

Aus der Klinik für Kardiologie und Angiologie der Medizinischen  
Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Der TJ-Regulator Zonulin – mehr als ein  
Mediator des Leaky-Gut-Syndroms?  
Eine Korrelationsanalyse bei Patienten mit  
kardio-renalen Erkrankungen**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von  
Robert Klüsener  
aus Köln

Datum der Promotion: 26. Juni 2022



Meinen Großeltern Doris und Helmut Paulsen.



# Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Mann, Elli ; Kluesener, Robert ; Boschann, Felix ; Ruppert, Jana ; Armbruster, Franz P. ; Meinitzer, Andreas ; Melzer, Christoph ; Dschietzig, Thomas B.: **Homoarginine Associates with Zonulin and Tryptophan - Findings in a High-Risk Cohort of Patients Carrying an AICD.** In: Clinical laboratory 63 (2017), November, S. 1911–1918.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>11</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>13</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>15</b>
<b>Abstract (englisch)</b>	<b>17</b>
<b>Abstract (deutsch)</b>	<b>19</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>21</b>
1.1 Hintergrund . . . . .	21
1.2 Tight Junctions . . . . .	22
1.2.1 Aufbau von Tight Junctions (TJs) . . . . .	22
1.2.2 Bedeutung von TJs . . . . .	23
1.3 Zonulin . . . . .	25
1.3.1 Entdeckung und Beschreibung von Zonulin . . . . .	25
1.3.2 Assoziation von Zonulin mit Erkrankungen . . . . .	28
1.3.3 Offene Fragen . . . . .	30
1.4 Herzinsuffizienz . . . . .	31
1.4.1 Definition . . . . .	31
1.4.2 Epidemiologie . . . . .	31
1.4.3 Ätiologie . . . . .	32
1.4.4 Einteilung und Diagnostik der Herzinsuffizienz . . . . .	33
1.4.5 Automatische implantierte Kardioverter/Defibrillatoren (AICD) . . . . .	34
1.5 Niereninsuffizienz . . . . .	34
1.5.1 Definition . . . . .	34

1.5.2	Epidemiologie . . . . .	34
1.5.3	Ätiologie . . . . .	35
1.5.4	Einteilung . . . . .	35
1.5.5	Niereninsuffizienz bei Herzinsuffizienz . . . . .	35
1.6	Systemische Entzündung . . . . .	37
1.7	Laborparameter für kardiovaskuläres Risiko und systemische Entzündungsprozesse . . . . .	37
1.7.1	C-reaktives Protein (CRP) . . . . .	37
1.7.2	Homoarginin . . . . .	38
1.7.3	Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) . . . . .	38
1.7.4	Carboxymethyl-Lysin-Calprotectin (CML-Cal) . . . . .	39
1.7.5	Kynurenin . . . . .	39
1.7.6	Carbonylproteine (CP) . . . . .	40
1.7.7	Nitrotyrosin (Nty) . . . . .	40
1.8	Herleitung der Fragestellung . . . . .	40
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>41</b>
2.1	Studiendesign . . . . .	41
2.2	Probanden . . . . .	41
2.2.1	Erfasste Daten . . . . .	42
2.2.2	Archivdaten . . . . .	42
2.2.3	Abgeleitete Daten . . . . .	42
2.3	Proben . . . . .	44
2.3.1	Probengewinnung . . . . .	44
2.3.2	Verblindung . . . . .	44
2.4	Laborchemische Methoden . . . . .	44
2.4.1	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) . . . . .	45
2.4.2	High Performance Liquid Chromatography (HPLC) . . . . .	46
2.4.3	Photometrie . . . . .	47
2.5	Statistische Auswertung . . . . .	48
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>49</b>
3.1	Deskriptive Statistik . . . . .	49
3.1.1	Patientenkollektiv . . . . .	49
3.1.2	Daten aus Anamnese, Untersuchung und Archiv . . . . .	49

3.1.3	Ergebnisse der durchgeführten Laboranalysen . . . . .	53
3.1.4	Übersicht über das Patientenkollektiv . . . . .	56
3.2	Explorative Analyse . . . . .	57
3.2.1	Korrelationsanalysen . . . . .	57
3.2.2	Regressionsanalysen . . . . .	61
3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse . . . . .	63
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>65</b>
4.1	Einleitung in die Diskussion . . . . .	65
4.2	Diskussion der Ergebnisse . . . . .	65
4.2.1	Überblick . . . . .	65
4.2.2	Patientenkollektiv . . . . .	66
4.2.3	Ergebnisse der Zonulin-Messung . . . . .	66
4.2.4	Ergebnisse der Korrelationsanalysen: Zonulin und klini- sche kardiologische Parameter . . . . .	67
4.2.5	Ergebnisse der Korrelationsanalysen: Zonulin und kar- diovaskuläre Risikofaktoren . . . . .	68
4.2.6	Ergebnisse der Korrelationsanalysen: Zonulin und Nie- renfunktion . . . . .	69
4.3	Limitationen . . . . .	71
4.4	Zusammenfassung . . . . .	72
4.5	Ausblick . . . . .	72
<b>5</b>	<b>Anhang</b>	<b>75</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>79</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>99</b>
	<b>Anteilerklärung</b>	<b>101</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>103</b>
	<b>Publikationsliste</b>	<b>105</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>107</b>



# Abbildungsverzeichnis

1.1	Darstellung von Zell-Zell-Kontakten . . . . .	23
1.2	Zonulin-Signalwege . . . . .	28
1.3	Herzinsuffizienz bei Frauen . . . . .	32
1.4	Herzinsuffizienz bei Männern . . . . .	32
3.1	Alle gemessenen Zonulinwerte . . . . .	54
3.2	Verteilung der Zonulinwerte . . . . .	54
3.3	QQ-Plot für Zonulin . . . . .	55
3.4	Zonulinspiegel bei Frauen und Männern . . . . .	58
3.5	Zonulin in Abhängigkeit von der GFR . . . . .	61
3.6	Zonulin in Abhängigkeit von Homoarginin . . . . .	62
3.7	Zonulin in Abhängigkeit von CML-Cal . . . . .	62



# Tabellenverzeichnis

2.1	Einteilung des Körpergewichts nach der WHO . . . . .	43
2.2	Definition des Raucherstatus . . . . .	43
2.3	Klassierung der linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) und des linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser (LVEDD) .	43
2.4	Berechnung der glomeruläre Filtrationsrate (GFR) . . . . .	44
2.5	Übersicht der Laboranalysen . . . . .	45
3.1	Alter und Geschlecht der Probanden . . . . .	50
3.2	Echokardiographische Parameter der linksventrikulären Funktion	50
3.3	Einteilung nach echokardiographischen Parametern . . . . .	51
3.4	Koronarstatus der Probanden . . . . .	51
3.5	Klassierung nach Raucherstatus . . . . .	52
3.6	Klassierung nach Körpergewicht . . . . .	52
3.7	Bekannter Diabetes mellitus . . . . .	53
3.8	Kennzahlen Zonulinmessung . . . . .	53
3.9	Kennzahlen Kreatininmessung und GFR-Berechnung . . . . .	55
3.10	Stadium der Niereninsuffizienz nach KDIGO . . . . .	56
3.11	Kennzahlen der Risiko- und Entzündungsmarker . . . . .	56
3.12	Übersicht des Patientenkollektivs . . . . .	57
3.13	Korrelationsanalyse Zonulin und Alter . . . . .	57
3.14	Korrelationsanalyse Zonulin und Nierenparameter . . . . .	58
3.15	Korrelationsanalyse für Zonulin und kardiaale Parameter . . . . .	59
3.16	Korrelationsanalyse für Zonulin und erhobene Risiko- und Ent- zündungsmarker . . . . .	59
3.17	Signifikante Korrelationen von Zonulin . . . . .	60
3.18	Univariate lineare Regressionsanalysen für Zonulin . . . . .	61

5.1	Partielle Korrelationsanalyse für Zonulin, Teil 1 von 2 . . . . .	76
5.2	Partielle Korrelationsanalyse für Zonulin, Teil 2 von 2 . . . . .	77

# Abkürzungsverzeichnis

<b>ADMA</b>	Asymmetrisches Dimethylarginin
<b>AGE</b>	Advanced Glycation End Product
<b>AICD</b>	Automatischer implantierter Kardioverter/Defibrillator
<b>ARDS</b>	Acute Respiratory Distress Syndrome
<b>BMI</b>	Body Mass Index
<b>BNP</b>	Brain Natriuretic Peptide
<b>cAMP</b>	zyklisches Adenosinmonophosphat
<b>CKD-EPI</b>	Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
<b>CML</b>	Carboxymethyl-Lysin
<b>CML-Cal</b>	Carboxymethyl-Lysin-Calprotectin
<b>CP</b>	Carbonylprotein
<b>CRP</b>	C-reaktives Protein
<b>CT</b>	Cholera-Toxin
<b>C. difficile</b>	Clostridioides difficile
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EGFR</b>	Epidermal Growth Factor Receptor
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked Immunosorbent Assay

<b>FHHNC</b>	Familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis
<b>GFR</b>	glomeruläre Filtrationsrate
<b>GSD</b>	Glomerular Slit Diaphragm
<b>HP2</b>	Haptoglobin-2
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography
<b>KDIGO</b>	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
<b>KHK</b>	koronare Herzkrankheit
<b>LVEDD</b>	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
<b>LVEF</b>	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
<b>Nty</b>	Nitrotyrosin
<b>NYHA</b>	New York Heart Association
<b>nt-proBNP</b>	n-terminales Pro-BNP
<b>PKC</b>	Proteinkinase-C
<b>Prä-HP2</b>	Prähaptoglobin-2
<b>py</b>	Pack Years
<b>SCr</b>	Serum-Kreatinin
<b>SD</b>	Standard Deviation
<b>TJ</b>	Tight Junction
<b>V. cholerae</b>	Vibrio cholerae
<b>WHO</b>	World Health Organisation
<b>ZO</b>	Zonula occludens
<b>ZOT</b>	Zonula-occludens-Toxin

# Abstract

Zonulin is the only known endogenous modulator of tight junctions. To this day, most studies have focused on its effect on intestinal permeability. Associations with several intestinal conditions like celiac disease are well established. Tight junctions, however, are present in almost all tissues. Previous results suggest an involvement in systemic inflammation and development of auto-immunity in general. But data on possible associations of zonulin with extraintestinal disease is scarce. We aimed to investigate a possible connection between zonulin and heart and kidney disease. In a cohort of 229 patients with severe heart conditions (patients with icd implants) serum zonulin was measured by ELISA and correlated with selected markers of cardiovascular risk and cardiorenal disease status. Three striking correlations were found: zonulin and GFR ( $\rho = 0.36$ ,  $p < 0.001$ ), zonulin and homoarginine ( $\rho = 0.25$ ,  $p = 0.003$ ), zonulin and carboxymethyllysine-calprotectin ( $\rho = -0.23$ ,  $p = 0.005$ ). Surprisingly, zonulin was associated with markers of low cardiovascular risk in those three cases. These novel findings are not yet fully understood but might indicate additional functions of zonulin apart from regulating gut permeability.



# Abstract

Zonulin ist aktuell der einzige bekannte endogene Regulator von Tight Junctions. Bisher ist es vor allem als Mediator der intestinalen Permeabilität untersucht. Seine Rolle in der Pathophysiologie intestinaler Erkrankungen wie der Zöliakie ist belegt. Tight Junctions üben jedoch nicht nur im Darm, sondern in allen Organsystemen wichtige Funktionen aus. Es gibt einige Hinweise auf eine Beteiligung von Zonulin bei systemischen Entzündungs- und Autoimmunprozessen. Allerdings mangelt es aktuell an Daten zu möglichen Zusammenhängen mit extraintestinalen Erkrankungen. Unser Ziel war es, hypothetische Assoziationen zwischen Zonulin und Herz- und Nierenerkrankungen zu untersuchen. Dazu haben wir in einer Kohorte von 229 Patienten mit schweren Herzerkrankungen (ambulant betreute Träger eines AICD-Aggregates) den Serum-Zonulinspiegel mittels ELISA gemessen und auf Korrelationen mit ausgewählten etablierten Markern für kardiovaskuläres Risiko, Entzündung und den kardiorespiratorischen Krankheitsstatus untersucht. Wir konnten drei auffällige Korrelationen feststellen: Zonulin und GFR ( $\rho = 0,36$ ,  $p < 0,001$ ), Zonulin und Homoarginin ( $\rho = 0,25$ ,  $p = 0,003$ ), Zonulin und CML-Calprotectin ( $\rho = -0,23$ ,  $p = 0,005$ ). Überraschenderweise korrelierte Zonulin in allen drei Fällen mit Markern für ein niedrigeres kardiovaskuläres Risiko. Der Hintergrund dieser bisher nicht bekannten Korrelationen ist noch unklar, unsere Ergebnisse weisen jedoch auf weitere Funktionen von Zonulin neben der Regulation der intestinalen Permeabilität hin.



# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Hintergrund

Tight Junctions (TJs), auch Zonulae occludentes (ZOs) genannt, gehören zu den Zell-Zell-Verbindungen. Sie sind in der Lage, den Raum zwischen Zellen abzudichten und so die parazelluläre Passage vieler Substanzen zu verhindern. Lange stellte man sich TJs als starre Barrieren vor, als „Zement“, der Zellverbände versiegelt. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass die Eigenschaften von TJs variabel sind und durch physiologische sowie pathophysiologische Prozesse verändert werden. Pathologische Veränderungen von TJs wurden bei vielen Erkrankungen beschrieben (bspw. bei malignen Neoplasien, bei C.-difficile-Infektionen oder bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen), die endogene Regulation ist jedoch bis jetzt nur unvollständig aufgeklärt. Zonulin ist der einzige bekannte körpereigene Regulator von TJs: Zonulin erhöht reversibel ihre Durchlässigkeit und steigert so bspw. die Darmpermeabilität. [Wang u. a., 2000; Fasano, 2001] Aktuell wird der Zonulin-Plasmaspiegel als Kriterium zur Feststellung eines sog. „Leaky-Gut-Syndroms“ genutzt, d.h. einer gesteigerten Durchlässigkeit der Darmwand. Des Weiteren wurden Assoziationen des Zonulinspiegels mit verschiedenen entzündlichen Erkrankungen festgestellt, bspw. mit der Zöliakie oder dem Diabetes mellitus Typ I. [Fasano, 2011] Die von Zonulin regulierten TJs werden nicht nur im Epithel des Verdauungstraktes exprimiert, sondern spielen bekanntermaßen auch in der Lunge, in den Nierentubuli und letztlich in allen Epithelien eine entscheidende Rolle. [Hou, 2014; Günzel u. Yu, 2013] Somit könnte Zonulin bei vielen anderen Erkrankungen,

die mit TJ-Veränderungen einhergehen, ggf. ein diagnostischer oder sogar therapeutischer Ansatzpunkt sein.

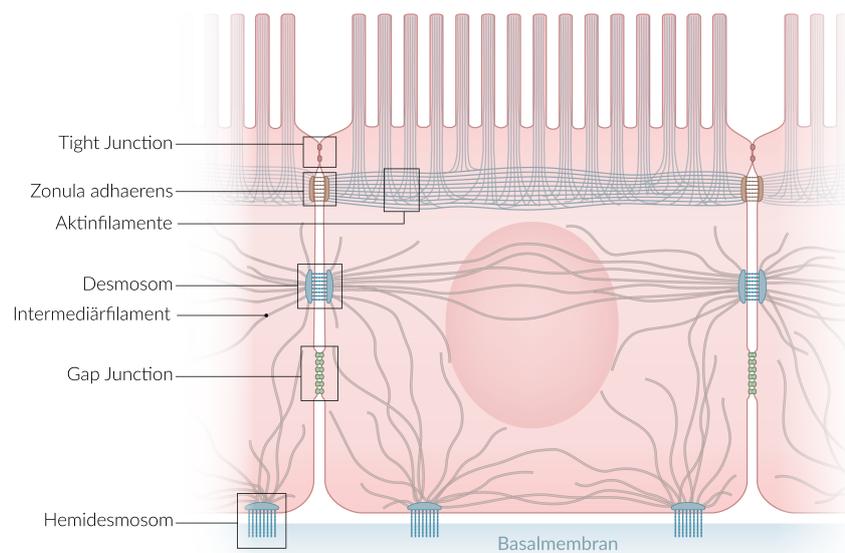
Die biochemische Charakterisierung von Zonulin, die Aufklärung seiner Rolle in Physiologie und Pathophysiologie und die Evaluation eines möglichen klinischen Nutzens stehen jedoch noch am Anfang. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Hypothese, dass Zonulin auch bei der Entwicklung von Herz- und Niereninsuffizienz eine Rolle spielen könnte und möchte einen Beitrag zur Aufklärung der Zonulinwirkung leisten. Dazu haben wir Zonulin und verschiedene etablierte Parameter für Herz- und Niereninsuffizienz, kardiovaskuläres Risiko und Entzündungsprozesse in einem kardiovaskulär stark belastetem Kollektiv (Patienten mit einem AICD) gemessen und auf Zusammenhänge untersucht.

## 1.2 Tight Junctions

Benachbarte Zellen werden im Körper durch verschiedene Proteinkomplexe miteinander verbunden, die unter anderem der Stabilität und der interzellulären Kommunikation dienen (für eine Übersicht siehe Abbildung 1.1). TJs sind schließende Zell-Zell-Verbindungen, die die parazelluläre Passage von Substanzen regulieren. Die Aufklärung ihrer Funktionsweise und Struktur geht auf Farquhar u. Palade [1963] zurück. Hielt man sie anfangs noch für simple Diffusionsbarrieren, so wurde mit der Zeit klar, dass ihre Durchlässigkeit für verschiedene Substanzen variabel ist. [Frömter u. Diamond, 1972] Mittlerweile ist darüber hinaus bekannt, dass TJs auch für die Polarität von Zellverbänden, d.h. für die Abgrenzung apikaler und basaler Zellmembranen, und damit für die Funktionsweise sämtlicher Epithelien verantwortlich sind. [Lee u. a., 2006] Bis heute ist Zonulin der einzige bekannte endogene Regulator von TJs.

### 1.2.1 Aufbau von TJs

Eine einzelne Tight Junction besteht aus einem Band von Proteinen, das in den Plasmamembranen der zu verbindenden Zellen verankert ist. Seit 1986 konnten immer mehr an Tight Junctions beteiligte Proteine identifiziert werden: diese können gruppiert werden in Gerüstproteine, die die Verbindung mit dem Zytoskelett herstellen, und transmembranäre Proteine, die mit den Ge-



**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung verschiedener Zell-Zell-Verbindungen (mit freundlicher Genehmigung von Amboss) [Amboss, 2020]

rüstproteinen verbunden sind und ihrerseits die Kontakte mit benachbarten Zellen ermöglichen. [Stevenson u. a., 1986; Van Itallie u. Anderson, 2014]

### 1.2.2 Bedeutung von TJs

Die Bedeutung von TJs wird in jenen Zellverbänden besonders deutlich, in denen die parazelluläre Passage bestimmter Substanzen erforderlich ist, andere Substanzen aber am Durchtritt gehindert werden müssen. Dazu gehören die Darmmukosa, das Endothel, das Nephron und das respiratorische Epithel. [Alberts u. a., 2002; Stamatovic u. a., 2016; Hou, 2014; Schlingmann u. a., 2015]

#### Bedeutung im Darm

Die Funktion des Darms besteht nicht nur im Austausch von niedermolekularen Nährstoffen und Flüssigkeiten, sondern auch in der Immunabwehr. [Peau-decerf u. Rocha, 2011] Hierbei muss er die primär widersprüchliche Aufgabe leisten, einerseits essentielle Substanzen in den Körper passieren zu lassen, und andererseits potentiell schädliche Moleküle sowie Krankheitserreger fern-

zuhalten. Fehlregulationen dieses Gleichgewichtes sind vorstellbare Ursachen für Krankheiten wie Lebensmittelallergien, chronisch entzündliche Darmerkrankungen oder systemische Entzündungsprozesse. [Ma, 1997; Schilling u. a., 2014] Für eine zu durchlässige Darmwand wurde in diesem Zusammenhang der Begriff „Leaky-Gut-Syndrom“ geprägt. [Hollander, 1999] Man kann sich aber genauso schädliche Folgen einer zu dichten Darmwand vorstellen, z.B. indem notwendige Immuntoleranzen gegenüber ungefährlichen körperfremden Stoffen wie Oberflächenantigenen der apathogenen Darmflora oder Nahrungsproteinen verhindert werden.

