

Aus der Klinik für Kardiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Der Einfluss des Darm-Mikrobioms auf die Expression von  
hepatischen und intestinalen Stoffwechselgenen:  
Rolle für kardiometabolische Erkrankungen“

„Impact of gut microbiota on expression of genes involved in  
hepatic and intestinal metabolism:  
Role for cardiometabolic disease“

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Johann Rößler

aus Berlin

Datum der Promotion: 03.03.2023

# Vorwort

Teile der in dieser Dissertation präsentierten Methodiken/Ergebnisse wurden bereits in den nachfolgend aufgeführten Publikationen veröffentlicht:

- F. Zimmermann\*, **J. Roessler\***, D. Schmidt, A. Jasina, P. Schumann, M. Gast, W. Poller, D. Leistner, H. Giral, N. Krankel, A. Kratzer, S. Schuchardt, M. M. Heimesaat, U. Landmesser, and A. Haghikia, "Impact of the Gut Microbiota on Atorvastatin Mediated Effects on Blood Lipids," *J Clin Med*, vol. 9, no. 5, May 25 2020, doi: 10.3390/jcm9051596.

**\* equally contributed as first authors**

- Haghikia A, Zimmermann F, Schumann P, Jasina A, **Roessler J**, Schmidt D, Heinze P, Kaisler J, Nageswaran V, Aigner A, Ceglarek U, Cineus R, Hegazy AN, van der Vorst EPC, Döring Y, Strauch CM, Nemet I, Tremaroli V, Dwibedi C, Kränkel N, Leistner DM, Heimesaat MM, Bereswill S, Rauch G, Seeland U, Soehnlein O, Müller DN, Gold R, Bäckhed F, Hazen SL, Haghikia A, Landmesser U. Propionate attenuates atherosclerosis by immune-dependent regulation of intestinal cholesterol metabolism. *European Heart Journal*. 2021;10.1093/eurheartj/ehab644.

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	5
Tabellenverzeichnis .....	5
Abkürzungsverzeichnis .....	6
<b>1. Abstrakt (Deutsch) .....</b>	<b>8</b>
<b>1. Abstract (English).....</b>	<b>10</b>
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>12</b>
2.1 Darm-Mikrobiom.....	12
2.2 Cholesterin-Metabolismus .....	15
2.2.1 Cholesterinbiosynthese .....	16
2.2.2 Cholesterinresorption .....	17
2.2.3 Lipoproteine .....	19
2.2.4 Cholesterinausscheidung.....	20
2.3 Darm-Mikrobiom und Cholesterin-Metabolismus .....	22
2.4 <i>Glucagon like Peptide-1</i> .....	24
2.5 Darm-Mikrobiom und <i>Glucagon like Peptide-1</i> .....	25
2.6 Kardiometabolische Erkrankungen und Atherosklerose .....	26
2.7 Zielsetzung.....	29
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>31</b>
3.1 Material .....	31
3.1.1 Tierhaltung und tierexperimentelle Versuche.....	31
3.1.2 Molekularbiologische Experimente .....	32
3.1.3 <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> .....	34
3.2 Methoden .....	35
3.2.1 Tierexperimentelle Versuche .....	35
3.2.2 Tierhaltung .....	35
3.2.3 Euthanasie der Versuchstiere und Probenentnahme .....	36
3.2.4 Wildtyp – Mäuse.....	36
3.2.4.1 Versuchsaufbau.....	36
3.2.4.2 Versuchsdurchführung .....	37
3.2.5 ApoE <sup>-/-</sup> -Mäuse .....	38
3.2.5.1 Versuchsaufbau.....	38
3.2.5.2 Versuchsdurchführung .....	38
3.2.6 Humane Plasmaproben .....	39
3.2.7 Molekularbiologische Methoden.....	40
3.2.7.1 Prinzip der Polymerasekettenreaktion.....	40
3.2.7.2 Prinzip der quantitativen Real Time-Polymerasekettenreaktion.....	41
3.2.7.3 <i>TaqMan-Assay</i> (FAM) .....	42
3.2.8 Durchführung der qRT-PCR.....	44
3.2.8.1 Isolation der Ribonukleinsäure .....	44
3.2.8.2 <i>NanoDrop</i> -Messung .....	45
3.2.8.3 DNase-Verdau.....	46
3.2.8.4 Reverse Transkription .....	47
3.2.8.5 Quantitative Real-Time PCR .....	49
3.2.8.6 Relative Quantifizierung qRT-PCR Daten .....	50
3.2.9 <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> .....	50
3.2.9.1 Prinzip des <i>Sandwich-ELISA</i> .....	50
3.2.9.2 Durchführung des <i>Sandwich-ELISA</i> .....	51
3.2.9.3 Auswertung des <i>Sandwich-ELISA</i> .....	53
3.2.10 Statistische Auswertung.....	54

<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>55</b>
4.1 Einfluss des Darm-Mikrobioms auf den Cholesterin-Metabolismus .....	55
4.1.1 Expression Cholesterin-regulierender Gene unter Depletion des Darm-Mikrobioms .....	55
4.1.1.1 Hepatische Genexpression .....	55
4.1.1.2 Intestinale Genexpression .....	56
4.1.2 Metabolische Reaktion auf Genexpressionsebene im Rahmen einer hochfettreichen Diät unter Depletion des Darm-Mikrobioms.....	57
4.1.2.1 Hepatische Genexpression .....	57
4.1.2.2 Intestinale Genexpression .....	59
4.1.3 Regulatorischer Effekt von Atorvastatin auf die Expression Cholesterin-regulierender Gene in Abhängigkeit vom Darm-Mikrobiom .....	60
4.1.3.1 Hepatische Genexpression .....	60
4.1.3.2 Intestinale Genexpression .....	62
4.2 Einfluss des Darm-Mikrobioms auf den <i>GLP-1</i> -Metabolismus.....	64
4.2.1 Einfluss des Darm-Mikrobiom abhängigen Metaboliten Propionat auf die Expression von intestinalen Genen des <i>GLP-1</i> -Metabolismus.....	65
4.2.2 Einfluss einer oralen Supplementation mit dem Darm-Mikrobiom abhängigen Metaboliten Propionat auf die <i>GLP-1</i> -Plasmakonzentration.....	66
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>67</b>
5.1 Einfluss des Darm-Mikrobioms auf den Cholesterin-Metabolismus .....	67
5.1.1 Veränderung der hepatischen Expression Cholesterin-regulierender Gene unter Depletion des Darm-Mikrobioms .....	68
5.1.2 Veränderung der intestinalen Expression Cholesterin-regulierender Gene unter Depletion des Darm-Mikrobioms .....	69
5.1.3 Veränderung der hepatischen metabolischen Reaktion auf Genexpressionsebene durch eine hochfettreiche Diät unter Depletion des Darm-Mikrobioms .....	70
5.1.4 Veränderung der intestinalen metabolischen Reaktion auf Genexpressionsebene durch eine hochfettreiche Diät unter Depletion des Darm-Mikrobioms .....	71
5.1.5 Zusammenfassung.....	72
5.2 Einfluss des Darm-Mikrobioms auf den cholesterinsenkenden Effekt von Statinen .....	74
5.2.1 Regulatorischer Effekt von Atorvastatin auf die Expression hepatischer Cholesterin-regulierender Gene in Abhängigkeit vom Darm-Mikrobiom .....	75
5.2.2 Regulatorischer Effekt von Atorvastatin auf die Expression intestinaler Cholesterin-regulierender Gene in Abhängigkeit vom Darm-Mikrobiom .....	75
5.2.3 Zusammenfassung.....	76
5.3 Einfluss des Darm-Mikrobioms auf den <i>GLP-1</i> -Metabolismus.....	77
5.3.1 Einfluss des Darm-Mikrobiom abhängigen Metaboliten Propionat auf die Expression von intestinalen Genen des <i>GLP-1</i> -Metabolismus.....	78
5.3.2 Einfluss einer oralen Supplementation des Darm-Mikrobiom abhängigen Metaboliten Propionat auf die <i>GLP-1</i> -Plasmakonzentration.....	79
5.3.3 Zusammenfassung.....	79
5.4 Limitationen .....	80
5.5 Schlussfolgerung.....	81
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>83</b>
<b>7. Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>92</b>
7.1 Anteilserklärung an erfolgten Publikationen .....	92
<b>8. Curriculum vitae .....</b>	<b>94</b>
<b>9. Publikationsliste .....</b>	<b>96</b>
<b>10. Danksagung .....</b>	<b>97</b>
<b>11. Bescheinigung Statistik.....</b>	<b>98</b>

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Schematische Darstellung des intestinalen Cholesterin–Metabolismus (modifiziert aus (1)). .....	18
Abbildung 2: Schematische Darstellung des hepatischen Cholesterin–Metabolismus (modifiziert aus (1)). .....	22
Abbildung 3: Schematische Darstellung des tierexperimentellen Versuch der Wildtyp-Mäuse (modifiziert aus (1)). .....	37
Abbildung 4: Schematische Darstellung des tierexperimentellen Versuches der ApoE <sup>-/-</sup> -Mäuse (modifiziert aus (69)). .....	39
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Studiendesigns. .....	40
Abbildung 6: Schematische Darstellung eines qRT-PCR–Zyklus (modifiziert aus (72)). .....	43
Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Sandwich–ELISA (modifiziert aus (75)). .....	51
Abbildung 8 (A-F): Veränderung der Expression hepatischer Cholesterin-regulierender Gene im Zuge der Depletion des Darm-Mikrobioms (modifiziert aus (1)). .....	56
Abbildung 9 (A-F): Veränderung der Expression intestinaler Cholesterin-regulierender Gene im Zuge der Depletion des Darm-Mikrobioms (modifiziert aus (1)). .....	57
Abbildung 10 (A-F): Veränderung der Expression hepatischer Cholesterin-regulierender Gene durch die HFD unter Depletion des Darm-Mikrobioms (modifiziert aus (1)). .....	58
Abbildung 11 (A-F): Veränderung der Expression intestinaler Cholesterin-regulierender Gene durch die HFD unter Depletion des Darm-Mikrobioms (modifiziert aus (1)). .....	60
Abbildung 12 (A-F): Regulatorischer Effekt von Atorvastatin auf die Expression hepatischer Cholesterin- regulierender Gene unter Depletion des Darm-Mikrobioms (modifiziert aus (1)). .....	62
Abbildung 13 (A-F): Regulatorischer Effekt von Atorvastatin auf die Expression intestinaler Cholesterin- regulierender Gene unter Depletion des Darm-Mikrobioms (modifiziert aus (1)). .....	64
Abbildung 14 (A-B): Einfluss des Darm-Mikrobiom abhängigen Metaboliten Propionat auf die Expression intestinaler Gene des GLP-1-Metabolismus. .....	65
Abbildung 15: GLP-1-Plasmakonzentrationen der Behandlungsgruppen zu den verschiedenen Studienzeitpunkten. .....	66

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien (Tierhaltung und tierexperimentelle Versuche) .....	31
Tabelle 2: Geräte (Tierhaltung und tierexperimentelle Versuche) .....	31
Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien (Tierhaltung und tierexperimentelle Versuche) .....	31
Tabelle 4: Inhaltsstoffe der Spezialdiäten (Standardiät (SCD), Hochfettreiche Diät (HFD)) (ssniff Spezialdiäten GmbH) (Tierhaltung und tierexperimentelle Versuche) .....	31
Tabelle 5: Versuchstiere (Tierhaltung und tierexperimentelle Versuche) .....	32
Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien (Molekularbiologische Experimente) .....	32
Tabelle 7: Geräte (Molekularbiologische Experimente) .....	32
Tabelle 8: Chemikalien und Reagenzien (Molekularbiologische Experimente) .....	33
Tabelle 9: Kits (Molekularbiologische Experimente) .....	33
Tabelle 10: „TaqMan™ Gene Expression Assays (FAM)“ (Applied Biosystems™; Kat.: 4331182) (Molekularbiologische Experimente, modifiziert aus (1)) .....	33
Tabelle 11: Verbrauchsmaterialien (ELISA) .....	34
Tabelle 12: Geräte (ELISA) .....	34
Tabelle 13: Kits (ELISA) .....	34
Tabelle 14: Verwendung von Reagenzien im Rahmen der RNA-Isolation .....	45
Tabelle 15: Zentrifugationsschritte im Rahmen der RNA-Isolation .....	45
Tabelle 16: Herstellung des Reaktionsansatzes für den DNase-Verdau .....	46
Tabelle 17: Thermocycler-Stufen im Rahmen des DNase-Verdau .....	47
Tabelle 18: Herstellung eines Reaktionsansatzes (1x) für die RT .....	48
Tabelle 19: Thermocycler-Stufen der RT („TaqMan™-RNA-to-cDNA-Kit“) .....	48
Tabelle 20: Thermocycler-Stufen der RT („High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“) .....	48
Tabelle 21: Herstellung eines Reaktionsansatzes (1X) für die qRT-PCR .....	49
Tabelle 22: Stufen der qRT-PCR .....	49
Tabelle 23: Pipettier-Schritte des Sandwich–ELISA .....	52
Tabelle 24: Inkubationsschritte des Sandwich–ELISA .....	53

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
16S-rRNA	16S-ribosomale-RNA
<i>Abca1</i>	<i>ATP-binding cassette transporter A1</i>
<i>Abcg5/g8</i>	<i>ATP binding cassette G5/G8</i>
ABS	antibiotisch behandelte Mäuse mit depletiertem Darm-Mikrobiom
<i>Acat2</i>	<i>acyl CoA:cholesterol acyl transferase 2</i>
ApoA-I	Apolipoprotein A-I
ApoB100	Apolipoprotein B100
ApoE	Apolipoprotein E
ApoE <sup>-/-</sup>	homozygote Deletion des Apolipoprotein E Gen (ApoE-Knockout)
<i>Asbt</i>	<i>apical sodium–bile acid transporter</i>
<i>BSH</i>	<i>bile salt hydrolase</i>
bspw.	beispielsweise
cDNA	codogene DNA
CONV	konventionelle Mäuse mit intaktem Darm-Mikrobiom
<i>Ct</i>	<i>Cycle threshold</i>
<i>Cyp7a1</i>	<i>Cholesterol 7 alpha-hydroxylase</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP's	freie Desoxyribonukleotidtriphosphate
<i>DPP-4</i>	<i>Dipeptidyl peptidase-4</i>
e.g.	<i>exempli gratia</i> (zu dt. Zum Beispiel)
<i>ELISA</i>	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>FFAR</i>	<i>free fatty acid receptor</i>
<i>Fgf15</i>	<i>fibroblast growth factor 15</i>
<i>Fxr</i>	<i>farnesoid X receptor</i>
<i>Gapdh</i>	<i>glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase</i>
<i>Gcg</i>	<i>Glucagon-gene</i>
<i>GIP</i>	<i>Glucose dependent insulinotropic peptide</i>
GIT	Gastrointestinaltrakt
<i>GLP-1</i>	<i>Glucagon like peptide–1</i>
<i>GLP-1-R</i>	<i>GLP–1–Rezeptor</i>

<i>GLP-1-RA</i>	<i>GLP-1-Rezeptor-Agonist</i>
<i>HDL</i>	<i>High-density Lipoprotein</i>
HFD	Hochfettreiche Diät
<i>HMG-CoA</i>	<i>3-Hydroxy-3-Methylglutarat-Coenzym A</i>
<i>Hmgcr</i>	<i>3-Hydroxy-3-Methylglutarat-Coenzym A-Reduktase</i>
i.S.	Im Sinne
<i>IDL</i>	<i>Intermediate-density Lipoprotein</i>
<i>Insig-1</i>	<i>Insulin induced gene protein-1</i>
Kat.	Katalognummer
<i>LDL</i>	<i>Low-density Lipoprotein</i>
<i>Ldlr</i>	<i>Low-density Lipoprotein-Receptor</i>
<i>mRNA</i>	messenger-RNA
n	number ( zu dt. Anzahl)
<i>Npc1l1</i>	<i>Niemann-Pick C1-like protein 1</i>
o.g.	oben genannt
PA	An Calcium gebundenes Propionat
PC	Prohormon-Konvertase
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>Pcsk1</i>	<i>Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 1</i>
<i>Pcsk9</i>	<i>Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9</i>
qRT-PCR	quantitative Real Time-Polymerasekettenreaktion
rcf	relative Zentrifugalbeschleunigung
RT	Reverse Transkription
<i>SCAP</i>	<i>SREBP cleavage activating protein</i>
SCD	Standarddiät
<i>Srb1</i>	<i>scavenger receptor class B type 1</i>
<i>Srebp</i>	<i>sterol regulatory element-binding protein</i>
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
TMAO	Trimethylamin-N-Oxid
<i>VLDL</i>	<i>Very Low-density Lipoprotein</i>
vs.	<i>versus</i>

# **1. Abstrakt (Deutsch)**

*Einleitung* - Eine Modulation kardiometabolischer Erkrankungen über das Darm-Mikrobiom rückt zunehmend in den Fokus aktueller kardiovaskulärer Forschung. Zahlreiche Studien belegen die Interaktion zwischen den Darmbakterien und bedeutsamen Stoffwechselwegen wie dem Cholesterin- sowie Glukose-Metabolismus, welche im dysregulierten Zustand wichtige atherosklerotische Risikofaktoren darstellen. Eine genaue Charakterisierung der Einflussnahme des Darm-Mikrobioms könnte zu neuen Therapiestrategien für kardiometabolische Erkrankungen führen. Ziel meiner Forschungsarbeit ist die Analyse der Partizipation des Darm-Mikrobioms am Cholesterin-Metabolismus in Abhängigkeit von der Nahrungszusammensetzung (Standarddiät vs. hochfettreiche Diät) sowie an der cholesterinsenkenden Wirkung einer Atorvastatin-Therapie. Zudem wurde ein möglicher langfristiger Einfluss des Darm-Mikrobiom abhängigen Metaboliten Propionat auf den *GLP-1*-Metabolismus untersucht.

*Methodik* - Im tierexperimentellen Versuch wurden Mäuse (*C57BL/6J*) mit intaktem oder depletiertem Darm-Mikrobiom mit verschiedenen Spezialdiäten (Standarddiät vs. hochfettreiche Diät) sowie mit Atorvastatin behandelt. Ein mikrobieller Einfluss auf die Expression Cholesterin-regulierender Gene in hepatischen und intestinalen Organproben wurde mittels quantitativer Real-time-PCR untersucht.

Ein langfristiger Einfluss einer oralen Supplementation mit Propionat auf die Expression von Genen des *GLP-1*-Metabolismus in Mäusen (*C57BL/6J*, *ApoE<sup>-/-</sup>*) sowie auf die *GLP-1*-Plasmakonzentration in Menschen wurde mittels quantitativer Real-time-PCR bzw. *Sandwich-ELISA* untersucht.

*Resultate* - In Abwesenheit des Darm-Mikrobioms zeigte sich unter der Standarddiät eine dysregulierte Expression von Genen des Gallensäure-Metabolismus sowie der hepatischen Cholesterin-Homöostase. Unter der hochfettreichen Diät konnte kein direkter mikrobieller Einfluss auf die Genexpression festgestellt werden. Die Atorvastatin-vermittelte Regulation der Expression Cholesterin-regulierender Gene zeigte sich zum Teil abhängig von einem intakten Darm-Mikrobiom (1).



Im Rahmen der oralen Supplementation mit Propionat konnte kein nachhaltig stimulierender Effekt auf die Expression intestinaler Gene des *GLP-1*-Metabolismus sowie auf die *GLP-1*-Plasmakonzentration beobachtet werden.

*Schlussfolgerung* – Es konnte gezeigt werden, dass das Darm-Mikrobiom an der physiologischen Cholesterin-Homöostase unter einer Standarddiät beteiligt ist. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass das Darm-Mikrobiom an der Atorvastatin vermittelten Regulation der Expression Cholesterin-regulierender Gene beteiligt ist und somit zum cholesterinsenkenden Effekt des Atorvastatins beiträgt (1). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass mögliche protektive Effekte des Darm-Mikrobiom abhängigen Metaboliten Propionat auf den kardiometabolischen Stoffwechsel vermutlich nicht über eine langfristige Modulation des *GLP-1*-Metabolismus erzielt werden.

## **1. Abstract (English)**

*Introduction* - Growing evidence suggests a gut microbial involvement in metabolic pathways contributing to cardiometabolic diseases, such as dyslipidemia and impaired glucose tolerance or diabetes. Since dysregulations in the cholesterol- and glucose metabolism are major risk factors for cardiovascular disease, detailed knowledge about the metabolic interactions between host and gut microbiota could lead to new approaches for treatment of cardiometabolic diseases. The aim of this research was to investigate the diet-dependent (standard diet vs. high fat diet) impact of the gut microbiota on cholesterol-metabolism as well as its impact on the cholesterol lowering effect of atorvastatin. Moreover, it was examined whether oral supplementation with the gut microbiota dependent metabolite propionate has a sustainable effect on *GLP-1*-metabolism.

*Methods* – Mice (*C57BL/6J*) with either an intact or depleted gut microbiome were fed diets diverging in nutrient composition (standard diet vs. high fat diet) and some of the mice additionally received atorvastatin. A microbial-dependent regulation of gene expression of cholesterol-regulating genes in hepatic and intestinal tissue was examined by quantitative real-time-PCR.

The effect of oral supplementation of propionate on *GLP-1* gene expression in mice (*C57BL/6J*, *ApoE*<sup>-/-</sup>) as well as on *GLP-1* plasma concentration in humans was examined by quantitative real-time-PCR and *Sandwich-ELISA* respectively.

*Results* - Mice with depleted gut microbiota displayed a dysregulated expression of genes involved in bile acid metabolism and hepatic cholesterol-homeostasis upon standard diet. Upon high fat diet direct microbial influence on gene expression was lacking. However, atorvastatin mediated effects on the expression of cholesterol regulating genes were partly dependent on the gut microbiota (1).

Oral supplementation of propionate had no persistent stimulating effect neither on intestinal gene expression in mice nor on plasma concentrations of *GLP-1* in humans.

*Conclusion* – The results of this study show that the gut microbiota is involved in the physiologic cholesterol-homeostasis upon a standard diet. Furthermore, for the first time, this study shows that the gut microbiota participates in atorvastatin mediated regulation

of cholesterol-regulating genes and therefore may contribute to the cholesterol lowering effect of atorvastatin (1). Additionally, the findings of this study suggest that the postulated protective effects of propionate on cardiometabolic pathways are likely not mediated by a sustainable stimulation of *GLP-1*-metabolism.

## 2. Einleitung

### 2.1 Darm-Mikrobiom

Das Mikrobiom des Menschen bezeichnet die Menge an Mikroorganismen, welche auf und in unserem Körper zu finden sind (2). Bis zu 100 Billionen Mikroorganismen besiedeln den menschlichen Körper, wobei sich der Großteil innerhalb des Gastrointestinaltraktes (GIT) befindet (2, 3). Es wird angenommen, dass die Anzahl der Mikroorganismen innerhalb des Darmes die Zahl der somatischen Zellen annähernd um das 10-fache übersteigt (4, 5). In ihrer Gesamtheit verfügen die Mikroorganismen über eine Fülle an genomischen Material, welche die des humanen Genoms um ein Vielfaches übertrifft (3). Der Darm, insbesondere das Kolon, bietet den Mikroorganismen stabile Bedingungen für Wachstum und Überleben. Im Kolon findet sich auch das größte Ausmaß der mikrobiellen Besiedlung im GIT, welche hier bis zu  $10^{11}$ - $10^{12}$  Zellen pro Gramm erreicht (3, 5). In weiter oral gelegenen Abschnitten des GIT, inklusive Magen und Dünndarm, finden sich im Vergleich weniger Mikroorganismen, da die Besiedlung durch Einflüsse von Magensäure, Pankreassekret, Gallensäuren und verstärkte Peristaltik erschwert wird (6).

Das Darm-Mikrobiom setzt sich aus Mikroorganismen der drei biologischen Domänen zusammen, bestehend aus Bakterien, Archaeen und Eukaryoten (4). Der bakterielle Anteil des Darm-Mikrobioms besteht aus wenigen Phyla, welche allerdings eine hohe Vielfalt auf Ebene der Spezies aufweisen (4). Schätzungsweise setzen sich die Darmbakterien aus 35.000 verschiedenen Spezies zusammen (4, 7). Der Hauptteil der Spezies, welche den Darm besiedeln, lässt sich den Phyla *Bacteroidetes* und *Firmicutes* zuordnen (4, 5, 7). Weitere im Darm ansässige bakterielle Spezies gehören den Phyla *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria* und *Cyanobakteria* an (2, 5, 7). Im Laufe der Evolution durchliefen die Spezies dieser Phyla einen Selektionsprozess, sowohl auf der mikrobiellen Ebene, als auch auf der Ebene des übergeordneten Organismus (4). Infolgedessen konnten sich die Mikroorganismen optimal an die vorherrschenden Bedingungen im Darm anpassen und ökologische Nischen besetzen. Das Resultat dieser Anpassung spiegelt sich darin wider, dass gemessen an der Anzahl bisher entdeckter Bakterien-Phyla nur wenige den Darm besiedeln, ungeachtet der großen Diversität auf Ebene der Spezies (3).

Durch die gemeinsame Entwicklung von Darm-Mikrobiom und Wirt ist eine symbiotische Wechselbeziehung entstanden (2, 8). Im Kontext dieser Wechselbeziehung kann der Wirt von der genetischen Vielfalt und der damit einhergehenden funktionellen Vielfalt des Darm-Mikrobioms profitieren. Im Gegenzug bietet der Wirt dem Darm-Mikrobiom einen sicheren Lebensraum und versorgt die Mikroorganismen über die Nahrung mit Energie (4). Mit seiner genetischen sowie funktionellen Vielfalt kann das Darm-Mikrobiom den Stoffwechsel seines Wirtes modulieren (5). Die Mikroorganismen generieren aus Nahrungsbestandteilen Stoffwechselprodukte, welche der menschliche Körper selbst nicht synthetisieren kann, wie bestimmte Vitamine (B, K) und essentielle Aminosäuren (4). Weiterhin können die Mikroorganismen des Darm-Mikrobioms für den Körper unverdauliche Nahrungsbestandteile wie Ballaststoffe fermentieren (4, 9). Die Fermentation der Ballaststoffe mündet unter anderem in der Produktion von bioaktiven Molekülen, den kurzkettigen Fettsäuren (Acetat, Butyrat, Propionat). Diese und weitere Moleküle können als sog. Darm-Mikrobiom abhängige Metaboliten auf verschiedenen Ebenen den Metabolismus des Wirtes beeinflussen (4, 6, 9). So stellen bis zu 20% der niedermolekularen Verbindungen innerhalb des Körperkreislaufes von Darmbakterien produzierte Metaboliten dar (8). Innerhalb des Darmes dienen die kurzkettigen Fettsäuren als Nährstoffquelle für die Enterozyten (10). Innerhalb und außerhalb des Darmes können die kurzkettigen Fettsäuren als Liganden für G-Protein gekoppelte Rezeptoren (sog. *free fatty acid receptors (FFAR)*) fungieren und verschiedene Stoffwechselwege beeinflussen (2, 9). So ist beschrieben, dass eine Ernährung mit einem hohen Anteil an Ballaststoffen in Zusammenhang mit Gewichtsverlust, verbesserten Blutzuckerspiegel und einem verminderten Cholesterinspiegel steht (2, 10). Auch für die Regulation der Produktion und Sekretion von intestinalen Hormonen (e.g. *GLP-1*, *Peptid YY*) sowie für den Gallensäuren-Metabolismus scheinen das Darm-Mikrobiom und die kurzkettigen Fettsäuren von Bedeutung zu sein (6).

Die intestinal ansässigen Mikroorganismen müssen, neben Einbau der angebotenen Nahrungsbestandteile in den eigenen Stoffwechsel, in der Lage sein, einer Immunantwort des Wirtes zu entgehen und sich gegen andere potentiell pathogene Mikroorganismen i.S. einer Platzhalterfunktion durchzusetzen (3). Dabei bildet das Darm-Mikrobiom keine statische Population an Bakterien-Spezies ab, sondern unterliegt vielmehr dynamischen Veränderungen, welche auf verschiedene Umweltfaktoren (e.g. Ernährung, Medikamenteneinnahme) zurückzuführen sind (2, 11-13).

Infolge einer veränderten Zusammensetzung der mikrobiellen Besiedlung des Darmes, welche man als Dysbiose bezeichnet, können für den Wirt gesundheitsschädliche Folgen resultieren (14). Im Rahmen der Dysbiose sind zumeist nicht einzelne bakterielle Spezies verantwortlich für die Initiierung bzw. Aufrechterhaltung eines krankhaften Zustandes, sondern vielmehr die Konstellation der Zusammensetzung von Mikroorganismen (3, 14). Das Verhältnis der beiden vorherrschenden Phyla, die sog. *Firmicutes* zu *Bacteroidetes* *ratio* (auch *vice versa Bacteroidetes* zu *Firmicutes* *ratio*), wird häufig herangezogen, um Veränderungen in der Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms in Bezug auf verschiedene Pathologien zu untersuchen (7). Untersuchungen an Zwillingen mit unterschiedlichem Körpergewicht zeigten beispielsweise, dass ein adipöser Phänotyp mit einer verminderten Anzahl an Bakterien des Phylums *Bacteroidetes*, sowie einer verminderten Diversität des Darm-Mikrobioms einhergeht (15). Die Entwicklung einer Erkrankung im Zuge einer Dysbiose, kann in einer Selektion des Darm-Mikrobioms auf der Ebene des Wirts resultieren.

