eine der häufigsten Ursachen einer terminalen Niereninsuffizienz^{1,2}. Die Prävalenz klinisch relevanter Krankheitsfälle wird in der Europäischen Union mit 3,96 auf 10.000 Einwohner*innen geschätzt⁵. Die genetische Prävalenz wird jedoch basierend auf populationsbasierten Datensätzen mit ca. 1000 angegeben⁶. Der Verlust der Nierenfunktion [im Folgenden angegeben als geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (eGFR)] ist durch das Wachstum flüssigkeitsgefüllter Zysten im Nierenparenchym verursacht und führt in etwa 50% der Fälle in der sechsten Lebensdekade zum Verlust der Nierenfunktion^{2,7}. Neben den charakteristisch, zystisch durchsetzten und deutlich vergrößerten Nieren finden sich in aller Regel weitere extrarenale Manifestationen. Hierzu gehören Zysten der Leber und anderer Organe, kardiale Klappenvitien oder intrakranielle Aneurysmen. Zumeist treten schon weit vor dem Eintritt einer dialysepflichtigen Nierenerkrankung Begleitkomplikationen, wie ein arterieller Hypertonus, eine Nephrolithiasis, intermittierende Makrohämaturie, Flankenschmerzen oder Zysteninfektionen auf, welche den Nierenfunktionsverlust weiter beschleunigen können. Im Rahmen des Nierenfunktionsverlustes kommt es schließlich zu den typischen sekundären Begleiterscheinungen einer chronischen Nierenerkrankung wie der renalen Anämie und Osteopathie, dem sekundären Hyperparathyreoidismus, sowie ganz generell einem erhöhten kardiovaskulären Risiko.

2.1.1. Pathogenese

Die ADPKD zählt zu den Ziliopathien. Hierbei handelt es sich um genetische Erkrankungen, die durch eine Fehlfunktion des Ziliums, einem Haar-ähnlichen Zellorgan, der apikalen Zellmembran, charakterisiert sind⁸. Die im Rahmen einer Ziliopathie veränderten Proteine sind üblicherweise im sogenannten Zilium-Zentrosom Komplex lokalisiert, einem Zellorgan, das unter anderem die Fähigkeit besitzt, extrazelluläre Signale zu detektieren und zu verarbeiten⁸. Im Rahmen der ADPKD kommt es durch die genetische Mutation zu einer fehlerhaften Bildung sogenannter *Polycystin* (PC) Proteine. Diese können dem Zilium-Zentrosom Komplex wie auch anderen zellulären Lokalisationen zugeordnet werden^{1,9}.

Durch fortschreitende genomische Forschung konnten bereits mehrere Gene identifiziert werden, deren Mutation mit einem ADPKD Phänotyp assoziiert sind¹⁰. Am häufigsten lassen sich Mutationen des *Polycystic kidney disease Gen 1* (PKD1) nachweisen, mit einem Anteil von 78% der Betroffenen¹¹. Hingegen weisen nur knapp 15% der Betroffenen eine Mutation des *Polycystic kidney disease Gen 2* (PKD2) auf¹¹. Weitere Gene, die einen ADPKD typischen Phänotyp auslösen, sind bedeutend seltener und zumeist mit einer autosomal dominanten

polyzytischen Lebererkrankung (ADPLD) assoziiert. Beispielhaft kann das *GANAB* Gen mit einer Prävalenz von etwa 0,3% aufgezählt werden, welches sowohl mit einer primären Nierenbeteiligung, als auch mit einer vorrangigen Leberbeteiligung einhergehen kann¹².

Derzeit verbleiben etwa 7% der Patient*innen mit einer ADPKD und etwa 50% der ADPLD Patient*innen genetisch ungelöst^{10,12}. Es sei zudem zu erwähnen, dass sich die genetische Testung, auf Grund einer intrachromosomalen Duplikation von 33 der 46 Exone des *PKD1* Gens, am 5' Ende - und hieraus resultierenden Pseudogenen - komplex darstellt^{13,14}. Darüber hinaus ist die Interpretation der Ergebnisse auf Grund einer ausgeprägten allelischen Heterogenität im *PKD1* und *PKD2* Gen, mit über 1900 bislang beschriebenen Mutationen erschwert¹.

Die von den *PKD* Genen kodierten Polycystin Proteine 1 (PC1) und 2 (PC2) lokalisieren im primären Zilium^{1,9,15}. Darüber hinaus sind sie an der basolateralen Plasmamembran, an Adhäsionskontakten und in sezernierten Mikrovesikeln zu finden^{1,9,15}. PC2 lässt sich zudem am endoplasmatischen Retikulum nachweisen und ist dort am Kalziumflux beteiligt¹⁶. Die PC Proteine formen multimerische Protein-Komplexe, die multiple Signalwege modulieren, zum Beispiel mechanistic target of Rapamycin (mTOR), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) -*Signaling*, den *WNT*- oder den *Hippo*- Signalweg sowie die zelluläre Kalziumhomöostase und Level von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP)^{1,17-21}. Es wird angenommen, dass der klinische Phänotyp und der Krankheitsprogress von der Anzahl funktionaler PC Proteine sowie der Schwere der jeweiligen Mutation abhängt^{1,2,22,23}.

Patient*innen mit einer ADPKD tragen üblicherweise eine Mutation in nur einem Allel des *PKD1* Gens, welches für PC1 oder des *PKD2* Gens, welches für PC2 kodiert. Erst mit Inaktivierung des verbliebenen Wildtyp Allels oder dem Verlust der Heterozygotie kommt es zur Zystenbildung^{1,24,25}. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der Mutationstyp (zum Beispiel inaktivierende Mutationen oder hypomorphe Allele) den Krankheitsverlauf in unterschiedlicher Ausprägung beeinflusst, sodass auch wenn das gleiche Gen betroffen ist, ein unterschiedlicher Phänotyp entstehen kann¹.

2.1.2. Diagnose und Risikostratifizierung

Im klinischen Alltag präsentieren sich Betroffene in der Kindheit und im jungen Erwachsenenalter oftmals asymptomatisch, können jedoch bereits Begleitkomplikationen aufweisen, deren frühzeitige Behandlung den weiteren Verlauf und den potenziellen Eintritt einer terminalen Nierenerkrankung verzögern kann. Insbesondere bei Betroffenen, bei denen in der Familie keine ADPKD bekannt ist, fällt die Erkrankung häufig erst im fortgeschrittenen Stadium als Zufallsbefund, auf Grund bereits erhöhter Nierenretentionsparameter oder etwaiger Begleitkomplikationen auf.

In aller Regel kann die Diagnose einer ADPKD durch eine gute klinische Charakterisierung, eine Analyse der Familienhistorie, sowie anhand bildmorphologischer Kriterien erfolgen^{2,26}. Als

Goldstandard zur bildmorphologischen Diagnose einer ADPKD verbleibt die Ultraschalluntersuchung als weit verbreitete und kostengünstige Methode^{1,2,27}. Pei und Kolleg*innen konnten anhand 948 Patient*innen mit einer genetisch gesicherten ADPKD, Kriterien zur Diagnosestellung einer ADPKD mittels Ultraschall erarbeiten²⁸. Diese hängt vom Alter und der Zahl der Zysten ab, wobei diese Diagnosekriterien nur bei positiver Familienanamnese validiert sind. Als sensitivere Alternative oder bei uneindeutigem sonographischen Befund, kann ebenfalls ein MRT zur Diagnosestellung angefertigt werden. Finden sich in einem MRT mehr als zehn Nierenzysten, kann bei Patient*innen mit einer positiven Familienhistorie für eine ADPKD, die Diagnose gestellt werden²⁷. Darüber hinaus hat das MRT einen signifikanten Stellenwert in der anschließenden Prognoseabschätzung. Bei Patient*innen mit unklarer oder negativer Familienhistorie, uneindeutiger MR-Morphologie oder dem Verdacht auf ein familiäres Tumor Syndrom wie der Tuberösen Sklerose, Von-Hippel-Lindau oder dem Birt-Hogg-Dubé-Syndrom, die ebenfalls mit zystisch durchsetzten Nieren einhergehen können, sollte neben einer entsprechenden klinischen Aufarbeitung eine genetische Testung zur Diagnosefindung angestrebt werden^{2,26}.

ADPKD-Patient*innen weisen klinisch eine hohe interindividuelle Variabilität hinsichtlich der im Verlauf zunehmenden Nierenschädigung auf. So benötigen 75% der Betroffenen bis zum Alter von 70 Jahren ein Nierenersatzverfahren, hingegen benötigen bereits 25% der Betroffenen ein Nierenersatzverfahren vor dem 50. Lebensjahr²⁹⁻³². Neben der Nierenerkrankung weisen Patient*innen mit einem rascheren Verlauf zudem oftmals frühzeitig Begleitkomplikationen auf, welche wiederum sekundäre Erkrankungen oder Komplikationen hervorrufen können. Eine Risikostratifizierung, um Betroffene mit einem zu erwartenden frühen Nierenfunktionsverlust zu identifizieren, ist somit sinnvoll und wichtig, um eine entsprechende Therapie einleiten zu können. Diese Risikostratifizierung kann unter Einbeziehung von klinischen Charakteristika, des Nierengesamtvolumens im MRT sowie des Genotyps erfolgen³³.

Ganz generell weisen Betroffene mit einer *PKD2* Mutation, mit einem mittleren Alter von 79 Jahren bei Erreichen der terminalen Nierenerkrankung, einen langsameren Verlauf auf, wohingegen Betroffene mit einer *PKD1* Mutation, mit einem mittleren Alter von 58 Jahren bei Erreichen der terminalen Nierenerkrankung, durch einen schnelleren Nierenfunktionsverlust gekennzeichnet sind^{2,34}. Dabei weisen insbesondere die inaktivierenden, sogenannten trunkierenden Mutationen einen schnelleren Krankheitsprogress auf. So konnte für Patient*innen mit einer trunkierenden *PKD1* Mutation im Mittel ein deutlich früherer Eintritt zur terminalen Nierenerkrankung gezeigt werden, als für Patient*innen mit nicht-trunkierender *PKD1* Mutation (55 Jahre gegenüber 67 Jahre)³⁴.

Im PROPKD Score (*Predicting Renal Outcome in Polycystic Kidney Disease*) wurden die genetischen Merkmale mit klinischen Charakteristika zu einem Algorithmus verbunden, der den Eintritt einer terminalen Nierenschädigung mit einem negativ prädiktiven Wert von über

80% zuverlässig voraussagen kann³⁵. Neben den genetischen Merkmalen wurden in einer multivariaten Analyse folgende klinisch relevanten Charakteristika identifiziert: Arterieller Hypertonus vor dem 35. Lebensjahr, urologische Komplikationen wie Zysteninfekte, Flankenschmerzen oder Makrohämaturie vor dem 35. Lebensjahr, sowie männliches Geschlecht³⁵. Eine Übersicht gibt Tabelle 1.

Variable	Punkte
<u>Klinische Charakteristika:</u>	
Männliches Geschlecht	1
Arterielle Hypertonie vor dem 35. Lebensjahr	2
Erste urologische Komplikation* vor dem 35. Lebensjahr	2
<u>Mutation:</u>	
Nachgewiesene PKD 2 Mutation	0
Nicht trunkierende PKD1 Mutation	2
Trunkierende PKD1 Mutation	4

PROPKD Score = (Summe)

Summe: PROPKD Score	Risiko der Progression zur terminalen Niereninsuffizienz
0-3	Niedriges Risiko Mittleres Alter bis Beginn der terminalen Niereninsuffizienz: 70,6 Jahre (Negativ prädiktiver Wert von 81,4%)
4-6	Intermediäres Risiko Mittleres Alter bis Beginn der terminalen Niereninsuffizienz 56,9 Jahre bis
7-9	Hohes Risiko Mittleres Alter bis Beginn der terminalen Niereninsuffizienz: 49 Jahre (Positiv prädiktiver Wert von 90,9%)

Tabelle 1: Auflistung der Variablen und ihrer Wertigkeit, die in den PROPKD-Score einfließen, sowie die Risikostratifizierung in Abhängigkeit der ermittelten Punktzahl. Modifiziert aus: Cornec-Le Gall E, et al.³⁵
* Urologische Komplikationen definiert als Zysteninfekte, Flankenschmerzen oder Makrohämaturie.

Weiterhin kann eine Risikoabschätzung anhand des in einer Schnittbildgebung gemessenen Nierengesamtvolumens [Total Kidney Volume (TKV)] erfolgen. Adjustiert nach Größe [Height adjusted Total Kidney Volume (HtTKV)], Alter und Geschlecht der Patient*innen können die Betroffenen in die sogenannte Mayo Klassifikation 1A bis 1E, mit einem schnelleren Krankheitsprogress hin zu Klassifikation 1E, eingeordnet werden³⁶. In einer ersten Auswertung einer ADPKD Kohorte der Mayo Klinik Rochester, USA, stieg die Inzidenz einer terminalen Nierenerkrankung in den nachfolgenden zehn Jahren von 2,4% in der Mayo-Klassifikation 1A auf 66,9% in der Mayo-Klassifikation 1E³⁶. Mit Hilfe eines linearen Regressionsmodells lässt sich somit das Risiko des Eintritts einer terminalen Nierenerkrankung gut abschätzen³⁶. Eine exemplarische Darstellung von drei Patient*innen des Deutschen ADPKD Tolvaptan Therapie Registers („AD(H)PKD“) der Uniklinik Köln (Siehe Abschnitt 3.2.1) findet sich in Abbildung 1. Ein Nachteil der Methode ist die fehlende Anwendbarkeit auf Patient*innen mit einer

untypischen Zystenverteilung, wie etwa eines einseitigen oder segmentalen Befalls, deutlich asymmetrischer Verteilung, kontralateraler Nierenatrophie oder einem Ungleichgewicht durch einzelne massiv vergrößerte Zysten mit sonst weitestgehend erhaltenem Nierenparenchym, welche als Mayo Klasse 2 zusammengefasst werden³⁶. Etwa 5-10% aller Betroffenen fallen in die Mayo Klasse 2, sodass kürzlich eine überarbeitete Methode zur Berechnung des TKV unter Ausschluss exophytischer Nierenzysten evaluiert wurde³⁷. Diese bietet sowohl für Patient*innen der Mayo Klasse 2, wie auch für Patient*innen der Mayo-Klasse 1A bis 1E eine verbesserte Vorhersagekraft³⁷.

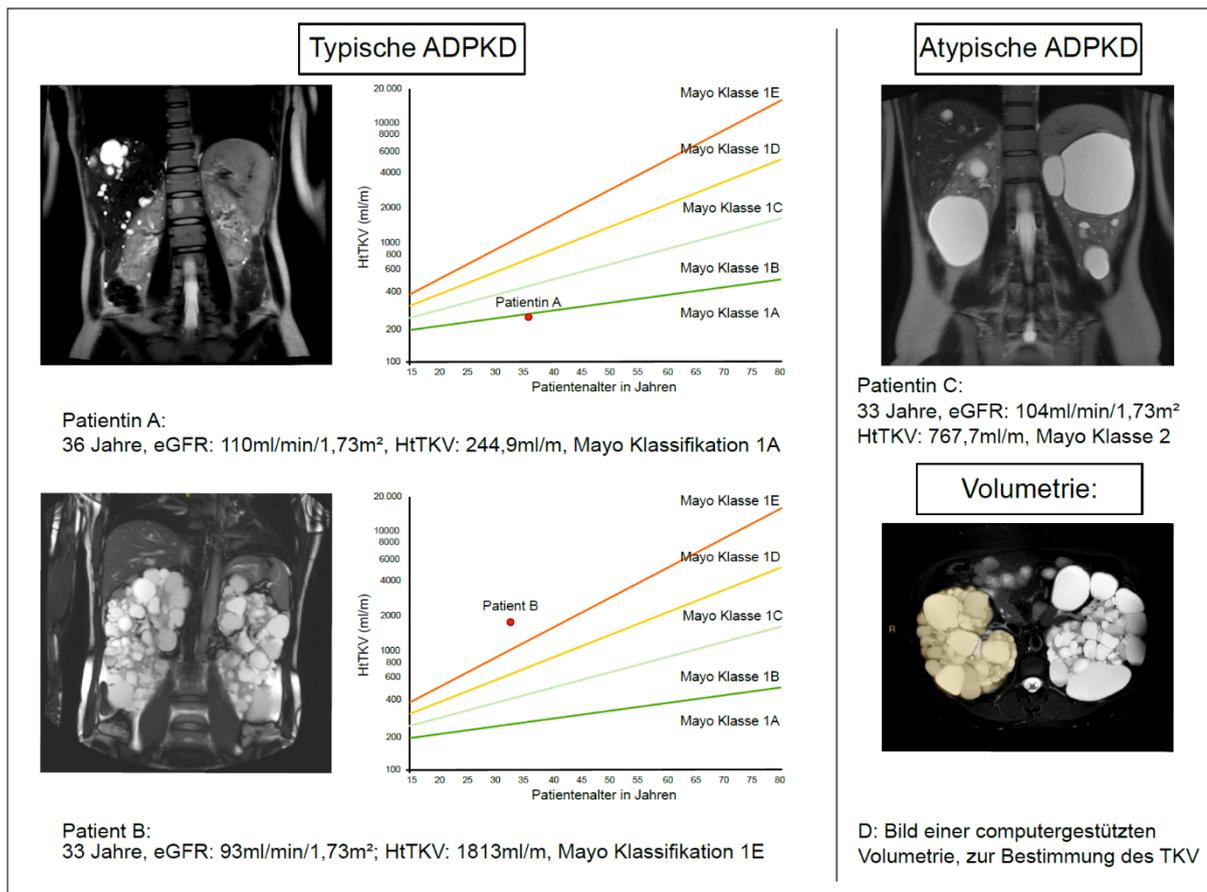


Abbildung 1: Bildgebung und Klassifizierung von Patient*innen mit einer ADPKD

MRT-Bilder dreier Patient*innen, ähnlichen Alters, aus der AD(H)PKD-Kohorte. Patientin A weist eine typische diffuse zystische Verteilung, mit Beteiligung der Leber, bei jedoch insgesamt geringem HtTKV auf. Patient B zeigte ebenfalls eine typische diffuse Zystenverteilung auf, mit jedoch deutlich größerem Zystenvolumen und dementsprechend höherem HtTKV. Bei Patientin A ist bis ins hohe Alter keine relevante Zunahme des Nierenvolumens zu erwarten, wohingegen bei Patient B eine massive Zunahme des HtTKV und damit einhergehende rasche Reduktion der Nierenfunktion zu erwarten ist. Patientin C weist -passend zu einer Mayo Klasse 2- eine atypische Zystenverteilung auf, bei der ≤5 Zysten ≥50% des TKV bedingen. D: Exemplarische Abbildung einer computergestützten Volumetrie eines MRT-Schnittbildes. MRT-Bilder freundlicherweise bereitgestellt vom Institut für diagnostische und interventionelle Radiologie der Uniklinik Köln. Graphen der TKV Trajektorien modifiziert aus: Irazabal et al.³⁶

Im klinischen Alltag erscheint die Verwendung der klinischen Charakteristika des PROPKD Scores, die bildmorphologische Mayo-Klassifikation und sofern verfügbar die Einbeziehung des Genotyps zur Einschätzung der zu erwartenden Krankheitsprogression sinnvoll. Es muss jedoch klar sein, dass die Möglichkeiten der Risikostratifizierung eine gewisse Irrtumswahrscheinlichkeit aufweisen, die durch anderweitige Einflüsse wie zum Beispiel

Umweltfaktoren bedingt sind. Um eine möglichst umfassende und individuelle Risikostratifizierung zu ermöglichen ist daher eine weitere Erforschung exogener Einflüsse und ihren Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf eminent wichtig.

2.1.3. Therapie

Über eine lange Zeit standen ausschließlich supportive Therapien, angelehnt an die generellen Empfehlungen für chronisch Nierenerkrankte, für die Behandlung von Patient*innen mit einer ADPKD zur Verfügung²⁶. In den vergangenen Jahren konnten konservative Maßnahmen, wie eine stringente Blutdruckeinstellung sowie eine Reduktion des Salzkonsums in randomisiert kontrollierten Studien verifiziert und mit dem Vasopressin-V2-Rezeptor Blocker Tolvaptan um ein zielgerichtetes Medikament erweitert werden.

Symptomatische Ansätze beinhalten eine adäquate Schmerztherapie, der durch die Volumenausdehnung hervorgerufenen abdominellen- oder Flanken- Schmerzen. Weiterhin ist eine adäquate antibiotische Therapie bei Harnwegsinfektionen oder Zysteninfektion notwendig.

Die allgemeingültigen Maßnahmen umfassen einen gesunden Lebenswandel mit ausreichend körperlicher Aktivität, Vermeidung von Übergewicht, Hypovolämie und abdominellen Traumen, Nikotinkarenz sowie Verzicht auf nephrotoxische Medikamente, insbesondere nicht steroidaler Antirheumatika^{2,26,38-42}.

In Bezug auf die ADPKD hat eine strenge Blutdruckeinstellung einen herausragenden Stellenwert. Von entscheidender Bedeutung ist dabei die HALT-PKD Studie. In der doppelt verblindeten, Placebo kontrollierten und randomisierten Studie wurden insgesamt 558 Patient*innen zwischen 15 und 49 Jahren mit einer ADPKD, einer eGFR von $>60\text{ml/min/1,73m}^2$ und einem arteriellen Hypertonus in Gruppen mit einem normotensiven Zielblutdruck (120/70mmHg - 130/80mmHg) und einem niedrigen Zielblutdruck (95/60mmHg - 110/75mmHg) eingeteilt^{43,44}. Die Gruppe mit dem niedrigeren Blutdruckziel zeigte dabei eine signifikant geringere Zunahme des TKVs, eine Reduktion der Albuminurie sowie dem linksventrikulärem Masseindex⁴³. Bei genauer Betrachtung der Daten lagen der systolische und der diastolische Blutdruck, in der Interventionsgruppe, im Median knapp über dem anvisierten Zielblutdruck von 110/75mmHg, jedoch unter 120/80mmHg (Appendix Figure S3)⁴⁵. Daher empfehlen wir jungen Patient*innen (<50 Jahren), mit einer eGFR von $>60\text{ml/min/1,73m}^2$ einen Zielblutdruck unter 120/80mmHg anzustreben.

Weiterhin ist auf Grund der blutdrucksteigernden Wirkung und der Auswirkungen auf den Volumenhaushalt eine Reduktion der Salzzufuhr generell im Rahmen chronischer Nierenerkrankungen empfehlenswert^{26,46,47}. Hinsichtlich einer ADPKD konnte in einer Post-hoc-Analyse der HALT-PKD Studie zudem ein zunehmendes Nierenwachstum sowie ein schneller progredienter Nierenfunktionsverlust in den fortgeschrittenen Stadien einer ADPKD

unter vermehrtem Salzkonsum nachgewiesen werden⁴⁸. Eine tägliche Einnahme von höchstens etwa 5 Gramm Kochsalz wird derzeit empfohlen^{47,49}.

Bezüglich möglicher diätetischer Interventionen im Rahmen einer ADPKD liegen bislang nur sehr begrenzte Daten aus klinischen Studien vor. Im Tiermodell finden sich jedoch unter anderem vielversprechende Effekte durch eine Reduktion der Kalorienzufuhr, intermittierendes Fasten oder durch eine ketogene Ernährung^{50,51}. Unter den genannten Ernährungsanpassungen zeigte sich im Mausmodell ein reduziertes Zystenwachstum, sowie eine verbesserte Nierenfunktion^{50,51}.

Im Rahmen jedweder Nierenerkrankung ist die ausreichende Flüssigkeitszufuhr, mit Erhaltung einer Euvolämie empfehlenswert. Im Rahmen der ADPKD ist eine Hydratation auf Grund einer wahrscheinlich krankheitsmodifizierenden Wirkung im Sinne eines reduzierten Zystenwachstums, besonders hervorzuheben. Der postulierte Effekt wird über eine verminderte Ausschüttung von Vasopressin (AVP) und hieraus resultierender Reduktion von cAMP in den die Zysten auskleidenden Zellen begründet. Zur Erläuterung: eine zentrale Erkenntnis im Verständnis der Pathogenese ist der Einfluss von cAMP und Kalzium auf das Zystenwachstum^{52-55,19}. Im Rahmen der Polyzystischen Nierenerkrankung führt cAMP sowohl zu einer beschleunigten Proliferation der Zysten-Epithelzellen als auch einer vermehrten Sekretion in die Zyste, was beides zum Zystenwachstum beiträgt^{26,52}. Um diesen Mechanismus zu unterbinden, wurde der Vasopressinrezeptor Typ 2 (V2R) Signalweg als potentester, modifizierbarer Induktor von cAMP in Zellen des Sammelrohrs identifiziert^{26,56}. Basierend auf diesen Erkenntnissen bewiesen Gattone und Kolleg*innen, die Wirksamkeit eines V2R Antagonisten in einem ADPKD Mausmodell^{26,55}. Da AVP führend durch die Serumosmolalität reguliert und bei hoher Osmolalität vermehrt sezerniert wird, erscheint im Umkehrschluss eine vermehrte Flüssigkeitszufuhr sinnvoll^{26,40}. In zwei Pilotstudien konnte eine suffiziente Reduktion der Urinosmolalität, als Indikator der AVP Sekretion, unter einer Urinproduktion von etwa 3,1l dargestellt werden^{57,58}. In der Folge erschien eine tägliche Flüssigkeitszufuhr von 3-3,5l als sinnvolle Vorgabe²⁶. Die erste randomisiert, kontrollierte Studie, die diesen Effekt untersuchte (PREVENT-Trial), zeigte jedoch keinen nennenswerten Nutzen einer vermehrten Flüssigkeitsaufnahme, hinsichtlich der Entwicklung des Nierengesamtvolumens oder der Nierenfunktion⁵⁹. Vor dem Hintergrund der pathophysiologischen Überlegungen und der Limitationen der Studie ist die vermehrte Flüssigkeitszufuhr dennoch weiterhin empfehlenswert. Gleichzeitig verdeutlichen die Ergebnisse des PREVENT-Trials die Notwendigkeit den V2R-Signalweg potenter zu inhibieren.

Aufbauend auf das Wissen um die krankheitsmodifizierende Wirkung von AVP wurde der V2R Inhibitor Tolvaptan in mehreren klinischen Studien (TEMPO 3:4, TEMPO 4:4, REPRISE) auf seine Wirksamkeit und Sicherheit untersucht und ist derzeit die einzig in Deutschland

zugelassene spezifische Therapie der ADPKD⁶⁰⁻⁶². Entsprechend der Wirkweise des Medikaments kommt es unter der Therapie mit Tolvaptan zu einer deutlich gesteigerten Diurese, mit daraus resultierender Nykturie und Polydipsie sowie, am ehesten als Folge des relativen Volumenmangels und der vermehrten

Flüssigkeitszufuhr entstehende Kopfschmerzen, Schwindel, Fatigue und Diarrhoen⁶⁰. Diese Nebenwirkungen führte im Rahmen der TEMPO 3:4 Studie zu einer vermehrten Abbruchrate von knapp 15,4% unter Einnahme von Tolvaptan im Vergleich zu 5% Abbrecher*innen in der Placebo Gruppe⁶⁰. Als spezifische Nebenwirkungen des Medikaments muss eine Leberwerterhöhung genannt werden, die unter Fortführung der Therapie zu einem bleibenden Leberschaden führen kann. Im Rahmen der TEMPO 3:4 fiel der Anstieg der Leberenzyme erstmals auf. In den nachfolgenden Studien zeigte sich ein Anstieg der Leberenzyme bei 3,8% (TEMPO 4:4) und 10,9% (REPRISE) der Proband*innen^{61,62}. Zusammenfassend konnte bei Patient*innen mit leicht bis mittelgradig eingeschränkter Nierenfunktion - unter Therapie mit Tolvaptan – ein anhaltend verlangsamtes Zystenwachstum nachgewiesen werden⁶⁰⁻⁶². Dieser Effekt konnte auch bei Patient*innen im fortgeschrittenen CKD Stadium 4 beobachtet werden⁶⁰⁻⁶².

Unter Berücksichtigung des Nebenwirkungsprofils, der hohen Therapiekosten und den damit verbundenen ökonomischen Belastungen des Gesundheitssystem sollte das Medikament jedoch nur Patient*innen mit einer hohen Progressionswahrscheinlichkeit, welche sich aus den eingangs beschriebenen Risikostratifizierungen ergibt, angeboten werden^{2,49,63}.

Weiterhin sollten im Rahmen der Therapie extrarenale Manifestationen mitbedacht werden, welche durch Tolvaptan nicht gänzlich adressiert werden. Bezüglich intrakranieller Aneurysmata (9-12% gegenüber 2-3% in der Allgemeinbevölkerung) wird, auf Grund eines ähnlich hohen Rupturrisikos wie dem der Allgemeinbevölkerung, sowie des Risikos nicht-indizierter Interventionen, ein zurückhaltendes Screeningverfahren empfohlen³⁸. Leberzysten treten bei über 80% aller Betroffenen auf, werden jedoch nur bei etwa 20% symptomatisch³⁸. Im Falle eines ausgeprägten symptomatischen Leberbefalls stehen eine medikamentöse Off-label Therapie mit Somatostatinanaloga, interventionelle Optionen wie eine Zystensklerosierung oder Drainage und chirurgische Optionen sowie als Ultima Ratio, eine Lebertransplantation zur Verfügung³⁸. Weitere extrarenale Manifestationen umfassen Zysten der Samenbläschen, des Pankreas, der Arachnoidalmembran, der Meningen sowie Klappenvitien, Divertikulose oder abdominelle Hernien³⁸.

2.2 Das Mikrobiom

Unter dem Begriff Mikroorganismen werden einzellige Organismen zusammengefasst, die nur mit Hilfe eines Mikroskops sichtbar sind⁶⁴. Während multizelluläre Eukaryoten seit etwa 1,2 Milliarden Jahren die Erde bevölkern, formten sich die ersten mikrobiellen Gemeinschaften bereits vor über 3 Milliarden Jahren⁶⁵. Diese lange Zeit der Koexistenz schuf eine gegenseitige

Abhängigkeit, in der die Mikroorganismen, wie auch ihre Wirt*innen, voneinander profitieren^{3,65}. Seit der Entdeckung von Mikroorganismen durch Antonie von Leuwenhook im Jahr 1670, basierte unser Verständnis der menschlichen Mikrobiologie führend auf Kultur basierten Studien oder auf der Identifikation einzelner Mikroorganismen unter dem Mikroskop^{3,66}. Erst die Entdeckung der DNA, Entwicklung der Polymerase Kettenreaktion (PCR) und Sequenzierungsmethoden im zwanzigsten Jahrhundert, schafften die Voraussetzungen für kultivierungsunabhängige umfassendere Analysen der Mikroorganismen⁶⁶. Hieraus erwachsen um die Jahrtausendwende neue computergestützte Hochdurchsatzverfahren, sogenannte „Next Generation Sequencing Methods“ (NGS), welche eine schnelle und kostengünstige Analyse der Gesamtheit aller Gene (Genom) einer Probe, ermöglichten und damit einen bis heute anhaltenden Paradigmenwechsel einleiteten⁶⁶.

Der enorme technologische Fortschritt mit fortwährender Entwicklung und Weiterentwicklung neuer sowie bereits bestehender Methoden hat zu einem Wissenssprung geführt. Gleichzeitig resultiert aus der rasanten Entwicklung eine fehlende Standardisierung der Mikrobiomstudien und deren Ergebnisse⁶⁶. Eine entsprechende Normierung und eine verbesserte Zusammenarbeit auf dem Feld der Mikrobiomforschung werden aktuell als die größten Herausforderungen angesehen^{66,67}. Auch die Taxonomische Klassifizierung unterliegt dabei auf Grund der neuen breit verfügbare Verfahren, mit stetiger Entdeckung neuer Mikroorganismen sowie der Möglichkeit einer genaueren phylogenetischen Zuordnung einzelner Stämme, einem stetigen Wandel. Um die Ergebnisse nachvollziehbar zu gestalten, wurde in dieser Arbeit, die Taxonomische Datenbank des *National Centers für Biotechnology Information* als primäre Quelle verwendet⁶⁸.

Exemplarisch für die mangelnde Normierung ist das Fehlen einer allgemeingültigen Definition des Begriffs „Mikrobiom“. Bereits 1988 präsentierten Whipps und seine Kolleg*innen die erste Definition des Begriffs Mikrobiom⁶⁶. Seither wurden multiple Definitionen publiziert, ohne dass es jedoch gelungen ist, die Komplexität der Zusammenhänge vollumfänglich zu erfassen⁶⁶.

Daher schlug ein internationales Konsortium kürzlich, im Rahmen des europäisch geförderten „Microbiome Support Project“, eine potenziell einheitliche Definition vor. Diese im Folgenden aufgeführte Definition soll, im Gegensatz zu bisherigen Definitionen einen ganzheitlichen Blick auf das Mikrobiom - einschließlich der Mikroorganismen selbst, ihres Lebensraums, den Interaktionen untereinander, den Auswirkungen auf den Lebensraum oder die Wirt*in sowie die dynamischen Veränderungen in Raum und Zeit - berücksichtigen und vereint somit die vielschichtigen Zusammenhänge in der Mikrobiomforschung⁶⁶.

Nach Berg und Kolleg*innen wäre hiermit die aktuelle ins Deutsche übersetzte Definition: „Das Mikrobiom ist definiert als eine charakteristische mikrobielle Gemeinschaft, die einen weitestgehend klar definierten Lebensraum, mit distinkten physiochemischen Eigenschaften

besetzt. Das Mikrobiom bezieht sich dabei nicht nur auf die beteiligten Mikroorganismen, sondern umfasst auch den Schauplatz ihrer Aktivität, der in der Ausbildung ökologischer Nischen resultiert. Das Mikrobiom, welches ein dynamisches Mikro-Ökosystem formt, ist geneigt, sich im Laufe der Zeit sowie im Umfang zu verändern und ist integriert in ein Makro-Ökosystem einschließlich eukaryotischer Wirte, deren Funktionsfähigkeit und Gesundheit es entscheidend beeinflusst.“(übersetzt aus:⁶⁶)

2.2.1. Das intestinale Mikrobiom

Mit geschätzten 38 Billionen Mikroorganismen finden sich, mit einem Verhältnis von 1:1,3, etwas mehr Mikroorganismen in und auf dem menschlichen Körper als körpereigene Zellen⁶⁹. Bakterien sind den Eukaryoten und Archaeen dabei zahlenmäßig deutlich, in etwa um den Faktor zwei bis drei, überlegen⁶⁹. Von allen bislang untersuchten mikrobiellen Ökosystemen des menschlichen Körpers weist das Kolon die mit Abstand größte Anzahl an Bakterien auf und ist, auf Grund der verhältnismäßig einfachen Zugänglichkeit, mittlerweile sehr gut charakterisiert⁶⁹. Ein umfassender Genkatalog des intestinalen Mikrobioms, basierend auf Proben von drei verschiedenen Kontinenten, listet insgesamt 9.879.896 mikrobielle Gene^{3,70}. Das intestinale Mikrobiom enthält somit fast fünfhundertmal mehr Gene als das menschliche Genom. Mit diesem nahezu vollständigen genetischen Datensatz ist nun der Schritt von einer deskriptiven Betrachtung hin zu einer Untersuchung der Funktionalität des intestinalen Mikrobioms möglich.

Das intestinale Mikrobiom eines jeden Menschen ist einzigartig. Im Laufe des Lebens verändert sich die Zusammensetzung durch verschiedene endogene und exogene Faktoren, wie genetischen Merkmalen, der körpereigenen Immunabwehr, dem Geburtsmodus, der Ernährung, einschließlich der Aufnahme von Muttermilch als Säugling oder der Einnahme von Medikamenten, insbesondere Antibiotika^{3,71}. Dennoch weist die individuelle Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms im Laufe des Leben eine hohe Stabilität und Resilienz gegenüber Perturbationen auf⁷¹.

Der Lebensraum des intestinalen Mikrobioms wird durch die Kolonschleimhaut begrenzt. Das Epithel der Kolonschleimhaut besteht aus einer einzelnen Schicht mit etwa 20 Milliarden zusammenhängenden Epithelzellen⁷². Gemeinsam mit der von ihr produzierten Mucusschicht bietet das Kolonepithel eine essenzielle schützende Barriere, welche den menschlichen Organismus von schädlichen Bestandteilen des den Darm durchwandernden Nahrungsbreis trennt. Neben den protektiven Eigenschaften ermöglicht das Kolonepithel die Aufnahme von Nährstoffen und die Kommunikation mit Mikroorganismen⁷². Gemeinsam mit den kommensalen Bakterien, den proximal sezernierten Sekreten des Magens und Pankreas, den submukös gelegenen Lymphfollikeln sowie den antimikrobiellen Substanzen der Paneth-Zellen bildet das Darmepithel und der darüber liegende Mucus, die sogenannte „intestinale Barriere“.

In Gesunden tragen die intestinalen Mikroorganismen durch Synthese von Vitaminen sowie essenzieller Aminosäuren zur Gesundheit ihrer Wirt*innen bei⁷³. Nebenprodukte des mikrobiellen Metabolismus, insbesondere kurzkettige Fettsäuren (*Short chain fatty acids* - SCFA), fungieren als bedeutende Energiequelle für die Wirt*innen sowie für die intestinalen Kolonozyten, und stärken somit die intestinale Barriere⁷³⁻⁷⁵. Auch im Metabolismus körperfremder Substanzen, wie Medikamenten und körpereigenen Substanzen wie Gallensäuren, sind die intestinalen Mikroben beteiligt^{76,77}. Weiterhin konnte ein Zusammenhang zwischen der intestinalen Vaskularisierung und dem Mikrobiom nachgewiesen werden⁷⁸. Hormone des Wirts beziehungsweise der Wirtin beeinflussen zudem Wachstum und Virulenz der Mikroorganismen, welche im Gegenzug eine Vielfalt endokrinologischer Mechanismen modulieren, mit Auswirkungen auf das Verhalten, den Appetit, Metabolismus und die Immunantwort des Wirts oder der Wirtin⁷⁹. Auch die Regulation und Synthese von Neurotransmittern wird durch das Mikrobiom wesentlich beeinflusst⁸⁰. In Interaktion mit dem Immunsystem tragen die Mikroorganismen zur intestinalen Homöostase bei, trainieren die körpereigene Abwehr und unterbinden inflammatorische Prozesse⁸¹.

Vor dem Hintergrund dieser mannigfaltigen Auswirkungen auf die Wirtin beziehungsweise den Wirt wurden einzelne Spezies (Sp.) identifiziert, die führend positive Effekte in sich vereinen. Durch die Nahrungsmittelindustrie genutzt wurden diese sogenannten Probiotika dem Interesse der breiten Öffentlichkeit zugänglich. Wissenschaftlich gesehen sind Probiotika definiert als „lebende Mikroorganismen, die dem Wirt, wenn sie in adäquaten Mengen verabreicht werden, einen gesundheitsfördernden Effekt verleihen“ (übersetzt aus⁸²).

Im Gegensatz zu diesen vorteilhaften Auswirkungen können Mikroorganismen jedoch auch schädliche Effekte, mit einer erhöhten Durchlässigkeit der Kolonschleimhaut und epithelialer Hyperproliferation, haben⁸³. Kommt es zu größeren Verschiebungen in der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota, entsteht ein krankheitsförderndes Ungleichgewicht, das in der Literatur als Dysbiose bezeichnet wird⁸⁴. Eine intestinale Dysbiose ist mit einer Vielzahl an Erkrankungen assoziiert, kann bestehende Erkrankungen verstärken oder als Auslöser einer Krankheit dienen⁸⁴. Beispielhaft erwähnt seien metabolische Störungen, Asthma, Atherosklerose sowie neurologische Erkrankungen wie Autismus⁸⁵⁻⁹². Neben dem Einfluss der Mikroorganismen selbst, ist vor allem die Integrität des Darmepithels mit der darüber liegenden Mucusschicht, ein Schlüsselfaktor für die Entstehung, Akzeleration und Schwere einer Erkrankung⁷².