### **Bedeutung im Endothel**

Das Endothel grenzt das Lumen der Blutgefäße und damit das Blut selbst von den durchbluteten Geweben ab. Dabei muss es ähnlich wie die Darmschleimhaut Nährstoffe passieren lassen, gleichzeitig aber toxische Substanzen und Krankheitserreger zurückhalten. Die Barrierefunktion ist im Gehirn als sogenannte „Blut-Hirn-Schranke“ besonders ausgeprägt. Die Endothel-Barriere stellt einerseits einen wichtigen Schutz dar, da Fehlfunktionen bspw. an der Metastasierung maligner Neoplasien beteiligt sind. Andererseits kann die Endothel-Barriere auch eine therapeutische Herausforderung sein, wenn auch Medikamente am Übertritt gehindert werden. [Stamatovic u. a., 2016]

### **Bedeutung im Nephron**

TJs sind entscheidend an den Transport- und Diffusionsvorgängen in den Glomeruli und Tubuli beteiligt und bekanntermaßen auch in die Pathophysiologie von Nierenerkrankungen involviert. [Hou, 2014] Störungen der TJ-Funktion im proximalen Tubulus führen im Mausmodell nach Muto u. a. [2010] bspw. zu einer gestörten Ionenselektivität und einer damit einhergehenden verringerten NaCl-Toleranz. Beim Menschen basiert zum Beispiel die seltene Erbkrankheit „familiäre Hypomagnesiämie mit Hyperkalziurie und Nephrokalzinose“ (FHHNC) auf einer Mutation des Gens für das TJ-Protein Claudin. [Claverie-Martin, 2015]

## Bedeutung in der Lunge

In der Lunge gewährleisten TJs die Diffusionsbarriere zwischen dem Lungenepithel und dem Alveolarraum und verhindern einen Übertritt von Flüssigkeit. [Günzel u. Yu, 2013; Schlingmann u. a., 2015] Pathophysiologisch sind TJ-Funktionsstörungen bspw. bei der Entwicklung eines ARDS, eines Asthmas bronchiale oder eines toxischen Lungenödems involviert. [Liu u. a., 2019; Wittekindt, 2017; Rittirsch u. a., 2013]

## 1.3 Zonulin

### 1.3.1 Entdeckung und Beschreibung von Zonulin

Die Entdeckung von Zonulin als Mediator der intestinalen Permeabilität geht auf Fasano u. a. [1997] zurück: Sie beschrieben, dass ein von *Vibrio cholerae* produziertes Toxin, genannt Zonula-occludens-Toxin (ZOT), die Durchlässigkeit von TJs reversibel erhöht. Basierend auf der Hypothese, dass es ein endogenes Analogon von ZOT geben könnte, identifizierten sie schließlich ein körpereigenes Protein mit ZOT-ähnlicher Wirkung auf die intestinale Permeabilität, das sie „Zonulin“ nannten. [Wang u. a., 2000; Fasano u. a., 2000]

#### Zonula-occludens-Toxin (ZOT)

Das Bakterium *V. cholerae* löst beim Menschen schwere Durchfallerkrankungen aus. Als wichtigster Virulenzfaktor gilt das Cholera-Toxin (CT), das im Dünndarm durch die Erhöhung intrazellulärer cAMP-Spiegel über die Aktivierung intrazellulärer Signalwege zu einer sekretorischen Diarrhoe führt. [Harris u. a., 2012] Bei der Entwicklung von Cholera-Impfstoffen mit attenuierten *V. cholerae*-Stämmen fiel jedoch auf, dass diese trotz Unfähigkeit zur Produktion von CT weiterhin Durchfälle auslösen können. [Levine u. a., 1988] Die Hypothese, dass es ein weiteres Toxin geben könnte, wurde von Fasano u. a. [1991] weiter untersucht: Die Zugabe von Bakterienkultur-Überständen verschiedener *V. cholerae*-Stämme zu isolierter Kaninchen-Dünndarmmukosa führte zu einer erhöhten Permeabilität. Der Effekt auf die Permeabilität unterschied sich zwischen den verschiedenen Stämmen, war aber unabhängig von der Fähigkeit, CT zu produzieren. Gleichzeitig korrelierte die Stärke der Permeabilitätserhö-

hung mit der Fähigkeit der Stämme, Durchfall in Probanden auszulösen. Aus funktionellen Versuchen und elektronenmikroskopischer Betrachtung schlossen sie, dass der Effekt auf die Permeabilität auf einer reduzierten Dichtigkeit von Zonulae occludentes (= Tight Junctions) basiert und nannten die verantwortliche Substanz danach Zonula-occludens-Toxin (ZOT). [Fasano u. a., 1991]

In den folgenden Studien zum neu entdeckten ZOT ging es anfangs vor allem um seine Rolle als Virulenzfaktor von *V. cholerae* sowie um die Entwicklung eines verträglichen Cholera-Impfstoffes [Baudry u. a., 1992; Karasawa u. a., 1993; Michalski u. a., 1993] Die Arbeitsgruppe um A. Fasano beschäftigte sich darüber hinaus schwerpunktmäßig mit der Wirkung von ZOT auf TJs: Die Funktionsweise von TJs war und ist zu großen Teilen ungeklärt, die Entdeckung von ZOT mit spezifischer, reversibler Wirkung auf TJs bot daher einen vielversprechenden Ansatz. [Fasano u. a., 1991, 1995]

### **Von ZOT zu Zonulin**

Fasano u. a. [1995] bemerkten, dass die Wirkung von ZOT komplett reversibel, sehr spezifisch und zelltypenabhängig ist und konnten zeigen, dass der Effekt auf die Permeabilität von TJs in der Dünndarmmukosa auf einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts basiert und durch intrazelluläre Signalwege vermittelt wird, die von der Proteinkinase-C (PKC) abhängig sind. Diese Erkenntnisse führten sie zu der Hypothese, dass ZOT über einen Rezeptor wirkt, für den es auch einen endogenen Liganden gibt. [Fasano u. a., 1995, 1997]

Sie fanden schließlich ein Protein in Präparaten humaner Dünndarmmukosa, das von anti-ZOT-Antikörpern gebunden wird. Dieses Protein wurde aufgereinigt und zeigte in weiteren Versuchen einen analogen Effekt auf die Permeabilität von Dünndarmmukosa. Gleichzeitig konnten sie eine vollständige Hemmung durch ZOT und eine starke Hemmung durch Blockade des für die ZOT-Wirkung verantwortlichen PKC-Signalswegs demonstrieren. [Wang u. a., 2000] Daraus folgt, dass das entdeckte Protein höchstwahrscheinlich über den gleichen Rezeptor wirkt wie ZOT. Das entdeckte Protein nannten sie als endogene Entsprechung von ZOT und Regulator von Zonulae occludentes „Zonulin“. [Wang u. a., 2000; Fasano, 2000]

Die Größe des als „Zonulin“ bezeichneten Proteins konnte über Aufreinigung, Filterung und wiederholte in-vitro-Testungen an Dünndarmmukosa auf

ca. 47kDa eingegrenzt werden. Bemerkenswert ist, dass Wang u. a. [2000] zwei verschiedene Zonulin-Varianten nachweisen konnten: das Zonulin aus fötalem Dünndarmgewebe unterschied sich in der Aminosäuresequenz von jenem aus adultem Dünndarmgewebe. Außerdem fanden sie entgegen ihrer Erwartung Zonulin nicht nur im Darm, sondern in allen getesteten Gewebeproben, d.h. auch in fetalem und adultem Hirn- und Herzgewebe.

### **Biochemische Eigenschaften und Genetik von Zonulin**

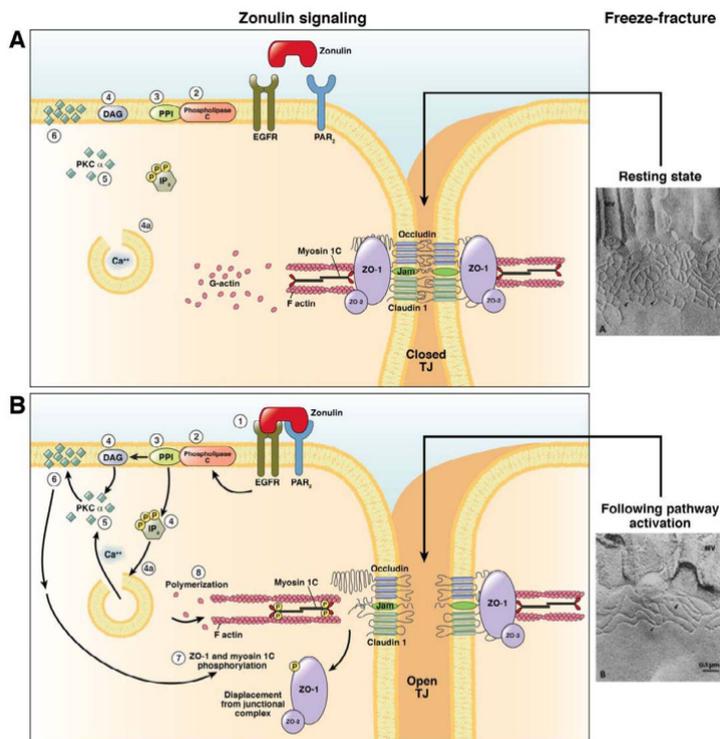
Nach der Publikation von Wang u. a. [2000] ist Zonulin also ein ca. 47kDa großes Protein, das die Permeabilität von Tight Junctions steigert, in verschiedenen intestinalen und extraintestinalen Geweben vorkommt und in mindestens zwei Varianten (fötales und adultes Zonulin) vorliegt.

Tripathi u. a. [2009] stellten fest, dass der zum Zonulin-Nachweis benutzte anti-ZOT-Antikörper an Prähaptoglobin-2 (Prä-HP2) bindet und dass rekombinantes Prä-HP2 die intestinale Permeabilität erhöht, d.h. „Zonulin-Wirkung“ besitzt. Daraus folgerten sie, dass Prä-HP2 identisch mit dem Protein ist, das als „Zonulin“ definiert worden war. Hierbei ergab sich jedoch das Problem, dass eine Aminosäure-Sequenz (GGVLVQPG), die nach Wang u. a. [2000] in Zonulin enthalten ist, gar nicht in Prä-HP2 vorkommt. [Tripathi u. a., 2009]

### **Das Zonulinsystem: Zusammenfassung der aktuellen Kenntnisse**

Aktuell geht man davon aus, dass Zonulin ein ca. 47kDa großes Protein ist, dessen primäre Funktion in der Regulation von Tight Junctions besteht. Es bindet an EGFR und führt PKC-vermittelt zu einer Umorganisation intrazellulärer Aktin-Filamente, welche wiederum die TJ-Konformation beeinflusst und so zu einer höheren Durchlässigkeit führt (siehe Abbildung 1.2). Es gibt Hinweise darauf, dass Zonulin identisch mit Prä-HP2 ist, einem Protein, das vorher nur als Vorläufer von Haptoglobin-2 (HP2) bekannt war. [Fasano, 2012a; Tripathi u. a., 2009]

Die physiologische Bedeutung von Zonulin ist noch unklar. Möglicherweise bildet es einen Teil der unspezifischen Immunabwehr des Dünndarms: Auch apathogene Bakterienspezies führen zu einer erhöhten luminalen Zonulinsekretion, was zu einem erhöhten Austritt von Elektrolyten und Flüssigkeiten ins Lumen führt und so eventuell zu einer Ausschwemmung der Mikroorganismen



**Abbildung 1.2:** Illustration der intrazellulären Zonulin-Signalwege vor Bindung von Zonulin (A) und nach Bindung von Zonulin (B) [Fasano, 2012a] (mit freundlicher Genehmigung von Elsevier)

aus dem normalerweise annähernd sterilen Dünndarm führen könnte. [Fasano, 2001; El Asmar u. a., 2002]

### 1.3.2 Assoziation von Zonulin mit Erkrankungen

#### Zonulin und intestinale Permeabilität

Zonulin erhöht wie in 1.3.1 beschrieben die intestinale Permeabilität. Hiermit geht eine verstärkte Konfrontation des Körpers, insbesondere des Immunsystems, mit verschiedenen Substanzen einher. So werden eine Reihe von Krankheiten, bei denen (Auto)-Immunprozesse beteiligt sind, mit intestinalen Permeabilitätsstörungen („leaky gut“) in Verbindung gebracht [Fasano, 2012b]. Hierzu zählen bspw. Zöliakie [Fasano u. a., 2000], Morbus Crohn [Hollander, 1999], Diabetes mellitus Typ I [Watts u. a., 2005], multiple Sklerose [Yacyshyn u. a., 1996] und Morbus Basedow [Zhang u. a., 2018]. Für die Zöliakie [Fasano u. a., 2000] und Diabetes mellitus Typ I [Sapone u. a., 2006; Watts u. a., 2005]

konnte sogar bereits eine direkte Assoziation mit Zonulin gezeigt werden. Eine sog. Zonulin-abhängige intestinale Barrieredysfunktion („zonulin-dependent intestinal barrier dysfunction“) wurde von Fasano [2008] als neuer möglicher Mechanismus der Entstehung von Autoimmunkrankheiten vorgeschlagen.

### **Zonulin und Entzündungsprozesse sowie metabolische Störungen**

Erhöhte Zonulinspiegel scheinen allgemein mit systemischen Entzündungsprozessen assoziiert zu sein. So fanden sich Zusammenhänge bei vielen chronischen und akuten entzündlichen Erkrankungen, bspw. bei Sepsis [Klaus u. a., 2013], multipler Sklerose [Camara-Lemarroy u. a., 2020] oder rheumatoider Arthritis [Tajik u. a., 2020]. Erhöhte Zonulin-Serumspiegel wurden außerdem bei vielen metabolischen Störungen, die ihrerseits mit Entzündungsprozessen assoziiert sind, nachgewiesen: Bei hochgradiger Adipositas [Aasbrenn u. a., 2020], bei Fettstoffwechselstörungen [Moreno-Navarrete u. a., 2012] und bei Diabetes mellitus Typ 2 [Jayashree u. a., 2014]. Moreno-Navarrete u. a. [2012] fanden zudem eine Korrelation von Zonulin mit zirkulierendem Interleukin-6, einem etablierten Entzündungsmarker.

### **Zonulin und Malignome**

Ein Kennzeichen maligner Erkrankungen ist die Invasion über zelluläre Barrieren hinweg. Hierfür müssen insbesondere auch TJs überwunden werden. Indizien weisen auf eine Beteiligung von Zonulin bei diesem Prozess hin: So konnten Skardelly u. a. [2009] zeigen, dass Gliome Zonulin exprimieren und dass das Ausmaß der Expression mit dem Grad der Malignität korreliert.

### **Herzinsuffizienz und Zonulin**

Es liegen Hinweise vor, dass Zonulin mit Herzinsuffizienz assoziiert ist. Bspw. bestand eine Korrelation des Zonulinspiegels mit dem linksventrikulären Durchmesser. [Przybyłowski u. a., 2014] Bei vielen Formen der Herzinsuffizienz spielt eine chronische Entzündungssituation eine Rolle. [Van Linthout u. Tschöpe, 2017] Zudem ist auch bei der Herzinsuffizienz eine begleitende epitheliale Barrierestörung bekannt. So konnten De Pasquale u. a. [2003] bspw. zeigen, dass die Durchlässigkeit der alveolokapillären Barriere für Proteine bei Patienten

mit ischämischer Kardiomyopathie erhöht ist. Zudem wird derzeit der Zusammenhang zwischen Herzinsuffizienz und der Durchlässigkeit des Darmepithels untersucht, hierfür wurde der Begriff „Gut-Heart-Axis“ geprägt. Diesbezüglich scheint es eine wechselseitige Beziehung zu geben: Eine Herzinsuffizienz erhöht die intestinale Permeabilität, gleichzeitig verstärkt eine zu permeable Darmwand aber eine Herzinsuffizienz. [Kamo u. a., 2017]

## **Nierenerkrankungen und Zonulin**

Ein Zusammenhang zwischen Zonulin und Nierenfunktionsstörungen wurde bisher nicht beschrieben. Bekanntermaßen finden sich jedoch bei etlichen renalen Erkrankungen Veränderungen von TJs, welchen auch eine pathophysiologische Bedeutung zugesprochen wird. [Lee u. a., 2006; Garg, 2018] Des Weiteren tritt bei sehr vielen chronischen entzündlichen Krankheiten eine Nierenbeteiligung auf. [Dietel u. a., 2005] Das gilt insbesondere für Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, für die, wie unter 1.3.2 beschrieben, Assoziationen mit dem Zonulinspiegel bekannt sind.

### **1.3.3 Offene Fragen**

Die biochemische Charakterisierung des Zonulin-Systems ist noch nicht abgeschlossen. Aktuell wird Zonulin häufig mit Prä-HP2 gleichgesetzt, jedoch fielen diesbezüglich Widersprüche in der Aminosäure-Struktur zwischen Prä-HP2 und den ursprünglich beschriebenen Zonulin-Sequenzen auf. [Tripathi u. a., 2009; Wang u. a., 2000].

Wie Zonulin auf die TJs des Dünndarmes wirkt, konnte gezeigt werden (siehe 1.3.1). Ob sich diese Erkenntnisse auf andere Organsysteme übertragen lassen, oder ob Zonulin auch weitere physiologische Funktionen erfüllt, ist Gegenstand aktueller Forschung. Es konnte bereits demonstriert werden, dass sich der Zonulinrezeptor von Gewebe zu Gewebe unterscheidet. Zudem fiel schon bei der Erstbeschreibung von Zonulin auf, dass fetales Zonulin eine etwas andere Aminosäuren-Sequenz aufweist. [Wang u. a., 2000] Beides kann als Hinweis auf weitere Wirkungen von Zonulin interpretiert werden, bspw. in der Migration von Zellen während der Embryonalentwicklung.

Nach der Entdeckung von Zonulin lag der Fokus vor allem auf der Betei-

ligung von Zonulin bei der Entwicklung intestinaler Barrierestörungen und damit assoziierter Erkrankungen, insbesondere der Zöliakie. Sehr früh fiel allerdings auf, dass Zonulin nicht nur im Darm, sondern auch in vielen anderen Geweben exprimiert wird. Mittlerweile wird Zonulin nicht mehr nur als Regulator der intestinalen Barriere angesehen, sondern zunehmend als übergreifender Regulator verschiedener Grenzgewebe. Assoziationen mit extraintestinalen Erkrankungen sind bisher jedoch nur sehr lückenhaft evaluiert worden, Erkenntnisse zu Zonulin bei kardialen und renalen Funktionsstörungen gab es bisher kaum.

## 1.4 Herzinsuffizienz

### 1.4.1 Definition

Als „Herzinsuffizienz“ bezeichnet man allgemein eine eingeschränkte Herzfunktion, welche zu einer unzureichenden Bereitstellung des Herzzeitvolumens führt. Da ein reduziertes Herzzeitvolumen prinzipiell jedes Organsystem beeinträchtigen kann, hat eine Herzinsuffizienz Auswirkung auf den gesamten Körper. [Dietel u. a., 2005]

### 1.4.2 Epidemiologie

Nach Daten des Statistischen Bundesamtes war die Herzinsuffizienz 2013 die zweithäufigste Diagnose von stationär behandelten Patienten in Deutschland. Seit über 20 Jahren wird ein stetiger Anstieg der Herzinsuffizienz-Morbidität dokumentiert. Im Jahr 2013 betrug die stationäre Morbiditätsziffer für die Herzinsuffizienz für Deutschland 490,8 je 100.000 Einwohner. Die Häufigkeit der Herzinsuffizienz steigt mit dem Alter, insbesondere nach dem 75. Lebensjahr. Auffällig sind die Unterschiede in der Geschlechterverteilung: Im Gegensatz zu allen anderen häufigen Herzerkrankungen ist bei der Herzinsuffizienz für Frauen eine höhere Morbidität als bei Männern zu verzeichnen; besonders bemerkenswert ist die Differenz der Morbiditätsziffer, diese ist bei Frauen 82% höher als bei Männern (siehe Abbildungen 1.3 und 1.4). Der Unterschied beruht nicht allein auf dem höheren Alter der Frauen, der genaue Grund ist jedoch nicht bekannt. Diese Zahlen verdeutlichen die hohe Relevanz weiterer

wissenschaftlicher Erkenntnisse auf diesem Gebiet. [Meinertz u. a., 2015]

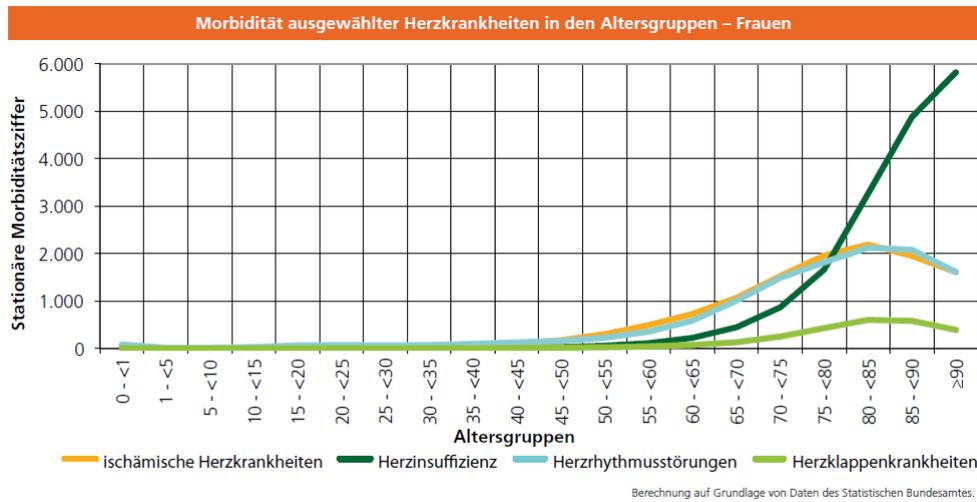


Abb. 2/2: Stationäre Morbiditätsziffer der ischämischen Herzkrankheiten (I20-I25), der Herzrhythmusstörungen (I44-I49), der Herzklappenkrankheiten (I05-I09, I34-I39) und der Herzinsuffizienz (I50) nach Altersgruppen in Deutschland 2013 – weiblich

Abbildung 1.3: Herzinsuffizienz bei Frauen [Meinertz u. a., 2015]

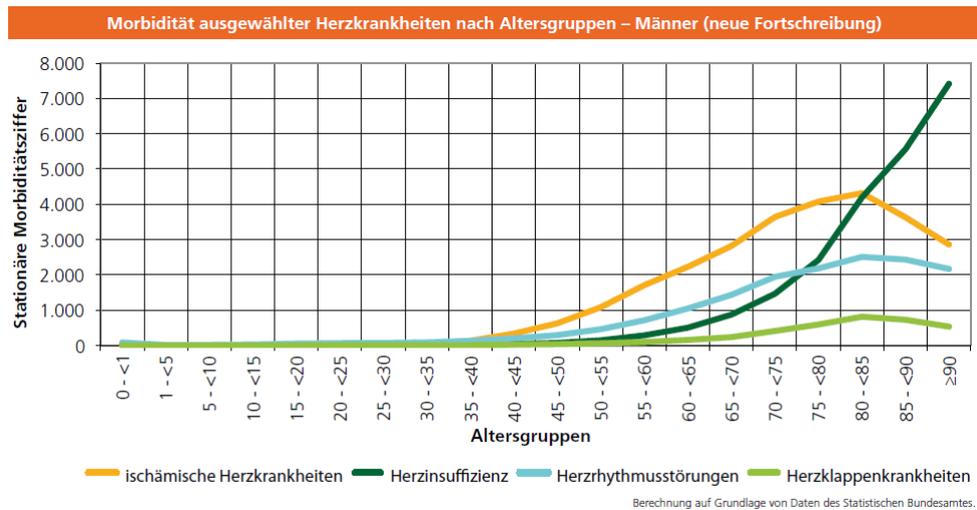


Abb. 2/1a: Stationäre Morbiditätsziffer der ischämischen Herzkrankheiten (I20-I25), der Herzrhythmusstörungen (I44-I49), der Herzklappenkrankheiten (I05-I09, I34-I39) und der Herzinsuffizienz (I50) nach Altersgruppen in Deutschland 2013 – männlich, auf Basis der „neuen“ Bevölkerungsfortschreibung (Zensus 2011).