Profitiert der Wirt hingegen von den Eigenschaften des Darm-Mikrobioms i.S. eines Überlebensvorteils, erhöht sich die Chance für die Mikroorganismen neue Habitate zu besiedeln, indem sich der Wirt fortpflanzt (3, 4). Im Laufe der Evolution hatten so insbesondere die Mikroorganismen die Möglichkeit sich weiter zu verbreiten, deren Eigenschaften nicht nur ihnen, sondern auch dem Wirt einen Überlebensvorteil sicherten (3).

Die Besiedlung des Darms mit Mikroorganismen beginnt mit der Geburt (5). Untersuchungen an Menschen und Mäusen zeigen, dass Nachkommen ihr Darm-Mikrobiom primär von der Mutter erlangen (3). Entscheidend für die Übertragung und Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms bei Säuglingen ist der Geburtsmodus (5, 6). Vaginal entbundene Säuglinge werden von Bakterien der vaginalen und intestinalen Flora der Mutter besiedelt, wohingegen Säuglinge, die per *sectio caesaria* zur Welt kommen eine andere Besiedlung aufweisen (5, 6). Säuglinge, die per *sectio caesaria* entbunden werden, weisen häufiger eine Besiedlung mit Krankenhauskeimen und zudem eine geringere Diversität des frühen Darm-Mikrobioms auf (5, 6).

Das Darm-Mikrobiom von Kleinkindern wird insbesondere von Bakterien dominiert, welche in der Lage sind, einfache Kohlenhydrate wie Lactose und Galaktose zu verarbeiten (5). Mit der Umstellung auf feste Nahrung siedeln sich Bakterien an, welche imstande sind, komplexe Polysaccharide zu verarbeiten (5). Hierbei wird die Plastizität des Darm-Mikrobioms deutlich, welches in der Lage ist sich an die veränderten

Energieressourcen anzupassen. Insbesondere Ernährungsgewohnheiten üben die gesamte Lebensspanne über einen modulierenden Einfluss auf die Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms aus (5). Eine Umstellung der Ernährungsgewohnheiten, welche sich sukzessive auf die Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms und somit dessen metabolische Aktivität auswirkt, stellt bereits heute in der Primär- und Sekundärprävention von kardiometabolischen Erkrankungen, wie Hypercholesterinämie oder Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM), einen therapeutischen Ansatz dar.

## 2.2 Cholesterin-Metabolismus

Cholesterin ist ein essentieller Bestandteil unseres Körpers und nimmt in vielen physiologischen sowie pathologischen Prozessen eine zentrale Rolle ein. Cholesterin ist als molekulare Komponente essentiell für Struktur und Funktion der eukaryotischen Zellmembran und trägt zur Aufrechterhaltung von Permeabilität und Fluidität der Membran bei (16, 17). Als Vorläufermolekül verschiedener bioaktiver Moleküle (Steroidhormone, Vitamin D3, Gallensäuren) spielt es zudem eine zentrale Rolle in vielen physiologischen Körperfunktionen (16, 17).

Jedoch kommt dem Cholesterin auch im Rahmen verschiedener Erkrankungen eine zentrale Rolle zu. Eine Hypercholesterinämie ist einer der Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen und gilt als eine kausale Ursache der Entstehung von Atherosklerose (16, 17).

Zentrale Organe der Cholesterin-Homöostase stellen die Leber und der Darm dar. Die Leber synthetisiert nur etwa 10% des endogenen Cholesterins, ist jedoch von großer Bedeutung hinsichtlich der Produktion und Regulation eines Großteils der im Blut zirkulierenden Lipoproteine und der Ausscheidung von Cholesterin (16, 18). Im Darm hingegen kommt es zur Resorption und Transport des resorbierten Cholesterins in den systemischen Kreislauf (18).

Da Cholesterin einerseits wichtiger Bestandteil vieler Körperfunktionen und andererseits Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen ist, wird die Synthese, die Aufnahme und die Ausscheidung vom Körper sorgfältig reguliert (16, 19).

### 2.2.1 Cholesterinbiosynthese

Trotz der Komplexität des Cholesterin-Moleküls, besitzen nahezu alle Zellen des menschlichen Körpers die Fähigkeit Cholesterin zu synthetisieren (20).

Die Biosynthese des Cholesterins erfolgt im endoplasmatischen Retikulum (ER) und umfasst mehr als 30 Einzelschritte, wobei Acetat als Vorläufersubstanz dient (17). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Cholesterinbiosynthese wird durch die in der Membran des ER lokalisierte *3-Hydroxy-3-Methylglutarat-Coenzyme A -Reductase (Hmgcr)* katalysiert (17). Die *Hmgcr* katalysiert die Umwandlung von *3-Hydroxy-3-methylglutarat-Coenzyme A (HMG-CoA)* zu Mevalonat, aus welchem im weiteren Verlauf Cholesterin synthetisiert wird (17). Da die *Hmgcr* das Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese darstellt, unterliegt sie verschiedenen Regulationsmechanismen. Zwischenprodukte der Synthese können i.S. eines negativen Feedbacks zu einer Ubiquitinierung und nachfolgend zum Abbau der *Hmgcr* führen (17). Eine Inhibition der *Hmgcr* durch Statine kommt in der Behandlung von Hypercholesterinämien und Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen zum Einsatz (21). Darüber hinaus wird die Expression der *Hmgcr* auch endogen reguliert und durch das *sterol element-binding protein (Srebp)* an den intrazellulären Cholesteringehalt angepasst.

Das *Srebp* kommt in der Leber primär in den Isoformen *Srebp-1c* und *Srebp-2* vor (22). Das *Srebp-1c* nimmt Einfluss auf die Synthese von Fettsäuren, wohingegen das *Srebp-2* einen essentiellen Bestandteil für die Aufrechterhaltung der intrazellulären Cholesterin-Homöostase darstellt (22). Im inaktiven Zustand befindet sich das Transmembranprotein *Srebp-2* in der Membran des ER und ist an das *Srebp cleavage activating protein (SCAP)* sowie an das *insulin induced gene protein-1 (Insig-1)* gebunden (16, 17). Sinkt der intrazelluläre Cholesteringehalt, so löst sich der SCAP-*Srebp* Komplex vom *Insig-1* und gelangt zum Golgi-Apparat (16, 17). Innerhalb des Golgi-Apparates wird die aktive Aminogruppe (NH<sub>2</sub>-Ende) des *Srebp-2* abgespalten (16, 17). Im Nukleus kann die aktive Aminogruppe über die Bindung des *sterol response element* in der Promoterregion verschiedener Gene (u.a. *Hmgcr*, *Low-density Lipoprotein-Receptor (Ldlr)*, *Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (Pcsk9)*) ihre Expression induzieren (16, 17). Steigt der intrazelluläre Cholesteringehalt kommt es zu einer Konformationsänderung des SCAP, welches nun eine höhere Affinität zum *Insig-1* aufweist, womit der SCAP-*Srebp* Komplex im ER verbleibt (17). Durch den Einfluss auf die Geneexpression trägt das *Srebp-2* zu einer konstanten intrazellulären Cholesterinkonzentration bei.



### 2.2.2 Cholesterinresorption

Im GIT befindliches Cholesterin kommt hauptsächlich aus drei Quellen, der Nahrung (ca. 300–500 mg/Tag), den Gallensäuren (ca. 800–1200 mg/Tag) und abgeschilferten Epithelzellen (ca. 300 mg/Tag) (23). Man geht davon aus, dass etwa 50 % des intestinalen Cholesterins vom Körper resorbiert wird (16). In der Nahrung enthaltenes Cholesterin befindet sich überwiegend in einer veresterten Form (Cholesterylester) und wird für eine vereinfachte Resorption von der pankreatischen Cholesterinesterase in freies Cholesterin umgewandelt (19). Das freie Cholesterin bildet in Verbindung mit Gallensäuren, Lipiden (Phospholipiden) und weiteren fettlöslichen Nahrungsbestandteilen (Vitamine-A, -D, -E, -K) Mizellen (16, 23). Die Mizellen erleichtern den Transport des Lipidgemischs über die Mukusschicht und wässrige Phase zum Bürstensaum der Enterozyten (23). Die Resorption des Cholesterins durch die Enterozyten wird über verschiedene Transportproteine vermittelt (24).

Das Haupttransportprotein der Cholesterinresorption ist das apikal gelegene *Niemann-Pick C1-like protein 1 (Npc111)*, welches innerhalb des GIT fast ausschließlich im Dünndarm exprimiert wird (16). Nach der Bindung von Cholesterin an das *Npc111* kommt es zu einer Clathrin-vermittelten Endozytose des Cholesterins (16). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass eine fehlende Expression von *Npc111* mit einer Reduktion der Cholesterinresorption um ca. 70% einhergeht (25). Eine Inhibierung des *Npc111* durch den Wirkstoff Ezetimib findet bereits therapeutische Anwendung in der Behandlung der Hypercholesterinämie und der Prävention der Atherosklerose (24).

Ein weiteres Transportprotein stellt der apikal befindliche *scavenger receptor class B type 1 (Srb1)* dar. In experimentellen Forschungsarbeiten konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression des *Srb1* mit einer erhöhten Cholesterinresorption verbunden war (24). Weitere Forschungsarbeiten konnten allerdings zeigen, dass eine fehlende Expression des *Srb1* keine wesentliche Reduktion der Cholesterinresorption hervorrufen konnte (24). Daher ist weiter unklar, in welchem Ausmaß das *Srb1* an der physiologischen Cholesterinresorption beteiligt ist, auch unter dem Aspekt, dass das *Npc111* den Hauptteil der Absorption ausmacht (24).

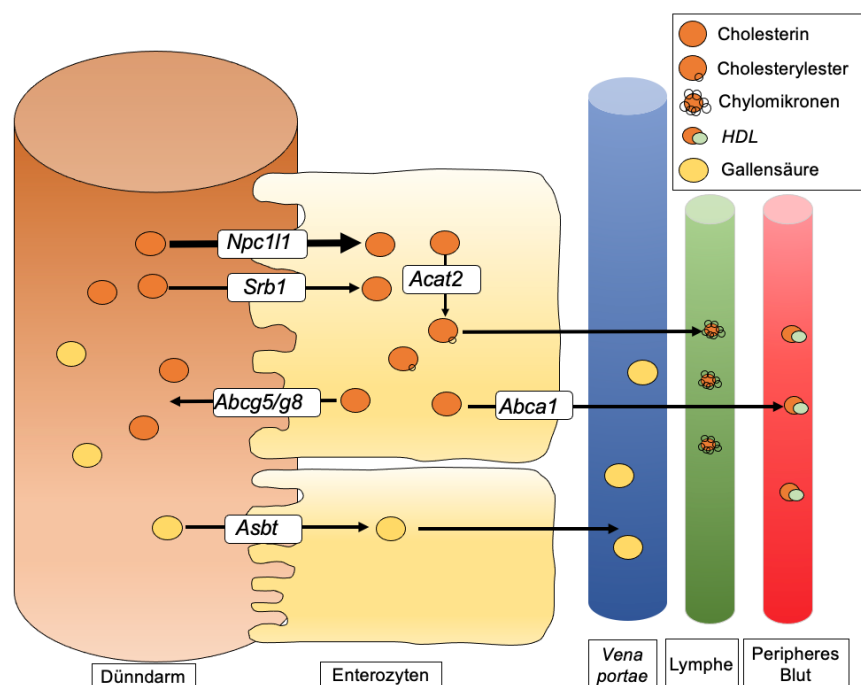
Innerhalb der Enterozyten wird ein Großteil des aufgenommenen Cholesterins durch die *acyl CoA:cholesterol acyl transferase 2 (Acat2)* wieder verestert (26, 27). Die Veresterung des Cholesterins hält das für die Absorption nötige Konzentrationsgefälle für freies Cholesterin über die Membran aufrecht (26-28). Eine verminderte Expression der *Acat2*

steht in Zusammenhang mit einer reduzierten Cholesterinresorption (26). Die von *Acat2* synthetisierten Cholesterinester sind zudem an der Bildung von Chylomikronen beteiligt, mithilfe derer die absorbierten Lipide über den *Ductus thoracicus* in den systemischen Kreislauf gelangen (26, 27).

Neben der Bildung von Chylomikronen gibt es noch weitere Mechanismen, über die Cholesterin die Enterozyten wieder verlassen kann, welche die *Proteine ATP-binding cassette transporter A1 (Abca1)* und *ATP binding cassette G5 und G8 (Abcg5/g8)* involvieren.

*Abca1* ist ein Transportprotein, welches an der basolateralen Membran exprimiert wird und Cholesterin sowie Phospholipide aus der Zelle in das Plasma transportiert. Im Plasma tragen die ausgeschleusten Lipide durch Bindung an das Apolipoprotein A-I (ApoA-I) zur Bildung des *High-density Lipoprotein (HDL)* bei (24, 29, 30). In der Maus werden durch die Aktivität des intestinalen *Abca1* etwa 30% des Plasma-HDL bereitgestellt (22).

Die Transporter *Abcg5* und *g8* bilden an der apikalen Membran der Enterozyten ein Heterodimer und vermitteln den Efflux von freiem Cholesterin und Phytosterolen zurück in das intestinale Lumen (18, 23, 29). Da insbesondere überschüssige Sterole aus den Zellen entfernt werden, trägt die Transportaktivität zur Regulation der Absorption bei.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des intestinalen Cholesterin-Metabolismus (modifiziert aus (1)).

Intestinales Cholesterin wird an der apikalen Membran der Enterozyten vorwiegend über das *Npc111* aufgenommen. Apikal exprimiertes *Srb1* trägt in geringerem Maße zu einer Absorption bei. Intrazellulär

wird das freie Cholesterin durch die *Acat2* verestert. Die Cholesterylester werden zur Bildung von Chylomikronen verwendet und gelangen über die Lymphe in den systemischen Kreislauf. Über das *Abca1* kann freies Cholesterin direkt in das periphere Blut gelangen, wo es zur Bildung von HDL beiträgt. Überschüssiges freies Cholesterin wird über den *Abcg5/g8* zurück ins intestinale Lumen befördert. Der *Asbt* reabsorbiert Gallensäuren im Rahmen des enterohepatischen Kreislaufes.

### 2.2.3 Lipoproteine

Cholesterin ist ein hydrophobes Molekül und wird für den Transport im Plasma gemeinsam mit Triglyceriden an Proteine gebunden. Durch die Bindung an spezielle Proteine entstehen die sog. Lipoproteine, welche den Transport der absorbierten und endogen synthetisierten Lipide im Plasma vermitteln (31). Der Kern der Lipoproteine besteht primär aus Triglyceriden und Cholesterylestern, welche von einer Plasmamembran, bestehend aus Phospholipiden, freiem Cholesterin und Apolipoproteinen, umgeben sind (31, 32). Apolipoproteine stellen den wichtigsten funktionellen Bestandteil der Lipoproteine dar. Sie bestimmen die Struktur der Lipoproteine, dienen als Liganden für Rezeptoren auf Zelloberflächen und interagieren mit Enzymen des Lipoprotein-Metabolismus (31).

Im Blutplasma finden sich verschiedene Lipoproteinklassen, welche sich in Größe, Lipidzusammensetzung, Apolipoproteinen und somit auch in ihrer Funktion unterscheiden (31).

Chylomikronen und *Very Low-density Lipoproteins (VLDL)*, welche reich an Triglyceriden sind, stellen ihre Lipide peripheren Geweben (Herz-, Muskel-, Fettgewebe) zur Energiegewinnung und Energiespeicherung bereit (31). Im Zuge der Hydrolyse der Triglyceride durch die Lipoproteinlipase werden die Lipide dem Gewebe zur Aufnahme zur Verfügung gestellt (31). Infolge des konsekutiven Verlusts an Triglyceriden entstehen die Chylomikronen-*Remnants* und das *Intermediate-density Lipoprotein (IDL)*, welche reicher an Cholesterin sind als ihre Vorgänger (31). Sowohl die Chylomikronen-*Remnants*, als auch das *IDL* können über Interaktion mit dem hepatischen *Ldlr*, welche über das Apolipoprotein B100 (ApoB100) und das Apolipoprotein E (ApoE) vermittelt wird, dem Körperkreislauf entzogen werden (31). Allerdings werden nur etwa 50 % des *IDL* auf diese Weise aus dem Kreislauf eliminiert (31). Im Kreislauf verbleibendes *IDL* verliert weiterhin Triglyceride und formt im Verlauf das cholesterinreiche und proatherogene *Low-density Lipoprotein (LDL)* (31). Das *LDL* speichert einen Großteil des zirkulierenden Cholesterins und erhöhte *LDL*-Spiegel korrelieren mit der Entstehung von

Atherosklerose (31). Auch das *LDL* wird über Interaktion seines ApoB100 mit dem hepatischen *Ldlr* aus dem Kreislauf eliminiert (31).

Eine weitere essentielle Lipoproteinfraktion stellt das *HDL* mit seinem ApoA-I dar (31). Das *HDL* vermittelt den sog. reversen Cholesterintransport von peripherem Gewebe zur Leber (22). *HDL* kann Cholesterin zum einen direkt an die Leber über die Bindung an hepatische *Srb1* abgeben und zum anderen über das Cholesterinester-Transferprotein im Austausch mit Triglyceriden an ApoB assoziierte Lipoproteine (*VLDL*, *IDL*, *LDL*) abgeben (22, 31). Die ApoB und ApoE assoziierten Lipoproteine werden wiederum über den hepatischen *Ldlr* dem Blutplasma entzogen.

#### 2.2.4 Cholesterinausscheidung

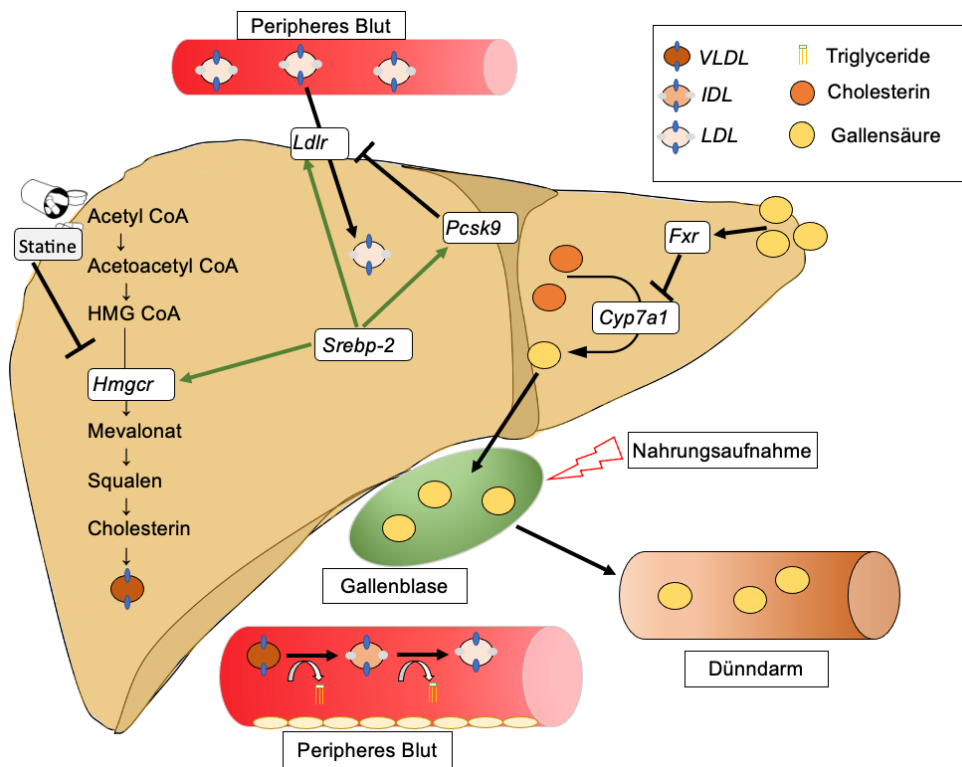
Zentrales Ausscheidungsorgan ist die Leber, welche das Cholesterin in lösliche Gallensäuren umwandelt. Durch die Bindung von Lipoproteinen an hepatische Rezeptoren, insbesondere den *Ldlr*, kommt es zur Aufnahme von Cholesterin in die Hepatozyten mittels Clathrin-vermittelter Endozytose (31, 33). Im Rahmen der Endozytose verschmelzen die entstehenden Vesikel zu Endosomen (17). Innerhalb der Endosomen kommt es zu einem Abfall des pH-Wertes, was die Dissoziation des *Ldlr* vom internalisierten Lipoprotein begünstigt (17). Der dissoziierte *Ldlr* kehrt anschließend für die Aufnahme weiterer Lipoproteine zur Zellmembran zurück (17). Die Kapazität der Lipoprotein-Absorption wird vor allem über die Anzahl der *Ldlr* auf der Zellmembran bestimmt (31).

Ein weiteres Protein, welches in die Regulation der Cholesterinresorption involviert ist, stellt die *Pcsk9* dar, welche die Cholesterinaufnahme über den *Ldlr* reguliert (31, 33, 34). Innerhalb der Zelle bindet die *Pcsk9* direkt an den *Ldlr*, wodurch es zum Abbau des *Ldlr* im Lysosom kommt (31, 34). In das Blut sezernierte *Pcsk9* kann von extrazellulär an den *Ldlr* binden und die Dissoziation des *Ldlr* von internalisierten Lipoproteinen verhindern, was ebenfalls im Abbau des *Ldlr* mündet (34). Monoklonale Antikörper, welche die externe Bindung der *Pcsk9* an den *Ldlr* unterbinden, werden zur Behandlung von Hypercholesterinämien eingesetzt (34).

Sowohl die Expression der *Pcsk9* als auch des *Ldlr* ist über das *Srebp-2* an den intrazellulären Cholesteringehalt gekoppelt. Somit gleicht die hepatische Cholesterinaufnahme einem selbstregulierten Kreislauf (31, 34).

Innerhalb der Hepatozyten können aus dem hydrophoben Cholesterin amphiphile Gallensäuren synthetisiert werden, welche den Hauptabbauweg für Cholesterin darstellen (35). Die Gallensäure-Synthese ist ein aufwendiger Prozess, welcher etwa 17 verschiedene Enzyme involviert (36). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gallensäure-Synthese wird von der *Cholesterol 7 alpha-hydroxylase (Cyp7a1)* katalysiert, ein Enzym der Cytochrom P450 Familie (17, 35, 36). Die Löslichkeit der Gallensäuren wird durch eine Konjugation mit Glycin oder Taurin erhöht, wodurch die Gallensalze entstehen (36). Nach abgeschlossener Synthese werden die Gallensalze in die Gallengänge abgegeben und gelangen in die Gallenblase (36).

Postprandial stimulieren steigende Konzentrationen des Hormons Cholecystokin eine Kontraktion der Gallenblase, wodurch die Galle mit dem Pankreassekret über die *Papilla duodeni major* in das Duodenum abgegeben wird (36). Innerhalb des Dünndarms bildet die Galle mit den in der Nahrung enthaltenen Lipiden die Mizellen und erleichtert so die Aufnahme der Nahrungslipide (36). Der Großteil der Gallensäuren (ca. 95 %) wird im Dünndarm über den *apical sodium-bile acid transporter (Asbt)* reabsorbiert, die verbleibenden Gallensäuren (ca. 5 %) werden mit der Fäzes ausgeschieden (37, 38). Die reabsorbierten Gallensäuren gelangen im Rahmen des enterohepatischen Kreislaufes zurück in die Leber und zirkulieren so mehrfach am Tag durch den Körper (37). Die aufgenommenen Gallensäuren können als Liganden für Rezeptoren fungieren. Der nukleäre *farnesoid X receptor (Fxr)*, welcher sowohl in Leber als auch im Darm exprimiert ist, wird primär von Gallensäuren aktiviert und übt einen regulatorischen Einfluss auf diverse Stoffwechselwege aus (39). So kann eine Aktivierung des *Fxr* zu einem negativen Feedback auf die Synthese der Gallensäuren führen, indem die *Cyp7a1* inaktiviert wird (38). Der *Fxr* trägt so zu einem konstanten Reservoir an Gallensäuren bei und reguliert über die Synthese der Gallensäuren die Cholesterinausscheidung.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des hepatischen Cholesterin-Metabolismus (modifiziert aus (1)).

Das Srebp-2 reguliert den intrazellulären Cholesteringehalt, indem es die Expression der Hmgcr, des Ldlr und der Pcsk9 reguliert. Die Hmgcr ist das Schlüsselenzym der endogenen Cholesterinbiosynthese und wird in therapeutischer Absicht durch Statine inhibiert. Endogen synthetisiertes Cholesterin wird in der Leber mit Triglyceriden in VLDL überführt, welches anschließend in das periphere Blut gelangt. In der Peripherie gibt das VLDL konsekutiv seine Triglyceride ab, wodurch zunächst das IDL und später das cholesterinreiche LDL entsteht. Das LDL gelangt über eine Interaktion mit dem Ldlr zurück in die Hepatozyten, welche von der Pcsk9 verhindert werden kann. Innerhalb der Hepatozyten kann das Cholesterin zu Gallensäuren umgewandelt und in der Gallenblase gespeichert werden. Die Cyp7a1, das Schlüsselenzym der Gallensäuren-Synthese, kann durch den nukleären Rezeptor Fxr inhibiert werden, welcher durch reabsorbierte Gallensäuren aktiviert wird.

## 2.3 Darm-Mikrobiom und Cholesterin-Metabolismus

Das Darm-Mikrobiom ist über verschiedene Mechanismen mit dem Cholesterin-Metabolismus verbunden. Darmbakterien können freies Cholesterin in ihre Zellmembranen einfügen, was ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber äußeren Einflüssen erhöht (40). Das eingefügte Cholesterin steht dem Körper somit nicht mehr zur Resorption zur Verfügung und wird mit den Bakterien über die Fäzes ausgeschieden (41). Inwieweit die bakterielle Cholesterinaufnahme zu einer verminderten intestinalen Absorption beiträgt ist allerdings fraglich, da nur ausgewählte Bakterien-Stämme diese Fähigkeit besitzen (41).

Weiterhin sind einige Darmbakterien in der Lage Cholesterin mithilfe einer Cholesterin-Reduktase zu Coprostanol umzuwandeln (41). Coprostanol wird im Vergleich zu Cholesterin in einem geringeren Ausmaß vom Körper absorbiert und vermehrt über die Fäzes ausgeschieden (41). Die Expression einer Cholesterin-Reduktase konnte in Bakterien der Gattungen *Eubacteria*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* und *Peptostreptococcus* nachgewiesen werden (20, 41). So ist beschrieben, dass der Umfang der Umwandlung von Cholesterin zu Coprostanol mit der Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms korreliert (20). Ein cholesterinsenkender Effekt der Coprostanol-Produktion ist allerdings umstritten, da dieser Effekt in einigen Studien nicht reproduzierbar war (41).

Möglicherweise wird die intestinale Cholesterinresorption auch direkt durch das Darm-Mikrobiom beeinflusst. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Zellen in Verbindung mit Bakterien der Gattung *Lactobacillus* eine verminderte Expression des *Npc1l1* aufwiesen, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen noch unklar sind (42, 43).

Zusätzlich beeinflussen die Darmbakterien den Gallensäuren-Metabolismus. Viele Darmbakterien besitzen die Möglichkeit zur Dekonjugation von primären Gallensäuren mithilfe der *bile salt hydrolase (BSH)*, wodurch unkonjugierte Gallensäuren und Aminosäuren frei werden (20, 44). Die Expression einer *BSH* ist mit einer erhöhten Toleranz der Bakterien gegenüber der antibakteriell wirksamen Galle verbunden (44). Durch Darmbakterien dekonjugierte Gallensäuren werden vermehrt mit der Fäzes ausgeschieden, da sie eine geringere Affinität zum *Asbt* aufweisen (19). Die verminderte Reabsorption der unkonjugierten Gallensäuren erhöht hierbei den Bedarf der *de novo* Synthese von Gallensäuren aus Cholesterin (41). Darmbakterien scheinen auch die Reabsorption der Gallensäuren über die Expression des *Asbt* direkt zu beeinflussen. So ist beschrieben, dass keimfreie Mäuse eine erhöhte Expression des *Asbt* aufweisen und weniger Gallensäuren mit der Fäzes ausscheiden (45).

Die Produktion von bioaktiven Metaboliten durch die Verstoffwechslung von Nahrungsbestandteilen nimmt ebenfalls Einfluss auf den Cholesterin-Metabolismus.