Zur Wahrung der positiven Eigenschaften des intestinalen Mikrobioms ist daher eine Dysbiose zu vermeiden. Unterstützend wirken dabei, aufbauend auf das Konzept der Probiotika, sogenannte Präbiotika. Diese sind definiert als „ein Substrat, das durch die Mikroorganismen des Wirts selektiv genützt wird, um einen gesundheitsfördernden Effekt zu übertragen“ (übersetzt aus⁹³).

2.2.2. Das Mikrobiom im Kontext chronischer Nierenerkrankungen

Nahrungs- und Medikamenteneinnahme zählen zu den bedeutendsten Einflussgrößen auf das intestinale Mikrobiom. Somit ist es nicht verwunderlich, dass es im Rahmen fortgeschrittener chronischer Nierenerkrankungen, unter den empfohlenen diätetischen Maßnahmen zur Vermeidung einer Hyperkaliämie sowie eines Phosphat- und Oxalat- Überschusses mit einer reduzierten Zufuhr an Früchten und Gemüse, zu Veränderungen des intestinalen Mikrobioms kommt^{94,95}. Insbesondere komplexe Kohlenhydrate und Ballaststoffe als Hauptsubstrate für die Bildung von SCFA werden im Rahmen der empfohlenen Umstellung der Essgewohnheiten vermindert aufgenommen. SCFA dienen den Kolonozyten als primäre Energiequelle und haben einen vorteilhaften Effekt auf die mukosale Barriere^{96,97}. Kommt es zu einem Abfall der SCFA Level im Kolon wird Energie durch vermehrte Autophagie der Kolonozyten generiert⁹⁷. In der Folge ergibt sich eine herabgesetzte Funktion der Kolonozyten. Dieser Umstand wirkt als Treiber einer intestinalen Dysbiose⁹⁸.

Des Weiteren konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Menge an SCFA und der Anzahl und Funktion regulatorischer T-Zellen (T_{reg}) im Kolon nachgewiesen werden⁹⁹. Diese T_{reg} tragen durch Regulation der Proliferation von $CD4^+$ Effektor T-Zellen (T_{eff}) zur intestinalen Homöostase bei und beugen inflammatorischen Prozessen vor. Eine Reduktion der SCFA Level im Kolon führt somit auch immunologisch vermittelt zu einer erhöhten Irritabilität des Kolons⁹⁹.

Weiterhin trägt die gehäufte Einnahme von Medikamenten, insbesondere von Phosphatbindern, oralen Eisenpräparaten oder Antibiotika im Rahmen einer chronischen Nierenerkrankung drastisch zu Veränderungen des intestinalen Mikrobioms bei^{95,100}. Mit Verringerung der Urinproduktion kommt es zudem zur Hypervolämie mit nachfolgender intestinaler Kongestion, erhöhter Permeabilität und Empfänglichkeit gegenüber potenziell pathogenen Mikroorganismen^{95,101}.

Spezifisch im Rahmen eines progredienten Nierenfunktionsverlustes sind jedoch die metabolischen Veränderungen, mit Akkumulation sogenannter urämischer Retentionssolute (URS). URS sind Moleküle, die üblicherweise über die Niere metabolisiert oder ausgeschieden werden. Mit zunehmendem Nierenfunktionsverlust akkumulieren URS im Serum der Betroffenen, mit folgendem Einstrom der harnpflichtigen Substanzen in das Intestinum^{95,96}. Intraluminal wird der anfallende Harnstoff, katalysiert durch die residenten Urease formenden Mikroorganismen, zu Ammoniumhydroxyd konvertiert⁹⁶. Dem zu Folge steigt der intestinale pH durch den vermehrten Anfall von Ammoniumhydroxyd an, was mit einer erhöhten Irritabilität und Schädigung der Mukosa assoziiert ist^{96,102,103}.

Die biochemischen Veränderungen des intestinalen Milieus führen schließlich zu einem Selektionsdruck, mit Vorteilen für bakterielle Familien, die den neuen Gegebenheiten standhalten können. Diese Bakterien verstärken die schädlichen Auswirkungen im weiteren

Verlauf. So konnte gezeigt werden, dass es unter den veränderten Bedingungen zu einer relevanten Zunahme pathogener Urease- und Uricase- besitzender Familien sowie bakterieller Familien mit P-cresol- und Indol- formenden Enzymen kommt⁹⁶. Hingegen reduziert sich die Anzahl nutzbringender Butyrat-formender Familien⁹⁶. Es konnte jedoch auch bereits im Mausmodell gezeigt werden, dass ein Anstieg der Harnstofflevel nur einen Faktor darstellt, der spezifische Veränderungen des Mikrobioms hervorruft¹⁰⁴. Im Rahmen chronischer Nierenerkrankungen kommt es zu vielfältigen biochemischen und biophysikalischen Veränderungen, die das intestinale Mikrobiom beeinflussen¹⁰⁴.

In der Zusammenschau lässt sich im Rahmen chronischer Nierenerkrankung, bedingt durch veränderte Nahrungsgewohnheiten, vermehrte Medikamenteneinnahme, intestinaler Kongestion sowie dem vermehrten Anfall harnpflichtiger Substanzen im Kolon, eine für den Wirt oder die Wirtin in vielerlei Hinsicht nachteilige Veränderung des Stuhlmikrobioms konstatieren. Neben den lokalen Effekten mit einer erhöhten Irritabilität des Kolons und Veränderungen in der mikrobiellen Zusammensetzung ergeben sich auf Grund der erhöhten Permeabilität der intestinalen Barriere sowie der Veränderungen der mikrobiellen Flora auch systemische Konsequenzen. So kommt es mit Verlust der Integrität, der intestinalen Barriere, zur Translokation toxischer luminaler Substanzen sowie mikrobieller Fragmente, welche auch als Endotoxine bezeichnet werden, in die Blutlaufbahn¹⁰⁰. Zusätzlich kommt es im Rahmen der Dysbiose als Produkt des mikrobiellen Metabolismus zu einer gesteigerten Produktion spezifischer harnpflichtiger toxischer Metabolite. Diese URS werden auf Grund ihrer krankheitsfördernden Wirkung auch als Urämietoxine (UT) beschrieben^{100,105}.

2.2.3. Übersicht der bestehenden Literatur zur Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms im Rahmen chronischer Nierenerkrankungen.

Die erste Charakterisierung der bakteriellen Zusammensetzung des Stuhls dialysepflichtiger Patient*innen erfolgte 1996 durch Hida und Kolleg*innen unter Anwendung klassischer Kultivierungsmethoden¹⁰⁶. Dabei fanden sich in den Stuhlproben dialysepflichtiger Patient*innen etwa hundert Mal mehr Enterobakterien (*Escherichia coli*, Klebsiellen), als in den Stuhlproben der gesunden Kontrollkohorte¹⁰⁶. Außerdem zeigte sich eine signifikante Häufung der Sp. *Clostridium perfringens* im Stuhl der dialysepflichtigen Proband*innen. In der gesunden Kontrollkohorte fanden sich hingegen signifikant mehr *Bifidobacteria*.

In nachfolgenden Studien konnten die Beobachtungen von Hida und Kolleg*innen untermauert werden. So ließen sich in einer Studie an Patient*innen mit einer IgA-Nephropathie, einer Studie an dialysepflichtigen Proband*innen sowie in zwei weiteren Studien an chronisch sowie terminal Nierengeschädigten, nicht dialysepflichtigen Patient*innen, vermehrt Enterobacteriaceae im Stuhl nachweisen^{94,107–109}. Des Weiteren ließen sich in den Stuhlproben von Patient*innen im CKD Stadium 3-4, in Stuhlproben von Patient*innen mit einer IgA

Nephropathie sowie im Stuhl chronisch- und terminal nierengeschädigter, nicht dialysepflichtiger deutlich weniger Bifidobacteria nachweisen, als in Gesunden^{107,109,110}.

Neben den Familien der Enterobacteriaceae und Bifidobacteriaceae fanden sich auch für die Familien der Lactobacillaceae, Bacteroidaceae und Prevotellaceae übereinstimmende Veränderungen mit einem vermindertem Vorkommen im Stuhl dialysepflichtigen Patient*innen sowie an einer IgA Nephropathie erkrankter Individuen, im Vergleich zu Gesunden^{94,96,107}. Dem Gegenüber zeigte sich in der Studie von Chaves und Kolleg*innen ein vermehrtes Vorkommen von Lactobacillus Spezies (Spp.), einer Gattung der Lactobacillaceae, in 5/6 nephrektomierten Mäusen¹⁰⁴.

2.3 Intestinal gebildete Urämietoxine

Urämische Retentionsolute (URS) akkumulieren auf Grund der reduzierten Funktion der Niere im Rahmen chronischer und - in geringerem Ausmaß - akuter Nierenschädigungen. Besitzen diese URS für den menschlichen Organismus krankheitsfördernde Eigenschaften werden diese auch als Urämietoxine (UT) bezeichnet. UTs akkumulieren entsprechend der verminderten renalen *Clearance* im Rahmen von Nierenfunktionseinschränkungen und sind mit multiplen gesundheitsschädlichen Auswirkungen auf den Wirt assoziiert. Nur etwa 25% aller UTs sind proteingebunden¹¹¹. Mit 46% der UTs besteht der überwiegende Anteil aus freien, wasserlöslichen Molekülen, mit einem niedrigen Molekulargewicht. 28% der UTs weisen hingegen ein mittleres Molekulargewicht von über 500 Dalton auf¹¹¹. Bislang bestand die verbreitete Annahme, dass die freien ungebundenen UT die schädlichen Auswirkungen auf den menschlichen Organismus ausüben¹¹²⁻¹¹⁴. Es mehren sich jedoch die Hinweise, dass auch die proteingebundenen Urämietoxine einen pathogenen Einfluss auf den menschlichen Organismus ausüben können¹¹². Dies ist insofern relevant, da ein überwiegender Teil der proteingebundenen Urämietoxine dem bakteriellen Metabolismus entstammt¹¹⁵. Zudem ergibt sich aus der Proteinbindung eine verminderte Elimination im Rahmen der Dialyse¹¹⁶. Wissen darum, welche Mikroorganismen zu einem Anstieg einzelner UTs führen, könnte in der Zukunft Therapieansätze ermöglichen, die die Akkumulation von proteingebundenen UTs reduzieren. Des Weiteren sollten bestehenden Erkenntnisse zu den Effekten der Urämietoxine, durch weitere Studien untermauert, oder wenn möglich erweitert, werden.

Vanholder und Kolleg*innen klassifizierten sämtliche bis dato bekannte URS anhand ihrer biochemischen Charakteristika, die einen potenziellen Einfluss auf ihre Elimination im Rahmen eines Nierenersatzverfahren haben¹¹⁷. Alternativ könnten URS auch anhand ihrer Entstehung eingeteilt und nach exogener Zufuhr beziehungsweise endogenem, mitochondrialem oder bakteriellem Metabolismus unterschieden werden^{105,118}. Es wird angenommen, dass der Hauptanteil der URS dem endogenen Metabolismus entstammt. Es zeichnet sich jedoch ab, dass der mikrobielle Metabolismus einen relevanten Anteil zur Entstehung der URS beiträgt und dieser Umstand im Rahmen chronischer Nierenschädigungen aggraviert^{105,119,120}.

Gegenwärtig sind fünf UT bekannt, die dem bakteriellen Metabolismus zugeordnet werden können und im Rahmen chronischer Nierenschädigungen akkumulieren: Indoxylsulfat (IS), Indole-3-Essigsäure (IES), p-Cresyl-Sulfat (pCS), Trimethylaminoxid (TMAO) und Phenylacetylglutamin (PAG)¹²¹. Im Rahmen dieser Arbeit wurden lediglich die Serumkonzentrationen des IS, pCS und TMAO gemessen, sodass an dieser Stelle vorrangig auf diese UT eingegangen werden soll.

In mehreren Studien konnten Assoziationen der UT zu typischen Begleitkomplikationen einer chronischen Nierenschädigung wie der Arteriosklerose, der renalen Anämie, der Osteopathie, einer erhöhten Insulinresistenz sowie einer Nierenfunktionsverschlechterung hergestellt werden. Sämtliche UT des bakteriellen Metabolismus konnten zudem mit kardiovaskulären Ereignissen und einer erhöhten Mortalität assoziiert werden¹²¹. Eine Übersicht der Effekte, die mit den UT assoziiert sind, finden sich in Tabelle 2.

Unter dem Einfluss von IS, pCS, sowie TMAO zeigt sich ein beschleunigter Nierenfunktionsverlust¹²¹. IS stimuliert dabei die Infiltration von Monozyten in die Niere, was zur Aktivierung verschiedener Enzyme und einer Fibrose der Nieren führt¹²². Zudem konnten unter dem Einfluss von IS, deutliche Veränderungen der Podozyten im Sinne von Fußfortsatzverschmelzungen, sowie Veränderungen der Basalmembran beobachtet werden¹²³. PCS hingegen bedingt vermehrten oxidativen Stress tubulärer Epithelzellen¹²⁴. Durch eine Steigerung inflammatorischer Zytokine und *Transforming-growth-factor-β1* (TGF-β1) trägt pCS zudem zur renalen Fibrose bei¹²⁴. Unter dem Einfluss von TMAO konnte eine vermehrte tubulointerstitielle Fibrose und Kollagen Deposition beobachtet werden¹²⁵. Des Weiteren zeigte sich auch unter TMAO eine vermehrte Aktivität des TGF-β mit Assoziation zu einer renalen Fibrose¹²⁵.

Sämtliche der aufgeführten UT konnten bei Patient*innen mit einer chronischen Nierenschädigung mit einem Anstieg kardiovaskulärer Erkrankungen und Tod assoziiert werden¹²¹. Serumspiegel des IS zeigen dabei einen direkten Zusammenhang zur Kalzifikation der Aorta, Pulswellengeschwindigkeit, kardiovaskulären Erstereignissen sowie der kardiovaskulären Gesamtmortalität^{121,126}. Die Aktivierung des Aryl-hydrocarbon-Rezeptors (AhR) durch IS hat dabei direkte proatherogene Effekte¹²⁷. Für IS wie auch für pCS konnte zudem eine konzentrationsabhängige Reduktion der endothelialen Proliferation und endothelialen Reperaturmechanismen belegt werden¹²⁸. PCS weist außerdem eine starke Assoziation zur vaskulären Kalzifikation mit begleitend erhöhter Gefäßsteifigkeit auf und wird ebenfalls als unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor angesehen^{129,130}. Weiterhin zeigt sich, sowohl bei Nierengesunden als auch bei Patient*innen mit einer chronischen Nierenschädigung eine deutliche Korrelation zwischen der Serumkonzentration von TMAO und kardiovaskulären Ereignissen^{121,125,131}. TMAO dient sowohl als unabhängiger prädiktiver Marker kardiovaskulärer Ereignisse wie auch als Marker für das Langzeitüberleben¹³².

Unter erhöhten Serumkonzentrationen von IS und pCS konnten Wechselwirkungen mit dem Immunsystem nachgewiesen werden. IS und pCS begünstigen dabei über verschiedene Mechanismen proinflammatorische vaskuläre Effekte^{133–136}. Zudem wird eine pCS bedingte Dysfunktion der Antigen Präsentation, mit hieraus entstehender Empfänglichkeit gegenüber bakteriellen Infekten postuliert¹³⁶.

Auch die Blutbildung zeigt sich unter dem Einfluss urämischer Toxine beeinträchtigt. So kommt es unter Einwirkung von IS zu einer Beeinträchtigung von Signalwegen des Hypoxie induzierten Faktors (HIF), mit folgender verminderter Erythropoetin Synthese^{137,138}.

Weiterhin besteht eine Assoziation zwischen den UT, einer Insulinresistenz und einer Dysfunktion der Adipozyten als möglicher Auslöser der Insulinresistenz¹³⁹. Des Weiteren konnte unter dem Einfluss von IS ein erhöhter oxidativer Stress auf die Adipozyten und daraus resultierende Lipodystrophie ähnliche Folgeerscheinungen beobachtet werden¹⁴⁰.

Schließlich zeigt sich unter IS eine reduzierte Expression des Parathormon-Rezeptors (PTHr), sowie eine verminderte intrazelluläre cAMP Produktion durch eine supprimierte Parathormon (PTH) Stimulation¹⁴¹. Als mögliche Ursache, der verminderten PTHr Expression, kommt ein konzentrationsabhängiger Anstieg freier Radikale in den Osteoblasten in Betracht¹⁴¹.

	Indoxylsulfat (IS)	p-Cresyl-Sulfat (pCS)	Trimethyl-aminoxid (TMAO)
Niere:	- Fibrose ↑	- Fibrose ↑ - Oxidativer Stress ↑	- Tubulointerstitielle Fibrose ↑ - Kollagen Deposition ↑
Herz:	- Kardiovaskulärer Tod ↑ - KHK ↑ - Kalzifikation der Aorta ↑ - Pulswellengeschwindigkeit ↑ - Proatherogen via Tissue-Factor ↑ - Endotheliale Proliferation ↓	- Kardiovaskulärer Tod ↑ - KHK ↑ - Vaskuläre Kalzifikation ↑ - Gefäß-steifigkeit ↑ - Unabhängiger Prädiktor kardiovaskulärer Ereignisse - Endotheliale Proliferation ↓	- Kardiovaskulärer Tod ↑ - KHK ↑ - Koronare Atherosklerose ↑ - Unabhängiger Prädiktor kardiovaskulärer Ereignisse - Langzeit-überleben ↓
Immunsystem:	- TNF- α Produktion ↑ - Leukozytäre endotheliale Adhäsion ↑		
Blutbildung:	- Erythropoetin ↓ - Eryptose ↑		
Adipozyten Dysfunktion:	- Oxidativer Stress ↑ - Regulations-störung des ADMA/DDAH Signalweges		

	Indoxylsulfat (IS)	p-Cresyl-Sulfat (pCS)	Trimethyl-aminoxid (TMAO)
Osteopathie:	- PTH Stimulation ↓ - Expression des PTH-Rezeptors ↓ - Freie Radikale in den Osteoblasten ↑		

Tabelle 2: Übersicht der Auswirkungen urämischer Retentionssolute, bakteriellen Ursprungs.

2.4 Das intestinale Mikrobiom bei ADPKD

Veränderungen des intestinalen Mikrobioms, einschließlich der metabolischen Veränderungen, sowie Veränderungen des Lebensraumes sind im Rahmen chronischer Nierenerkrankungen bereits vielfach beschrieben worden. Nierenerkrankungen unterliegen jedoch häufig anderweitigen Grunderkrankungen endokrinologischen, autoimmunen oder kardiovaskulären Ursprungs. Eine klare Differenzierung zwischen den Veränderungen des Mikrobioms auf Grund der Nierenfunktionsverschlechterung oder der begleitenden Grunderkrankung ist somit oftmals nicht möglich. Die ADPKD als genetische Erkrankung tritt häufig initial ohne klassische kardiovaskuläre Folgeerkrankung auf und lässt sich auf Grund des naturgemäß progredienten Nierenfunktionsverlustes im Verlauf gut nachverfolgen. Von einer ADPKD Betroffene stellen somit eine interessante Studienpopulation dar. Yacoub und Kolleg*innen nutzten diese Eigenschaften und waren die bislang die Ersten und Einzigen, welche das intestinale Mikrobiom einer Gruppe von Patient*innen mit einer ADPKD untersuchten⁴. Aus einer Kohorte von ADPKD-Patient*innen wurden drei Gruppen, mit jeweils 6 Proband*innen, aus unterschiedlichen weit fortgeschrittenen Stadien (eGFR >60ml/min, eGFR 15-60ml/min, Dialysepflichtig eGFR <15ml/min) ausgewählt. Die Proband*innen wiesen, mit Ausnahme der ADPKD, keine weiteren relevante Erkrankungen auf und auch die Einnahme der gängigen medikamentösen Therapien wurde ausgeschlossen. Lediglich die Einnahme von Phosphatbindern sowie eine milde polyzystische Lebererkrankung ohne Transaminasenerhöhung wurde akzeptiert⁴.

Die Ergebnisse Yacoub's weisen auf ein distinktes intestinales Mikrobiom im Rahmen eines Nierenfunktionsverlustes hin. Erstmals konnten in vivo Veränderungen einzelner Gruppen taxonomisch eng verwandter Bakterien, sogenannter Operationaler taxonomischer Einheiten (OTU), in Abhängigkeit der Nierenfunktion und unter Ausschluss möglichst vieler *Confounder* beobachtet werden⁴.

Bereits einige Jahre zuvor charakterisierte die Arbeitsgruppe um Vaziri erstmals das Mikrobiom im Rahmen chronischer Nierenerkrankungen im Menschen sowie unter kontrollierten Bedingungen im Rattenmodell⁹⁴.

Betrachtet man die in den Studien identifizierten signifikant unterschiedlichen OTUs, zeigen sich zum Teil, wie am Beispiel der Laktobacillaceae, konträre Ergebnisse⁴. Übereinstimmend

konnte jedoch in beiden Studien eine Reduktion der individuellen Diversität, der sogenannten Alpha Diversität festgestellt werden^{4,94}.

2.4.1. Charakterisierung des Stuhlmikrobioms von Patient*innen mit einer ADPKD

Bislang liegt nur eine Studie vor, die die Zusammensetzung des Stuhlmikrobioms von einer ADPKD Betroffenen untersucht hat. Im Gegensatz zu den obenstehenden Studien (Siehe Abschnitt 1.2.3 ^{94,96,104,106–110}) verglichen Yacoub und Kolleg*innen die Nierenerkrankten dabei nicht mit Gesunden, sondern bildeten Vergleichsgruppen anhand der Nierenfunktion [1) GFR >60ml/min/1,73m²; 2) GFR >15 / >60ml/min/1,73m²; 3) Dialysepflichtig GFR <15ml/min/1,73m²]⁴. Unter Ausschluss möglichst vieler potenzieller Störfaktoren, wie etwaige Begleiterkrankungen, vorangegangenen Operationen und einer Vielzahl an Medikamenten wurde versucht, einen graduellen Effekt der Nierenfunktion auf das intestinale Mikrobiom zu identifizieren.

In der Übersicht zeigte sich insbesondere in der Gruppe der dialysepflichtigen Proband*innen eine, wenn auch nicht statistisch signifikante, verminderte Alpha-diversität im Vergleich zu den Gruppen mit einer besseren Nierenfunktion⁴. Es fanden sich insgesamt in elf Gattungen und siebzehn Spp. signifikante Unterschiede in den Vergleichsgruppen⁴. Yacoub und Kolleg*innen fokussierten sich jedoch auf die Taxa, die eine stufenweise Veränderung, in Abhängigkeit der Nierenfunktion aufwiesen. Dabei zeigte sich insbesondere für die im folgenden aufgeführten OTUs eine zunehmende Häufigkeit im Stuhlmikrobiom der Proband*innen bei gleichsam abnehmender Nierenfunktion: Acinetobacter Spp., Allobaculum Spp., Campylobacter; Lactobacillaceae (Genus, nicht kultivierte Sp.), Plancoccaceae (Genus, nicht kultivierte Spezies), Pyramidobacter Piscalens, Pyramidobacter Spp., Sphingobium, Streptococcus Spp., Limnohabitans Spp.. Für die Spp. Bilophila und Oscillospira zeigte sich hingegen eine Abnahme der Häufigkeit im Stuhlmikrobiom der Proband*innen bei gleichsam abnehmender Nierenfunktion.

In der Zusammenschau mit der bestehenden Literatur stachen vor allem die Lactobacillaceae hervor, die sich im Gegensatz zu den Ergebnissen Yacoub's, in den Studien von Vaziri et al., Wong et al. und De Angelis et al. im Rahmen einer Nierenfunktionseinschränkung in verminderter Häufigkeit fanden^{94,96,107}. Unterstützt werden die Ergebnisse jedoch durch die Studie von Chaves und Kolleg*innen, die ebenfalls ein vermehrtes Vorkommen der Lactobacillus Spp. fanden¹⁰⁴.

2.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit

In den vergangenen Jahrzehnten hat die Mikrobiomforschung enorme Fortschritte gemacht. Mannigfaltige Studien beschreiben die mikrobielle Besiedlung, günstige sowie nachteilige Voraussetzungen und Auswirkungen des Mikrobioms auf Ihren Wirt oder Wirtin und auf das

Mikrobiom selbst. Auf Grund der komplexen Interaktionen können bislang oftmals keine kausalen Schlüsse gezogen werden, die eine Verwendung im klinischen Alltag erlauben.

Wie bereits erwähnt, kann es selbst bei Patient*innen, bei denen das gleiche Gen betroffen ist, zu einem sehr unterschiedlich ausgeprägtem Verlauf kommen. Daher sind Faktoren, welche Genotyp-unabhängig den Progress der ADPKD beeinflussen können, von größtem Interesse. Dies gilt sowohl für mögliche therapeutische Ansätze als auch für eine Verbesserung der Prädiktion des Krankheitsverlaufes. Das Mikrobiom ist hierfür ein äußerst interessanter Aspekt. Die hier vorgelegte Arbeit diene daher der Beantwortung folgender

Fragen:

1. Können spezifische Veränderungen des intestinalen Mikrobioms bei Patient*innen mit einer ADPKD identifiziert werden?
2. Finden sich bei Patient*innen mit einer ADPKD spezifische Veränderungen des intestinalen Mikrobioms, in Abhängigkeit klinisch relevanter Parameter wie z.B. der Nierenfunktion, des Alters, der Mayo-Klassifikation, einem früh aufgetretenen arteriellen Hypertonus oder früh aufgetretenen urologischen Komplikationen?
3. Welche Zusammenhänge bestehen zwischen den Serumkonzentrationen der Urämie Toxine und klinischen Merkmalen der Patient*innen bzw. zu den in den Mikrobiomanalysen identifizierten, signifikant abundanten, OTUs?

Um diese Fragen zu beantworten wurde der Stuhl von 25 Patient*innen in unterschiedlich weit fortgeschrittenen Stadien und Risikogruppen einer ADPKD, unter Ausschluss möglichst vieler Confounder, mit dem Stuhl von 12 gesunden Proband*innen verglichen. Beide Gruppen wiesen eine ähnliche Altersverteilung auf.

Simultan wurde aus dem Serum sämtlicher Proband*innen drei UT, die dem bakteriellen Metabolismus zuzuordnen sind (IS, pCS, TMAO) quantifiziert.

3. Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine Fall-Kontroll-Studie. Hierfür wurde das intestinale Mikrobiom sowie einzelne Metabolite bakteriellen Ursprungs, im Serum von Patient*innen in unterschiedlich weit fortgeschrittenen Stadien der ADPKD, mit dem intestinalen Mikrobiom und den entsprechenden Metaboliten im Serum, von gesunden Proband*innen untersucht und miteinander verglichen. Ergänzend suchte ich nach Korrelationen zwischen den molekulargenetischen Ergebnissen und klinischen Charakteristika der Proband*innen. Die entsprechenden Stuhl- und Serumproben der an einer ADPKD erkrankten Proband*innen lagen nach vormaliger Einwilligung in die Studie zur Aufklärung

seltener Nierenerkrankungen „RKD“ (DRKS00008910) vor. Die zugehörigen klinischen Daten lagen nach vorherigem Einschluss in das Deutsche ADPKD Tolvaptan Therapie Register „AD(H)PKD“ (NCT02497521) vor. Für beide Studien besteht eine zustimmende Bewertung der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln (RKD: Ethikvotum 15-215; AD(H)PKD: 15-323)

Die klinischen Daten, Stuhl- und Serumproben der gesunden Proband*innen standen uns nach vorheriger Einwilligung in die Studie zur Untersuchung altersabhängiger Änderungen im Transkriptom, Proteom und Metabolom (DRKS00014637), mit entsprechend zustimmender Bewertung der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln (Ethikvotum: 17-362), zur Verfügung.

3.2 Auswahl der Probanden und Probandinnen

3.2.1. ADPKD Kohorte

Patient*innen mit einem Mindestalter von 18 Jahren, dem auf Grund einer positiven Familienhistorie begründeten Verdacht auf eine ADPKD, sowie Patient*innen mit einer klinisch oder genetisch gesicherten ADPKD stellten sich seit 2015 gemäß dem Studienprotokoll des „AD(H)PKD“ Registers in der Klinik II für Innere Medizin, der Uniklinik Köln vor. Sofern sich kein Hinweis auf eine sekundäre Ursache einer chronischen Nierenerkrankung ergab oder eine fehlende Einwilligungsfähigkeit vorlag, erfolgte die Rekrutierung in die „RKD“ Studie, welche die molekulare Pathophysiologie hinter seltenen und genetischen Nierenerkrankungen, wie der ADPKD, unter Verwendung von Bioproben untersucht.

Zum Zeitpunkt der Auswahl der Proband*innen lagen insgesamt 80 Stuhlproben von Patient*innen mit einer ADPKD vor. Angelehnt an unser primäres Studienziel wurden zunächst zwei Gruppen, basierend auf der errechneten Nierenfunktion zum Zeitpunkt der Stuhlabgabe berechnet nach CKD-Epi 2009¹⁴²⁾ gebildet. Die Probenahme erfolgte zeitversetzt zur Blutentnahme und der Berechnung der eGFR, durch die Proband*innen im häuslichen Umfeld. Bei einem Probanden erfolgte die Probenahme 6 Monate nach der Blutentnahme. Bei allen anderen Proband*innen liegt die Blutentnahme, sowie die Probenahme des Stuhls maximal 3 Monate auseinander. Die Nierenfunktion zum Zeitpunkt der Stuhlabgabe bezieht sich somit auf den eGFR-Wert der zeitlich am nächsten an der Stuhlabgabe liegt.

Gruppe A zeigte eine weitestgehend erhaltene Nierenfunktion, mit einer eGFR von $\geq 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ (n=46), Gruppe B (n=34) zeigte eine mittel- bis schwergradig reduzierte Nierenfunktion $< 45 \text{ ml/min/1,73m}^2$. Die Messung der eGFR und Einteilung des Schweregrads erfolgte dabei nach den aktuellen Empfehlungen der Globalen Organisation zur Verbesserung chronischer Nierenerkrankungen „KDIGO“¹⁴³. Gruppe A und B wurden anschließend entsprechend dem Alter in Subgruppen, mit einem Alter von 45 Jahren oder jünger und einer Subgruppe mit einem Alter von 50 Jahren oder älter unterteilt [Gruppe A ≤ 45 (n=19); Gruppe

A ≥ 50 (n=13); Gruppe B ≤ 45 (n=7); Gruppe B ≥ 50 (n=25)]. Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die unterschiedlich präformierten Gruppen der ADPKD Kohorte.

Mayo Klassifikation			A	B	C	D	E	*Nb	Total
Gruppe A (eGFR $\geq 60\text{ml/min/1,73m}^2$)	Alter (in Jahren) ≤ 45	W n=3	n=0	n=0	n=3	n=3	n=0	n=0	n=6
		M n=3							
	Alter (in Jahren) ≥ 50	W n=4							
		M n=3							
Gruppe B (eGFR $< 45\text{ml/min/1,73m}^2$)	Alter (in Jahren) ≤ 45	W n=2	n=1	n=0	n=0	n=1	n=3	n=1	n=6
		M n=4							
	Alter (in Jahren) ≥ 50	W n=3							
		M n=3							

Tabelle 3: Aufteilung der Patient*innen: 2 Gruppen mit jeweils 2 Subgruppen entsprechend der Nierenfunktion (A / B) und dem Alter (≤ 45 Jahren / ≥ 50 Jahren). Anzahl der weiblichen (W) und männlichen (M) Patient*innen in den einzelnen Subgruppen, sowie Anzahl der Patient*innen gemäß der Risikostratifizierung anhand der Mayo Klassifikation. (*Nb = Nicht bestimmt)

3.2.2. Kontroll-Kohorte

Aus der Kohorte gesunder Proband*innen der Studie lagen insgesamt 42 Stuhlproben vor. Da diese Proband*innen keine relevanten Erkrankungen, insbesondere keine relevanten Nierenerkrankungen aufwiesen, wählten wir die Proband*innen analog zur ADPKD Kohorte anhand des Alters aus (Gruppe C ≤ 45 Jahre; Gruppe D ≥ 50 Jahre). Weiterhin achteten wir auf eine ausgeglichene Geschlechterverteilung, siehe auch Tabelle 4.

	Geschlecht	Total
Gruppe C (Alter ≤ 45 Jahre)	W (n=3)	n=6
	M (n=3)	
Gruppe D (Alter ≥ 50 Jahre)	W (n=3)	n=6
	M (n=3)	

Tabelle 4: Aufteilung der gesunden Proband*innen: Anhand des Alters (Gruppe C / D). Anzahl weiblicher (W) und männlicher (M) Proband*innen in den Gruppen.

3.3 Probengewinnung

3.3.1. ADPKD Kohorte

Im Rahmen der Heilfürsorge wurde während eines Vorstellungstermins in unserer Klinik Blut zur laborchemischen Diagnostik entnommen. Die Rückstellproben für die RKD-Studie wurden nach erfolgter Einwilligung am selben Tag zur Diagnostik und Aufarbeitung (Zentrifugation 4000 Umdrehung/Minute über 10 Minuten, anschließend tiefgefroren bei -20°C) in das Zentrallabor der Uniklinik Köln geliefert. Hiernach wurde das gefrorene Serum durch eine geschulte Mitarbeiterin des Studienzentrums, der Klinik II für Innere Medizin abgeholt, aufgetaut und entsprechend der vorliegenden Menge, jeweils 250µl Serum in 2ml Cryo Tubes aliquotiert. Die Proben wurden durch eine ID Pseudonymisiert und anschließend bei -80°C in einem vor Erwärmung alarmgesicherten Tiefkühlschrank gelagert.

Des Weiteren wurden die Patient*innen gefragt, ob sie bereit seien eine Stuhlprobe zur Verfügung zu stellen. Willigten die Patient*innen ein, wurde ihnen ein entsprechendes Set zur Sammlung von Stuhl ausgehändigt. Der Stuhl wurde dabei in einem speziellen Stuhl Kollektor System (Fisher Scientific Commode Specimen Collection System, 60/cs Fisher Scientific Model: 02-544-208), getrennt von Urin aufgefangen. Anschließend wurde eine Stuhlprobe durch die Proband*in, gemäß der mitgelieferten Anleitung, in einem speziell für die Untersuchung des Mikrobioms, des Stuhls ausgelegten Sammelbehälter (OMNIgene® Gut, OM-200, DNAGENOTEK™) asserviert. Ein Probenbegleitschein erfasste das Datum der Probenahme, die Stuhlkonsistenz (Bristol Skala), sowie den Namen der Patient*in. Nachfolgend wurde die Stuhlprobe zusammen mit dem Probenbegleitschein, gemäß den Richtlinien des europäischen Übereinkommens zur internationalen Beförderung gefährlicher Güter auf der Straße (ADR), in einer entsprechenden Verpackung (P650) und vorfrankierten Versandbox (UN 3373) an das Studienzentrum der Klinik II für Innere Medizin versandt¹⁴⁴. Nach Ankunft im Studienzentrum wurden die in den OMNIgene® Gut Sammelbehältern befindlichen Stuhlproben für maximal 14 Tage bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurde der Stuhl von der Stabilisierungsflüssigkeit durch eine geschulte Mitarbeiterin in einem Schüttler (Vortex-Schüttler, VWR™) getrennt und jeweils 1ml Stuhl in ein 2ml Cryo Tube aliquotiert. Die Proben wurden dann analog zu den Serumproben Pseudonymisiert und bei -80°C in einem vor Erwärmung alarmgesicherten Tiefkühlschrank gelagert.

3.3.2. Kontroll-Kohorte

Im Rahmen der Studie zur Untersuchung altersabhängiger Änderungen im Transkriptom, Proteom und Metabolom wurden gesunde Proband*innen mit einem Mindestalter von 18 Jahren rekrutiert. Die Proband*innen wurden durch einen Aushang auf die Studie aufmerksam

gemacht. Ausschlusskriterien waren eine fehlende Einwilligungsfähigkeit, relevante kardiovaskuläre, sowie renale Vorerkrankungen und eine bekannte aktive Hepatitis oder HIV-Erkrankung. Die Probenahme, Verarbeitung, Pseudonymisierung und Lagerung der Serum- und Stuhlproben erfolgte, nach vorheriger Einwilligung, nach dem gleichen Protokoll wie bei den Proben der ADPKD Kohorte. Als Unterschied ist anzumerken, dass die Serumproben auf Grund der guten Gesundheit der Proband*innen, nicht im Rahmen der allgemeinen Heilfürsorge abgenommen wurden, sondern - nach dementsprechender Aufklärung - eine einmalige zusätzliche Blutentnahme erforderlich wurde.

3.4 Auswahl der klinischen Parameter

Wie zuvor bereits erwähnt basierte die Auswahl der Patient*innen entsprechend der Kohorte auf dem Alter, dem Geschlecht sowie der Nierenfunktion, zum Zeitpunkt der Probenahme. Zur späteren Korrelation der Ergebnisse mit den klinischen Merkmalen wurden ergänzend Parameter erfasst, die Aufschluss über den Krankheitsverlauf geben können, oder als potenzielle *Confounder* in Betracht kämen.

In der gesunden Kontrollkohorte wurden Proband*innen mit relevanten kardiovaskulären sowie renalen Vorerkrankungen oder einer bekannten aktiven Hepatitis oder HIV-Erkrankung ausgeschlossen. Andere Begleiterkrankungen wurden ebenso wie eine potenzielle Begleitmedikation erfasst.

In der ADPKD Kohorte wurden, wie auch in der gesunden Kohorte, Begleiterkrankungen und eine bestehende Medikation erfasst. Als potenzielle Progressionsmarker, wie im Rahmen des PROPKD Scores aufgeführt, wurden urologische Komplikationen (Zysteninfekte, Flankenschmerzen <35. Lebensjahr, Makrohämaturie <35. Lebensjahr) und ein arterieller Hypertonus vor dem 35. Lebensjahr separat dokumentiert. Weiterhin wurde die zugrundeliegende Genomveränderung (PKD1 / PKD2), sofern untersucht, inkludiert. Auch eine mögliche Nephrolithiasis wurde erfasst. Um im Rahmen der Datenanalyse einen graduellen Verlauf darstellen zu können wurde zudem die eGFR zum Zeitpunkt der Probenahme aufgenommen. Des Weiteren wurden Noxen (Alkohol-, Nikotinkonsum), die geschätzte orale Salzzufuhr, der Körpermasseindex (*Body-mass-index*, BMI), die Stuhlkonsistenz anhand der Bristol Skala, sowie eine kürzliche antiinfektive Therapie (festgelegt als antiinfektive Therapie in den vergangenen 3 Monaten) als mögliche *Confounder* eines veränderten Mikrobioms registriert. Eine Übersicht gibt Tabelle 5.