Abbildung 1.4: Herzinsuffizienz bei Männern [Meinertz u. a., 2015]

### 1.4.3 Ätiologie

Grundsätzlich können viele verschiedene Grunderkrankungen zu einer Herzinsuffizienz führen. In Deutschland ist die ischämische Kardiomyopathie als Folge

einer koronaren Herzerkrankung die bei weitem bedeutendste Form. Darüber hinaus können bspw. Herzklappenfehler, angeborene Herzfehler, genetisch bedingte Kardiomyopathien oder Infektionen zu einer Herzinsuffizienz führen. [Dietel u. a., 2005]

### **Koronare Herzerkrankung**

Als koronare Herzerkrankung bezeichnet man die Arteriosklerose der Koronararterien. Sie ist in Deutschland die Herzkrankheit mit der höchsten Morbidität (über 800/100.000 Einwohner im Jahr 2013) und zudem durch die mögliche Auslösung einer ischämischen Kardiomyopathie die führende Ursache einer Herzinsuffizienz. [Meinertz u. a., 2015]

Die koronare Herzerkrankung wird heute als systemische Erkrankung mit Beteiligung des Immunsystems verstanden. So ist bspw. der etablierte Entzündungsparameter CRP prognostisch ungünstig bei einer koronaren Herzerkrankung. [Ribeiro u. a., 2014] Die Senkung des CRP-Spiegels mittels Plasmapherese nach einem Herzinfarkt kann den Verlauf verbessern [Sheriff u. a., 2015].

#### **1.4.4 Einteilung und Diagnostik der Herzinsuffizienz**

Klinisch wird die Herzinsuffizienz nach dem System der New York Heart Association (NYHA) je nach Symptomatik in vier Schweregrade eingeteilt: NYHA I bis NYHA IV. [Dietel u. a., 2005]

Als Laborparameter der Herzinsuffizienz sind die natriuretischen Peptide etabliert: Dabei handelt es sich insbesondere um das Brain Natriuretic Peptide (BNP), das unter physiologischen Bedingungen an der Flüssigkeits- und Volumenregulation des Körpers mitwirkt. Ein wichtiger Stimulus für die endogene Produktion von BNP ist eine Volumenüberladung der Vorhöfe. [McCullough u. a., 2003; Azzazy u. Christenson, 2003] Im Rahmen der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz tritt regelhaft eine Volumenüberladung des Körpers mit Vorhofdehnung auf, daher korreliert erhöhtes BNP mit dem Schweregrad einer Herzinsuffizienz. Neben der Messung des BNP selbst ist auch die Messung des sogenannten n-terminalen Pro-BNP (nt-proBNP) üblich; dabei handelt es sich um ein Polypeptid, das bei der Abspaltung von BNP aus pro-BNP frei wird

und dessen Spiegel daher auf die endogene BNP-Produktion schließen lässt. [McCullough u. a., 2003] Klinisch werden die natriuretischen Peptide insbesondere zur Differenzierung zwischen kardialer und pulmonaler Genese von Dyspnoe eingesetzt.

### **1.4.5 Automatische implantierte Kardioverter/Defibrillatoren (AICD)**

AICD werden in der Primär- und Sekundärprophylaxe ventrikulärer Herzrhythmusstörungen eingesetzt. Die wichtigsten Indikationen sind hierbei:

- Primärprävention bei symptomatischer Herzinsuffizienz und LVEF < 35%
- Sekundärprävention nach anhaltender ventrikulärer Tachykardie
- Sekundärprävention nach Kammerflimmern
- Primär- und Sekundärprävention bei angeborenen primären Arrhythmie-syndromen [Priori u. a., 2015]

Grundsätzlich wird die Indikation aufgrund einer Vielzahl von kardialen Erkrankungen gestellt, in Deutschland erhält die Mehrheit der Patienten (über 70%) einen AICD jedoch zur Primärprophylaxe [Markewitz, 2019]. Die ischämische Kardiomyopathie ist die bedeutendste Grunderkrankung bei Patienten mit einem AICD. [Meinertz u. a., 2015]

## **1.5 Niereninsuffizienz**

### **1.5.1 Definition**

Als Niereninsuffizienz bezeichnet man eine dauerhaft reduzierte Fähigkeit der Nieren, Primärharn zu bilden. Sie beruht auf einer Reduktion der funktionsfähigen Nephrone. In der Praxis wird diese reduzierte Nierenfunktion über die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bewertet. [Dietel u. a., 2005]

### **1.5.2 Epidemiologie**

Üblicherweise geht man bei einer GFR von unter 60 ml/min/1,73m<sup>2</sup> von einer relevanten Nierenfunktionseinschränkung aus. Nach dieser Definition gibt es

derzeit ca. 2 Millionen Niereninsuffiziente in Deutschland. [Girndt u. a., 2016] Weltweit wird die Prävalenz auf über 10% geschätzt. [Eckardt u. a., 2013]. Niereninsuffiziente Personen haben eine stark erhöhte Mortalität und erleiden vermehrt kardiovaskuläre Ereignisse [Go u. a., 2004]. Die chronische Niereninsuffizienz ist daher auch global gesehen von außerordentlicher Relevanz. [Luyckx u. a., 2018]

### **1.5.3 Ätiologie**

Die wichtigsten Ursachen für eine Niereninsuffizienz sind in Deutschland die arterielle Hypertonie und der Diabetes mellitus. Beide Erkrankungen führen über eine Schädigung der Glomeruli zur Zerstörung von Nephronen. [Dietel u. a., 2005]

### **1.5.4 Einteilung**

Zur Einteilung einer Niereninsuffizienz wird hauptsächlich die glomeruläre Filtrationsrate benutzt. In der klinischen Praxis wird diese meistens nicht direkt bestimmt, sondern über Algorithmen aus dem Serumkreatinin abgeschätzt. Standard ist aktuell die sogenannte CKD-EPI-Formel. [Levey u. a., 2009; Stevens u. a., 2013]

### **1.5.5 Niereninsuffizienz bei Herzinsuffizienz**

Sowohl die Niere als auch das Herz sind entscheidend am Volumenhaushalt, an der Blutdruckregulation und der Steuerung der Organdurchblutung beteiligt. Daraus folgt ein komplexes Zusammenspiel – Störungen eines Systems haben Auswirkungen auf das andere. Bei herzinsuffizienten Patienten findet man dementsprechend sehr häufig auch eine bestehende Niereninsuffizienz. Dafür gibt es mehrere Gründe: Die Risikofaktoren ähneln sich, fast alle typischen Risikofaktoren für eine Herzinsuffizienz wie Diabetes mellitus, Nikotinkonsum oder arterielle Hypertonie sind auch Risikofaktoren für die Niereninsuffizienz. Außerdem beeinträchtigt eine gestörte Herzfunktion über die verminderte Perfusion auch die Nierenfunktion. Umgekehrt verursacht eine schwer eingeschränkte Nierenfunktion auch eine Herzinsuffizienz. Bei einer Gruppe herz- und nieren-

insuffizienter Patienten sind also mehrere Konstellationen zu erwarten: [Dietel u. a., 2005]

- Koinzidenz von Herz- und Niereninsuffizienz bei prädisponierenden Grunderkrankungen
- Gestörte Nierenperfusion durch Herzinsuffizienz (kardiorenales Syndrom)
- Gestörte Herzfunktion durch Niereninsuffizienz (renokardiales Syndrom)

## 1.6 Systemische Entzündung

Kardiovaskuläre Erkrankungen werden nicht mehr nur als lokale Erkrankungen begriffen, sondern scheinen im Zusammenhang mit einer systemischen Entzündungsreaktion zu stehen. [Elia u. a., 2021; Boland u. Long, 2021] So erlaubt der etablierte Entzündungsparameter CRP eine Risikostratifizierung von KHK-Patienten. Zudem gab es wiederholt Hinweise, dass entzündungshemmende Medikamente die kardiovaskuläre Sterblichkeit reduzieren. [Tapoi u. a., 2021; Boland u. Long, 2021]

Viele Zustände, die eine chronische Entzündungsreaktion zur Folge haben, sind auch mit einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität assoziiert. Dies betrifft zum einen die Atherosklerose, die mittlerweile als komplexe systemische Krankheit mit inflammatorischer Komponente begriffen wird. Zum anderen aber auch systemische Erkrankungen, die nicht primär kardiovaskulären Ursprungs sind, wie die rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn oder eine chronische Hepatitis-C-Infektion. [Hansson, 2005; Cainzos-Achirica u. a., 2020; Nevola u. a., 2020]

## 1.7 Laborparameter für kardiovaskuläres Risiko und systemische Entzündungsprozesse

### 1.7.1 C-reaktives Protein (CRP)

Das CRP gehört zu den sogenannten Akut-Phase-Proteinen, also Proteinen, die im Rahmen von akuten Entzündungsreaktionen typischerweise ansteigen. Seine klinische Bedeutung liegt hauptsächlich in seiner Verwendung als Laborparameter zur Diagnostik und Verlaufsbeurteilung von systemischen Entzündungsreaktionen bei Infektionen oder Autoimmunkrankheiten. [Pepys u. Hirschfield, 2003]

Der CRP-Spiegel ist ein sehr nützlicher Indikator für die aktuelle Entzündungsaktivität, da er von anderen Faktoren kaum beeinflusst wird und der gemessene Spiegel aufgrund der kurzen Halbwertszeit von ca. 19h hauptsächlich von der aktuellen Syntheserate abhängt. [Vigushin u. a., 1993] Für die meisten entzündlichen Erkrankungen eignet sich CRP besser als andere Akut-

Phase-Proteine zur Einschätzung der Krankheitsaktivität. Typisch ist eine ausgeprägte CRP-Reaktion bei systemischen Infektionen insbesondere bakterieller Genese, Gewebnekrosen inklusive Myokardinfarkten und Krankheiten des rheumatischen Formenkreises [Pepys u. Hirschfield, 2003]

### **CRP-Spiegel als kardiovaskulärer Risikofaktor**

Bei der Untersuchung von 468 gesunden Blutspendern fanden Shine u. a. [1981] eine mediane CRP-Konzentration im Serum von 0,8 g/l, eine 90.-Perzentile von 3 g/l und eine 99.-Perzentile von 10 g/l. Bei CRP-Konzentrationen von über 10 g/l kann daher von einer zugrundeliegenden systemischen Entzündung ausgegangen werden. In den letzten Jahren wurde wiederholt gezeigt, dass über erhöhte CRP-Spiegel festgestellte gesteigerte systemische Entzündungsaktivität mit einem gesteigerten kardiovaskulären Risiko assoziiert ist. [Ridker u. a., 1998; Hak u. a., 1999; Hansson, 2005; Elkind u. a., 2006]

### **1.7.2 Homoarginin**

Homoarginin ist eine nicht-proteinogene Aminosäure, die sich von Arginin nur durch eine zusätzliche Methylgruppe unterscheidet. Der Homoarginin-Plasmaspiegel gilt als protektiver Faktor für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen. Ein zugrundeliegender Mechanismus ist aktuell nicht geklärt, vermutet wird aber ein günstiger Einfluss auf den NO-Stoffwechsel und damit eine Verbesserung der endothelialen Funktion. [Karetnikova u. a., 2019; Zinellu u. a., 2018]

### **1.7.3 Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA)**

ADMA ist ein Derivat der Aminosäure Arginin und entsteht endogen durch posttranslationale Methylierung. Erhöhte ADMA-Plasmaspiegel sind ein etablierter kardiovaskulärer und renaler Risikofaktor. Zusammenhänge mit KHK, chronischer Niereninsuffizienz, Atherosklerose und einer Vielzahl anderer Erkrankungen wurden beschrieben. Die ungünstige Wirkung von ADMA beruht wahrscheinlich auf einer Störung des NO-Stoffwechsels: ADMA ist der am besten charakterisierte endogene Hemmstoff der NO-Synthase, welche die Bildung

von NO aus Arginin katalysiert. [Vallance u. a., 1992; Valkonen u. a., 2001; Zoccali u. a., 2001; Cooke, 2004]

#### 1.7.4 Carboxymethyl-Lysin-Calprotectin (CML-Cal)

Carboxymethyl-Lysin-Calprotectin ist durch oxidative Glykierung modifiziertes Calprotectin und gehört damit zu den sogenannten „Advanced Glycation End Products (AGEs)“. [Delgado-Andrade, 2016] AGEs sind nach aktuellen Erkenntnissen an einer Vielzahl pathologischer Veränderungen im Rahmen von Alterungsprozessen und degenerativen Erkrankungen wie bspw. der Atherosklerose oder der Niereninsuffizienz beteiligt. [Yamagishi u. Matsui, 2018; Drenth u. a., 2016; Mallipattu u. Uribarri, 2014] Carboxymethyl-Lysin (CML) wird klinisch als Indikator für erhöhte endogene Glykierung und damit gesteigertes Risiko für die Entwicklung entsprechender Erkrankungen eingesetzt. [Jaisson u. a., 2011; Monnier u. a., 2014; Delgado-Andrade, 2016]

Calprotectin ist ein heterodimeres Protein, das in Zellen des angeborenen Immunsystems, vor allem in neutrophilen Granulozyten, vorkommt. Erhöhte Spiegel treten bei einer Vielzahl akuter und chronischer Entzündungszustände auf. [Stríz u. Trebichavský, 2004; Nakashige u. a., 2015]

#### 1.7.5 Kynurenin

Kynurenin ist ein Abbauprodukt der essentiellen Aminosäure Tryptophan. Die Tryptophan-Verstoffwechslung läuft im menschlichen Körper größtenteils über den Kynurenin-Weg, der die Bildung mehrerer bioaktiver Metabolite inkl. Kynurenin selbst beinhaltet. Erhöhte Spiegel dieser Metabolite sind sowohl direkt mit kardiovaskulären Erkrankungen wie Herzinsuffizienz oder Atherosklerose als auch mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie Adipositas, Diabetes mellitus und arterieller Hypertonie assoziiert. [Song u. a., 2017] Des Weiteren treten erhöhte Spiegel von Kynurenin und Kynurenin-Metaboliten als Urämietoxine bei chronischer Niereninsuffizienz auf und scheinen bspw. zu thromboembolischen Ereignissen beizutragen. [Addi u. a., 2018]

### 1.7.6 Carbonylproteine (CP)

Carbonylproteine sind Oxidationsprodukte von Proteinen mit Carbonylgruppen. Sie sind Biomarker für erhöhten oxidativen Stress, erhöhte CP-Spiegel treten bspw. bei Diabetes mellitus, chronischem Nierenversagen und vielen entzündlichen und degenerativen Erkrankungen auf. [Dalle-Donne u. a., 2003]

### 1.7.7 Nitrotyrosin (Nty)

Nitrotyrosin entsteht durch Nitrierung der Aminosäure Tyrosin, insbesondere durch Reaktion von Tyrosin mit dem Radikal Peroxinitrit. Erhöhte Nitrotyrosin-Spiegel weisen auf oxidativen Stress hin und werden als entsprechende Biomarker eingesetzt. [Campolo u. a., 2020]

## 1.8 Herleitung der Fragestellung

Als Parameter für intestinale Permeabilität ist Zonulin mittlerweile etabliert und Korrelationen mit einigen primär gastrointestinalen Erkrankungen konnten gezeigt werden. TJs, deren Durchlässigkeit von Zonulin moduliert wird, üben jedoch in praktisch allen Organsystemen wichtige Funktionen aus; besonders hervorzuheben sind hier das Endothel, die Epithelien des Respirationstraktes einschließlich der Lunge sowie die Nierenglomeruli und -tubuli. Darüber hinaus gab es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Zonulin und systemischen Entzündungsreaktionen generell, die – wie in 1.6 dargestellt – einen bekannten Risikofaktor für Herzinsuffizienz, koronare Herzerkrankung und kardiovaskuläre Mortalität darstellen. Daraus haben wir folgende Fragen abgeleitet:

- Korreliert Zonulin in einem kardiovaskulär stark vorbelasteten Kollektiv mit etablierten laborchemischen Parametern für kardiovaskuläres Risiko, Nierenfunktion oder systemische Entzündungsprozesse?
- Gibt es Zusammenhänge zwischen dem Plasmazonulinspiegel und dem Krankheitsstatus bzgl. Herzinsuffizienz, koronare Herzkrankheit (KHK) oder Niereninsuffizienz?

# Kapitel 2

## Material und Methoden

### 2.1 Studiendesign

Zur Beantwortung der Fragestellung wurden Plasmaproben und klinische Daten von Patienten mit kardiovaskulären und renalen Erkrankungen benötigt. Ausgewählt wurden Patienten mit einem automatischen implantierten Defibrillator, die in der rhythmologischen Sprechstunde der Charité Campus Mitte betreut wurden. Wie in 1.4.5 dargestellt, besteht bei der Mehrzahl der AICD-Träger eine chronische Herzinsuffizienz, zudem sind in diesem Kollektiv weitere kardiovaskuläre Erkrankungen wie eine KHK, eine Niereninsuffizienz oder eine arterielle Hypertonie zu erwarten.

### 2.2 Probanden

Die Probanden wurden in der rhythmologischen Sprechstunde der Charité Campus Mitte über einen Zeitraum von sieben Monaten (April bis Oktober 2013) rekrutiert. Dabei handelte es sich ausschließlich um ambulant betreute Träger eines AICD.

Die Patienten wurden sowohl schriftlich als auch mündlich aufgeklärt und bei Einverständnis eingeschlossen. Weitere Einschlusskriterien wurden nicht angewandt. Da alle bereits betreuten Patienten mindestens halbjährlich einen Sprechstundentermin erhalten, kann von einer fast vollständigen Abdeckung des Patientenstammes ausgegangen werden.

### 2.2.1 Erfasste Daten

Bei der Vorstellung der Patienten wurden folgende Daten anamnestisch erfasst:

- Körpergröße
- Körpergewicht
- Nikotinkonsum in py
- Dialysepflichtigkeit
- Bekannter Diabetes mellitus Typ 1 oder 2

### 2.2.2 Archivdaten

Den Patientenakten der kardiologischen Ambulanz wurden, wenn vorhanden, folgende Daten entnommen:

- Koronarangiographisch ermittelter Koronarstatus
- Echokardiographisch ermittelte LVEF
- Echokardiographisch ermittelter LVEDD

### 2.2.3 Abgeleitete Daten

Auf Basis der Anamnese, einer orientierenden körperlichen Untersuchung und gegebenenfalls vorhandener Vorbefunde wurden folgende Klassifikationen vorgenommen:

- Indikation des AICD (primär- oder sekundärprophylaktisch)
- Vorhandensein einer ischämischen oder nichtischämischen Herzinsuffizienz
- Body Mass Index (BMI) definiert als  $BMI := \frac{\text{Körpergewicht}}{\text{Körpergröße}^2}$
- Einteilung in Körpergewichtsklassen (siehe Tabelle 2.1)
- Einteilung in Raucherklassen (siehe Tabelle 2.2)
- Klassierung der linksventrikulären Funktion nach Echokardiographiebefunden (siehe Tabelle 2.3)

- Berechnete GFR entsprechend aktueller Empfehlungen über die Kreatinin-basierte CKD-EPI-Formel (siehe Tabelle 2.4) [Eknoyan u. a., 2013; Levey u. a., 2009]

**Tabelle 2.1: Einteilung des Körpergewichts nach der WHO [World Health Organization, 2009]**

Gewichtsklasse	Definition
Untergewicht	$BMI < 18,5 \frac{kg}{m^2}$
Normalgewicht	$18,5 \frac{kg}{m^2} \leq BMI < 25 \frac{kg}{m^2}$
Übergewicht	$BMI \geq 25 \frac{kg}{m^2}$
- Präadipositas	$25 \frac{kg}{m^2} \leq BMI < 30 \frac{kg}{m^2}$
- Adipositas I°	$30 \frac{kg}{m^2} \leq BMI < 35 \frac{kg}{m^2}$
- Adipositas II°	$35 \frac{kg}{m^2} \leq BMI < 40 \frac{kg}{m^2}$
- Adipositas III°	$BMI \geq 40 \frac{kg}{m^2}$

**Tabelle 2.2: Definition des Raucherstatus [Janjigian u. a., 2010]**

Raucherstatus	Definition
Nichtraucher	<100 gerauchte Zigaretten im Leben
Raucher	$\geq 100$ Zigaretten, <20py
Starker Raucher	$\geq 20$ py

**Tabelle 2.3: Klassierung der LVEF und des LVEDD [Lang u. a., 2015]**

Klassierung der LVEF	LVEF in % (Frauen)	LVEF in % (Männer)
Normal	54 – 74	52 – 72
Leichtgradig erniedrigt	41 – 54	41 – 52
Mittelgradig erniedrigt	30 – 41	30 – 41
Schwergradig erniedrigt	< 30	< 30
Klassierung des LVEDD	LVEDD in mm (Frauen)	LVEDD in mm (Männer)
Nicht erhöht	$\leq 52,6$	$\leq 58,3$
Erhöht	$> 52,6$	$> 58,3$

**Tabelle 2.4: Berechnung der GFR (CKD-EPI-Formel) [Eknoyan u. a., 2013; Levey u. a., 2009]**

Geschlecht	Formel
Weiblich	$GFR = 144 \cdot \min\left(\frac{SCr}{0,7}, 1\right)^{-0,329} \cdot \max\left(\frac{SCr}{0,7}, 1\right)^{-1,209} \cdot 0,993^{Alter}$
Männlich	$GFR = 141 \cdot \min\left(\frac{SCr}{0,9}, 1\right)^{-0,411} \cdot \max\left(\frac{SCr}{0,9}, 1\right)^{-1,209} \cdot 0,993^{Alter}$

## 2.3 Proben

### 2.3.1 Probengewinnung

Nach Einschluss eines Patienten wurden bei der Vorstellung nach üblichem Prozedere 6 ml Blut venös entnommen und in entsprechende Röhrchen mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) gefüllt (BD Vacutainer® EDTA-Röhrchen 6 ml). Im Anschluss wurden die Proben 15 Minuten bei 3500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. 2 ml Plasma wurden schließlich von jeder Probe in Form von 4 Aliquots à 0,5 ml bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und gelagert. Die Verarbeitung und Einfrierung der Proben erfolgte immer am Entnahmetag.

### 2.3.2 Verblindung

Die Proben wurden fortlaufend durchnummeriert. Die Nummer ließ dabei keinen Rückschluss auf den Patienten oder die anderen erfassten Daten zu. Die Daten wurden in einer separaten Datenbank gespeichert und erst nach vollständiger Bearbeitung aller Proben zur Entblindung mit den anderen Daten zusammengeführt. Eine Zuordnung der Proben zum Patienten war damit während der Weiterverarbeitung und Messung für keine beteiligte Person möglich.

## 2.4 Laborchemische Methoden

Die Laboranalysen erfolgten in Kooperation mit der Immundiagnostik AG, Bensheim und der Limbach Gruppe, Heidelberg. Zur Analyse wurden ELISA, HPLC und Photometrie verwendet (siehe Tabelle 2.5).