Einige Darmbakterien können in der Nahrung enthaltenes Cholin sowie Phosphatidylcholin verwenden um Trimethylamin zu produzieren, welches in der Leber zu Trimethylamin-N-Oxid (TMAO) verstoffwechselt wird (46). TMAO wird als proatherogen eingestuft, da es u.a. den physiologischen Cholesterin-Metabolismus beeinträchtigt. TMAO inhibiert den reversen Cholesterintransport, was eine vermehrte

Ablagerung von Cholesterin in Gefäßwänden und somit eine vermehrte Bildung von proatherogenen Schaumzellen begünstigt (46). Auch die *de novo* Synthese von Gallensäuren und somit die Ausscheidung von Cholesterin wird infolge einer reduzierten Expression der *Cyp7a1* durch das TMAO beeinträchtigt (46).

Die bei der bakteriellen Fermentation von Ballaststoffen freigesetzten kurzkettigen Fettsäuren (Acetat, Butyrat, Propionat) zeigen ebenfalls Auswirkungen auf den Cholesterin-Metabolismus. So kann Acetat zur Synthese von Cholesterin genutzt werden, wohingegen Propionat mit einer verminderten Cholesterinbiosynthese durch eine Inhibierung der *Hmgcr* in Verbindung gebracht wird (41, 47).

## 2.4 Glucagon like Peptide-1

Das *Glucagon like peptide-1* (*GLP-1*) ist ein von enteroendokrinen Darmzellen produziertes Peptidhormon, welches mit dem *Glucose dependent insulinotropic peptide* (*GIP*) die sog. Inkretine bildet. Inkretine werden in Abhängigkeit zur Nahrungsaufnahme von enteroendokrinen Zellen der Darmschleimhaut produziert und in den systemischen Kreislauf freigesetzt, wobei die ausgeschüttete Menge von Inkretinen proportional zur Größe der Mahlzeit ist (48). Das *GLP-1* wird in geringen Mengen auch nahrungsunabhängig sezerniert, sodass sich eine geringere basale Konzentration im Plasma auch bei nüchternen Individuen findet (49). Die Inkretine stellen ein Bindeglied zwischen der gastrointestinalen Nahrungsaufnahme und dem postprandialen Anstieg des Insulinspiegels dar, welcher der adäquaten Verteilung der aufgenommenen Glukose in die peripheren Gewebe dient. So führt eine orale Glukoseaufnahme zu einer stärkeren Sekretion von Insulin aus den  $\beta$ -Zellen des Pankreas im Vergleich zur intravenösen Verabreichung von Glukose, bei vergleichbaren Blutglukosespiegeln (49). Dieses Phänomen wird als Inkretin-Effekt bezeichnet (49). Man geht davon aus, dass die Wirkung der Inkretine für ca. 50 % der postprandialen Insulinsekretion verantwortlich ist (50). Die Wirkung der Inkretine trägt wesentlich dazu bei, dass gesunde Menschen ihre Blutglukosespiegel in relativ engen Grenzen halten können und die Insulinsekretion an die Nahrungsaufnahme angepasst wird (48).

Insbesondere das *GLP-1* wird noch mit weiteren Funktionen in Verbindung gebracht. Das *GLP-1* supprimiert die pankreatische Glucagon-Sekretion, vermindert den Appetit, verlangsamt Nahrungspassage durch den Magen und scheint auch multiple protektive Effekte auf das kardiovaskuläre System auszuüben (48, 49, 51, 52). Das *GLP-1* entsteht



durch die posttranslationale Modifikation des Präproteins Präproglucagon, welches vom *Glucagon-Gene (Gcg)* codiert wird (49, 50). Das *Gcg* wird in mehreren Geweben exprimiert (Darm, Pankreas, Neuronen), wobei die posttranslationale Modifikation des Präproglucagons durch Prohormon-Konvertasen (PC) gewebespezifisch verläuft (53). Im Darm wird das *Gcg* von den L-Zellen exprimiert, welche sich in der Darmschleimhaut befinden (49, 53). L-Zellen sind über den gesamten Darm verteilt, wobei sich die höchste Dichte an L-Zellen im Ileum und im Kolon befindet (53). Innerhalb der L-Zellen kommt es zur spezifischen posttranslationalen Prozessierung des Präproglucagons durch die PC-1/3, welche vom *Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 1 -Gene (Pcsk1)* codiert wird (53, 54). Im Rahmen der posttranslationalen Modifizierung entstehen so die Peptidhormone *GLP-1*, *GLP-2*, *Oxyntomodulin*, *Glicentin* und *Intervening peptide* (54). Sezerniert wird das *GLP-1* in seiner aktiven (amidierten) Form, welche ein aus 30 Aminosäuren bestehendes Peptid darstellt (*GLP-1 (7-36) NH<sub>2</sub>*), das spezifisch an den *GLP-1-Rezeptor (GLP-1-R)* binden kann (48). Jedoch wird das biologisch aktive *GLP-1 (7-36)* rasch von der ubiquitär vorkommenden *Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4)* inaktiviert, sodass die Halbwertszeit des aktiven *GLP-1* lediglich bei 1–2 Minuten liegt (48). Durch die *DPP-4* vermittelte Abspaltung eines Dipeptids (Histamin–Alanin) am N-terminalen Ende des *GLP-1* entsteht das *GLP-1 (9-36)*, welches keine Wirkung auf den *GLP-1-R* zeigt (48). Dennoch scheint auch das *GLP-1 (9-36)* eine physiologische Funktion zu erfüllen, insbesondere hinsichtlich der Wirkung des *GLP-1* auf das kardiovaskuläre System, wobei die genauen Mechanismen noch ungeklärt sind (51). In der Behandlung des Diabetes mellitus, speziell des T2DM, macht man, über den Einsatz von *GLP-1-Rezeptor-Agonisten (GLP-1-RA)* und *DPP-4-Inhibitoren*, Gebrauch von der Inkretin-Wirkung auf den Insulin-Metabolismus.

## 2.5 Darm-Mikrobiom und *Glucagon like Peptide-1*

Die Sekretion des *GLP-1* aus den enteroendokrinen L-Zellen ist unter anderem an die Nahrungsaufnahme gekoppelt (49, 50, 53). Aufgrund ihrer epithelialen Lokalisation kommen die L-Zellen in direkten Kontakt mit den Nahrungsbestandteilen, was zu einem Stimulus für die Sekretion des *GLP-1* umgewandelt wird. Dabei variiert die Stärke des Stimulus mit der Zusammensetzung und Größe der Mahlzeit (49, 50). Insbesondere Glukose, Kohlenhydrate, Triglyceride, Aminosäuren und Proteine sind in der Lage die *GLP-1*-Sekretion zu stimulieren (49). Möglicherweise ist auch das Darm-Mikrobiom und

seine Metaboliten an der Regulation der Sekretion des *GLP-1* beteiligt. Von Darmbakterien produzierte kurzkettige Fettsäuren können an die G-Protein gekoppelten Rezeptoren 41 und 43 (auch bekannt als *FFAR2*, *FFAR3*) der L-Zellen binden und durch deren Aktivierung die Sekretion von *GLP-1* stimulieren (55). In einer experimentellen Studie an Mäusen konnte anhand von Propionat-Injektionen in das Kolon und in Zellkulturexperimenten mit Darmzellen murinen Ursprungs nachgewiesen werden, dass die kurzkettige Fettsäure Propionat über die Bindung an den *FFAR2* die Sekretion von *GLP-1* stimuliert (56). Weiterhin stellten die Autoren dieser Studie die Theorie auf, dass viele der Nahrungsbestandteile, welche die *GLP-1*-Sekretion stimulieren können, bereits resorbiert werden, bevor sie die Darmabschnitte erreichen, in denen sich die höchste Konzentration an L-Zellen befindet (Ileum und Kolon) (56). Gleichzeitig ergeben sich in diesen Darmabschnitten (Ileum, Kolon) die höchsten Konzentrationen an kurzkettigen Fettsäuren (u.a. Propionat), da hier die bisher unverdauten Nahrungsbestandteile von den Darmbakterien fermentiert werden (56). Die Koinzidenz der maximalen Konzentration von kurzkettigen Fettsäuren in den Darmabschnitten, welche den Großteil der L-Zellen beherbergen, könnte für eine physiologische Bedeutung der Darm-Mikrobiom abhängigen Metaboliten in der Regulation der Sekretion des *GLP-1* sprechen (56).

Allerdings werden neben den Nahrungsbestandteilen sowie kurzkettigen Fettsäuren auch weitere neuronale und endokrine Mechanismen diskutiert, welche die Nahrungsaufnahme in einen Stimulus für die Sekretion des *GLP-1* umwandeln können (50, 53). So ist ein Anstieg der *GLP-1*-Sekretion bereits kurz nach der Nahrungsaufnahme zu erwarten, trotz der überwiegend aboralen Lokalisation der L-Zellen innerhalb des GIT (49). Zudem konnte gezeigt werden, dass keimfreie Mäuse eher erhöhte basale Plasmaspiegel an *GLP-1* im Vergleich zu konventionellen Kontrollmäusen aufweisen (57), was gegen eine mikrobielle Beteiligung an der Regulation des *GLP-1*-Metabolismus spricht.

## 2.6 Kardiometabolische Erkrankungen und Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine Erkrankung, welche das arterielle Gefäßsystem betrifft. Kardiovaskuläre Erkrankungen wie Herzinfarkt und Schlaganfall, welche sekundär zur Atherosklerose auftreten, stellen eine der Haupttodesursachen der westlichen Zivilisation

dar. Allein in Europa sterben jährlich über 4 Millionen Menschen an atherosklerotisch bedingten kardiovaskulären Erkrankungen (21).

Pathophysiologisch kommt es zu Ablagerungen, sog. Plaques, innerhalb der arteriellen Gefäßwände (58). Bedingt sind die Plaques durch mehrere pathologische Faktoren. Zunächst kommt es aufgrund einer verminderten Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid zu einer abnorm veränderten Funktion der Endothelzellen, welche als endotheliale Dysfunktion bezeichnet wird (59). Durch die endotheliale Dysfunktion, welche als Reaktion auf bestimmte Stimuli wie Dyslipidämie, Hypertonie oder auch Insulinresistenz auftreten kann, exprimieren die Endothelzellen vermehrt Adhäsionsmoleküle, welche zu einer erhöhten Konzentration von Immunzellen innerhalb der Gefäßwand führen (58). Zeitgleich erhöht sich die Permeabilität des Endothels, was cholesterinreichen Lipoproteinen, insbesondere dem *LDL*, den Übertritt in die Gefäßwand erleichtert (58). Innerhalb der Gefäßwand interagieren die Lipoproteine mit der extrazellulären Matrix, wodurch sie die Gefäßwand nicht mehr verlassen können (21). Die in der Gefäßwand befindlichen Lipoproteine werden nun konsekutiv von Makrophagen aufgenommen. Es kommt zu Akkumulation des Cholesterins innerhalb der Makrophagen und zur Bildung von Schaumzellen, da Makrophagen Cholesterin nicht abbauen können (58). Die Bildung von Schaumzellen mündet schließlich in der Entwicklung einer atheromatösen Plaque (58). Zudem wandern glatte Muskelzellen in die Plaque ein und produzieren extrazelluläre Matrix (Kollagen, Elastin), welche die Plaque als fibröse Kappe bedecken (58). Innerhalb der Plaque kommt es zur Apoptose von Schaumzellen und zur Ausbildung eines nekrotischen Kerns bestehend aus Zellresten und extrazellulär akkumulierten Lipiden (58). Besteht dieser Prozess über einen längeren Zeitraum statt, kann eine Stenose entstehen, welche durch einen reduzierten Blutfluss zu einer Hypoxie des hinter der Stenose liegenden Gewebes führen kann. Die Stenose kann über den reduzierten Blutfluss zu einer klinischen Manifestation der Atherosklerose führen, beispielsweise im Rahmen pektangiöser Beschwerden (60). Durchbricht eine Plaque das Endothel, so kommt die prokoagulatorische fibröse Kappe in Kontakt mit dem Blut, was in der Entstehung von Thromben resultiert (58). Durch diese Thrombusformation kann es zum Verschluss des Gefäßes kommen, was sich klinisch als Infarkt präsentiert.

Die Entstehung der Atherosklerose wird durch mehrere Risikofaktoren begünstigt. Neben den Lebensstil betreffenden Faktoren (Nikotinabusus, Bewegungsmangel, erhöhtes Körpergewicht), stellen insbesondere kardiometabolische Erkrankungen (Diabetes mellitus, Dyslipidämie,) und die arterielle Hypertonie entscheidende Risikofaktoren für die

Entstehung der Atherosklerose und dem resultierenden kardiovaskulären Risiko dar (21). Erhöhte Plasmaspiegel cholesterinreicher Lipoproteine zeigen eine lineare Assoziation mit dem atherosklerotisch bedingten kardiovaskulären Risiko (21, 58). Die Entwicklung von Plaques korreliert dabei vor allem mit der Konzentration des *LDL*-Plasmaspiegels und dem Expositionszeitraum (21). Präventionsstrategien zur Vermeidung kardiovaskulärer Ereignisse auf Grundlage atherosklerotischer Gefäßveränderungen haben daher eine Reduktion des cholesterinreichen *LDLs* zum Ziel. Neben Veränderungen im Lebensstil werden, je nach individuellem Risiko, auch Medikamente empfohlen. Die Substanzklasse der Statine stellt hierbei die erste Wahl für eine medikamentöse Therapie einer Hypercholesterinämie dar (21). Statine inhibieren die hepatische *Hmgcr*, wodurch es zu einem intrazellulären Cholesterinmangel kommt, welcher durch eine erhöhte Expression des *Ldlr* ausgeglichen wird (21). Durch eine erhöhte Expression des *Ldlr* kommt es zu einer Reduktion der Plasmakonzentration des *LDL* (21). Die Wirkung der Statine unterliegt jedoch einer erheblichen interindividuellen Varianz (61). Die Kausalität, welche der interindividuellen Varianz zugrunde liegt, wurde bislang nicht abschließend geklärt (61). Neben möglichen Einflüssen von Geschlecht, Alter, Ernährung und Körpergewicht, werden auch Zusammenhänge mit der Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms diskutiert (47, 61).

Weiterhin wird in der aktuellen kardiovaskulären Forschung auch ein Fokus auf einen möglichen cholesterinsenkenden Effekt der Darm-Mikrobiom abhängigen Metabolite gerichtet. Besonders vielversprechend scheinen die vom Darm-Mikrobiom produzierten kurzkettigen Fettsäuren zu sein. So ist ein cholesterinsenkender Effekt ballaststoffreicher Nahrung bereits in den Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie zur Behandlung von Dyslipidämien festgehalten (21).

Auch der Diabetes mellitus ist mit mikro- und makrovaskulären Erkrankungen assoziiert (62). Insbesondere an T2DM erkrankte Patienten\*innen sind überproportional häufig von kardiovaskulären Erkrankungen, speziell von der koronaren Herzkrankheit, betroffen, welche die Haupttodesursache für diese Patienten\*innen darstellt (62). Pathophysiologisch führen langfristig erhöhte Blutglukosespiegel und eine Insulinresistenz zu einem vermehrten oxidativen Stress, welcher auch die Endothelschicht der arteriellen Gefäße betrifft und eine endotheliale Dysfunktion induzieren kann (63). Zeitgleich kommt es bei einer peripheren Insulinresistenz zu einer vermehrten Lipolyse des viszeralen Fettgewebes mit einer gesteigerten Freisetzung von

freien Fettsäuren, welche eine Dyslipidämie mit einer Risikoerhöhung für die Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen begünstigt (63).

In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Einnahme von *GLP-1*-RA zu einer reduzierten Rate an kardiovaskulären Ereignissen bei Patienten\*innen mit T2DM führte (64, 65). Ebenso wurde festgestellt, dass eine Behandlung mit *GLP-1*-RA im Rahmen eines akuten Koronarsyndroms zu einer reduzierten Infarktgröße und einer verbesserten linksventrikulären Funktion bei Patienten\*innen mit Myokardinfarkt führen konnte (52). In weiteren experimentellen Forschungsarbeiten zeigten sich Hinweise für protektive Effekte des *GLP-1* auf das kardiovaskuläre System zusätzlich zum regulatorischen Effekt auf den Insulin-Metabolismus (51, 52). So konnte im Mausmodell bei Anwendung von *GLP-1*-RA eine verminderte Expression pro-inflammatorischer Gene (*Matrix-Metalloproteinase-3*, *Cluster of Differentiation 163*) im aortalen Gewebe und eine Reduktion atherosklerotischer Läsionen nachgewiesen werden (66). Darüber hinaus konnte in Mäusen, welche gesteigerte *GLP-1*-Plasmakonzentrationen aufgrund eines Mangels einer spezifischen Untergruppe an intraepithelialen T-Lymphozyten (*integrin-β7<sup>-/-</sup>*-Mäuse) aufweisen, gezeigt werden, dass diese unter einer cholesterinreichen Diät signifikant reduzierte Cholesterinspiegel im Plasma aufweisen (67). Da vom Darm-Mikrobiom produzierte kurzkettige Fettsäuren (e.g. Propionat) möglicherweise Einfluss auf die *GLP-1*-Sekretion nehmen, könnte diese Beobachtung in Zusammenhang mit dem vermuteten cholesterinsenkenenden Effekt einer ballaststoffreichen Ernährung stehen. Aus einer möglichen Darm-Mikrobiom abhängigen Modulation des *GLP-1*-Metabolismus könnte ein therapeutischer Ansatz für Patienten\*innen mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko im Zuge kardiometabolischer Erkrankungen (T2DM, Hypercholesterinämie) resultieren.

## 2.7 Zielsetzung

Die Modulation kardiometabolischer Erkrankungen und daraus resultierenden kardiovaskulären Erkrankungen durch das Darm-Mikrobiom rückt verstärkt in den Fokus der kardiovaskulären Forschung. Insbesondere die Erforschung des Darm-Mikrobioms hinsichtlich seiner Rolle für den kardiovaskulär bedeutsamen Metabolismus, sowie für Therapie- und Präventionsstrategien kardiovaskulärer Erkrankungen birgt potentiell neue Erkenntnisse hinsichtlich der Pathogenese und der Therapie der Atherosklerose (68).

Ziel meiner Forschungsarbeit ist es, mögliche Interaktionen zwischen Darm-Mikrobiom und Cholesterin– sowie *GLP-1*-Metabolismus zu untersuchen.

Für die Analyse der möglichen Beeinflussung des Cholesterin-Metabolismus durch das Darm-Mikrobiom wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- 1) Verändert sich die Expression hepatischer und intestinaler Cholesterin-regulierender Gene im Zuge einer Depletion des Darm-Mikrobioms?
- 2) Verändert sich die metabolische Reaktion auf Genexpressionsebene (hepatisch und intestinal) durch eine hochfettreiche Diät im Zuge einer Depletion des Darm-Mikrobioms?
- 3) Verändert sich der regulatorische Effekt von Atorvastatin auf die Expression hepatischer und intestinaler Cholesterin-regulierender Gene im Zuge einer Depletion des Darm-Mikrobioms?

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wurden Analysen an Proben murinen Ursprungs durchgeführt.

Für die Analyse der möglichen Beeinflussung des *GLP-1*-Metabolismus durch das Darm-Mikrobiom wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- 4) Beeinflusst der Darm-Mikrobiom abhängige Metabolit Propionat die Expression intestinaler Gene des *GLP-1*-Metabolismus?
- 5) Beeinflusst eine orale Supplementation mit dem Darm-Mikrobiom abhängigen Metaboliten Propionat nachhaltig die *GLP-1*-Plasmakonzentration?

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wurden Analysen an Proben sowohl murinen ( 4) ), als auch humanen Ursprungs ( 5) ) durchgeführt.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Tierhaltung und tierexperimentelle Versuche

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien (Tierhaltung und tierexperimentelle Versuche)

Haarnetz	B. Braun Melsungen AG
Mundschutz	B. Braun Melsungen AG
Handschuhe/ sterile Handschuhe	B. Braun Melsungen AG
Spritzen, 1ml	B. Braun Melsungen AG
Falcons (50ml, 10ml)	Becton Dickinson (BD)
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf

Tabelle 2: Geräte (Tierhaltung und tierexperimentelle Versuche)

Käfige	Tecniplast
Trinkflaschen	Tecniplast

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien (Tierhaltung und tierexperimentelle Versuche)

Ethanol	Carl Roth
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich
Atorvastatin	Sigma-Aldrich
MiliQ	Merckmillipore
Propionat (PA)	Sigma-Aldrich (Calcium-Propionat)
Antibiose–Cocktail	Siehe 3.2.4.1
Dulbeccos phosphate buffered saline 1X	Thermo Fisher Scientific™

Tabelle 4: Inhaltsstoffe der Spezialdiäten (Standarddiät (SCD), Hochfettreiche Diät (HFD)) (ssniff Spezialdiäten GmbH) (Tierhaltung und tierexperimentelle Versuche)

<b><u>Inhaltsstoff</u></b>	<b><u>SCD (Kat.: E15000)</u></b>	<b><u>HFD (Kat.: E15741)</u></b>
Trockensubstanz	95,2%	94,0%
Rohprotein	20,8%	24,1%
Rohfett	4,2%	34,6%

- Cholesterin (mg/kg)	14 mg/kg	290 mg/kg
Rohfaser	5,0%	6,0%
Rohasche	5,6%	6,1%
Stickstoff – freie Extrakte	59,4%	23,3%
Stärke	46,8%	0,5%
Zucker	10,8%	9,5%
Dextrin	/	15,3%

Tabelle 5: Versuchstiere (Tierhaltung und tierexperimentelle Versuche)

<i>C57BL/6J</i>	Charles River
<i>C57BL/6J, ApoE<sup>-/-</sup></i>	Charles River

### 3.1.2 Molekularbiologische Experimente

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien (Molekularbiologische Experimente)

Handschuhe	B.Braun Melsungen AG
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf
Filter–Tip Pipettenspitzen	Sarstedt AG (Biosphere® plus)
Falcons (50ml)	Becton Dickinson (BD)
96–Well Platten farblos	Biozym
96–Well Adhäsionsfolie	4titude (4ti-0560)

Tabelle 7: Geräte (Molekularbiologische Experimente)

Pipetten	Eppendorf
<i>Pellet Pestle Motor</i>	Thermo Fisher Scientific™
<i>Pellet Pestles</i>	Merck
Zentrifuge	Eppendorf
Vortexmischer	IKA
<i>Thermomixer</i>	Eppendorf
<i>NanoDrop 2000</i>	Thermo Fisher Scientific™
<i>Thermocycler</i>	Eppendorf
Plattenzentrifuge	Eppendorf
„ <i>StepOnePlus™ Real time PCR-System</i> “	Applied Biosystems™



**Tabelle 8: Chemikalien und Reagenzien (Molekularbiologische Experimente)**

Aqua dest. (Filtermaschine)	VWR
Ethanol	Carl Roth
Chloroform	Merck
Isopropanol	AppliChem
<i>Aqua ad injectabilia</i>	B. Braun Melsungen AG

**Tabelle 9: Kits (Molekularbiologische Experimente)**

<i>TRizol</i>	Thermo Fisher Scientific™ (15596026)
„ <i>DNase I, RNase free</i> “	Thermo Fisher Scientific™ (EN0521)
„ <i>High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit</i> “	Applied Biosystems™ (4368814)
„ <i>TaqMan™-RNA-to-cDNA-Kit</i> “	Applied Biosystems™ (4387406)
<i>RNase-Inhibitor</i>	Applied Biosystems™ (N8080119)
„ <i>TaqMan™ Gene Expression Master Mix</i> “	Applied Biosystems™ (4369016)
„ <i>TaqMan™ Gene Expression Assay (FAM)</i> “	Applied Biosystems™ (4331182)

**Tabelle 10: „*TaqMan™ Gene Expression Assays (FAM)*“ (Applied Biosystems™; Kat.: 4331182) (Molekularbiologische Experimente, modifiziert aus (1))**

<b>Gen</b>	<b>Spezies</b>	<b>Assay-ID</b>
<i>Abca1</i>	Maus	Mm00442646_m1
<i>Abcg5</i>	Maus	Mm00446241_m1
<i>Acat2</i>	Maus	Mm00782408_s1
<i>Asbt</i>	Maus	Mm00488258_m1
<i>Cyp7a1</i>	Maus	Mm00484150_m1
<i>Fxr</i>	Maus	Mm00436425_m1
<i>Gapdh</i>	Maus	Mm99999915_g1
<i>Gcg</i>	Maus	Mm00801714_m1
<i>Hmgcr</i>	Maus	Mm01282499_m1
<i>Ldlr</i>	Maus	Mm01177349_m1
<i>Npc1l1</i>	Maus	Mm01191973_m1
<i>Pcsk1</i>	Maus	MM00479023_m1
<i>Pcsk9</i>	Maus	Mm01263610_m1

<i>Srb1</i>	Maus	Mm00450234_m1
<i>Srebp2</i>	Maus	Mm01306292_m1

### 3.1.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Tabelle 11: Verbrauchsmaterialien (*ELISA*)

Handschuhe	B. Braun Melsungen AG
Pipettenspitzen	Sarstedt AG
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf
Aqua dest. (Filtermaschine)	VWR

Tabelle 12: Geräte (*ELISA*)

Pipetten	Eppendorf
Multipipette (8-Kanal)	Eppendorf
Mikrotiterplatten-Schüttler	Ditabis
„TECAN Infinite 200 Pro“	TECAN
Vortexmischer	IKA

Tabelle 13: Kits (*ELISA*)

„Multi Species GLP-1 Total ELISA“	Merck Millipore; Kat.: EZGLP1T-36K
-----------------------------------	------------------------------------

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Tierexperimentelle Versuche

Für die tierexperimentellen Versuche wurde der Inzuchtstamm *C57Bl/6J* der Tierart *Mus Musculus* (Hausmaus) verwendet.

Vor Durchführung der Tierversuche wurde die Berechtigung zur „Durchführung von Verfahren an Tieren“ (Funktion A), gemäß Art. 23 Abs. 2a RL 2010/63 i.V.m. Anhang V und §16 TierSchVersV i.V.m. Anlage 1 Abschnitt 3, durch den erfolgreichen Abschluss des tierexperimentellen Basisfachkurses Maus/Ratte der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) der Charité-Universitätsmedizin Berlin erlangt. Die Planung und Durchführung der tierexperimentellen Versuche fand im Einklang mit geltenden Deutschen und Europäischen Tierschutzgesetzen sowie unter Beachtung des Leitfadens *3<sup>R</sup>–Replace–Reduce–Refine* zur Stärkung des Tierschutzes statt. Die Notwendigkeit des Tierversuches für die Beantwortung der wissenschaftlichen Fragestellungen meiner Forschungsarbeit begründet sich darin, dass die Komplexität des Darm-Mikrobioms und dessen systemischer Einfluss auf den Wirts–Metabolismus *in vitro* nicht ausreichend simuliert werden kann. Die Tierversuchsanträge wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales in Berlin (LAGeSo-Berlin) geprüft und genehmigt (G0295/16).

### 3.2.2 Tierhaltung

Tierhaltung und Forschungsversuche wurden in einer spezifisch pathogenfreien-Tierhaltungsanlage am Experimentalstandort der Charité–Campus Benjamin Franklin durchgeführt. Die Tiere wurden bei einem Tag-Nacht-Zyklus von jeweils 12 Stunden bei 20°C Raumtemperatur gehalten. Zugunsten der Stressreduktion wurden die Versuchstiere in Gruppen (n=3–5) gehalten und die Käfige mit autoklaviertem Papier ausgestattet. Es wurden ausschließlich weibliche Mäuse zu Versuchszwecken verwendet, da diese eine geringere Aggressivität gegenüber Artgenossen zeigen und sich somit besser für eine Käfighaltung eignen.

Allen Tieren wurde eine Akklimatisationsphase von 2 Wochen vor Versuchsbeginn gewährt. Vor und während des Versuches wurde den Tieren der Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum* ermöglicht. Die Interaktion und Behandlung der Versuchstiere fand stets unter der Beachtung aseptischer und, falls erforderlich, steriler Kautelen (Haarnetz, Mundschutz, unsterile/sterile Handschuhe, aseptische/sterile Materialien, Schutzkittel)

statt. Während der Versuchsdurchführung kam es zur täglichen Visite der Versuchstiere, unter Beachtung etwaiger Abbruchkriterien des Tierversuches für die einzelnen Versuchstiere.

### 3.2.3 Euthanasie der Versuchstiere und Probenentnahme

Die tierexperimentellen Versuche endeten nach jeweils 6 Wochen mit der Euthanasie der Versuchstiere. Zur Euthanasie wurde den einzelnen Mäusen innerhalb eines abgeschlossenen Käfig-Systems Kohlenstoffdioxid (100 % CO<sub>2</sub>) zugeführt. Nach dem Aussetzen der Spontanatmung, wurde der Bewusstseinsverlust der Versuchstiere über den Ausfall des Zwischenzehenreflexes überprüft. Der endgültige und sichere Tod der Versuchstiere wurde durch die anschließende Entnahme von Herzblut sichergestellt. Im Anschluss wurden die Versuchstiere seziiert. Es wurden Organproben entnommen, welche ggf. mit einer Phosphat-gepufferten Salzlösung gespült wurden. Die Organproben wurden nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Anschluss bei -80°C gelagert.