Kohorte	Erfasste Variablen (Verwendung von Werten mit dem kürzesten erfassten zeitlichen Abstand zur Stuhlprobe)
ADPKD Kohorte	Allgemeine Daten: <ul style="list-style-type: none"> • Alter • Geschlecht ADPKD spezifisch: <ul style="list-style-type: none"> • eGFR (Berechnung nach CKD-Epi) • Mayo Klassifikation (1A-1E) • Nachgewiesene Mutation (PKD1 / PKD2) • Urologische Komplikationen <ul style="list-style-type: none"> ○ Zysteninfektionen ○ Flankenschmerzen <35.Lebensjahr ○ Makrohämaturie <35. Lebensjahr • Arterielle Hypertonie <35.Lebensjahr • Nephrolithiasis Potenzielle <i>Confounder</i> : <ul style="list-style-type: none"> • Begleiterkrankungen • Dauermedikation • Stuhlkonsistenz (Bristol Skala) • BMI • Geschätzter täglicher Salzkonsum • Noxen <ul style="list-style-type: none"> ○ Alkoholkonsum ○ Nikotinkonsum
Kontroll Kohorte	Allgemeine Daten: <ul style="list-style-type: none"> • Alter • Geschlecht Potenzielle <i>Confounder</i> : <ul style="list-style-type: none"> • Begleiterkrankungen • Dauermedikation

Tabelle 5: Übersicht der initial erfassten Variablen zur nachfolgenden statistischen Aufarbeitung.

3.5 Mikrobiomanalyse

Die Untersuchung der Stuhlproben erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe „Klinische Mikrobiomforschung“, der Klinik I für Innere Medizin der Uniklinik Köln, unter Leitung von Frau Prof. Dr. Maria J. G. T. Vehreschild.

3.5.1. Präanalytik und Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte durch die Arbeitsgruppe „Klinische Mikrobiomforschung“. Der Transport der Proben erfolgte auf Trockeneis, um ein vorzeitiges Auftauen zu vermeiden. Nachdem die Stuhlproben aufgetaut wurden, wurde die enthaltene DNA entsprechend den Herstelleranweisungen mit dem „FastDNA™ Spin Kit for Soil“ (MP Biomedicals #6560-200) extrahiert¹⁴⁵. Dabei werden maximal 500µg der Stuhlprobe in ein spezielles Gefäß, das eine Flüssigkeit (*Lysing Matrix E*) zur Lyse sämtlicher Organismen (inklusive komplizierterer Organismen wie Pilzen, Sporen) enthält, gegeben¹⁴⁵. Anschließend wird die Probe mit Hilfe eines Schüttlers (*FastPrep®*) homogenisiert¹⁴⁵. Die in der *Lyse Matrix E* enthaltenen Puffer

schützen und erhalten dabei die bei der Lyse freigesetzten Proteine und Nukleinsäuren¹⁴⁵. Anschließend wird die entstandene Masse zentrifugiert um Zellbestandteile, *Lyse Matrix E* und Stuhllagerungen zu trennen¹⁴⁵. Nach entsprechenden Aliquotierungsschritten wird die DNA aus dem Überstand mit einer Silikabasierten Prozedur (*GeneClean®*), und speziellen Filtern (*SPIN™ Filter*) aufgereinigt¹⁴⁵. Die extrahierte DNA wurde dann mit einer Vakuumzentrifuge konzentriert und anschließend mit den Primern 341F (S-D-Bact-0341-b-S-17) und 802R (S-D-Bact-0785-b-A-18), sowie mit „KAPA HiFi Hot Start Ready Mix“ (VWR KAPBKK2602) zur Amplifikation behandelt. Die Primer 341F und 802R binden an die variablen Regionen V3 und V4 des 16S-rRNA-Gens und wiesen in einer Auswertung von 175 verschiedenen 16S-rDNA Primern und 512 Primer-Paaren einen guten Erfassungsbereich der enthaltenen Bakterien auf¹⁴⁶.

Anschließend wurden die 16S Amplikons chemisch, mit „Agencourt AMPure XP, 5 mL kit“ (Beckman Coulter Genomics, #A63881) aufgereinigt und enzymatisch, mittels „Nextera Index Kit“ (FC-131-1002) markiert. Eine qualitative Kontrolle erfolgte unter Zuhilfenahme des „Qubit dsDNA HS Assay Kit“ (Thermo Fisher, Q32851). Hiernach erfolgte die sogenannte „Normalisierung“, bei der die Proben nach Protokoll verdünnt wurden, sodass jede Probe ungefähr die gleiche Menge DNA enthielt¹⁴⁷. Vor der eigentlichen Sequenzierung wurden im letzten Arbeitsschritt, Aliquots aller Proben im Rahmen des sogenannten „Pooling“ in ein Probenröhrchen gegeben. Abschließend erfolgte dann die Sequenzierung auf dem „Illumina MiSeq“ System mit den „MiSeq Reagent Kit v3“ (600 cycle, Illumina MS-102-3003) Reagenzien und der „MiSeq Phix control“ (0.5 mL, Illumina FC-110-3001) Lösung zur Kalibrierung.

3.5.2. Bioinformatische Auswertung

Die sequenzierten Daten wurden anschließend mit der „DADA2“ Pipeline und dem „QIIME“ Software Paket Version 2 (2019.04) aufgearbeitet und analysiert^{148–150}. Kurz zusammengefasst wurden hierbei Qualitätsprofile der ausgelesenen Daten analysiert, um Positionen herauszufiltern, an denen die Auslesungsqualität deutlich vermindert ist. Die Sequenzen wurden dann an den identifizierten Positionen gekappt (`trunc_len_f=280`, `trunc_len_r=240`) und mit dem DADA2 Plugin für QIIME mit der hieran gekoppelten Entrauschungsfunktion unter den Standardeinstellungen (`trunc_g=2`, `max_ee=2`, `chimera_method=consensus`) weiterverarbeitet. Rarefizierungskurven wurden anschließend basierend auf den Funktionstabellen festgelegt und die Analyse der relativen Anteile jedes bakteriellen Taxons erfolgte, nachdem die Daten bis auf eine Sequenzierungstiefe von 2000 Sequenzen je Probe rarefiziert wurden. Die Taxonomische Zuordnung erfolgte mittels naivem Bayes-Klassifikator (Auto-sklearn), der an der „SILVA“ Datenbank (Version 132) trainiert

wurde, wobei lediglich die Sequenzen der variablen Regionen V3 und V4 des 16S-rRNA Gens inkludiert wurden^{151–154}.

Die statistische Auswertung erfolgte mit „R for Statistical Computing“ (Version 3.6.3, R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich)¹⁵⁵. Hierfür wurden die mittels QIIME generierten Daten importiert und die Diversität-Scores unter Zuhilfenahme des Phyloseq Software Pakets für R kalkuliert¹⁵⁶. Mit dem „Linear Discriminant Analysis (LDA) Effective Size“ (LEfSe) Algorithmus wurden zudem in komparativer Weise signifikant unterschiedliche Taxa hervorgehoben¹⁵⁷. Zur Darstellung der phylogenetischen Distanz verschiedenen Proben wurde der „Analysis of similarity“ (ANOSIM) Test, basierend auf der „generalized UniFrac“ (alpha = 0,5) Distanzmetrik mit 999 Permutationen angewandt, unter Verwendung einer Kombination des „Vegan: Community Ecology Package“ und des „GUniFrac Package“^{158–160}.

3.6 Analyse der Urämie Toxine

Die Analyse der Urämischen Retentionssolute -TMAO, IS und pCS- erfolgte in Kooperation mit der Lipidomics / Metabolomics Facility im Exzellenzcluster CECAD, unter Leitung von Frau Dr. Susanne Brodesser.

Für die Quantifizierung der Gesamt-Serumlevel von TMAO, IS und pCS im Serum der Proband*innen wurden die Proben mit dem Lösungsmittel Acetonitril, zur Ausfällung von Proteinen behandelt. Das Acetonitril enthielt, gemäß des internen Standards, Isotopen markiertes TMAO, IS und pCS.

Für die Quantifizierung des freien TMAO, IS und pCS wurde ein Aliquot der Serumprobe durch eine Ultrafiltrationsmembran [Molecular weight cut off filter (MWCO)] mit einer molekularen Ausschlussgrenze von 3000 Dalton zentrifugiert. Das Filtrat wurde anschließend, analog zur Messung der Gesamt-Serumlevel, mit Acetonitril behandelt, welches die markierte Metabolite enthielt.

Nach der Zentrifugation und Ausfällung der Proteine, wurde der Überstand mittels Flüssigkeitschromatographie [Liquid Chromatography; (LC)], gekoppelt mit einem Elektronenstoß Ionisations [Electron Spray Ionization (ESI)] Tandem Massenspektrometer [Tandem Mass Spectrometry (MS/MS)], an dem QTRAP® 6500 Triple Quadrupole/linear ion trap mass spectrometer der Firma SCIEX ausgewertet. Die zu untersuchenden mikrobiellen Metabolite wurden dabei durch einen *Multi Reaction Monitoring* (MRM) Scan Modus identifiziert. Zur abschließenden Quantifizierung der endogenen urämischen Toxine wurden Kalibrationskurven verwendet, die auf der Basis sequenzieller LC-MS/MS Messungen seriell verdünnter synthetischer TMAO, IS und pCS generiert wurden.

3.7 Statistische Auswertung

Die Datenverwaltung, sowie die Auswertung führte ich mit der statistischen Analysesoftware SPSS® (IBM® Corporation, Armonk, New York, USA) Version 25 und Version 28 durch. Eine

begleitende Beratung zum Vorgehen und Anwendung einzelner Methoden erhielt ich durch das Institut für medizinische Statistik und Bioinformatik der Universität zu Köln.

Die im Rahmen der bioinformatischen Auswertung gewonnenen Werte der logarithmischen linearen Diskriminanzanalyse (LDA Score), gaben einen Hinweis auf die in den einzelnen Vergleichen, signifikant unterschiedlich abundanten Taxa. Ich fügte die relativen Häufigkeiten dieser signifikant unterschiedlich abundanten Taxa zusätzlich zu den klinischen Parametern in die Datenbank ein. Weiterhin implementierte ich die Mittelwerte, der gemessenen freien- und gebundenen URS [angegeben in Mikromolar (μM)].

Zunächst berechnete ich die deskriptive Statistik der demographischen Daten, der klinischen Charakteristika sowie der implementierten Taxa und UTs, der gesunden Kontrollkohorte, der ADPKD Kohorte sowie der gesamten Kohorte. Neben den Mittelwerten, beziehungsweise je nach Skalenniveau, dem Modus oder Median berechnete ich die Verteilung einschließlich der Spannweite, Quartile, Standardabweichung, Varianz, Schiefe und Kurtosis. Ergänzend ließ ich mir für die metrisch verteilten Daten Histogramme ausgeben.

Im Rahmen der eigenen Datenanalyse korrelierte ich, mit Hilfe des Spearman Korrelationskoeffizienten (zweiseitige Testung) sowie im Falle nominal skalierte Daten, mit Hilfe des Eta-Koeffizienten, die relativen Häufigkeiten der signifikant abundanten Taxa, mit den gemittelten Serumkonzentrationen der Urämie Toxine, sowie den klinischen Charakteristika. Gleichermaßen korrelierte ich die Urämie Toxine mit den klinischen Charakteristika. Fanden sich signifikante Korrelationen und die Voraussetzungen für eine lineare Regression zeigten sich erfüllt, führte ich eine lineare Regressionsanalyse durch. Ergänzend wendete ich bei bestimmten Fragestellungen den Mann-Whitney-U- oder den Kruskal-Wallis-Test, zur Differenzierung zentraler Tendenzen in zwei Vergleichsgruppen an. Um eine Kausalität zwischen mehreren Variablen aufzudecken, berechnete ich bei bestimmter Fragestellung eine multiple lineare Regression.

4. Ergebnisse

4.1 Merkmale der Studienpopulation

In der univariaten deskriptiven Statistik beider Kohorten (ADPKD Kohorte und gesunde Kontrollkohorte) zeigte sich eine vergleichbare Altersverteilung, mit einem Median von 50 Jahren in der ADPKD Kohorte und einem Median von 45 Jahren in der gesunden Kontrollkohorte. Die Geschlechterverteilung lag in der gesunden Kontrollkohorte bei genau 50% Frauen (n=6) und 50% Männern (n=6). In der ADPKD Kohorte war die Geschlechterverteilung ebenfalls nahezu ausgeglichen, mit 48% Frauen (n=12) und 52% Männern (n=13). Für die ADPKD Kohorte wurden im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit Vorerkrankungen, die in den PROPKD Score einfließen, erfasst [Art. Hypertonie vor dem 35. Lebensjahr, urologische Komplikationen vor dem 35. Lebensjahr (Zysteninfekte,

Flankenschmerzen, Makrohämaturie)]. Dabei wiesen 24% (n=6) einen arteriellen Hypertonus vor dem 35. Lebensjahr auf und 20% (n=5) erlitten bereits vor dem 35. Lebensjahr urologische Komplikationen. In der gesunden Kontrollkohorte fand sich lediglich 1 Proband*in mit einem arteriellen Hypertonus (n=1, 8,3%)]. Bezüglich der Medikation fokussierte ich mich auf Antihypertensiva, Protonenpumpenhemmer, sowie im Falle der ADPKD Kohorte auf Tolvaptan. Vergleiche hierfür Tabelle 6.

Variablen		ADPKD Kohorte (n=25)	Gesunde Kontrollkohorte (n=12)
Demografische Daten			
Geschlecht	Weiblich	n=12 (48%)	n=6 (50%)
	Männlich	n=13 (52%)	n=6 (50%)
Alter (in Jahren)	Median (Interquartilsbereich)	50 (14,5)	45 (25,85)
Vorerkrankungen			
Art. Hypertonie < 35. Lebensjahr		n=6 (24%)	n=0 (0%)
Urologische Komplikationen < 35. Lebensjahr (Zysteninfekte, Flankenschmerz, Makrohämaturie)		n=5 (20%)	n=0 (0%)
Medikamenteneinnahme			
Einnahme von Tolvaptan		n=3 (12%)	n=0 (0%)
Einnahme von ACE-Hemmern		n=9 (36%)	n=0 (0%)
Einnahme von AT1-Antagonisten		n=12 (48%)	n=0 (0%)
Einnahme von Kalziumantagonisten		n=6 (24%)	n=1 (8,3%)
Einnahme von Thiaziden		n=5 (20%)	n=0 (0%)
Einnahme von Betablockern		n=2 (8%)	n=1 (8,3%)
Einnahme von Protonenpumpenhemmern		n=3 (12%)	n=0 (0%)
Einnahme sonstiger Medikamente		n=8 (36%)	n=2 (16,7%)

Tabelle 6: Zusammenfassung der gemeinsamen Merkmale, der gesunden Kontrollkohorte, sowie der ADPKD Kohorte.

4.1.1. Merkmale der ADPKD Kohorte

Die ADPKD Kohorte wurde im Rahmen des AD(H)PKD-Registers detailliert charakterisiert. Neben klinischen Charakteristika, wie der Körpergröße und -gewicht, zusammengefasst zum BMI, der eGFR, und dem CKD Stadium wurden auch potenzielle Noxen und Ernährungsgewohnheiten, wie Alkohol-, Nikotinkonsum und der geschätzte Salzkonsum, erfasst. Als prognostischer Marker für eine ADPKD wurde zudem die Mayo-Klassifikation, anhand intern angefertigter Volumetriemessungen, bestimmt. Darüber hinaus wurde für die Stuhlproben des AD(H)PKD Registers die Stuhlbeschaffenheit anhand der Bristol Skala festgehalten (Vergleiche Tabelle 7). Insgesamt zeigte sich über die ADPKD-Kohorte ein weitestgehend normalgewichtiges Kollektiv, von denen nur 5% aktiv Nikotin konsumierten und Alkohol überwiegend in moderaten Mengen zu sich nahmen (44% <1 Getränk/Woche, weitere 44% <1 Getränk/Tag), Der Salzkonsum lag im Median bei 9,9 g/24h und somit über der empfohlenen Menge von 5-7g/Tag. Etwa die Hälfte der Patient*innen wies eine leichtgradig eingeschränkte

Nierenfunktion im CKD Stadium G2 (eGFR ≥ 60 , $< 90 \text{ ml/min/1,73m}^2$) auf. Hingegen wiesen lediglich ein Viertel der Betroffenen eine fortgeschrittene Nierenfunktionseinschränkung mit einer eGFR $< 30 \text{ ml/min/1,73m}^2$ auf. Hinsichtlich der prognostisch relevanten Mayo-Klassifikation konnten knapp ein Drittel der Kohorte den Mayo-Klassen D und E mit einem hohen Progressionsrisiko zugewiesen werden. Ein weiteres Drittel der Kohorte konnte in die Mayo-Klasse C mit einem intermediärem Progressionsrisiko eingeordnet werden. Für zwei Patient*innen konnte auf Grund fehlender MRT-Bilder keine Mayo-Klasse bestimmt werden. 20% der Kohorte wiesen mit einer Mayo-Klasse A oder B ein eher niedriges Progressionsrisiko auf. Die Stuhlkonsistenz wurde überwiegend als unauffällig angegeben. Lediglich bei zwei Stuhlproben wurde flüssiger Stuhlgang mit einzelnen festen Anteilen (Bristol Skala 6), beziehungsweise wässriger Stuhlgang angegeben (Bristol Skala 7).

Variablen		ADPKD Kohorte (n=25)
<u>Klinische Charakteristika</u>		
BMI (Kg/m ²)	Median (Interquartilbereich)	22,3 (4) 4
eGFR (ml/min/1,73m ²)	Median (Interquartilbereich)	62 (46)
CKD Stadium	Stadium G2 Stadium G3b Stadium G4	n=13 (52%) n=6 (24%) n=6 (24%)
Nachgewiesene Mutation	PKD1, nicht trunkierend PKD1, trunkierend PKD1, Variante unklarer Signifikanz PKD2 Untersucht keine Mutation detektiert Nicht untersucht	n=3 (12%) n=4 (16%) n=3 (12%) n=7 (28%) n=5 (20%) n=3 (12%)
Nikotinkonsum	Nie geraucht Ex Raucher Aktive Raucher	n=9 (36%) n=11 (44%) n=5 (20%)
Alkoholkonsum	Kein Alkoholkonsum ≤ 1 Getränk / Woche < 1 Getränk / Tag ≥ 1 Getränk / Tag Nicht erfasst	n=6 (24%) n=5 (20%) n=11 (44%) n=2 (8%) n=1 (4%)
Geschätzter Salzkonsum (g/24h)	Median (Interquartilbereich)	9,9 (9,75)
<u>Prognostische Marker</u>		
Mayo Klassifikation	1A 1B 1C 1D 1E Nicht erfasst	n=2 (8%) n=3 (12%) n=9 (36%) n=6 (24%) n=3 (12%) n=2 (8%)

Beschaffenheit der Stuhlprobe		
Bristol Skala	1	n=1 (4%)
	3	n=9 (36%)
	4	n=6 (24%)
	6	n=1 (4%)
	7	n=1 (4%)
	Nicht erfasst	n=7 (28%)

Tabelle 7: Zusammenfassung der klinischen Charakteristika der ADPKD Kohorte

4.2 Ergebnisse der Mikrobiomanalyse

Die bioinformatische Auswertung erfolgte als Teil der Analyse des Stuhlmikrobioms durch Herrn Dr. Fedja Farowski aus der Arbeitsgruppe „Klinische Mikrobiomforschung“. Zur Beantwortung der primären Fragestellungen definierte ich, anhand klinischer Charakteristika, Subgruppen aus den Gesunden und an einer ADPKD erkrankten Proband*innen, die in unterschiedlichen Konstellationen gegenübergestellt wurden. Eine detaillierte Auflistung der Vergleiche, inklusive der Fragestellungen und der involvierten Subgruppen gibt Tabelle 8.

Fragestellungen		Präformierte Vergleichsgruppen
Vergleich 1	Führt eine ADPKD zu Veränderungen im Stuhlmikrobiom?	1.1 Alle Patient*innen mit einer ADPKD gegenüber allen gesunden Proband*innen. <hr/> 1.2 Alle Patient*innen mit einer ADPKD und eine eGFR $\geq 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ gegenüber allen gesunden Proband*innen.
Vergleich 2	Sind diese Veränderungen abhängig von der Nierenfunktion?	2.1 Alle Patient*innen mit einer ADPKD und einer eGFR $< 45 \text{ ml/min/1,73m}^2$ gegenüber allen gesunden Proband*innen. <hr/> 2.2 Alle Patient*innen mit einer ADPKD und einer eGFR $< 45 \text{ ml/min/1,73m}^2$ gegenüber allen Patient*innen mit einer ADPKD und einer eGFR $\geq 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$.
Vergleich 3	Sind diese Veränderungen altersabhängig?	3.1 Alle Patient*innen mit einer ADPKD und einem Alter ≤ 45 Jahren gegenüber allen Patient*innen mit einer ADPKD und einem Alter ≥ 50 Jahren <hr/> 3.2 Alle gesunden Proband*innen mit einem Alter ≤ 45 Jahren gegenüber allen Proband*innen mit einem Alter ≥ 50 Jahren
		4.1. Alle Patient*innen mit einer ADPKD, einem Alter ≤ 45 Jahren und einer eGFR $< 45 \text{ ml/min/1,73m}^2$, gegenüber allen Patient*innen mit einer ADPKD, einem Alter ≥ 50 Jahren und einer eGFR $\geq 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$

Vergleich 4	Zeigen sich spezifische Veränderungen im Stuhlmikrobiom in Abhängigkeit der Progression der ADPKD? (Risikostratifizierung anhand von Alter und Nierenfunktion)	<p>4.2. Alle Patient*innen mit einer ADPKD, einem Alter ≤ 45 Jahren und einer eGFR $< 45 \text{ ml/min/1,73m}^2$, gegenüber allen Patient*innen mit einer ADPKD, einem Alter ≥ 50 Jahren und einer eGFR $< 45 \text{ ml/min/1,73m}^2$</p> <p>4.3. Alle Patient*innen mit einer ADPKD, einem Alter ≤ 45 Jahren und einer eGFR $< 45 \text{ ml/min/1,73m}^2$, gegenüber allen Patient*innen mit einer ADPKD einem Alter ≤ 45 Jahren und einer eGFR $\geq 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$</p> <p>4.4. Alle Patient*innen mit einer ADPKD, einem Alter ≥ 50 Jahren und einer eGFR $< 45 \text{ ml/min/1,73m}^2$, gegenüber allen Patient*innen mit einer ADPKD, einem Alter ≥ 50 Jahren und einer eGFR $\geq 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$</p> <p>4.5. Alle Patient*innen mit einer ADPKD, einem Alter ≥ 50 Jahren und einer eGFR $< 45 \text{ ml/min/1,73m}^2$, gegenüber allen Patient*innen mit einer ADPKD, einem Alter ≤ 45 Jahren und einer eGFR $\geq 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$</p> <p>4.6. Alle Patient*innen mit einer ADPKD, einem Alter ≥ 50 Jahren und einer eGFR $\geq 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ gegenüber allen Patient*innen mit einer ADPKD, einem Alter ≤ 45 Jahren und einer eGFR $\geq 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$</p>
Vergleich 5	Zeigen sich spezifische Veränderungen im Stuhlmikrobiom in Abhängigkeit der Progression der ADPKD? (Risikostratifizierung anhand früher Begleitkomplikation; Art. Hypertonus $< 35.$ Lebensjahr)	5. Alle Patient*innen mit einer ADPKD und einem vor dem 35. Lebensjahr aufgetretenen arteriellen Hypertonus gegenüber allen Patient*innen mit einer ADPKD, bei denen kein arterieller Hypertonus vor dem 35. Lebensjahr aufgetreten ist.
Vergleich 6	Zeigen sich spezifische Veränderungen im Stuhlmikrobiom in Abhängigkeit der Progression der ADPKD? (Risikostratifizierung anhand der Mayo-Klassifikation)	6. Alle Patient*innen mit einer ADPKD und einer Nierengröße, gemäß der Mayo Klassifikation 1A-1C, gegenüber allen Patient*innen mit einer ADPKD und einer Nierengröße, gemäß der Mayo Klassifikation 1D-1E
Vergleich 7	Zeigen sich spezifische Veränderungen im Stuhlmikrobiom in Abhängigkeit der Progression der ADPKD? (Risikostratifizierung anhand früher Begleitkomplikationen; Urologische Komplikationen, $< 35.$ Lebensjahr)	7. Alle Patient*innen mit einer ADPKD und vor dem 35. Lebensjahr stattgehabten urologischen Komplikationen gegenüber allen Patient*innen mit einer ADPKD ohne stattgehabten urologischen Komplikationen $< 35.$ Lebensjahr.

Tabelle 8: Übersicht der präformierten Vergleichsgruppen, inklusive der zugehörigen Fragestellungen, zur bioinformatischen Auswertung der Mikrobiomanalyse.

4.2.1. Bioinformatische Analyse

Die Gegenüberstellungen wurden mit Hilfe des LEfSe Algorithmus ausgewertet, womit die signifikant unterschiedlich abundanten bakteriellen Taxa, in den jeweiligen Vergleichsgruppen, berechnet wurden. Der Grenzwert für den LDA score wurde dabei, angelehnt an die Originalarbeit von Segata und Kollegen, auf 2,0 gesetzt¹⁵⁷.

Bakterielle Taxa, die klar mit der Nierenfunktion korrelieren, konnten anhand der bioinformatischen Analysen nicht gefunden werden. Auch konnte in der ADPKD Kohorte kein relevanter Unterschied in der Alpha- (Shannon Index; p-Wert=0,886) oder Betadiversität (Permanova/Adonis Analyse; $R^2=0,03119$) gegenüber der gesunden Kontrollkohorte gefunden werden (Siehe auch Abbildung 2 und 3)^{4,95}.

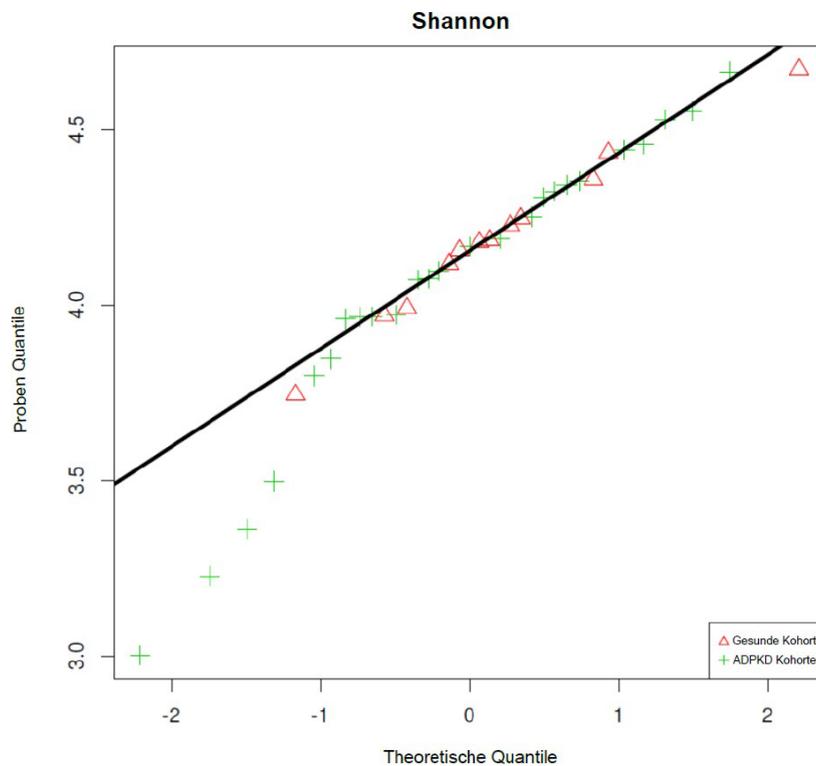


Abbildung 2: Grafische Darstellung der Ergebnisse des Shannon Indexes, als Maß der Diversität in den einzelnen Stuhlproben. Die Daten liegen sämtlich nah beieinander, ohne Hinweis auf einen signifikanten Unterschied in der Alpha Diversität zwischen der gesunden Kontrollkohorte und der ADPKD Kohorte

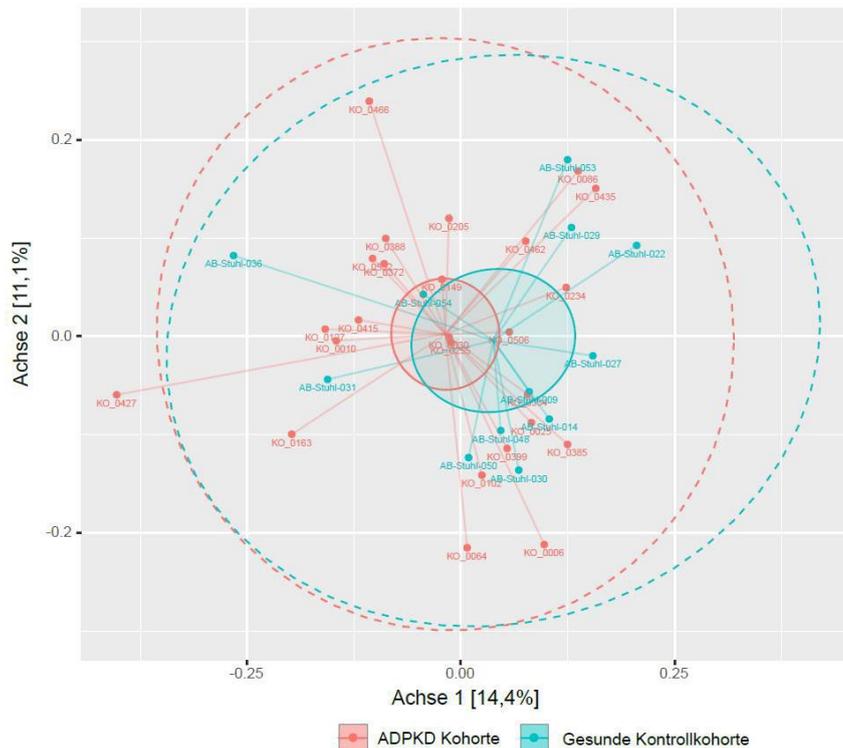


Abbildung 3: Distanzmatrix (Generalized UniFrac PCoA) zur Veranschaulichung, wie ähnlich bzw. unterschiedlich die mikrobielle Zusammensetzung der Stuhlproben, der einzelnen Proband*innen ist. Die Zentren, um die sich die einzelnen Proben der Gesunden und Erkrankten streuen, sind zum besseren Verständnis farblich markiert und überlappen sich. Es ergibt sich kein Hinweis auf einen signifikanten Unterschied in der Beta Diversität.

Auffällig erschien hingegen die vergleichsübergreifende, signifikante Häufung, der OTUs der Ordnung der Enterobacteriales und der zugehörigen Familie der Enterobacteriaceae, in der ADPKD Kohorte. Zudem fiel eine deutliche Zunahme der OTUs der Proteobacteria bei Patient*innen mit einem früh aufgetretenem arteriellen Hypertonus auf. Weiterhin konnten in den Stuhlproben der Patient*innen mit einer ADPKD und einer höheren Mayo-Klasse (1D-1E) vermehrt OTUs der Lactobacillales, spezifisch der Familie der Streptococcaceae nachgewiesen werden.

Eine Übersicht der signifikant abundanten Taxa - mit einem LDA score über 2 - in den jeweiligen Vergleichsgruppen, findet sich in Tabelle 9. Histogramme, wie exemplarisch in Abbildung 4 dargestellt, visualisieren die Ergebnisse.

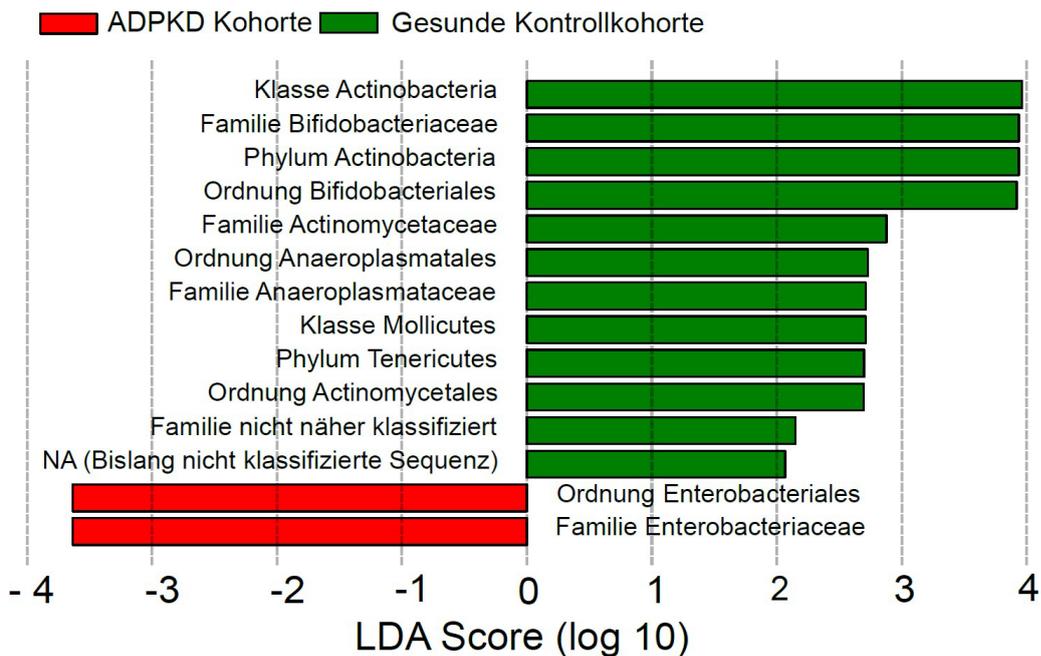


Abbildung 4: Histogramm der errechnet signifikant unterschiedlich abundanten bakteriellen Taxa aller Patient*innen mit einer ADPKD gegenüber allen gesunden Proband*innen (Vergleich 1.1): Grün markiert sind die bakteriellen Taxa, die im Vergleich zu den Patient*innen mit einer ADPKD (ADPKD Kohorte) gehäuft im Stuhl gesunder Proband*innen (Gesunde Kontrollkohorte) nachgewiesen wurden. Rot markiert sind die bakteriellen Taxa, die im Vergleich zu den gesunden Proband*innen gehäuft im Stuhl von Patient*innen mit einer ADPKD nachgewiesen wurden. Als Grenzwert für den LDA score wurde 2.0 festgelegt.

Vergleich	Auflistung der signifikant unterschiedlich abundanten Taxa
1.1. Alle Patient*innen mit einer ADPKD gegenüber allen gesunden Proband*innen.	<p>Vermeehrt in ADPKD:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ordnung: Enterobacteriales <ul style="list-style-type: none"> • Familie: Enterobacteriaceae <p>Vermeehrt in Gesunden:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Stamm: Tenericutes <ul style="list-style-type: none"> • Klasse: Mollicutes <ul style="list-style-type: none"> • Ordnung: Anaeroplasmatales <ul style="list-style-type: none"> • Familie: Anaeroplasmataceae • Stamm: Actinobacteria <ul style="list-style-type: none"> • Klasse: Actinobacteria <ul style="list-style-type: none"> • Familie Actinomycetaceae • Ordnung: Bifidobacteriales <ul style="list-style-type: none"> • Familie: Bifidobacteriaceae
1.2. Alle Patient*innen mit einer ADPKD und eine eGFR $\geq 60 \text{ml/min/1,73m}^2$ gegenüber allen gesunden Proband*innen.	<p>Vermeehrt in ADPKD, eGFR $\geq 60 \text{ml/min/1,73m}^2$</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ordnung: Enterobacteriales <ul style="list-style-type: none"> • Familie: Enterobacteriaceae

<p>2.1. Alle Patient*innen mit einer ADPKD und einer eGFR <45ml/min/1,73m² gegenüber allen gesunden Proband*innen.</p>	<p>Vermeehrt in ADPKD, eGFR<45ml/min/1,73m²</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ordnung: Enterobacterales <ul style="list-style-type: none"> • Familie: Enterobacteriaceae <p>Vermeehrt in Gesunden:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Familie: Enterococcaceae • Stamm: Actinobacteria <ul style="list-style-type: none"> • Klasse: Actinobacteria <ul style="list-style-type: none"> • Ordnung: Bifidobacteriales <ul style="list-style-type: none"> • Familie: Bifidobacteriaceae
<p>2.2. Alle Patient*innen mit einer ADPKD und einer eGFR <45ml/min/1,73m² gegenüber allen Patient*innen mit einer ADPKD und einer eGFR ≥60ml/min/1,73m².</p>	<p>Keine signifikant unterschiedlich abundanten Taxa</p>
<p>3.1. Alle Patient*innen mit einer ADPKD und einem Alter ≤45 Jahren gegenüber allen Patient*innen mit einer ADPKD und einem Alter ≥50 Jahren</p>	<p>Vermeehrt in ADPKD, Alter ≥50 Jahre</p> <ul style="list-style-type: none"> • Familie: Coriobacteriales Incertae Sedis • Familie: Peptococcaceae
<p>3.2. Alle Proband*innen mit einem Alter ≤45 Jahren gegenüber allen Proband*innen mit einem Alter ≥50 Jahren</p>	<p>Vermeehrt in Gesunden, Alter ≤45 Jahre</p> <ul style="list-style-type: none"> • Familie: Peptococcaceae
<p>4.1. Alle Patient*innen mit einer ADPKD, einem Alter ≤45 Jahren und einer eGFR <45ml/min/1,73m², gegenüber allen Patient*innen mit einer ADPKD, einem Alter ≥50 Jahren und einer eGFR ≥60ml/min/1,73m²</p>	<p>Keine signifikant unterschiedlich abundanten Taxa</p>
<p>4.2. Alle Patient*innen mit einer ADPKD, einem Alter ≤45 Jahren und einer eGFR <45ml/min/1,73m², gegenüber allen Patient*innen mit einer ADPKD, einem Alter ≥50 Jahren und einer eGFR <45ml/min/1,73m²</p>	<p>Vermeehrt in ADPKD, Alter ≥50 Jahre, eGFR <45ml/min/1,73m²</p> <ul style="list-style-type: none"> • Familie: Peptococcaceae
<p>4.3. Alle Patient*innen mit einer ADPKD, einem Alter ≤45 Jahren und einer eGFR <45ml/min/1,73m², gegenüber allen Patient*innen mit einer ADPKD einem Alter ≤45 Jahren und einer eGFR ≥60ml/min/1,73m²</p>	<p>Keine signifikant unterschiedlich abundanten Taxa</p>
<p>4.4. Alle Patient*innen mit einer ADPKD, einem Alter ≥50 Jahren und einer eGFR <45ml/min/1,73m², gegenüber allen Patient*innen mit einer ADPKD, einem Alter ≥50 Jahren und einer eGFR ≥60ml/min/1,73m²</p>	<p>Vermeehrt in ADPKD, Alter ≥50 Jahre, eGFR <45ml/min/1,73m²</p> <ul style="list-style-type: none"> • Familie: Peptococcaceae • Ordnung: Flavobacteriales <ul style="list-style-type: none"> • Familie: Flavobacteriaceae <p>Vermeehrt in ADPKD, Alter ≥50 Jahre, eGFR ≥60ml/min/1,73m²</p> <p>Familie: Veillonellaceae</p>

<p>4.5. Alle Patient*innen mit einer ADPKD, einem Alter ≥ 50 Jahren und einer eGFR $< 45 \text{ ml/min/1,73m}^2$, gegenüber allen Patient*innen mit einer ADPKD, einem Alter ≤ 45 Jahren und einer eGFR $\geq 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$</p>	<p>Vermeehrt in ADPKD, Alter ≥ 50 Jahre, eGFR $< 45 \text{ ml/min/1,73m}^2$</p> <ul style="list-style-type: none"> • Familie: Peptococcaceae <p>Vermeehrt in ADPKD, Alter ≤ 45 Jahre, eGFR $\geq 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$</p> <ul style="list-style-type: none"> • Familie: Coriobacteriales incertae sedis
<p>4.6. Alle Patient*innen mit einer ADPKD, einem Alter ≥ 50 Jahren und einer eGFR $\geq 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ gegenüber allen Patient*innen mit einer ADPKD, einem Alter ≤ 45 Jahren und einer eGFR $\geq 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$</p>	<p>Vermeehrt in ADPKD Alter ≥ 50 Jahre, eGFR $\geq 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$</p> <ul style="list-style-type: none"> • Familie: Coriobacteriales incertae sedis • Familie: Veillonellaceae <p>Vermeehrt in ADPKD, Alter ≤ 45 Jahren, eGFR $\geq 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$</p> <ul style="list-style-type: none"> • Familie: Eubacteriaceae • Stamm: Bacteoidetes <ul style="list-style-type: none"> • Klasse: Bacteroidia <ul style="list-style-type: none"> • Ordnung Bacteroidales
<p>5. Alle Patient*innen mit einer ADPKD und einem vor dem 35. Lebensjahr aufgetretenen arteriellen Hypertonus gegenüber allen Patient*innen mit einer ADPKD, bei denen kein arterieller Hypertonus vor dem 35. Lebensjahr aufgetreten ist.</p>	<p>Vermeehrt in ADPKD, art. Hyp. < 35. LJ</p> <ul style="list-style-type: none"> • Stamm: Proteobacteria <ul style="list-style-type: none"> • Klasse: Alphaproteobacteria <ul style="list-style-type: none"> • Ordnung: Rhodospirillales • Ordnung: Betaproteobacteriales <ul style="list-style-type: none"> • Familie: Burkholderiaceae <p>Vermeehrt in ADPKD, keine art. Hyp. < 35. LJ</p> <ul style="list-style-type: none"> • Familie: Tannerellaceae
<p>6. Alle Patient*innen mit einer ADPKD und einer Nierengröße, gemäß der Mayo Klassifikation 1A-1C, gegenüber allen Patient*innen mit einer ADPKD und einer Nierengröße, gemäß der Mayo Klassifikation 1D-1E</p>	<p>Vermeehrt in ADPKD, Mayo-Klasse 1D-1E</p> <ul style="list-style-type: none"> • Klasse: Bacilli <ul style="list-style-type: none"> • Ordnung: Lactobacillales <ul style="list-style-type: none"> • Familie: Streptococcaceae
<p>7. Alle Patient*innen mit einer ADPKD und vor dem 35. Lebensjahr stattgehabten urologischen Komplikationen gegenüber allen Patient*innen mit einer ADPKD ohne stattgehabten urologischen Komplikationen < 35. Lebensjahr.</p>	<p>Keine signifikant unterschiedlich abundanten Taxa</p>

Tabelle 9: Übersicht der signifikant unterschiedlich abundanten Taxa, in den jeweiligen gegenübergestellten Vergleichsgruppen: Sofern die signifikant unterschiedlich abundanten Taxa eine gemeinsame taxonomische Abstammungslinie haben, sind diese hierarchisch, untereinander organisiert.