**Tabelle 2.5: Übersicht der Laboranalysen [Immundiagnostik, 2020; Limbach-Gruppe, 2020]**

Parameter	Methode	Durchführung
Zonulin	Kompetitiver ELISA	Immundiagnostik
Kreatinin	Photometrie	Limbach Gruppe
CRP	Direkter Sandwich-ELISA	Immundiagnostik
Homoarginin	HPLC	Immundiagnostik
ADMA	HPLC	Immundiagnostik
CML-Cal	ELISA	Immundiagnostik
Kynurenin	Kompetitiver ELISA	Immundiagnostik
CP	Indirekter ELISA	Immundiagnostik
Nty	Indirekter Sandwich-ELISA	Immundiagnostik

### 2.4.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA ist ein Antikörper-basiertes Analyseverfahren. Es nutzt deren Eigenschaft, sehr spezifisch an eine Zielsubstanz zu binden. Zum Nachweis dieser Bindung dienen Enzyme, die mit Antikörpern oder Antigenen verbunden wurden (sog. Enzym-Konjugate) und deren Reaktionsprodukte sich einfach messen lassen. Hierzu werden insbesondere Enzyme eingesetzt, die über ein zugegebenes Substrat zu einem photometrisch messbaren Farbumschlag führen. Es gibt mehrere Abwandlungen des ursprünglichen Verfahrens mit jeweils eigenen Vor- und Nachteilen. [Engvall u. Perlmann, 1971; Van Weemen u. Schuurs, 1971; Crowther, 2000]

Bei der einfachsten Version, dem sog. direkten ELISA, wird ein Enzym-konjugierter Detektionsantikörper eingesetzt, der spezifisch für die Zielsubstanz ist. Die Zielsubstanz wird erst unspezifisch fixiert, dann werden die Enzym-markierten Antikörper hinzugefügt. Diese binden an ggf. vorhandene Zielsubstanz, nicht-gebundene Antikörper werden entfernt. Gebundene Antikörper können nach Zugabe des Substrats über die katalysierte Enzym-Substrat-Reaktion quantifiziert werden – je mehr Zielsubstanz vorhanden war, desto mehr Reaktionsprodukt ist nachweisbar. Direkte ELISA sind vergleichsweise

einfach durchführbar.

Der indirekte ELISA unterscheidet sich hinsichtlich des Enzymkonjugats: Hier ist das Enzym nicht mit dem Detektionsantikörper verbunden, sondern mit einem zweiten Antikörper, der an den Detektionsantikörper bindet. Beim indirekten ELISA weist die Enzymreaktion also gebundene Antikörper und nicht die Zielsubstanz selbst nach. Seine Spezifität entsteht durch die Auswahl des Detektionsantikörpers. Vorteilhaft ist hierbei, dass ein Enzymkonjugat zum Nachweis verschiedener Zielsubstanzen eingesetzt werden kann.

Kompetitive ELISA basieren auf einem etwas abgewandelten Nachweisprinzip: Hier läuft die Enzym-Substrat-Reaktion ohne die Zielsubstanz ab, die Quantifizierung der zu testenden Substanz erfolgt über die Fähigkeit, die Reaktion zu stören. Die Störung beruht dabei auf einer Konkurrenz von Enzymkonjugat und Testsubstanz um Bindungsstellen – je mehr Zielsubstanz vorhanden war, desto weniger Reaktionsprodukt ist nachweisbar. Kompetitive ELISA sind bei nicht aufgereinigten Proben vorteilhaft.

Beim Sandwich-ELISA erfolgt die Fixierung der Zielsubstanz nicht unspezifisch, sondern über einen weiteren Antikörper, den Capture-Antikörper. Er ist möglichst gegen ein anderes Epitop gerichtet als der Detektionsantikörper. Die Zielsubstanz wird dann von zwei Antikörpern gebunden: Dem Capture-Antikörper, der es fixiert, und dem Detektionsantikörper, der dem Nachweis dient (das „Sandwich“). Vorteile liegen in der höheren Spezifität durch Nutzung zweier Epitope sowie in der besseren Fixierung des Antigens, was die Sensitivität erhöhen kann. [Crowther, 2000]

Zonulin und Kynurenin wurden über einen kompetitiven ELISA bestimmt, CP und Nty über einen indirekten und CRP über einen direkten Sandwich-ELISA. Durchgeführt wurden die Assays von der Immundiagnostik AG, Bensheim.

## 2.4.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Die HPLC gehört zu den Trennverfahren und wird vor allem zur Bestimmung organischer Substanzen in Lösungen eingesetzt. Dabei wird die zu analysierende Probe in einem sog. Elutionsmittel unter hohem Druck durch eine Trennsäule gepumpt. In der Probe enthaltene Substanzen wechselwirken je nach Stoff-

eigenschaft unterschiedlich stark mit der stationären Phase in der Trennsäule, wodurch verschiedene Substanzen voneinander getrennt werden. Am Ende der Säule werden die getrennten Substanzen detektiert und können durch Vergleich mit Standardproben zugeordnet und quantifiziert werden. [Schwedt, 2017]

Über HPLC wurden ADMA und Homoarginin bestimmt. Die Analysen erfolgten durch die Immundiagnostik AG, Bensheim.

### **2.4.3 Photometrie**

Bei der Photometrie wird die Konzentration einer farbigen Substanz in einer Probe durch Durchleuchtung und Bestimmung der Absorption analysiert. Das Ausmaß der Absorption hängt dabei von der Konzentration des zu analysierenden Stoffes ab, dabei muss die Wellenlänge des verwendeten Lichts gemäß der stoffspezifischen Absorptionsspektren gewählt werden. Farblose Stoffe können durch chemische Reaktionen in farbige Substanzen überführt werden, damit sie mittels Photometrie analysierbar werden. [Schwedt, 2017]

Der Serum-Kreatininspiegel wurde photometrisch bestimmt, die Analyse wurde von der Limbach-Gruppe, Heidelberg, durchgeführt

## 2.5 Statistische Auswertung

Alle statistischen Berechnungen wurden über die Programmiersprache „R“ unter Nutzung der Software „RStudio“ durchgeführt. Bei kontinuierlichen Größen wurde die Normalverteilung optisch über Quantil-Quantil-Diagramme und rechnerisch über den Shapiro-Wilk-Test überprüft. Korrelationsanalysen wurden bei normalverteilten Daten als Pearson-Korrelation berechnet. Bei nicht normalverteilten Daten wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman angewandt. Gruppenvergleiche wurden bei normalverteilten Daten über einen doppelten t-Test, bei nicht normalverteilten Daten über den Wilcoxon-Rangsummentest durchgeführt. Ergebnisse mit einem Signifikanzwert  $p < 0,05$  wurden als signifikant und Ergebnisse mit einem Wert  $p < 0,01$  als hochsignifikant bezeichnet, signifikante und hochsignifikante Ergebnisse wurden mit „\*“ bzw. „\*\*“ markiert. Zur Reduktion der Wahrscheinlichkeit eines  $\alpha$ -Fehlers durch multiples Testen wurde bei den Zielparametern zusätzlich ein adjustierter p-Wert ( $p_{adj}$ ) nach Holm [1979] berechnet.

# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 Deskriptive Statistik

#### 3.1.1 Patientenkollektiv

Im Zeitraum der Rekrutierung stellten sich 230 Patienten in der Sprechstunde vor, alle haben einer Teilnahme an der Studie zugestimmt. Ein Proband wurde wegen unvollständiger Daten ausgeschlossen, so dass letztlich 229 Patienten in die Auswertung einbezogen wurden ( $n = 229$ ).

#### 3.1.2 Daten aus Anamnese, Untersuchung und Archiv

##### Demographische Daten

Unter den 229 in die Datenauswertung eingeschlossenen Probanden waren Männer deutlich überrepräsentiert: Das Kollektiv setzt sich aus 45 Frauen und 184 Männern zusammen. Das Durchschnittsalter aller Probanden betrug 67,3 Jahre und unterschied sich nur geringfügig in den geschlechtsspezifischen Subgruppen (siehe Tabelle 3.1).

**Tabelle 3.1: Alter und Geschlecht der Probanden**

	Anzahl (Prozent)	Durchschnittsalter (SD)
Gesamt	229 (100)	67 (11,7)
Frauen	45 (20)	65 (11,0)
Männer	184 (80)	68 (12,0)

### Klinische kardiale Parameter

Gemäß dem Studiendesign sind alle Patienten Träger eines AICD-Aggregats. Bei den meisten Patienten (ca. 66%) handelt es sich um eine primärprophylaktische AICD-Versorgung bei höhergradiger Herzinsuffizienz.

Die Auswertung der Echokardiographiebefunde ergab bei einem Großteil der Probanden eine mittel- oder hochgradig eingeschränkte linksventrikuläre systolische Funktion sowie bei fast der Hälfte einen deutlich vergrößerten LVEDD (siehe Tabellen 3.2 und 3.3). Beide Ergebnisse deuten auf einen sehr hohen Anteil herzinsuffizienter Probanden hin. Zudem bestand bei einem Großteil (ca. 2/3) der Studienteilnehmer eine koronarangiographisch nachgewiesene koronare Herzerkrankung (siehe Tabelle 3.4).

**Tabelle 3.2: Echokardiographische Parameter der linksventrikulären Funktion**

Parameter	Mittelwert
LVEF	37,3 %
LVEDD der Frauen	53,0 mm
LVEDD der Männer	58,0 mm

**Tabelle 3.3: Einteilung nach echokardiographischen Parametern**

LVEF	Anzahl (Prozent)
Keine Angabe	9 (3,9)
Erhöht	1 (0,4)
Normal	33 (14,4)
Leicht eingeschränkt	36 (15,7)
Mittelgradig eingeschränkt	93 (40,6)
Hochgradig eingeschränkt	57 (24,9)

LVEDD	Anzahl (Prozent)
Keine Angabe	27 (11,8)
Erhöht	95 (41,5)
Nicht erhöht	107 (46,7)

**Tabelle 3.4: Koronarstatus der Probanden**

Koronarstatus	Anzahl (Prozent)
Keine Angabe	16 (7,0)
Keine KHK	72 (31,4)
Eingefäß-KHK	36 (15,7)
Zweigegefäß-KHK	40 (17,5)
Dreigegefäß-KHK	65 (28,4)

### Nikotinkonsum

Der Raucherstatus wurde wie in Tabelle 2.2 dargestellt definiert. Danach sind über zwei Drittel der Probanden Raucher, 48% sogar starke Raucher (siehe Tabelle 3.5).

**Tabelle 3.5: Klassierung nach Raucherstatus**

Raucherstatus	Anzahl (Prozent)
Keine Angabe	1 (0,4)
Nichtraucher	69 (30,1)
Raucher	49 (21,4)
Starker Raucher	110 (48,0)

### Körpergewicht

Gemäß Einteilung über den BMI nach der WHO (siehe Tabelle 2.1) war die Mehrzahl der Patienten übergewichtig (68%), fast ein Drittel sogar adipös (siehe Tabelle 3.6).

**Tabelle 3.6: Klassierung nach Körpergewicht**

Gewichtskategorie	Anzahl (Prozent)
Keine Angabe	1 (0,4)
Untergewicht	1 (0,4)
Normalgewicht	71 (31,0)
Präadipositas	89 (38,9)
Adipositas I°	51 (22,3)
Adipositas II°	10 (4,4)
Adipositas III°	6 (2,6)

### Diabetes mellitus

Im Kollektiv gab es nur einen Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1. Ein bekannter Typ-2-Diabetes-mellitus lag bei 60 Probanden vor (siehe Tabelle 3.7).

**Tabelle 3.7: Bekannter Diabetes mellitus**

Kategorie	Anzahl (Prozent)
Keine Angabe	6 (2,6)
Kein Diabetes mellitus	162 (70,7)
Diabetes mellitus Typ 1	1 (0,4)
Diabetes mellitus Typ 2	60 (26,2)

### 3.1.3 Ergebnisse der durchgeführten Laboranalysen

#### Zonulin

Bei allen Patienten wurde eine Zonulin-Immunreaktion über den durchgeführten ELISA festgestellt, die Messwerte für Zonulin lagen zwischen  $4,1 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$  und  $26,8 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$  (siehe Tabelle 3.8, Abbildungen 3.1 und 3.2). Die Werte waren nach Shapiro-Wilk-Test ( $p < 0,001$ ) und QQ-Plot (siehe Abbildung 3.3) nicht normalverteilt.

**Tabelle 3.8: Kennzahlen Zonulinmessung**

Kennzahl	Zonulin in $\frac{\text{ng}}{\text{ml}}$
Anzahl	229
Niedrigster Wert	4,1
Mittelwert	10,6
Höchster Wert	26,8
Standardabweichung	2,9

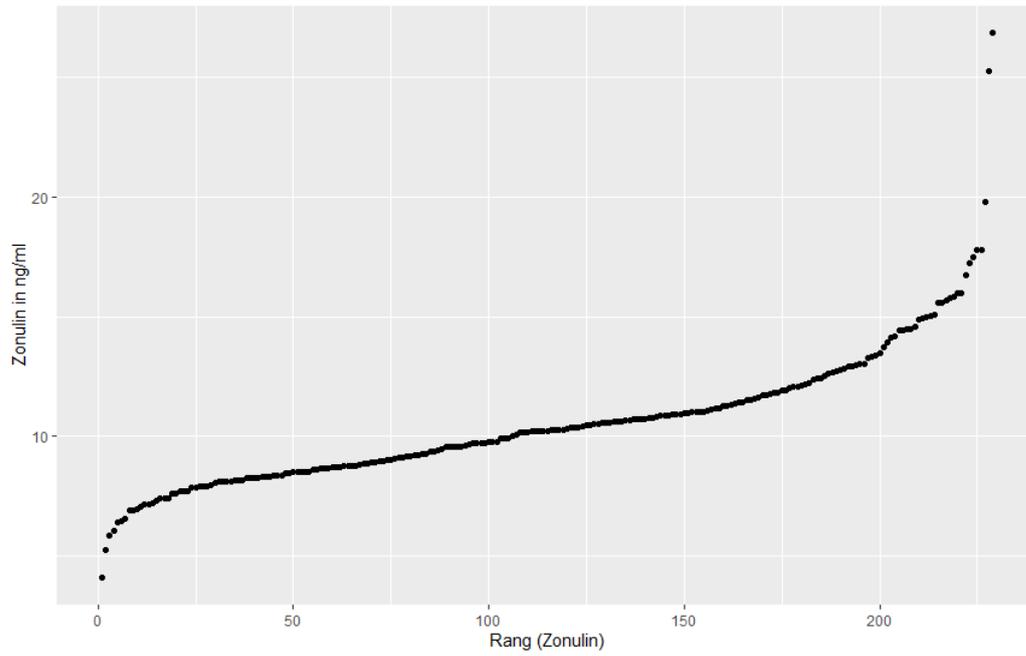


Abbildung 3.1: Alle gemessenen Zonulinwerte nach Größe sortiert

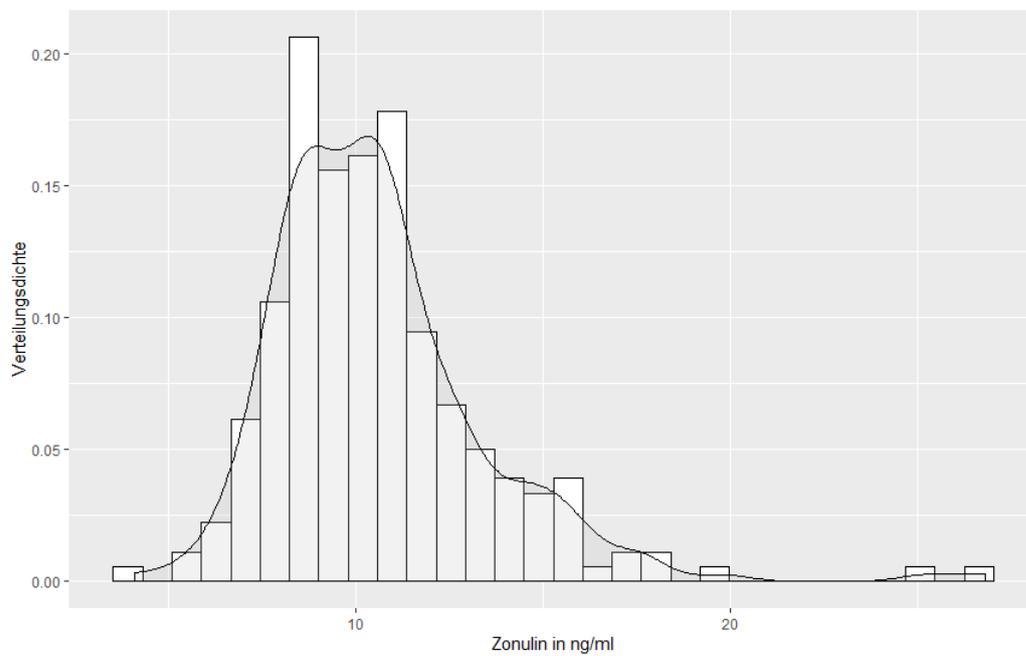
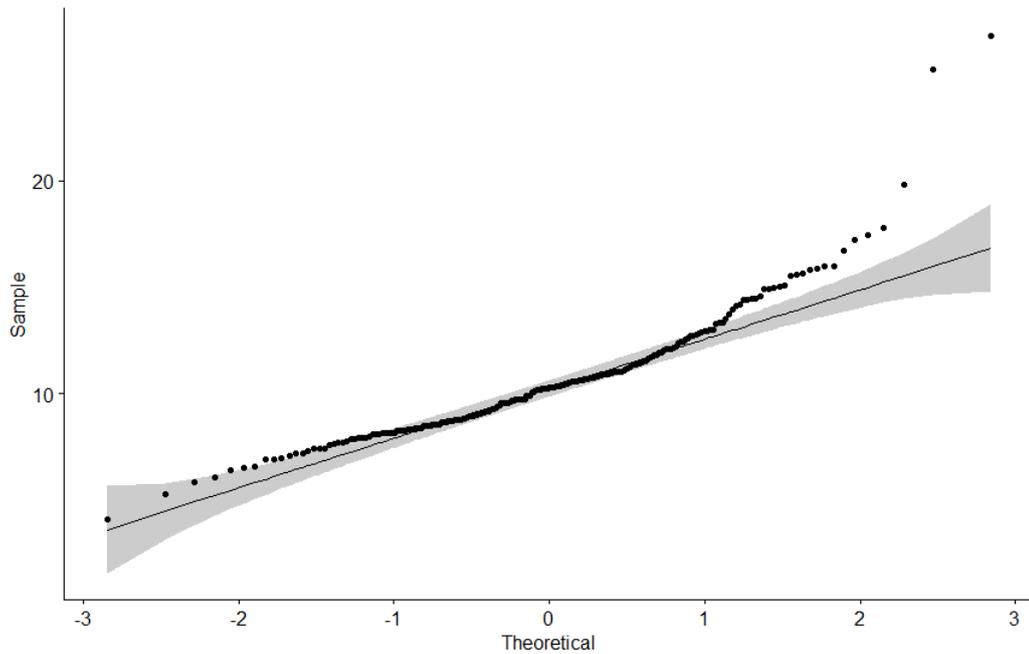


Abbildung 3.2: Verteilung der Zonulinwerte



**Abbildung 3.3:** QQ-Plot für Zonulin

### Kreatinin und GFR

Bei allen Probanden wurde der Kreatininspiegel gemessen, die GFR wurde anschließend über den Kreatininspiegel nach CKD-EPI berechnet. Bei zwei Patienten konnte aufgrund einer bestehenden terminalen Niereninsuffizienz mit intermittierender Hämodialyse keine sinnvolle GFR ermittelt werden. Es zeigte sich ein hoher Anteil an Patienten mit einer Niereninsuffizienz: Mehr als die Hälfte der Probanden hatte eine GFR von unter  $60 \frac{\text{ml}}{\text{min} \cdot 1,72\text{m}^2}$  (siehe Tabellen 3.9 und 3.10).

**Tabelle 3.9:** Kennzahlen Kreatininmessung und GFR-Berechnung

Kennzahl	Kreatinin in $\frac{\text{mg}}{\text{dl}}$	GFR in $\frac{\text{ml}}{\text{min} \cdot 1,72\text{m}^2}$
Niedrigster Wert	0,64	13,3
Mittelwert	1,35	59,5
Höchster Wert	7,22	107,5

**Tabelle 3.10: Stadium der Niereninsuffizienz nach KDIGO**

Stadium der Niereninsuffizienz	Anzahl (Prozent)
I oder keine	20 (8,7)
II	91 (39,7)
III	98 (42,8)
IV	17 (7,4)
V	3 (1,3)

### Marker für kardiovaskuläres Risiko und Entzündung

Analysiert wurden insgesamt sieben Marker, die mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko und systemischen Entzündungsprozessen in Verbindung stehen, wie in Sektion 1.7 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.11 zusammengefasst.

**Tabelle 3.11: Kennzahlen der Risiko- und Entzündungsmarker**

Marker	Minimum	Mittelwert	Maximum
ADMA in $\frac{\mu\text{mol}}{\text{l}}$	0,51	0,78	1,36
CML-Cal in $\frac{\text{ng}}{\text{ml}}$	0,1	198,5	3579
Carbonylprotein in $\frac{\text{U}}{\text{ml}}$	60,9	182,1	709,9
CRP in $\frac{\text{mg}}{\text{l}}$	0,2	4,8	99,2
Homoarginin in $\frac{\mu\text{mol}}{\text{l}}$	0,27	1,65	7,91
Kynurenin in $\frac{\mu\text{mol}}{\text{l}}$	1,3	3,7	11,7
Nitrotyrosin in $\frac{\text{nmol}}{\text{l}}$	0,1	608,7	4295,3

### 3.1.4 Übersicht über das Patientenkollektiv

Insgesamt handelt es sich um ein überwiegend männliches Patientenkollektiv im fortgeschrittenen Alter mit einem hohen kardiovaskulären Risikoprofil und entsprechenden Vorerkrankungen (siehe Tabelle 3.12)

**Tabelle 3.12: Übersicht des Patientenkollektivs**

Parameter	Anzahl (Prozent) bzw. Mittelwert (SD)
Eingeschlossen (= $n$ )	229
Männlich	184 (80)
Weiblich	45 (20)
Alter	67,3 ( $\pm 12$ )
BMI	27,8 ( $\pm 5$ )
Übergewicht	156 (68)
Raucher	159 (69,4)
GFR (CKD-EPI)	59 ( $\pm 21$ )
Moderate bis terminale Niereninsuffizienz	118 (52)
KHK	141 (62)
Eingeschränkte LVEF	186 (81)
Diabetes mellitus	61 (27)

## 3.2 Explorative Analyse

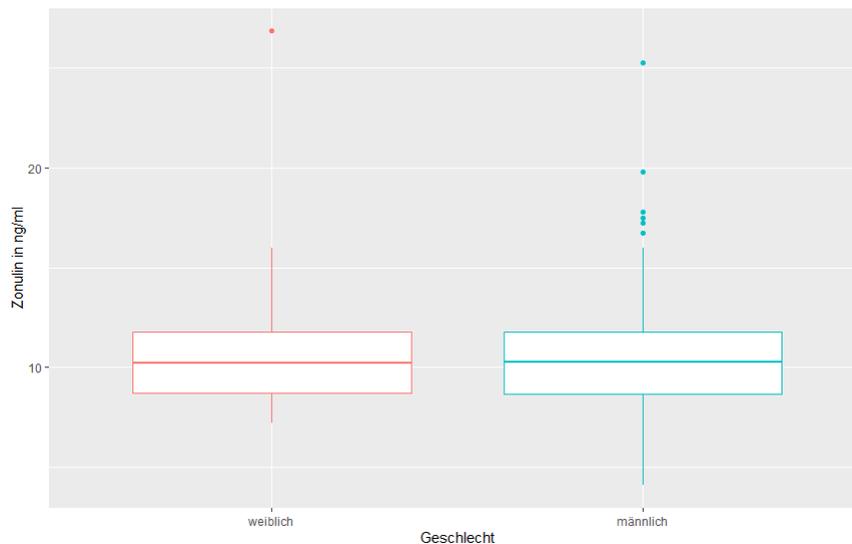
### 3.2.1 Korrelationsanalysen

#### Zonulin und demographische Daten

Es zeigten sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede im gemessenen Zonulin Spiegel ( $p = 0,59$ ), jedoch eine hochsignifikante negative Korrelation mit dem Patientenalter (siehe Tabelle 3.13 und Abbildung 3.4).