### 3.2.4 Wildtyp – Mäuse

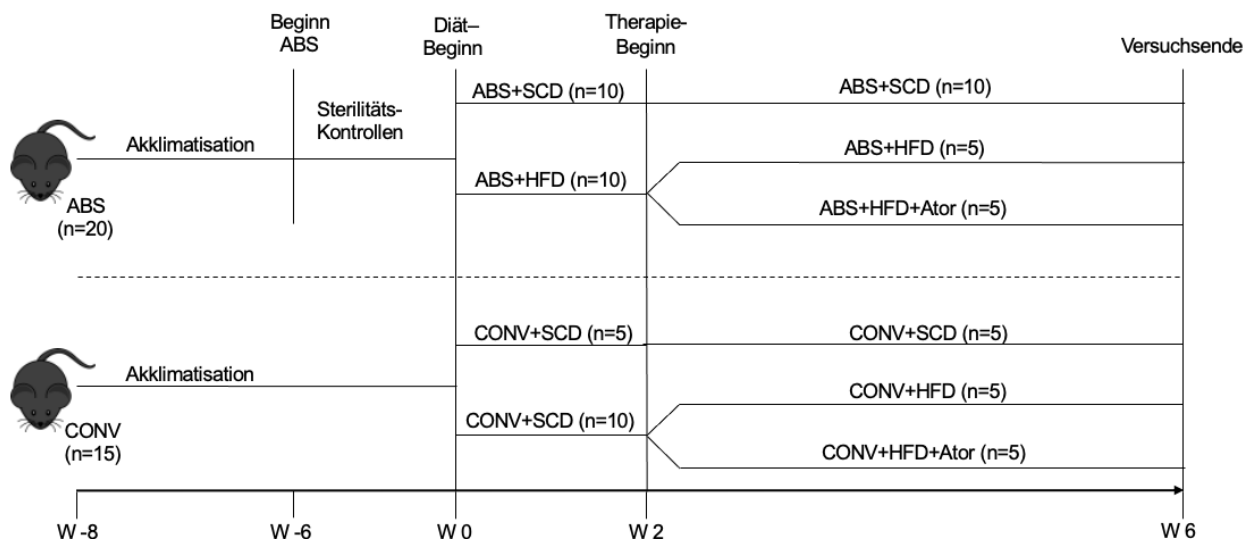
#### 3.2.4.1 Versuchsaufbau

Der tierexperimentelle Versuch wurde zur Analyse einer möglichen Einflussnahme des Darm-Mikrobioms am Cholesterin-Metabolismus und der cholesterinsenkenden Wirkung von Atorvastatin geplant und durchgeführt. Für den Versuch wurden 16 Wochen alte *C57BL/6J* Mäuse (Charles River; n=35) vor Beginn des Experimentes hinsichtlich des benötigten mikrobiellen Status (konventionelle Mäuse mit intaktem Darm-Mikrobiom (CONV) versus (vs.) antibiotisch behandelte Mäuse mit depletiertem Darm-Mikrobiom (ABS)) aufgeteilt. Zur Generierung sekundär gnotobiotischer Mäuse und Aufrechterhaltung des abiotischen Status wurde den Mäusen eine in Wasser gelöste und steril gefilterte Quintupel-Antibiose (Ampicillin/Sulbactam (1 g/L), Vancomycin (500 mg/L), Ciprofloxacin (200 mg/L), Imipenem (250 mg/L), Metronidazol (1 g/L)) über die gesamte Haltungs- und Versuchsdauer mit dem Trinkwasser *ad libitum* bereitgestellt (1). Die vollständige Depletion des Darm-Mikrobioms wurde vor Versuchsbeginn durch eine wöchentliche Analyse einer aus der Fäzes generierten Bakterienkultur überprüft (1). Gesichert wurde die Depletion des Darm-Mikrobioms durch eine molekularbiologische Analyse bakterieller 16S-ribosomaler-Ribonukleinsäure (16S-rRNA) in der Fäzes (1). Die

ABS-Mäuse wurden über die gesamte Haltungsdauer in autoklavierten Käfigen gehalten und unter strenger Beachtung steriler Kautelen behandelt (1). Nach 6 Wochen wurde der tierexperimentelle Versuch initiiert.

### 3.2.4.2 Versuchsdurchführung

Zu Beginn des tierexperimentellen Versuches wurden sowohl die CONV- (n=15), als auch die ABS-Mäuse (n=20) anhand der gefütterten Diät (Standarddiät (SCD) vs. Hochfettreiche Diät (HFD)) in jeweils zwei Subgruppen aufgeteilt (1). Nach 2 Wochen wurde einem Teil der Mäuse, welche die HFD erhielten, eine zusätzliche tägliche Atorvastatin-Therapie (10 mg/kg Körpergewicht, gelöst in 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in MiliQ) per oraler Gavage zugeführt (CONV+HFD+Ator (n=5), ABS+HFD+Ator (n=5)) (1). Es wurde eine orale Applikationsform gewählt, da dies die Applikationsform des Atorvastatins bei Menschen darstellt. Die restlichen Versuchstiere erhielten eine Kontrolltherapie (5 % DMSO in MiliQ), ebenfalls täglich per oraler Gavage (CONV+SCD (n=5), CONV+HFD (n=5), ABS+SCD (n=10), ABS+HFD (n=5)) (1). Die Verabreichung der Atorvastatin-Therapie bzw. der Kontrolltherapie wurde über 4 Wochen fortgeführt (1). Nach insgesamt 6 Wochen endete der tierexperimentelle Versuch mit der Euthanasie der Versuchstiere und Entnahme der Organproben (1).



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des tierexperimentellen Versuches der Wildtyp-Mäuse (modifiziert aus (1)).

6 Wochen vor Beginn des Experimentes (W -6) wurde mit der antibiotischen Behandlung der Mäuse begonnen (ABS) und die Eradikation des Darm-Mikrobioms sichergestellt (1). Das Experiment begann mit der Fütterung der Spezialdiäten (W 0). Nach 2 Wochen (W 2) wurde mit der Verabreichung der Behandlungen entsprechend der Versuchsgruppen (Kontrolle, Atorvastatin) begonnen (1). Nach 6 Wochen endete (W 6) der tierexperimentelle Versuch (1).

Im primären tierexperimentellen Versuch verstarben 3 Versuchstiere der Gruppe ABS+SCD (n=2). Daher wurde die Gruppe mit Versuchstieren eines nachfolgenden tierexperimentellen Versuches mit identischen Versuchsbedingungen aufgefüllt, wodurch eine von den anderen Gruppen abweichende Gruppengröße (ABS+SCD (n=10)) entstand.

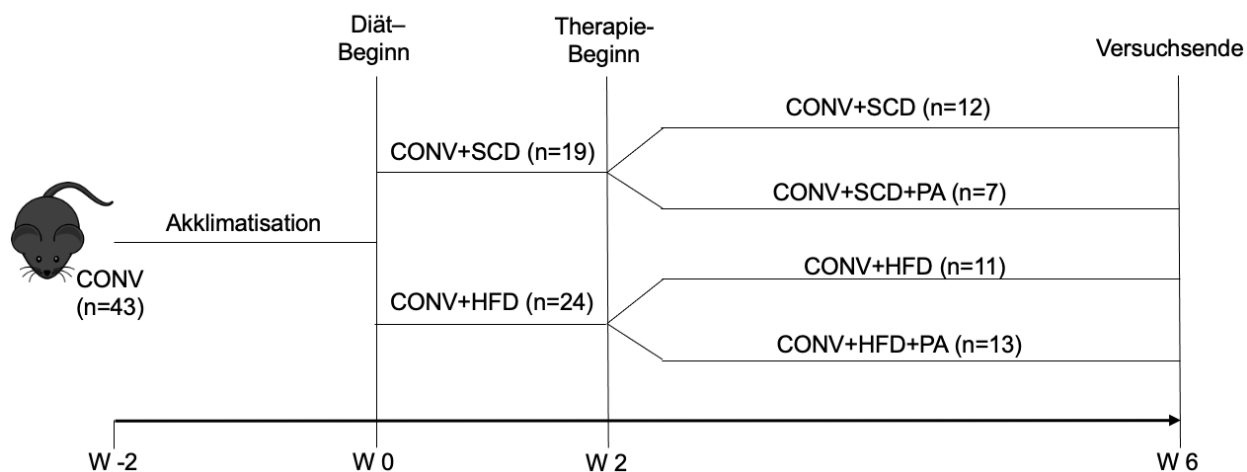
### 3.2.5 ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse

#### 3.2.5.1 Versuchsaufbau

Für diese Versuchsreihe wurden 16 Wochen alte *C57BL/6J* Mäuse (Charles River (n=43)) mit einer genetisch homozygoten Deletion des Apolipoprotein E Gens (ApoE<sup>-/-</sup>) und intaktem Darm-Mikrobiom verwendet (69). Der genetische Defekt des ApoE führt zu einer hypercholesterinämischen Stoffwechsellage, da die Absorption cholesterinreicher Lipoproteine über den *Ldlr* gestört ist. Aufgrund der hypercholesterinämischen Stoffwechsellage eignet sich das ApoE<sup>-/-</sup>-Mausmodell zur Erforschung von Atherosklerose. Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurde außerdem ein möglicher Einfluss des Darm-Mikrobiom abhängigen Metaboliten Propionat auf die Expression von intestinalen Genen des *GLP-1*-Metabolismus untersucht.

#### 3.2.5.2 Versuchsdurchführung

Zu Beginn des tierexperimentellen Versuches wurden die Versuchstiere anhand der gefütterten Diät (SCD vs. HFD) in zwei Subgruppen aufgeteilt. Nach 2 Wochen erhielt jeweils ein Teil der Subgruppen eine zusätzliche tägliche Behandlung mit an Calcium gebundenen Propionat (PA; 150 mM in MiliQ) per oraler Gavage (CONV+SCD+PA (n=7), CONV+HFD+PA (n=13)) (69). Calcium wurde als Trägersubstanz gewählt, da es im Vergleich zu weiteren erhältlichen Trägersubstanzen wie Natrium einen geringeren Einfluss auf die Blutdruckregulation nimmt. Die restlichen Versuchstiere erhielten jeweils eine tägliche Kontrollbehandlung (MiliQ) per oraler Gavage (CONV+SCD (n=12), CONV+HFD (n=11)) (69). Die Verabreichung der PA-Behandlung bzw. der Kontrollbehandlung wurde über 4 Wochen fortgeführt (69). Der orale Applikationsweg wurde gewählt, da das Propionat *in vivo* vom Darmmikrobiom produziert wird und vom Darm aus mit dem Stoffwechsel des Wirtes interagiert. Nach insgesamt 6 Wochen endete der tierexperimentelle Versuch mit der Euthanasie der Versuchstiere und Entnahme der Organproben (69).



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung des tierexperimentellen Versuches der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse (modifiziert aus (69)).

Nach einer zweiwöchigen Akklimatisationsphase wurde das Experiment mit der Verabreichung der Spezialdiäten gestartet (W 0) (69). Nach 2 Wochen wurde mit der Verabreichung der Behandlungen entsprechend der Versuchsgruppen (Kontrolle, PA) begonnen (69). Nach 6 Wochen endete (W 6) der tierexperimentelle Versuch (69).

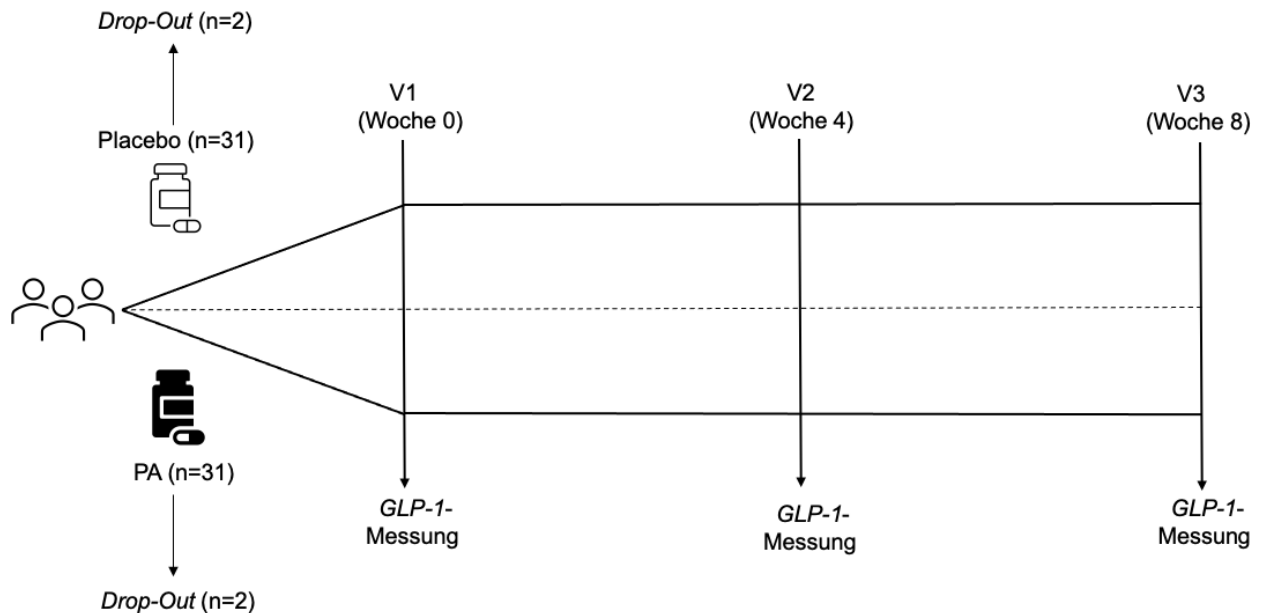
### 3.2.6 Humane Plasmaproben

Die aus einer klinischen Studie stammenden Plasmaproben wurden im Rahmen meiner Forschungsarbeit verwendet, um den Einfluss einer oralen Substitution des Darm-Mikrobiom abhängigen Metaboliten Propionat auf die Plasmakonzentration des *GLP-1* beim Menschen zu analysieren. Die zur Analyse genutzten Plasmaproben entstammen einer prospektiven, monozentrischen, Placebo-kontrollierten, doppelt-blinden, randomisierten Studie, mit 62 Teilnehmern\*innen im Alter zwischen 23-67 Jahren (69). Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin genehmigt, zudem wurde die Studie sowie das Studienprotokoll online registriert (clinicaltrials.gov, Identifizierungscode: NCT03590496) (69).

Da Propionat im Rahmen der bakteriellen Fermentation von Ballaststoffen im Darm entsteht, sollte mit der oralen PA-Supplementierung eine Augmentation bestehender Wechselwirkungen zwischen Propionat und dem *GLP-1*-Metabolismus erzielt werden.

Die Studienteilnehmer\*innen wurden bei Studieneinschluss in zwei Gruppen (Placebo vs. PA) randomisiert (69). Über einen Zeitraum von 8 Wochen nahmen die Studienteilnehmer\*innen jeweils zweimal am Tag 500 mg PA bzw. Placebo in magensaftresistenten Kapseln ein (69). Jeweils zu Studienbeginn (Woche 0 (V1)), zu Studienmitte (Woche 4 (V2)) und zu Studienabschluss (Woche 8 (V3)) wurden

Plasmaproben gewonnen, welche im Anschluss bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden (69). Zum Zeitpunkt der Probenentnahme sollten die Probanden\*innen nüchtern sein (69).



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung des Studiendesigns.

Zu Studienbeginn wurden die Probanden\*innen ( $n=62$ ) in einen der beiden Studienarme (Placebo vs. PA) eingeteilt (69). In beiden Studienarmen gab es jeweils zwei Drop-Outs. Zu Studienbeginn (V1), nach 4 Wochen (V2) sowie zu Studienabschluss (V3) wurden Plasmaproben gewonnen, welche auf ihre GLP-1-Konzentration untersucht wurden (69).

### 3.2.7 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.7.1 Prinzip der Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine wichtige und häufig genutzte Methode der molekularbiologischen Forschung. Die PCR ermöglicht es, gezielt Abschnitte der Desoxyribonukleinsäure (DNA) zu amplifizieren ohne die gesamte DNA zu kopieren (70). Zur Amplifikation spezieller Abschnitte der DNA benötigt ein PCR-Reaktionsansatz mehrere Bestandteile. Benötigt wird eine Pufferlösung, die zu vervielfältigende DNA-Probe (sog. Matrize) und die freien Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP`s) Adenin-Triphosphat, Thymin-Triphosphat, Guanin-Triphosphat und Cytosin-Triphosphat, welche als Grundgerüst für die komplementären DNA-Fragmente dienen (70). Weiterhin wird eine hitzestabile DNA-Polymerase benötigt, welche die neuen DNA-Fragmente synthetisiert, sowie Oligonukleotid-Primer, welche als Ansatzpunkt für die DNA-Polymerase dienen und spezifisch an den Teil der Matrize binden, welcher amplifiziert werden soll (70).



Die Amplifikation der DNA findet in drei Schritten statt, welche man zusammengefasst als Zyklus bezeichnet. Im ersten Schritt kommt es zur hitzevermittelten Auflösung der Wasserstoffbrückenbindungen der DNA und somit zur Trennung der doppelsträngigen DNA, was als Denaturierung bezeichnet wird (70). Im nächsten Schritt kommt es durch Kühlung des Reaktionsansatzes zur spezifischen Bindung der Oligonukleotid-Primer an ihre Zielsequenz innerhalb der einsträngig vorliegenden Matrize, was als Annealing bezeichnet wird (70). Anschließend binden hitzestabile DNA-Polymerasen an die Oligonukleotid-Primer und beginnen mit der Synthese eines zur Matrize komplementären DNA-Stranges unter Verwendung der dNTP's, was als Elongation bezeichnet wird (70). Ausgehend von einer perfekten Effizienz der PCR, welche mit einer Verdopplung des zu amplifizierenden Genabschnittes mit jedem Zyklus einhergeht, kommt es zu einem exponentiellen Anstieg des Genproduktes.

### 3.2.7.2 Prinzip der quantitativen Real Time-Polymerasekettenreaktion

Die quantitative Real Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) stellt eine modifizierte Variante der klassischen PCR dar, welche es erlaubt die Expression des zu untersuchenden Genabschnittes zu quantifizieren. Dazu wird die Amplifikation des Gens in Echtzeit gemessen, indem sie mithilfe verschiedener Techniken (*SYBR*, *TaqMan*) an eine Fluoreszenz-Sonde gekoppelt wird. Die Fluoreszenz verhält sich dabei proportional zum generierten Amplikon und ermöglicht über die Messung der Fluoreszenz eine Quantifizierung der Amplifikation.

Die Entwicklung der Fluoreszenz während der qRT-PCR kann in mehrere Phasen eingeteilt werden (71):

#### 1) Baseline

Zu Beginn der qRT-PCR kommt es mit Beginn der Amplifikation zu einem leichten Anstieg der Fluoreszenz (71). Die Intensität der Fluoreszenz liegt jedoch noch unterhalb der Hintergrundstrahlung und wird daher nicht vom Gerät detektiert (71).

#### 2) Frühe exponentielle Phase

Die Intensität der Fluoreszenz übersteigt nun die Intensität der Hintergrundstrahlung und übersteigt einen Grenzwert, den sog. *Threshold*, welcher zumeist die 10-fache Standardabweichung der *Baseline* darstellt (71).

Für jede Probe wird registriert zu welchem Zeitpunkt bzw. Zyklus die Fluoreszenz den *Threshold* überschreitet, was als *Cycle threshold (Ct)* bezeichnet wird (71).

### 3) Exponentielle Phase

Während der exponentiellen Phase kommt es unter perfekten Reaktionsbedingungen mit jedem Zyklus zu einer Verdopplung des Genproduktes, wodurch auch die Fluoreszenz der Proben ansteigt (71).

### 4) Plateau Phase

Sind die Reaktionskomponenten der qRT-PCR (z.B. dNTPs, Sonden etc.) verbraucht, stagniert die exponentielle Amplifikation und somit die Intensität der Fluoreszenz, welche nun nicht mehr für die Quantifizierung genutzt werden kann (71). Die Intensität der Fluoreszenz der einzelnen Proben nähert sich wieder an.

Grundlage der Quantifizierung der Genexpression stellt der *Ct*-Wert dar. Die Konzentration des Amplikons während der exponentiellen Phase ist direkt proportional zur Ausgangskonzentration des zu untersuchenden Genabschnittes (72). Je größer die Konzentration des zu untersuchenden Genabschnittes vor Eintritt in die exponentielle Phase der Amplifikation ist, desto weniger Zyklen werden benötigt, um den *Threshold* zu überschreiten (72). Je niedriger der *Ct*-Wert ist, desto größer ist die Ausgangskonzentration des zu untersuchenden Genabschnittes in der Probe (72).

#### 3.2.7.3 TaqMan-Assay (FAM)

*TaqMan*-Assays sind eine weit verbreitete Methode, welche im Rahmen der qRT-PCR genutzt werden. *TaqMan*-Assays beinhalten zusätzlich zu spezifischen Oligonukleotid-Primern eine *TaqMan*-Sonde. Die *TaqMan*-Sonde besitzt an ihrem 5`Ende einen fluoreszierenden Farbstoff (z.B. 6-carboxyfluorescein (FAM)) und an ihrem 3`Ende einen sog. *Quencher* (72). Ist die *TaqMan*-Sonde intakt verhindert der *Quencher* aufgrund seiner räumlichen Nähe zum Farbstoff eine Emission der Fluoreszenz, im Rahmen des sog. Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers (72).

Während der Elongation des zu untersuchenden Genabschnittes kommt es durch die 5`Nukleaseaktivität der Taq-Polymerase zur Spaltung der *TaqMan*-Sonde (72). Der Farbstoff dissoziiert vom *Quencher* und beginnt zu fluoreszieren (72). Die vom Farbstoff ausgehende Fluoreszenz kann nun mithilfe spezieller *Thermocycler* gemessen werden,

wobei die Intensität der Fluoreszenz proportional zur Konzentration des Amplikons ansteigt (72).

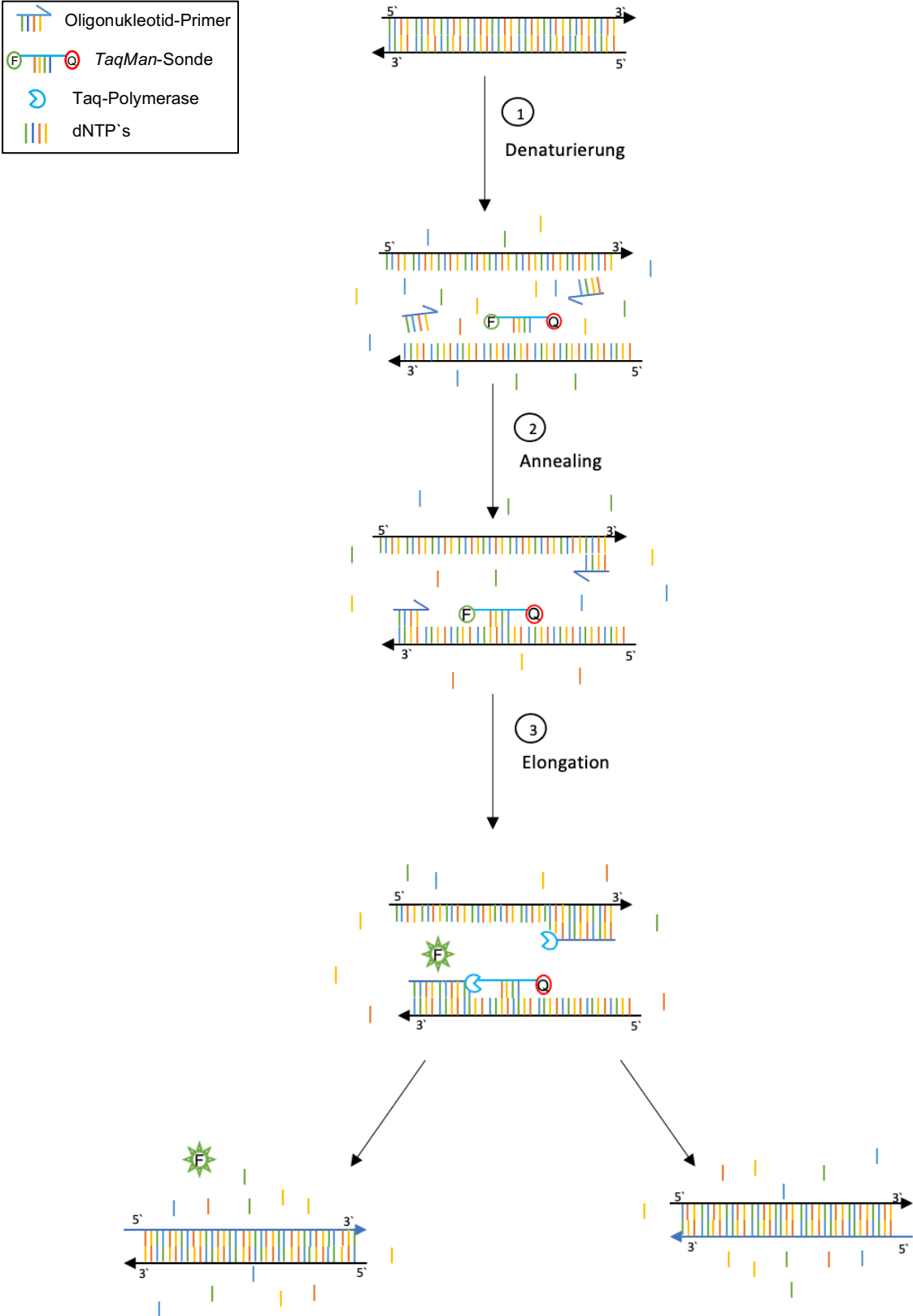


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines qRT-PCR-Zyklus (modifiziert aus (72)).

Während der Denaturierung (1) kommt es zur Auflösung der Wasserstoffbrückenbindungen der Matrize und zur Trennung der DNA-Doppelhelix. Im Zuge des Annealing (2) binden die Oligonukleotid-Primer und TaqMan-Sonden spezifisch an den zu amplifizierenden Genabschnitt. Während der Farbstoff an die Sonde gebunden ist, verhindert der Quencher die Emission der Fluoreszenz. Im Zuge der Elongation (3) bindet die Taq-Polymerase an die Oligonukleotid-Primer und amplifiziert den Genabschnitt unter Verwendung der dNTP's. Dabei spaltet die Taq-Polymerase die TaqMan-Sonde, der Farbstoff (F) dissoziiert vom Quencher (Q) und beginnt zu fluoreszieren. Die Fluoreszenz steigt proportional zur Amplifikation des zu untersuchenden Gens an.

### 3.2.8 Durchführung der qRT-PCR

Nachfolgend wird in chronologischer Reihenfolge dargelegt, wie mit den im Rahmen der tierexperimentellen Versuche (3.2.4, 3.2.5) gewonnenen Organproben eine qRT-PCR zur Bestimmung der *messenger*-Ribonukleinsäure (mRNA) -Expression durchgeführt wurde.

#### 3.2.8.1 Isolation der Ribonukleinsäure

Die Isolation der Ribonukleinsäure (RNA) wurde unter größtmöglicher Vermeidung einer Kontamination durchgeführt. Alle Pipettierschritte wurden unter Verwendung von Handschuhen bei Raumtemperatur mit RNase-freien Pipettenspitzen mit Filterschutz durchgeführt. Die Isolation der RNA wurde mit *TRizol* durchgeführt, welches eine Lösung aus Phenol, Guanidin Isothiocyanat und weiteren Bestandteilen darstellt.

Von den gesammelten Organproben wurden jeweils einheitliche Stücke mit einem sterilen Skalpell abgetrennt und in RNase-freie Mikroreaktionsgefäße überführt.

Auf das entnommene Gewebe wurde *TRizol* (350 µl) gegeben. Anschließend wurde das Gewebe mittels autoklavierter *Pellet-Pestles* und dem zugehörigen *Pellet-Pestle Cordless Motor* für 30–45 Sekunden homogenisiert. Nach abgeschlossener Homogenisierung wurde erneut *TRizol* (350 µl) auf die Probe pipettiert. Im Folgenden wurde die Probe für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde auf das Gewebe-*TRizol*-Gemisch Chloroform (140 µl) pipettiert. Die Reagenzien wurden durch händisches Schütteln des Mikroreaktionsgefäßes miteinander vermengt. Nach einer 3-minütigen Inkubationszeit wurden die Proben in eine vorgekühlte Zentrifuge überführt und für 15 Minuten bei 4°C mit einer relativen Zentrifugalbeschleunigung (rcf) von 12.000 zentrifugiert. Nach der Zentrifugation hat sich das *TRizol*-Chloroform-Gemisch in drei Phasen aufgetrennt mit der RNA in der oberen wässrigen Phase. Für die nachfolgenden Arbeitsschritte wurde die wässrige Phase in ein neues RNase-freies Mikroreaktionsgefäß pipettiert. Die unteren Phasen (Inter-, Phenolphase) wurden verworfen.