4.2.2. Ergänzende Dependenzanalysen

Erweiterte statistische Analyse (Enterobacteriales, Enterobacteriaceae, Bifidobacteria, Bifidobacteriaceae):

Hinsichtlich möglicher ADPKD spezifischer Veränderungen untersuchte ich – vor dem Hintergrund der bestehenden Literatur, die auf eine Assoziation zu Nierenerkrankungen hindeutet – einen Zusammenhang der Ordnung der Enterobacteriales und der zugehörigen Familie Enterobacteriaceae sowie der Ordnung der Bifidobacteria und ihrer Familie der Bifidobacteriaceae, zur ADPKD. Hierzu erfolgte für die nicht metrisch skalierten Variablen eine zweiseitige Rangkorrelationsanalyse nach Spearman. Ziel war es anderweitige Einflüsse auf die zu untersuchenden Mikrobiota auszuschließen. Wie aus Tabelle 10 zu entnehmen konnten dabei keine Confounder identifiziert werden.

	Entero- bacteriales	Entero- bacteriaceae	Bifido- bacteriales	Bifido- bacteriaceae
Bristol Skala	$r_s = 0,067$ p-Wert = 0,749	$r_s = 0,067$ p-Wert = 0,749	$r_s = -0,083$ p-Wert = 0,693	$r_s = -0,083$ p-Wert = 0,693
Geschätzter Salzkonsum ^a	$r_s = -0,056$ p-Wert = 0,814	$r_s = -0,056$ p-Wert = 0,814	$r_s = 0,080$ p-Wert = 0,737	$r_s = 0,080$ p-Wert = 0,737
Nikotinkonsum ^b	$r_s = -0,381$ p-Wert = 0,060	$r_s = -0,381$ p-Wert = 0,060	$r_s = -0,309$ p-Wert = 0,132	$r_s = -0,309$ p-Wert = 0,132
Alkoholkonsum ^c	$r_s = 0,160$ p-Wert = 0,455	$r_s = 0,160$ p-Wert = 0,455	$r_s = 0,296$ p-Wert = 0,161	$r_s = 0,296$ p-Wert = 0,161
Mayo-Klassifikation	$r_s = -0,178$ p-Wert = 0,395	$r_s = -0,178$ p-Wert = 0,395	$r_s = 0,197$ p-Wert = 0,344	$r_s = 0,197$ p-Wert = 0,344

Tabelle 10: Übersicht der Ergebnisse der zweiseitigen Rangkorrelationsanalyse nach Spearman zur Prüfung eines Zusammenhangs zwischen Mikrobiota und potenziellen Einflussfaktoren (Bristol Skala, Salzzufuhr, Nikotinkonsum, Alkoholkonsum, Mayo-Klassifikation). In sämtlichen Analysen konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen den untersuchten Mikroben und den möglichen Einflussfaktoren festgestellt werden.

a) Einteilung des Salzkonsums: <5g/Tag; 5-<10g/Tag; 10-<15g/Tag; >=15g/Tag

b) Einteilung des Nikotinkonsums: Nie geraucht; Früherer Konsum; aktiver Konsum

c) Einteilung des Alkoholkonsums: Kein Konsum; <= 1 Getränk/Woche; <1 Getränk/Tag; >= 1 Getränk/Tag

Für die metrisch skalierten Variablen eGFR, Alter und BMI erfolgten ergänzende einfache lineare Regressionsanalysen, welche jedoch ebenfalls kein signifikantes Ergebnis erbrachten (Vergleiche Tabelle 11) Zumindest unter Berücksichtigung der hier untersuchten Variablen kann somit kein Zusammenhang zu anderen Einflussfaktoren auf die untersuchten Mikroorganismen identifiziert werden. Die signifikanten Unterschiede, der Ordnungen beziehungsweise Familien der Enterobacteriales, Enterobacteriaceae, Bifidobacteriales und Bifidobacteriaceae, zwischen Gesunden und an einer ADPKD erkrankten, können somit als ADPKD spezifische Veränderungen angesehen werden.

	Entero- bacteriales	Entero- bacteriaceae	Bifido- bacteriales	Bifido- bacteriaceae
eGFR bei Stuhlabgabe	p-Wert = 0,498 F = 0,473	p-Wert = 0,498 F = 0,473	p-Wert = 0,119 F = 2,623	p-Wert = 0,119 F = 2,623
Alter bei Stuhlabgabe	p-Wert = 0,614 F = 0,262	p-Wert = 0,614 F = 0,262	p-Wert = 0,168 F = 2,023	p-Wert = 0,168 F = 2,023
BMI	p-Wert = 0,230 F = 1,521	p-Wert = 0,230 F = 1,521	p-Wert = 0,146 F = 2,269	p-Wert = 0,146 F = 2,269

Tabelle 11: Übersicht der Ergebnisse der einfachen linearen Regressionsanalysen der metrisch skalierten Variablen, zur Prüfung einer Kausalität zwischen den Mikroorganismen und den möglichen Einflussfaktoren (eGFR, Alter, BMI). In den Regressionsanalysen zeigt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen den untersuchten Mikrobiota und den potenziellen Einflussfaktoren.

Kruskal-Wallis-Test (Bacilli; Lactobacillales; Streptococcaceae):

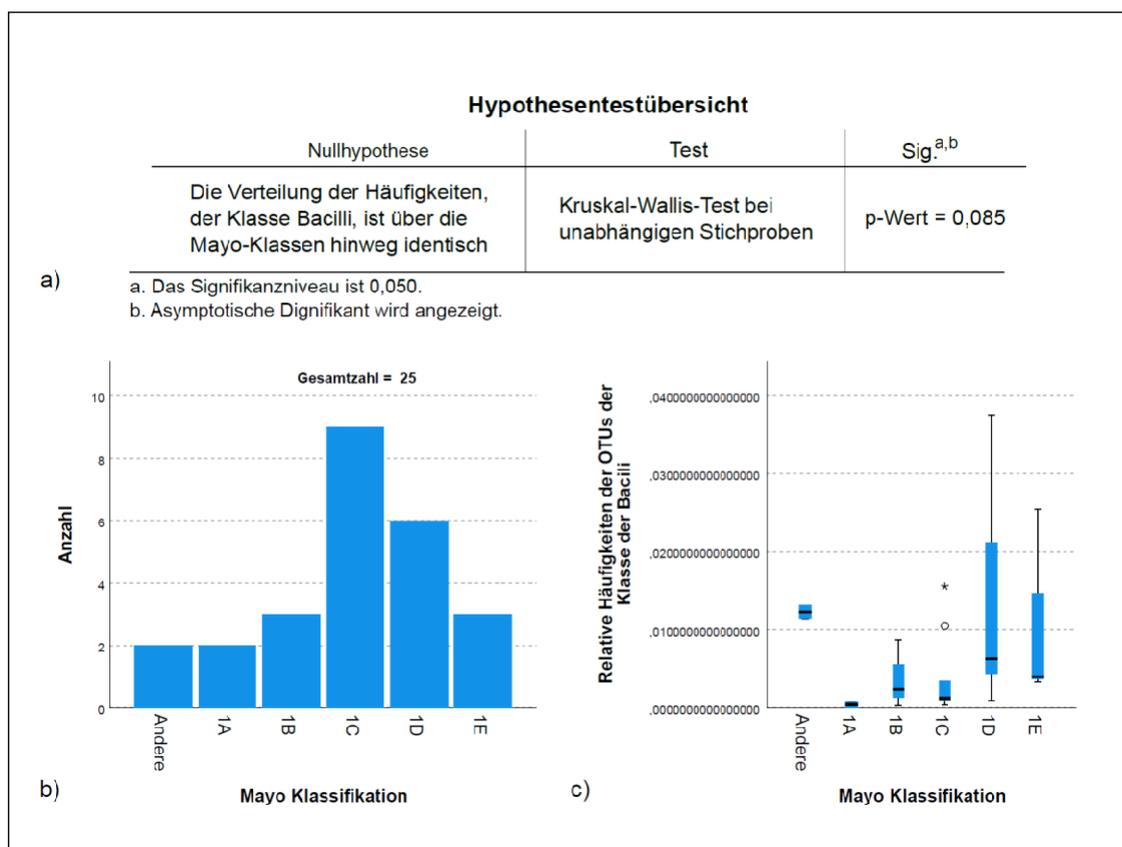


Abbildung 5: Differenzierung der zentralen Tendenzen der OTU der Klasse der Bacilli in den einzelnen Mayo-Klassen. A: Im Kruskal-Wallis-Test bei unabhängigen Stichproben konnte die Nullhypothese, welche besagt, dass die Verteilung der OTUs über die Kategorien der Mayo-Klassifikation identisch ist, nicht verworfen werden. Die zentralen Tendenzen unterscheiden sich in den verschiedenen Mayo Klassen nicht signifikant. **B:** Anzahl der aufgenommenen Fälle in der jeweiligen Kategorie (Mayo Klasse). **C:** In der grafischen Darstellung mittels Boxplot-Diagramms kann zudem kein eindeutiger gradueller Anstieg oder Abfall der relativen Häufigkeiten der OTUs, der Klasse der Bacilli, in den höheren Mayo-Klassen ausgemacht werden.

Im Rahmen der bioinformatischen Auswertungen zeigte sich für die höheren Mayo-Klassen 1D und 1E eine relevante Ansammlung der Klasse Bacilli, der untergeordneten Ordnung Lactobacillales sowie der zugehörigen Familie Streptococcaceae im Verhältnis zu den niedrigeren Mayo-Klassen (1A-1C). Um eine mögliche Kausalität zwischen der Progression der Erkrankung, anhand der Mayo-Klassifikation und diesen bakteriellen Taxa aufzudecken,

suchte ich nach einer Möglichkeit, um einen graduellen Anstieg oder Abfall der relativen Häufigkeiten der OTUs über die Mayo-Klassen hinweg zu quantifizieren. Da es sich bei den Mayo-Klassen um ordinal skalierte Kategorien handelt war eine Regressionsanalyse nicht möglich. Ich entschied mich zur Durchführung eines Kruskal-Wallis Tests zur Unterscheidung der zentralen Tendenzen in den einzelnen Mayo-Klassen. Hierbei konnte jedoch weder für die Klasse der Bacili (p-Wert: 0,085) noch für die zugehörige Ordnung der Lactobacillales (p-Wert: 0,089) sowie der Familie der Streptococcaceae (p-Wert: 0,070), die Nullhypothese verworfen werden. Abbildung 5 stellt die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests, am Beispiel der Klasse der Bacili exemplarisch dar. Anhand des Boxplot-Diagramms lässt sich zudem erkennen, dass es keinen graduellen Anstieg oder Abfall der OTUs über die Mayo-Klassen hinweg gibt.

Multiple lineare Regression (Peptococcaceae):

In den Subgruppenanalysen (Vergleich 4.1.-4.6.), in denen Patient*innen mit einer ADPKD, in den unterschiedlichen Altersgruppen (≤ 45 Jahre, ≥ 50 Jahre) und mit unterschiedlich weit fortgeschrittener Nierenfunktionseinschränkung (eGFR $< 45 \text{ ml/min/1,73m}^2$, eGFR $\geq 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$) untereinander verglichen wurden, zeigte sich in mehreren Vergleichen eine signifikant unterschiedliche Häufung der Familie der Peptococcaceae. Die Familie der Peptococacceae fand sich dabei vermehrt in der Subgruppe der Patient*innen mit einer ADPKD, einem Alter von ≥ 50 Jahre und einer Nierenfunktionseinschränkung, mit einer eGFR $< 45 \text{ ml/min/1,73m}^2$. Zunächst ging ich von einem altersabhängigen Effekt aus, da auch in Vergleich 3.1 eine Häufung der Familie der Peptococcaceae bei Patient*innen mit einer ADPKD und einem Alter ≥ 50 Jahre, gegenüber den Patient*innen mit einer ADPKD und einem Alter von ≤ 45 Jahren festgestellt wurde. Allerdings stellten sich die Ergebnisse der Subgruppenanalyse der gesunden Kontrollkohorte gegenläufig zur ADPKD-Kohorte dar (Vergleich 3.2). Hierin fand sich eine Häufung der Peptococcaceae in der Gruppe der jüngeren (≤ 45 Jahren) Proband*innen, sodass das Alter nicht der einzige Grund für die Zunahme der Peptococcaceae zu sein schien. Zudem zeigte sich auch im Vergleich zwischen zwei Subgruppen der ADPKD Kohorte, mit einem Alter ≥ 50 Jahre, lediglich in der Subgruppe mit einer zusätzlich eingeschränkten Nierenfunktion eine Häufung der Peptococcaceae. In der Zusammenschau schien somit sowohl das Alter als auch die Nierenfunktion zu einer Zunahme der relativen Häufigkeit der Familie der Peptococcaceae zu führen.

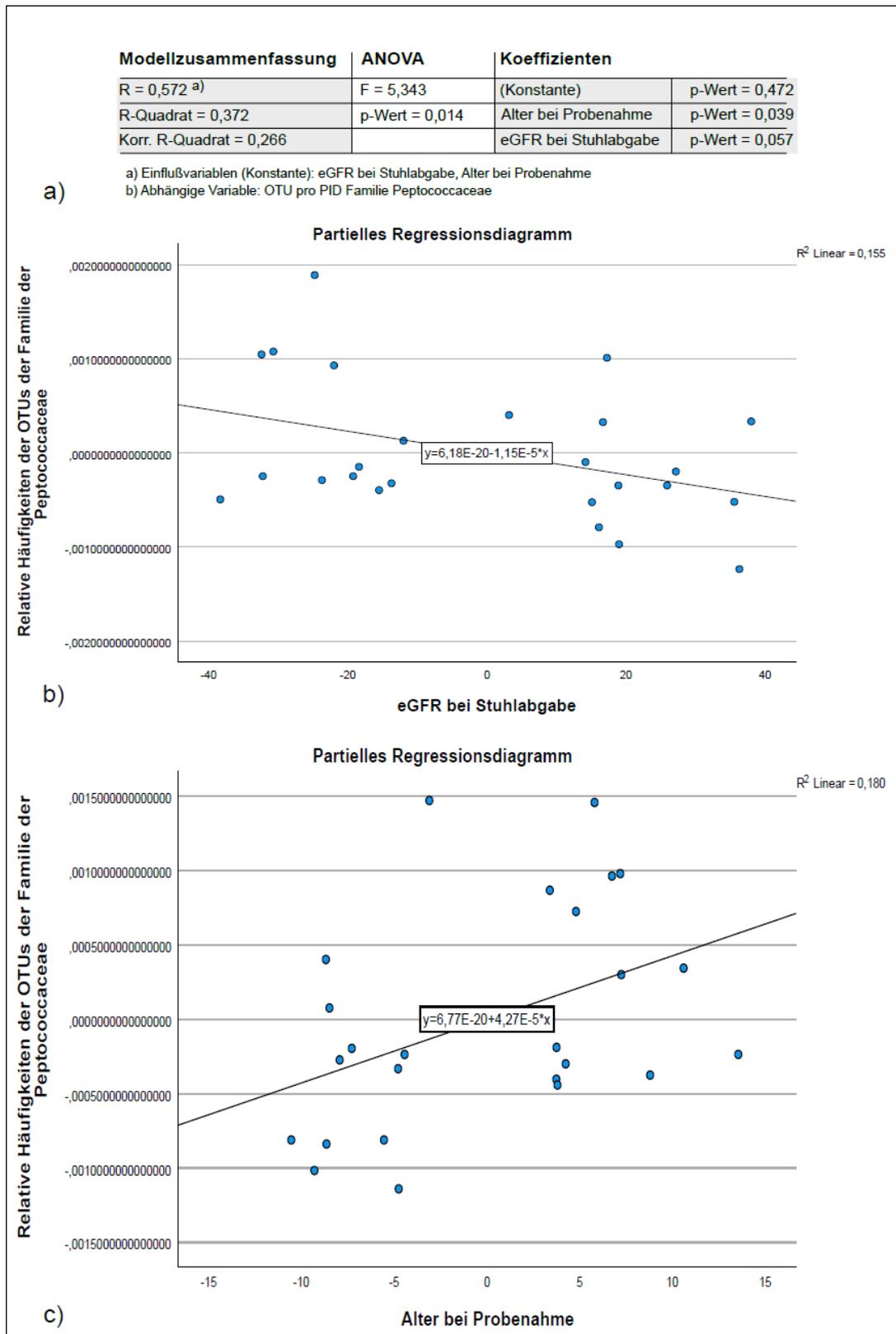


Abbildung 6: Ergebnisse der multiplen linearen Regression, zur Prüfung eines kausalen Zusammenhangs des Alters und der Nierenfunktion zur relativen Häufigkeit der OTUs der Familie der Peptococcaceae, im Stuhl von Patient*innen mit einer ADPKD. A) Aus der Testübersicht ergibt dich ein signifikantes Ergebnis für das Regressionsmodell. **B, c)** Regressionsdiagramme, mit Abbildung der Residuen der relativen Häufigkeiten der OTUs der Peptococcaceae auf der Y-Achse und den Residuen der eGFR bei Stuhlabgabe beziehungsweise des Alters bei Probenahme. Aus beiden Regressionsdiagrammen lässt sich ein linearer Zusammenhang ableiten.

Um meine Überlegungen beweisen zu können, berechnete ich für die ADPKD Kohorte, nach vorheriger Rangkorrelationsanalyse nach Spearman (zwei- und einseitige Testung) mit signifikantem Ergebnis, eine multiple lineare Regression (Vergleiche auch Abbildung 6). Diese zeigte sich ebenfalls signifikant ($F=5,343$; p -Wert $0,014$; zusätzliche Parameterschätzung mit robusten Standardfehlern, HC3 Methode). Das Modell stellte sich dabei zwar insgesamt signifikant dar, es ist jedoch anzumerken, dass der Regressionskoeffizient für die Variable „eGFR bei Stuhlabgabe“ das Signifikanzniveau nicht ganz erreicht (p -Wert: $0,057$).

Zusammenfassend kann eine Zunahme der OTUs der Peptococcaceae mit zunehmendem Alter und eine Abnahme der OTUs der Peptococcaceae mit zunehmender Nierenfunktion beobachtet werden. 57,2 Prozent der Streuung der relativen Häufigkeiten der OTUs der Peptococcaceae werden dabei durch die beiden unabhängigen Variablen (Alter; eGFR) erklärt, was nach Cohen einem starken Effekt entspricht ($f^2=1,3364485981$)¹⁶¹.

4.3 Ergebnisse der Massenspektrometrischen Messungen

Für die mittels Massenspektrometrie bestimmten Serumkonzentrationen der UT (Gesamt- und freies pCS, gesamt- und freies IS sowie gesamt TMAO), führte Frau Dr. Susanne Brodesser, Leiterin Lipidomics / Metabolomics Facility im Exzellenzcluster CECAD, jeweils zwei Messungen pro Probe als technische Replikate durch, um potenzielle Fehlmessungen auszuschließen. Im Anschluss erhielt ich somit für jedes der untersuchten UT zwei Messergebnisse pro Proband*in. Diese beiden Werte fasste ich zur anschließenden Auswertung zu einem Mittelwert zusammen. Die Ergebnisse der Häufigkeitsverteilungen zeigt Tabelle 12 Im Folgenden wertete ich die Urämietoxine, angelehnt an die Fragestellungen aus, die ich bereits für die Analyse des Stuhlmikrobioms formulierte.

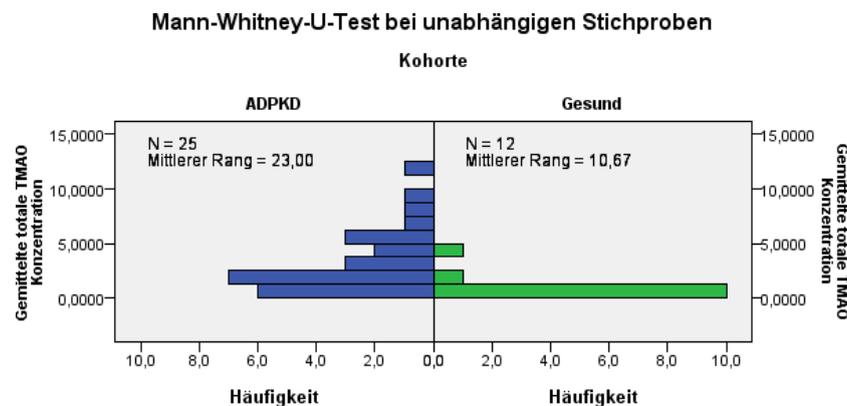
		Alle Proband*innen	ADPKD Kohorte	Gesunde Kontrollkohorte
Gesamt IS (μ M)	Median	2,078500	3,251000	1,181000
	Interquartilbereich	3,4540	4,39835	0,869375
Freies IS (μ M)	Median	0,07000	0,107500	0,037000
	Interquartilbereich	0,0950	0,156	0,023125
Gesamt pCS (μ M)	Median	24,617500	34,15650 0	15,930000
	Interquartilbereich	45,1287	57,4255	22,190375
Freies pCS (μ M)	Median	0,674500	0,833000	0,331750
	Interquartilbereich	1,1430	1,74625	0,66775
Gesamt TMAO (μ M)	Median	1,469500	2,185500	0,833500
	Interquartilbereich	2,9678	4,32625	0,45025

Tabelle 12: Übersicht des Medians und des Interquartilbereichs der gemittelten Serumkonzentrationen, der untersuchten Urämietoxine. Der Median und Interquartilbereich für die gemittelten Serumkonzentrationen wird für die gesamte Kohorte sowie separat für die ADPKD Kohorte und für die gesunde Kontrollkohorte abgebildet. Werte in Mikromolar (μ M)

4.4 Dependenzanalysen

4.4.1. Dependenzanalyse: Unterschiede der Serumkonzentrationen der Urämie Toxine in den beiden untersuchten Kohorten

Obwohl bereits anhand des Medians der gemittelten Serumkonzentrationen der analysierten UT, ein deutlicher Unterschied in den beiden Kohorten (ADPKD, gesunde Kontrollkohorte) ersichtlich ist, wollte ich testen, ob auch ein statistisch signifikanter Unterschied besteht. Da die gemittelten Serumkonzentrationen der UT weder in der gesunden Kontrollkohorte noch in der ADPKD Kohorte normal verteilt sind, entschied ich mich zur Durchführung eines Mann-Whitney-U-Tests, zur Unterscheidung der zentralen Tendenzen, in den beiden unabhängigen Stichproben. Mittels Mann-Whitney-U-Test zeigte sich erwartungsgemäß, für sämtliche UT, eine signifikant unterschiedliche Serumkonzentration in den beiden untersuchten Kohorten (Siehe Tabelle 13). Entsprechend des positiven Ausschlags der Z-Werte, im Folgenden (Abbildung 7) angegeben als „standardisierte Teststatistik“, mit erhöhten Serumkonzentration der UT in der ADPKD Kohorte. Zusammenfassend kann somit für alle in dieser Arbeit analysierten UT eine statistisch signifikant höhere Serumkonzentration in der ADPKD Kohorte, gegenüber der gesunden Kontrollkohorte nachgewiesen werden.



Gesamtanzahl	37
Mann-Whitney-U	250,000
Wilcoxon-W	575,000
Teststatistik	250,000
Standardfehler	30,822
Standardisierte Teststatistik	3,244
Asymptotische Sig. (2-seitiger Test)	,001
Exakte Sig. (2-seitiger Test)	,001

Abbildung 7: Beispielhafte Auswertung des Mann-Whitney-U-Tests, für die gemittelten Serumkonzentrationen des TMAO, zur Unterscheidung der zentralen Tendenzen, in der gesunden Kontrollkohorte und der ADPKD Kohorte. Der positive Z-Wert, hier angegeben als „Standardisierte Teststatistik“, zeigt dabei an, dass in der ADPKD Kohorte signifikant höhere Werte (Serumkonzentrationen) vorliegen. Dies wird zudem aus dem zusätzlich angegebenen Histogramm ersichtlich.

Hypothesentestübersicht
(Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben)

	Nullhypothese	Ergebnis	Signifikanz
1	Die Serumkonzentration des Indoxylsulfats ist in der Gruppe der ADPKD-Kohorte identisch zu der gesunden Kontrollkohorte	Die ADPKD-Kohorte weist im Mittel eine höhere Serumkonzentration des Indoxylsulfats auf als die gesunde Kontrollkohorte (Z-Wert 3,342)	z = 3,342 p-Wert < 0,001
2	Die Serumkonzentration des freien Indoxylsulfats ist in der Gruppe der ADPKD-Kohorte identisch zu der gesunden Kontrollkohorte	Die ADPKD-Kohorte weist im Mittel eine höhere Serumkonzentration des freien Indoxylsulfats auf als die gesunde Kontrollkohorte (Z-Wert 3,731)	z = 3,731 p-Wert < 0,001
3	Die Serumkonzentration des p-Cresyl-Sulfats ist in der Gruppe der ADPKD-Kohorte identisch zu der gesunden Kontrollkohorte	Die ADPKD-Kohorte weist im Mittel eine höhere Serumkonzentration des p-Cresyl-Sulfats auf als die gesunde Kontrollkohorte (Z-Wert 2,304)	z = 2,304 p-Wert = 0,021
4	Die Serumkonzentration des freien p-Cresyl-Sulfats ist in der Gruppe der ADPKD-Kohorte identisch zu der gesunden Kontrollkohorte	Die ADPKD-Kohorte weist im Mittel eine höhere Serumkonzentration des p-Cresyl-Sulfats auf als die gesunde Kontrollkohorte (Z-Wert 2,596)	z = 2,596 p-Wert = 0,009
5	Die Serumkonzentration des Trimethylaminoxid ist in der Gruppe der ADPKD-Kohorte identisch zu der gesunden Kontrollkohorte	Die ADPKD-Kohorte weist im Mittel eine höhere Serumkonzentration des Trimethylaminoxid auf als die gesunde Kontrollkohorte (Z-Wert 3,244)	z = 3,244 p-Wert = 0,001

Tabelle 13: Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests, zur Unterscheidung der zentralen Tendenzen der Urämie Toxine zwischen den beiden untersuchten Kohorten. Es wurden mittels Mann-Whitney-U-Test die zentralen Tendenzen, der gemittelten Serumkonzentrationen der analysierten Urämietoxine in den beiden Kohorten (ADPKD und gesunde Kontrollkohorte) gegenübergestellt. Es zeigt sich für alle Urämie Toxine ein signifikanter Unterschied, mit erhöhten Serumkonzentrationen in der ADPKD-Kohorte. (Bei einer Gruppengröße $n > 30$ wird die asymptotische Signifikanz und der z-Wert berichtet)

4.4.2. Dependenzanalyse: Abhängigkeit der Urämietoxine von der eGFR

Da nur für die ADPKD Kohorte die eGFR in dem Zeitraum um die Probenahme genau erfasst wurde, konnten folgende statistische Tests lediglich für die Patient*innen der ADPKD Kohorte durchgeführt werden. Für die Kontrollkohorte galt indes die anamnestische Annahme einer normalen Nierenfunktion.

In einer zweiseitigen Rangkorrelationsanalyse nach Spearman ließ sich für sämtliche UT eine starke Korrelation zur eGFR nachweisen. Entsprechende einfache, lineare Regressionsanalysen (Beispielhaft für IS in Abbildung 8) zwischen der eGFR und den einzelnen UT, erbrachten ebenfalls signifikante Ergebnisse für alle UT, sodass ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Abfall der eGFR und dem Anstieg der UT konstatiert werden kann.

A:

Modellzusammenfassung

Modell	R	R-Quadrat	Korrigiertes R-Quadrat	Standardfehler des Schätzers	ANOVA ^a Sig.
1	,778 ^a	,606	,588	2,6969340	< ,001 ^b

a. Abhängige Variable: Gesamt Serumkonzentration, Indoxylsulfat
b. Einflussvariablen: (Konstante), eGFR bei Stuhlabgabe

B:

Koeffizienten^a

Modell		Nicht standardisierte Koeffizienten		Standardisierte Koeffizienten		
		Regressionskoeffizient B	Std.-Fehler	Beta	T	Sig.
1	(Konstante)	11,594	1,288		9,004	<,001
	eGFR bei Stuhlabgabe	-,129	,022	-,778	-5,942	<,001

a. Abhängige Variable: Gesamt Serumkonzentration, Indoxylsulfat

C:

Parameterschätzung mit robusten Standardfehlern

Abhängige Variable: Gesamt Serumkonzentration, Indoxylsulfat

Parameter	Regressionskoeffizient B	Robuster Standardfehler ^c	T	Sig.	Untergrenze
Konstanter Term	11,594	2,100	5,521	<,001	7,250
GFR bei Stuhlabgabe	-,129	,032	-4,108	<,001	-,195

c. HC3-Methode

Abbildung 8: Übersicht der statistischen Kennzahlen, der einfachen linearen Regressionsanalyse, zur Überprüfung der Kausalität zwischen der Nierenfunktion (eGFR) und den gemittelten Serumkonzentrationen des Indoxyl-sulfats (IS). Interpretation: **A:** Die eGFR hat einen statistisch signifikanten (p-Wert <0,001) Einfluss auf die Serumkonzentrationen des IS. Aus dem korrigierten R-Quadrat von 0,588 lässt sich schließen, dass 58,8% der Streuung der Serumkonzentrationen des IS, durch die eGFR bedingt ist. Aus dem R-Quadrat lässt sich schließlich noch die Effektstärke (f) nach Cohen berechnen. In diesem Fall zeigt sich ein starker Effekt nach Cohen (f=1,1946). **B:** Bei einem negativen Regressionskoeffizienten der unabhängigen Variable (eGFR) ist von einem Anstieg der Serumkonzentrationen des IS bei fallender eGFR auszugehen. **C:** Die Regressionskoeffizienten stellen sich dabei in der primären linearen Regressionsanalyse und auch nach Anwendung robuster Standardfehler (HC3-Methode) hoch signifikant dar (p-Wer <0,001).

Anhand der negativen Regressionskoeffizienten, in sämtlichen berechneten linearen Regressionsanalysen, lässt sich ableiten, dass die Serumkonzentrationen der UT, in unterschiedlich starker Ausprägung, mit fallender eGFR ansteigen. Eine Übersicht der statistischen Merkmale der Regressionsanalysen, gibt Tabelle 14.

Untersuchte Variablen	Korrelation nach Spearman	Einfache lineare Regression
Abhängige Variable: Gesamt IS Unabhängige Variable eGFR	$r_s = 0,828$ p-Wert <0,001	F=35,304 p-Wert <0,001 ^{a,b}
Abhängige Variable: freies IS Unabhängige Variable eGFR	$r_s = 0,832$ p-Wert <0,001	F=18,266 p-Wert <0,05 ^{a,b}
Abhängige Variable: Gesamt pCS Unabhängige Variable eGFR	$r_s = 0,687$ p-Wert <0,001	F=18,694 p-Wert <0,01 ^a

Untersuchte Variablen	Korrelation nach Spearman	Einfache lineare Regression
Abhängige Variable: freies pCS Unabhängige Variable eGFR	$r_s = 0,636$ p-Wert = 0,001	F=17,679 p-Wert <0,01 ^a
Abhängige Variable: Gesamt TMAO Unabhängige Variable eGFR	$r_s = 0,732$ p-Wert <0,001	F=26,436 p-Wert <0,001 ^a

Tabelle 14: Zusammenfassung der wichtigsten Parameter der Dependenzanalysen hinsichtlich des Einflusses der eGFR auf die einzelnen Urämie Toxine. Anhand der Rangkorrelation nach Spearman zeigt sich für jede untersuchtes Variablenpaar eine signifikante Korrelation. Dabei handelt es sich nach Cohen um einen starken Effekt¹⁶¹. Ergänzend zeigen sich in den Regressionsmodellen ebenfalls ausschließlich signifikante Ergebnisse.

a=Zusätzliche Parameterschätzung mit robusten Standardfehlern (HC3 Methode),

b=Zusätzliche Parameterschätzung mit robusten Standardfehlern (HC4 Methode)

4.4.3. Dependenzanalyse: Abhängigkeit der Urämie Toxine vom Alter der Proband*innen

Mittels einer zweiseitig durchgeführten Rangkorrelationsanalyse nach Spearman untersuchte ich die Daten nach einem Zusammenhang zwischen den Serumkonzentrationen der UT und dem Alter. Über die gesamte Kohorte (gesunde Kontrollkohorte und ADPKD Kohorte) ergab sich lediglich für die Serumkonzentrationen des gesamten pCS und des freien pCS ein signifikantes Ergebnis (p-Wert <0,05). Ergänzend führte ich weitere zweiseitige Korrelationsanalysen nach Spearman in der Gruppe gesunder Proband*innen und in der Gruppe der an einer ADPKD erkrankten Patient*innen durch (Siehe auch Tabelle 15). Dabei fand sich in der gesunden Kontrollkohorte für keines der untersuchten UT eine signifikante Korrelation zum Alter der Proband*innen. Das freie pCS in der gesunden Kontrollkohorte wies jedoch mit einem p-Wert von 0,055, am ehesten eine Tendenz zu einer Korrelation mit den UT auf. In der ADPKD Kohorte ergab sich nur für das freie pCS eine signifikante Korrelation zum Alter (p-Wert <0,05).

Untersuchte Toxine	Korrelation mit dem Alter der Gesamtkohorte	Korrelation mit dem Alter gesunder Proband*innen	Korrelation mit dem Alter von Patient*innen mit einer ADPKD
Gesamt IS	$r_s = 0,125$ p-Wert ^a = 0,461	$r_s = 0,021$ p-Wert ^a = 0,948	$r_s = 0,191$ p-Wert ^a = 0,361
Freies IS	$r_s = 0,236$ p-Wert ^a = 0,161	$r_s = 0,21$ p-Wert ^a 0,948	$r_s = 0,354$ p-Wert ^a = 0,082
Gesamt pCS	$r_s = 0,351$ p-Wert ^a = 0,033	$r_s = 0,503$ p-Wert ^a = 0,095	$r_s = 0,312$ p-Wert ^a = 0,129
Freies pCS	$r_s = 0,425$ p-Wert ^a = 0,009	$r_s = 0,566$ p-Wert ^a = 0,055	$r_s = 0,445$ p-Wert ^a = 0,026
Gesamt TMAO	$r_s = 0,021$ p-Wert ^a = 0,903	$r_s = 0,308$ p-Wert ^a = 0,331	$r_s = 0,136$ p-Wert ^a = 0,517

Tabelle 15: Übersicht der Korrelationskoeffizienten und der Signifikanz aus der zweiseitigen Korrelationsanalyse nach Spearman, zur Untersuchung des Zusammenhangs der UT mit dem Alter der Proband*innen.

a=Zweiseitige Korrelationsanalyse

Zusammenfassend zeigte sich in den zweiseitig durchgeführten Testungen kein eindeutiges Bild. Ein Zusammenhang zwischen dem Alter und den Serumkonzentrationen des freien pCS

erschien jedoch, bei signifikanter Korrelation über die gesamte Kohorte, und in der ADPKD Kohorte denkbar.

Um den Einfluss des Alters auf die Serumkonzentration des freien pCS, von dem Einfluss der Nierenfunktion zu trennen berechnete ich eine multiple Regressionsanalyse. Für das Modell nahm ich eine eGFR von 100ml/min/1,73m² für die Teilnehmer der gesunden Kontrollkohorte an. (bei anamnestischer Annahme einer normalen Nierenfunktion). Hierbei zeigte sich ein signifikantes Ergebnis für das gesamte Modell (F = 19,601, p-Wert = <0,001, korrigiertes R² = 0,508). Mit Blick auf die Regressionskoeffizienten stellen sich diese für die eGFR hoch signifikant (p-Wert = <0,001) und für das Alter mit einem 95%-igem Konfidenzintervall signifikant dar (p-Wert = 0,047). Dabei zeigen sich die Serumkonzentrationen des freien pCS mit höherem Alter und mit fallender Nierenfunktion steigend.

Insbesondere bei Patient*innen mit einer ADPKD findet sich jedoch eine erhebliche Kausalität zwischen dem Alter und einem Rückgang der Nierenfunktion, sodass ich zusätzlich eine multiple lineare Regression für die einzelnen Kohorten (Gesunde Kontrollkohorte und ADPKD Kohorte) berechnete.

Hierbei zeigte sich in der ADPKD Kohorte, bei insgesamt signifikantem Ergebnis (F = 11,678, p-Wert = <0,001, korrigiertes R² = 0,471) lediglich für die Nierenfunktion ein signifikanter Regressionskoeffizient (p-Wert <0,001). Das Alter schien somit in der Gruppe der ADPKD Kohorte nicht als sicherer Prädiktor für die Serumkonzentrationen des freien pCS in Frage zu kommen (p-Wert = 0,069).