**Tabelle 3.13: Korrelationsanalyse Zonulin und Alter**

	Koeffizient $\rho$	Signifikanz $p$
Alter	-0,24**	<0,001



**Abbildung 3.4:** Zonulinspiegel bei Frauen und Männern

### Zonulin und Nierenfunktionsparameter

Es zeigte sich eine hochsignifikante negative Korrelation mit dem gemessenen Kreatininspiegel ( $\rho = -0,35$ ,  $p_{adj} < 0,001$ ) und entsprechend eine hochsignifikante positive Korrelation mit der berechneten GFR ( $\rho = 0,36$ ,  $p_{adj} < 0,001$ ).

**Tabelle 3.14:** Korrelationsanalyse Zonulin und Nierenparameter

Parameter	Koeffizient $\rho$	Signifikanz $p$ ( $p_{adj}$ )
Kreatinin	-0,35**	<0,001 (<0,001)
GFR	0,36**	<0,001 (<0,001)

### Zonulin und kardiale Parameter

Der aus ggf. vorhandenen Vorbefunden ermittelte Koronarstatus korrelierte signifikant negativ mit Zonulin. Die LVEF zeigte einen Trend zu einer positiven Korrelation, die jedoch nach p-Wert-Adjustierung nicht signifikant war (siehe Tabelle 3.15).

**Tabelle 3.15: Korrelationsanalyse für Zonulin und kardiale Parameter**

Parameter	Koeffizient $\rho$	Signifikanz $p$ ( $p_{adj}$ )
Koronarstatus	-0,21*	0,002 (0,018)
LVEF	0,13	0,05 (0,23)
LVEDD (Frauen)	-0,02	0,09
LVEDD (Männer)	-0,13	0,09

### Zonulin und klinische kardiovaskuläre Risikofaktoren

Die Zonulinspiegel zwischen Nicht-Diabetikern und Typ-2-Diabetikern unterschieden sich nicht ( $p = 0,49$ ). Bezüglich Typ-1-Diabetes konnte keine Analyse durchgeführt werden, da nur ein entsprechender Patient eingeschlossen war. Auch bzgl. des BMI und Raucherstatus zeigte sich kein Zusammenhang.

### Zonulin und Labormarker für kardiovaskuläres Risiko und Entzündung

Bzgl. der erhobenen Labormarker zeigten sich mehrere auffällige Korrelationen. So ergaben sich signifikante oder hochsignifikante negative Korrelationen mit ADMA, CML-Cal und Kynurenin sowie eine hochsignifikante positive Korrelation mit Homoarginin (siehe Tabelle 3.16).

**Tabelle 3.16: Korrelationsanalyse für Zonulin und erhobene Risiko- und Entzündungsmarker**

Marker	Koeffizient $\rho$	Signifikanz $p$ ( $p_{adj}$ )
ADMA	-0,20*	0,003 (0,018)
CML-Cal	-0,23**	<0,001 (0,005)
Carbonylprotein	-0,08	0,243 (0,728)
CRP	-0,03	0,66 (>0,999)
Homoarginin	0,25**	<0,001 (0,003)
Kynurenin	-0,25**	<0,001 (0,002)
Nitrotyrosin	0,01	0,93 (>0,999)

## Überblick signifikanter Korrelationen von Zonulin

Insgesamt zeigten sich acht signifikante Korrelationen zwischen Zonulin und anderen erhobenen Werten (siehe Tabelle 3.17).

Bei vielen dieser Größen ist zu erwarten, dass sie auch untereinander korrelieren, bspw. bei Alter und GFR. Um Scheinkorrelationen auszuschließen, wurde daher im Anschluss eine partielle Korrelationsanalyse durchgeführt. Hierbei wurde Kreatinin von der Analyse ausgeschlossen, da eine Korrelation mit der nach CKD-EPI berechneten GFR zwangsläufig vorhanden ist.

**Tabelle 3.17: Signifikante Korrelationen von Zonulin**

Parameter	Koeffizient $\rho$
Alter	-0,24**
Kreatinin	-0,35**
GFR	0,36**
Koronarstatus	-0,21*
ADMA	-0,20*
CML-Calprotectin	-0,23**
Homoarginin	0,25**
Kynurenin	-0,25**

## Partielle Korrelationsanalyse für Zonulin

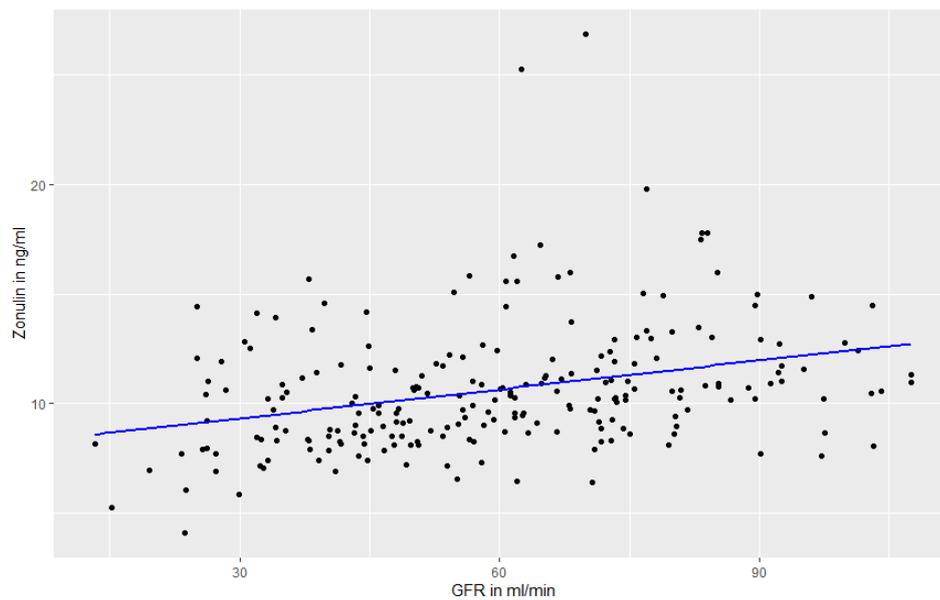
Bei allen signifikant mit Zonulin univariat korrelierenden Größen wurde eine partielle Korrelationsanalyse mit den jeweils anderen Größen als Kontrollvariable durchgeführt. Dabei blieben drei Korrelationen von Zonulin mit allen Kontrollvariablen signifikant: GFR, CML-Cal und Homoarginin. Die übrigen auffälligen Korrelationen (mit Alter, Koronarstatus, ADMA und Kynurenin) waren mit der GFR als Kontrollvariable nicht mehr signifikant, so dass es sich hier wahrscheinlich um Scheinkorrelationen handelt. Die vollständigen Ergebnisse der partiellen Korrelationsanalyse finden sich im Anhang (Tabellen 5.1, 5.2).

### 3.2.2 Regressionsanalysen

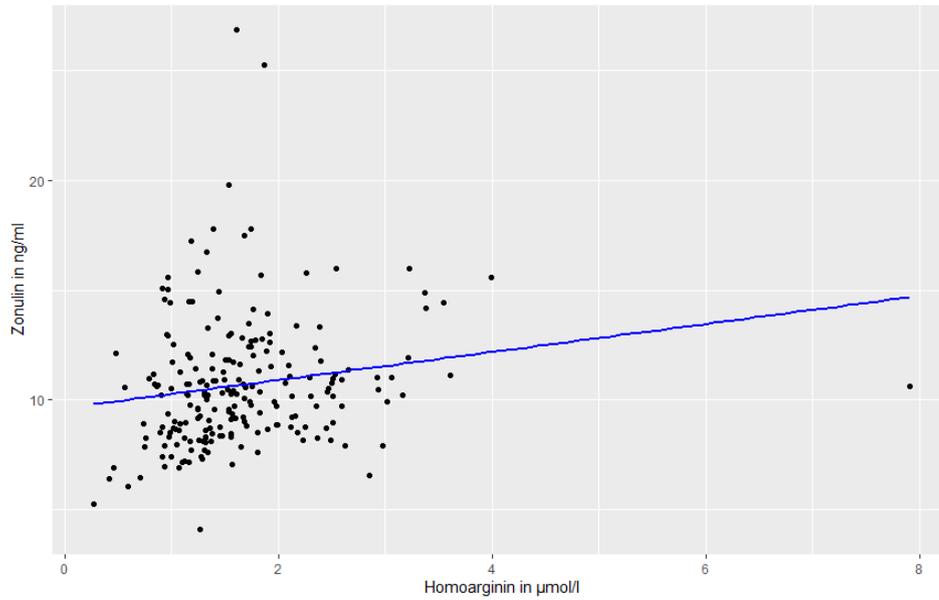
Für die drei genannten signifikant mit Zonulin korrelierenden Parameter wurde weiterführend eine univariate lineare Regressionsanalyse durchgeführt (siehe Tabelle 3.18 und Abbildungen 3.5, 3.6, 3.7).

**Tabelle 3.18: Univariate lineare Regressionsanalysen für Zonulin**

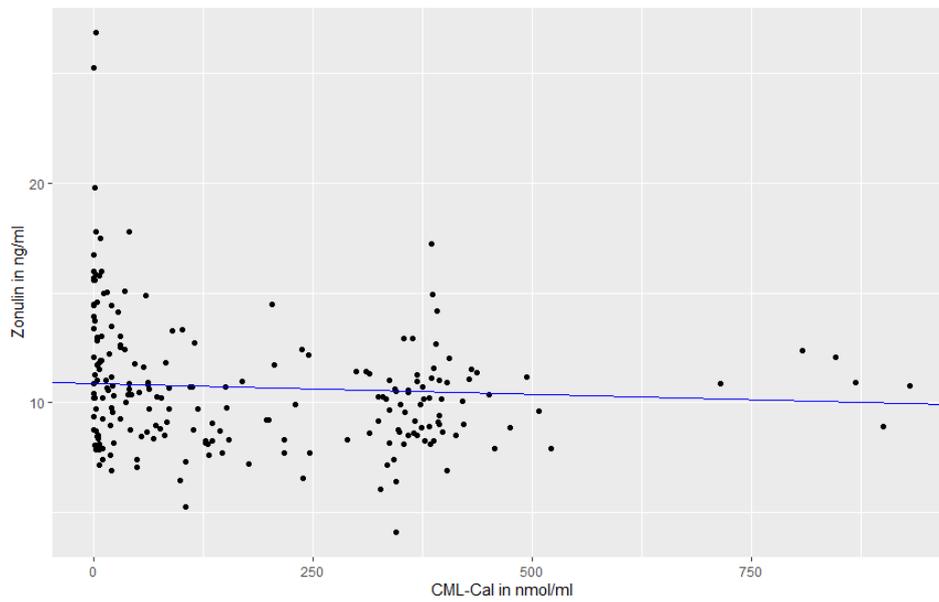
Unabhängige Variable	Regressionskoeffizient	Intercept	$R^2$
GFR	0,044	8,01	0,10
Homoarginin	0,638	9,64	0,02
CML-Cal	-0,001	10,89	0,01



**Abbildung 3.5:** Zonulin in Abhängigkeit von der GFR inkl. Regressionsgerade



**Abbildung 3.6:** Zonulin in Abhängigkeit von Homoarginin inkl. Regressionsgerade



**Abbildung 3.7:** Zonulin in Abhängigkeit von CML-Cal inkl. Regressionsgerade<sup>1</sup>

<sup>1</sup>In der Abbildung wurde der höchste CML-Cal-Wert zur besseren Darstellbarkeit weggelassen, bei der Auswertung jedoch berücksichtigt.

### 3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei allen Patienten wurde ein Zonulinspiegel gemessen (Tabelle 3.8). Zonulin korrelierte positiv mit der glomerulären Filtrationsrate sowie dem Homoargininspiegel und negativ mit dem CML-Calprotectin-Spiegel (siehe Tabellen 3.14 bzw. 3.16). Diese Korrelationen blieben auch in einer partiellen Korrelationsanalyse hochsignifikant, so dass es sich wahrscheinlich um keine Scheinkorrelation handelt (siehe Tabellen 5.1 5.2). Korrelationen mit CRP, Carbonylproteinen oder den erhobenen klinischen kardialen Parametern fanden sich nicht. Da sich im Kollektiv nur ein Patient mit einem Diabetes mellitus Typ 1 befindet, konnte diesbezüglich keine Subgruppenanalyse durchgeführt werden.



# Kapitel 4

## Diskussion

### 4.1 Einleitung in die Diskussion

Zonulin ist der erste entdeckte endogene Regulator von Tight Junctions. Seit der Erstbeschreibung konnten einige Assoziationen mit Erkrankungen des Verdauungssystems gezeigt werden, die Bedeutung bei extraintestinalen Erkrankungen blieb aber weitgehend unklar. Ziel dieser explorativen Studie war es, mögliche Zusammenhänge zwischen Zonulin und Herz- und Nierenerkrankungen zu klären. Dazu führten wir eine Korrelationsanalyse zwischen dem Zonulin-Plasmaspiegel und verschiedenen Parametern für entsprechende Erkrankungen sowie damit assoziierte Zustände (systemische Entzündung, erhöhtes kardiovaskuläres Risiko) in einem kardiovaskulär stark vorbelasteten Patientenkollektiv durch.

### 4.2 Diskussion der Ergebnisse

#### 4.2.1 Überblick

Bei allen Probanden zeigte sich im ELISA eine Zonulin-Immunreaktion. Auffällige Korrelationen von Zonulin bestanden mit der glomerulären Filtrationsrate, mit CML-Calprotectin und mit Homoarginin, nicht aber mit dem CRP-Spiegel, den erhobenen klinischen kardialen Parametern, dem BMI, dem Raucherstatus, den Parametern für erhöhten oxidativen Stress und Diabetes mellitus.

## 4.2.2 Patientenkollektiv

Die deskriptive statistische Auswertung des Patientenkollektivs zeigte eine gemäß der Indikationen für eine AICD-Implantation und der etablierten Risikofaktoren für eine Herzinsuffizienz zu erwartende Verteilung: Die größte Subgruppe bildeten männliche Raucher mit einer ischämischen Kardiomyopathie. Die meisten Probanden hatten einen primärprophylaktisch implantierten AICD (ca. 66%), was sich mit den deutschlandweiten Zahlen deckt (ca. 70%) [Markewitz, 2019]. Man kann von einer repräsentativen Stichprobe deutscher AICD-Träger ausgehen.

## 4.2.3 Ergebnisse der Zonulin-Messung

In unserem Patientenkollektiv betrug der mittlere Zonulinspiegel ca.  $11 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}$ . In allen Proben ließ sich dabei Zonulin nachweisen (Details siehe Tabelle 3.8)

Der Nachweis von Zonulin in allen Proben widerspricht, wie im Folgenden dargelegt wird, der aktuell von vielen Autoren vertretenen Gleichsetzung von Zonulin mit Prähaptoglobin-2 (Prä-HP2).

Prä-HP2 ist ein Polypeptid, aus dem die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette von Haptoglobin abgespalten werden. Beim Menschen gibt es zwei verbreitete Varianten von Haptoglobin, die als Haptoglobin-1 bzw. Haptoglobin-2 bezeichnet werden. Dem entsprechend handelt es sich bei Prä-HP2 um die Vorstufe von Haptoglobin-2. [Langlois u. Delanghe, 1996] Die Identifikation von Zonulin mit Prä-HP2 basiert auf Tripathi u. a. [2009]: Sie zeigten in ihrer Studie, dass ein anti-ZOT-Antikörper, der im Vorfeld von verschiedenen Arbeitsgruppen zur Detektion von Zonulin benutzt worden war, in Blutseren von Zöliakiepatienten an Prä-HP2 bindet. In einem zweiten Schritt konnten sie zudem demonstrieren, dass rekombinantes Prä-HP2 die Permeabilität von Duodenalepithel erhöht, also eine „Zonulinwirkung“ besitzt. Aus diesen Ergebnissen folgerten sie, dass Prä-HP2 und Zonulin das gleiche Protein seien.

Aus epidemiologischen Untersuchungen ist jedoch bekannt, dass ca. 10–20% der europäischen Bevölkerung homozygot für Prähaptoglobin-1 sind und demzufolge gar kein Prähaptoglobin-2 bilden. [Langlois u. Delanghe, 1996] Ausgehend davon dürfte in unserem Kollektiv bei einem relevanten Teil der Proban-

den kein Zonulin nachweisbar sein, tatsächlich zeigte sich aber in allen unseren 229 Proben eine Zonulin-Immunreaktion. Dabei handelt es sich um einen auffälligen Widerspruch zur Gleichsetzung von Zonulin mit Prähaptoglobin-2 ( $p < 0,001$  nach Binomialtest bei angenommener Prävalenz von 5%).

Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass es sich bei „Zonulin“ nicht um ein einzelnes Protein, sondern um eine Familie von Proteinen mit ähnlicher bis gleicher Funktion handelt. Definiert wurde „Zonulin“ als ein Protein, das über den in Abschnitt 1.3.1 beschriebenen Mechanismus die Permeabilität von Tight Junctions erhöht. Schon bei der Erstbeschreibung fiel auf, dass es mindestens zwei Varianten gibt, nämlich fetales und adultes Zonulin. [Wang u. a., 2000] Weitere Anhaltspunkte dafür, dass es mehrere Proteine mit „Zonulinwirkung“ gibt, wurden zwischenzeitlich von Fasano [2020] publiziert. Ihm zufolge gibt es verschiedene „Zonuline“, zu denen beispielsweise Prä-HP2 und Properdin, höchstwahrscheinlich aber noch weitere, bisher nicht genau charakterisierte Proteine gehören, die alle über den selben Mechanismus zu einer erhöhten Permeabilität von TJs führen.

Nach jetzigem Stand kann man vermuten, dass es sich bei „Zonulin“ um eine Gruppe von verwandten Proteinen handelt. Jedenfalls scheint es neben Prä-HP2 noch weitere Proteine mit „Zonulinwirkung“ zu geben. Hierbei ergibt sich das Problem, dass die verschiedenen derzeit verfügbaren Messmethoden für „Zonulin“ teils andere Proteine messen, so dass ein Vergleich der Ergebnisse mitunter nicht möglich ist.

#### **4.2.4 Ergebnisse der Korrelationsanalysen: Zonulin und klinische kardiologische Parameter**

Es zeigten sich keine auffälligen Zusammenhänge zwischen dem Zonulinspiegel und den von uns erhobenen klinischen und echokardiographischen kardialen Parametern. Die Korrelation zwischen dem Grad der KHK und Zonulin bewerten wir als Scheinkorrelation mit der GFR als Störvariable.

In unserem Kollektiv gibt es damit keine Hinweise darauf, dass die in Abschnitt 1.3.2 beschriebene Hypothese eines Zusammenhangs zwischen Zonulin und einer Herzinsuffizienz zutrifft. Daten aus einer anderen Studie mit 115

herzinsuffizienten Patienten zeigten ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen Herzinsuffizienz und Zonulinspiegel, so dass die Hypothese von uns verworfen wird. [Dschietzig u. a., 2016]

#### **4.2.5 Ergebnisse der Korrelationsanalysen: Zonulin und kardiovaskuläre Risikofaktoren**

In der univariaten Korrelationsanalyse zeigten sich eine auffällige positive Korrelation von Homoarginin und eine negative Korrelation von CML-Calprotectin mit Zonulin, die auch in der partiellen Korrelationsanalyse signifikant blieben. Mit den anderen erhobenen Risikofaktoren (BMI, Pack Years, CRP) und den Markern für oxidativen Stress (Carbonylproteine, Nitrotyrosin) korrelierte Zonulin nicht.

Homoarginin gilt als protektiv für kardiovaskuläre Erkrankungen, ein niedriger Homoarginin-Spiegel ist ein etablierter Risikofaktor. [März u. a., 2010] [Pilz u. a., 2011] Dass Zonulin positiv mit Homoarginin korreliert, ist unseres Wissens ein neues Ergebnis und steht im Widerspruch zur ursprünglichen Hypothese, dass Zonulin ein Marker für erhöhtes Risiko sein könnte. Die negative Korrelation von Zonulin mit CML-Calprotectin weist in die gleiche Richtung: CML-Calprotectin entsteht durch Glykierung und gehört damit zu den sog. „Advanced glycation end products“ (AGE), welche als kardiovaskuläre Risikofaktoren gelten. Das heißt, auch bezüglich CML-Calprotectin besteht eine Assoziation von höheren Zonulinspiegeln mit geringerem kardiovaskulärem Risiko.

Unseres Wissens wurden diese Zusammenhänge bisher nicht weiter untersucht. Möglicherweise hat zirkulierendes Zonulin andere bzw. weitere Funktionen als derzeit bekannt. [Dschietzig u. a., 2016; Mann u. a., 2017]

Da sich keine Korrelationen mit dem CRP-Spiegel oder den Parametern für erhöhten oxidativen Stress fanden, gibt es keinen Hinweis, dass Zonulin über diesen Mechanismus an der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt sein könnte.