Auf die RNA-haltige wässrige Phase wurde Isopropanol (350 µl) pipettiert, gefolgt von einer 10-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Probe mithilfe eines Vortexmischers durchmischt und für 10 Minuten bei 4°C und 12.000 rcf zentrifugiert. Im Anschluss an die Zentrifugation erfolgte eine visuelle Kontrolle des aus der präzipitierten RNA bestehenden RNA-Pellets, welches sich am Grund des Mikroreaktionsgefäßes befinden sollte.

Der wässrige Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet in 75 % Ethanol (700 µl) resuspendiert. Im Anschluss wurde die Probe mithilfe eines Vortexmischers durchmischt und für 5 Minuten bei 4°C und 7.500 rcf zentrifugiert. Dieser Arbeitsschritt (RNA-Reinigung) wurde zweifach durchgeführt.

Nach abgeschlossener RNA-Reinigung wurde der Ethanol-Überstand verworfen. Die RNA-Pellets wurden für 5 bis 10 Minuten luftgetrocknet. Anschließend wurden die getrockneten RNA-Pellets in RNase-freiem Wasser resuspendiert (50 µl) und für 10 Minuten bei 56°C in einem *Thermomixer* inkubiert. Anschließend erfolgte eine Lagerung der isolierten RNA bei -80°C.

Tabelle 14: Verwendung von Reagenzien im Rahmen der RNA-Isolation

<b>Schritt</b>	<b>Reagenzien</b>
Homogenisierung der Organproben	<i>TRIzol</i> (2x 350 µl)
Phasenseparation	Chloroform (140 µl)
RNA-Präzipitation	Isopropanol (350 µl)
RNA-Reinigung	75% Ethanol (2x 700 µl)
RNA-Konservierung	RNase freies Wasser (50 µl)

Tabelle 15: Zentrifugationsschritte im Rahmen der RNA-Isolation

<b>Schritt</b>	<b>Rcf</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
Phasenseparation	12.000 rcf	4°C	15 Min
RNA-Präzipitation	12.000 rcf	4°C	10 Min
RNA-Reinigung*	7.500 rcf	4°C	5 Min

\* Zentrifugation wurde zweifach durchgeführt

### 3.2.8.2 NanoDrop-Messung

Die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA wurde mittels photometrischer Absorptionsmessung bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Die photometrischen Messungen

wurden mit einem *NanoDrop 2000* -Instrument durchgeführt. Für die Messungen wurde jeweils 1 µl der RNA–Suspension auf den Messplatz des Gerätes pipettiert.

Für die folgenden Arbeitsschritte wurden ausschließlich RNA–Suspensionen verwendet, welche einen Absorptions-Quotienten (260/280 nm)  $\geq 1,8$  aufwiesen, was für einen angemessenen Reinheitsgrad der RNA spricht (73). Für die anstehenden Arbeitsschritte wurde für jede Probe eines Organs ein Aliquot mit jeweils einheitlicher RNA–Menge (µg/µl) hergestellt.

### 3.2.8.3 DNase-Verdau

Ein DNase–Verdau wurde durchgeführt, um eine mögliche Verunreinigung der RNA durch DNA zu beseitigen. Sämtliche Pipettierschritte, sowie die Probenlagerungen wurden auf Eis an einem DNase- und RNase-freien Arbeitsplatz durchgeführt.

Der DNase-Verdau wurde mit dem Kit „*DNase I, RNase-free*“ durchgeführt. Der Reaktionsansatz für den DNase-Verdau bestand aus 10X Reaktionspuffer (1 µl) und DNase I (Endonuklease, 1 µl /1 µg RNA). Je nach verwendetem Kit für die nachfolgende Reverse Transkription (siehe Tabelle 18) wurden die Proben mit RNase-freiem Wasser auf 7 bzw. 9 µl Volumen aufgefüllt. Es folgte eine Inkubation der Probe für 30 Minuten bei 37°C in einem *Thermocycler*. Im Anschluss wurde dem Reaktionsansatz 50 mM EDTA (1 µl) zur Inaktivierung der DNase hinzugefügt, sodass das Endvolumen der Proben 8 bzw. 10 µl betrug. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 65°C in einem *Thermocycler* inkubiert.

Tabelle 16: Herstellung des Reaktionsansatzes für den DNase-Verdau

<b>Schritt</b>	<b>Reagenzien</b>
DNase-Verdau	Reaktionsansatz (1X): <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1 µg RNA (in X µl)</li> <li>- 1 µl 10X Reaktionspuffer (pro 1 µg RNA)</li> <li>- 1 µl DNase (pro 1 µg RNA)</li> <li>- 1 µl 50 mM EDTA</li> <li>- X µl RNase freies Wasser</li> </ul> Endvolumen: 8 bzw. 10 µl

Tabelle 17: *Thermocycler*-Stufen im Rahmen des DNase-Verdau

Schritt	Temperatur	Zeit
DNase-Verdau	37°C	30 Min
Inaktivierung der DNase	65°C	10 Min

#### 3.2.8.4 Reverse Transkription

Zur Herstellung codogener DNA (cDNA) für die qRT-PCR wurde eine Reverse Transkription (RT) mit der aufbereiteten RNA durchgeführt. Sämtliche Pipettierschritte sowie Probenlagerungen wurden auf Eis an einem DNase- und RNase-freien Arbeitsplatz durchgeführt. Die RT der intestinalen Proben der Wildtyp-Mäuse (3.2.4.) wurde mit dem „*TaqMan<sup>TM</sup>-RNA-to-cDNA-Kit*“ durchgeführt. Die RT aller weiteren Proben wurde mit dem „*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*“ durchgeführt. Zu jeglicher RT wurde ein *RNase-Inhibitor* hinzugefügt. Für beide Kits wurde zunächst der Reaktionsansatz pipettiert.

Der Reaktionsansatz (1X) des „*TaqMan<sup>TM</sup>-RNA-to-cDNA-Kit*“ bestand aus 2X *RT Buffer Mix* (10 µl), 20X *RT Enzyme Mix* (1 µl) und dem *RNase-Inhibitor* (1 µl) (siehe Tabelle 18).

Der Reaktionsansatz (1X) des „*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*“ bestand aus 10X *RT Buffer* (2 µl), 25X *dNTP Mix* 100 mM (0,8 µl), 10X *RT Random Primer* (2 µl), *Multiscribe<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase* (1 µl), *RNase-Inhibitor* (1 µl) und *RNase-freies Wasser* (3,2 µl) (siehe Tabelle 18).

Nach Herstellung des jeweiligen Reaktionsansatzes wurde jeweils ein RT-Reaktionsansatz auf einen Reaktionsansatz des DNase-Verdau pipettiert. Das Endvolumen des Reaktionsansatzes für die RT betrug für jede Probe 20 µl.

Anschließend wurden die Proben für die RT im *Thermocycler* inkubiert. Die Programmierung der *Thermocycler*-Stufen für die jeweilige RT wurde gemäß Herstellerangaben vorgenommen (siehe Tabelle 19 bzw. 20). Nach abgeschlossener RT wurden die cDNA-Proben mit *RNase-freiem Wasser* auf 25 ng cDNA pro 1µl verdünnt und bei -20°C gelagert.

**Tabelle 18:** Herstellung eines Reaktionsansatzes (1x) für die RT

<b>Kit</b>	<b>Reagenzien</b>
„ <i>TaqMan<sup>TM</sup>-RNA-to-cDNA-Kit</i> “	Reaktionsansatz (1X): <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>2X RT Buffer Mix</i> (10 µl)</li> <li>- <i>20X RT Enzyme Mix</i> (1 µl)</li> <li>- <i>RNase-Inhibitor</i> (1 µl)</li> </ul> Endvolumen: 12 µl
„ <i>High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit</i> “	Reaktionsansatz (1X): <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>10X Reverse Transcription Buffer</i> (2 µl)</li> <li>- <i>25X dNTP Mix 100 mM</i> (0,8 µl)</li> <li>- <i>10X Reverse Transcription Primers</i> (2 µl)</li> <li>- <i>Multiscribe<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase</i> (1 µl)</li> <li>- <i>RNase-Inhibitor</i> (1 µl)</li> <li>- <i>RNase freies Wasser</i> (3,2 µl)</li> </ul> Endvolumen: 10 µl

**Tabelle 19:** *Thermocycler*-Stufen der RT („*TaqMan<sup>TM</sup>-RNA-to-cDNA-Kit*“)

<b>Stufe</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
Stufe I	37°C	60 Min
Stufe II	95°C	5 Min
Stufe III	4°C	∞ Min

**Tabelle 20:** *Thermocycler*-Stufen der RT („*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*“)

<b>Stufe</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
Stufe I	25°C	10 Min
Stufe II	37°C	120 Min
Stufe III	85°C	5 Min
Stufe IV	4°C	∞ Min



### 3.2.8.5 Quantitative Real-Time PCR

Die qRT-PCR wurde mit dem „*TaqMan™ Gene Expression Master Mix*“ durchgeführt. Als Primer wurden „*TaqMan™ Gene Expression Assays (FAM)*“ verwendet. Zu Beginn wurde der Reaktionsansatz (1X) für die qRT-PCR pipettiert, bestehend aus „*TaqMan™ Gene Expression Master Mix*“ (5 µl), „*TaqMan™ Gene Expression Assays (FAM)*“ (0,5 µl) und RNase-freiem Wasser (3,5 µl) (siehe Tabelle 21). Anschließend wurde jeweils ein Reaktionsansatz (1X) in ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert. Im Folgenden wurde die cDNA (25 ng/µl) zum Reaktionsansatz in den Wells hinzugefügt, wobei für jede Probe eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde. Nach dem Pipettieren wurde die 96-Well-Platte mithilfe einer Adhäsionsfolie versiegelt.

Die qRT-PCR wurde mit dem „*StepOnePlus™ Real-Time PCR-System*“ durchgeführt. Die Programmierung der qRT-PCR Stufen wurde nach Herstellerangaben vorgenommen (siehe Tabelle 22).

**Tabelle 21:** Herstellung eines Reaktionsansatzes (1X) für die qRT-PCR

Schritt	Reagenzien
qRT-PCR	Reaktionsansatz (1X) <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>“TaqMan™ Gene Expression Master Mix”</i> (5 µl)</li> <li>- <i>“TaqMan™ Gene Expression Assay”</i> (0,5 µl)</li> <li>- RNase-freies Wasser (3,5 µl)</li> </ul> Endvolumen: 9 µl

**Tabelle 22:** Stufen der qRT-PCR

Stufe	Temperatur	Zeit
<i>Holding Stage</i> (1x) *		
- I	- 50°	- 2 Min
- II	- 95°C	- 10 Min
<i>Cycling Stage</i> (40x) **		
- I	- 95°	- 15 Sek
- II	- 60°C	- 1 Min

\* Die *Holding Stage* wurde einmalig zu Beginn der qRT-PCR durchgeführt, zur Aktivierung der Taq-Polymerase. \*\* Die *Cycling Stage* wurde in 40 Zyklen wiederholt, wobei zum Ende jedes Zyklus eine Fluoreszenzmessung durch das „*StepOnePlus™ Real-Time PCR-System*“ durchgeführt wurde.

### 3.2.8.6 Relative Quantifizierung qRT–PCR Daten

Zunächst wurde für jede Probe ein durchschnittlicher  $C_t$ -Wert errechnet, ausgehend von den  $C_t$ -Werten der Dreifachbestimmung. Im Anschluss wurde eine Quantifizierung der Daten mittels der komparativen  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode durchgeführt (74).

Als Referenzgen diente für jedes Experiment die *glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)*. Für die Analyse der Daten wurde der relative Expressionsunterschied innerhalb der Kontrollgruppe gemittelt und die relativen Expressionsunterschiede auf den Mittelwert der Kontrollgruppe bezogen. Die relative mRNA-Expression der Kontrollgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ist dabei per Definition gleich 100 % (74).

### 3.2.9 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

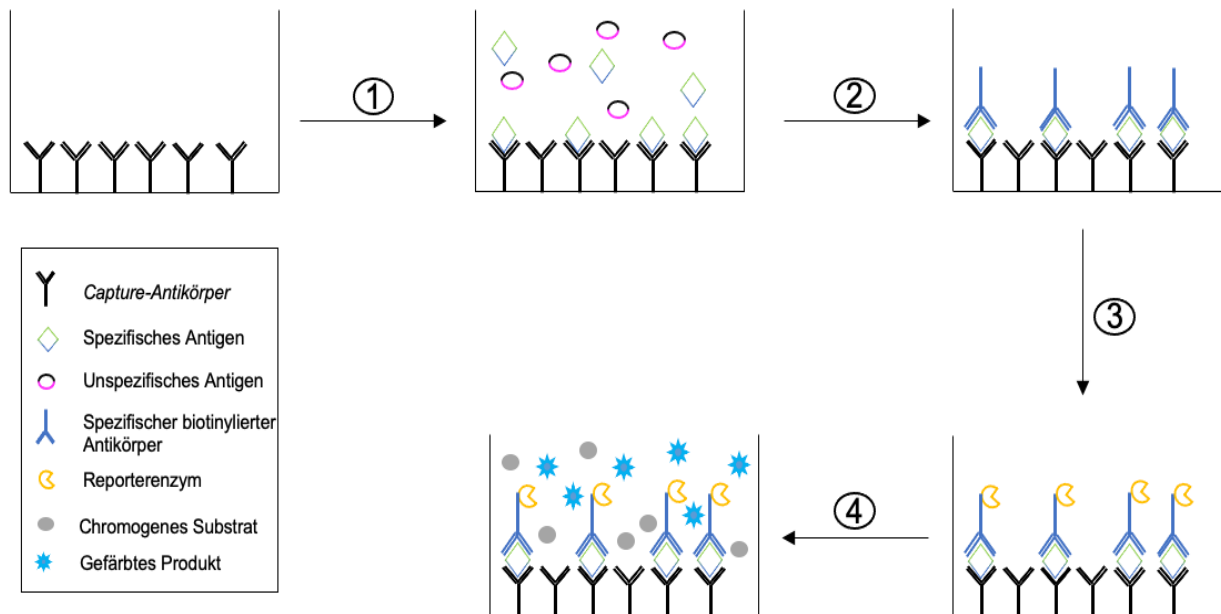
Der *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)* ist ein Nachweisverfahren, welches auf der natürlichen Bindung von Antigen und Antikörper basiert (75). Über die Bindung von Antikörpern an bestimmte Epitope eines Antigens ist die Interaktion zwischen Antigen und Antikörper zumeist hochspezifisch. Der *ELISA* stellt die Möglichkeit dar, sowohl qualitativ als auch quantitativ, über den Zusatz von Reporterenzymen, ein bestimmtes Antigen (Protein, Hormon, Peptid, etc.) in einer Probe zu detektieren (75). Die Methodik des *ELISA* umfasst verschiedene Vorgehensweisen, im Folgenden wird auf die im Rahmen meiner Forschungsarbeit verwendete Technik des *Sandwich-ELISA* eingegangen.

#### 3.2.9.1 Prinzip des Sandwich-ELISA

Das Prinzip des *Sandwich-ELISA* besteht darin, dass das gesuchte Antigen zwischen zwei spezifischen Antikörpern fixiert wird, welche jeweils ein anderes Epitop des Antigens detektieren (75). Aufgrund der Bindung an verschiedene Epitope ist dieses Nachweisverfahren hochspezifisch für das gesuchte Antigen.

Zunächst wird die Probe in die Wells der Mikrotiterplatte gegeben, wobei diese bereits mit einem ersten, für das gesuchte Antigen spezifischen sog. *Capture-Antikörper* beschichtet sind (75). In der Regel werden in einem anschließenden Waschschriff nun alle Komponenten der Probe aus den Wells entfernt, welche keine Bindung mit den Antikörpern eingegangen sind. Um zu vermeiden, dass zufällige Fehlbindungen zwischen den Antikörpern und anderen Antigenen die spätere Quantifizierung verfälschen, wird hinterher ein zweiter Antikörper in die Wells gegeben, welcher ein weiteres Epitop des

gesuchten Antigens bindet (75). An den zweiten Antikörper ist zumeist ein Reporterenzym (e.g. Meerrettichperoxidase) gekoppelt, welches aus einem chromogenen Substrat ein gefärbtes Produkt erzeugen kann (75). Das durch den Farbumschlag erhaltene Signal verhält dabei proportional zur Konzentration des gesuchten Antigens (75). Zur Quantifizierung der Daten wird im Anschluss eine photometrische Messung vorgenommen.



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISA (modifiziert aus (75)).

Die Wells der Mikrotiterplatte sind zu Beginn des ELISA bereits mit dem Capture-Antikörper beschichtet. Im ersten Schritt (1) bindet das in der Probe enthaltene Antigen spezifisch an den Capture-Antikörper. Nachdem alle unspezifischen Antigene aus den Wells herausgewaschen wurden, wird ein zweiter spezifischer Antikörper hinzugegeben (2), welcher ein anderes Epitop des Antigens bindet. Hinzugegebene Reporterenzyme binden an den sekundären Antikörper (3). Im Anschluss (4) entwickeln die Reporterenzyme aus dem hinzugegebenen chromogenen Substrat ein gefärbtes Produkt, welches die Quantifizierung des Antigens ermöglicht.

### 3.2.9.2 Durchführung des Sandwich-ELISA

Der Sandwich-ELISA wurde mit dem „Multi-Species GLP-1 Total ELISA-Kit“ durchgeführt, zur Quantifizierung der aktiven (7-36) und inaktiven (9-36) Form des GLP-1 in humanen Plasmaproben (3.2.6). Zunächst wurden alle für die Durchführung benötigten Reagenzien, sowie die Proben der Standardreihe für die Bestimmung der Standardkurve gemäß Herstellerprotokoll vorbereitet. Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Zu Beginn des Experimentes wurde ein initialer Waschschrift mit der Waschpuffer-Lösung (1X) durchgeführt (300 µl/Well), in dreimaliger Ausführung. Im Folgenden wurde in die Wells des Blindwertes, der Standardreihe und

der Qualitätskontrolle die Matrix-Lösung (50 µl/Well) pipettiert. In die Wells des Blindwertes und die Wells der Proben wurde der Assay-Puffer (50 µl/Well) pipettiert. Im Anschluss wurden die Standardreihe (50 µl/Well), die Qualitätskontrollen (50 µl/Well) und die Plasmaproben (50 µl/Well) in ihre entsprechenden Wells pipettiert. Es folgte eine erste Inkubation der Mikrotiterplatte für 90 Minuten bei 450 Umdrehungen pro Minute (rpm) auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde die Mikrotiterplatte abdekantiert, abgeklopft und die Wells mit der Waschpuffer-Lösung (1X, 300 µl/Well) dreimalig ausgespült. Nach dem Waschschrift wurde der *Detection*-Antikörper (100 µl/Well) in die Wells pipettiert und die Mikrotiterplatte auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler für 60 Minuten bei 450 rpm inkubiert. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde die Mikrotiterplatte erneut abdekantiert, abgeklopft und erneut mit der Waschpuffer-Lösung (1X, 300 µl/Well) dreimalig ausgewaschen. Im nächsten Schritt wurde in jedes Well der Mikrotiterplatte die Enzym-Lösung (100 µl/Well) pipettiert und die Mikrotiterplatte auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler für 30 Minuten bei 450 rpm inkubiert. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde die Mikrotiterplatte abdekantiert, abgeklopft und erneut mit der Waschpuffer-Lösung (1X, 300 µl/Well) dreimalig ausgewaschen. Nachfolgend wurde die Substrat-Lösung (100 µl/Well) in jedes Well gegeben und die Mikrotiterplatte wurde für 20 Minuten auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler bei 400 rpm inkubiert. Während der letzten Inkubationszeit erfolgte eine visuelle Kontrolle des Farbumschlags (Blau) innerhalb der einzelnen Wells. Nach 20 Minuten wurde die Reaktion durch Hinzugabe der Stopplösung (100 µl/Well) unterbrochen, wobei es zu einem Farbumschlag von Blau zu Gelb kam.

Tabelle 23: Pipettier-Schritte des *Sandwich-ELISA*

<b>Schritt</b>	<b>Reagenz/Well</b>
1. Waschschrift	Waschpuffer-Lösung (1X) – 300 µl/Well (3fach)
2. Matrix-Lösung	Matrix-Lösung – 50 µl/Well (Blindwert, Standardreihe, Qualitätskontrolle)
3. Assay-Puffer	Assay-Puffer – 50 µl/Well (Blindwert, Proben)
4. Standardreihe, Qualitätskontrolle, Proben	Jeweilige Reagenz/Probe – 50 µl/Well
5. Waschschrift	Waschpuffer-Lösung (1X) – 300 µl/Well (3fach)
6. Detection-Antibody	Detection-Antibody – 100 µl/Well

7. Waschschritt	Waschpuffer-Lösung (1X) – 300 µl/Well (3fach)
8. Enzym-Lösung	Enzym-Lösung – 100 µl/Well
9. Waschschritt	Waschpuffer-Lösung (1X) – 300 µl/Well (3fach)
10. Substrat-Lösung	Substrat-Lösung – 100 µl/Well
11. Stopplösung	Stopplösung – 100 µl/Well

Tabelle 24: Inkubationsschritte des *Sandwich-ELISA*

<b>Schritt</b>	<b>Zeit</b>	<b>Rpm</b>
Inkubation der Proben	90 Minuten	450 rpm
Inkubation des Detection-Antibody	60 Minuten	450 rpm
Inkubation der Enzym-Lösung	30 Minuten	450 rpm
Inkubation der Substrat-Lösung	20 Minuten	400 rpm

### 3.2.9.3 Auswertung des *Sandwich-ELISA*

Nach Hinzugabe der Stopplösung wurde die Mikrotiterplatte im „*TECAN Infinite 200 Pro*“ platziert. Nachfolgend wurde die Absorption der einzelnen Wells bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die gemessenen Absorptionswerte wurden korrigiert durch eine Referenzmessung bei einer Wellenlänge von 590 nm, gemäß Herstellerprotokoll. Im Anschluss wurden die gemittelten Werte des Blindwertes von den korrigierten Absorptionswerten subtrahiert, um die Werte von der Hintergrundabsorption zu bereinigen. Im Anschluss wurde gemäß den Herstellerempfehlungen eine Standardkurve mittels einer 5-Parameter logistischen Funktion zur Quantifizierung der Proben mit der „*PRISM-GraphPad*“-Software (Version 8.4.1) erstellt. Für jede erstellte Standardkurve wurde ein Determinationskoeffizient ( $R^2$ ) von 1 bestimmt, weshalb von einer optimalen Übereinstimmung der gemessenen Werte der Standardreihe mit der erstellten 5-Parameter logistischen Funktion auszugehen ist.

### 3.2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten wurde mittels der „*PRISM–GraphPad*“ -Software (Version 8.4.1) sowie „*IBM SPSS Statistics*“ (Version 25) durchgeführt. Im Vorfeld der Auswertung erfolgte eine Beratung durch das Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité–Universitätsmedizin Berlin (siehe Zertifikat).

Zunächst wurde für jeden Datensatz eine deskriptive Statistik erstellt, wobei jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt wurden.

Innerhalb der Daten der tierexperimentellen Versuche (3.2.4, 3.2.5) wurden statistische Ausreißer durch einen Grubbs`s-Test identifiziert und aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Anschließend wurde die Normalverteilung der Daten mittels Shapiro-Wilk-Test überprüft. Wurde keine signifikante Abweichung von einer Normalverteilung festgestellt wurde ein t-Test für unabhängige Stichproben zum Vergleich von jeweils zwei Gruppen angewendet. Wurde eine signifikante Abweichung von einer Normalverteilung festgestellt wurde ein Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich von jeweils zwei Gruppen angewendet.

Die Daten, welche den *ELISA*-Analysen der humanen Plasmaproben (3.2.6) entstammen, wurden nach Prüfung der Voraussetzungen mittels einer gemischten Varianzanalyse mit Messwiederholung (*Mixed-ANOVA*) statistisch ausgewertet, um einen möglichen Behandlungseffekt über den Studienzeitraum zu identifizieren.

Für jegliche Auswertung wurde eine statistische Signifikanz ab einem p-Wert von  $<0,05$  angenommen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Einfluss des Darm-Mikrobioms auf den Cholesterin-Metabolismus

Es wurden Genexpressionsanalysen an hepatischen und intestinalen Organproben (terminales Ileum) aus dem tierexperimentellen Versuch der Wildtyp-Mäuse durchgeführt (3.2.4). Dabei wurde ein möglicher Einfluss des Darm-Mikrobioms auf die Expression Cholesterin-regulierender Gene in Leber und Dünndarm untersucht. In den hepatischen Organproben wurde die Expression der Gene *Cyp7a1*, *Fxr*, *Hmgcr*, *Ldlr*, *Pcsk9*, und *Srebp-2* untersucht. In den intestinalen Genproben wurde die Expression der Gene *Abca1*, *Abcg5*, *Acat2*, *Asbt*, *Npc111* und *Srb1* untersucht. Die Genexpressionsdaten sind als relative mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe in Prozent errechnet und werden inklusive der Standardabweichung ( $\pm$ ) angegeben. Die im Folgenden (4.1.1, 4.1.2, 4.1.3) gezeigten Ergebnisse wurden bereits in Form eines Originalpaper publiziert (1).

#### 4.1.1 Expression Cholesterin-regulierender Gene unter Depletion des Darm-Mikrobioms

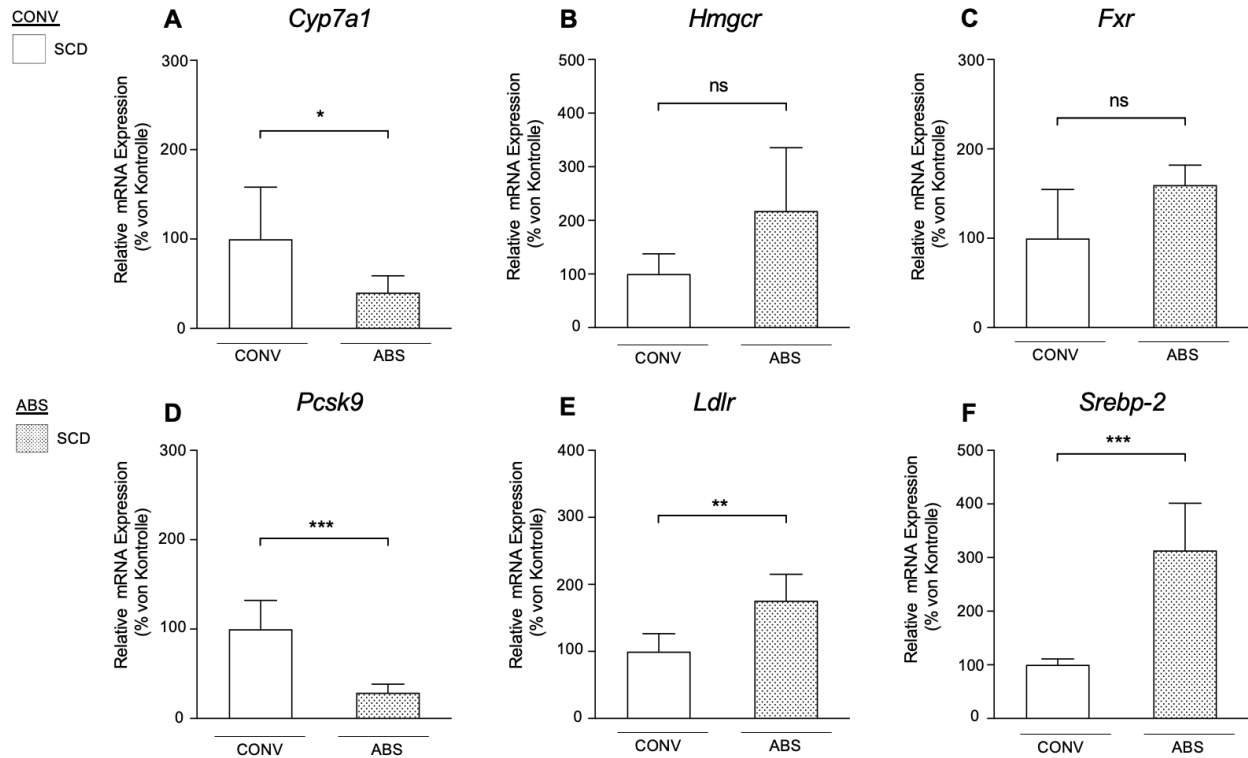
Für die Beantwortung dieser Fragestellung wurden die hepatischen und intestinalen Genexpressionsprofile der CONV- und ABS-Mäuse unter der SCD verglichen. Die Daten entstammen dem tierexperimentellen Versuch der Wildtyp-Mäuse (3.2.4).