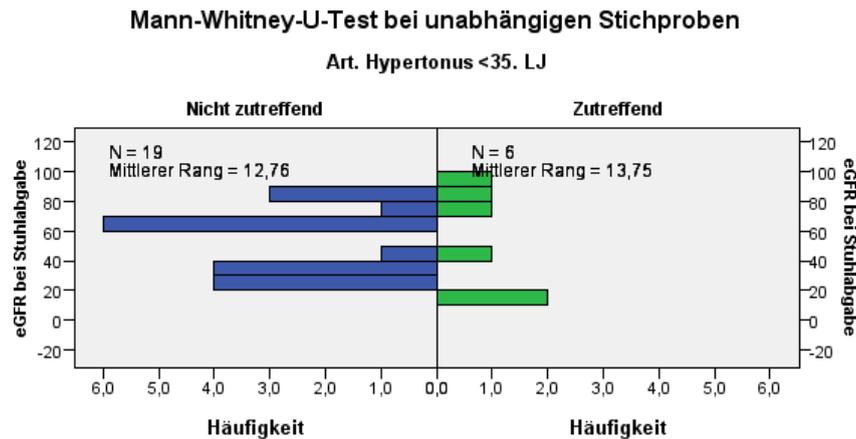
Für die gesunde Kontrollkohorte nahm ich erneut eine eGFR von 100ml/min/1,73m² an. Bei konstanter eGFR von 100ml/min/1,73m² zeigt sich jedoch kein linearer Zusammenhang zur Serumkonzentration des freien pCS, sodass die Analyse nicht möglich war.

In der Zusammenschau scheint die Nierenfunktion und nicht das Alter der Patient*innen der treibende Faktor für den Anstieg der Serumkonzentrationen, des freien pCS zu sein, wobei vor dem Hintergrund der kleinen Gruppengröße ein Einfluss nicht vollends ausgeschlossen werden kann.

4.4.4. Dependenzanalyse: Abhängigkeit der Urämie Toxine von Risikofaktoren für rasch progrediente Verläufe einer ADPKD

Für diese Fragestellung untersuchte ich ausschließlich die ADPKD Kohorte. Um einen Zusammenhang zwischen der ADPKD typischen, Begleitkomplikation des früh auftretenden arteriellen Hypertonus (vor dem 35. Lebensjahr) und den Serumkonzentrationen der Urämietoxine zu identifizieren, nutzte ich bei nominal skalierten Daten (Arterielle Hypertonus: Ja/Nein), den Eta-Koeffizienten (η^2). Dabei zeigten sich für sämtliche UT, mit Ausnahme des freien pCS, Werte mit einer hohen praktischen Bedeutsamkeit, definiert als Werte $\eta^2 > 0.25$ ¹⁶² (Siehe auch Tabelle 16). Für die Serumlevel des freien pCS ergab sich ein Wert von $\eta^2 = 0.245$, entsprechend einer mittleren praktischen Bedeutsamkeit. Um auszuschließen, dass es sich

hierbei um eine Verzerrung durch eine begleitend verminderte eGFR handelt, verglich ich die Gruppe von Patient*innen, mit dem früh aufgetretenen arteriellen Hypertonus, gegenüber den Patient*innen, ohne einen früh aufgetretenen arteriellen Hypertonus, anhand der eGFR. Hierbei zeigte sich im Mann-Whitney-U-Test kein signifikantes Ergebnis (p-Wert=0,78, vergleiche auch Abbildung 9). Die Effektstärke nach Cohen lag bei 0,287, entsprechend einer mittleren Effektstärke¹⁶¹. Die eGFR ist demnach im Mittel, in keiner der beiden Subgruppen (früh aufgetretener arterieller Hypertonus gegenüber kein früh aufgetretener arterieller Hypertonus), signifikant höher oder niedriger. Aus diesen Ergebnissen stellte ich die Hypothese auf, dass die Serumkonzentrationen der UT mit einem früh aufgetretenen arteriellen Hypertonus zusammenhängen und dieser Effekt unabhängig von der eGFR ist. Um die These zu prüfen verglich ich nachfolgend, mittels Mann-Whitney-U Test, die zentralen Tendenzen der UT zwischen den Patient*innen mit einer ADPKD und einem früh aufgetretenen arteriellen Hypertonus und den Patient*innen mit einer ADPKD ohne früh aufgetretenen arteriellen Hypertonus. Hierbei zeigte sich für keines der untersuchten UT ein signifikanter Unterschied der zentralen Tendenzen in den Vergleichsgruppen (p-Werte in Tabelle 16 aufgeführt). Auch zeigt sich keine hinreichende Tendenz, sodass die Nullhypothese (Es besteht kein Unterschied zwischen den zentralen Tendenzen der Serumkonzentrationen der Urämietoxine über die Kategorien früh aufgetretener arterieller Hypertonus) nicht verworfen werden kann.



Gesamtanzahl	25
Mann-Whitney-U	61,500
Wilcoxon-W	82,500
Teststatistik	61,500
Standardfehler	15,674
Standardisierte Teststatistik	,287
Asymptotische Sig. (2-seitiger Test)	,774
Exakte Sig. (2-seitiger Test)	,780

Abbildung 9: Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Testes zur Differenzierung, ob die Nierenfunktion (eGFR) einen Einfluss auf die Serumkonzentrationen der Urämietoxine (UT) in den Vergleichsgruppen (Arterieller Hypertonus vor dem 35. Lebensjahr, kein arterieller Hypertonus vor dem 35. Lebensjahr) hat. In der Gruppe der Patient*innen mit einem früh aufgetretenen arteriellen Hypertonus, findet sich im Mittel keine signifikant höhere oder niedrigere eGFR als in der Gruppe der Patient*innen ohne früh aufgetretenem arteriellen Hypertonus.

Auch hinsichtlich einer möglichen Assoziation, zwischen den Serumkonzentrationen der UT und den prognostisch relevanten urologischen Komplikationen, im Sinne des PROPKD Scores, mit Auftreten vor dem 35. Lebensjahr berechnete ich, auf Grund der nominalen Skalierung, die Korrelation mit Hilfe des Eta-Koeffizienten. Hierbei fanden sich jedoch lediglich Werte mittlerer praktischer Bedeutsamkeit (Siehe Tabelle 16). Für TMAO ergab sich sogar nur ein Wert geringer praktischer Bedeutsamkeit $\eta^2=0,032$. In der untersuchten Kohorte haben die früh aufgetretenen urologischen Komplikationen somit keinen relevanten Einfluss auf die Serumkonzentrationen der UT.

Für die Mayo-Klassifikation konnte ich bei ordinal skalierten Daten eine zweiseitige Korrelationsanalyse nach Spearman berechnen. Hierbei konnte keine signifikante Korrelation gefunden werden. In Anlehnung an die präformierten Gruppen (1. Gruppe: Mayo-Klasse A-C, Gruppe 2: Mayo-Klasse D-E), welche in der bioinformatischen Analyse verwendet wurden, erfolgte die zusätzliche Auswertung der zentralen Tendenzen, mittels des Mann-Whitney-U-Testes. Doch auch hier fanden sich keine signifikanten Unterschiede. An dieser Stelle sei

erwähnt, dass diese präformierten Gruppen in der bioinformatischen Analyse verwendet wurden, um eine sinnvolle Gruppengröße zu erreichen. Klinisch betrachtet weisen die Mayo-Klasse D und E ein hohes-, die Mayo-Klasse C ein intermediäres- und die Mayo Klasse A und B ein niedriges Progressionsrisiko auf. Vor diesem Hintergrund berechnete ich ergänzend einen Kruskal-Wallis-Test, um signifikante Unterschiede, der gemittelten Serumkonzentrationen der UT über die einzelnen Mayo-Klassen hinweg zu identifizieren. Auch in diesem Testverfahren konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede gefunden werden. Visuell konnte zudem kein Anstieg der Serumkonzentrationen der UT in den höheren Mayo-Klassen gesehen werden (Abbildung 10). Zusammenfassend zeigt sich in den vorliegenden Daten kein Zusammenhang der UT zur Mayo-Klassifikation.

Testverfahren		UT / Art. Hypertonie <35. LJ	UT / Urologische Komplikationen <35. LJ	UT / Mayo- Klassifikation
Eta-Koeffizient	Gesamt IS	$\eta^2 = 0,342$	$\eta^2 = 0,200$	
	Freies IS	$\eta^2 = 0,368$	$\eta^2 = 0,209$	
	Gesamt pCS	$\eta^2 = 0,280$	$\eta^2 = 0,185$	
	Freies pCS	$\eta^2 = 0,245$	$\eta^2 = 0,227$	
	Gesamt TMAO	$\eta^2 = 0,252$	$\eta^2 = 0,032$	
Rangkorrelation nach Spearman				$r_s = 0,12$ p-Wert ^a = 0,956
Mann-Whitney U-Test	Gesamt IS	U = 73000 p-Wert ^a = 0,333	U = 61000 p-Wert ^a = 0,926	
	Freies IS	U = 67000 p-Wert ^a = 0,555	U = 61000 p-Wert ^a = 0,926	
	Gesamt pCS	U = 72000 p-Wert ^a = 0,366	U = 53000 p-Wert ^a = 0,557	
	Freies pCS	U = 68000 p-Wert ^a = 0,514	U = 52000 p-Wert ^a = 0,516	
	Gesamt TMAO	U = 75000 p-Wert ^a = 0,274	U = 67000 p-Wert ^a = 0,829	
	Kruskal-Wallis- Test	Gesamt IS	H = 8,959 p-Wert ^{b,c} = 0,111	
	Freies IS	H = 6,532 p-Wert ^{b,c} = 0,258		
	Gesamt pCS	H = 4,286 p-Wert ^{b,c} = 0,509		
	Freies pCS	H = 4,377 p-Wert ^{b,c} = 0,496		
	Gesamt TMAO	H = 4,335 p-Wert ^{b,c} = 0,502		

Tabelle 16: Zusammenfassung der relevanten Ergebnisse der Dependenzanalysen, zwischen den Urämietoxinen und klinisch relevanten prognostischen Charakteristika der ADPKD Kohorte. Eta Koeffizient: Korrelation der nominal skalierten Daten „früh aufgetretener arterieller Hypertonus“ (ja/nein) und „urologische Komplikationen“ (ja/nein). **Rangkorrelation nach Spearman:** Ordinal skalierte Daten der Mayo Klassifikation (A/B/C/D/E). **Mann-Whitney-U-Test:** Vergleich der zentralen Tendenzen der UT in der Gruppe des früh aufgetretener arteriellen Hypertonus, gegenüber der Gruppe ohne früh aufgetretenem arteriellen Hypertonus. Vergleich der zentralen Tendenzen der UT in der Gruppe der Mayo-Klassifikation (A-C) gegenüber der Gruppe der Mayo-Klasse (D-E) **Kruskal-Wallis-Test:** Vergleich der zentralen Tendenzen über die einzelnen Mayo-Klassen.

a = Bei einer Gruppengröße $n < 30$ wird die exakte Signifikanz angegeben.

b = Zweiseitige Korrelationsanalyse.

c = Es wird die asymptotische Signifikanz angegeben.

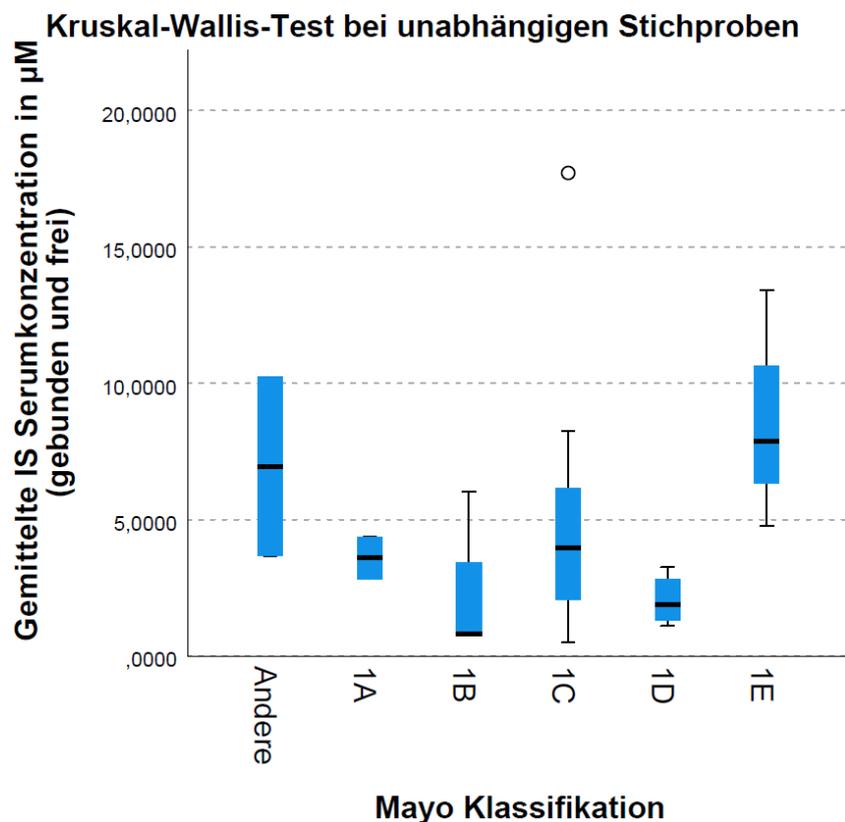


Abbildung 10: Exemplarische Darstellung, der Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Testes zur Unterscheidung der gemittelten Serumkonzentrationen der Urämietoxine (UT) in Abhängigkeit der Mayo-Klasse. Im Kruskal-Wallis-Test konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede, in den Serumkonzentrationen des gesamt Indoxyl-Sulfats (IS) über die einzelnen Mayo-Klassen hinweg identifiziert werden. Insbesondere fand sich kein gradueller Anstieg der Serumkonzentrationen, in den Mayo-Klassen, mit einem höheren Progressionsrisiko.

4.4.5. Dependenzanalyse: Korrelation der signifikanten OTUs mit den Urämie Toxinen

Nach Auswertung der Mikrobiomdaten und der Serumkonzentrationen der UT in Abhängigkeit der interessierenden klinischen Charakteristika suchte ich ergänzend nach Zusammenhängen zwischen den Serumkonzentrationen der UT und den in den bioinformatischen Analysen identifizierten, signifikant überrepräsentierten Taxa. Um eine bessere Aussagekraft zu erhalten, führte ich die im Folgenden beschriebenen Analysen zuerst für sämtliche Studienteilnehmer durch. Anschließend erfolgte die Analyse der ADPKD Kohorte und die der gesunden Kontrollkohorte.

Da eine gerichtete Korrelation zwischen den einzelnen bakteriellen Taxa und den Serumkonzentrationen der UT nicht sicher vorherzusagen war, führte ich zunächst eine zweiseitige Rangkorrelationsanalyse nach Spearman durch. Die signifikanten Ergebnisse sind in Tabelle 17 aufgeführt. Anzumerken ist, dass es sich bei der überwiegenden Anzahl der im Folgenden aufgeführten, signifikanten Korrelationen zwischen den Serumkonzentrationen der UT und den abundanten bakteriellen Taxa, lediglich um einen mittleren Effekt ($r > 0,3; < 0,5$) nach Cohen handelt¹⁶¹. Nur die Korrelationen in der gesunden Kontrollkohorte wiesen einen starken Effekt ($r > 0,5$) nach Cohen auf¹⁶¹.

Gesamtkohorte (ADPKD und gesunde Kohorte)		
Urämietoxine	Korrelation mit bakteriellen Taxa	
Gesamt IS	• Enterobacteriales	($r_s = 0,339$; p-Wert ^a = 0,040)
	• Enterobacteriaceae	($r_s = 0,339$; p-Wert ^a = 0,040)
	• Peptococcaceae	($r_s = 0,437$; p-Wert ^a = 0,007)
	• Enterococcaceae	($r_s = 0,342$; p-Wert ^a = 0,038)
Freies IS	• Actinobacteria	($r_s = 0,371$; p-Wert ^a = 0,024)
	• Bifidobacteriales	($r_s = 0,368$; p-Wert ^a = 0,025)
	• Bifidobacteriaceae	($r_s = 0,368$; p-Wert ^a = 0,025)
	• Peptococcaceae	($r_s = 0,335$; p-Wert ^a = 0,043)
	• Enterococcaceae	($r_s = 0,439$; p-Wert ^a = 0,007)
Gesamt pCS	• Anaeroplasmatales	($r_s = 0,358$; p-Wert ^a = 0,030)
	• Anaeroplasmataceae	($r_s = 0,358$; p-Wert ^a = 0,030)
	• Peptococcaceae	($r_s = 0,377$; p-Wert ^a = 0,021)
Freies pCS	• Actinobacteria	($r_s = 0,337$; p-Wert ^a = 0,042)
	• Bifidobacteriales	($r_s = 0,339$; p-Wert ^a = 0,040)
	• Bifidobacteriaceae	($r_s = 0,339$; p-Wert ^a = 0,040)
	• Anaeroplasmatales	($r_s = 0,393$; p-Wert ^a = 0,016)
	• Anaeroplasmataceae	($r_s = 0,393$; p-Wert ^a = 0,016)
Gesamt TMAO	• Enterococcaceae	($r_s = 0,396$; p-Wert ^a = 0,015)
	• Actinomycetaceae	($r_s = 0,325$; p-Wert ^a = 0,050)
	• Peptococcaceae	($r_s = 0,383$; p-Wert ^a = 0,019)
• Enterococcaceae	($r_s = 0,455$; p-Wert ^a = 0,005)	
ADPKD Kohorte		
Urämietoxine	Korrelation mit bakteriellen Taxa	
Gesamt IS	• Peptococcaceae	($r_s = 0,454$; p-Wert ^a = 0,023)
Freies IS	• Peptococcaceae	($r_s = 0,433$; p-Wert ^a = 0,031)
Gesamt pCS	• Flavobacteriaceae	($r_s = 0,457$; p-Wert ^a = 0,022)
	• Peptococcaceae	($r_s = 0,410$; p-Wert ^a = 0,042)
Freies pCS	• Flavobacteriaceae	($r_s = 0,461$; p-Wert ^a = 0,020)
	• Enterococcaceae	($r_s = 0,407$; p-Wert ^a = 0,044)
Gesamt TMAO	• Flavobacteriaceae	($r_s = 0,441$; p-Wert ^a = 0,027)
Gesunde Kontrollkohorte		
Urämietoxine	Korrelation mit bakteriellen Taxa	
Gesamt IS	• Keine signifikanten Korrelationen	
Freies IS	• Enterococcaceae	($r_s = 0,580$; p-Wert ^a = 0,048)
Gesamt pCS	• Keine signifikanten Korrelationen	
Freies pCS	• Anaeroplasmatales	($r_s = 0,624$; p-Wert ^a = 0,030)
	• Anaeroplasmataceae	($r_s = 0,624$; p-Wert ^a = 0,030)
Gesamt TMAO	• Peptococcaceae	($r_s = 0,702$; p-Wert ^a = 0,011)
	• Enterococcaceae	($r_s = 0,592$; p-Wert ^a = 0,042)

Tabelle 17: Übersicht der signifikanten Ergebnisse, der zweiseitigen Rangkorrelationsanalyse nach Spearman in der Gesamt-, ADPKD- und gesunden Kontrollkohorte. Da ein gerichteter Zusammenhang, vorab nicht klar war, erfolgte bei nicht normalverteilten Daten, die zweiseitige Rangkorrelationsanalyse nach Spearman um mögliche Zusammenhänge zwischen den Urämietoxinen und den in der bioinformatischen Analyse signifikant unterschiedlich abundanten Taxa zu identifizieren. Aufgeführt sind in dieser Tabelle lediglich die statistisch signifikanten Ergebnisse (p-Wert <0,05). Bei den meisten Ergebnissen handelt es sich um einen mittleren Effekt nach Cohen ($r >0,3$; < 0,5). Lediglich in der gesunden Kontrollkohorte finden sich Ergebnisse mit einem starken Effekt nach Cohen.

Anschließend suchte ich mit Hilfe einfacher linearer Regressionen, nach einer Kausalität zwischen den signifikant gehäuften bakteriellen Taxa und den Serumkonzentrationen der UT, welche in der Korrelationsanalyse nach Spearman eine signifikante Korrelation aufwiesen.

Regressionsanalysen der Gesamtkohorte:

In den Regressionsanalysen der Gesamtkohorte fiel für die Ordnung der Anaeroplasmatales und die untergeordnete Familie Anaeroplasmataceae auf, dass die entsprechenden OTUs nur bei drei untersuchten Individuen, der gesunden Kontrollkohorte überhaupt im Stuhl vorzufinden waren. Die Familie der Actinomycetaceae fand sich sogar nur in zwei Proben (ebenfalls in der gesunden Kontrollkohorte). Eine Kausalität erschien daher äußerst unwahrscheinlich. Da sich zudem bei sämtlichen Teilnehmer*innen, auch ohne dem Vorkommen dieser bakteriellen Taxa, deutliche Unterschiede in den Serumkonzentrationen der UT zeigten, war kein kausaler Zusammenhang zwischen diesen OTUs und den UT zu erwarten.

Bei den Regressionsanalysen zwischen dem freien IS und der Klasse der Actinobacteria sowie deren angegliederten Ordnung, respektive Familie der Bifidobacteriales und Bifidobacteriaceae, sowie der Familie der Enterococcaceae zeigte sich eine fehlende Normalverteilung der Residuen. Auch nach entsprechender Box-Cox Transformation der Variablen konnte keine annähernde Normalverteilung der Residuen erreicht werden¹⁶³. In den Regressionen zwischen dem freien IS, Actinobacteria, Bifidobacteriales, Bifidobacteriaceae und auch den Enterococcaceae fand sich zudem kein signifikantes Ergebnis. Die Ergebnisse sind jedoch, aller Voraussicht nach, bei nicht normalverteilten Residuen nicht repräsentativ.

In den sonstigen linearen Regressionsanalysen zwischen den UT und den signifikant abundanten Taxa, unter Ausschluss der Anaeroplasmatales, Anaeroplasmataceae und Actinomycetaceae, ergaben sich nur für die Familie der Peptococcaceae statistisch signifikante, kausale Zusammenhänge. So zeigte sich für die Familie der Peptococcaceae [p-Wert <0,01, R² 0,247, F=11,497; zusätzliche Verwendung robuster Standardfehler (HC3)] eine Zunahme des gesamt IS, bei einer Zunahme der relativen Häufigkeiten, der OTUs der Peptococcaceae. Darüber hinaus fand sich für die Familie der Peptococcaceae über die gesamte Kohorte eine Zunahme der Serumkonzentrationen des gesamt pCS [p-Wert <0,01, R² 0,168, F=8,284; zusätzliche Verwendung robuster Standardfehler (HC3)] und des TMAO [p-Wert 0,012, R² 0,168, F=7,046; zusätzliche Verwendung robuster Standardfehler (HC3)] bei gleichzeitiger Zunahme der Peptococcaceae. Es ist jedoch anzumerken, dass in der Regressionsanalyse der OTUs der Peptococcaceae und dem gesamt-pCS sowie TMAO, die Regressionskoeffizienten nur ohne Verwendung der robusten Standardfehler signifikant verblieben. Unter Verwendung der robusten Standardfehler zeigten sich die relativen Häufigkeiten der Peptococcaceae, mit einem p-Wert von 0,097 für das Gesamt-pCS,

respektive einem p-Wert von 0,118 für TMAO (HC3 Methode), nicht als sicherer Prädiktor des Modells.

Vor dem Hintergrund des vorangegangenen statistischen Nachweises, eines linearen Zusammenhangs, der relativen Häufigkeiten, der OTUs der Peptococcaceae mit dem Alter der Proband*innen (Vergleiche Abschnitt 4.2.2) sowie der Assoziation des Alters mit den freien pCS Serumkonzentrationen (Vergleiche Abschnitt 4.4.3), erschien eine Regressionsanalyse gerechtfertigt, obwohl in der zweiseitig durchgeführten Korrelationsanalyse nach Spearman, kein statistisch signifikantes Ergebnis gefunden werden konnte. In der Regressionsanalyse ließ sich eine Zunahme der Serumkonzentrationen des freien pCS, bei gleichzeitiger Zunahme der relativen Häufigkeiten der OTUs der Peptococcaceae feststellen [p-Wert <0,05, R^2 0,152, $F=6,274$; zusätzliche Verwendung robuster Standardfehler (HC3)]. Auch hier ist jedoch anzumerken, dass die Koeffizienten nur ohne Verwendung der robusten Standardfehler signifikant verblieben (p-Wert <0,01). Unter Verwendung der robusten Standardfehler – bei heteroskedastischen Daten - zeigten sich die relativen Häufigkeiten der Peptococcaceae, mit einem p-Wert von 0,113 (HC3 Methode), nicht als sicherer Prädiktor des Modells.

Regressionsanalysen der ADPKD Kohorte:

Auch im Rahmen der Regressionsanalysen der signifikant abundanten Taxa und den korrelierenden UT, fiel auf, dass die Familien der Flavobacteriaceae und die Familie der Enterococcaceae nur in jeweils drei Proben gefunden wurden. Da es sich nun jedoch um ein kleineres Patientenkollektiv ($n=25$) handelte als in der Gesamtkohorte, entschied ich mich trotzdem zur Berechnung der linearen Regressionen. Hierbei zeigte sich für die Familie der Flavobacteriaceae eine signifikante Zunahme der Serumkonzentrationen des TMAO [p-Wert <0,05, korr. R^2 : 0,154, $F=5,348$; zusätzliche Verwendung robuster Standardfehler (HC3)].

Weiterhin fand sich innerhalb der ADPKD Kohorte ein Zusammenhang zwischen den Gesamt-Serumkonzentrationen des IS zu den OTUs der Familie der Peptococcaceae [p-Wert <0,01, korr. R^2 : 0,230, $F=8,177$; zusätzliche Verwendung robuster Standardfehler (HC3)]. Wie in der Gesamtkohorte ist hierbei jedoch anzumerken, dass der Regressionskoeffizient für die unabhängige Variable unter Anwendung der robusten Standardfehler nicht signifikant verblieb (p-Wert = 0,055), sodass diese Variable nicht mit letzter Sicherheit ein guter Prädiktor für den Anstieg der Serumkonzentrationen des IS ist.

Regressionsanalysen der Kontrollkohorte:

Wie bereits erwähnt fanden sich OTUs der Ordnung der Anaeroplasmatales und der zugehörigen Familie der Anaeroplasmataceae in nur drei Stuhlproben, da in der Kontrollkohorte jedoch insgesamt nur 12 Proband*innen untersucht wurden, entschied ich mich die entsprechenden Regressionsanalysen durchzuführen. Es konnte jedoch in keiner der

durchgeführten Regressionsanalysen ein signifikantes Ergebnis erhoben werden, sodass statistisch betrachtet kein kausaler Zusammenhang, zwischen den korrelierenden OTUs und den Serumkonzentrationen der UT, konstatiert werden kann.

5. Diskussion

Eine Einschränkung der Nierenfunktion ist durch Änderungen des Metabolismus, der Hämodynamik, inflammatorischer Prozesse sowie Anpassung der Nahrungsgewohnheiten, mit Veränderungen des intestinalen Mikrobioms und URS assoziiert. Bislang findet sich eine begrenzte Anzahl an Studien, die spezifische Veränderungen der bakteriellen Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms, im Rahmen chronischer Nierenschädigungen aufzeigen^{4,94,96,106,107,110,164,165}. Veränderungen des Stuhlmirobioms bei Menschen mit einer ADPKD wurden lediglich im Rahmen einer Pilot Studie beschrieben⁴. Es finden sich mannigfaltige Studien zu urämischen Retentionssolute in Bezug zu anderweitigen Erkrankungen. Hinsichtlich der ADPKD finden sich jedoch keine Studien zu UT.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals im Rahmen eines explorativen Ansatzes simultan die Auswirkung der ADPKD und ihren entsprechenden klinischen Merkmalen, auf das Stuhlmirobiom sowie einer Auswahl an Urämietoxinen intestinalen Ursprungs untersucht.

5.1 Interpretation der eigenen Ergebnisse

5.1.1. Einordnung der Ergebnisse unter Berücksichtigung der bestehenden Literatur

Hinsichtlich der Veränderungen des intestinalen Mikrobioms im Rahmen chronischer Nierenfunktionseinschränkungen findet sich eine begrenzte Anzahl Studien. Bislang liegt nur eine vergleichbare Arbeit, von Yacoub und Kolleg*innen vor, in der das Stuhlmirobiom von Patienten mit einer ADPKD untersucht wurde⁴. Zur Einordnung der hier präsentierten Ergebnisse dienen daher primär Studien des intestinalen Mikrobioms chronisch Nierenkranker, mit Nierenerkrankungen unterschiedlicher Ätiologie sowie experimentelle Studien am Tiermodell. Dennoch konnten in der Literaturrecherche Assoziationen zu den Ergebnissen dieser Arbeit gefunden werden.

Es ist zu erwähnen, dass es sich bei der hier präsentierten Arbeit um eine Pilot-Studie mit insgesamt kleiner Kohorten-Größe handelt, was bei allen Betrachtungen berücksichtigt werden muss. Als Vorteil gegenüber der einzigen vergleichbaren Studie, von Yacoub et al., konnte ich den Erkrankten ein gesundes Kollektiv gegenüberstellen. Zudem befinden sich in der ADPKD Kohorte dieser Arbeit keine dialysepflichtigen Patient*innen. Die Studie Yacoub wies eine geringe Anzahl von 18 Proband*innen auf. Aus dieser Kohorte waren bereits ein Drittel dialysepflichtig, ein Drittel mit fortgeschrittener Nierenfunktionseinschränkung (Median eGFR 32,8ml/min/1,73m²) und ein Drittel im CKD Stadium I (Median eGFR

78,5ml/min/1,73m²)⁴. Obwohl Yacoub und Kolleg*innen ein sehr ausgewähltes Patientengut, unter Ausschluss vielfältiger Komorbiditäten und Begleitmedikation untersuchte, ist anzunehmen, dass hohe und stark schwankende Harnstoffkonzentrationen sowie eine Dialysetherapie das Stuhlmikrobiom in relevanter Weise beeinflusst. Trotz des breit erfassten Wertebereichs der Nierenfunktion befinden sich in meiner Kohorte keine extremen Ausreißer. So wird in der Literatur auffallend oft eine Häufung der Familie der Enterobacteriaceae oder von Mitgliedern der Familie der Enterobacteriaceae bei Patient*innen mit einer Nierenfunktionseinschränkung beschrieben^{94,106–109}. In Übereinstimmung mit der Literatur konnte auch in dieser Arbeit eine signifikante Häufung der Ordnung der Enterobacterales und der zugehörigen Familie der Enterobacteriaceae in der ADPKD Kohorte gegenüber der gesunden Kontrollkohorte beobachtet werden. Des Weiteren wurde bereits in mehreren Studien eine reduzierte Anzahl von Mitgliedern der Bifidobakterien, bei chronisch Nierenerkrankten vorgefunden^{106,107,109,110}. Diese Beobachtung konnten ebenfalls in den vorliegenden Daten bestätigt werden. Es fanden sich signifikant mehr OTUs der Ordnung der Bifidobacteriales und der zugehörigen Familie der Bifidobacteriaceae in den Stuhlproben der gesunden Kontrollkohorte, gegenüber den Stuhlproben der Patient*innen mit einer ADPKD. In der einzigen Studie an Patient*innen mit einer ADPKD konnte demgegenüber keine signifikante Zunahme der Enterobakterien, mit abnehmender eGFR beobachtet werden. Auch zeigten sich die Bifidobakterien nicht vermindert im Stuhl der Patient*innen mit einer reduzierten eGFR.

Weitere im Zusammenhang mit einer Nierenfunktionseinschränkung häufig erwähnte bakterielle Taxa, umfassen die Familie der Lactobacillaceae. Bezüglich der Lactobacillaceae finden sich jedoch divergente Ergebnisse. Mehrere Studien zeigten ein vermindertes Vorkommen der Lactobacillaceae im Rahmen einer Nierenfunktionseinschränkung^{94,96,107}. Chaves et. al sowie Yacoub und Kolleg*innen wiesen hingegen eine Zunahme der relativen Häufigkeit, der Lactobacillaceae, im Rahmen einer reduzierten Nierenfunktion nach^{4,104}. Yacoub und Kolleg*innen konnten sogar einen graduellen Anstieg der relativen Häufigkeit der Lactobacillaceae mit abnehmender Nierenfunktion nachweisen. In meinen Daten konnte hingegen kein eindeutiger Zusammenhang der Lactobacillaceae zur Nierenfunktion gefunden werden. Wie bereits erwähnt kommt der Einfluss anderweitiger Störfaktoren sowie die unterschiedliche Patientenauswahl, insbesondere hinsichtlich der Nierenfunktion, als mögliche Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse in Betracht. Speziell für die Familie der Lactobacillaceae sollte zudem der alimentäre Einfluss bedacht werden. Viele Mitglieder der Familie der Lactobacillaceae werden in der Lebensmittelindustrie, führend in der Produktion von Milchprodukten, verwendet.

Spezifisch für die ADPKD sind die Ergebnisse Yacoub im Folgenden detaillierter in Zusammenschau mit unseren Resultaten diskutiert. Es fanden sich insgesamt in elf Gattungen

und siebzehn Spp. signifikante Unterschiede in den Vergleichsgruppen [Gruppe 1) GFR >60ml/min/1,73m²; Gruppe 2) GFR >15 / >60ml/min/1,73m²; Gruppe 3) Dialysepflichtig GFR <15ml/min/1,73m²]⁴. Yacoub und Kolleg*innen fokussierten sich jedoch auf die Taxa, die eine stufenweise Veränderung, in Abhängigkeit der Nierenfunktion aufwiesen. Dabei zeigte sich insbesondere für die im folgenden aufgeführten OTUs eine zunehmende Häufigkeit im Stuhlmikrobiom der Proband*innen bei gleichsam abnehmender Nierenfunktion: Acinetobacter Spp., Allobaculum Spp., Campylobacter; Lactobacillaceae (Genus, nicht kultivierte Sp.), Planococcaceae (Genus, nicht kultivierte Sp.), Pyramidobacter Pisolens, Pyramidobacter Spp., Sphingobium, Streptococcus Spp., Limnohabitans Spp. Für die Spp. Bilophila und Oscillospira zeigte sich hingegen eine Abnahme der Häufigkeit im Stuhlmikrobiom der Proband*innen bei gleichsam abnehmender Nierenfunktion. Überschneidungen zu anderen Studien finden sich dabei lediglich für die Familie der Lactobacillaceae, die bereits diskutiert wurden, und für die Familie der Streptococcaceae. Die Familie der Streptococcaceae konnten jedoch bislang nicht eindeutig mit einer reduzierten Nierenfunktion assoziiert werden. So wiesen De Angelis und Kolleg*innen vermehrt OTUs der Familie der Streptococcaceae im Stuhl von Patient*innen mit einer progredienten IgA- Nephropathie nach, ein direkter Zusammenhang zur Nierenfunktion ist jedoch nicht beschrieben. In den hier präsentierten Daten fiel eine signifikante Häufung der OTUs der Streptococcaceae in den Stuhlproben von Patient*innen in den höheren Mayo-Klassen (1D, 1E) auf. Ein Zusammenhang zur Nierenfunktion konnte auch in dieser Arbeit nicht gefunden werden. Weiterhin wurde in der Arbeit von Yacoub und Kolleg*innen ein statistisch nicht signifikanter, jedoch sichtbarer Trend, zur Reduktion der Alpha Diversität, mit abnehmender Nierenfunktion berichtet. Auch diese Beobachtung lässt sich in meinen Daten nicht bestätigen. Abschließend sei erwähnt, dass in mehreren Studien ein vermindertes Vorkommen der Familien der Bacteroidaceae und der Prevotellaceae, im Rahmen einer reduzierten Nierenfunktion, nachgewiesen werden konnte^{94,96,107}. Eine signifikant unterschiedliche Häufung dieser Familien konnte weder in den hier präsentierten Daten noch in der Studie von Yacoub et. al gefunden werden.

5.1.2. Identifikation spezifischer Veränderungen des intestinalen Mikrobioms bei Patient*innen mit einer ADPKD

Als eine der primären Fragestellungen dieser Arbeit wurde die Detektion ADPKD- spezifischer Veränderungen ausgegeben. Durch die bioinformatische Analyse der Mikrobiota und den nachfolgenden statistischen Untersuchungen konnten zwei Ordnungen sowie jeweils zwei untergeordnete Familien identifiziert werden, welche unabhängig von einem Einfluss der eGFR und unabhängig von den typischen Risikomeerkmalen der ADPKD (früh aufgetretener arterieller Hypertonus, - urologische Komplikationen, hohe Mayo-Klassifikation), signifikant häufiger in Stuhlproben der Patient*innen der ADPKD Kohorte nachgewiesen werden konnten.

Die Ordnung der Enterobacterales wie auch die Ordnung der Enterobacteriaceae konnten im direkten Vergleich aller Patient*innen mit einer ADPKD gegenüber der gesunden Kontrollkohorte signifikant häufiger nachgewiesen werden. Darüber hinaus ließen sich auch in den Subgruppen-Vergleichen der Patient*innen mit einer ADPKD mit einer erhaltenen und auch mit einer verminderten Nierenfunktion (eGFR ≥ 60 ml/min/1,73m²; eGFR < 45 ml/min/1,73m²) gegenüber der gesunden Kontrollkohorte, vermehrt OTUs der Enterobakterien nachweisen. In den weiteren bioinformatischen Analysen unter Berücksichtigung der typischen Risikomerkmale der ADPKD konnten hingegen keine signifikante Häufung der Enterobacterales oder der Enterobacteriaceae gefunden werden. Ein Einfluss der Nierenfunktion konnte ausgeschlossen werden. Zweiseitige Korrelationsanalysen ergaben weiterhin keinen Anhalt, dass die Enterobakterien mit anderweitigen klinischen Merkmalen (Alkohol-, Nikotinkonsum, Salzzufuhr, Mayo-Klassifikation, htTKV) zusammenhängen. Auch lineare Regressionsanalysen der metrischen Variablen Alter und BMI verblieben ohne signifikantes Ergebnis, sodass von spezifischen Veränderung ausgegangen werden kann, welche primär durch die Grunderkrankung ADPKD bedingt sind. Ähnlich verhält es sich mit den OTUs der Ordnung der Bifidobacterales sowie der zugehörigen Familie der Bifidobacteriaceae, welche im Vergleich aller Patient*innen mit einer ADPKD und der gesunden Kontrollkohorte deutlich vermindert im Stuhl der Patient*innen mit einer ADPKD vorzufinden waren. In den Subgruppenanalysen ließ sich hingegen nur im Vergleich der Patient*innen mit einer ADPKD und einer reduzierten Nierenfunktion gegenüber den gesunden Proband*innen eine signifikant verminderte Anzahl an OTUs der Bifidobakterien nachweisen. Ich konnte jedoch auch in diesem Fall, mittels Regressionsanalyse keinen signifikanten Einfluss der Nierenfunktion auf die Bifidobakterien feststellen. Des Weiteren konnte mittels zweiseitiger Korrelationsanalyse und linearen Regressionsanalysen, auch für die Ordnung der Bifidobacterales sowie der Familie der Bifidobacteriaceae kein Anhalt auf einen Zusammenhang zu anderweitigen (oben genannten) klinischen Merkmalen gefunden werden, sodass auch für die Bifidobakterien ein ADPKD spezifischer Effekt konstatiert werden kann.