#### 4.2.6 Ergebnisse der Korrelationsanalysen: Zonulin und Nierenfunktion

Unsere Daten zeigen eine hochsignifikante negative Korrelation zwischen dem Zonulinspiegel und dem Kreatininspiegel bzw. eine hochsignifikante positive Korrelation mit der berechneten GFR. Zwischenzeitlich publizierte Studien anderer Gruppen weisen auf die gleiche Korrelation hin: Hasslacher [2018] zeigte sie in einem Kollektiv von 63 Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus und Lukaszyc u. a. [2018] in einem Vergleich von 88 chronisch niereninsuffizienten Patienten mit 23 nierengesunden.

Der Hintergrund dieses Zusammenhangs ist derzeit unklar, mehrere Erklärungen sind denkbar:

- Ein renaler Verlust von Zonulin durch erhöhte Proteinurie
- Ein kausaler Zusammenhang zwischen Zonulin und Erkrankungen, die die Nierenfunktion verschlechtern
- Eine pathophysiologische Beteiligung von Zonulin bei der Entwicklung einer Niereninsuffizienz
- Eine verringerte renale Zonulin-Synthese bei Niereninsuffizienz
- Eine Kombination aus mehreren der genannten Faktoren

Erhöhte renale Verluste bei Proteinurie wären eine einfache Erklärung für den beobachteten Zusammenhang. Zonulin ist ca. 47 kDa groß und wird daher nicht frei filtriert. Viele Erkrankungen, die zu einer chronischen Niereninsuffizienz führen, gehen jedoch gleichzeitig mit einer pathologischen Proteinurie einher. [Zhong u. a., 2017] Im Falle einer unselektiven Proteinurie ist davon auszugehen, dass auch Zonulin über den Urin verloren geht. Da uns weder Informationen zur Proteinurie unserer Probanden noch Urinproben zur Messung zur Verfügung stehen, können wir diese Hypothese nicht weiter untersuchen. In einer Studie an pädiatrischen Patienten mit nephrotischem Syndrom zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Höhe der Proteinurie und dem Zonulinspiegel, aber eine signifikante Zonulinerhöhung bei den Probanden im Vergleich zu gesunden Kontrollen. [Trachtman u. a., 2019] Diese Ergebnisse sprechen gegen

renale Verluste als alleinige Ursache, sind aber aufgrund des speziellen Patientenkollektivs nicht auf unsere Probanden übertragbar. Weitere Daten hierzu, insbesondere bei erwachsenen Patienten, fanden wir in einer Literaturrecherche nicht. Damit können wir die Hypothese, dass der niedrigere Zonulinspiegel bei eingeschränkter Nierenfunktion primär auf Verlusten über den Urin basiert, aktuell nicht bewerten.

Ein indirekter kausaler Zusammenhang über primär extrarenale Erkrankungen, die aber im Verlauf die Nierenfunktion beeinträchtigen, ist ebenfalls möglich: Auffällige Zonulinspiegel sind insbesondere für Erkrankungen mit Autoimmunprozessen beschrieben (siehe hierzu auch Abschnitt 1.3.2). Viele Autoimmunkrankheiten können im Verlauf die Nieren schädigen, bspw. etliche Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises. [Kapoor u. Bathon, 2018; Davidson, 2016; Bertrand u. a., 2017] Unser Kollektiv beinhaltet jedoch keine relevante Anzahl entsprechender Patienten, so dass diesbezüglich keine Auswertung möglich ist. In der aktuellen Literatur fanden wir ebenfalls keine entsprechenden Daten.

Die Möglichkeit einer direkten Beteiligung von Zonulin bei der Entwicklung von Nierenfunktionseinschränkungen ergibt sich daraus, dass Tight Junctions in der Physiologie und Pathophysiologie der Niere eine große Rolle spielen. Im Tubulus gewährleisten TJs die Barrierefunktion und damit die selektive Rückresorption filtrierter Moleküle. Die Filtrationsbarriere im Glomerulum wird zwar nicht direkt durch TJs, sondern durch das sogenannte „Glomerular Slit Diaphragm“ gebildet, das die Fortsätze der Podozyten miteinander verbindet. Das GSD enthält jedoch Tight-Junction-typische Proteine und weist viele Gemeinsamkeiten mit TJs auf. Im akuten Nierenversagen verlieren tubuläre TJs ihre Barrierefunktion, außerdem sind funktionale Veränderungen von TJs an der Entwicklung einer tubulointerstitiellen Fibrose beteiligt, welche wiederum die gemeinsame Endstrecke zum terminalen Nierenversagen darstellt. [Lee u. a., 2006; Garg, 2018] Ob Zonulin selbst Einfluss auf die Entwicklung einer renalen Funktionsstörung nimmt, wurde unseres Wissens bisher nicht untersucht, erscheint aber aufgrund der beschriebenen Beteiligung von Tight Junctions bei der Entwicklung verschiedener renaler Pathologien denkbar.

Aktuell ist nicht klar, woher genau das im Blutplasma zirkulierende Zonulin stammt. Tight Junctions kommen in allen Epithelien vor und sind neben der Barrierefunktion auch an der Zell- und Gewebedifferenzierung beteiligt. [Lee u. a., 2006] Bei chronischer Niereninsuffizienz entsteht regelhaft eine Nierenfibrose mit Untergang des Tubulusepithels und Reduktion vitaler Nephrone. Dadurch könnte es zu einer reduzierten Zonulinsynthese innerhalb der Nieren und in der Folge auch zu messbar niedrigeren Zonulinspiegeln kommen. Auf Basis unserer Daten können wir jedoch keine Aussage zu einer eventuellen renalen Zonulinproduktion machen.

Grundsätzlich ist auch eine Kombination mehrerer Ursachen denkbar, die sich sowohl verstärken als auch gegenseitig abschwächen könnten. So könnte der Zonulinspiegel einerseits durch eine Proteinurie sinken, andererseits könnte Zonulin aber auch eine protektive Rolle durch Regulation der Tubulusbarriere spielen. Eine Bewertung der verschiedenen Erklärungsansätze ist auf Basis unserer Ergebnisse und anderer Publikationen nach aktuellem Stand nicht möglich.

### 4.3 Limitationen

Die vorliegende Arbeit basiert auf einer primär explorativen Studie. Uns liegen keine weiteren Daten vor, um die auffälligen Zusammenhänge und die daraus generierten Hypothesen überprüfen zu können. Unsere Daten entstammen zudem einem sehr speziellen Kollektiv, daher ist die Übertragbarkeit auf andere Populationen eingeschränkt.

Sämtliche Biomarker konnten nur einmalig gemessen werden, so dass analytische Fehler nicht ausgeschlossen werden können. Bezüglich Zonulin gibt es zudem Hinweise, dass die Serumspiegel starken Schwankungen ausgesetzt sind, so dass Mehrfachmessungen eventuell aussagekräftiger wären. [Vojdani u. a., 2017]

Zur Messung des Serumzonulins gibt es keinen etablierten Standard. Derzeit werden verschiedene ELISA angewandt, die sich jedoch nicht gegen die gleiche Struktur richten und nach neueren Erkenntnissen unterschiedliche Pro-

teine nachweisen. Daraus folgt, dass sich die Messwerte bezüglich Zonulin nur schwer bis gar nicht vergleichen lassen. Des Weiteren ist aktuell nicht klar, welches Protein bzw. welche Proteine als „Zonulin“ bezeichnet werden sollten. In aktuellen Publikationen wird daher teilweise die Bezeichnung „Zonulin Family Peptide“ angewandt. [Pietrukaniec u. a., 2019; Tajik u. a., 2020].

## 4.4 Zusammenfassung

Zonulin korrelierte hochsignifikant positiv mit der glomerulären Filtrationsrate. Die Ursache für diesen Zusammenhang ist derzeit unklar, neben erhöhten renalen Verlusten ist auch eine pathophysiologische Rolle von Zonulin bei Niereninsuffizienz denkbar.

Außerdem fanden wir eine Assoziation von Zonulin mit zwei Faktoren für ein niedriges kardiovaskuläres Risiko: mit einem hohen Homoarginin- und einem niedrigen CML-Calprotectinspiegel. Hier fehlt es aktuell an Erklärungsansätzen, möglicherweise deutet dieses Ergebnis auf bisher unbekannte Funktionen von Zonulin hin.

Wie auch schon von anderen Arbeitsgruppen berichtet, zeigte sich, dass der von uns verwendete ELISA zum Zonulinnachweis nicht Prä-Haptoglobin-2 erkennt. Unsere Daten sprechen daher gegen die Gleichsetzung von Zonulin und Prä-Haptoglobin-2 und reihen sich in neuere Hypothesen ein, dass es sich bei „Zonulin“ um eine Familie verschiedener, funktionell ähnlicher Proteine handelt.

## 4.5 Ausblick

Der hier erstmals aufgefallene Zusammenhang zwischen dem Zonulinspiegel und der GFR bietet möglicherweise einen Ansatzpunkt zur weiteren Aufklärung der Bedeutung von Zonulin und Tight Junctions bei dem hochrelevanten Krankheitsbild der Niereninsuffizienz. Ein sinnvoller nächster Schritt wären Studien, die den verantwortlichen Mechanismus näher untersuchen, bspw. über zusätzliche Zonulinmessungen in Urinproben oder direkt im Nierengewebe.

Die ebenfalls bisher nicht beschriebenen Korrelationen von Zonulin mit Markern für ein niedrigeres kardiovaskuläres Risiko stehen auf den ersten Blick im

Widerspruch zur aktuell üblichen Interpretation von Zonulin als Krankheitsmarker oder gar Pathogenitätsfaktor. Der Einfluss von Zonulin scheint weit über die Regulation der intestinalen Barriere hinauszugehen, das derzeitige Verständnis hierzu ist noch sehr lückenhaft. Die Einschätzung und Reduktion des kardiovaskulären Risikos ist eine anhaltende Herausforderung, so dass auch in diesem Bereich weitere Untersuchungen lohnenswert erscheinen.

Ein weiterer wichtiger Schritt ist eine genauere biochemische und genetische Charakterisierung von Zonulin bzw. von „Zonulin Family Peptides“, um perspektivisch einen Goldstandard zur Messung zu etablieren und eine bessere Vergleichbarkeit verschiedener Studien zu ermöglichen.

Zur Verifizierung aller Ergebnisse wäre eine Untersuchung in einem größeren, repräsentativen Kollektiv sinnvoll.



# Kapitel 5

## Anhang

**Tabelle 5.1: Partielle Korrelationsanalyse für Zonulin, Teil 1 von 2**

Variable	Kontrollvariable	Korrelationskoeffizient	Signifikanz
Alter	KHK	-0.17	0.023
	EF	-0.22	0.003
	GFR	-0.02	0.819
	Calprotectin	-0.26	0.001
	Homoarginin	-0.22	0.004
	Kynurenin	-0.18	0.021
	ADMA	-0.22	0.005
KHK	Alter	-0.13	0.096
	EF	-0.17	0.024
	GFR	-0.05	0.532
	Calprotectin	-0.18	0.018
	Homoarginin	-0.22	0.004
	Kynurenin	-0.15	0.052
	ADMA	-0.17	0.024
EF	Alter	0.11	0.142
	KHK	0.07	0.333
	GFR	0.01	0.897
	Calprotectin	0.14	0.073
	Homoarginin	0.11	0.157
	Kynurenin	0.05	0.526
	ADMA	0.11	0.140

**Tabelle 5.2: Partielle Korrelationsanalyse für Zonulin, Teil 2 von 2**

Variable	Kontrollvariable	Korrelationskoeffizient	Signifikanz
GFR	Alter	0.32	<0,001
	KHK	0.34	<0,001
	EF	0.37	<0,001
	Calprotectin	0.43	<0,001
	Homoarginin	0.37	<0,001
	Kynurenin	0.32	<0,001
	ADMA	0.36	<0,001
Calprotectin	Alter	-0.31	<0,001
	KHK	-0.28	<0,001
	EF	-0.30	<0,001
	GFR	-0.36	<0,001
	Homoarginin	-0.31	<0,001
	Kynurenin	-0.35	<0,001
	ADMA	-0.31	<0,001
Homoarginin	Alter	0.26	<0.001
	KHK	0.28	<0,001
	EF	0.26	<0.001
	GFR	0.24	<0.001
	Calprotectin	0.29	<0,001
	Kynurenin	0.26	<0.001
	ADMA	0.26	<0.001
Kynurenin	Alter	-0.18	0.018
	KHK	-0.19	0.012
	EF	-0.20	0.008
	GFR	-0.02	0.76
	Calprotectin	-0.31	<0,001
	Homoarginin	-0.22	0.005
	ADMA	-0.20	0.008
ADMAHLC	Alter	-0.16	0,043
	KHK	-0.15	0.059
	EF	-0.17	0.029
	GFR	-0.10	0.190
	Calprotectin	-0.20	0.008
	Homoarginin	-0.16	0.036
	Kynurenin	-0.13	0.092



# Literaturverzeichnis

- [Aasbrenn u. a. 2020] AASBRENN, Martin ; LYDERSEN, Stian ; FARUP, Per G.: Changes in serum zonulin in individuals with morbid obesity after weight-loss interventions: a prospective cohort study. In: *BMC endocrine disorders* 20 (2020), Juli, S. 108. <http://dx.doi.org/10.1186/s12902-020-00594-5>. – DOI 10.1186/s12902-020-00594-5. – ISSN 1472-6823
- [Addi u. a. 2018] ADDI, Tawfik ; DOU, Laetitia ; BURTEY, Stéphane: Tryptophan-Derived Uremic Toxins and Thrombosis in Chronic Kidney Disease. In: *Toxins* 10 (2018), Oktober. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins10100412>. – DOI 10.3390/toxins10100412. – ISSN 2072-6651
- [Alberts u. a. 2002] ALBERTS, Bruce ; JOHNSON, Alexander ; LEWIS, Julian ; RAFF, Martin ; ROBERTS, Keith ; WALTER, Peter: *Molecular Biology of the Cell, Fourth Edition*. Garland Science, 2002. – ISBN 0815332181
- [Amboss 2020] AMBOSS: *Die Zelle*. <https://next.amboss.com/de/>, 2020
- [Azzazy u. Christenson 2003] AZZAZY, Hassan M E. ; CHRISTENSON, Robert H.: B-type natriuretic peptide: physiologic role and assay characteristics. In: *Heart failure reviews* 8 (2003), Oktober, S. 315–320. – ISSN 1382-4147
- [Baudry u. a. 1992] BAUDRY, B. ; FASANO, A. ; KETLEY, J. ; KAPER, J. B.: Cloning of a gene (zot) encoding a new toxin produced by *Vibrio cholerae*. In: *Infection and immunity* 60 (1992), Februar, S. 428–434. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.60.2.428-434.1992>. – DOI 10.1128/IAI.60.2.428-434.1992. – ISSN 0019-9567
- [Bertrand u. a. 2017] BERTRAND, Dominique ; DEHAY, Julien ; OTT, Julien ; SBERRO, Rebecca ; BRUNELLE, Charlotte ; KAMAR, Nassim ; COLOSIO, Charlotte ; CHATELET, Valérie ; ALBANO, Laetitia ; GIRERD, Sophie ; AUDARD, Vincent ; BARBET, Christelle ; DANTAL, Jacques ; DUCLOUX, Didier ; DURRBACH, Antoine ; GARRIGUE, Valérie ; HAZZAN, Marc ; HENG, Anne-Elisabeth ; MARIAT,

- Christophe ; MERVILLE, Pierre ; REROLLE, Jean-Philippe ; MOULIN, Bruno ; GUERROT, Dominique: Kidney transplantation in patients with systemic sclerosis: a nationwide multicentre study. In: *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 30 (2017), März, S. 256–265. <http://dx.doi.org/10.1111/tri.12923>. – DOI 10.1111/tri.12923. – ISSN 1432–2277
- [Boland u. Long 2021] BOLAND, Julia ; LONG, Carlin: Update on the Inflammatory Hypothesis of Coronary Artery Disease. In: *Current cardiology reports* 23 (2021), Januar, S. 6. <http://dx.doi.org/10.1007/s11886-020-01439-2>. – DOI 10.1007/s11886-020-01439-2. – ISSN 1534–3170
- [Cainzos-Achirica u. a. 2020] CAINZOS-ACHIRICA, Miguel ; GLASSNER, Kerri ; ZAWAHIR, Hassan S. ; DEY, Amit K. ; AGRAWAL, Tanushree ; QUIGLEY, Eamonn M. M. ; ABRAHAM, Bincy P. ; ACQUAH, Isaac ; YAHYA, Tamer ; MEHTA, Nehal N. ; NASIR, Khurram: Inflammatory Bowel Disease and Atherosclerotic Cardiovascular Disease: JACC Review Topic of the Week. In: *Journal of the American College of Cardiology* 76 (2020), Dezember, S. 2895–2905. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2020.10.027>. – DOI 10.1016/j.jacc.2020.10.027. – ISSN 1558–3597
- [Camara-Lemarroy u. a. 2020] CAMARA-LEMARROY, Carlos R. ; SILVA, Claudia ; GREENFIELD, Jamie ; LIU, Wei-Qiao ; METZ, Luanne M. ; YONG, V. W.: Biomarkers of intestinal barrier function in multiple sclerosis are associated with disease activity. In: *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 26 (2020), Oktober, S. 1340–1350. <http://dx.doi.org/10.1177/1352458519863133>. – DOI 10.1177/1352458519863133. – ISSN 1477–0970
- [Campolo u. a. 2020] CAMPOLO, Nicolás ; ISSOGLIO, Federico M. ; ESTRIN, Darío A. ; BARTESAGHI, Silvina ; RADI, Rafael: 3-Nitrotyrosine and related derivatives in proteins: precursors, radical intermediates and impact in function. In: *Essays in biochemistry* 64 (2020), Februar, S. 111–133. <http://dx.doi.org/10.1042/EBC20190052>. – DOI 10.1042/EBC20190052. – ISSN 1744–1358
- [Claverie-Martin 2015] CLAVERIE-MARTIN, Felix: Familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: clinical and molecular characteristics. In: *Clinical kidney journal* 8 (2015), Dezember, S. 656–664. <http://dx.doi.org/10.1093/ckj/sfv081>. – DOI 10.1093/ckj/sfv081. – ISSN 2048–8505

- [Cooke 2004] COOKE, John P.: Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? In: *Circulation* 109 (2004), April, S. 1813–1818. <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.0000126823.07732.D5>. – DOI 10.1161/01.CIR.0000126823.07732.D5. – ISSN 1524–4539
- [Crowther 2000] CROWTHER, J. R.: *The ELISA guidebook*. Totowa, NJ : Humana Press, 2000. – ISBN 9781592590490
- [Dalle-Donne u. a. 2003] DALLE-DONNE, Isabella ; ROSSI, Ranieri ; GIUSTARINI, Daniela ; MILZANI, Aldo ; COLOMBO, Roberto: Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 329 (2003), März, S. 23–38. [http://dx.doi.org/10.1016/s0009-8981\(03\)00003-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0009-8981(03)00003-2). – DOI 10.1016/s0009–8981(03)00003–2. – ISSN 0009–8981
- [Davidson 2016] DAVIDSON, Anne: What is damaging the kidney in lupus nephritis? In: *Nature reviews. Rheumatology* 12 (2016), März, S. 143–153. <http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2015.159>. – DOI 10.1038/nrrheum.2015.159. – ISSN 1759–4804
- [De Pasquale u. a. 2003] DE PASQUALE, Carmine G. ; BERSTEN, Andrew D. ; DOYLE, Ian R. ; AYLWARD, Phillip E. ; ARNOLDA, Leonard F.: Infarct-induced chronic heart failure increases bidirectional protein movement across the alveolocapillary barrier. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 284 (2003), Juni, S. H2136–H2145. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00875.2002>. – DOI 10.1152/ajpheart.00875.2002. – ISSN 0363–6135
- [Delgado-Andrade 2016] DELGADO-ANDRADE, Cristina: Carboxymethyl-lysine: thirty years of investigation in the field of AGE formation. In: *Food and function* 7 (2016), Januar, S. 46–57. <http://dx.doi.org/10.1039/c5fo00918a>. – DOI 10.1039/c5fo00918a. – ISSN 2042–650X
- [Dietel u. a. 2005] DIETEL, Manfred (Hrsg.) ; SUTTORP, Norbert (Hrsg.) ; ZEITZ, Martin (Hrsg.): *Harrisons Innere Medizin*. ABW Wissenschaftsverlag G, 2005. – ISBN 3936072299
- [Drenth u. a. 2016] DRENTH, Hans ; ZUIDEMA, Sytse ; BUNT, Steven ; BAUTMANS, Ivan ; SCHANS, Cees van d. ; HOBBELEN, Hans: The Contribution of Advanced Glycation End product (AGE) accumulation to the decline in motor function. In: *European review of aging and physical activity : official journal of the European*

- Group for Research into Elderly and Physical Activity* 13 (2016), S. 3. <http://dx.doi.org/10.1186/s11556-016-0163-1>. – DOI 10.1186/s11556-016-0163-1. – ISSN 1813-7253
- [Dschietzig u. a. 2016] DSCHIETZIG, Thomas B. ; BOSCHANN, Felix ; RUPPERT, Jana ; ARMBRUSTER, Franz P. ; MEINITZER, Andreas ; BANKOVIC, Dragic ; MITROVIC, Veselin ; MELZER, Christoph: Plasma Zonulin and its Association with Kidney Function, Severity of Heart Failure, and Metabolic Inflammation. In: *Clinical laboratory* 62 (2016), Dezember, S. 2443-2447. <http://dx.doi.org/10.7754/Clin.Lab.2016.160512>. – DOI 10.7754/Clin.Lab.2016.160512. – ISSN 1433-6510
- [Eckardt u. a. 2013] ECKARDT, Kai-Uwe ; CORESH, Josef ; DEVUYST, Olivier ; JOHNSON, Richard J. ; KÖTTGEN, Anna ; LEVEY, Andrew S. ; LEVIN, Adeera: Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden. In: *The Lancet* 382 (2013), jul, Nr. 9887, S. 158-169. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(13\)60439-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(13)60439-0). – DOI 10.1016/s0140-6736(13)60439-0
- [Eknoyan u. a. 2013] EKNOYAN, Garabed ; LAMEIRE, Norbert ; ECKARDT, Kai-Uwe: *KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease*. 2013
- [El Asmar u. a. 2002] EL ASMAR, Ramzi ; PANIGRAHI, Pinaki ; BAMFORD, Penelope ; BERTI, Irene ; NOT, Tarcisio ; COPPA, Giovanni V. ; CATASSI, Carlo ; FASANO, Alessio ; EL ASMAR, Rahzi: Host-dependent zonulin secretion causes the impairment of the small intestine barrier function after bacterial exposure. In: *Gastroenterology* 123 (2002), November, S. 1607-1615. <http://dx.doi.org/10.1053/gast.2002.36578>. – DOI 10.1053/gast.2002.36578. – ISSN 0016-5085
- [Elia u. a. 2021] ELIA, Edoardo ; MINISTRINI, Stefano ; CARBONE, Federico ; MONTECUCCO, Fabrizio: Diabetic cardiomyopathy and inflammation: development of hostile microenvironment resulting in cardiac damage. In: *Minerva cardiologica* (2021), Januar. <http://dx.doi.org/10.23736/S0026-4725.20.05454-7>. – DOI 10.23736/S0026-4725.20.05454-7. – ISSN 1827-1618
- [Elkind u. a. 2006] ELKIND, Mitchell S. V. ; TAI, Wanling ; COATES, Kristen ; PAIK, Myunghee C. ; SACCO, Ralph L.: High-sensitivity C-reactive protein, lipoprotein-associated phospholipase A2, and outcome after ischemic stroke. In: *Archives of internal medicine* 166 (2006), Oktober, S. 2073-2080. <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.166.19.2073>. – DOI 10.1001/archinte.166.19.2073. – ISSN 0003-9926