##### 4.1.1.1 Hepatische Genexpression

Bei den ABS-Mäusen konnte eine Reduktion der Expression der *Cyp7a1* (**A**, CONV+SCD (n=5) vs. ABS+SCD (n=8):  $100,0 \pm 58,2$  % vs.  $40,1 \pm 18,9$  %,  $p=0,019$ ) beobachtet werden. Die Expression des *Fxr* hingegen blieb in den ABS-Mäusen unverändert (**C**, CONV+SCD (n=5) vs. ABS+SCD (n=9):  $100,0 \pm 54,6$  % vs.  $159,7 \pm 22,3$  %,  $p=0,083$ )

Ein statistisch signifikanter Anstieg der Expression konnte für das *Srebp-2* in der ABS-Gruppe beobachtet werden (**F**, CONV+SCD (n=5) vs. ABS+SCD (n=9):  $100,0 \pm 11,1$  % vs.  $313,6 \pm 87,9$  %,  $p<0,001$ ). Kongruent stieg die Expression des *Ldlr* (**E**, CONV+SCD (n=5) vs. ABS+SCD(n=9):  $100,0 \pm 26,4$  % vs.  $175,9 \pm 39,3$  %,  $p=0,002$ ) und der *Hmgcr* (**B**, CONV+SCD (n=5) vs. ABS+SCD(n=9):  $100,0 \pm 37,8$  % vs.  $217,9 \pm 117,6$  %,  $p=0,053$ )

in der ABS-Gruppe an, wobei dies im Falle der *Hmgcr* keine statistische Signifikanz erreichte. Konträr dazu zeigte sich eine signifikante Reduktion der Expression der *Pcsk9* unter Depletion des Darm-Mikrobioms (**D**, CONV+SCD (n=5) vs. ABS+SCD (n=8):  $100,0 \pm 32,2 \%$  vs.  $28,8 \pm 9,5 \%$ ,  $p < 0,001$ ).



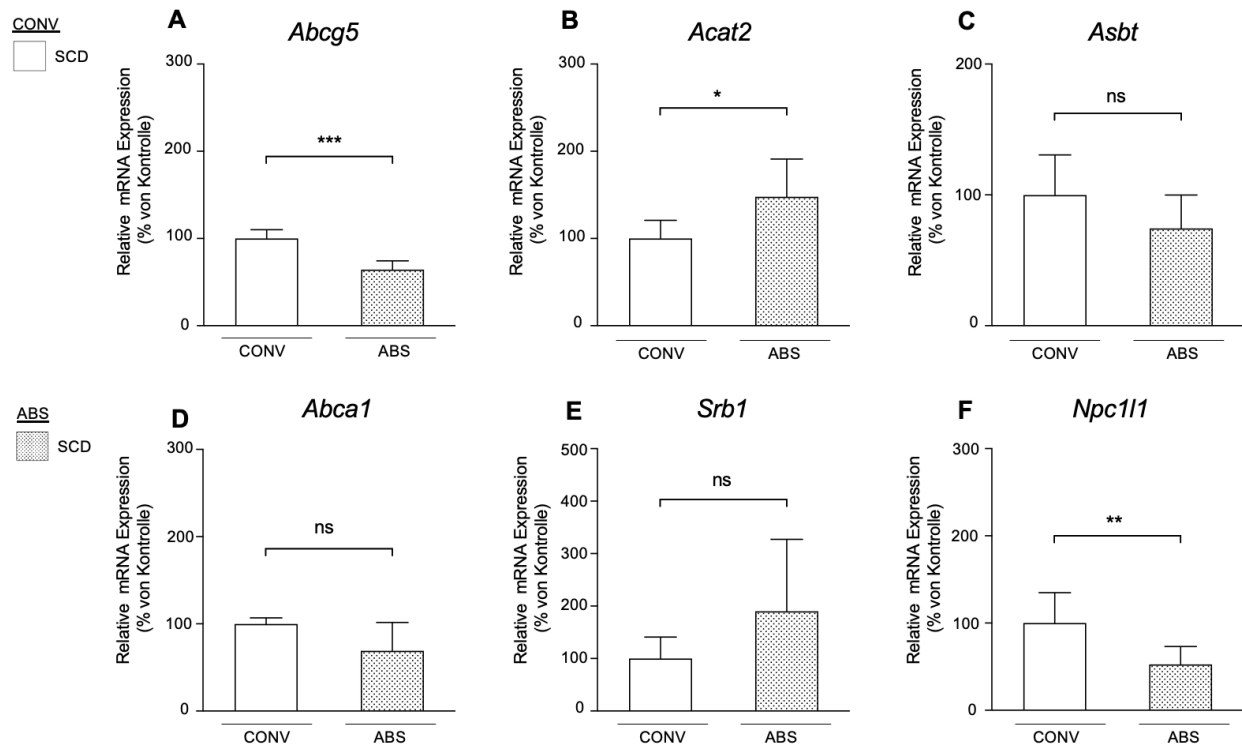
**Abbildung 8 (A-F):** Veränderung der Expression hepatischer Cholesterin-regulierender Gene im Zuge der Depletion des Darm-Mikrobioms (modifiziert aus (1)). Gezeigt sind Genexpressionsdaten der Wildtyp-Mäuse (3.2.4). Verglichen werden die Genexpressionsprofile der korrespondierenden Gruppen der CONV- und ABS-Mäuse (CONV+SCD (n=5), ABS+SCD (n=9)). Die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung. \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ , \*\*\*= $p < 0,001$ .

#### 4.1.1.2 Intestinale Genexpression

Sowohl die Expression des *Npc1l1* (**F**, CONV+SCD (n=5) vs. ABS+SCD (n=10):  $100,0 \pm 35,0 \%$  vs.  $52,7 \pm 20,3 \%$ ,  $p = 0,005$ ), als auch des *Abcg5* (**A**, CONV+SCD (n=5) vs. ABS+SCD (n=10):  $100,0 \pm 10,0 \%$  vs.  $64,4 \pm 10,1 \%$ ,  $p < 0,001$ ) zeigten sich unter Depletion des Darm-Mikrobioms reduziert. Für die *Acat2* konnte eine gesteigerte mRNA-Expression in den ABS-Mäusen verzeichnet werden (**B**, CONV+SCD (n=5) vs. ABS+SCD (n=10):  $100,0 \pm 21,0 \%$  vs.  $148,0 \pm 43,1 \%$ ,  $p = 0,037$ ). Die Expressionslevel des *Asbt* (**C**, CONV+SCD (n=5) vs. ABS+SCD (n=10):  $100,0 \pm 30,6 \%$  vs.  $74,4 \pm 25,6 \%$ ,  $p = 0,11$ ), des *Abca1* (**D**, CONV+SCD (n=4) vs. ABS+SCD (n=9):  $100,0 \pm 6,9 \%$  vs.  $69,1 \pm 32,5 \%$ ,  $p = 0,148$ ) sowie des *Srb1* (**E**, CONV+SCD (n=5) vs. ABS+SCD (n=9):  $100,0 \pm$



40,9 % vs.  $190,3 \pm 136,8$  %,  $p=0,182$ ) blieben unter der Depletion des Darm-Mikrobioms unverändert.



**Abbildung 9 (A-F):** Veränderung der Expression intestinaler Cholesterin-regulierender Gene im Zuge der Depletion des Darm-Mikrobioms (modifiziert aus (1)).

Gezeigt sind Genexpressionsdaten der Wildtyp-Mäuse (3.2.4). Verglichen werden die Genexpressionsprofile der korrespondierenden Gruppen der CONV- und ABS-Mäuse (CONV+SCD ( $n=5$ ), ABS+SCD ( $n=10$ )). Die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung.  $*=p<0,05$ ;  $**=p<0,01$ ,  $***=p<0,001$

#### 4.1.2 Metabolische Reaktion auf Genexpressionsebene im Rahmen einer hochfettreichen Diät unter Depletion des Darm-Mikrobioms

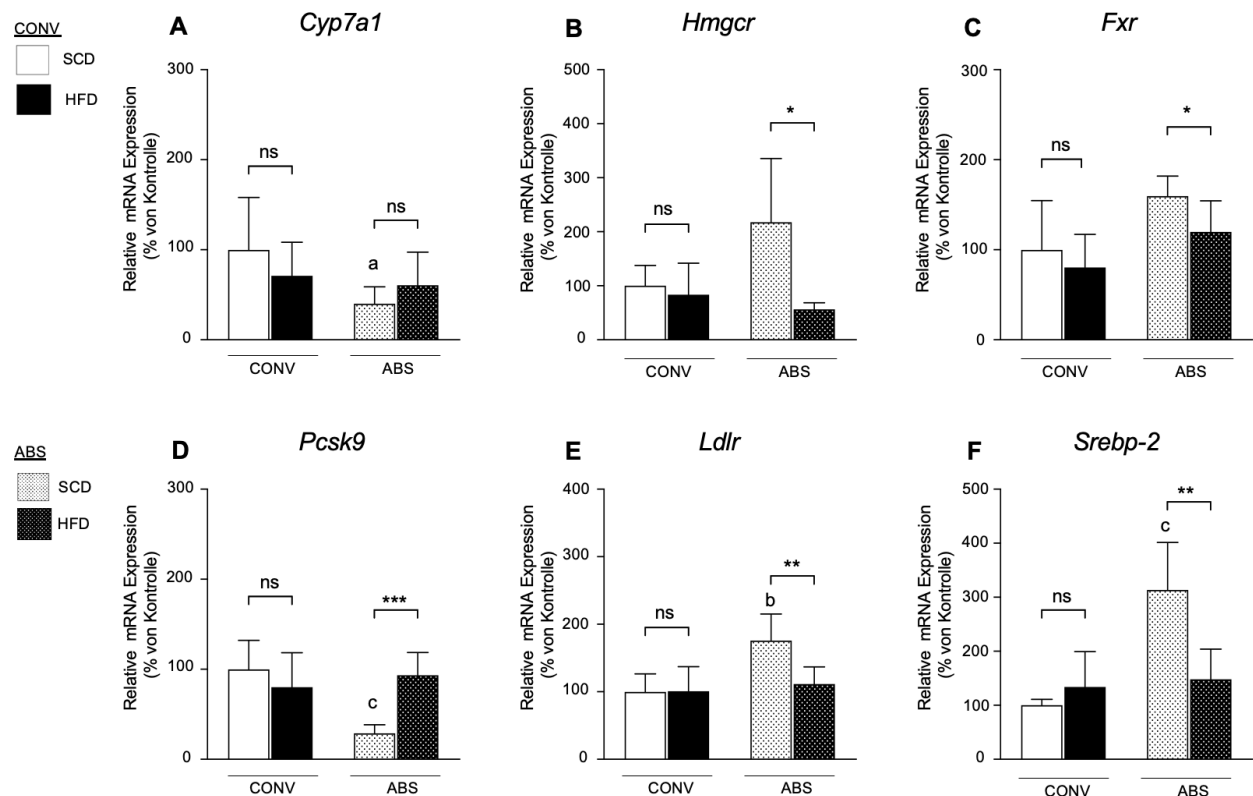
Für die Beantwortung dieser Fragestellung wurden die hepatischen und intestinalen Genexpressionsprofile der CONV- und ABS-Mäuse unter der HFD mit den Genexpressionsprofilen der Versuchstiere unter der SCD verglichen. Weiterhin wurden die Genexpressionsprofile der korrespondierenden Gruppen, welche die HFD erhielten, miteinander verglichen. Die Daten entstammen dem tierexperimentellen Versuch der Wildtyp-Mäuse (3.2.4).

##### 4.1.2.1 Hepatische Genexpression

Bei den CONV-Mäusen konnten keine signifikanten Veränderungen der hepatischen Genexpression im Rahmen der HFD beobachtet werden (**A, B, C, D, E, F**).

Bei den ABS-Mäusen konnte eine Reduktion der Expression des *Fxr* (**C**, ABS+SCD (n=9) vs. ABS+HFD (n=5): 159,7 ± 22,3 % vs. 120,0 ± 34,3 %, p=0,021) unter dem Einfluss der HFD festgestellt werden. Dahingegen blieb die Genexpression der *Cyp7a1* unter der HFD unverändert (**A**, ABS+SCD (n=8) vs. ABS+HFD (n=5): 40,1 ± 18,9 % vs. 60,7 ± 36,7 %, p=0,204). Weiterhin zeigte sich in der ABS-Gruppe eine Reduktion der Expression unter der HFD für die *Hmgcr* (**B**, ABS+SCD (n=9) vs. ABS+HFD (n=5): 217,9 ± 117,6 % vs. 56,3 ± 12,3 %, p=0,011), den *Ldlr* (**E**, ABS+SCD (n=9) vs. ABS+HFD (n=5): 175,9 ± 39,3 % vs. 111,5 ± 25,5 %, p=0,007) sowie das *Srebp-2* (**F**, ABS+SCD (n=9) vs. ABS+HFD (n=5): 313,6 ± 87,9 % vs. 148,3 ± 55,8 %, p=0,003). Für die *Pcsk9* hingegen konnte ein Anstieg der Expression in der ABS-Gruppe beobachtet werden (**D**, ABS+SCD (n=8) vs. ABS+HFD (n=5): 28,8 ± 9,5 % vs. 93,5 ± 25,2 %, p=<0,001).

Der direkte Vergleich der Expressionsprofile der CONV- und ABS-Mäuse unter der HFD (CONV+HFD (n=5) vs. ABS+HFD (n=5)) ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede der mRNA-Expression.



**Abbildung 10 (A-F):** Veränderung der Expression hepatischer Cholesterin-regulierender Gene durch die HFD unter Depletion des Darm-Mikrobioms (modifiziert aus (1)).

Gezeigt sind Genexpressionsdaten der Wildtyp-Mäuse (3.2.4). Verglichen werden die Gruppen der Versuchstiere mit demselben mikrobiellen Status, sowie die korrespondierenden Gruppen der CONV- und ABS-Mäuse (CONV+SCD (n=5), CONV+HFD (n=5), ABS+SCD (n=9), ABS+HFD (n=5)). Die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung. Die Buchstaben a,b,c markieren den Vergleich der

korrespondierenden Gruppen zwischen den CONV- und ABS-Mäusen. \*, $a=p<0,05$ ; \*\*, $b=p<0,01$ , \*\*\*, $c=p<0,001$ .

#### 4.1.2.2 Intestinale Genexpression

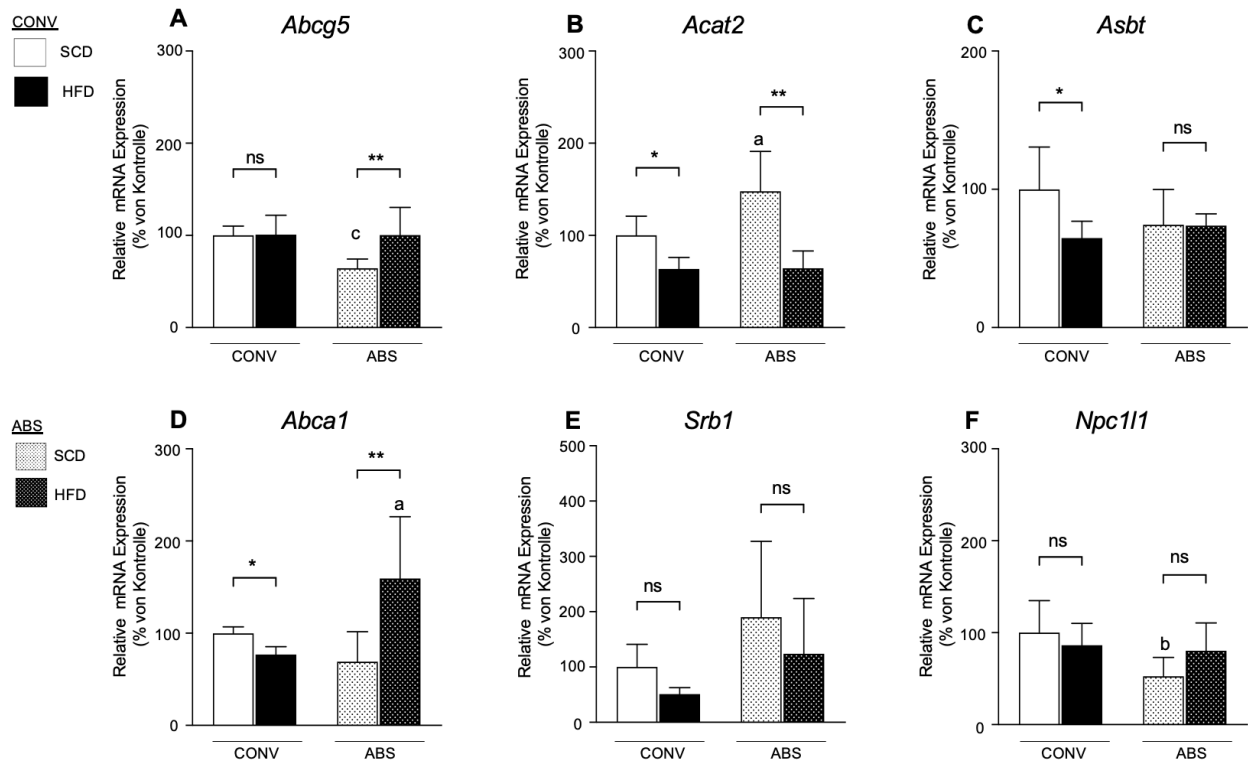
In der CONV-Gruppe kam es im Zuge der HFD zu einer Reduktion der Expression der *Acat2* (**B**, CONV+SCD (n=5) vs. CONV+HFD (n=5):  $100,0 \pm 21,0$  % vs.  $63,7 \pm 12,3$  %,  $p=0,01$ ), des *Asbt* (**C**, CONV+SCD (n=5) vs. CONV+HFD (n=5):  $100,0 \pm 30,6$  % vs.  $64,7 \pm 12,3$  %,  $p=0,044$ ) sowie des *Abca1* (**D**, CONV+SCD (n=4) vs. CONV+HFD (n=4):  $100,0 \pm 6,9$  % vs.  $76,8 \pm 8,6$  %,  $p=0,029$ ). Für die Transmembran-Transporter *Abcg5* (**A**) und *Npc1l1* (**F**) konnte bei den CONV-Mäusen keine veränderte Expression unter der HFD festgestellt werden. Für das *Srb1* ergab sich eine tendenziell verringerte Expression unter der HFD in der CONV-Gruppe (**E**, CONV+SCD (n=5) vs. CONV+HFD (n=4):  $100,0 \pm 40,9$  % vs.  $51,2 \pm 11,4$  %,  $p=0,056$ ).

Kongruent zu den Veränderungen der Expression in den CONV-Mäusen kam es in der ABS-Gruppe zu einer Reduktion der Expression der *Acat2* unter der HFD (**B**, ABS+SCD (n=10) vs. ABS+HFD (n=5):  $148,0 \pm 43,1$  % vs.  $64,4 \pm 18,7$  %,  $p=0,001$ ).

Für das *Abca1* hingegen konnte eine gesteigerte mRNA-Expression bei den ABS-Mäusen beobachtet werden (**D**, ABS+SCD (n=9) vs. ABS+HFD (n=5):  $69,1 \pm 32,5$  % vs.  $159,4 \pm 66,8$  %,  $p=0,005$ ). Die Expression des *Asbt*, welche sich in den CONV-Mäusen erhöht zeigte, wies in den ABS-Mäusen keinen Unterschied unter der HFD auf (**C**, ABS+SCD (n=10) vs. ABS+HFD (n=5):  $74,4 \pm 25,6$  % vs.  $73,8 \pm 8,4$  %,  $p=0,964$ ).

Weiterhin zeigte sich in den ABS-Mäusen eine signifikante Steigerung der Expression des *Abcg5* infolge der HFD (**A**, ABS+SCD (n=10) vs. ABS+HFD (n=5):  $64,4 \pm 10,1$  % vs.  $100,3 \pm 30,2$  %,  $p=0,004$ ), welche nun nicht mehr signifikant von der Expression in der CONV-Gruppe abwich.

Im direkten Vergleich der korrespondierenden Gruppen, welche die HFD erhielten, zeigte sich lediglich eine signifikant gesteigerte Expression des *Abca1* in den ABS-Mäusen (**D**, CONV+HFD (n=4) vs. ABS+HFD (n=5):  $76,8 \pm 8,6$  % vs.  $159,4 \pm 66,8$  %,  $p=0,046$ ). Der Vergleich der restlichen Gruppen (**A**, **B**, **C**, **E**, **F**) ergab keine statistischen Unterschiede hinsichtlich der Genexpression.



**Abbildung 11 (A-F):** Veränderung der Expression intestinaler Cholesterin-regulierender Gene durch die HFD unter Depletion des Darm-Mikrobioms (modifiziert aus (1)).

Gezeigt sind Genexpressionsdaten der Wildtyp-Mäuse (3.2.4). Verglichen werden die Gruppen der Versuchstiere mit demselben mikrobiellen Status, sowie die korrespondierenden Gruppen der CONV- und ABS-Mäuse (CONV+SCD (n=5), CONV+HFD (n=5), ABS+SCD (n=10), ABS+HFD (n=5)). Die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung. Die Buchstaben a,b,c markieren den Vergleich der korrespondierenden Gruppen zwischen den CONV- bzw. ABS-Mäusen. \*,a=p<0,05; \*\*,b=p<0,01, \*\*\*,c=p<0,001.

#### 4.1.3 Regulatorischer Effekt von Atorvastatin auf die Expression Cholesterin-regulierender Gene in Abhängigkeit vom Darm-Mikrobiom

Für die Beantwortung dieser Fragestellung wurden die hepatischen und intestinalen Genexpressionsprofile der CONV- und ABS-Mäuse unter der zusätzlichen Atorvastatin-Therapie mit den weiteren Diätgruppen (SCD, HFD) verglichen. Zusätzlich wurden die Genexpressionsprofile der korrespondierenden Gruppen, welche die zusätzliche Atorvastatin-Therapie erhielten, direkt miteinander verglichen. Die Daten entstammen dem tierexperimentellen Versuch der Wildtyp-Mäuse (3.2.4).

##### 4.1.3.1 Hepatische Genexpression

Die Expression der *Cyp7a1* stieg unter der zusätzlichen Atorvastatin-Therapie sowohl in den CONV-Mäusen als auch in den ABS-Mäusen signifikant an (A, CONV+HFD (n=5))

vs. CONV+HFD+Ator (n=5):  $71,2 \pm 37,2$  % vs.  $147,2 \pm 56,1$  %,  $p=0,036$ ; ABS+HFD (n=5) vs. ABS+HFD+Ator (n=5):  $60,7 \pm 36,7$  % vs.  $256,4 \pm 129,7$  %,  $p=0,012$ ) (1).

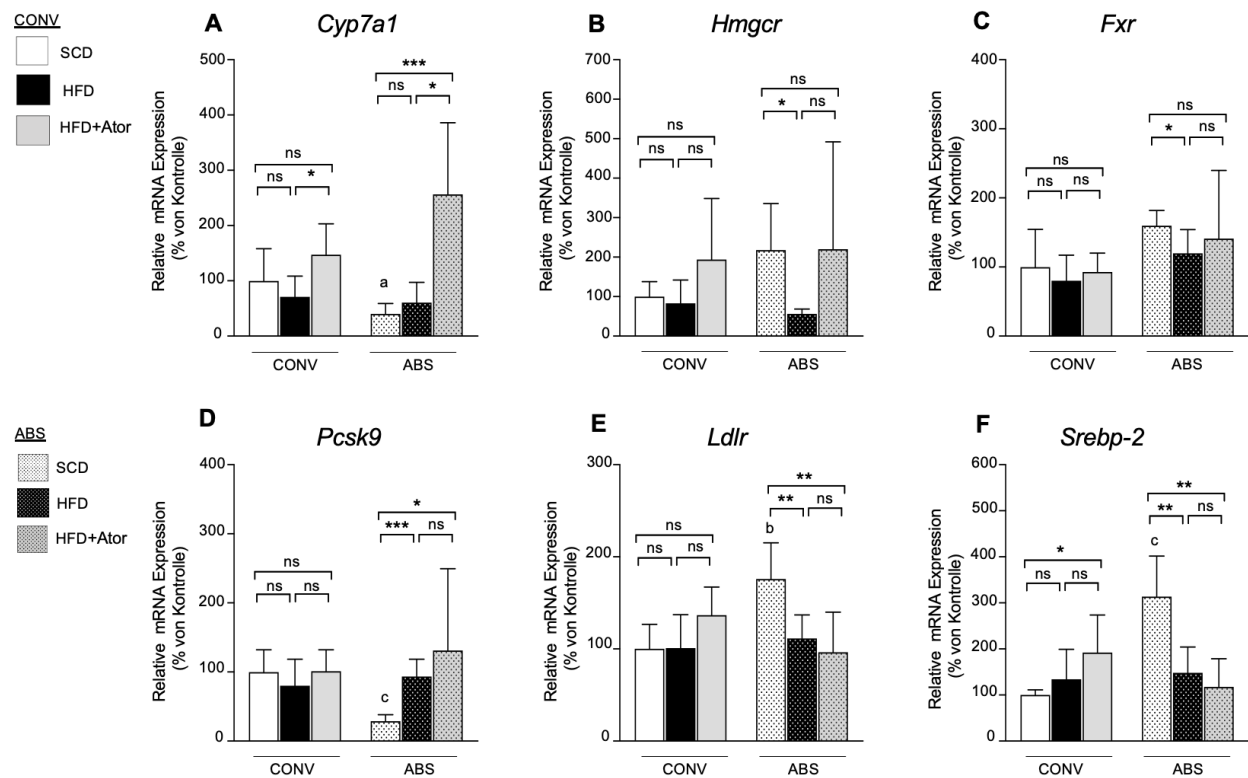
Die Expression des *Fxr* (**C**) hingegen zeigte sich sowohl in der CONV- als auch in der ABS-Gruppe unter Atorvastatin-Therapie gegenüber den weiteren Gruppen unverändert. Auch die Expression der *Hmgcr* (**B**) zeigte unabhängig des mikrobiellen Status der Versuchstiere keine Veränderung unter Atorvastatin-Therapie auf.

Eine inverse Regulation der Expression unter Atorvastatin-Therapie wurde für das *Srebp-2* beobachtet, welches in den CONV-Mäusen vermehrt (**F**, CONV+SCD (n=5) vs. CONV+HFD+Ator (n=5):  $100,0 \pm 11,1$  % vs.  $192,2 \pm 81,5$  %,  $p=0,037$ ) und in den ABS-Mäusen vermindert (**F**, ABS+SCD (n=9) vs. ABS+HFD+Ator (n=4):  $313,6 \pm 87,9$  % vs.  $117,6 \pm 61,2$  %,  $p=0,002$ ) exprimiert wurde (1).

Eine ähnliche Regulation wurde für den *Ldlr* festgestellt (**E**, CONV+SCD (n=5) vs. CONV+HFD+Ator (n=5):  $100,0 \pm 26,4$  % vs.  $136,5 \pm 30,6$  %,  $p=0,078$ ; ABS+SCD (n=9) vs. ABS+HFD+Ator (n=4):  $175,9 \pm 39,3$  % vs.  $96,3 \pm 43,7$  %,  $p=0,008$ ) (1), wobei die vermehrte Expression in den CONV-Mäusen eine nicht signifikante Tendenz darstellt.

Die *Pcsk9* hingegen wies lediglich in der ABS-Gruppe eine gesteigerte Expression im Zuge der Atorvastatin-Therapie auf (**D**, CONV+SCD (n=5) vs. CONV+HFD+Ator (n=5):  $100,0 \pm 32,2$  % vs.  $101,2 \pm 31,1$  %,  $p=0,955$ ; ABS+SCD (n=8) vs. ABS+HFD+Ator (n=5):  $28,8 \pm 9,5$  % vs.  $131,1 \pm 118,6$  %,  $p=0,03$ ) (1).

Trotz des teilweise unterschiedlichen Effektes der Atorvastatin-Therapie auf die Regulation der Genexpression konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den korrespondierenden Gruppen unter der zusätzlichen Atorvastatin-Therapie (CONV+HFD+Ator (n=5) vs. ABS+HFD+Ator (n=5)) festgestellt werden.



**Abbildung 12 (A-F):** Regulatorischer Effekt von Atorvastatin auf die Expression hepatischer Cholesterin-regulierender Gene unter Depletion des Darm-Mikrobioms (modifiziert aus (1)). Gezeigt sind Genexpressionsdaten der Wildtyp-Mäuse (3.2.4). Verglichen werden die Gruppen der Versuchstiere mit demselben mikrobiellen Status, sowie die korrespondierenden Gruppen der CONV- und ABS-Mäuse (CONV+SCD (n=5), CONV+HFD (n=5), CONV+HFD+Ator (n=5), ABS+SCD (n=9), ABS+HFD (n=5), ABS+HFD+Ator (n=5)). Die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung. Die Buchstaben a,b,c markieren den Vergleich der korrespondierenden Gruppen zwischen den CONV- bzw. ABS-Mäusen. \*, a=p<0,05; \*\*, b=p<0,01, \*\*\*, c=p<0,001.

#### 4.1.3.2 Intestinale Genexpression

Die *Acat2* (**B**, CONV+HFD (n=5) vs. CONV+HFD+Ator (n=5):  $63,7 \pm 12,3$  % vs.  $84,9 \pm 13,3$  %, p=0,031; ABS+HFD (n=5) vs. ABS+HFD+Ator (n=5):  $64,4 \pm 18,7$  % vs.  $111,5 \pm 36,1$  %, p=0,032) sowie der *Asbt* (**C**, CONV+HFD (n=5) vs. CONV+HFD+Ator (n=5):  $64,7 \pm 12,3$  % vs.  $88,2 \pm 15,8$  %, p=0,031; ABS+HFD (n=5) vs. ABS+HFD+Ator (n=4):  $73,8 \pm 8,4$  % vs.  $129,9 \pm 2,6$  %, p=<0,001) wiesen unter der zusätzlichen Atorvastatin-Therapie eine erhöhte Genexpression auf, unabhängig des mikrobiellen Status der Mäuse.