In der von Yacoub et. al durchgeführten Studie, konnten indes keine signifikant auffälligen Unterschiede der Enterobakterien oder Bifidobakterien gefunden werden⁴. Dies kann gegebenenfalls durch das Fehlen einer gesunden Kontrollkohorte in der Studie von Yacoub und Kolleg*innen erklärt werden. Bezüglich der hier präsentierten Daten könnten zudem anderweitige Störfaktoren, wie die weniger selektive Patientenauswahl, unter Akzeptanz bestehender Begleitmedikation und der weniger selektiven Auswahl hinsichtlich bestehender Vor- und Begleiterkrankungen, in meiner Kohorte in Betracht kommen. Ich wählte zudem ein Kollektiv mit möglichst gleichen Anteilen, jüngerer (≤ 45 Jahre) sowie älterer (≥ 50 Jahre) Proband*innen in höheren (Mayo Klasse D, E) und niedrigeren Mayo-Klassen (Mayo Klasse

A-C). Im Gegensatz zu Yacoub und Kolleg*innen trennte ich die Gruppen weniger scharf anhand der eGFR, sondern versuchte Alter, Geschlecht, Nierenfunktion und die Mayo-Klassifikation zu möglichst gleichen Anteilen in vier Subgruppen zu unterteilen. So lag die mittlere eGFR in der Gruppe mit einer eingeschränkten Nierenfunktion (eGFR <45ml/min/1,73m²) bei 29,83ml/min/1,73m². Die eGFR in der Gruppe mit einer erhaltenen Nierenfunktion (eGFR ≥60ml/min/1,73m²) bei 75,69ml/min/1,73m². Dialysepflichtige Patient*innen wurden im Gegensatz zur Studie Yacoub nicht eingeschlossen. In der Zusammenschau sind die unterschiedlichen Ergebnisse durch anderweitige Faktoren als der Nierenfunktion, oder durch die größere Bandbreite von Nierenfunktionsstörungen in der Studie von Yacoub und Kolleg*innen denkbar. Alternativ kann auch die geringe Patientenzahl in meiner Arbeit (n=25) sowie in der Studie von Yacoub und Kolleg*innen (n=18) zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben.

Klinische Relevanz im Rahmen chronischer Nierenerkrankungen erlangen die Enterobacteriaceae durch das Enzym Urease, welches es den Mikroben ermöglicht Harnstoff zu Ammoniumhydroxid zu konvertieren^{95,96}. Es kommt zu einem Selektionsvorteil. Harnstoff und das durch die Mikroben produzierte Ammoniumhydroxid beeinträchtigen dabei direkt die intestinale epitheliale Barriere und begünstigen einen Übertritt von Lipopolysacchariden (LPS), einem Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien, in den Blutkreislauf^{95,166–168}. Es mehren sich die Hinweise, dass die Durchwanderung der LPS durch die Darmwand, ein auslösender Faktor einer chronisch systemischen Entzündungsreaktion in Nierenerkrankten ist^{166,168–171}. Die Abnahme der Nierenfunktion ist dabei mit einer Zunahme proinflammatorischer Zytokine assoziiert¹⁷². Die ätiologische Zuordnung der chronischen Inflammation ist jedoch nicht zweifelsfrei zu bestimmen. Während Patient*innen mit einer terminalen Nierenschädigung durch die Dialyseverfahren an sich einem erhöhten Stress ausgesetzt sind, zeigen auch Nierenerkrankte vor dem Dialyseeintritt bereits erhöhte Serumkonzentrationen des C-reaktiven-Proteins (CRP) auf¹⁷². Problematisch erscheint zudem die Messung der Endotoxine mit dem vorhandenen *Limulus amoebocyte lysate* (LAL) Assay, der in Studien divergente Ergebnisse zeigte¹⁷¹. In der Zusammenschau ist dennoch anzunehmen, dass der Anstieg der relativen Häufigkeiten der Enterobakterien im Stuhl von Patient*innen mit einer ADPKD eine Endotoxinämie begünstigt, die wiederum eine chronische systemische Inflammation antreibt. Somit ist die Zunahme der OTUs Familie der Enterobacteriaceae im Stuhl von Patient*innen mit einer ADPKD als klinisch äußerst relevant zu werten. Dennoch werden zunächst weitere Studien unter Anwendung verlässlicher Testverfahren benötigt, um das genaue Ausmaß der Effekte der Endotoxinämie einschätzen zu können.

Die Familie der Bifidobacteriaceae gelten hingegen als nicht pathogen. Im Gegenteil wird der Familie der Bifidobacteriaceae eine zentrale Rolle in der Erhaltung der kommensalen intestinalen Flora und der Gesundheit des Wirts zugeschrieben, sodass sie auch als Probiotika

gelten¹⁷³. Somit ist eine Abnahme der OTUs der Bifidobacteriaceae im Stuhl von Patient*innen mit einer ADPKD ebenfalls als klinisch äußerst relevant zu werten.

Für die Bifidobacteriaceae konnten positive Effekte auf den Wirt im Rahmen von akuten Durchfallerkrankungen, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Obstipation, bestehender Laktoseunverträglichkeit sowie in der Prävention kolorektaler Karzinome nachgewiesen werden^{173–175}. Die genauen protektiven Mechanismen sind bislang nicht umfassend verstanden. In Studien konnte für einzelne Sp. der Bifidobacteriaceae ein immunmodulatorischer Effekt sowie eine Stärkung der epithelialen Barriere dargestellt werden^{99,174–178}. Zumindest in Teilen erscheint dieser Effekt durch die Bildung vorteilhafter metabolischer Nebenprodukte wie Acetate und SCFA bedingt zu sein^{99,176,178}.

Im urämischen Milieu konnten Wei und Kolleg*innen eine verminderte bakterielle Translokation sowie eine Abnahme proinflammatorischer Marker, in 5/6 nephrektomierten Ratten unter Einfluss von *Bifidobacterium animalis* (Subspezies *Lactis* Bi-07) nachweisen¹⁷⁷. Bifidobakterien oder zumindest einzelne Mitglieder der Familie scheinen somit eine bakterielle Translokation zu reduzieren und die systemische Entzündungsreaktion zu mindern. Denkbar ist, dass diesem Effekt eine Optimierung der epithelialen Integrität durch die Bifidobakterien, zugrunde liegt¹⁷⁷.

Zusammengefasst konnten zwei Taxa identifiziert werden, welche unabhängig von der Nierenfunktion sowie anderweitiger klinischer Merkmale, auf dem Boden der Grunderkrankung, im Stuhl von Patient*innen mit einer ADPKD über-, beziehungsweise unterrepräsentiert sind. Durch die Zunahme der Enterobakterien wird insbesondere bei Nierenkranken eine Translokation von Endotoxinen, mit hieraus resultierender chronisch systemischer Inflammation begünstigt. Erschwerend fand sich eine reduzierte Anzahl von Bifidobakterien, die üblicherweise mit vorteilhaften Effekten auf den Wirt - unter anderem einer Optimierung der epithelialen Integrität - assoziiert sind.

5.1.3. Identifikation spezifischer Veränderungen im Stuhl von Patient*innen mit einer ADPKD, unter Berücksichtigung klinischer Risikoprofile

Bei der ADPKD findet sich auf Grund der chronischen Progredienz der Erkrankung eine kausale Beziehung zwischen dem Alter, dem Nierengesamtvolumen und der Nierenfunktion. Daher hat ein früher Nierenfunktionsverlust oder ein großes Nierengesamtvolumen, ausgedrückt durch die Mayo-Klassifikation, bei jungen Patient*innen, in aller Regel eine schlechtere Prognose. Auch Begleitkomplikationen, die bereits im jungen Erwachsenenalter (vor dem 35.Lebensjahr) auftreten, bedingen häufig einen schnellen progredienten Verlauf.

Alter und Nierenfunktion:

Im Rahmen der statistischen Auswertung der Subgruppenanalysen unter Berücksichtigung des Alters und der Nierenfunktion konnte ein Zusammenhang der Familie der Peptococcaceae zum Alter und zur Nierenfunktion nachgewiesen werden. Bei Patient*innen mit einer ADPKD konnte dabei mittels multipler und einfacher linearer Regression eine Zunahme der relativen Häufigkeit der Peptococcaceae mit abnehmender Nierenfunktion, sowie mit steigendem Alter, festgestellt werden. In der multiplen linearen Regressionsanalyse zeigte sich der Regressionskoeffizient für die eGFR jedoch nicht auf dem 95%-igen Konfidenzintervall signifikant (p-Wert = 0,057). Allerdings ließ sich in der gesunden Kontrollkohorte kein Zusammenhang zum Alter feststellen. Daher wertete ich den nicht signifikanten Regressionskoeffizienten durch Multikollinearität bedingt. Mitglieder der Familie der Peptococcaceae zeigen somit eine Alters- und Nierenfunktions-abhängige Zunahme der relativen Häufigkeiten im Stuhl von Patient*innen mit einer ADPKD.

Bei Gesunden konnte kein Zusammenhang zum Alter festgestellt werden. In einer Arbeit von Shimizu und Kolleg*innen sowie von Kashtanova et. al finden sich jedoch auch - passend zu den Ergebnissen der hier beschriebenen ADPKD Kohorte – Hinweise, dass Mitglieder der Familie der Peptococcaceae mit steigendem Alter vermehrt im Stuhl vorzufinden sind^{179,180}. Möglich ist auch, dass die Nierenfunktion der hauptsächliche Treiber dieser Veränderungen des Stuhlmikrobioms ist. Wie auch bei anderen Ergebnissen dieser Studie, sollten diese unter dem Aspekt der kleinen Kohorte beurteilt werden. Um eindeutige Ergebnisse zu erhalten, muss ein größeres Kollektiv auf diese Fragestellung hin ausgewertet werden.

Die Familie der Peptococcaceae gehört der Klasse der Clostridia innerhalb der Firmicutes an und umfasst 14 Gattungen¹⁸¹. Über die Rolle der Peptococcaceae in der intestinalen Flora ist jedoch bislang wenig bekannt.

Bezüglich möglicher vorteilhafter Effekte auf den Wirt, konnten in einer Analyse bakterieller Genome, für die Familie der Peptococcaceae, Gene identifiziert werden, die mit Butyrat produzierenden Stoffwechselwegen assoziiert sind¹⁸². Allerdings ist bislang, auf Grund fehlender biochemischer Testung unklar, ob Mitglieder der Familie der Peptococcaceae auch wirklich in der Lage sind Butyrat zu produzieren¹⁸².

Hinsichtlich möglicher negativer Auswirkungen auf den Menschen findet, sich in Referenzwerken keine Assoziation zu bestimmten Erkrankungen^{181,183}. In einer Literaturrecherche konnte ich lediglich vereinzelt Berichte über Infektionen mit Peptococcaceae finden^{184,185}. Houlden und Kolleg*innen fanden eine positive Korrelation zwischen Peptococcaceae und dem proinflammatorischen Zytokin *C-C Motif Chemokine 5* (CCL5), welches unter anderem mit der Entstehung einer Kolitis assoziiert ist^{186,187}.

Hinsichtlich der klinischen Relevanz im Rahmen von chronischen Nierenerkrankungen finden sich ebenfalls keine Studienergebnisse. Bezugnehmend auf die Beobachtung von Houlden et

al. konnte jedoch für CCL5 eine nephroprotektive Wirkung, durch Reduktion der Makrophagenakkumulation, im Rahmen Angiotensin-II bedingter Nierenschädigungen, nachgewiesen werden¹⁸⁸. Inwiefern die Familie der Peptococcaceae Einfluss auf die Nierenfunktion hat, zum Beispiel über ein Zusammenspiel mit CCL 5, bleibt zunächst offen, kann jedoch als Fragestellung zukünftiger Studien in Betracht kommen.

Hinsichtlich möglicher altersabhängiger Auswirkungen auf das intestinale Mikrobiom fanden Shimizu et al. eine positive Korrelation der Peptococcaceae zum Alter, sowie eine negative Korrelation der Peptococcaceae zum *Human defensin 5*¹⁷⁹. Dieses ist ein alpha Defensin, dass mit Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase und der Regulation der intestinalen Mikrobiota durch Modulation der Paneth-Zellen assoziiert ist^{179,189}. Sollte sich diese Beobachtung in weiteren Studien bestätigen könnte die altersabhängige Zunahme der Peptococcaceae, durch Begünstigung einer Dysbiose, als potenziell krankheitsfördernde Ursache in Betracht kommen und somit auch für Patient*innen mit einer ADPKD negative Auswirkungen haben.

Biomarker:

Die Mayo-Klassifikation dient als wichtiger prognostischer Marker für den Verlauf der ADPKD. Dennoch kann der genaue Verlauf der Erkrankung, insbesondere der Eintritt der Dialysepflicht in aller Regel nur geschätzt werden. Weitere Marker, die den Verlauf der Erkrankung besser vorhersagen und damit die Entscheidung zur Therapie erleichtern werden dringend benötigt. In Subgruppenanalysen, in denen der Stuhl von Patient*innen, mit mutmaßlich rasch progredienten Verläufen (Mayo-Klassifikation 1D, 1E), mit Stuhlproben von Patient*innen mit niedrigem bis intermediärem Risiko (Mayo-Klassifikation 1A-1C) verglichen wurde, fanden sich signifikant häufiger OTUs der Klasse der Bacilli und ihrer untergeordneten Ordnung Lactobacillales sowie der zugehörigen Familie der Streptococcaceae. Ein Zusammenhang zur Nierenfunktion konnte nicht hergestellt werden. Weiterhin konnte - mittels Kruskal-Wallis-Test - eine graduelle Zunahme über die Mayo-Klassen hinweg nicht eindeutig bewiesen werden. Vor dem Hintergrund der kleinen Kohorte und bei bereits niedrigen p-Werten [Bacili (p-Wert = 0,085); Lactobacillales (p-Wert = 0,089); Streptococcaceae (p-Wert = 0,070)] ist jedoch ein Erreichen des Signifikanz Niveaus im Rahmen einer größer angelegten Studie denkbar.

Interessanterweise konnte auch in der Studie von De Angelis, an Patienten mit einer IgA Nephropathie, vermehrt Streptococcaceae in den Stuhlproben von Patient*innen mit einer progredienten IgA Nephropathie gefunden werden. Auch wenn es sich bei einer ADPKD und einer IgA Nephropathie um grundsätzlich verschiedene Erkrankungen handelt ist an dieser Stelle dennoch ein Zusammenhang der Streptococcaceae zur Progressionsgeschwindigkeit der jeweiligen Grunderkrankung zu diskutieren.

In der Vergangenheit wurden akute infektiöse Glomerulonephritiden vorwiegend im Kindesalter, nach Infektion mit Streptococccen, beobachtet^{190,191}. In den letzten drei Jahrzehnten zeigte sich jedoch eine relevante Verschiebung der Epidemiologie und Ätiologie, mit zunehmender Inzidenz in älteren, oftmals vorerkrankten Patient*innen¹⁹¹. Im Gegensatz zu der akuten Poststreptococccen-Glomerulonephritis bei Kindern, ist die Infektion beim Erwachsenen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung oftmals noch persistierend, sodass der Begriff *Infection related Glomerulonephritis* (IRGN) vorgeschlagen wurde¹⁹¹. Als einer der treibenden Faktoren des Übergangs einer IRGN in eine chronische Nierenschädigung wird eine persistierende Infektion angenommen¹⁹⁰. Meines Wissens gibt es keine Evidenz für einen direkten Zusammenhang zwischen dem vermehrten Vorkommen von Streptococccaceae im Stuhl und einer IRGN. Unter der bereits vorab ausführlich diskutierten Annahme einer verminderten Integrität des Darmepithels, im Rahmen chronischer Nierenerkrankungen und in der Folge vermehrtem Übertritt bakterieller Bestandteile (Endotoxine) in den Blutstrom, erscheint jedoch ein kausaler Zusammenhang der Streptococccaceae, zur Nierenfunktionsverschlechterung möglich. Die aus der Endotoxinämie anzunehmende und ebenfalls vorab diskutierte subklinische chronische Inflammation könnte dabei die Progression einer chronischen Nierenerkrankung – wie der ADPKD – hin zur terminalen Niereninsuffizienz zusätzlich begünstigen. Eine Assoziation zwischen dem vermehrten Vorkommen der Streptococccaceae im Stuhl und einem beschleunigtem Nierenfunktionsverlust, im Rahmen chronischer Nierenerkrankungen wie der ADPKD scheint somit möglich.

Früh aufgetretener arterieller Hypertonus:

Als weiterer Anhalt für einen schnell progredienten Verlauf, zählt ein früher (vor dem 35. Lebensjahr) arterieller Hypertonus. Im direkten Vergleich der Patient*innen mit einer ADPKD, zeigte sich eine signifikante Überrepräsentation der OTUs des Phylums der Proteobacteria in Patient*innen mit einem früh aufgetretenem arteriellen Hypertonus. OTUs der Familie der Tannerelleaceae fanden sich im Stuhl der Patient*innen mit einem früh aufgetretenem arteriellen Hypertonus, deutlich seltener. Ein Zusammenhang zur Nierenfunktion konnte für beide Taxa nicht hergestellt werden.

Die Proteobacteria umfassen einen Großteil der Gram negativen Bakterien und sind somit medizinisch betrachtet von großer Bedeutung¹⁹². Im Stuhlmikrobiom des Menschen stellen die Proteobacteria hingegen keinen dominanten Anteil dar¹⁹³. Eine erhöhte Prävalenz der Proteobacteria ist mit einer Dysbiose des intestinalen Mikrobioms, im Rahmen metabolischer Erkrankungen, intestinaler Entzündungsreaktionen, einer Kolitis sowie mit kolorektalen Karzinomen assoziiert¹⁹⁴. Zudem ist die Zunahme gramnegativer Bakterien, welche zu einem großen Anteil dem Phylum Proteobacteria abstammen, mit einer arteriellen Hypertension assoziiert¹⁹⁵.

Die Studienlage zu den Tannerellaceae, ist aufgrund der erst kürzlichen Erstbeschreibung übersichtlich. Es mehren sich die Hinweise, dass es sich bei den Tannerellaceae um für den Wirt tendenziell vorteilhafte Mikroorganismen handelt. So konnte für die Familie der Tannerellaceae eine aktive Rolle in der Verstoffwechselung von Rutin, einem der am häufigsten konsumierten Flavonoide, nachgewiesen werden¹⁹⁶. Rutin wird, sofern intestinal absorbiert, antioxidative und anti-neurodegenerative Effekte sowie eine schützende Wirkung gegenüber einer Dyslipidämie, Hyperglykämie, kardiovaskulären Erkrankungen und Leberschäden zugesprochen¹⁹⁶. Die Bioverfügbarkeit wird dabei maßgeblich von der kommensalen Darmflora mitbestimmt, wobei die Tannerellaceae zu den Taxa gehört, die den größten Anteil der Metabolisierung von Rutin übernehmen¹⁹⁶.

Hinsichtlich eines bestehenden arteriellen Hypertonus fand sich in Übereinstimmung mit den hier präsentierten Ergebnissen, bereits in einer Studie von Calderón-Pérez et. al, eine signifikante Häufung von Sp. der Familie der Tannerellaceae im normotensivem Kollektiv gegenüber Proband*innen mit einer bestehenden arteriellen Hypertonie¹⁹⁷. Ob diese Beobachtungen mit der ADPKD an sich zu assoziieren sind bleibt fraglich. Indes ist ein Zusammenhang der Beobachtungen zur arteriellen Hypertonie, die eine der häufigsten Begleiterscheinungen einer ADPKD darstellt, durchaus möglich.

Zusammenfassung:

Zusammengefasst konnten unter Berücksichtigung der klassischen klinischen Risikoprofile spezifische Veränderungen des intestinalen Mikrobioms in Patient*innen mit einer ADPKD beobachtet werden. Zunehmendes Alter und eine, im Rahmen der ADPKD oftmals begleitende Abnahme der Nierenfunktion begünstigen dabei eine Zunahme der relativen Häufigkeiten der OTUs der Peptococcaceae. Die klinische Relevanz dieser Familie ist bislang nicht näher einzugrenzen, wobei die Begünstigung einer intestinalen Dysbiose denkbar ist. Weiterhin fanden sich Veränderungen des Mikrobioms in Zusammenhang mit klassischen Progressionsfaktoren der ADPKD. So konnten bei Patient*innen in den Mayo-Klassifikationen 1D und 1E vermehrt Streptococcaceae im Stuhl nachgewiesen werden. Die klinische Relevanz der Streptococcaceae bleibt ebenfalls ungewiss, jedoch könnte in zukünftigen Studien eine Affektion der Niere im Sinne einer klinisch inapparenten IRGN untersucht werden. Eine Zunahme der OTUs der Proteobacteria und eine simultane Abnahme der OTUs der Tannerellaceae konnte für die Subgruppe der Patient*innen mit einem früh aufgetretenem arteriellen Hypertonus festgestellt werden. Den Proteobakterien wird dabei ein der Gesundheit überwiegend abträglicher Einfluss zugesprochen. Den Tannerellaceae hingegen ein gesundheitsfördernder Effekt. In zukünftigen Studien sollte untersucht werden, ob das Mikrobiom diese klassischen Progressionsfaktoren beeinflusst. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob das Mikrobiom die Nierenfunktion prädiziert oder sogar kausal beeinflusst.

5.1.4. Assoziationen zu den Urämietoxinen

In der hier präsentierten Arbeit fokussierte ich mich auf drei UTs, die dem bakteriellen Metabolismus entstammen. TMAO stellt ein freies wasserlösliches Molekül dar. IS und pCS gehören den proteingebundenen UTs an, wobei ein geringer Anteil des IS (7%) sowie des pCS (10%) ungebunden im Serum vorliegt^{198,199}. Um klinische Auswirkungen höherer Konzentrationen ungebundener UTs von den totalen Serumkonzentrationen zu differenzieren, wurden sowohl die freien- als auch die gesamte Serumkonzentrationen gemessen und statistisch ausgewertet.

In der statistischen Auswertung zeigten sich die Serumkonzentrationen der freien und gesamten UT, wie zu erwarten signifikant höher in der ADPKD Kohorte als in der gesunden Kontrollkohorte. Innerhalb des Kollektivs der Proband*innen mit einer ADPKD konnte zudem, durch eine Regressionsanalyse, ein inverser Zusammenhang im Sinne eines Anstiegs der UT, bei regredierter Nierenfunktion nachgewiesen werden.

Eine statistisch signifikante Assoziation der UTs zu spezifischen bakteriellen Taxa fand sich für die Familie der Flavobacteriaceae und der Familie der Peptococcaceae. Die Familie der Flavobacteriaceae wiesen dabei innerhalb der ADPKD Kohorte einen linearen Zusammenhang mit den Serumkonzentrationen des TMAO auf. In einer ausgiebigen Literaturrecherche konnte ich jedoch keine Assoziation zwischen den Serumkonzentrationen des TMAO und einer Abundanz der Flavobacteriaceae finden, Weiterhin konnte basierend auf einer genomischen Exploration kein Zusammenhang der Flavobacteriaceae zu erhöhten TMAO-Serumkonzentrationen hergestellt werden^{200,201}. Ob ein klinischer Zusammenhang besteht, bleibt somit auch vor dem Hintergrund der geringen Fallzahl (n=3), der Patient*innen die überhaupt OTUs der Flavobacteriaceae in ihrem Stuhl nachwiesen, zumindest uneindeutig. Die OTUs der Familie der Peptococcaceae wiesen über die gesamte Kohorte einen statistisch signifikanten Zusammenhang zu den Serumkonzentrationen des totalen IS auf. In der Subgruppenanalyse der ADPKD Kohorte konnte dieser Zusammenhang ebenfalls aufgezeigt werden, jedoch muss einschränkend erwähnt werden, dass sich der Regressionskoeffizient unter Anwendung der robusten Standardfehler nicht mehr eindeutig signifikant (p-Wert = 0,055) zeigte. Ob die Peptococcaceae innerhalb der ADPKD Kohorte zu einer Elevation der IS-Konzentrationen im Serum beitragen ist somit nicht mit letzter Sicherheit zu sagen, bei einem p-Wert von 0,055 lässt sich jedoch eine deutliche Tendenz ableiten. Wie bereits an anderen Stellen erwähnt, ist auch hier die kleine Kohorte ein Unsicherheitsfaktor, sodass auch diese Beobachtung durch größere Studien verifiziert werden muss.

Weiterhin konnte über die gesamte Kohorte eine Verbindung der Peptococcaceae mit der freien- und der gesamt-pCS, sowie TMAO-Serumkonzentration hergestellt werden. Allerdings zeigte sich auch hier das Regressionsmodell als Ganzes signifikant, die Koeffizienten

verblieben hingegen unter Verwendung robuster Standardfehler nicht auf einem 95% Signifikanzniveau (Vergleiche Abschnitt 4.4.5). Daher können die OTUs der Peptococcaceae, statistisch betrachtet, nicht als sichere Prädiktoren für die pCS-Serumkonzentrationen gelten. Während die Urämietoxine natürlicherweise mit der Nierenfunktion korrelieren, konnte in dieser Arbeit nur eine bakterielle Familie identifiziert werden, welche klar mit der Nierenfunktion sowie dem Alter der Patient*innen korrelierte. Die Familie der Peptococcaceae. Vor dem Hintergrund der auffälligen Zunahme, der relativen Häufigkeit der Peptococcaceae, im Stuhl der Patient*innen, mit steigendem Alter und abnehmender Nierenfunktion sowie der simultanen Assoziation zur Elevation der Konzentrationen mehrerer UTs im Serum erfolgte eine umfangreiche Literaturrecherche. Ein Zusammenhang zum Alter steht im Einklang mit einer begrenzten Anzahl an Studien, wohingegen bislang keine klare Assoziation zur Nierenfunktion beschrieben wurde^{179,180}. Hinsichtlich möglicher Assoziationen zu den Urämietoxinen konnten bedauerlicherweise keine Studien gefunden werden, die eine Assoziation der Peptococcaceae zu einer der genannten UTs aufwiesen (Gesamt IS, freies- und gesamt-pCS, TMAO).

An dieser Stelle ist anzumerken, dass in dieser Arbeit lediglich eine kleine Auswahl an Taxa untersucht wurden. Taxa, die in den bioinformatischen Analysen, in Abhängigkeit der klinischen Merkmale eine signifikant unterschiedliche Anzahl aufwiesen. Möglicherweise könnten in einer nachfolgenden Untersuchung, unter Einbeziehung sämtlicher sequenzierter OTUs, entsprechende Verbindungen zu einzelnen Taxa hergestellt werden. Insbesondere für Ordnungen, Klassen oder sogar Phyla mit großen phylogenetischen Linien sind entsprechende Zusammenhänge wahrscheinlich. Hingegen stellen einzelne Sp. in aller Regel nur einen verschwindend geringen Anteil in der Gesamtheit des Mikrobioms dar. Dementsprechend sind für die Bildung der UT in relevanten Konzentrationen eine große Anzahl verschiedener Mikroben verantwortlich. So konnten mittlerweile multiple Mikroorganismen ermittelt werden, die zur Bildung der UTs beitragen^{202,203}.

Für die Begleitkomplikation einer ADPKD, dem früh auftretenden arteriellen Hypertonus, zeigte sich zunächst eine signifikante Korrelation zu sämtlichen Serumkonzentrationen der UTs, mit Ausnahme des freien pCS. Ein Einfluss der Nierenfunktion auf dieses Ergebnis konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. In nachfolgenden statistischen Analysen konnte jedoch kein kausaler Zusammenhang, der UTs zu dem klinischen Merkmal eines früh aufgetretenen arteriellen Hypertonus gefunden werden. In der Literatur wird deutlich, dass sämtliche UT intestinalen Ursprungs mit kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung zu bringen sind¹²¹. Die hier untersuchten Urämie Toxine pCS, IS und TMAO sind zudem mit einer vaskulären Kalzifizierung assoziiert und begünstigen durch ihre zusätzlich proatherogenen und proinflammatorischen Effekte einen arteriellen Hypertonus^{121,195,204}. Nichtsdestoweniger handelt es sich dabei um einen Prozess, der über eine gesamte Lebensspanne abläuft und

zumeist erst mit fortschreitendem Alter klinisch auffällig wird. Der fehlende Zusammenhang in dieser Arbeit, kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass viele der Patient*innen, zum Zeitpunkt der Stuhlabgabe bereits weit älter als 35 Jahre waren und mittlerweile einen arteriellen Hypertonus, mit Eintreten nach dem 35. Lebensjahr, entwickelt hatten. Blutdruckwerte zum Zeitpunkt der Stuhlabgabe lagen nicht vor, sodass diesbezüglich keine weiteren Nachuntersuchungen erfolgen konnten. Ein weiterer Erklärungsversuch ist die unterschiedliche Ätiologie des Bluthochdrucks. So entsteht die Hypertension, im Rahmen der ADPKD aller Wahrscheinlichkeit nach nicht, oder zumindest nur zu einem geringen Anteil durch die Auswirkungen der UTs. Die arterielle Hypertonie im Rahmen einer ADPKD wird führend durch die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) ausgelöst²⁰⁵. Für die Aktivierung des RAAS wird wiederum eine Dehnung der Gefäße, im Rahmen der Zystenexpansion, als Reiz angenommen²⁰⁵. Langfristig erscheint dennoch eine Nachbeobachtung unter Monitoring der UT im Serum von Patient*innen mit einer ADPKD sinnvoll, um einen möglichen additiven gesundheitsschädlichen Effekt in Zukunft erkennen zu können.

Bezüglich der prognostisch relevanten urologischen Komplikationen im Sinne des PROPKD Scores, mit Auftreten vor dem 35. Lebensjahr, ergaben sich in der statistischen Analyse keine Hinweise auf einen relevanten Einfluss auf die Serumkonzentrationen der UT. Auch konnten keine Taxa identifiziert werden, die signifikant überrepräsentiert waren. In einer Literaturrecherche zu einem Zusammenhang der untersuchten UT und Nierensteinen konnte ich ebenfalls keine weiteren Erkenntnisse gewinnen. Auch in der bislang einzigen vorliegenden Studie zum Stuhlmikrobiom von einer ADPKD Betroffener wurden keine UT bestimmt, sodass hier ebenfalls keine weiteren Zusammenhänge abzuleiten waren.

Für die Mayo-Klassifikation ergaben sich in der statistischen Analyse keine Hinweise auf einen Zusammenhang zu den Serumkonzentrationen der UT. In einer ergänzenden Analyse fanden sich auch für die - in der Sequenzierung aufgefallenen - signifikant unterschiedlich relativen Häufigkeiten, der OTUs der Ordnung der Lactobacillales sowie der Familie der Streptococcaceae, keine Korrelation zu den UT. Da bislang nur eine Studie zu den Veränderungen des intestinalen Mikrobioms, bei Proband*innen mit einer ADPKD vorliegt und in dieser die UT-Konzentrationen im Serum nicht bestimmt wurden, kann diesbezüglich keine weitere Aussage getroffen werden.

Zusammenfassung:

Zusammengefasst können in den hier präsentierten Daten, gegenüber gesunden Proband*innen, signifikant höhere Serumkonzentrationen der freien- und gesamten UT, bei Patient*innen mit einer ADPKD festgestellt werden. Dies lässt sich durch einen inversen Zusammenhang der UT zur Nierenfunktion erklären. Hinsichtlich der für die ADPKD

klassischen Begleitkomplikation eines früh aufgetretenen arteriellen Hypertonus konnte ich keine kausalen Zusammenhänge feststellen. Vor dem Hintergrund der eindeutigen Studienlage zum Thema, mit signifikant höheren Serumkonzentrationen bei bestehendem Bluthochdruck, kann die spezielle Genese des Bluthochdrucks bei Patient*innen mit einer ADPKD (Aktivierung des RAAS) sowie die begleitende Nierenfunktionseinschränkung einen fehlenden Zusammenhang erklären. Dennoch bleibt zu beantworten, ob die UT eine weitere Aggravation des Bluthochdrucks begünstigen. Eine Assoziation der UT zur Mayo-Klassifikation sowie früh aufgetretenen urologischen Komplikationen konnte ich nicht herstellen. Eine Verbindung zwischen den Serumkonzentrationen des gesamt IS und den Peptococcaceae konnte sowohl in der Gesamtkohorte als auch in der ADPKD Kohorte hergestellt werden. Es bleibt einschränkend zu erwähnen, dass die Regressionskoeffizienten unter Verwendung der robusten Standardfehler knapp oberhalb des 95%-igen Konfidenzintervalls verblieben (p-Wert 0,055), dennoch ergibt sich hier trotz der kleinen Kohorte eine deutliche Tendenz. Bislang fehlen weitere Studienergebnisse, die einen Zusammenhang der Peptococcaceae zu UT herstellen konnten. Weitere Verbindungen zwischen den UT und überrepräsentierten Taxa verblieben statistisch nicht eindeutig signifikant.

5.2 Fazit

Im Stuhlmikrobiom von Patient*innen mit einer ADPKD konnte eine spezifische und eGFR-unabhängige Überrepräsentation der OTUs der Ordnung der Enterobacteriales und der zugehörigen Familie der Enterobacteriaceae, identifiziert werden. Veränderungen in Abhängigkeit der eGFR konnten lediglich für die OTUs der Familie der Peptococcaceae gezeigt werden. Hierbei wurde zudem eine Kolinearität zum Alter bei Patient*innen mit einer ADPKD beobachtet. Hinsichtlich der Begleitkomplikation des früh aufgetretenen arteriellen Hypertonus fand sich eine Zunahme der Proteobacteria, die mit überwiegend schädlichen Einflüssen auf den Körper assoziiert sind und eine Abnahme der tendenziell gesundheitsfördernden Tannerellaceae. Ein Zusammenhang der Urämietoxine zu einzelnen bakteriellen Sp. konnte nur für die Serumkonzentrationen des gesamt-IS zu den Peptococcaceae identifiziert werden. Assoziationen zu den klassischen Risikoprofilen fanden sich für die Urämietoxine nicht.

In dieser Pilot-Studie konnten bereits spezifische Veränderungen des Stuhlmikrobioms bei einer ADPKD sowie Veränderungen der Urämietoxin-Konzentrationen, unabhängig von relevanten Störfaktoren wie einer Dialysetherapie oder relevanten Vorerkrankungen identifiziert werden. Vor dem Hintergrund der kleinen Kohorte fanden sich oftmals mehr Tendenzen als statistisch signifikante Ergebnisse. Es liegt nun daran in größer angelegten Studien diese Beobachtungen zu verifizieren. Ziel ist zudem die Identifikation potenzieller Biomarker sowie therapeutischer Ansätze für die ADPKD und ihre Begleitkomplikationen.

5.3 Limitationen

Abschließend möchte ich nun noch Limitationen der Studie, in der Methodik sowie in der Bewertung der Ergebnisse herausstellen.

Eine zentrale Schwäche der Studie besteht wie bereits zuvor diskutiert in der kleinen Kohortengröße.

Des Weiteren wurden die Stuhlproben unabhängig von den Serumproben zu unterschiedlichen Zeitpunkten gewonnen. Ich verwendete stets die aktenkundigen klinischen Charakteristika, Medikation und Ergebnisse der serologischen Untersuchungen, die zeitlich betrachtet dem Eingang der Stuhlprobe am nächsten kam. Mit Ausnahme von zwei Proben kam es nie zu einem zeitlichen Versatz von mehr als zwei Monaten. In zwei Fällen gingen die Stuhlproben indes erst 7,5 und 6 Monate nach Entnahme des Bluts und Aufnahme der Medikation sowie der klinischen Charakteristika ein. Eine signifikante Veränderung des intestinalen Mikrobioms, durch eine Zunahme der Krankheitsschwere, zusätzlicher Erkrankungen, weiterer Medikation oder einer Umstellung der Ernährungsgewohnheiten ist in einem solchen Zeitraum denkbar.

Für die gesunde Kontrollkohorte wurden im Gegensatz zu der ADPKD Kohorte deutlich weniger klinische Charakteristika erfasst. Zudem erfolgte keine reguläre Laboranalyse des Bluts, sodass etwaige bislang nicht erkannte oder subklinische Erkrankungen, insbesondere potenzielle Nierenfunktionseinschränkungen möglicherweise unentdeckt blieben.

Wie in der Mikrobiomforschung am Menschen üblich, konnten Störfaktoren wie unterschiedliche Diäten, Noxen, Medikamenteneinnahme oder etwaige Begleiterkrankungen nicht sicher ausgeschlossen werden. Es wurde jedoch versucht ein möglich homogenes Kollektiv, mit möglichst wenigen Störfaktoren auszuwählen. Die geringe Anzahl an Proband*innen kann jedoch eine mögliche Verzerrung durch Störfaktoren verstärken.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Bergmann, C.; Guay-Woodford, L. M.; Harris, P. C.; Horie, S.; Peters, D. J. M.; Torres, V. E. Polycystic Kidney Disease. *Nat Rev Dis Primers* **2018**, *4* (1), 50. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0047-y>.
- (2) Cornec-Le Gall, E.; Alam, A.; Perrone, R. D. Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *The Lancet* **2019**, *393* (10174), 919–935. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32782-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32782-X).
- (3) Lynch, S. V.; Pedersen, O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med* **2016**, *375* (24), 2369–2379. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1600266>.
- (4) Yacoub, R.; Nadkarni, G. N.; McSkimming, D. I.; Chaves, L. D.; Abyad, S.; Bryniarski, M. A.; Honan, A. M.; Thomas, S. A.; Gowda, M.; He, J. C.; Uribarri, J. Fecal Microbiota Analysis of Polycystic Kidney Disease Patients According to Renal Function: A Pilot Study. *Exp Biol Med (Maywood)* **2019**, *244* (6), 505–513. <https://doi.org/10.1177/1535370218818175>.
- (5) Willey, C. J.; Blais, J. D.; Hall, A. K.; Krasa, H. B.; Makin, A. J.; Czerwiec, F. S. Prevalence of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease in the European Union. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2016**, gfw240. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfw240>.
- (6) Lanktree, M. B.; Haghghi, A.; Guiard, E.; Iliuta, I.-A.; Song, X.; Harris, P. C.; Paterson, A. D.; Pei, Y. Prevalence Estimates of Polycystic Kidney and Liver Disease by Population Sequencing. *JASN* **2018**, *29* (10), 2593–2600. <https://doi.org/10.1681/ASN.2018050493>.
- (7) Torres, V. E.; Harris, P. C.; Pirson, Y. Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *The Lancet* **2007**, *369* (9569), 1287–1301. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60601-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60601-1).
- (8) Hildebrandt, F.; Benzing, T.; Katsanis, N. Ciliopathies. *N Engl J Med* **2011**, *364* (16), 1533–1543. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1010172>.
- (9) Harris, P. C.; Torres, V. E. Genetic Mechanisms and Signaling Pathways in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *J. Clin. Invest.* **2014**, *124* (6), 2315–2324. <https://doi.org/10.1172/JCI72272>.
- (10) Cornec-Le Gall, E.; Torres, V. E.; Harris, P. C. Genetic Complexity of Autosomal Dominant Polycystic Kidney and Liver Diseases. *JASN* **2018**, *29* (1), 13–23. <https://doi.org/10.1681/ASN.2017050483>.
- (11) Heyer, C. M.; Sundsbak, J. L.; Abebe, K. Z.; Chapman, A. B.; Torres, V. E.; Grantham, J. J.; Bae, K. T.; Schrier, R. W.; Perrone, R. D.; Braun, W. E.; Steinman, T. I.; Mrug, M.; Yu, A. S. L.; Brosnahan, G.; Hopp, K.; Irazabal, M. V.; Bennett, W. M.; Flessner, M. F.; Moore, C. G.; Landsittel, D.; Harris, P. C.; for the HALT PKD and CRISP Investigators. Predicted Mutation Strength of Nontruncating *PKD1* Mutations Aids Genotype-Phenotype Correlations in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *JASN* **2016**, *27* (9), 2872–2884. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015050583>.
- (12) Porath, B.; Gainullin, V. G.; Cornec-Le Gall, E.; Dillinger, E. K.; Heyer, C. M.; Hopp, K.; Edwards, M. E.; Madsen, C. D.; Mauritz, S. R.; Banks, C. J.; Baheti, S.; Reddy, B.; Herrero, J. I.; Bañales, J. M.; Hogan, M. C.; Tasic, V.; Watnick, T. J.; Chapman, A. B.; Vigneau, C.; Lavainne, F.; Audrézet, M.-P.; Ferec, C.; Le Meur, Y.; Torres, V. E.; Harris, P. C. Mutations in *GANAB*, Encoding the Glucosidase II α Subunit, Cause Autosomal-Dominant Polycystic Kidney and Liver Disease. *The American Journal of Human Genetics* **2016**, *98* (6), 1193–1207. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.05.004>.
- (13) Rossetti, S.; Consugar, M. B.; Chapman, A. B.; Torres, V. E.; Guay-Woodford, L. M.; Grantham, J. J.; Bennett, W. M.; Meyers, C. M.; Walker, D. L.; Bae, K.; Zhang, Q. (Jean); Thompson, P. A.; Miller, J. P.; Harris, P. C. Comprehensive Molecular Diagnostics in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *JASN* **2007**, *18* (7), 2143–2160. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006121387>.
- (14) Rossetti, S.; Chauveau, D.; Walker, D.; Saggari-Malik, A.; Winearls, C. G.; Torres, V. E.; Harris, P. C. A Complete Mutation Screen of the ADPKD Genes by DHPLC. *Kidney International* **2002**, *61* (5), 1588–1599. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00326.x>.