- [Engvall u. Perlmann 1971] ENGVALL, E. ; PERLMANN, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. In: *Immunochemistry* 8 (1971), September, S. 871–874. [http://dx.doi.org/10.1016/0019-2791\(71\)90454-x](http://dx.doi.org/10.1016/0019-2791(71)90454-x). – DOI 10.1016/0019-2791(71)90454-x. – ISSN 0019-2791
- [Farquhar u. Palade 1963] FARQUHAR, M. G. ; PALADE, G. E.: Junctional complexes in various epithelia. In: *J Cell Biol* 17 (1963), May, S. 375–412
- [Fasano 2000] FASANO, A.: Regulation of intercellular tight junctions by zonula occludens toxin and its eukaryotic analogue zonulin. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 915 (2000), S. 214–222. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05244.x>. – DOI 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05244.x. – ISSN 0077-8923
- [Fasano 2001] FASANO, A.: Intestinal zonulin: open sesame! In: *Gut* 49 (2001), Aug, Nr. 2, S. 159–162
- [Fasano u. a. 1991] FASANO, A. ; BAUDRY, B. ; PUMPLIN, D. W. ; WASSERMAN, S. S. ; TALL, B. D. ; KETLEY, J. M. ; KAPER, J. B.: *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (1991), Juni, S. 5242–5246. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.88.12.5242>. – DOI 10.1073/pnas.88.12.5242. – ISSN 0027-8424
- [Fasano u. a. 1995] FASANO, A. ; FIORENTINI, C. ; DONELLI, G. ; UZZAU, S. ; KAPER, J. B. ; MARGARETTEN, K. ; DING, X. ; GUANDALINI, S. ; COMSTOCK, L. ; GOLDBLUM, S. E.: Zonula occludens toxin modulates tight junctions through protein kinase C-dependent actin reorganization, in vitro. In: *The Journal of clinical investigation* 96 (1995), August, S. 710–720. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI118114>. – DOI 10.1172/JCI118114. – ISSN 0021-9738
- [Fasano u. a. 2000] FASANO, A. ; NOT, T. ; WANG, W. ; UZZAU, S. ; BERTI, I. ; TOMMASINI, A. ; GOLDBLUM, S. E.: Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. In: *Lancet* 355 (2000), Apr, Nr. 9214, 1518–1519. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02169-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02169-3). – DOI 10.1016/S0140-6736(00)02169-3
- [Fasano u. a. 1997] FASANO, A. ; UZZAU, S. ; FIORE, C. ; MARGARETTEN, K.: The

enterotoxic effect of zonula occludens toxin on rabbit small intestine involves the paracellular pathway. In: *Gastroenterology* 112 (1997), Mar, Nr. 3, S. 839–846

[Fasano 2008] FASANO, Alessio: Physiological, pathological, and therapeutic implications of zonulin-mediated intestinal barrier modulation: living life on the edge of the wall. In: *The American journal of pathology* 173 (2008), November, S. 1243–1252. <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2008.080192>. – DOI 10.2353/ajpath.2008.080192. – ISSN 1525–2191

[Fasano 2011] FASANO, Alessio: Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. In: *Physiol Rev* 91 (2011), Jan, Nr. 1, 151–175. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00003.2008>. – DOI 10.1152/physrev.00003.2008

[Fasano 2012a] FASANO, Alessio: Intestinal permeability and its regulation by zonulin: diagnostic and therapeutic implications. In: *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 10 (2012), Oktober, S. 1096–1100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2012.08.012>. – DOI 10.1016/j.cgh.2012.08.012. – ISSN 1542–7714

[Fasano 2012b] FASANO, Alessio: Zonulin, regulation of tight junctions, and autoimmune diseases. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1258 (2012), Juli, S. 25–33. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06538.x>. – DOI 10.1111/j.1749-6632.2012.06538.x. – ISSN 1749–6632

[Fasano 2020] FASANO, Alessio: All disease begins in the (leaky) gut: role of zonulin-mediated gut permeability in the pathogenesis of some chronic inflammatory diseases. In: *F1000Research* 9 (2020). <http://dx.doi.org/10.12688/f1000research.20510.1>. – DOI 10.12688/f1000research.20510.1. – ISSN 2046–1402

[Frömter u. Diamond 1972] FRÖMTER, E. ; DIAMOND, J.: Route of passive ion permeation in epithelia. In: *Nat New Biol* 235 (1972), Jan, Nr. 53, S. 9–13

[Garg 2018] GARG, Puneet: A Review of Podocyte Biology. In: *American journal of nephrology* 47 Suppl 1 (2018), S. 3–13. <http://dx.doi.org/10.1159/000481633>. – DOI 10.1159/000481633. – ISSN 1421–9670

[Girndt u. a. 2016] GIRNDT, Matthias ; TROCCHI, Pietro ; SCHEIDT-NAVE, Christa ; MARKAU, Silke ; STANG, Andreas: The Prevalence of Renal Failure. Results

- from the German Health Interview and Examination Survey for Adults, 2008-2011 (DEGS1). In: *Deutsches Arzteblatt international* 113 (2016), Februar, S. 85–91. <http://dx.doi.org/10.3238/arztebl.2016.0085>. – DOI 10.3238/arztebl.2016.0085. – ISSN 1866–0452
- [Go u. a. 2004] GO, Alan S. ; CHERTOW, Glenn M. ; FAN, Dongjie ; McCULLOCH, Charles E. ; HSU, Chi-yuan: Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. In: *The New England journal of medicine* 351 (2004), September, S. 1296–1305. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa041031>. – DOI 10.1056/NEJMoa041031. – ISSN 1533–4406
- [Günzel u. Yu 2013] GÜNZEL, Dorothee ; YU, Alan S. L.: Claudins and the modulation of tight junction permeability. In: *Physiol Rev* 93 (2013), Apr, Nr. 2, 525–569. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00019.2012>. – DOI 10.1152/physrev.00019.2012
- [Hak u. a. 1999] HAK, A. E. ; STEHOUWER, C. D. ; BOTS, M. L. ; POLDERMAN, K. H. ; SCHALKWIJK, C. G. ; WESTENDORP, I. C. ; HOFMAN, A. ; WITTEMAN, J. C.: Associations of C-reactive protein with measures of obesity, insulin resistance, and subclinical atherosclerosis in healthy, middle-aged women. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19 (1999), August, S. 1986–1991. <http://dx.doi.org/10.1161/01.atv.19.8.1986>. – DOI 10.1161/01.atv.19.8.1986. – ISSN 1079–5642
- [Hansson 2005] HANSSON, Göran K.: Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. In: *The New England journal of medicine* 352 (2005), April, S. 1685–1695. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra043430>. – DOI 10.1056/NEJMra043430. – ISSN 1533–4406
- [Harris u. a. 2012] HARRIS, Jason B. ; LAROCQUE, Regina C. ; QADRI, Firdausi ; RYAN, Edward T. ; CALDERWOOD, Stephen B.: Cholera. In: *Lancet (London, England)* 379 (2012), Juni, S. 2466–2476. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60436-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60436-X). – DOI 10.1016/S0140-6736(12)60436-X. – ISSN 1474–547X
- [Hasslacher 2018] HASSLACHER, Christoph: Serum zonulin as parameter of intestinal permeability in longstanding type 2 diabetes: correlations with metabolism parameter and renal function. In: *Journal of Diabetes, Metabolic Disorders & Control* 5 (2018), apr, Nr. 2, S. 58–62. <http://dx.doi.org/10.15406/jdmdc.2018.05.00138>. – DOI 10.15406/jdmdc.2018.05.00138

- [Hollander 1999] HOLLANDER, D.: Intestinal permeability, leaky gut, and intestinal disorders. In: *Curr Gastroenterol Rep* 1 (1999), Oct, Nr. 5, S. 410–416
- [Holm 1979] HOLM, Sture: A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure. In: *Scandinavian Journal of Statistics* 6 (1979), Nr. 2, 65–70. <http://www.jstor.org/stable/4615733>. – ISSN 03036898, 14679469
- [Hou 2014] HOU, Jianghui: The kidney tight junction (Review). In: *Int J Mol Med* 34 (2014), Dec, Nr. 6, 1451–1457. <http://dx.doi.org/10.3892/ijmm.2014.1955>. – DOI 10.3892/ijmm.2014.1955
- [Immundiagnostik 2020] <http://www.immundiagnostik.com/>
- [Jaisson u. a. 2011] JAISSE, Stéphane ; PIETREMENT, Christine ; GILLERY, Philippe: Carbamylation-derived products: bioactive compounds and potential biomarkers in chronic renal failure and atherosclerosis. In: *Clinical chemistry* 57 (2011), November, S. 1499–1505. <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2011.163188>. – DOI 10.1373/clinchem.2011.163188. – ISSN 1530–8561
- [Janjigian u. a. 2010] JANJIGIAN, Yelena Y. ; MCDONNELL, Kevin ; KRIS, Mark G. ; SHEN, Ronglai ; SIMA, Camelia S. ; BACH, Peter B. ; RIZVI, Naiyer A. ; RIELY, Gregory J.: Pack-years of cigarette smoking as a prognostic factor in patients with stage IIIB/IV nonsmall cell lung cancer. In: *Cancer* 116 (2010), feb, Nr. 3, S. 670–675. <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.24813>. – DOI 10.1002/cncr.24813
- [Jayashree u. a. 2014] JAYASHREE, B. ; BIBIN, Y. S. ; PRABHU, D. ; SHANTHIRANI, C. S. ; GOKULAKRISHNAN, K. ; LAKSHMI, B. S. ; MOHAN, V. ; BALASUBRAMANYAM, M.: Increased circulatory levels of lipopolysaccharide (LPS) and zonulin signify novel biomarkers of proinflammation in patients with type 2 diabetes. In: *Molecular and cellular biochemistry* 388 (2014), März, S. 203–210. <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-013-1911-4>. – DOI 10.1007/s11010-013-1911-4. – ISSN 1573–4919
- [Kamo u. a. 2017] KAMO, Takehiro ; AKAZAWA, Hiroshi ; SUZUKI, Jun-Ichi ; KOMURO, Issei: Novel Concept of a Heart-Gut Axis in the Pathophysiology of Heart Failure. In: *Korean circulation journal* 47 (2017), September, S. 663–669. <http://dx.doi.org/10.4070/kcj.2017.0028>. – DOI 10.4070/kcj.2017.0028. – ISSN 1738–5520

- [Kapoor u. Bathon 2018] KAPOOR, Teja ; BATHON, Joan: Renal Manifestations of Rheumatoid Arthritis. In: *Rheumatic diseases clinics of North America* 44 (2018), November, S. 571–584. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rdc.2018.06.008>. – DOI 10.1016/j.rdc.2018.06.008. – ISSN 1558–3163
- [Karasawa u. a. 1993] KARASAWA, T. ; MIHARA, T. ; KURAZONO, H. ; NAIR, G. B. ; GARG, S. ; RAMAMURTHY, T. ; TAKEDA, Y.: Distribution of the zot (zonula occludens toxin) gene among strains of *Vibrio cholerae* 01 and non-01. In: *FEMS microbiology letters* 106 (1993), Januar, S. 143–145. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb05950.x>. – DOI 10.1111/j.1574-6968.1993.tb05950.x. – ISSN 0378–1097
- [Karetnikova u. a. 2019] KARETNIKOVA, Ekaterina S. ; JARZEBSKA, Natalia ; MARKOV, Alexander G. ; WEISS, Norbert ; LENTZ, Steven R. ; RODIONOV, Roman N.: Is Homoarginine a Protective Cardiovascular Risk Factor? In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 39 (2019), Mai, S. 869–875. <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.312218>. – DOI 10.1161/ATVBAHA.118.312218. – ISSN 1524–4636
- [Klaus u. a. 2013] KLAUS, Daniel A. ; MOTAL, Michael C. ; BURGER-KLEPP, Ursula ; MARSCHALEK, Corinna ; SCHMIDT, Elisabeth M. ; LEBHERZ-EICHINGER, Diana ; KRENN, Claus G. ; ROTH, Georg A.: Increased plasma zonulin in patients with sepsis. In: *Biochemia medica* 23 (2013), S. 107–111. – ISSN 1330–0962
- [Lang u. a. 2015] LANG, Roberto M. ; BADANO, Luigi P. ; MOR-AVI, Victor ; AFLALO, Jonathan ; ARMSTRONG, Anderson ; ERNANDE, Laura ; FLACHSKAMPF, Frank A. ; FOSTER, Elyse ; GOLDSTEIN, Steven A. ; KUZNETSOVA, Tatiana ; LANCELLOTTI, Patrizio ; MURARU, Denisa ; PICARD, Michael H. ; RIETZSCHEL, Ernst R. ; RUDSKI, Lawrence ; SPENCER, Kirk T. ; TSANG, Wendy ; VOIGT, Jens-Uwe: Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. In: *Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography* 28 (2015), Januar, S. 1–39.e14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.echo.2014.10.003>. – DOI 10.1016/j.echo.2014.10.003. – ISSN 1097–6795
- [Langlois u. Delanghe 1996] LANGLOIS, M R. ; DELANGHE, J R.: Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. In: *Clinical chemistry* 42 (1996), Oktober, S. 1589–1600. – ISSN 0009–9147

- [Lee u. a. 2006] LEE, David B. N. ; HUANG, Edmund ; WARD, Harry J.: Tight junction biology and kidney dysfunction. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 290 (2006), Januar, S. F20–F34. <http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00052.2005>. – DOI 10.1152/ajprenal.00052.2005. – ISSN 1931–857X
- [Levey u. a. 2009] LEVEY, Andrew S. ; STEVENS, Lesley A. ; SCHMID, Christopher H. ; ZHANG, Yaping L. ; CASTRO, Alejandro F. ; FELDMAN, Harold I. ; KUSEK, John W. ; EGGERS, Paul ; VAN LENTE, Frederick ; GREENE, Tom ; CORESH, Josef ; COLLABORATION), CKD-EPI: A new equation to estimate glomerular filtration rate. In: *Annals of internal medicine* 150 (2009), Mai, S. 604–612. <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-150-9-200905050-00006>. – DOI 10.7326/0003-4819-150-9-200905050-00006. – ISSN 1539–3704
- [Levine u. a. 1988] LEVINE, M. M. ; KAPER, J. B. ; HERRINGTON, D. ; LOSONSKY, G. ; MORRIS, J. G. ; CLEMENTS, M. L. ; BLACK, R. E. ; TALL, B. ; HALL, R.: Volunteer studies of deletion mutants of *Vibrio cholerae* O1 prepared by recombinant techniques. In: *Infection and immunity* 56 (1988), Januar, S. 161–167. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.56.1.161-167.1988>. – DOI 10.1128/IAI.56.1.161–167.1988. – ISSN 0019–9567
- [Limbach-Gruppe 2020] <https://www.labor-limbach.de/>
- [Liu u. a. 2019] LIU, Yina ; MU, Shengtian ; LI, Xu ; LIANG, Yingjian ; WANG, Liang ; MA, Xiaochun: Unfractionated Heparin Alleviates Sepsis-Induced Acute Lung Injury by Protecting Tight Junctions. In: *The Journal of surgical research* 238 (2019), Juni, S. 175–185. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2019.01.020>. – DOI 10.1016/j.jss.2019.01.020. – ISSN 1095–8673
- [Lukaszyk u. a. 2018] LUKASZYK, Ewelina ; LUKASZYK, Mateusz ; KOC-ZORAWSKA, Ewa ; BODZENTA-LUKASZYK, Anna ; MALYSZKO, Jolanta: Zonulin, inflammation and iron status in patients with early stages of chronic kidney disease. In: *International urology and nephrology* 50 (2018), Januar, S. 121–125. <http://dx.doi.org/10.1007/s11255-017-1741-5>. – DOI 10.1007/s11255–017–1741–5. – ISSN 1573–2584
- [Luyckx u. a. 2018] LUYCKX, Valerie A. ; TONELLI, Marcello ; STANIFER, John W.: The global burden of kidney disease and the sustainable development goals. In: *Bulletin of the World Health Organization* 96 (2018), apr, Nr. 6, S. 414–422D. <http://dx.doi.org/10.2471/blt.17.206441>. – DOI 10.2471/blt.17.206441

- [Ma 1997] MA, T Y.: Intestinal epithelial barrier dysfunction in Crohn's disease. In: *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 214 (1997), April, S. 318–327. – ISSN 0037–9727
- [Mallipattu u. Uribarri 2014] MALLIPATTU, Sandeep K. ; URIBARRI, Jaime: Advanced glycation end product accumulation: a new enemy to target in chronic kidney disease? In: *Current opinion in nephrology and hypertension* 23 (2014), November, S. 547–554. <http://dx.doi.org/10.1097/MNH.0000000000000062>. – DOI 10.1097/MNH.0000000000000062. – ISSN 1473–6543
- [Mann u. a. 2017] MANN, Elli ; KLUESENER, Robert ; BOSCHANN, Felix ; RUPPERT, Jana ; ARMBRUSTER, Franz P. ; MEINITZER, Andreas ; MELZER, Christoph ; DSCHIETZIG, Thomas B.: Homoarginine Associates with Zonulin and Tryptophan - Findings in a High-Risk Cohort of Patients Carrying an AICD. In: *Clinical laboratory* 63 (2017), November, S. 1911–1918. <http://dx.doi.org/10.7754/Clin.Lab.2017.170725>. – DOI 10.7754/Clin.Lab.2017.170725. – ISSN 1433–6510
- [Markewitz 2019] MARKEWITZ, A: [Annual Report 2016 of the German Pacemaker and Defibrillator-Register. Part 2: Implantable cardioverter defibrillators (ICD) : Workin Group on Pacemaker and Defibrillators at the at the IQTIG-Institute for quality assurance and transparency in healthcare]. In: *Herzschrittmachertherapie & Elektrophysiologie* 30 (2019), März, S. 117–135. <http://dx.doi.org/10.1007/s00399-018-0604-9>. – DOI 10.1007/s00399-018-0604-9. – ISSN 1435–1544
- [McCullough u. a. 2003] MCCULLOUGH, Peter A. ; OMLAND, Torbjørn ; MAISEL, Alan S.: B-type natriuretic peptides: a diagnostic breakthrough for clinicians. In: *Reviews in cardiovascular medicine* 4 (2003), S. 72–80. – ISSN 1530–6550
- [Meinertz u. a. 2015] MEINERTZ, Thomas ; TRAPPE, Hans-Joachim ; ANDERS, Gunter ; ANDRESEN, Dietrich: *Deutscher Herzbericht 2015*. Deutsche Herzstiftung e.V., 2015. – ISBN 978–3–9811926–6–7
- [Michalski u. a. 1993] MICHALSKI, J. ; GALEN, J. E. ; FASANO, A. ; KAPER, J. B.: CVD110, an attenuated *Vibrio cholerae* O1 El Tor live oral vaccine strain. In: *Infection and immunity* 61 (1993), Oktober, S. 4462–4468. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.61.10.4462-4468.1993>. – DOI 10.1128/IAI.61.10.4462–4468.1993. – ISSN 0019–9567

- [Monnier u. a. 2014] MONNIER, Vincent M. ; SUN, Wanjie ; SELL, David R. ; FAN, Xingjun ; NEMET, Ina ; GENUTH, Saul: Glucosepane: a poorly understood advanced glycation end product of growing importance for diabetes and its complications. In: *Clinical chemistry and laboratory medicine* 52 (2014), Januar, S. 21–32. <http://dx.doi.org/10.1515/cclm-2013-0174>. – DOI 10.1515/cclm-2013-0174. – ISSN 1437–4331
- [Moreno-Navarrete u. a. 2012] MORENO-NAVARRETE, José M. ; SABATER, Mónica ; ORTEGA, Francisco ; RICART, Wifredo ; FERNÁNDEZ-REAL, José M.: Circulating zonulin, a marker of intestinal permeability, is increased in association with obesity-associated insulin resistance. In: *PLoS One* 7 (2012), Nr. 5, e37160. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0037160>. – DOI 10.1371/journal.pone.0037160
- [März u. a. 2010] MÄRZ, Winfried ; MEINITZER, Andreas ; DRECHSLER, Christiane ; PILZ, Stefan ; KRANE, Vera ; KLEBER, Marcus E. ; FISCHER, Joachim ; WINKELMANN, Bernhard R. ; BÖHM, Bernhard O. ; RITZ, Eberhard ; WANNER, Christoph: Homoarginine, cardiovascular risk, and mortality. In: *Circulation* 122 (2010), September, S. 967–975. <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.908988>. – DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.908988. – ISSN 1524–4539
- [Muto u. a. 2010] MUTO, Shigeaki ; HATA, Masaki ; TANIGUCHI, Junichi ; TSURUOKA, Shuichi ; MORIWAKI, Kazumasa ; SAITOU, Mitinori ; FURUSE, Kyoko ; SASAKI, Hiroyuki ; FUJIMURA, Akio ; IMAI, Masashi ; KUSANO, Eiji ; TSUKITA, Shoichiro ; FURUSE, Mikio: Claudin-2-deficient mice are defective in the leaky and cation-selective paracellular permeability properties of renal proximal tubules. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (2010), April, S. 8011–8016. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0912901107>. – DOI 10.1073/pnas.0912901107. – ISSN 1091–6490
- [Nakashige u. a. 2015] NAKASHIGE, Toshiki G. ; ZHANG, Bo ; KREBS, Carsten ; NOLAN, Elizabeth M.: Human calprotectin is an iron-sequestering host-defense protein. In: *Nature chemical biology* 11 (2015), Oktober, S. 765–771. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.1891>. – DOI 10.1038/nchembio.1891. – ISSN 1552–4469
- [Nevola u. a. 2020] NEVOLA, Riccardo ; ACIERNO, Carlo ; PAFUNDI, Pia C. ; ADINOLFI, Luigi E.: Chronic hepatitis C infection induces cardiovascular disease and type 2 diabetes: mechanisms and management. In: *Minerva medica*