Das *Abcg5* zeigte in der ABS-Gruppe unter dem Einfluss von Atorvastatin eine erhöhte Genexpression auf (**A**, ABS+SCD (n=10) vs. ABS+HFD+Ator (n=4):  $64,4 \pm 10,1$  % vs.  $89,8 \pm 16,4$  %, p=0,004), wohingegen in der CONV-Gruppe keine Veränderung festgestellt werden konnte (**A**).

In den CONV-Mäusen kam es unter der Atorvastatin-Therapie zu einer signifikanten Reduktion der Expression des *Srb1* (**E**, CONV+SCD (n=5) vs. CONV+HFD+Ator (n=5):

100,0 ± 40,9 % vs. 52,8 ± 19,6 %, p=0,048), welche in den ABS-Mäusen nicht vorhanden war (**E**).

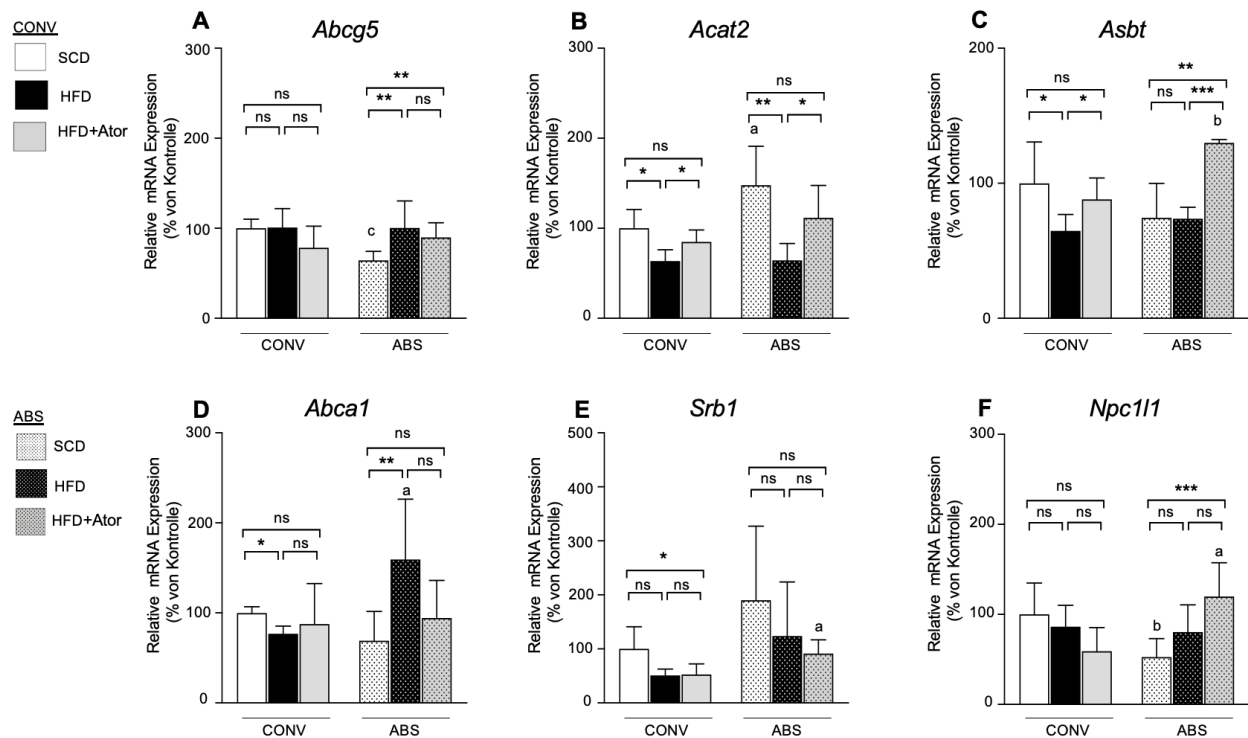
Eine inverse Regulation der intestinalen Genexpression unter Atorvastatin-Therapie wurde für das *Npc1l1* beobachtet (**F**) (1). In der CONV-Gruppe ergab sich eine tendenziell reduzierte Expression des *Npc1l1* unter Atorvastatin-Therapie (**F**, CONV+SCD (n=5) vs. CONV+HFD+Ator (n=5): 100,0 ± 35,0 % vs. 59,0 ± 26,2 %, p=0,069), wohingegen es in der ABS-Gruppe zu einer signifikanten Zunahme der Expression kam (**F**, ABS+SCD (n=10) vs. ABS+HFD+Ator (n=5): 52,7 ± 20,3 % vs. 119,8 ± 37,6 %, p=<0,001) (1).

Keine Veränderung der Expression unter Atorvastatin-Therapie in den CONV- sowie ABS-Mäusen konnte für das *Abca1* (**D**) beobachtet werden.

Weiterhin wurden zwischen den korrespondierenden Gruppen, welche die Atorvastatin-Therapie erhielten, signifikante Unterschiede in der mRNA-Expression der Gene *Asbt*, *Srb1* und *Npc1l1* festgestellt.

Trotz eines ähnlichen Effektes der Atorvastatin-Therapie war sowohl die Expression des *Asbt* (**C**, CONV+HFD+Ator (n=5) vs. ABS+HFD+Ator (n=4): 88,2 ± 15,8 % vs. 129,9 ± 2,6 %, p=0,001), als auch die Expression des *Srb1* (**E**, CONV+HFD+Ator (n=5) vs. ABS+HFD+Ator (n=5): 52,8 ± 19,6 % vs. 91,6 ± 25,5 %, p= 0,027) in den ABS-Mäusen signifikant erhöht im Vergleich zu den korrespondierenden CONV-Mäusen.

Entsprechend den gegensätzlichen Expressionsprofilen des *Npc1l1* unter der Atorvastatin-Therapie hinsichtlich des mikrobiellen Status zeigte sich die Expression des *Npc1l1* in der ABS-Gruppe auch im direkten Vergleich zur korrespondierenden CONV-Gruppe signifikant erhöht (**F**, CONV+HFD+Ator (n=5) vs. ABS+HFD+Ator (n=5): 59,0 ± 26,2 % vs. 119,8 ± 37,6 %, p=0,018) (1).



**Abbildung 13 (A-F):** Regulatorischer Effekt von Atorvastatin auf die Expression intestinaler Cholesterin-regulierender Gene unter Depletion des Darm-Mikrobioms (modifiziert aus (1)). Gezeigt sind Genexpressionsdaten der Wildtyp-Mäuse (3.2.4). Verglichen werden die Gruppen der Versuchstiere mit demselben mikrobiellen Status, sowie die korrespondierenden Gruppen der CONV- und ABS-Mäuse (CONV+SCD (n=5), CONV+HFD (n=5), CONV+HFD+Ator (n=5), ABS+SCD (n=10), ABS+HFD (n=5), ABS+HFD+Ator (n=5)). Die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung. Die Buchstaben a,b,c markieren den Vergleich der korrespondierenden Gruppen zwischen den CONV- bzw. ABS-Mäusen. \*,a=p<0,05; \*\*,b=p<0,01, \*\*\*,c=p<0,001.

## 4.2 Einfluss des Darm-Mikrobioms auf den *GLP-1*-Metabolismus

Für die Beantwortung dieser Fragestellung wurde ein möglicher modulierender Einfluss einer oralen Supplementation mit PA auf den *GLP-1*-Metabolismus in murinen sowie humanen Proben untersucht.

Anhand muriner intestinaler Organproben (terminales Ileum) (3.2.5), wurde ein modulierender Effekt des PA auf die Expression von Genen des *GLP-1*-Metabolismus unter verschiedenen Diäten (SCD vs. HFD) untersucht. Die Genexpressionsdaten sind als relative mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe in Prozent errechnet und inklusive der Standardabweichung ( $\pm$ ) angegeben.

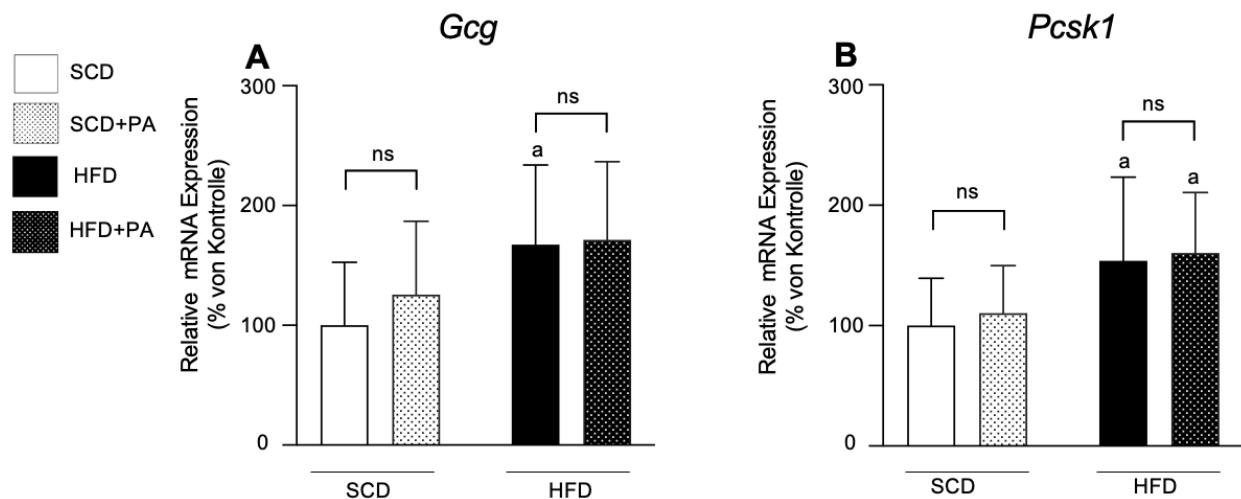
In den humanen Plasmaproben (3.2.6) wurde der Einfluss der PA-Therapie auf die *GLP-1*-Plasmakonzentration analysiert. Die Mittelwerte der *GLP-1*-Plasmakonzentration einer Behandlungsgruppe werden für jeglichen Zeitpunkt in picomolar (pM) gemeinsam mit der Standardabweichung ( $\pm$ ) angegeben.



#### 4.2.1 Einfluss des Darm-Mikrobiom abhängigen Metaboliten Propionat auf die Expression von intestinalen Genen des *GLP-1*-Metabolismus

Die Expression des *Gcg* blieb sowohl unter der SCD (**A**, SCD (n=11) vs. SCD+PA (n=7):  $100,0 \pm 52,73$  % vs.  $125,6 \pm 61,33$  %,  $p=0,36$ ), als auch der HFD (**A**, HFD (n=11) vs. HFD+PA (n=12):  $167,5 \pm 66,5$  % vs.  $171,5 \pm 65,15$  %,  $p=0,886$ ) im Rahmen der PA-Behandlung unverändert. In den Versuchstieren, welche die Kontrollbehandlung erhielten, führte die HFD zu einer signifikant gesteigerten Expression des *Gcg* (**A**, SCD (n=11) vs. HFD (n=11):  $100,0 \pm 52,73$  % vs.  $167,5 \pm 66,5$  %,  $p=0,016$ ). In den Versuchstieren, welche die PA-Behandlung erhielten, konnte kein Unterschied der *Gcg*-Expression in Zusammenhang mit der gefütterten Diät beobachtet werden (**A**, SCD+PA (n=7) vs. HFD+PA (n=12):  $125,6 \pm 61,33$  % vs.  $171,5 \pm 65,15$  %,  $p=0,149$ ).

Die Expression der *Pcsk1* blieb sowohl unter der SCD (**B**, SCD (n=12) vs. SCD+PA (n=6):  $100,0 \pm 39,26$  % vs.  $110,3 \pm 39,66$  %,  $p=0,608$ ) als auch unter der HFD (**B**, HFD (n=10) vs. HFD+PA (n=13):  $153,9 \pm 69,4$  % vs.  $160,3 \pm 50,36$  %,  $p=0,78$ ) infolge der PA-Behandlung unverändert. Sowohl im Rahmen der Kontrollbehandlung (**B**, SCD (n=12) vs. HFD (n=10):  $100,0 \pm 39,26$  % vs.  $153,9 \pm 69,4$  %,  $p=0,033$ ), als auch der PA-Behandlung (**B**, SCD+PA (n=6) vs. HFD+PA (n=13):  $110,3 \pm 39,26$  % vs.  $160,3 \pm 50,36$  %,  $p=0,048$ ) konnte eine signifikante Zunahme der Expression der *Pcsk1* bei Fütterung der HFD beobachtet werden.



**Abbildung 14 (A-B):** Einfluss des Darm-Mikrobiom abhängigen Metaboliten Propionat auf die Expression intestinaler Gene des *GLP-1*-Metabolismus.

Gezeigt sind Genexpressionsdaten der *ApoE<sup>-/-</sup>*-Mäuse (3.2.5). Verglichen werden die Gruppen, welche dieselbe Diät erhielten, sowie die Gruppen, welche dieselbe Behandlung erhielten (SCD (n=12), SCD+PA (n=7), HFD (n=11), HFD+PA (n=13)). Die Fehlerbalken markieren die Standardabweichung. Die Buchstaben a,b,c markieren den Vergleich der Gruppen, welche dieselbe Behandlung erhielten. \*,a= $p<0,05$ , \*\*,b= $p<0,01$ , \*\*\*,c= $p<0,001$ .

#### 4.2.2 Einfluss einer oralen Supplementation mit dem Darm-Mikrobiom abhängigen Metaboliten Propionat auf die *GLP-1*-Plasmakonzentration

Innerhalb der Placebo-Gruppe (n=29) konnte eine mittlere *GLP-1*-Plasmakonzentration von  $19,4 \pm 7,75$  pM zum Zeitpunkt V1 (0 Wochen),  $19,01 \pm 7,4$  pM zum Zeitpunkt V2 (4 Wochen) und  $18,11 \pm 6,24$  pM zum Zeitpunkt V3 (8 Wochen) ermittelt werden. Innerhalb der PA-Gruppe (n=29) konnte eine mittlere *GLP-1*-Plasmakonzentration von  $19,24 \pm 7,72$  pM zum Zeitpunkt V1 (0 Wochen),  $21,87 \pm 9,36$  pM zum Zeitpunkt V2 (4 Wochen) und  $20,21 \pm 8,39$  pM zum Zeitpunkt V3 (8 Wochen) verzeichnet werden.

Die gemischte Varianzanalyse mit Messwiederholung (*Mixed-ANOVA*) ergab keinen signifikanten Unterschied in der *GLP-1*-Plasmakonzentration zwischen den Behandlungsgruppen über die Dauer der Studie (Interaktionseffekt: Behandlungsgruppe\*Studiendauer,  $p=0,11$ ).

Kongruent dazu ergab sich in der Einzelanalyse weder für die Zugehörigkeit zu einer der Behandlungsgruppen (Placebo vs. PA,  $p=0,399$ ), noch für den Zeitpunkt der Messung (V1 vs. V2 vs. V3,  $p=0,174$ ) ein signifikanter Einfluss auf die *GLP-1*-Plasmakonzentration.

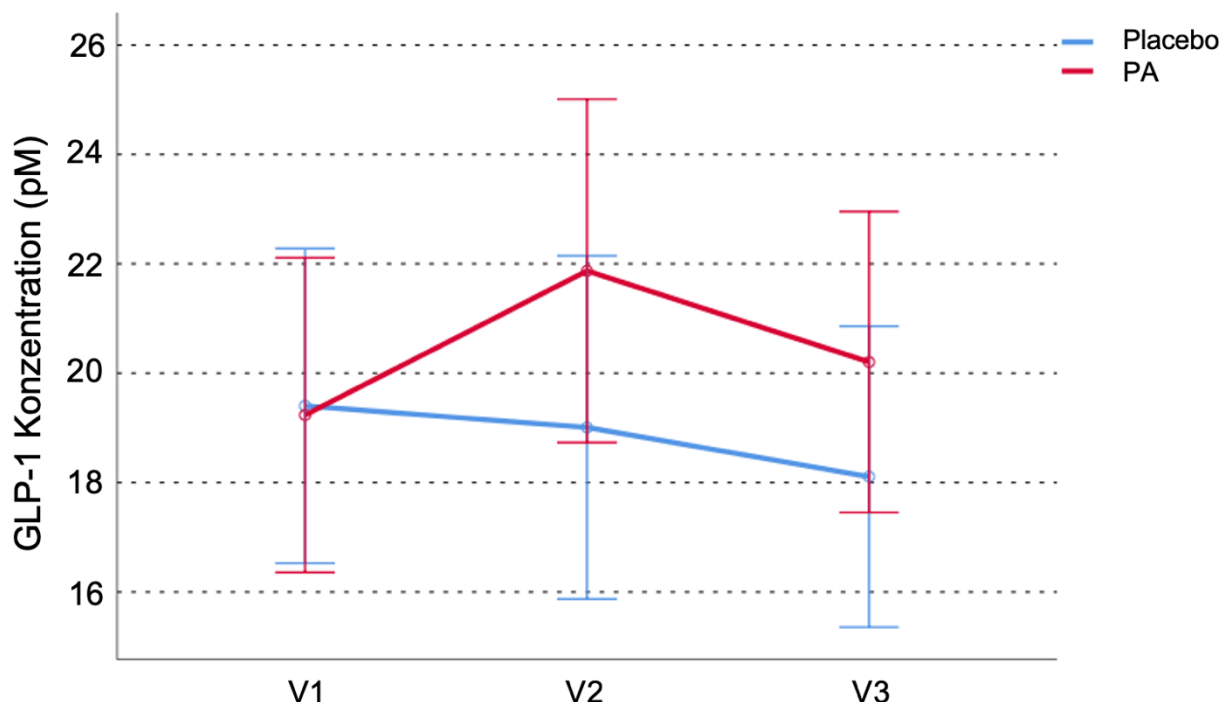


Abbildung 15: *GLP-1*-Plasmakonzentrationen der Behandlungsgruppen zu den verschiedenen Studienzeitpunkten.

Gezeigt sind die *GLP-1*-Plasmakonzentrationen der beiden Behandlungsgruppen (Placebo (n=29) (blau), PA (n=29) (rot)) zu den Studienzeitpunkten V1 (0 Wochen), V2 (4 Wochen) und V3 (8 Wochen). Die Fehlerbalken markieren das 95%-Konfidenzintervall.

## 5. Diskussion

### 5.1 Einfluss des Darm-Mikrobioms auf den Cholesterin-Metabolismus

Zahlreiche Studien weisen auf eine Interaktion zwischen dem Darm-Mikrobiom und der Entwicklung des Phänotyps hin. So unterscheidet sich die Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms zwischen adipösen und normalgewichtigen Individuen sowohl im Tiermodell als auch im Menschen (15, 76, 77). Mehrere Studien berichten übereinstimmend von einer erhöhten *Firmicutes* zu *Bacteroidetes* ratio in adipösen Individuen (15, 76-78), welche sich im Rahmen einer Gewichtsnormalisierung rückläufig zeigt (77). Darüber hinaus wurde bereits ein kausaler Zusammenhang zwischen einer veränderten Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms und der Entwicklung eines adipösen Phänotyps nachgewiesen. So gelang in mehreren Studien die Reproduktion eines adipösen Phänotyps in einem neuen Wirt mithilfe einer Transplantation eines Adipositas-assoziierten Darm-Mikrobioms (78, 79).

Eine mikrobielle Beteiligung an der Entwicklung des Phänotyps ist von besonderem Interesse, da bestimmte phänotypische Merkmale wie Adipositas (Body Mass Index >30) gehäuft mit einer pathologischen Stoffwechsellage (e.g. Hypercholesterinämie, Insulinresistenz) einhergehen, welche die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen begünstigt (80). Neben verschiedenen Einflussfaktoren wie einer genetischen Prädisposition, dem Lebens- sowie Ernährungsstil, scheint auch das Darm-Mikrobiom zum individuellen Cholesteringehalt im Plasma beizutragen. Huang *et al.* konnten in ihrer Studie aufzeigen, dass das Darm-Mikrobiom für ca. 5,9% der Variation des Gesamtcholesterins sowie für 2,8% der Variation des LDL im porcinen Plasma verantwortlich ist (81). Le Roy *et al.* gelang analog zur Reproduktion eines adipösen Phänotyps der Transfer einer Hypercholesterinämie von Menschen auf Mäuse durch die Transplantation des Darm-Mikrobioms (82).

Der Einfluss des Darm-Mikrobioms an der Regulation der Cholesterinkonzentration im Plasma wurde durch unsere Arbeitsgruppe in einer tierexperimentellen Studie (3.2.4) untersucht (1). Die Plasmaanalysen zeigten, dass die ABS-Mäuse unter der SCD ein signifikant gesteigertes Gesamtcholesterin im Plasma verglichen mit den CONV-Mäusen aufwiesen (1). Unter der HFD kam es sowohl in den CONV- als auch ABS-Mäusen zu einem signifikanten Anstieg des Gesamtcholesterins sowie aller gemessenen

Lipoproteinfraktionen (*VLDL*, *LDL*, *HDL*) im Plasma, sodass sich die Cholesterinspiegel der CONV- und ABS-Mäuse unter der HFD angleichen (1). Im Rahmen meiner Forschungsarbeit habe ich eine mögliche Beteiligung des Darm-Mikrobioms am Cholesterin-Metabolismus sowie an der metabolischen Reaktion auf eine hochfettreiche Diät anhand von Genexpressionsanalysen Cholesterin-regulierender Gene hepatischer und intestinaler Organproben untersucht. Die Befunde werde ich im Folgenden diskutieren.

### 5.1.1 Veränderung der hepatischen Expression Cholesterin-regulierender Gene unter Depletion des Darm-Mikrobioms

Unter der SCD zeigte sich in der ABS-Gruppe eine signifikante Reduktion der Expression der *Cyp7a1* bei unveränderter Expression des *Fxr*. Die in der Literatur beschriebene Inhibition der *Cyp7a1*-Transkription durch eine Stimulation des hepatischen *Fxr* (35), konnte in meiner Forschungsarbeit nicht bestätigt werden. Dennoch könnte die reduzierte Expression der hepatischen *Cyp7a1* durch eine gesteigerte Reabsorption von Gallensäuren und einer damit einhergehenden Aktivierung des *Fxr* in den ABS-Mäusen bedingt sein. Out *et al.* beschrieben in ihrer Studie, dass eine Depletion des Darm-Mikrobioms mit einer vermehrten Reabsorption und einer verringerten Ausscheidung von Gallensäuren einhergeht (45). Die Autoren führten diese Beobachtung auf eine vermehrte intestinale Expression des *Asbt* in Abwesenheit des Darm-Mikrobioms zurück (45). Auch eine reduzierte Dekonjugation der Gallensäuren infolge einer fehlenden mikrobiellen *BSH*-Aktivität könnte die Gallensäure-Reabsorption verstärken, da primäre Gallensäuren eine höhere Affinität zum *Asbt* aufweisen (19). Eine gesteigerte Wiederaufnahme an Gallensäuren führt womöglich zu einer Aktivitätssteigerung des intestinalen *Fxr*, welcher über die Freisetzung des *fibroblast growth factor 15* (*Fgf15*) die hepatische *Cyp7a1*-Transkription inhibiert (35, 83). So ist eine gesteigerte intestinale Freisetzung des *Fgf15* in Zusammenhang mit einer verminderten hepatischen Expression der *Cyp7a1* in keimfreien Mäusen bereits beschrieben (84) und möglicherweise Hauptursache für eine verminderte hepatische *Cyp7a1*-Expression in keimfreien Mäusen.

Auch die Expression der Gene der intrazellulären Cholesterin-Homöostase zeigte sich in Abwesenheit des Darm-Mikrobioms verändert. Die vermehrte Expression des *Srebp-2* sowie des *Ldlr* und die verminderte Expression der *Pcsk9* deuten auf einen erniedrigten

intrazellulären Cholesterin-Gehalt in der ABS-Gruppe hin. Passend dazu, zeigte sich eine tendenziell gesteigerte Expression der *Hmgcr* und somit eine tendenziell gesteigerte Cholesterinbiosynthese.

Ein dysregulierter hepatischer Cholesterin-Metabolismus und insbesondere ein dysregulierter Cholesterin-Katabolismus infolge einer verringerten *Cyp7a1*-Expression könnte zu gesteigerten Cholesterinspiegeln im Plasma der ABS-Mäuse beitragen, wie in unserer Studie beobachtet (1). Allerdings sollten auch indirekte Mechanismen i.S. einer metabolischen Kompensation der erhöhten Cholesterinspiegel im Plasma als Ursache der veränderten hepatischen Expression (e.g. vermehrte Expression des Ldlr) in Betracht gezogen werden.

### 5.1.2 Veränderung der intestinalen Expression Cholesterin-regulierender Gene unter Depletion des Darm-Mikrobioms

In Abwesenheit des Darm-Mikrobioms konnte eine Reduktion der Expression des apikalen Cholesterin-Transporters *Npc1l1* beobachtet werden. Eine Reduktion der jejunalen Expression des *Npc1l1* unter keimfreien Bedingungen wurde auch in einer Studie von Zhong *et al.* gezeigt, allerdings unter Fütterung einer HFD (85). Die Autoren leiteten daraus ab, dass das Darm-Mikrobiom an der Regulation der physiologischen Cholesterinresorption über eine Modulation der Expression des *Npc1l1* beteiligt ist (85). Weitere *in vitro* Experimente konnten allerdings nachweisen, dass eine Inkubation von Enterozyten mit Bakterien der Gattung *Lactobacillus* ebenfalls zu einer Reduktion der *Npc1l1*-Expression führt (42, 43). Möglicherweise ist der Einfluss auf die *Npc1l1*-Expression abhängig von der Zusammensetzung der lokal ansässigen Darmbakterien, wobei verschiedene Bakterien einen unterschiedlichen Einfluss auf die Expression ausüben könnten. Eine kompensatorisch reduzierte Expression des *Npc1l1* in der ABS-Gruppe infolge der erhöhten Cholesterinspiegel im Plasma sollte ebenfalls in Betracht gezogen werden.

Die unter der SCD in der ABS-Gruppe signifikant gesteigerte Expression der *Acat2* scheint eine Kompensation der reduzierten Cholesterinabsorption bei verminderter Expression des *Npc1l1* darzustellen. Eine gesteigerte Veresterung des absorbierten Cholesterins führt zu einem erhöhten Konzentrationsgefälle für die Absorption von freiem Cholesterin. Zeitgleich verhindert die Veresterung den Verlust von Cholesterin durch einen nach intraluminal gerichteten Efflux. Eine vermehrte Expression der *Acat2* im

Rahmen einer *Npc1*-Defizienz konnte bereits in testikulärem Gewebe nachgewiesen werden (86).

Die reduzierte Expression des *Abcg5* in den ABS-Mäusen steht möglicherweise ebenfalls in Zusammenhang mit einer verringerten Cholesterinabsorption und einer kompensatorischen Reduktion des nach intraluminal gerichteten Efflux. Allerdings konnten Joyce *et al.* zeigen, dass eine mikrobielle Kolonisation von keimfreien Mäusen auch zu einer gesteigerten Expression des *Abcg5* führt (87). Daher sollte ähnlich dem *Npc111*, auch eine mikrobielle Beteiligung an der Regulation der Expression des *Abcg5* in Betracht gezogen werden.

In der ABS-Gruppe konnte keine signifikante Steigerung der *Asbt*-Expression unter der SCD festgestellt werden, was im Gegensatz zu der von Out *et al.* beschriebenen Überexpression des *Asbt* in keimfreien Mäusen steht (45). Allerdings beschrieben Out *et al.*, dass eine Abwesenheit des Darm-Mikrobioms insbesondere in proximalen Dünndarmabschnitten zu einer vermehrten Expression des *Asbt* führt (45). Die vermehrte Expression des *Asbt* in keimfreien Mäusen führten die Autoren auf eine fehlende mikrobielle Stimulation des Transkriptionsfaktors Gata4 zurück, welcher im terminalen Ileum jedoch nicht vorkommt (45). Daher ist es denkbar, dass die Expression des *Asbt* im terminalen Ileum, welche in meiner Forschungsarbeit erhoben wurde, unabhängig von mikrobiellen Einflüssen ist. Weitere Möglichkeiten für ein gesteigertes Gallensäuren-Reservoir und einem infolgedessen dysregulierten Cholesterin-Katabolismus in den ABS-Mäusen stellen die vermehrte Reabsorption von Gallensäuren über weitere Gallensäure-Transporter sowie eine gesteigerte passive Reabsorption dar.

Keine Unterschiede in der Genexpression im Vergleich zu ihren CONV-Artgenossen wiesen die ABS-Mäuse hinsichtlich der Cholesterin-Transporter *Abca1* und *Srb1* auf, weshalb eine direkte sowie indirekte mikrobielle Beteiligung an der Regulation der Genexpression fraglich ist.