- (15) Hogan, M. C.; Manganelli, L.; Woollard, J. R.; Masyuk, A. I.; Masyuk, T. V.; Tammachote, R.; Huang, B. Q.; Leontovich, A. A.; Beito, T. G.; Madden, B. J.; Charlesworth, M. C.; Torres, V. E.; LaRusso, N. F.; Harris, P. C.; Ward, C. J. Characterization of PKD Protein-Positive Exosome-Like Vesicles. *JASN* **2009**, *20* (2), 278–288. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008060564>.
- (16) Koulen, P.; Cai, Y.; Geng, L.; Maeda, Y.; Nishimura, S.; Witzgall, R.; Ehrlich, B. E.; Somlo, S. Polycystin-2 Is an Intracellular Calcium Release Channel. *Nat Cell Biol* **2002**, *4* (3), 191–197. <https://doi.org/10.1038/ncb754>.
- (17) Lee, K.; Battini, L.; Gusella, G. L. Cilium, Centrosome and Cell Cycle Regulation in Polycystic Kidney Disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2011**, *1812* (10), 1263–1271. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.02.008>.
- (18) Lancaster, M. A.; Louie, C. M.; Silhavy, J. L.; Sintasath, L.; DeCambre, M.; Nigam, S. K.; Willert, K.; Gleeson, J. G. Impaired Wnt– β -Catenin Signaling Disrupts Adult Renal Homeostasis and Leads to Cystic Kidney Ciliopathy. *Nat Med* **2009**, *15* (9), 1046–1054. <https://doi.org/10.1038/nm.2010>.
- (19) Hanaoka, K.; Guggino, W. B. CAMP Regulates Cell Proliferation and Cyst Formation in Autosomal Polycystic Kidney Disease Cells. *JASN* **2000**, *11* (7), 1179–1187. <https://doi.org/10.1681/ASN.V1171179>.
- (20) Mangoo-Karim, R.; Uchic, M.; Lechene, C.; Grantham, J. J. Renal Epithelial Cyst Formation and Enlargement in Vitro: Dependence on CAMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1989**, *86* (15), 6007–6011. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.15.6007>.
- (21) Shillingford, J. M.; Murcia, N. S.; Larson, C. H.; Low, S. H.; Hedgepeth, R.; Brown, N.; Flask, C. A.; Novick, A. C.; Goldfarb, D. A.; Kramer-Zucker, A.; Walz, G.; Piontek, K. B.; Germino, G. G.; Weimbs, T. The MTOR Pathway Is Regulated by Polycystin-1, and Its Inhibition Reverses Renal Cystogenesis in Polycystic Kidney Disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103* (14), 5466–5471. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509694103>.
- (22) Hopp, K.; Ward, C. J.; Hommerding, C. J.; Nasr, S. H.; Tuan, H.-F.; Gainullin, V. G.; Rossetti, S.; Torres, V. E.; Harris, P. C. Functional Polycystin-1 Dosage Governs Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Severity. *J. Clin. Invest.* **2012**, *122* (11), 4257–4273. <https://doi.org/10.1172/JCI64313>.
- (23) Leeuwen, I. S. L.; Dauwerse, J. G.; Baelde, H. J.; Leonhard, W. N.; van de Wal, A.; Ward, C. J.; Verbeek, S.; DeRuiter, M. C.; Breuning, M. H.; de Heer, E.; Peters, D. J. M. Lowering of Pkd1 Expression Is Sufficient to Cause Polycystic Kidney Disease. *Human Molecular Genetics* **2004**, *13* (24), 3069–3077. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh336>.
- (24) Qian, F.; Watnick, T. J.; Onuchic, L. F.; Germino, G. G. The Molecular Basis of Focal Cyst Formation in Human Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Type I. *Cell* **1996**, *87* (6), 979–987. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81793-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81793-6).
- (25) Pei, Y.; Watnick, T.; He, N.; Wang, K.; Liang, Y.; Parfrey, P.; Germino, G.; George-Hyslop, P. St. Somatic *PKD2* Mutations in Individual Kidney and Liver Cysts Support a “Two-Hit” Model of Cystogenesis in Type 2 Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *JASN* **1999**, *10* (7), 1524–1529. <https://doi.org/10.1681/ASN.V1071524>.
- (26) Müller, R.-U.; Benzing, T. Management of Autosomal-Dominant Polycystic Kidney Disease—State-of-the-Art. *Clinical Kidney Journal* **2018**, *11* (suppl_1), i2–i13. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfy103>.
- (27) Pei, Y.; Hwang, Y.-H.; Conklin, J.; Sundsbak, J. L.; Heyer, C. M.; Chan, W.; Wang, K.; He, N.; Rattansingh, A.; Atri, M.; Harris, P. C.; Haider, M. A. Imaging-Based Diagnosis of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *JASN* **2015**, *26* (3), 746–753. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014030297>.
- (28) Pei, Y.; Obaji, J.; Dupuis, A.; Paterson, A. D.; Magistroni, R.; Dicks, E.; Parfrey, P.; Cramer, B.; Coto, E.; Torra, R.; San Millan, J. L.; Gibson, R.; Breuning, M.; Peters, D.; Ravine, D. Unified Criteria for Ultrasonographic Diagnosis of ADPKD. *JASN* **2009**, *20* (1), 205–212. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008050507>.
- (29) Wakai, K.; Nakai, S.; Kikuchi, K.; Iseki, K.; Miwa, N.; Masakane, I.; Wada, A.; Shinzato, T.; Nagura, Y.; Akiba, T. Trends in Incidence of End-Stage Renal Disease in Japan, 1983-

- 2000: Age-Adjusted and Age-Specific Rates by Gender and Cause. *Nephrology Dialysis Transplantation* **2004**, *19* (8), 2044–2052. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfh317>.
- (30) Stengel, B. Trends in the Incidence of Renal Replacement Therapy for End-Stage Renal Disease in Europe, 1990-1999. *Nephrology Dialysis Transplantation* **2003**, *18* (9), 1824–1833. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfg233>.
- (31) Neumann, H. P. H.; Jilg, C.; Bacher, J.; Nabulsi, Z.; Malinoc, A.; Hummel, B.; Hoffmann, M. M.; Ortiz-Bruechle, N.; Glasker, S.; Pisarski, P.; Neeff, H.; Krämer-Guth, A.; Cybulla, M.; Hornberger, M.; Wilpert, J.; Funk, L.; Baumert, J.; Paatz, D.; Baumann, D.; Lahl, M.; Felten, H.; Hausberg, M.; Zerres, K.; Eng, C.; for the Else-Kroener-Fresenius-ADPKD-Registry. Epidemiology of Autosomal-Dominant Polycystic Kidney Disease: An in-Depth Clinical Study for South-Western Germany. *Nephrology Dialysis Transplantation* **2013**, *28* (6), 1472–1487. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfs551>.
- (32) Parfrey, P. S.; Bear, J. C.; Morgan, J.; Cramer, B. C.; McManamon, P. J.; Gault, M. H.; Churchill, D. N.; Singh, M.; Hewitt, R.; Somlo, S.; Reeders, S. T. The Diagnosis and Prognosis of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *N Engl J Med* **1990**, *323* (16), 1085–1090. <https://doi.org/10.1056/NEJM199010183231601>.
- (33) Müller, R.-U.; Messchendorp, A. L.; Birn, H.; Capasso, G.; Cornec-Le Gall, E.; Devuyt, O.; van Eerde, A.; Guirchoun, P.; Harris, T.; Hoorn, E. J.; Knoers, N. V. A. M.; Korst, U.; Mekahli, D.; Le Meur, Y.; Nijenhuis, T.; Ong, A. C. M.; Sayer, J. A.; Schaefer, F.; Servais, A.; Tesar, V.; Torra, R.; Walsh, S. B.; Gansevoort, R. T. An Update on the Use of Tolvaptan for Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: Consensus Statement on Behalf of the ERA Working Group on Inherited Kidney Disorders, the European Rare Kidney Disease Reference Network and Polycystic Kidney Disease International. *Nephrology Dialysis Transplantation* **2021**, gfab312. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfab312>.
- (34) Cornec-Le Gall, E.; Audrézet, M.-P.; Chen, J.-M.; Hourmant, M.; Morin, M.-P.; Perrichot, R.; Charasse, C.; Whebe, B.; Renaudineau, E.; Jousset, P.; Guillodo, M.-P.; Grall-Jezequel, A.; Saliou, P.; Férec, C.; Le Meur, Y. Type of *PKD1* Mutation Influences Renal Outcome in ADPKD. *JASN* **2013**, *24* (6), 1006–1013. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012070650>.
- (35) Cornec-Le Gall, E.; Audrézet, M.-P.; Rousseau, A.; Hourmant, M.; Renaudineau, E.; Charasse, C.; Morin, M.-P.; Moal, M.-C.; Dantal, J.; Wehbe, B.; Perrichot, R.; Frouget, T.; Vigneau, C.; Potier, J.; Jousset, P.; Guillodo, M.-P.; Siohan, P.; Terki, N.; Sawadogo, T.; Legrand, D.; Menoyo-Calonge, V.; Benarbia, S.; Besnier, D.; Longuet, H.; Férec, C.; Le Meur, Y. The PROPKD Score: A New Algorithm to Predict Renal Survival in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *JASN* **2016**, *27* (3), 942–951. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015010016>.
- (36) Irazabal, M. V.; Rangel, L. J.; Bergstralh, E. J.; Osborn, S. L.; Harmon, A. J.; Sundsbak, J. L.; Bae, K. T.; Chapman, A. B.; Grantham, J. J.; Mrug, M.; Hogan, M. C.; El-Zoghby, Z. M.; Harris, P. C.; Erickson, B. J.; King, B. F.; Torres, V. E.; the CRISP Investigators. Imaging Classification of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: A Simple Model for Selecting Patients for Clinical Trials. *JASN* **2015**, *26* (1), 160–172. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013101138>.
- (37) Bae, K. T.; Shi, T.; Tao, C.; Yu, A. S. L.; Torres, V. E.; Perrone, R. D.; Chapman, A. B.; Brosnahan, G.; Steinman, T. I.; Braun, W. E.; Srivastava, A.; Irazabal, M. V.; Abebe, K. Z.; Harris, P. C.; Landsittel, D. P.; the HALT PKD Consortium. Expanded Imaging Classification of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *JASN* **2020**, *31* (7), 1640–1651. <https://doi.org/10.1681/ASN.2019101121>.
- (38) Chapman, A. B.; Devuyt, O.; Eckardt, K.-U.; Gansevoort, R. T.; Harris, T.; Horie, S.; Kasiske, B. L.; Odland, D.; Pei, Y.; Perrone, R. D.; Pirson, Y.; Schrier, R. W.; Torra, R.; Torres, V. E.; Watnick, T.; Wheeler, D. C. Autosomal-Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD): Executive Summary from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney International* **2015**, *88* (1), 17–27. <https://doi.org/10.1038/ki.2015.59>.
- (39) Nowak, K. L.; You, Z.; Gitomer, B.; Brosnahan, G.; Torres, V. E.; Chapman, A. B.; Perrone, R. D.; Steinman, T. I.; Abebe, K. Z.; Rahbari-Oskoui, F. F.; Yu, A. S. L.; Harris, P. C.; Bae, K. T.; Hogan, M.; Miskulin, D.; Chonchol, M. Overweight and Obesity Are

- Predictors of Progression in Early Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *JASN* **2018**, *29* (2), 571–578. <https://doi.org/10.1681/ASN.2017070819>.
- (40) Wong, A. T. Y.; Mannix, C.; Grantham, J. J.; Allman-Farinelli, M.; Badve, S. V.; Boudville, N.; Byth, K.; Chan, J.; Coulshed, S.; Edwards, M. E.; Erickson, B. J.; Fernando, M.; Foster, S.; Haloob, I.; Harris, D. C. H.; Hawley, C. M.; Hill, J.; Howard, K.; Howell, M.; Jiang, S. H.; Johnson, D. W.; Kline, T. L.; Kumar, K.; Lee, V. W.; Lonergan, M.; Mai, J.; McCloud, P.; Peduto, A.; Rangan, A.; Roger, S. D.; Sud, K.; Torres, V.; Vliayuri, E.; Rangan, G. K. Randomised Controlled Trial to Determine. *Open Access* **12**.
- (41) Wei Wang, J. S. B. Effects of Smoking on ADPKD: Frequency of Vascular Events and Concentrations of Soluble CD40 Ligand. *General Med* **2015**, *03* (02). <https://doi.org/10.4172/2327-5146.1000175>.
- (42) Torres, V. E. Water for ADPKD? Probably, Yes. *JASN* **2006**, *17* (8), 2089–2091. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006060603>.
- (43) Schrier, R. W.; Abebe, K. Z.; Perrone, R. D.; Torres, V. E.; Braun, W. E.; Steinman, T. I.; Winklhofer, F. T.; Brosnahan, G.; Czarnecki, P. G.; Hogan, M. C.; Miskulin, D. C.; Rahbari-Oskoui, F. F.; Grantham, J. J.; Harris, P. C.; Flessner, M. F.; Bae, K. T.; Moore, C. G.; Chapman, A. B. Blood Pressure in Early Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *N Engl J Med* **2014**, *371* (24), 2255–2266. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1402685>.
- (44) Chapman, A. B.; Torres, V. E.; Perrone, R. D.; Steinman, T. I.; Bae, K. T.; Miller, J. P.; Miskulin, D. C.; Oskoui, F. R.; Masoumi, A.; Hogan, M. C.; Winklhofer, F. T.; Braun, W.; Thompson, P. A.; Meyers, C. M.; Kelleher, C.; Schrier, R. W. The HALT Polycystic Kidney Disease Trials: Design and Implementation. *CJASN* **2010**, *5* (1), 102–109. <https://doi.org/10.2215/CJN.04310709>.
- (45) Schrier, R. W.; Abebe, K. Z.; Perrone, R. D.; Torres, V. E.; Braun, W. E.; Steinman, T. I.; Winklhofer, F. T.; Brosnahan, G.; Czarnecki, P. G.; Hogan, M. C.; Miskulin, D. C.; Rahbari-Oskoui, F. F.; Grantham, J. J.; Harris, P. C.; Flessner, M. F.; Bae, K. T.; Moore, C. G.; Chapman, A. B. Blood Pressure in Early Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *N Engl J Med* **2014**, *371* (24), 2255–2266. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1402685>.
- (46) Bibbins-Domingo, K.; Chertow, G. M.; Coxson, P. G.; Moran, A.; Lightwood, J. M.; Pletcher, M. J.; Goldman, L. Projected Effect of Dietary Salt Reductions on Future Cardiovascular Disease. *N Engl J Med* **2010**, *362* (7), 590–599. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0907355>.
- (47) Cheung, A. K.; Chang, T. I.; Cushman, W. C.; Furth, S. L.; Hou, F. F.; Ix, J. H.; Knoll, G. A.; Muntner, P.; Pecoits-Filho, R.; Sarnak, M. J.; Tobe, S. W.; Tomson, C. R. V.; Mann, J. F. E. KDIGO 2021 Clinical Practice Guideline for the Management of Blood Pressure in Chronic Kidney Disease. *Kidney International* **2021**, *99* (3), S1–S87. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2020.11.003>.
- (48) Torres, V. E.; Abebe, K. Z.; Schrier, R. W.; Perrone, R. D.; Chapman, A. B.; Yu, A. S.; Braun, W. E.; Steinman, T. I.; Brosnahan, G.; Hogan, M. C.; Rahbari, F. F.; Grantham, J. J.; Bae, K. T.; Moore, C. G.; Flessner, M. F. Dietary Salt Restriction Is Beneficial to the Management of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Kidney International* **2017**, *91* (2), 493–500. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.10.018>.
- (49) Soroka, S.; Alam, A.; Bevilacqua, M.; Girard, L.-P.; Komenda, P.; Loertscher, R.; McFarlane, P.; Pandeya, S.; Tam, P.; Bichet, D. G. Updated Canadian Expert Consensus on Assessing Risk of Disease Progression and Pharmacological Management of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Can J Kidney Health Dis* **2018**, *5*, 205435811880158. <https://doi.org/10.1177/2054358118801589>.
- (50) Warner, G.; Hein, K. Z.; Nin, V.; Edwards, M.; Chini, C. C. S.; Hopp, K.; Harris, P. C.; Torres, V. E.; Chini, E. N. Food Restriction Ameliorates the Development of Polycystic Kidney Disease. *JASN* **2016**, *27* (5), 1437–1447. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015020132>.
- (51) Torres, J. A.; Kruger, S. L.; Broderick, C.; Amaralkhagva, T.; Agrawal, S.; Dodam, J. R.; Mrug, M.; Lyons, L. A.; Weimbs, T. Ketosis Ameliorates Renal Cyst Growth in Polycystic

- Kidney Disease. *Cell Metabolism* **2019**, *30* (6), 1007-1023.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.09.012>.
- (52) Wallace, D. P. Cyclic AMP-Mediated Cyst Expansion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2011**, *1812* (10), 1291–1300. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.11.005>.
- (53) Yamaguchi, T.; Pelling, J. C.; Ramaswamy, N. T.; Eppler, J. W.; Wallace, D. P.; Nagao, S.; Rome, L. A.; Sullivan, L. P.; Grantham, J. J. CAMP Stimulates the in Vitro Proliferation of Renal Cyst Epithelial Cells by Activating the Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway¹¹ See Editorial by Grande, p. 1770. *Kidney International* **2000**, *57* (4), 1460–1471. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00991.x>.
- (54) Belibi, F. A.; Reif, G.; Wallace, D. P.; Yamaguchi, T.; Olsen, L.; Li, H.; Helmkamp, G. M.; Grantham, J. J. Cyclic AMP Promotes Growth and Secretion in Human Polycystic Kidney Epithelial Cells¹¹ See Editorial by Torres, p. 1283. *Kidney International* **2004**, *66* (3), 964–973. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00843.x>.
- (55) Gattone, V. H.; Wang, X.; Harris, P. C.; Torres, V. E. Inhibition of Renal Cystic Disease Development and Progression by a Vasopressin V2 Receptor Antagonist. *Nat Med* **2003**, *9* (10), 1323–1326. <https://doi.org/10.1038/nm935>.
- (56) Yasuda, G.; Jeffries, W. B. Regulation of CAMP Production in Initial and Terminal Inner Medullary Collecting Ducts. *Kidney International* **1998**, *54* (1), 80–86. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.00990.x>.
- (57) Barash, I.; Ponda, M. P.; Goldfarb, D. S.; Skolnik, E. Y. A Pilot Clinical Study to Evaluate Changes in Urine Osmolality and Urine CAMP in Response to Acute and Chronic Water Loading in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *CJASN* **2010**, *5* (4), 693–697. <https://doi.org/10.2215/CJN.04180609>.
- (58) Wang, C. J.; Creed, C.; Winklhofer, F. T.; Grantham, J. J. Water Prescription in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: A Pilot Study. *CJASN* **2011**, *6* (1), 192–197. <https://doi.org/10.2215/CJN.03950510>.
- (59) Rangan, G. K.; Wong, A. T. Y.; Munt, A.; Zhang, J. Q. J.; Saravanabavan, S.; Louw, S.; Allman-Farinelli, M.; Badve, S. V.; Boudville, N.; Chan, J.; Coolican, H.; Coulshed, S.; Edwards, M. E.; Erickson, B. J.; Fernando, M.; Foster, S.; Gregory, A. V.; Haloob, I.; Hawley, C. M.; Holt, J.; Howard, K.; Howell, M.; Johnson, D. W.; Kline, T. L.; Kumar, K.; Lee, V. W.; Lonergan, M.; Mai, J.; McCloud, P.; Pascoe, E.; Peduto, A.; Rangan, A.; Roger, S. D.; Sherfan, J.; Sud, K.; Torres, V. E.; Vilayur, E.; Harris, D. C. H. Prescribed Water Intake in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *NEJM Evidence* **2022**, *1* (1). <https://doi.org/10.1056/EVIDoa2100021>.
- (60) Torres, V. E.; Chapman, A. B.; Devuyst, O.; Gansevoort, R. T.; Grantham, J. J.; Higashihara, E.; Perrone, R. D.; Krasa, H. B.; Ouyang, J.; Czerwiec, F. S. Tolvaptan in Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *N Engl J Med* **2012**, *367* (25), 2407–2418. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1205511>.
- (61) Torres, V. E.; Chapman, A. B.; Devuyst, O.; Gansevoort, R. T.; Perrone, R. D.; Dandurand, A.; Ouyang, J.; Czerwiec, F. S.; Blais, J. D. Multicenter, Open-Label, Extension Trial to Evaluate the Long-Term Efficacy and Safety of Early versus Delayed Treatment with Tolvaptan in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: The TEMPO 4:4 Trial. **13**.
- (62) Torres, V. E.; Chapman, A. B.; Devuyst, O.; Gansevoort, R. T.; Perrone, R. D.; Koch, G.; Ouyang, J.; McQuade, R. D.; Blais, J. D.; Czerwiec, F. S.; Sergeeva, O. Tolvaptan in Later-Stage Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *N Engl J Med* **2017**, *377* (20), 1930–1942. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1710030>.
- (63) Chebib, F. T.; Perrone, R. D.; Chapman, A. B.; Dahl, N. K.; Harris, P. C.; Mrug, M.; Mustafa, R. A.; Rastogi, A.; Watnick, T.; Yu, A. S. L.; Torres, V. E. A Practical Guide for Treatment of Rapidly Progressive ADPKD with Tolvaptan. *JASN* **2018**, *29* (10), 2458–2470. <https://doi.org/10.1681/ASN.2018060590>.
- (64) Drews, G. *Mikrobiologie: die Entdeckung der unsichtbaren Welt*; Springer: Heidelberg, 2010.
- (65) Ley, R. E.; Lozupone, C. A.; Hamady, M.; Knight, R. Worlds within Worlds: Evolution of the Vertebrate Gut Microbiota. **2009**, **23**.

- (66) Berg, G.; Rybakova, D.; Fischer, D.; Cernava, T.; Vergès, M.-C. C.; Charles, T.; Chen, X.; Cocolin, L.; Eversole, K.; Corral, G. H.; Kazou, M.; Kinkel, L.; Lange, L.; Lima, N.; Loy, A.; Macklin, J. A.; Maguin, E.; Mauchline, T.; McClure, R.; Mitter, B.; Ryan, M.; Sarand, I.; Smidt, H.; Schelkle, B.; Roume, H.; Kiran, G. S.; Selvin, J.; Souza, R. S. C. de; van Overbeek, L.; Singh, B. K.; Wagner, M.; Walsh, A.; Sessitsch, A.; Schloter, M. Microbiome Definition Re-Visited: Old Concepts and New Challenges. *Microbiome* **2020**, *8* (1), 103. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>.
- (67) Proctor, L. Priorities for the next 10 Years of Human Microbiome Research. *Nature* **2019**, *569* (7758), 623–625. <https://doi.org/10.1038/d41586-019-01654-0>.
- (68) Schoch, C. L.; Ciufu, S.; Domrachev, M.; Hotton, C. L.; Kannan, S.; Khovanskaya, R.; Leipe, D.; Mcveigh, R.; O'Neill, K.; Robbertse, B.; Sharma, S.; Soussov, V.; Sullivan, J. P.; Sun, L.; Turner, S.; Karsch-Mizrachi, I. NCBI Taxonomy: A Comprehensive Update on Curation, Resources and Tools. *Database (Oxford)* **2020**, *2020*, baaa062. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>.
- (69) Sender, R.; Fuchs, S.; Milo, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol* **2016**, *14* (8), e1002533. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>.
- (70) MetaHIT Consortium; Li, J.; Jia, H.; Cai, X.; Zhong, H.; Feng, Q.; Sunagawa, S.; Arumugam, M.; Kultima, J. R.; Prifti, E.; Nielsen, T.; Juncker, A. S.; Manichanh, C.; Chen, B.; Zhang, W.; Levenez, F.; Wang, J.; Xu, X.; Xiao, L.; Liang, S.; Zhang, D.; Zhang, Z.; Chen, W.; Zhao, H.; Al-Aama, J. Y.; Edris, S.; Yang, H.; Wang, J.; Hansen, T.; Nielsen, H. B.; Brunak, S.; Kristiansen, K.; Guarner, F.; Pedersen, O.; Doré, J.; Ehrlich, S. D.; Bork, P.; Wang, J. An Integrated Catalog of Reference Genes in the Human Gut Microbiome. *Nat Biotechnol* **2014**, *32* (8), 834–841. <https://doi.org/10.1038/nbt.2942>.
- (71) Sommer, F.; Anderson, J. M.; Bharti, R.; Raes, J.; Rosenstiel, P. The Resilience of the Intestinal Microbiota Influences Health and Disease. *Nat Rev Microbiol* **2017**, *15* (10), 630–638. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.58>.
- (72) Capaldo, C. T.; Powell, D. N.; Kalman, D. Layered Defense: How Mucus and Tight Junctions Seal the Intestinal Barrier. *J Mol Med* **2017**, *95* (9), 927–934. <https://doi.org/10.1007/s00109-017-1557-x>.
- (73) Singh, R. K.; Chang, H.-W.; Yan, D.; Lee, K. M.; Ucmak, D.; Wong, K.; Abrouk, M.; Farahnik, B.; Nakamura, M.; Zhu, T. H.; Bhutani, T.; Liao, W. Influence of Diet on the Gut Microbiome and Implications for Human Health. *J Transl Med* **2017**, *15* (1), 73. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1175-y>.
- (74) Canfora, E. E.; Jocken, J. W.; Blaak, E. E. Short-Chain Fatty Acids in Control of Body Weight and Insulin Sensitivity. *Nat Rev Endocrinol* **2015**, *11* (10), 577–591. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.128>.
- (75) Cani, P. D.; Van Hul, M.; Lefort, C.; Depommier, C.; Rastelli, M.; Everard, A. Microbial Regulation of Organismal Energy Homeostasis. *Nat Metab* **2019**, *1* (1), 34–46. <https://doi.org/10.1038/s42255-018-0017-4>.
- (76) Haiser, H. J.; Gootenberg, D. B.; Chatman, K.; Sirasani, G.; Balskus, E. P.; Turnbaugh, P. J. Predicting and Manipulating Cardiac Drug Inactivation by the Human Gut Bacterium *Eggerthella Lenta*. *Science* **2013**, *341* (6143), 295–298. <https://doi.org/10.1126/science.1235872>.
- (77) Devlin, A. S.; Fischbach, M. A. A Biosynthetic Pathway for a Prominent Class of Microbiota-Derived Bile Acids. *Nat Chem Biol* **2015**, *11* (9), 685–690. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1864>.
- (78) Reinhardt, C. Tissue Factor and PAR1 Promote Microbiota-Induced Intestinal Vascular Remodelling. *6*.
- (79) Neuman, H.; Debelius, J. W.; Knight, R.; Koren, O. Microbial Endocrinology: The Interplay between the Microbiota and the Endocrine System. *FEMS Microbiology Reviews* **2015**, *39* (4), 509–521. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu010>.
- (80) Yano, J. M.; Yu, K.; Donaldson, G. P.; Shastri, G. G.; Ann, P.; Ma, L.; Nagler, C. R.; Ismagilov, R. F.; Mazmanian, S. K.; Hsiao, E. Y. Indigenous Bacteria from the Gut Microbiota Regulate Host Serotonin Biosynthesis. *Cell* **2015**, *161* (2), 264–276. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.047>.

- (81) Shi, N.; Li, N.; Duan, X.; Niu, H. Interaction between the Gut Microbiome and Mucosal Immune System. *Military Med Res* **2017**, *4* (1), 14. <https://doi.org/10.1186/s40779-017-0122-9>.
- (82) Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G. R.; Merenstein, D. J.; Pot, B.; Morelli, L.; Canani, R. B.; Flint, H. J.; Salminen, S.; Calder, P. C.; Sanders, M. E. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics Consensus Statement on the Scope and Appropriate Use of the Term Probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2014**, *11* (8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>.
- (83) Ijssennagger, N.; Belzer, C.; Hooiveld, G. J.; Dekker, J.; van Mil, S. W. C.; Müller, M.; Kleerebezem, M.; van der Meer, R. Gut Microbiota Facilitates Dietary Heme-Induced Epithelial Hyperproliferation by Opening the Mucus Barrier in Colon. *Proc Natl Acad Sci USA* **2015**, *112* (32), 10038–10043. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507645112>.
- (84) Weiss, G. A.; Hennet, T. Mechanisms and Consequences of Intestinal Dysbiosis. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, *74* (16), 2959–2977. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2509-x>.
- (85) Turnbaugh, P. J.; Hamady, M.; Yatsunencko, T.; Cantarel, B. L.; Duncan, A.; Ley, R. E.; Sogin, M. L.; Jones, W. J.; Roe, B. A.; Affourtit, J. P.; Egholm, M.; Henrissat, B.; Heath, A. C.; Knight, R.; Gordon, J. I. A Core Gut Microbiome in Obese and Lean Twins. *Nature* **2009**, *457* (7228), 480–484. <https://doi.org/10.1038/nature07540>.
- (86) MetaHIT consortium; Le Chatelier, E.; Nielsen, T.; Qin, J.; Prifti, E.; Hildebrand, F.; Falony, G.; Almeida, M.; Arumugam, M.; Batto, J.-M.; Kennedy, S.; Leonard, P.; Li, J.; Burgdorf, K.; Grarup, N.; Jørgensen, T.; Brandslund, I.; Nielsen, H. B.; Juncker, A. S.; Bertalan, M.; Levenez, F.; Pons, N.; Rasmussen, S.; Sunagawa, S.; Tap, J.; Tims, S.; Zoetendal, E. G.; Brunak, S.; Clément, K.; Doré, J.; Kleerebezem, M.; Kristiansen, K.; Renault, P.; Sicheritz-Ponten, T.; de Vos, W. M.; Zucker, J.-D.; Raes, J.; Hansen, T.; Bork, P.; Wang, J.; Ehrlich, S. D.; Pedersen, O. Richness of Human Gut Microbiome Correlates with Metabolic Markers. *Nature* **2013**, *500* (7464), 541–546. <https://doi.org/10.1038/nature12506>.
- (87) Qin, J.; Li, Y.; Cai, Z.; Li, S.; Zhu, J.; Zhang, F.; Liang, S.; Zhang, W.; Guan, Y.; Shen, D.; Peng, Y.; Zhang, D.; Jie, Z.; Wu, W.; Qin, Y.; Xue, W.; Li, J.; Han, L.; Lu, D.; Wu, P.; Dai, Y.; Sun, X.; Li, Z.; Tang, A.; Zhong, S.; Li, X.; Chen, W.; Xu, R.; Wang, M.; Feng, Q.; Gong, M.; Yu, J.; Zhang, Y.; Zhang, M.; Hansen, T.; Sanchez, G.; Raes, J.; Falony, G.; Okuda, S.; Almeida, M.; LeChatelier, E.; Renault, P.; Pons, N.; Batto, J.-M.; Zhang, Z.; Chen, H.; Yang, R.; Zheng, W.; Li, S.; Yang, H.; Wang, J.; Ehrlich, S. D.; Nielsen, R.; Pedersen, O.; Kristiansen, K.; Wang, J. A Metagenome-Wide Association Study of Gut Microbiota in Type 2 Diabetes. *Nature* **2012**, *490* (7418), 55–60. <https://doi.org/10.1038/nature11450>.
- (88) Karlsson, F. H.; Tremaroli, V.; Nookaew, I.; Bergström, G.; Behre, C. J.; Fagerberg, B.; Nielsen, J.; Bäckhed, F. Gut Metagenome in European Women with Normal, Impaired and Diabetic Glucose Control. *Nature* **2013**, *498* (7452), 99–103. <https://doi.org/10.1038/nature12198>.
- (89) Arrieta, M.-C.; Stiemsma, L. T.; Dimitriu, P. A.; Thorson, L.; Russell, S.; Yurist-Doutsch, S.; Kuzeljevic, B.; Gold, M. J.; Britton, H. M.; Lefebvre, D. L.; Subbarao, P.; Mandhane, P.; Becker, A.; McNagny, K. M.; Sears, M. R.; Kollmann, T.; the CHILD Study Investigators; Mohn, W. W.; Turvey, S. E.; Brett Finlay, B. Early Infancy Microbial and Metabolic Alterations Affect Risk of Childhood Asthma. *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7* (307), 307ra152-307ra152. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aab2271>.
- (90) Koeth, R. A.; Wang, Z.; Levison, B. S.; Buffa, J. A.; Org, E.; Sheehy, B. T.; Britt, E. B.; Fu, X.; Wu, Y.; Li, L.; Smith, J. D.; DiDonato, J. A.; Chen, J.; Li, H.; Wu, G. D.; Lewis, J. D.; Warrier, M.; Brown, J. M.; Krauss, R. M.; Tang, W. H. W.; Bushman, F. D.; Lysis, A. J.; Hazen, S. L. Intestinal Microbiota Metabolism of L-Carnitine, a Nutrient in Red Meat, Promotes Atherosclerosis. *Nat Med* **2013**, *19* (5), 576–585. <https://doi.org/10.1038/nm.3145>.
- (91) Tang, W. H. W.; Wang, Z.; Levison, B. S.; Koeth, R. A.; Britt, E. B.; Fu, X.; Wu, Y.; Hazen, S. L. Intestinal Microbial Metabolism of Phosphatidylcholine and Cardiovascular Risk. *N Engl J Med* **2013**, *368* (17), 1575–1584. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1109400>.

- (92) Hsiao, E. Y.; McBride, S. W.; Hsien, S.; Sharon, G.; Hyde, E. R.; McCue, T.; Codelli, J. A.; Chow, J.; Reisman, S. E.; Petrosino, J. F.; Patterson, P. H.; Mazmanian, S. K. Microbiota Modulate Behavioral and Physiological Abnormalities Associated with Neurodevelopmental Disorders. *Cell* **2013**, *155* (7), 1451–1463. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.024>.
- (93) Gibson, G. R.; Hutkins, R.; Sanders, M. E.; Prescott, S. L.; Reimer, R. A.; Salminen, S. J.; Scott, K.; Stanton, C.; Swanson, K. S.; Cani, P. D.; Verbeke, K.; Reid, G. Expert Consensus Document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on the Definition and Scope of Prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2017**, *14* (8), 491–502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>.
- (94) Vaziri, N. D.; Wong, J.; Pahl, M.; Piceno, Y. M.; Yuan, J.; DeSantis, T. Z.; Ni, Z.; Nguyen, T.-H.; Andersen, G. L. Chronic Kidney Disease Alters Intestinal Microbial Flora. *Kidney International* **2013**, *83* (2), 308–315. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.345>.
- (95) Meijers, B.; Evenepoel, P.; Anders, H.-J. Intestinal Microbiome and Fitness in Kidney Disease. *Nat Rev Nephrol* **2019**, *15* (9), 531–545. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0172-1>.
- (96) Wong, J.; Piceno, Y. M.; DeSantis, T. Z.; Pahl, M.; Andersen, G. L.; Vaziri, N. D. 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), 230–237. <https://doi.org/10.1159/000360010>.
- (97) Donohoe, D. R.; Garge, N.; Zhang, X.; Sun, W.; O'Connell, T. M.; Bunker, M. K.; Bultman, S. J. The Microbiome and Butyrate Regulate Energy Metabolism and Autophagy in the Mammalian Colon. *Cell Metabolism* **2011**, *13* (5), 517–526. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.02.018>.
- (98) Litvak, Y.; Byndloss, M. X.; Bäuml, A. J. Colonocyte Metabolism Shapes the Gut Microbiota. *Science* **2018**, *362* (6418), eaat9076. <https://doi.org/10.1126/science.aat9076>.
- (99) Smith, P. M.; Howitt, M. R.; Panikov, N.; Michaud, M.; Gallini, C. A.; Bohlooly-Y, M.; Glickman, J. N.; Garrett, W. S. The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis. *Science* **2013**, *341* (6145), 569–573. <https://doi.org/10.1126/science.1241165>.
- (100) Vaziri, N. D.; Zhao, Y.-Y.; Pahl, M. V. 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), 737–746. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfv095>.
- (101) Polsinelli, V. B.; Marteau, L.; Shah, S. J. The Role of Splanchnic Congestion and the Intestinal Microenvironment in the Pathogenesis of Advanced Heart Failure. *Current Opinion in Supportive & Palliative Care* **2019**, *13* (1), 24–30. <https://doi.org/10.1097/SPC.0000000000000414>.
- (102) Bourke, E.; Milne, M. D.; Stokes, G. S. Caecal PH and Ammonia in Experimental Uraemia. *Gut* **1966**, *7* (5), 558–561. <https://doi.org/10.1136/gut.7.5.558>.
- (103) Kang, J. Y. The Gastrointestinal Tract in Uremia. *Digest Dis Sci* **1993**, *38* (2), 257–268. <https://doi.org/10.1007/BF01307542>.
- (104) Chaves, L. D.; McSkimming, D. I.; Bryniarski, M. A.; Honan, A. M.; Abyad, S.; Thomas, S. A.; Wells, S.; Buck, M.; Sun, Y.; Genco, R. J.; Quigg, R. J.; Yacoub, R. Chronic Kidney Disease, Uremic Milieu, and Its Effects on Gut Bacterial Microbiota Dysbiosis. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **2018**, *315* (3), F487–F502. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00092.2018>.
- (105) Evenepoel, P.; Meijers, B. K. I.; Bammens, B. R. M.; Verbeke, K. Uremic Toxins Originating from Colonic Microbial Metabolism. *Kidney International* **2009**, *76*, S12–S19. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.402>.
- (106) Hida, M.; Aiba, Y.; Sawamura, S.; Suzuki, N.; Satoh, T.; Koga, Y. 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), 349–355. <https://doi.org/10.1159/000189334>.
- (107) De Angelis, M.; Montemurno, E.; Piccolo, M.; Vannini, L.; Lauriero, G.; Maranzano, V.; Gozzi, G.; Serrazanetti, D.; Dalfino, G.; Gobbetti, M.; Gesualdo, L. Microbiota and Metabolome Associated with Immunoglobulin A Nephropathy (IgAN). *PLoS ONE* **2014**, *9* (6), e99006. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099006>.
- (108) Wang, F.; Jiang, H.; Shi, K.; Ren, Y.; Zhang, P.; Cheng, S. Gut Bacterial Translocation Is Associated with Microinflammation in End-Stage Renal Disease Patients: Bacterial Translocation in ESRD. *Nephrology* **2012**, *17* (8), 733–738. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2012.01647.x>.
- (109) Fukuuchi, F.; Hida, M.; Aiba, Y.; Koga, Y.; Endoh, M.; Kurokawa, K.; Sakai, H. Intestinal Bacteria-Derived Putrefactants in Chronic Renal Failure. *Clinical and Experimental Nephrology* **2002**, *6* (2), 99–104. <https://doi.org/10.1007/s101570200016>.
- (110) Ranganathan, N.; Friedman, E. A.; Tam, P.; Rao, V.; Ranganathan, P.; Dheer, R. Probiotic Dietary Supplementation in Patients with Stage 3 and 4 Chronic Kidney Disease: A 6-Month Pilot Scale Trial in Canada. *Current Medical Research and Opinion* **2009**, *25* (8), 1919–1930. <https://doi.org/10.1185/03007990903069249>.
- (111) Durantou, F.; Cohen, G.; De Smet, R.; Rodriguez, M.; Jankowski, J.; Vanholder, R.; Argiles, A.; on behalf of the European Uremic Toxin Work Group. Normal and Pathologic Concentrations of Uremic Toxins. *JASN* **2012**, *23* (7), 1258–1270. <https://doi.org/10.1681/ASN.2011121175>.
- (112) Vanholder, R.; Schepers, E.; Pletinck, A.; Nagler, E. V.; Glorieux, G. The Uremic Toxicity of Indoxyl Sulfate and P-Cresyl Sulfate: A Systematic Review. *JASN* **2014**, *25* (9), 1897–1907. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013101062>.
- (113) Sirich, T.; Meyer, T. W. Indoxyl Sulfate: Long Suspected But Not Yet Proven Guilty. *CJASN* **2011**, *6* (1), 3–4. <https://doi.org/10.2215/CJN.10141110>.
- (114) Bammens, B.; Evenepoel, P.; Keuleers, H.; Verbeke, K.; Vanrenterghem, Y. Free Serum Concentrations of the Protein-Bound Retention Solute p-Cresol Predict Mortality in Hemodialysis Patients. *Kidney International* **2006**, *69* (6), 1081–1087. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000115>.
- (115) Lim, Y. J.; Sidor, N. A.; Tonial, N. C.; Che, A.; Urquhart, B. L. Uremic Toxins in the Progression of Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease: Mechanisms and Therapeutic Targets. *Toxins* **2021**, *13* (2), 142. <https://doi.org/10.3390/toxins13020142>.
- (116) Madero, M.; Cano, K. B.; Campos, I.; Tao, X.; Maheshwari, V.; Brown, J.; Cornejo, B.; Handelman, G.; Thijssen, S.; Kotanko, P. Removal of Protein-Bound Uremic Toxins during Hemodialysis Using a Binding Competitor. *CJASN* **2019**, *14* (3), 394–402. <https://doi.org/10.2215/CJN.05240418>.
- (117) Vanholder, R.; De Smet, R.; Glorieux, G.; Argilés, A.; Baurmeister, U.; Brunet, P.; Clark, W.; Cohen, G.; De Deyn, P. P.; Deppisch, R.; Descamps-Latscha, B.; Henle, T.; Jörres, A.; Lemke, H. D.; Massy, Z. A.; Passlick-Deetjen, J.; Rodriguez, M.; Stegmayr, B.; Stenvinkel, P.; Tetta, C.; Wanner, C.; Zidek, W.; For the European Uremic Toxin Work Group (EUTox). Review on Uremic Toxins: Classification, Concentration, and Interindividual Variability. *Kidney International* **2003**, *63* (5), 1934–1943. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00924.x>.
- (118) Popkov, V. A.; Silachev, D. N.; Zalevsky, A. O.; Zorov, D. B.; Plotnikov, E. Y. Mitochondria as a Source and a Target for Uremic Toxins. *IJMS* **2019**, *20* (12), 3094. <https://doi.org/10.3390/ijms20123094>.
- (119) Wikoff, W. R.; Anfora, A. T.; Liu, J.; Schultz, P. G.; Lesley, S. A.; Peters, E. C.; Siuzdak, G. Metabolomics Analysis Reveals Large Effects of Gut Microflora on Mammalian Blood Metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106* (10), 3698–3703. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812874106>.
- (120) Aronov, P. A.; Luo, F. J.-G.; Plummer, N. S.; Quan, Z.; Holmes, S.; Hostetter, T. H.; Meyer, T. W. Colonic Contribution to Uremic Solutes. *JASN* **2011**, *22* (9), 1769–1776. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010121220>.