(2020), November. <http://dx.doi.org/10.23736/S0026-4806.20.07129-3>. – DOI 10.23736/S0026-4806.20.07129-3. – ISSN 1827-1669

[Peaudecerf u. Rocha 2011] PEAUDE CERF, Laetitia ; ROCHA, Benedita: Role of the gut as a primary lymphoid organ. In: *Immunol Lett* 140 (2011), Oct, Nr. 1-2, 1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2011.05.009>. – DOI 10.1016/j.imlet.2011.05.009

[Pepys u. Hirschfield 2003] PEPYS, Mark B. ; HIRSCHFIELD, Gideon M.: C-reactive protein: a critical update. In: *J Clin Invest* 111 (2003), Jun, Nr. 12, 1805-1812. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI18921>. – DOI 10.1172/JCI18921

[Pietrukaniec u. a. 2019] PIETRUKANIEC, Marta ; MIGACZ, Maciej ; ZAK-GOŁAB, Agnieszka ; OLSZANECKA-GLINIANOWICZ, Magdalena ; CHUDEK, Jerzy ; DUŁAWA, Jan ; HOLECKI, Michał: Zonulin Family Peptide Levels in Ascites and Serum in Patients with Liver Cirrhosis: A Preliminary Study. In: *Disease markers* 2019 (2019), S. 2804091. <http://dx.doi.org/10.1155/2019/2804091>. – DOI 10.1155/2019/2804091. – ISSN 1875-8630

[Pilz u. a. 2011] PILZ, Stefan ; MEINITZER, Andreas ; TOMASCHITZ, Andreas ; DRECHSLER, Christiane ; RITZ, Eberhard ; KRANE, Vera ; WANNER, Christoph ; BOEHM, Bernhard O. ; MÄRZ, Winfried: Low homoarginine concentration is a novel risk factor for heart disease. In: *Heart (British Cardiac Society)* 97 (2011), August, S. 1222-1227. <http://dx.doi.org/10.1136/hrt.2010.220731>. – DOI 10.1136/hrt.2010.220731. – ISSN 1468-201X

[Priori u. a. 2015] PRIORI, Silvia G. ; BLOMSTRÖM-LUNDQVIST, Carina ; MAZZANTI, Andrea ; BLOM, Nico ; BORGGREFE, Martin ; CAMM, John ; ELLIOTT, Perry M. ; FITZSIMONS, Donna ; HATALA, Robert ; HINDRICKS, Gerhard ; KIRCHHOF, Paulus ; KJELDSSEN, Keld ; KUCK, Karl-Heinz ; HERNANDEZ-MADRID, Antonio ; NIKOLAOU, Nikolaos ; NOREKVÅL, Tone M. ; SPAULDING, Christian ; VAN VELDHUISEN, Dirk J. ; VENTRICULAR ARRHYTHMIAS, Task F. w. ; CARDIOLOGY (ESC) the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society o.: 2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: The Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology (ESC) Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC). In:

*Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology* 17 (2015), November, S. 1601–1687. <http://dx.doi.org/10.1093/europace/euv319>. – DOI 10.1093/europace/euv319. – ISSN 1532–2092

[Przybyłowski u. a. 2014] PRZYBYŁOWSKI, P ; NOWAK, E ; JANIK, L ; WASILEWSKI, G ; KOZŁOWSKA, S ; MAŁYSZKO, J: Zonulin and iron metabolism in heart transplant recipients. In: *Transplantation proceedings* 46 (2014), Oktober, S. 2856–2859. <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2014.09.041>. – DOI 10.1016/j.transproceed.2014.09.041. – ISSN 1873–2623

[Ribeiro u. a. 2014] RIBEIRO, Daniel Rios P. ; RAMOS, Adriane M. ; VIEIRA, Pedro L. ; MENTI, Eduardo ; BORDIN, Odemir L. ; SOUZA, Priscilla Azambuja Lopes d. ; QUADROS, Alexandre Schaan d. ; PORTAL, Vera L.: High-sensitivity C-reactive protein as a predictor of cardiovascular events after ST-elevation myocardial infarction. In: *Arquivos brasileiros de cardiologia* 103 (2014), Juli, S. 69–75. – ISSN 1678–4170

[Ridker u. a. 1998] RIDKER, P. M. ; RIFAI, N. ; PFEFFER, M. A. ; SACKS, F. M. ; MOYE, L. A. ; GOLDMAN, S. ; FLAKER, G. C. ; BRAUNWALD, E.: Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. In: *Circulation* 98 (1998), September, S. 839–844. <http://dx.doi.org/10.1161/01.cir.98.9.839>. – DOI 10.1161/01.cir.98.9.839. – ISSN 0009–7322

[Rittirsch u. a. 2013] RITTIRSCH, Daniel ; FLIERL, Michael A. ; NADEAU, Brian A. ; DAY, Danielle E. ; HUBER-LANG, Markus S. ; GRAILER, Jamison J. ; ZETOUNE, Firas S. ; ANDJELKOVIC, Anuska V. ; FASANO, Alessio ; WARD, Peter A.: Zonulin as prehaptoglobin2 regulates lung permeability and activates the complement system. In: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 304 (2013), Jun, Nr. 12, L863–L872. <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.00196.2012>. – DOI 10.1152/ajplung.00196.2012

[Sapone u. a. 2006] SAPONE, Anna ; DE MAGISTRIS, Laura ; PIETZAK, Michelle ; CLEMENTE, Maria G. ; TRIPATHI, Amit ; CUCCA, Francesco ; LAMPIS, Rosanna ; KRYSZAK, Deborah ; CARTENI $\frac{1}{2}$ , Maria ; GENEROSO, Maddalena ; IAFUSCO, Dario ; PRISCO, Francesco ; LAGHI, Francesca ; RIEGLER, Gabriele ; CARRATU,

- Romano ; COUNTS, Debra ; FASANO, Alessio: Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. In: *Diabetes* 55 (2006), May, Nr. 5, S. 1443–1449
- [Schilling u. a. 2014] SCHILLING, Johannes ; LOENING-BAUCKE, Vera ; DÖRFFEL, Yvonne: Increased Gardnerella vaginalis urogenital biofilm in inflammatory bowel disease. In: *J Crohns Colitis* 8 (2014), Jun, Nr. 6, 543–549. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crohns.2013.11.015>. – DOI 10.1016/j.crohns.2013.11.015
- [Schlingmann u. a. 2015] SCHLINGMANN, Barbara ; MOLINA, Samuel A. ; KOVAL, Michael: Claudins: Gatekeepers of lung epithelial function. In: *Semin Cell Dev Biol* 42 (2015), Jun, 47–57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.04.009>. – DOI 10.1016/j.semcdb.2015.04.009
- [Schwedt 2017] SCHWEDT, Georg: *Analytische Chemie : Grundlagen, Methoden und Praxis*. Weinheim : Wiley-VCH, 2017. – ISBN 3527698779
- [Sheriff u. a. 2015] SHERIFF, Ahmed ; SCHINDLER, Ralf ; VOGT, Birgit ; ABDEL-ATY, Hassan ; UNGER, Juliane K. ; BOCK, Christopher ; GEBAUER, Frank ; SLAGMAN, Anna ; JERICHOW, Timo ; MANS, Dörte ; YAPICI, Gülcan ; JANELT, Gunnar ; SCHRÖDER, Malte ; KUNZE, Rudolf ; MÖCKEL, Martin: Selective apheresis of C-reactive protein: a new therapeutic option in myocardial infarction? In: *Journal of clinical apheresis* 30 (2015), Februar, S. 15–21. <http://dx.doi.org/10.1002/jca.21344>. – DOI 10.1002/jca.21344. – ISSN 1098–1101
- [Shine u. a. 1981] SHINE, B. ; DE BEER, F. C. ; PEPYS, M. B.: Solid phase radioimmunoassays for human C-reactive protein. In: *Clin Chim Acta* 117 (1981), Nov, Nr. 1, S. 13–23
- [Skardelly u. a. 2009] SKARDELLE, Marco ; ARMBRUSTER, Franz P. ; MEIXENSBERGER, Jürgen ; HILBIG, Heidegard: Expression of Zonulin, c-kit, and Glial Fibrillary Acidic Protein in Human Gliomas. In: *Translational oncology* 2 (2009), August, S. 117–120. <http://dx.doi.org/10.1593/tlo.09115>. – DOI 10.1593/tlo.09115. – ISSN 1936–5233
- [Song u. a. 2017] SONG, Ping ; RAMPRASATH, Tharmarajan ; WANG, Huan ; ZOU, Ming-Hui: Abnormal kynurenine pathway of tryptophan catabolism in cardiovascular diseases. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 74 (2017), August, S. 2899–2916. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-017-2504-2>. – DOI 10.1007/s00018-017-2504-2. – ISSN 1420–9071

- [Stamatovic u. a. 2016] STAMATOVIĆ, Svetlana M. ; JOHNSON, Allison M. ; KEEP, Richard F. ; ANDJELKOVIĆ, Anuska V.: Junctional proteins of the blood-brain barrier: New insights into function and dysfunction. In: *Tissue Barriers* 4 (2016), Nr. 1, e1154641. <http://dx.doi.org/10.1080/21688370.2016.1154641>. – DOI 10.1080/21688370.2016.1154641
- [Stevens u. a. 2013] STEVENS, Paul E. ; LEVIN, Adeera ; MEMBERS, Kidney Disease: Improving Global Outcomes Chronic Kidney Disease Guideline Development Work G.: Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. In: *Annals of internal medicine* 158 (2013), Juni, S. 825–830. <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-158-11-201306040-00007>. – DOI 10.7326/0003-4819-158-11-201306040-00007. – ISSN 1539-3704
- [Stevenson u. a. 1986] STEVENSON, B. R. ; SILICIANO, J. D. ; MOOSEKER, M. S. ; GOODENOUGH, D. A.: Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. In: *J Cell Biol* 103 (1986), Sep, Nr. 3, S. 755–766
- [Stríz u. Trebichavský 2004] STRÍZ, I. ; TREBICHAŤSKÝ, I.: Calprotectin - a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. In: *Physiological research* 53 (2004), S. 245–253. – ISSN 0862-8408
- [Tajik u. a. 2020] TAJIK, Narges ; FRECH, Michael ; SCHULZ, Oscar ; SCHÄLTER, Fabian ; LUCAS, Sébastien ; AZIZOV, Vugar ; DÜRHOŁZ, Kerstin ; STEFFEN, Franziska ; OMATA, Yasunori ; RINGS, Andreas ; BERTOĞ, Marko ; RIZZO, Aroldo ; ILJAZOVIC, Aida ; BASIC, Marijana ; KLEYER, Arnd ; CULEMANN, Stephan ; KRÖNKE, Gerhard ; LUO, Yubin ; ÜBERLA, Klaus ; GAİPL, Udo S. ; FREY, Benjamin ; STROWİG, Till ; SARTER, Kerstin ; BISCHOFF, Stephan C. ; WIRTZ, Stefan ; CAÑETE, Juan D. ; CICCIA, Francesco ; SCHETT, Georg ; ZAİSS, Mario M.: Targeting zonulin and intestinal epithelial barrier function to prevent onset of arthritis. In: *Nature communications* 11 (2020), April, S. 1995. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-15831-7>. – DOI 10.1038/s41467-020-15831-7. – ISSN 2041-1723
- [Tapi u. a. 2021] TAPI, Laura ; BENCHEA, Laura ; SIRIOPOL, Dimitrie ; KANBAY, Mehmet ; COVIC, Adrian: Colchicine Use in Acute Coronary Syndromes: An Update. In: *Angiology* (2021), Januar, S. 3319720985644. <http://dx.doi.org/>

10.1177/0003319720985644. – DOI 10.1177/0003319720985644. – ISSN 1940–1574

[Trachtman u. a. 2019] TRACHTMAN, Howard ; GIPSON, Debbie S. ; LEMLEY, Kevin V. ; TROOST, Jonathan P. ; FAUL, Christian ; MORRISON, Debra J. ; VENTO, Suzanne M. ; AHN, Dong-Hyun ; GOLDBERG, Judith D.: Plasma Zonulin Levels in Childhood Nephrotic Syndrome. In: *Frontiers in pediatrics* 7 (2019), S. 197. <http://dx.doi.org/10.3389/fped.2019.00197>. – DOI 10.3389/fped.2019.00197. – ISSN 2296–2360

[Tripathi u. a. 2009] TRIPATHI, Amit ; LAMMERS, Karen M. ; GOLDBLUM, Simeon ; SHEA-DONOHUE, Terez ; NETZEL-ARNETT, Sarah ; BUZZA, Marguerite S. ; ANTALIS, Toni M. ; VOGEL, Stefanie N. ; ZHAO, Aiping ; YANG, Shiqi ; ARRIETTA, Marie-Claire ; MEDDINGS, Jon B. ; FASANO, Alessio: Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as prehaptoglobin-2. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009), Sep, Nr. 39, 16799–16804. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0906773106>. – DOI 10.1073/pnas.0906773106

[Valkonen u. a. 2001] VALKONEN, V. P. ; PÄIVÄ, H. ; SALONEN, J. T. ; LAKKA, T. A. ; LEHTIMÄKI, T. ; LAAKSO, J. ; LAAKSONEN, R.: Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. In: *Lancet (London, England)* 358 (2001), S. 2127–2128. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)07184-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(01)07184-7). – DOI 10.1016/S0140-6736(01)07184-7. – ISSN 0140–6736

[Vallance u. a. 1992] VALLANCE, P. ; LEONE, A. ; CALVER, A. ; COLLIER, J. ; MONCADA, S.: Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. In: *Lancet (London, England)* 339 (1992), März, S. 572–575. [http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)90865-z](http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736(92)90865-z). – DOI 10.1016/0140-6736(92)90865-z. – ISSN 0140–6736

[Van Itallie u. Anderson 2014] VAN ITALLIE, Christina M. ; ANDERSON, James M.: Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. In: *Semin Cell Dev Biol* 36 (2014), Dec, 157–165. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.08.011>. – DOI 10.1016/j.semcdb.2014.08.011

[Van Linthout u. Tschöpe 2017] VAN LINTHOUT, Sophie ; TSCHÖPE, Carsten: Inflammation - Cause or Consequence of Heart Failure or Both? In: *Current heart failure reports* 14 (2017), August, S. 251–265. <http://dx.doi.org/10.1007/s11897-017-0337-9>. – DOI 10.1007/s11897-017-0337-9. – ISSN 1546–9549

- [Van Weemen u. Schuurs 1971] VAN WEEMEN, B. K. ; SCHUURS, A. H. W. M.: Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. In: *FEBS letters* 15 (1971), Juni, S. 232–236. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(71\)80319-8](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(71)80319-8). – DOI 10.1016/0014-5793(71)80319-8. – ISSN 1873–3468
- [Vigushin u. a. 1993] VIGUSHIN, D. M. ; PEPYS, M. B. ; HAWKINS, P. N.: Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. In: *J Clin Invest* 91 (1993), Apr, Nr. 4, 1351–1357. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI116336>. – DOI 10.1172/JCI116336
- [Vojdani u. a. 2017] VOJDANI, Aristo ; VOJDANI, Elroy ; KHARRAZIAN, Datis: Fluctuation of zonulin levels in blood vs stability of antibodies. In: *World journal of gastroenterology* 23 (2017), August, S. 5669–5679. <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v23.i31.5669>. – DOI 10.3748/wjg.v23.i31.5669. – ISSN 2219–2840
- [Wang u. a. 2000] WANG, W. ; UZZAU, S. ; GOLDBLUM, S. E. ; FASANO, A.: Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. In: *J Cell Sci* 113 Pt 24 (2000), Dec, S. 4435–4440
- [Watts u. a. 2005] WATTS, Tammara ; BERTI, Irene ; SAPONE, Anna ; GERARDUZZI, Tania ; NOT, Tarcisio ; ZIELKE, Ronald ; FASANO, Alessio: Role of the intestinal tight junction modulator zonulin in the pathogenesis of type I diabetes in BB diabetic-prone rats. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (2005), Februar, S. 2916–2921. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0500178102>. – DOI 10.1073/pnas.0500178102. – ISSN 0027–8424
- [Wittekindt 2017] WITTEKINDT, Oliver H.: Tight junctions in pulmonary epithelia during lung inflammation. In: *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 469 (2017), Januar, S. 135–147. <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-016-1917-3>. – DOI 10.1007/s00424-016-1917-3. – ISSN 1432–2013
- [World Health Organization 2009] WORLD HEALTH ORGANIZATION: *Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic*. WORLD HEALTH ORGN, 2009 [http://www.ebook.de/de/product/6551038/world\\_health\\_organization\\_unaids\\_world\\_health\\_organization\\_obesity\\_preventing\\_and\\_managing\\_the\\_global\\_epidemic.html](http://www.ebook.de/de/product/6551038/world_health_organization_unaids_world_health_organization_obesity_preventing_and_managing_the_global_epidemic.html). – ISBN 9241208945
- [Yacyshyn u. a. 1996] YACYSHYN, B. ; MEDDINGS, J. ; SADOWSKI, D. ; BOWEN-YACYSHYN, M. B.: Multiple sclerosis patients have peripheral blood CD45RO+

- B cells and increased intestinal permeability. In: *Dig Dis Sci* 41 (1996), Dec, Nr. 12, S. 2493–2498
- [Yamagishi u. Matsui 2018] YAMAGISHI, Sho-Ichi ; MATSUI, Takanori: Role of Hyperglycemia-Induced Advanced Glycation End Product (AGE) Accumulation in Atherosclerosis. In: *Annals of vascular diseases* 11 (2018), September, S. 253–258. <http://dx.doi.org/10.3400/avd.ra.18-00070>. – DOI 10.3400/avd.ra.18-00070. – ISSN 1881–641X
- [Zhang u. a. 2018] ZHANG, Lei ; MASETTI, Giulia ; COLUCCI, Giuseppe ; SALVI, Mario ; COVELLI, Danila ; ECKSTEIN, Anja ; KAISER, Ulrike ; DRAMAN, Mohd S. ; MULLER, Ilaria ; LUDGATE, Marian ; LUCINI, Luigi ; BISCARINI, Filippo: Combining micro-RNA and protein sequencing to detect robust biomarkers for Graves' disease and orbitopathy. In: *Scientific reports* 8 (2018), Mai, S. 8386. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-26700-1>. – DOI 10.1038/s41598-018-26700-1. – ISSN 2045–2322
- [Zhong u. a. 2017] ZHONG, Jianyong ; YANG, Hai-Chun ; FOGO, Agnes B.: A perspective on chronic kidney disease progression. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 312 (2017), März, S. F375–F384. <http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00266.2016>. – DOI 10.1152/ajprenal.00266.2016. – ISSN 1522–1466
- [Zinellu u. a. 2018] ZINELLU, Angelo ; PALIOGIANNIS, Panagiotis ; CARRU, Ciriacco ; MANGONI, Arduino A.: Homoarginine and all-cause mortality: A systematic review and meta-analysis. In: *European journal of clinical investigation* 48 (2018), August, S. e12960. <http://dx.doi.org/10.1111/eci.12960>. – DOI 10.1111/eci.12960. – ISSN 1365–2362
- [Zoccali u. a. 2001] ZOCCALI, C. ; BODE-BÖGER, S. ; MALLAMACI, F. ; BENEDETTO, F. ; TRIPEPI, G. ; MALATINO, L. ; CATALIOTTI, A. ; BELLANUOVA, I. ; FERMO, I. ; FRÖLICH, J. ; BÖGER, R.: Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. In: *Lancet (London, England)* 358 (2001), S. 2113–2117. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(01\)07217-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(01)07217-8). – DOI 10.1016/s0140-6736(01)07217-8. – ISSN 0140–6736



## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Robert Klüsener, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der T<sub>J</sub>-Regulator Zonulin – mehr als ein Mediator des Leaky-Gut-Syndroms? Eine Korrelationsanalyse bei Patienten mit kardio-renalen Erkrankungen“ bzw. „Zonulin – more than a mediator of leaky gut? Correlation analysis in patients with cardiorenal disease“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der folgenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, 28. Januar 2022

Robert Klüsener



## **Anteilserklärung an erfolgten Publikationen**

Robert Klüsener hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

### **Publikation 1: Mann u. a. [2017]**

#### **Publikation**

Mann, Elli ; Kluesener, Robert ; Boschann, Felix ; Ruppert, Jana ; Armbruster, Franz P. ; Meinitzer, Andreas ; Melzer, Christoph ; Dschietzig, Thomas B.: **Homoarginine Associates with Zonulin and Tryptophan - Findings in a High-Risk Cohort of Patients Carrying an AICD.** In: Clinical laboratory 63 (2017)

#### **Anteil**

Bei 225 der 229 eingeschlossenen Probanden habe ich die klinischen Daten (Anamnese, körperliche Untersuchung) erhoben, venös Blut abgenommen sowie die Proben weiterverarbeitet (Zentrifugation, Aliquotierung, Lagerung). Zudem habe ich an der statistischen Auswertung mitgewirkt (Tabelle 1 und Abbildung 1).

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden



# Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## Publikationsliste

1. Mann, Elli ; Kluesener, Robert ; Boschann, Felix ; Ruppert, Jana ; Armbruster, Franz P. ; Meinitzer, Andreas ; Melzer, Christoph ; Dschietzig, Thomas B.: **Homoarginine Associates with Zonulin and Tryptophan - Findings in a High-Risk Cohort of Patients Carrying an AICD.** In: Clinical laboratory 63 (2017), November, S. 1911–1918.
2. Dschietzig, Thomas B. ; Kellner, Karl-Heinz ; Sasse, Katrin ; Boschann, Felix ; Klüsener, Robert ; Ruppert, Jana ; Armbruster, Franz P. ; Bankovic, Dragic ; Meinitzer, Andreas ; Mitrovic, Veselin ; Melzer, Christoph: **Plasma Kynurenine Predicts Severity and Complications of Heart Failure and Associates with Established Biochemical and Clinical Markers of Disease.** In: Kidney and blood pressure research 44 (2019), S. 765–776.



# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den vielen Personen danken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Zunächst gilt mein Dank meinem Doktorvater PD Dr. Christoph Melzer für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung und die gute Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Thomas Dschietzig danke ich für die vielen Denkanstöße, Ideen und fachliche Diskussionen.

Für die Begleitung, Unterstützung, Aufmunterung und das Korrekturlesen danke ich meinen Eltern Marion und Werner genauso wie meiner Schwester Judith mit Alexander und Jannis.

Dankbar bin ich ebenso Phil, Hansi und Lemmy für Motivation und Inspiration über viele Jahren.

Nicht zuletzt hat der unablässige liebevolle Rückhalt durch meine Frau Franziska dafür gesorgt, dass diese Dissertation vollendet wurde.