- (121) Lau, W. L.; Savoj, J.; Nakata, M. B.; Vaziri, N. D. Altered Microbiome in Chronic Kidney Disease: Systemic Effects of Gut-Derived Uremic Toxins. *Clinical Science* **2018**, *132* (5), 509–522. <https://doi.org/10.1042/CS20171107>.
- (122) Miyazaki, T.; Ise, M.; Hirata, M.; Endo, K.; Ito, Y.; Seo, H.; Niwa, T. Indoxyl Sulfate Stimulates Renal Synthesis of Transforming Growth Factor-Beta 1 and Progression of Renal Failure. *Kidney Int Suppl* **1997**, *63*, S211-214.
- (123) Ichii, O.; Otsuka-Kanazawa, S.; Nakamura, T.; Ueno, M.; Kon, Y.; Chen, W.; Rosenberg, A. Z.; Kopp, J. B. Podocyte Injury Caused by Indoxyl Sulfate, a Uremic Toxin and Aryl-Hydrocarbon Receptor Ligand. *PLoS ONE* **2014**, *9* (9), e108448. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108448>.
- (124) Watanabe, H.; Miyamoto, Y.; Honda, D.; Tanaka, H.; Wu, Q.; Endo, M.; Noguchi, T.; Kadowaki, D.; Ishima, Y.; Kotani, S.; Nakajima, M.; Kataoka, K.; Kim-Mitsuyama, S.; Tanaka, M.; Fukagawa, M.; Otagiri, M.; Maruyama, T. P -Cresyl Sulfate Causes Renal Tubular Cell Damage by Inducing Oxidative Stress by Activation of NADPH Oxidase. *Kidney International* **2013**, *83* (4), 582–592. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.448>.
- (125) Tang, W. H. W.; Wang, Z.; Kennedy, D. J.; Wu, Y.; Buffa, J. A.; Agatista-Boyle, B.; Li, X. S.; Levison, B. S.; Hazen, S. L. Gut Microbiota-Dependent Trimethylamine N -Oxide (TMAO) Pathway Contributes to Both Development of Renal Insufficiency and Mortality Risk in Chronic Kidney Disease. *Circ Res* **2015**, *116* (3), 448–455. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305360>.
- (126) Barreto, F. C.; Barreto, D. V.; Liabeuf, S.; Meert, N.; Glorieux, G.; Temmar, M.; Choukroun, G.; Vanholder, R.; Massy, Z. A.; on behalf of the European Uremic Toxin Work Group (EUTox). Serum Indoxyl Sulfate Is Associated with Vascular Disease and Mortality in Chronic Kidney Disease Patients. *CJASN* **2009**, *4* (10), 1551–1558. <https://doi.org/10.2215/CJN.03980609>.
- (127) Gondouin, B.; Cerini, C.; Dou, L.; Sallée, M.; Duval-Sabatier, A.; Pletinck, A.; Calaf, R.; Lacroix, R.; Jourde-Chiche, N.; Poitevin, S.; Arnaud, L.; Vanholder, R.; Brunet, P.; Dignat-George, F.; Burtey, S. Indolic Uremic Solutes Increase Tissue Factor Production in Endothelial Cells by the Aryl Hydrocarbon Receptor Pathway. *Kidney International* **2013**, *84* (4), 733–744. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.133>.
- (128) Moradi, H.; Sica, D. A.; Kalantar-Zadeh, K. Cardiovascular Burden Associated with Uremic Toxins in Patients with Chronic Kidney Disease. *Am J Nephrol* **2013**, *38* (2), 136–148. <https://doi.org/10.1159/000351758>.
- (129) Liabeuf, S.; Barreto, D. V.; Barreto, F. C.; Meert, N.; Glorieux, G.; Schepers, E.; Temmar, M.; Choukroun, G.; Vanholder, R.; Massy, Z. A.; on behalf of the European Uraemic Toxin Work Group (EUTox). Free P-Cresylsulphate Is a Predictor of Mortality in Patients at Different Stages of Chronic Kidney Disease. *Nephrology Dialysis Transplantation* **2010**, *25* (4), 1183–1191. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfp592>.
- (130) Rossi, M.; Campbell, K. L.; Johnson, D. W.; Stanton, T.; Vesey, D. A.; Coombes, J. S.; Weston, K. S.; Hawley, C. M.; McWhinney, B. C.; Ungerer, J. P. J.; Isbel, N. Protein-Bound Uremic Toxins, Inflammation and Oxidative Stress: A Cross-Sectional Study in Stage 3–4 Chronic Kidney Disease. *Archives of Medical Research* **2014**, *45* (4), 309–317. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2014.04.002>.
- (131) Guasti, L.; Galliazzo, S.; Molaro, M.; Visconti, E.; Pennella, B.; Gaudio, G. V.; Lupi, A.; Grandi, A. M.; Squizzato, A. TMAO as a Biomarker of Cardiovascular Events: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Intern Emerg Med* **2021**, *16* (1), 201–207. <https://doi.org/10.1007/s11739-020-02470-5>.
- (132) Stubbs, J. R.; House, J. A.; Ocque, A. J.; Zhang, S.; Johnson, C.; Kimber, C.; Schmidt, K.; Gupta, A.; Wetmore, J. B.; Nolin, T. D.; Spertus, J. A.; Yu, A. S. Serum Trimethylamine- N -Oxide Is Elevated in CKD and Correlates with Coronary Atherosclerosis Burden. *JASN* **2016**, *27* (1), 305–313. <https://doi.org/10.1681/ASN.2014111063>.
- (133) Kim, H. Y.; Yoo, T.-H.; Hwang, Y.; Lee, G. H.; Kim, B.; Jang, J.; Yu, H. T.; Kim, M. C.; Cho, J.-Y.; Lee, C. J.; Kim, H. C.; Park, S.; Lee, W.-W. Indoxyl Sulfate (IS)-Mediated Immune Dysfunction Provokes Endothelial Damage in Patients with End-Stage Renal

- Disease (ESRD). *Sci Rep* **2017**, 7 (1), 3057. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03130-z>.
- (134) Pletinck, A.; Glorieux, G.; Schepers, E.; Cohen, G.; Gondouin, B.; Van Landschoot, M.; Eloot, S.; Rops, A.; Van de Voorde, J.; De Vriese, A.; van der Vlag, J.; Brunet, P.; Van Biesen, W.; Vanholder, R. Protein-Bound Uremic Toxins Stimulate Crosstalk between Leukocytes and Vessel Wall. *JASN* **2013**, 24 (12), 1981–1994. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012030281>.
- (135) Schepers, E.; Meert, N.; Glorieux, G.; Goeman, J.; Van der Eycken, J.; Vanholder, R. P-Cresylsulphate, the Main in Vivo Metabolite of p-Cresol, Activates Leucocyte Free Radical Production. *Nephrology Dialysis Transplantation* **2006**, 22 (2), 592–596. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfl584>.
- (136) Azevedo, M. L. V.; Bonan, N. B.; Dias, G.; Brehm, F.; Steiner, T. M.; Souza, W. M.; Stingham, A. E. M.; Barreto, F. C.; Elifio-Esposito, S.; Pecoits-Filho, R.; Moreno-Amaral, A. N. P-Cresyl Sulfate Affects the Oxidative Burst, Phagocytosis Process, and Antigen Presentation of Monocyte-Derived Macrophages. *Toxicology Letters* **2016**, 263, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.10.006>.
- (137) Chiang, C.-K.; Tanaka, T.; Inagi, R.; Fujita, T.; Nangaku, M. Indoxyl Sulfate, a Representative Uremic Toxin, Suppresses Erythropoietin Production in a HIF-Dependent Manner. *Lab Invest* **2011**, 91 (11), 1564–1571. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.114>.
- (138) Hamza, E.; Metzinger, L.; Metzinger-Le Meuth, V. Uremic Toxins Affect Erythropoiesis during the Course of Chronic Kidney Disease: A Review. *Cells* **2020**, 9 (9), 2039. <https://doi.org/10.3390/cells9092039>.
- (139) Koppe, L.; Pillon, N. J.; Vella, R. E.; Croze, M. L.; Pelletier, C. C.; Chambert, S.; Massy, Z.; Glorieux, G.; Vanholder, R.; Dugenet, Y.; Soula, H. A.; Fouque, D.; Soulage, C. O. P-Cresyl Sulfate Promotes Insulin Resistance Associated with CKD. *JASN* **2013**, 24 (1), 88–99. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012050503>.
- (140) Minakuchi, H.; Wakino, S.; Hosoya, K.; Sueyasu, K.; Hasegawa, K.; Shinozuka, K.; Yoshifuji, A.; Futatsugi, K.; Komatsu, M.; Kanda, T.; Tokuyama, H.; Hayashi, K.; Itoh, H. The Role of Adipose Tissue Asymmetric Dimethylarginine/Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase Pathway in Adipose Tissue Phenotype and Metabolic Abnormalities in Subtotally Nephrectomized Rats. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2016**, 31 (3), 413–423. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfv367>.
- (141) Nii-Kono, T.; Iwasaki, Y.; Uchida, M.; Fujieda, A.; Hosokawa, A.; Motojima, M.; Yamato, H.; Kurokawa, K.; Fukagawa, M. Indoxyl Sulfate Induces Skeletal Resistance to Parathyroid Hormone in Cultured Osteoblastic Cells. *Kidney International* **2007**, 71 (8), 738–743. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002097>.
- (142) Levey, A. S.; Stevens, L. A.; Schmid, C. H.; Iii, A. F. C.; Feldman, H. I.; Kusek, J. W.; Eggers, P.; Coresh, J. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. **2009**, 16.
- (143) KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. <https://kdigo.org/guidelines/ckd-evaluation-and-management/> (accessed 2021-07-20).
- (144) Robert Koch Institut. Robert Koch Institut. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Biosicherheit/Probentransport/Probentransport_no_de.html.
- (145) MP Biomedicals. FastDNA Spin Kit Manual. www.mpbio.com.
- (146) Klindworth, A.; Pruesse, E.; Schweer, T.; Peplies, J.; Quast, C.; Horn, M.; Glöckner, F. O. Evaluation of General 16S Ribosomal RNA Gene PCR Primers for Classical and Next-Generation Sequencing-Based Diversity Studies. *Nucleic Acids Research* **2013**, 41 (1), e1–e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>.
- (147) 16S Metagenomic Sequencing Library.
- (148) Callahan, B. J.; McMurdie, P. J.; Rosen, M. J.; Han, A. W.; Johnson, A. J. A.; Holmes, S. P. DADA2: High-Resolution Sample Inference from Illumina Amplicon Data. *Nat Methods* **2016**, 13 (7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.
- (149) Bolyen, E.; Rideout, J. R.; Dillon, M. R.; Bokulich, N. A.; Abnet, C. C.; Al-Ghalith, G. A.; Alexander, H.; Alm, E. J.; Arumugam, M.; Asnicar, F.; Bai, Y.; Bisanz, J. E.; Bittinger, K.;

- Brejnerod, A.; Brislawn, C. J.; Brown, C. T.; Callahan, B. J.; Caraballo-Rodríguez, A. M.; Chase, J.; Cope, E. K.; Da Silva, R.; Diener, C.; Dorrestein, P. C.; Douglas, G. M.; Durall, D. M.; Duvallet, C.; Edwardson, C. F.; Ernst, M.; Estaki, M.; Fouquier, J.; Gauglitz, J. M.; Gibbons, S. M.; Gibson, D. L.; Gonzalez, A.; Gorlick, K.; Guo, J.; Hillmann, B.; Holmes, S.; Holste, H.; Huttenhower, C.; Huttley, G. A.; Janssen, S.; Jarmusch, A. K.; Jiang, L.; Kaehler, B. D.; Kang, K. B.; Keefe, C. R.; Keim, P.; Kelley, S. T.; Knights, D.; Koester, I.; Kosciulek, T.; Kreps, J.; Langille, M. G. I.; Lee, J.; Ley, R.; Liu, Y.-X.; Lofffield, E.; Lozupone, C.; Maher, M.; Marotz, C.; Martin, B. D.; McDonald, D.; McIver, L. J.; Melnik, A. V.; Metcalf, J. L.; Morgan, S. C.; Morton, J. T.; Naimey, A. T.; Navas-Molina, J. A.; Nothias, L. F.; Orchanian, S. B.; Pearson, T.; Peoples, S. L.; Petras, D.; Preuss, M. L.; Pruesse, E.; Rasmussen, L. B.; Rivers, A.; Robeson, M. S.; Rosenthal, P.; Segata, N.; Shaffer, M.; Shiffer, A.; Sinha, R.; Song, S. J.; Spear, J. R.; Swafford, A. D.; Thompson, L. R.; Torres, P. J.; Trinh, P.; Tripathi, A.; Turnbaugh, P. J.; Ul-Hasan, S.; van der Hoof, J. J. J.; Vargas, F.; Vázquez-Baeza, Y.; Vogtmann, E.; von Hippel, M.; Walters, W.; Wan, Y.; Wang, M.; Warren, J.; Weber, K. C.; Williamson, C. H. D.; Willis, A. D.; Xu, Z. Z.; Zaneveld, J. R.; Zhang, Y.; Zhu, Q.; Knight, R.; Caporaso, J. G. Reproducible, Interactive, Scalable and Extensible Microbiome Data Science Using QIIME 2. *Nat Biotechnol* **2019**, *37* (8), 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>.
- (150) Estaki, M.; Jiang, L.; Bokulich, N. A.; McDonald, D.; González, A.; Kosciulek, T.; Martino, C.; Zhu, Q.; Birmingham, A.; Vázquez-Baeza, Y.; Dillon, M. R.; Bolyen, E.; Caporaso, J. G.; Knight, R. QIIME 2 Enables Comprehensive End-to-End Analysis of Diverse Microbiome Data and Comparative Studies with Publicly Available Data. *Current Protocols in Bioinformatics* **2020**, *70* (1). <https://doi.org/10.1002/cpbi.100>.
- (151) *Automated Machine Learning: Methods, Systems, Challenges*; Hutter, F., Kotthoff, L., Vanschoren, J., Eds.; The Springer Series on Challenges in Machine Learning; Springer International Publishing: Cham, 2019. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-05318-5>.
- (152) Waring, J.; Lindvall, C.; Umeton, R. Automated Machine Learning: Review of the State-of-the-Art and Opportunities for Healthcare. *Artificial Intelligence in Medicine* **2020**, *104*, 101822. <https://doi.org/10.1016/j.artmed.2020.101822>.
- (153) Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F. O. The SILVA Ribosomal RNA Gene Database Project: Improved Data Processing and Web-Based Tools. *Nucleic Acids Research* **2012**, *41* (D1), D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>.
- (154) Yilmaz, P.; Parfrey, L. W.; Yarza, P.; Gerken, J.; Pruesse, E.; Quast, C.; Schweer, T.; Peplies, J.; Ludwig, W.; Glöckner, F. O. The SILVA and “All-Species Living Tree Project (LTP)” Taxonomic Frameworks. *Nucl. Acids Res.* **2014**, *42* (D1), D643–D648. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>.
- (155) Dessau, R. B.; Pipper, C. B. [“R”--project for statistical computing]. *Ugeskr Laeger* **2008**, *170* (5), 328–330.
- (156) McMurdie, P. J.; Holmes, S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE* **2013**, *8* (4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>.
- (157) Segata, N.; Izard, J.; Waldron, L.; Gevers, D.; Miropolsky, L.; Garrett, W. S.; Huttenhower, C. Metagenomic Biomarker Discovery and Explanation. *Genome Biol* **2011**, *12* (6), R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>.
- (158) Chen, J. Generalized UniFrac Distances and Distance-Based Multivariate Analysis of Variance, 14:20:09 UTC.
- (159) Oksanen, J.; F. Guillaume Blanchet, Michael Friendly, Roeland Kindt.; Pierre Legendre, Dan McGlinn, Peter R. Minchin, R. B. O’Hara.; Gavin L. Simpson, Peter Solymos, M. Henry H. Stevens, Eduard Szoecs.; Helene Wagner. Community Ecology Package, 2018.
- (160) Chen, J.; Bittinger, K.; Charlson, E. S.; Hoffmann, C.; Lewis, J.; Wu, G. D.; Collman, R. G.; Bushman, F. D.; Li, H. Associating Microbiome Composition with Environmental Covariates Using Generalized UniFrac Distances. *Bioinformatics* **2012**, *28* (16), 2106–2113. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts342>.
- (161) Cohen, J. QUANTITATIVE METHODS IN PSYCHOLOGY. 5.

- (162) Tachtsoglou, S.; König, J. Zusammenhangsmaße für nominalskalierte Variablen. In *Statistik für Erziehungswissenschaftlerinnen und Erziehungswissenschaftler*; Springer Fachmedien Wiesbaden: Wiesbaden, 2017; pp 129–163. https://doi.org/10.1007/978-3-658-13437-2_6.
- (163) Osborne, J. Improving Your Data Transformations: Applying the Box-Cox Transformation. <https://doi.org/10.7275/QBPC-GK17>.
- (164) Barros, A. F.; Borges, N. A.; Ferreira, D. C.; Carmo, F. L.; Rosado, A. S.; Fouque, D.; Mafra, D. Is There Interaction between Gut Microbial Profile and Cardiovascular Risk in Chronic Kidney Disease Patients? *Future Microbiology* **2015**, *10* (4), 517–526. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.140>.
- (165) Simões-Silva, L.; Araujo, R.; Pestana, M.; Soares-Silva, I.; Sampaio-Maia, B. The Microbiome in Chronic Kidney Disease Patients Undergoing Hemodialysis and Peritoneal Dialysis. *Pharmacological Research* **2018**, *130*, 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.02.011>.
- (166) Vaziri, N. D.; Yuan, J.; Norris, K. Role of Urea in Intestinal Barrier Dysfunction and Disruption of Epithelial Tight Junction in Chronic Kidney Disease. *Am J Nephrol* **2013**, *37* (1), 1–6. <https://doi.org/10.1159/000345969>.
- (167) Vaziri, N. D.; Goshtasbi, N.; Yuan, J.; Jellbauer, S.; Moradi, H.; Raffatellu, M.; Kalantar-Zadeh, K. Uremic Plasma Impairs Barrier Function and Depletes the Tight Junction Protein Constituents of Intestinal Epithelium. *Am J Nephrol* **2012**, *36* (5), 438–443. <https://doi.org/10.1159/000343886>.
- (168) Vaziri, N. D.; Yuan, J.; Khazaeli, M.; Masuda, Y.; Ichii, H.; Liu, S. Oral Activated Charcoal Adsorbent (AST-120) Ameliorates Chronic Kidney Disease-Induced Intestinal Epithelial Barrier Disruption. *Am J Nephrol* **2013**, *37* (6), 518–525. <https://doi.org/10.1159/000351171>.
- (169) McIntyre, C. W.; Harrison, L. E. A.; Eldehni, M. T.; Jefferies, H. J.; Szeto, C.-C.; John, S. G.; Sigrist, M. K.; Burton, J. O.; Hothi, D.; Korsheed, S.; Owen, P. J.; Lai, K.-B.; Li, P. K. T. Circulating Endotoxemia: A Novel Factor in Systemic Inflammation and Cardiovascular Disease in Chronic Kidney Disease. *CJASN* **2011**, *6* (1), 133–141. <https://doi.org/10.2215/CJN.04610510>.
- (170) Feroze, U.; Kalantar-Zadeh, K.; Sterling, K. A.; Molnar, M. Z.; Noori, N.; Benner, D.; Shah, V.; Dwivedi, R.; Becker, K.; Kovesdy, C. P.; Raj, D. S. Examining Associations of Circulating Endotoxin With Nutritional Status, Inflammation, and Mortality in Hemodialysis Patients. *Journal of Renal Nutrition* **2012**, *22* (3), 317–326. <https://doi.org/10.1053/j.jrn.2011.05.004>.
- (171) Wong, J.; Vilar, E.; Farrington, K. Endotoxemia in End-Stage Kidney Disease. *Semin Dial* **2015**, *28* (1), 59–67. <https://doi.org/10.1111/sdi.12280>.
- (172) Wanner, C.; Drechsler, C.; Krane, V. C-Reactive Protein and Uremia. *Seminars in Dialysis* **2009**, *22* (4), 438–441. <https://doi.org/10.1111/j.1525-139X.2009.00596.x>.
- (173) Leahy, S. C.; Higgins, D. G.; Fitzgerald, G. F.; Sinderen, D. Getting Better with Bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology* **2005**, *98* (6), 1303–1315. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02600.x>.
- (174) Biavati, B.; Mattarelli, P. The Family Bifidobacteriaceae. In *The Prokaryotes*; Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., Eds.; Springer New York: New York, NY, 2006; pp 322–382. https://doi.org/10.1007/0-387-30743-5_17.
- (175) Sivan, A.; Corrales, L.; Hubert, N.; Williams, J. B.; Aquino-Michaels, K.; Earley, Z. M.; Benyamin, F. W.; Man Lei, Y.; Jabri, B.; Alegre, M.-L.; Chang, E. B.; Gajewski, T. F. Commensal *Bifidobacterium* Promotes Antitumor Immunity and Facilitates Anti-PD-L1 Efficacy. *Science* **2015**, *350* (6264), 1084–1089. <https://doi.org/10.1126/science.aac4255>.
- (176) Fukuda, S.; Toh, H.; Hase, K.; Oshima, K.; Nakanishi, Y.; Yoshimura, K.; Tobe, T.; Clarke, J. M.; Topping, D. L.; Suzuki, T.; Taylor, T. D.; Itoh, K.; Kikuchi, J.; Morita, H.; Hattori, M.; Ohno, H. Bifidobacteria Can Protect from Enteropathogenic Infection through Production of Acetate. *Nature* **2011**, *469* (7331), 543–547. <https://doi.org/10.1038/nature09646>.

- (177) Wei, M.; Wang, Z.; Liu, H.; Jiang, H.; Wang, M.; Liang, S.; Shi, K.; Feng, J. Probiotic *Bifidobacterium Animalis* Subsp. *Lactis* Bi-07 Alleviates Bacterial Translocation and Ameliorates Microinflammation in Experimental Uraemia: Beneficial Effect of Probiotic on Uraemia. *Nephrology* **2014**, *19* (8), 500–506. <https://doi.org/10.1111/nep.12272>.
- (178) Ewaschuk, J. B.; Diaz, H.; Meddings, L.; Diederichs, B.; Dmytrash, A.; Backer, J.; Looijer-van Langen, M.; Madsen, K. L. Secreted Bioactive Factors from *Bifidobacterium Infantis* Enhance Epithelial Cell Barrier Function. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **2008**, *295* (5), G1025–G1034. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90227.2008>.
- (179) Shimizu, Y.; Nakamura, K.; Kikuchi, M.; Ukawa, S.; Nakamura, K.; Okada, E.; Imae, A.; Nakagawa, T.; Yamamura, R.; Tamakoshi, A.; Ayabe, T. Lower Human Defensin 5 in Elderly People Compared to Middle-Aged Is Associated with Differences in the Intestinal Microbiota Composition: The DOSANCO Health Study. *GeroScience* **2021**. <https://doi.org/10.1007/s11357-021-00398-y>.
- (180) Kashtanova, D. A.; Klimenko, N. S.; Strazhesko, I. D.; Starikova, E. V.; Glushchenko, O. E.; Gudkov, D. A.; Tkacheva, O. N. A Cross-Sectional Study of the Gut Microbiota Composition in Moscow Long-Livers. *Microorganisms* **2020**, *8* (8), 1162. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081162>.
- (181) *The Prokaryotes Firmicutes Und Tenericutes*; Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2014. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-30120-9>.
- (182) Vital, M.; Howe, A. C.; Tiedje, J. M. Revealing the Bacterial Butyrate Synthesis Pathways by Analyzing (Meta)Genomic Data. *mBio* **2014**, *5* (2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00889-14>.
- (183) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed.; Boone, D. R., Castenholz, R. W., Garrity, G. M., Eds.; Springer: New York, 2001.
- (184) Topiel, M. S.; Simon, G. L. Peptococcaceae Bacteremia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **1986**, *4* (2), 109–117. [https://doi.org/10.1016/0732-8893\(86\)90144-6](https://doi.org/10.1016/0732-8893(86)90144-6).
- (185) Bourgault, A.-M. Peptococcus Magnus: A Significant Human Pathogen. *Ann Intern Med* **1980**, *93* (2), 244. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-93-2-244>.
- (186) Houlden, A.; Goldrick, M.; Brough, D.; Vizi, E. S.; Lénárt, N.; Martinecz, B.; Roberts, I. S.; Denes, A. Brain Injury Induces Specific Changes in the Caecal Microbiota of Mice via Altered Autonomic Activity and Mucoprotein Production. *Brain, Behavior, and Immunity* **2016**, *57*, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.04.003>.
- (187) Elinav, E.; Strowig, T.; Kau, A. L.; Henao-Mejia, J.; Thaiss, C. A.; Booth, C. J.; Peaper, D. R.; Bertin, J.; Eisenbarth, S. C.; Gordon, J. I.; Flavell, R. A. NLRP6 Inflammasome Regulates Colonic Microbial Ecology and Risk for Colitis. *Cell* **2011**, *145* (5), 745–757. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.04.022>.
- (188) Rudemiller, N. P.; Patel, M. B.; Zhang, J.; Jeffs, A. D.; Karlovich, N. S.; Griffiths, R.; Kan, M. J.; Buckley, A. F.; Gunn, M. D.; Crowley, S. D. C-C Motif Chemokine 5 Attenuates Angiotensin II-Dependent Kidney Injury by Limiting Renal Macrophage Infiltration. *The American Journal of Pathology* **2016**, *186* (11), 2846–2856. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.07.015>.
- (189) Nakamura, K.; Sakuragi, N.; Takakuwa, A.; Ayabe, T. Paneth Cell α -Defensins and Enteric Microbiota in Health and Disease. *Bioscience of Microbiota, Food and Health* **2016**, *35* (2), 57–67. <https://doi.org/10.12938/bmfh.2015-019>.
- (190) Oda, T.; Yoshizawa, N. Factors Affecting the Progression of Infection-Related Glomerulonephritis to Chronic Kidney Disease. *IJMS* **2021**, *22* (2), 905. <https://doi.org/10.3390/ijms22020905>.
- (191) Nasr, S. H.; Radhakrishnan, J.; D'Agati, V. D. Bacterial Infection-Related Glomerulonephritis in Adults. *Kidney International* **2013**, *83* (5), 792–803. <https://doi.org/10.1038/ki.2012.407>.
- (192) *The Prokaryotes Proteobacteria*; Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., Eds.; Springer New York: New York, NY, 2006. <https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1>.

- (193) Backhed, F. Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science* **2005**, *307* (5717), 1915–1920. <https://doi.org/10.1126/science.1104816>.
- (194) Shin, N.-R.; Whon, T. W.; Bae, J.-W. Proteobacteria: Microbial Signature of Dysbiosis in Gut Microbiota. *Trends in Biotechnology* **2015**, *33* (9), 496–503. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>.
- (195) Verhaar, B. J. H.; Prodan, A.; Nieuwdorp, M.; Muller, M. Gut Microbiota in Hypertension and Atherosclerosis: A Review. *Nutrients* **2020**, *12* (10), 2982. <https://doi.org/10.3390/nu12102982>.
- (196) Riva, A.; Kolimár, D.; Spittler, A.; Wisgrill, L.; Herbold, C. W.; Abrankó, L.; Berry, D. Conversion of Rutin, a Prevalent Dietary Flavonol, by the Human Gut Microbiota. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 585428. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.585428>.
- (197) Calderón-Pérez, L.; Gosalbes, M. J.; Yuste, S.; Valls, R. M.; Pedret, A.; Llauradó, E.; Jimenez-Hernandez, N.; Artacho, A.; Pla-Pagà, L.; Companys, J.; Ludwig, I.; Romero, M.-P.; Rubió, L.; Solà, R. Gut Metagenomic and Short Chain Fatty Acids Signature in Hypertension: A Cross-Sectional Study. *Sci Rep* **2020**, *10* (1), 6436. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63475-w>.
- (198) Martinez, A. W.; Recht, N. S.; Hostetter, T. H.; Meyer, T. W. Removal of P-Cresol Sulfate by Hemodialysis. *JASN* **2005**, *16* (11), 3430–3436. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005030310>.
- (199) Devine, E.; Krieter, D.; Rùth, M.; Jankovski, J.; Lemke, H.-D. Binding Affinity and Capacity for the Uremic Toxin Indoxyl Sulfate. *Toxins* **2014**, *6* (2), 416–429. <https://doi.org/10.3390/toxins6020416>.
- (200) Craciun, S.; Balskus, E. P. Microbial Conversion of Choline to Trimethylamine Requires a Glycyl Radical Enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109* (52), 21307–21312. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215689109>.
- (201) Al-Obaide, M.; Singh, R.; Datta, P.; Rewers-Felkins, K.; Salguero, M.; Al-Obaidi, I.; Kottapalli, K.; Vasylyeva, T. Gut Microbiota-Dependent Trimethylamine-N-Oxide and Serum Biomarkers in Patients with T2DM and Advanced CKD. *JCM* **2017**, *6* (9), 86. <https://doi.org/10.3390/jcm6090086>.
- (202) Rath, S.; Rud, T.; Pieper, D. H.; Vital, M. Potential TMA-Producing Bacteria Are Ubiquitously Found in Mammalia. *Front. Microbiol.* **2020**, *10*, 2966. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02966>.
- (203) Saito, Y.; Sato, T.; Nomoto, K.; Tsuji, H. Identification of Phenol- and p-Cresol-Producing Intestinal Bacteria by Using Media Supplemented with Tyrosine and Its Metabolites. *FEMS Microbiology Ecology* **2018**, *94* (9), fiy125. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy125>.
- (204) Opdebeeck, B.; D’Haese, P. C.; Verhulst, A. Molecular and Cellular Mechanisms That Induce Arterial Calcification by Indoxyl Sulfate and P-Cresyl Sulfate. *Toxins* **2020**, *12* (1), 58. <https://doi.org/10.3390/toxins12010058>.
- (205) Chebib, F. T.; Torres, V. E. Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: Core Curriculum 2016. *American Journal of Kidney Diseases* **2016**, *67* (5), 792–810. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2015.07.037>.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bildgebung und Klassifizierung von Patient*innen mit einer ADPKD	16
Abbildung 2: Grafische Darstellung der Ergebnisse des Shannon Indexes, als Maß der Diversität in den einzelnen Stuhlproben	43
Abbildung 3: Distanzmatrix (Generalized UniFrac PCoA) zur Veranschaulichung, wie ähnlich bzw. unterschiedlich die mikrobielle Zusammensetzung der Stuhlproben, der einzelnen Proband*innen ist.....	44
Abbildung 4: Histogramm der errechnet signifikant unterschiedlich abundanten bakteriellen Taxa aller Patient*innen mit einer ADPKD gegenüber allen gesunden Proband*innen (Vergleich 1.1)	45
Abbildung 5: Differenzierung der zentralen Tendenzen der OTU der Klasse der Bacilli in den einzelnen Mayo-Klassen	49
Abbildung 6: Ergebnisse der multiplen linearen Regression, zur Prüfung eines kausalen Zusammenhangs des Alters und der Nierenfunktion zur relativen Häufigkeit der OTUs der Familie der Peptococcaceae, im Stuhl von Patient*innen mit einer ADPKD.....	51
Abbildung 7: Beispielhafte Auswertung des Mann-Whitney-U-Tests, für die gemittelten Serumkonzentrationen des TMAO, zur Unterscheidung der zentralen Tendenzen, in der gesunden Kontrollkohorte und der ADPKD Kohorte.	53
Abbildung 8: Übersicht der statistischen Kennzahlen, der einfachen linearen Regressionsanalyse, zur Überprüfung der Kausalität zwischen der Nierenfunktion (eGFR) und den gemittelten Serumkonzentrationen des Indoxyl-sulfats (IS).....	55
Abbildung 9: Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Testes zur Differenzierung, ob die Nierenfunktion (eGFR) einen Einfluss auf die Serumkonzentrationen der Urämietoxine (UT) in den Vergleichsgruppen (Arterieller Hypertonus vor dem 35. Lebensjahr, kein arterieller Hypertonus vor dem 35. Lebensjahr) hat.....	59

Abbildung 10: Exemplarische Darstellung, der Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Testes zur Unterscheidung der gemittelten Serumkonzentrationen der Urämietoxine (UT) in Abhängigkeit der Mayo-Klasse.....61

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der Variablen und ihrer Wertigkeit, die in den PROPKD-Score einfließen, sowie die Risikostratifizierung in Abhängigkeit der ermittelten Punktzahl..... 15

Tabelle 2: Übersicht der Auswirkungen urämischer Retentionssolute, bakteriellen Ursprungs.27-28

Tabelle 3: Aufteilung der Patient*innen..... 32

Tabelle 4: Aufteilung der gesunden Proband*innen..... 32

Tabelle 5: Übersicht der initial erfassten Variablen zur nachfolgenden statistischen Aufarbeitung..... 35

Tabelle 6: Zusammenfassung der gemeinsamen Merkmale, der gesunden Kontrollkohorte, sowie der ADPKD Kohorte.39

Tabelle 7: Zusammenfassung der klinischen Charakteristika der ADPKD Kohorte.....40-41

Tabelle 8: Übersicht der präformierten Vergleichsgruppen, inklusive der zugehörigen Fragestellungen, zur bioinformatischen Auswertung der Mikrobiomanalyse 41-42

Tabelle 9: Übersicht der signifikant unterschiedlich abundanten Taxa, in den jeweiligen gegenübergestellten Vergleichsgruppen. 45-47

Tabelle 10: Übersicht der Ergebnisse der zweiseitigen Rangkorrelationsanalyse nach Spearman zur Prüfung eines Zusammenhangs zwischen Mikrobiota und potenziellen Einflussfaktoren (Bristol Skala, Salzzufuhr, Nikotinkonsum, Alkoholkonsum, Mayo-Klassifikation)..... 48

Tabelle 11: Übersicht der Ergebnisse der einfachen linearen Regressionsanalysen der metrisch skalierten Variablen, zur Prüfung einer Kausalität zwischen den Mikroorganismen und den möglichen Einflussfaktoren (eGFR, Alter, BMI)48

Tabelle 12: Übersicht des Medians und des Interquartilsbereichs der gemittelten Serumkonzentrationen, der untersuchten Urämietoxine.....	52
Tabelle 13: Übersicht der statistischen Kennzahlen, der einfachen linearen Regressionsanalyse, zur Überprüfung der Kausalität zwischen der Nierenfunktion (eGFR) und den gemittelten Serumkonzentrationen des Indoxyl-sulfats (IS).....	54
Tabelle 14: Zusammenfassung der wichtigsten Parameter der Dependenzanalysen hinsichtlich des Einflusses der eGFR auf die einzelnen Urämie Toxine.....	55-56
Tabelle 15: Übersicht der Korrelationskoeffizienten und der Signifikanz aus der zweiseitigen Korrelationsanalyse nach Spearman, zur Untersuchung des Zusammenhangs der UT mit dem Alter der Proband*innen.	56
Tabelle 16: Zusammenfassung der relevanten Ergebnisse der Dependenzanalysen, zwischen den Urämie Toxinen und klinisch relevanten prognostischen Charakteristika der ADPKD Kohorte.....	60
Tabelle 17: Übersicht der signifikanten Ergebnisse, der zweiseitigen Rangkorrelationsanalyse nach Spearman in der Gesamt-, ADPKD- und gesunden Kontrollkohorte	62

8. Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Es wurden vorab keine Ergebnisse veröffentlicht.