### 5.1.3 Veränderung der hepatischen metabolischen Reaktion auf Genexpressionsebene durch eine hochfettreiche Diät unter Depletion des Darm-Mikrobioms

In der ABS-Gruppe zeigte sich eine signifikante Reduktion der Expression des *Fxr* unter der HFD, wobei die *Cyp7a1*-Expression jedoch unverändert blieb. Dies steht im Einklang

mit der aufgestellten Hypothese (5.1.1), dass die hepatische *Cyp7a1*-Expression möglicherweise stärker von der Aktivität des intestinalen *Fxr* abhängt.

Trotz unveränderter Expression der *Cyp7a1* in den ABS-Mäusen konnte unter der HFD kein signifikanter Unterschied mehr zur *Cyp7a1*-Expression in den CONV-Mäusen festgestellt werden. Dies könnte auf einen angeglichenen Gallensäuren-Metabolismus zwischen den CONV- und ABS-Mäusen hindeuten, welcher möglicherweise in Zusammenhang mit den in beiden Gruppen gleichsam erhöhten Cholesterinspiegeln im Plasma steht (1).

Weiterhin zeigte sich in der ABS-Gruppe unter der HFD eine verminderte Expression der Gene *Srebp-2*, *Ldlr* und *Hmgcr*, sowie eine vermehrte Expression der *Pcsk9*. Die modifizierte Expression unter der HFD reflektiert womöglich eine metabolische Kompensation im Rahmen eines gesteigerten hepatischen Cholesteringehalts. Eine deutliche Lipidakkumulation in der Leber unter der HFD konnte im Rahmen unserer Studie mithilfe von *Oil-Red-O*-Färbungen beobachtet werden und zeigte sich unabhängig des mikrobiellen Status der Versuchstiere (1).

Insgesamt fielen die signifikanten Unterschiede in der hepatischen Genexpression zwischen den CONV- und ABS-Mäusen, welche unter der SCD auftraten, unter Fütterung der HFD weg. Da sich die Cholesterinspiegel im Plasma gleichermaßen entwickelten (1), könnten die angepassten Genexpressionsprofile eine Konsequenz Darm-Mikrobiom unabhängiger metabolischer Kompensationsmechanismen sein. Allerdings sollte auch in Betracht gezogen werden, dass eine veränderte Zusammensetzung und somit veränderte metabolische Aktivität des Darm-Mikrobioms unter der HFD in den CONV-Mäusen die Genexpression beeinflussen könnte.

#### 5.1.4 Veränderung der intestinalen metabolischen Reaktion auf Genexpressionsebene durch eine hochfettreiche Diät unter Depletion des Darm-Mikrobioms

Unabhängig des mikrobiellen Status zeigte sich unter der HFD eine signifikante Reduktion der Expression der *Acat2* mit vergleichbaren Expressionsleveln zwischen den CONV- und ABS-Mäusen. Der Bedarf einer vermehrten Veresterung des absorbierten Cholesterins zur Aufrechterhaltung eines erhöhten Konzentrationsgefälles entfällt womöglich in beiden Gruppen gleichermaßen infolge der gesteigerten intraluminalen Cholesterinkonzentration unter der HFD. Auch die Expression des *Npc111* unterschied

sich unter der HFD nicht mehr signifikant zwischen den CONV- und ABS-Mäusen. Weiterhin kam es zu einer Zunahme der Expression des *Abcg5* in der ABS-Gruppe, möglicherweise durch eine gesteigerte Cholesterinresorption bedingt, wodurch kein signifikanter Unterschied mehr zur CONV-Gruppe zu beobachten war.

Die signifikante Reduktion der Expression des *Asbt* in den CONV-Mäusen könnte einer kompensatorisch gesteigerten Ausscheidung von Gallensäuren bei einem erhöhten Cholesterinspiegel im Plasma dienen.

Die Veränderungen in der Genexpression unter der HFD führten jeweils zu einer Annäherung der Expressionslevel zwischen den CONV- und ABS-Mäusen, was auf einen angeglichenen intestinalen Cholesterin-Metabolismus zwischen den CONV- und ABS-Mäusen hinweist, welcher womöglich die angeglichenen Cholesterinspiegel im Plasma widerspiegelt (1).

Lediglich die Expression des *Abca1* unterschied sich signifikant zwischen den CONV- und ABS-Mäusen unter Fütterung der HFD, allerdings ohne Einfluss auf die jeweilige HDL-Konzentration im Plasma zu nehmen (1). Eine gesteigerte intestinale Inflammation im Zuge der antibiotischen Depletion des Darm-Mikrobioms könnte zu den abweichenden Expressionsprofilen des *Abca1* beitragen. So berichteten Lou *et al.* über eine erhöhte *Abca1*-Expression im Zuge einer gesteigerten intestinalen Inflammation (88).

### 5.1.5 Zusammenfassung

Die Genexpressionsprofile in Zusammenschau mit den in unserer Studie erhobenen Cholesterinkonzentrationen im Plasma (1), deuten darauf hin, dass das Darm-Mikrobiom zu einer physiologischen Cholesterin-Homöostase unter der SCD beiträgt. So ist ein direkter mikrobieller Einfluss als Ursache der unterschiedlichen Genexpressionsprofile (CONV+SCD vs. ABS+SCD) denkbar. Allerdings spielt womöglich auch eine indirekte Beeinflussung der Genexpression infolge einer veränderten Cholesterin—Homöostase in Abwesenheit des Darm-Mikrobioms eine Rolle. Unter der SCD scheint es in Abwesenheit des Darm-Mikrobioms zu Dysregulationen des hepatischen Gallensäure-Metabolismus sowie der intrazellulären Cholesterin-Homöostase der Hepatozyten zu kommen.

Unter der Fütterung der HFD hingegen konnte eine Anpassung der Genexpression zwischen den CONV- und ABS-Mäusen beobachtet werden, welche durch die angeglichenen Cholesterinspiegel im Plasma reflektiert wird (1). Auch eine veränderte Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms unter der HFD in der CONV-Gruppe könnte zu



der angepassten Genexpression beigetragen haben. So konnte im Rahmen unserer Studie eine Verschiebung der mikrobiellen Zusammensetzung zugunsten des Phylums *Firmicutes* beobachtet werden (1). Eine modifizierte Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms geht mit einer veränderten metabolischen Aktivität einher, wodurch die Darmbakterien ihren Einfluss auf die Cholesterin-Homöostase einbüßen könnten. In Analogie dazu konnten Stepankova *et al.* zeigen, dass der Effekt des Darm-Mikrobioms auf die Progression von Atherosklerose Diät-abhängig ist, mit einem protektiven Effekt bei Fütterung einer Standarddiät, welcher unter einer cholesterinreichen Diät entfällt (89). Allerdings sollte bedacht werden, dass im Rahmen der HFD auch Darm-Mikrobiom unabhängige Kompensationsmechanismen die metabolische Reaktion dominieren und konsekutiv zur Anpassung der Genexpression zwischen den Gruppen führen könnten. Weitere Studien, welche den Einfluss des Darm-Mikrobioms auf den Cholesterin-Metabolismus untersuchten, präsentieren z.T. sehr heterogene Ergebnisse. So stimmen die Ergebnisse einiger Studien mit unserer Beobachtung erhöhter Cholesterinspiegel im Plasma keimfreier Versuchstiere bei Fütterung einer Standarddiät überein (84, 90-92). Andere Studien beobachteten keinen relevanten (45, 93-95) oder einen entgegengesetzten Einfluss des Darm-Mikrobioms auf die Cholesterinkonzentration im Plasma (87).

Auch unter Fütterung einer HFD wurden in verschiedenen Studien unterschiedliche metabolische Reaktionen in Abwesenheit des Darm-Mikrobioms beobachtet. Übereinstimmend mit unseren Beobachtungen wurde in einer Studie eine Anpassung der Cholesterinspiegel zwischen CONV- und keimfreien Mäusen unter einer HFD beobachtet (96). Weitere Studien beobachteten einen Abfall (85, 97) oder einen Anstieg der Cholesterinspiegel in keimfreien Mäusen unter Fütterung einer HFD bzw. cholesterinreichen Diät (89).

Die abweichenden Ergebnisse dieser Studien betreffen z.T. auch die Genexpressionsprofile Cholesterin-regulierender Gene und lassen sich womöglich durch methodische Unterschiede erklären. So unterscheiden sich die Studien teilweise in der Wahl des Genotyps der Versuchstiere (ApoE<sup>-/-</sup> vs. Wildtyp), der Methode zur Depletion des Darm-Mikrobioms (ABS- vs. Gnotobiotische Tiere), der Wahl der Diät (verschiedene Inhalts- und Zusatzstoffe) sowie Wahl der Analysemethoden (e.g. qRT-PCR-Primer).

## 5.2 Einfluss des Darm-Mikrobioms auf den cholesterinsenkenden Effekt von Statinen

Ein nicht adäquates Ansprechen auf eine Therapie mit Statinen verbunden mit einer persistierenden Hypercholesterinämie birgt ein hohes Risiko für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen (98). Boekholdt *et al.* konnten in ihrer Meta-Analyse zeigen, dass bis zu 40% aller Patienten\*innen unter einer hochdosierten Statin-Therapie ein Therapieziel von <70mg/dl LDL im Plasma nicht erreichten (61), wobei die aktualisierten Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie bereits einen LDL-Zielwert von <55mg/dl ausgeben (21). Vor dem Hintergrund dieser hohen interindividuellen Variabilität bezüglich des cholesterinsenkenden Effektes einer Statin-Therapie rückt eine mikrobielle Beteiligung am therapeutischen Effekt der Statine verstärkt in den Fokus der aktuellen kardiovaskulären Forschung.

Vieira-Silva *et al.* konnten in einer großen humanen Studie zeigen, dass eine Statin-Therapie mit einer abgeschwächten Prävalenz einer intestinalen Dysbiose in adipösen Individuen einhergeht (99). Auch eine Studie an hypercholesterinämischen Ratten konnte zeigen, dass eine Statin-Therapie in Zusammenhang mit einer gesteigerten Diversität des Darm-Mikrobioms steht (100). Darüber hinaus wird das Statin-modulierte Darm-Mikrobiom mit anti-inflammatorischen Effekten in Verbindung gebracht (99, 101, 102), welche sich möglicherweise in einer veränderten Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms begründen (102). Eine verringerte systemische Inflammation sowie eine veränderte metabolische Aktivität infolge einer Modulation des Darm-Mikrobioms könnte zu der Statin vermittelten Prävention von atherosklerotischen kardiovaskulären Erkrankungen beitragen.

In der von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten tierexperimentellen Studie (3.2.4) wurde eine mögliche mikrobielle Beteiligung am cholesterinsenkenden Effekt von Atorvastatin unter Fütterung einer HFD untersucht (1). Plasmaanalysen zeigten, dass der cholesterinsenkende Effekt des Atorvastatins in den ABS-Mäusen signifikant abgeschwächt war (1). Im Vergleich zu den CONV-Mäusen wiesen die ABS-Mäuse trotz der Behandlung mit Atorvastatin gesteigerte Cholesterin- sowie Lipoproteinspiegel (*VLDL*, *LDL*, *HDL*) im Plasma auf (1). Eine mögliche Beteiligung des Darm-Mikrobioms an der therapeutischen Wirkung des Atorvastatins wurde im Rahmen meiner Forschungsarbeit anhand von Genexpressionsanalysen hepatischer und intestinaler Organproben untersucht. Die Befunde werde ich im Folgenden diskutieren.

### 5.2.1 Regulatorischer Effekt von Atorvastatin auf die Expression hepatischer Cholesterin-regulierender Gene in Abhängigkeit vom Darm-Mikrobiom

Unter der Atorvastatin-Therapie kam es sowohl in den CONV- als auch in den ABS-Mäusen zu einem signifikanten Anstieg der *Cyp7a1*-Expression (1). Der vergleichbare Trend weist auf eine Darm-Mikrobiom unabhängige Modulation des Gallensäure-Metabolismus durch Atorvastatin hin (1). Da sich die Expression des *Fxr* unabhängig des mikrobiellen Status der Versuchstiere unter der Therapie unverändert zeigte, scheint ein regulatorischer Einfluss des Atorvastatins auf die Expression der *Cyp7a1* nicht über den hepatischen *Fxr* vermittelt zu sein.

Ein veränderter regulatorischer Einfluss des Atorvastatins in Abhängigkeit des Darm-Mikrobioms zeigte sich für die Expression des *Srebp-2* und des *Ldlr* (1). In der ABS-Gruppe wurde eine signifikante Reduktion der Expression des *Srebp-2* und des *Ldlr* beobachtet, wohingegen die Expression der Gene in den CONV-Mäusen signifikant (*Srebp-2*) bzw. tendenziell (*Ldlr*) gesteigert war (1). Die gegensätzliche Regulation dieser Gene weist auf eine mikrobielle Beteiligung an der Atorvastatin vermittelten Regulation des hepatischen Cholesterin-Metabolismus hin (1). *Oil-Red-O*-Färbungen in der von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Studie zeigten, dass sich die hepatische Lipidakkumulation im Zuge der HFD unter Atorvastatin in den ABS-Mäusen im Vergleich zu den CONV-Mäusen kaum reduzierte (1). Ein erhöhter hepatischer Lipidgehalt gekoppelt an eine verminderte Kapazität zur Aufnahme von Cholesterin aus der Zirkulation könnte zum abgeschwächten cholesterinsenkenden Effekt des Atorvastatin in den ABS-Mäusen beitragen.

Weiterhin zeigte sich in den ABS-Mäusen unter Atorvastatin eine erhöhte Expression der *Pcsk9* (1), welche möglicherweise in Zusammenhang mit einem erhöhten Lipidgehalt der Leber steht. Die Expression der *Hmgcr* zeigte sich unabhängig des mikrobiellen Status der Versuchstiere unverändert, weshalb eine mikrobielle Beteiligung an der Atorvastatin vermittelten Regulation der Genexpression der *Hmgcr* unwahrscheinlich ist.

### 5.2.2 Regulatorischer Effekt von Atorvastatin auf die Expression intestinaler Cholesterin-regulierender Gene in Abhängigkeit vom Darm-Mikrobiom

Für den Großteil der analysierten intestinalen Gene (*Abca1*, *Abcg5*, *Acat2*, *Asbt*, *Srb1*) zeigte sich ein ähnlicher regulatorischer Einfluss der Atorvastatin-Therapie auf die Expression, unabhängig der mikrobiellen Besiedlung der Versuchstiere (1). Ein

mikrobieller Einfluss am regulatorischen Effekt von Atorvastatin auf die Expression o.g. Gene scheint daher unwahrscheinlich.

Interessanterweise konnte für den Hauptcholesterin-Transporter *Npc1l1* ein abweichender regulatorischer Einfluss des Atorvastatin auf die Genexpression beobachtet werden (1). In der ABS-Gruppe kam es zu einer signifikanten Steigerung der Expression des *Npc1l1*, wohingegen in den CONV-Mäusen eine tendenziell reduzierte Expression zu beobachten war (1). Diese Beobachtung auf molekularbiologischer Ebene konnte in unserer Studie durch immunohistochemische Färbungen des *Npc1l1* im terminalen Ileum bestätigt werden (1). Die signifikant gesteigerte Expression des *Npc1l1* in der ABS-Gruppe im Vergleich zur korrespondierenden CONV-Gruppe weist auf eine Darm-Mikrobiom abhängige Regulation der intestinalen Cholesterinresorption durch Atorvastatin hin (1). So könnte eine erhöhte Kapazität zur intestinalen Cholesterinresorption bei gesteigerter Expression des *Npc1l1* zum abgeschwächten therapeutischen Effekt des Atorvastatin in den ABS-Mäusen beitragen (1). In den CONV-Mäusen hingegen könnte ein durch Atorvastatin moduliertes Darm-Mikrobiom zu der beobachteten tendenziell verringerten Expression des *Npc1l1* beitragen.

### 5.2.3 Zusammenfassung

Die erhobenen Genexpressionsprofile in Zusammenschau mit weiteren im Rahmen unserer Studie erhobenen Daten deuten auf eine mikrobiellen Beteiligung am cholesterinsenkenden Effekt einer Atorvastatin-Therapie hin (1). Anhand von 16S-rRNA-Analysen der Versuchstierfäzes konnte zudem ein modulierender Einfluss des Atorvastatins auf die Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms nachgewiesen werden (1). Es zeigte sich eine Verschiebung der Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms hin zu der in der Kontrollgruppe beobachteten Zusammensetzung, gekennzeichnet durch eine verringerte *Firmicutes* zu *Bacteroidetes* ratio (1). Eine modifizierte metabolische Aktivität des Darm-Mikrobioms infolge der modulierten Zusammensetzung könnte zum regulatorischen Einfluss des Atorvastatins auf die Genexpression sowie dem therapeutischen Effekt beitragen (1).

Ein ähnlicher Mechanismus wurde für das antidiabetische Medikament Metformin nachgewiesen. Sun *et al.* konnten in ihrer Studie zeigen, dass Metformin die Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms beeinflusst und damit einhergehende

Veränderungen im mikrobiellen Gallensäuren-Metabolismus direkt mit der antidiabetischen Wirkung des Metformins zusammenhängen (103).

Da Statine zu den oral applizierten Arzneimitteln zählen, kann auch eine Biotransformation des Arzneimittels durch Darmbakterien relevanten Einfluss auf die Wirkung nehmen. Im Rahmen eines mikrobiellen Metabolismus der Statine könnten Metabolite freigesetzt werden, welche am regulatorischen Effekt einer Statin-Therapie auf die Expression Cholesterin-regulierender Gene beteiligt sind. So konnten Yoo *et al.* zeigen, dass nach Verabreichung einer Antibiotika-Therapie weniger bioaktive Metabolite der mikrobiellen Biotransformation von Lovastatin in der Zirkulation von Ratten zu finden sind (104).

### 5.3 Einfluss des Darm-Mikrobioms auf den *GLP-1*-Metabolismus

Resultate aktueller Studien belegen den Einfluss des Darm-Mikrobioms auf den Glukose-Metabolismus. Die Interaktion zwischen Darm-Mikrobiom und Glukose-Metabolismus scheint auch eine relevante Rolle in der Pathophysiologie des T2DM zu spielen. So konnten Vrieze *et al.* zeigen, dass eine Transplantation des Darm-Mikrobioms normalgewichtiger Individuen bei Patienten\*innen mit metabolischem Syndrom mit einer verbesserten Insulinsensitivität einherging (105). Begleitend konnte eine veränderte mikrobielle Zusammensetzung mit einem Zuwachs an Butyrat produzierenden Bakterien festgestellt werden (105). Eine weitere Studie zeigte, dass eine äußerst ballaststoffreiche Diät der gewöhnlich empfohlenen Ernährungsumstellung (basierend auf den Leitlinien der Chinesischen Diabetes Gesellschaft) überlegen ist, um bei Patienten\*innen mit T2DM einen adäquaten Langzeitblutzucker (HbA1c <7%) zu erreichen (106). Da Ballaststoffe Substrate der bakteriellen Produktion kurzkettiger Fettsäuren darstellen, könnten diese einen Beitrag zur Verbesserung der Glukose-Homöostase leisten. So konnte in tierexperimentellen Studien gezeigt werden, dass eine Behandlung mit kurzkettigen Fettsäuren (Butyrat, Propionat) mit einer optimierten Glukose-Homöostase einhergeht (107, 108). Insbesondere für das Propionat konnte bereits *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, dass eine Supplementation den *GLP-1*-Plasmaspiegel kurzfristig erhöht (56, 108), was zu einem möglichen antidiabetischen sowie cholesterinsenkenden Effekt der kurzkettigen Fettsäuren beitragen könnte. Eine Korrelation zwischen erhöhten *GLP-1*-Plasmakonzentrationen und einer herabgesetzten Cholesterinkonzentration im Plasma wurde bereits in einer tierexperimentellen Studie gezeigt (67).

Bislang ist allerdings nicht bekannt, ob eine Supplementation mit kurzkettigen Fettsäuren die *GLP-1*-Plasmakonzentration nachhaltig steigert. Dies ist von besonderer Bedeutung, da sich insbesondere langfristig erhöhte *GLP-1*-Plasmakonzentrationen, wie sie bspw. bei Einnahme von *GLP-1*-RA entstehen, positiv auf den Glukose-Metabolismus und das kardiovaskuläre System auswirken (65, 67).

Im Rahmen meiner Forschungsarbeit wurde eine mögliche langfristige Beeinflussung des *GLP-1*-Metabolismus durch eine orale Supplementation mit PA an murinen und humanen Proben untersucht und wird im Folgenden diskutiert.

### 5.3.1 Einfluss des Darm-Mikrobiom abhängigen Metaboliten Propionat auf die Expression von intestinalen Genen des *GLP-1*-Metabolismus

Im Rahmen der oralen PA-Supplementation der ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse konnten sowohl für die SCD- als auch HFD-Gruppen keine Unterschiede in der Expression des *Gcg* und der *Pcsk1* beobachtet werden. Dies steht in Gegensatz zu Ergebnissen einer Studie von Reimer *et* McBurney, welche in Ratten im Zuge einer ballaststoffreichen Diät einen signifikanten Anstieg der ilealen Expression des *Gcg* beobachteten (109). Allerdings wurde unseren Versuchstieren PA mittels Gavage zu einem festen Zeitpunkt über 4 Wochen verabreicht, wohingegen Reimer *et* McBurney den Versuchstieren Zugang zu einer ballaststoffreichen Diät *ad libitum* ermöglichten (109). Eine Fütterung *ad libitum* mit einer ballaststoffreichen Diät führt möglicherweise über eine dauerhaft erhöhte intestinale Konzentration an kurzkettigen Fettsäuren zu einer Steigerung der *Gcg*-Expression. Eine gezielte orale Substitution mit PA scheint hingegen keinen nachhaltigen Effekt auf die Expression der intestinalen Gene des *GLP-1*-Metabolismus auszuüben. Auch speziesspezifische Unterschiede im *GLP-1*-Metabolismus sollten als Ursache für die unterschiedlichen Beobachtungen in Betracht gezogen werden.

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass sowohl die *Gcg*- als auch die *PCSK-1*-Expression unter der HFD anstiegen. Dies könnte mit der unterschiedlichen Nährstoffzusammensetzung der Spezialdiäten zusammenhängen, da bestimmte Nährstoffe die Sekretion bzw. die Expression des *GLP-1* mehr stimulieren als andere.

Lediglich die Expression des *Gcg* wies unter Fütterung der HFD und der zusätzlichen PA-Behandlung keine Veränderung auf. Jedoch ergab sich hierdurch kein Unterschied in der Genexpression verglichen mit den kontrollbehandelten Versuchstieren unter der HFD, was gegen eine Einflussnahme des PA auf die Genexpression spricht.

### 5.3.2 Einfluss einer oralen Supplementation des Darm-Mikrobiom abhängigen Metaboliten Propionat auf die *GLP-1*-Plasmakonzentration

Die Behandlung mit dem Darm-Mikrobiom abhängigen Metaboliten Propionat hatte nach 4 bzw. 8 Wochen keinen signifikanten Effekt auf die *GLP-1*-Plasmakonzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Schwankungen der mittleren *GLP-1*-Plasmakonzentration zu den verschiedenen Messzeitpunkten lassen sich demnach nicht auf die Zugehörigkeit zu einer der beiden Behandlungsgruppen zurückführen und scheinen anderweitig bedingt zu sein. So könnten unter anderem abweichende Ernährungsgewohnheiten sowie ein nicht einheitlicher Abstand zwischen Einnahme der letzten Mahlzeit und der Blutentnahme Einfluss auf die *GLP-1*-Plasmakonzentration genommen haben. Darüber hinaus könnte sich auch eine zirkadiane Regulation der *GLP-1*-Sekretion aus den intestinalen L-Zellen, wie bereits für Nager und Mensch vorgeschrieben (110, 111), auf die gemessenen Plasmakonzentrationen auswirken.

### 5.3.3 Zusammenfassung

Die im Rahmen dieser Forschungsarbeit erhobenen Daten deuten darauf hin, dass der Darm-Mikrobiom abhängige Metabolit Propionat weder im murinen noch im humanen Organismus bei gezielter Supplementation einen langfristig stimulierenden Effekt auf den *GLP-1*-Metabolismus hat.

Anhand der murinen Daten konnte gezeigt werden, dass eine Supplementation mit PA keinen nachhaltigen Einfluss auf die Expression der intestinalen Gene des *GLP-1*-Metabolismus ausübt. Weitere Studien beobachteten allerdings einen stimulierenden Effekt des Propionats auf die intestinale *GLP-1*-Sekretion (56, 108, 112). Die abweichenden Ergebnisse lassen sich möglicherweise durch die unterschiedlichen Fragestellungen und daraus folgend unterschiedlichen methodischen Verfahren erklären. So untersuchten die Studien insbesondere den akuten Effekt einer Supplementation von Propionat auf die Sekretion des *GLP-1* (56, 108, 112). Ein akut stimulierender Effekt des Propionats auf die intestinale *GLP-1*-Sekretion wurde im Rahmen dieser Forschungsarbeit nicht untersucht und kann somit nicht ausgeschlossen werden. Auch wurde im Rahmen dieser Forschungsarbeit anstelle der *GLP-1*-Sekretion die Expression intestinaler Gene des *GLP-1*-Metabolismus im Mausmodell gemessen. Allerdings wäre eine dauerhaft erhöhte *GLP-1*-Plasmakonzentration ohne gesteigerte intestinale *Gcg*- sowie *Pcsk1*-Expression unwahrscheinlich.

Kongruent zu den Ergebnissen der murinen Analysen konnte auch in den humanen Proben kein langfristig stimulierender Effekt des Propionats auf die Plasmakonzentration des *GLP-1* erhoben werden. Ein akut stimulierender Effekt des Propionats auf die *GLP-1*-Sekretion bei Menschen, wie in einer Studie von Chambers *et al.* im Rahmen der Supplementation eines Inulin-Propionatesters gezeigt (112), ist anhand der in dieser Forschungsarbeit erhobenen Daten nicht auszuschließen. Inulin als Trägersubstanz ist jedoch diskutabel, da das Inulin selbst als Substrat für den mikrobiellen Metabolismus dient und resultierende Metaboliten potentiell Einfluss auf den *GLP-1*-Metabolismus nehmen (113, 114).

Allerdings konnte auch in der Studie von Chambers *et al.* kein langfristig stimulierender Effekt einer Supplementation des Inulin-Propionatesters auf die postprandiale Konzentration des *GLP-1* beobachtet werden (112). Die Autoren leiteten aus ihren Ergebnissen ab, dass längerfristige Effekte der Supplementation des Inulin-Propionatesters (e.g. reduzierter hepatischer Lipidgehalt, signifikant reduzierter Appetit, reduzierter Zuwachs intraabdominaler Fetteinlagerungen) möglicherweise unabhängig vom *GLP-1*-Metabolismus vermittelt werden (112). Im Einklang mit dieser Hypothese konnten Pingitore *et al.* nachweisen, dass kurzkettige Fettsäuren *in vitro* über eine Stimulation des *FFAR2* die Insulinsekretion aus pankreatischen  $\beta$ -Zellen in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration im Medium verstärken (115). Ein direkter Einfluss des Propionats auf die pankreatischen  $\beta$ -Zellen mit nachfolgenden Effekten auf den Insulin-Metabolismus kann im Rahmen der in meiner Forschungsarbeit gezeigten Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden.

Weiterhin sprechen die hier gezeigten Ergebnisse gegen die aufgestellte Hypothese, dass ein möglicher cholesterinsenkender Effekt des Propionats durch dauerhaft erhöhte *GLP-1*-Plasmakonzentrationen vermittelt wird.

## 5.4 Limitationen

Bei der Interpretation der gezeigten Daten müssen verschiedene Limitationen berücksichtigt werden. So lassen sich Erkenntnisse der Grundlagenforschung, welche im Tiermodell gewonnen werden, zumeist nicht direkt auf den Menschen anwenden. Es gilt zu bedenken, dass tierexperimentelle Versuche unter standardisierten Bedingungen (e.g. Haltung, Behandlung, Fütterung) stattfinden, welche sich in klinischen Studien nur bedingt reproduzieren lassen und somit das Resultat beeinflussen könnten. Auch gibt es



keine absolute Übereinstimmung im Lipid-Metabolismus zwischen Mensch und Tier. So transportieren Mäuse einen besonders hohen Anteil ihres Plasmacholesterins assoziiert an *HDL*, wohingegen der Großteil des Cholesterins im Plasma bei Menschen an *LDL* gebunden ist (116). Allerdings stellt das Mausmodell ein anerkanntes sowie häufig genutztes Tiermodell dar und Ergebnisse aus dem murinen Tiermodell können wichtige Hinweise auf ähnlich regulierte Stoffwechselwege im Menschen geben.

Mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede hinsichtlich der aufgestellten Fragestellungen wurden im Rahmen der tierexperimentellen Versuche (3.2.4, 3.2.5) nicht berücksichtigt, da ausschließlich weibliche Versuchstiere verwendet wurden. Ein Studiendesign zur Berücksichtigung eines geschlechterspezifischen Einflusses hätte eine erheblich gesteigerte Anzahl an Versuchstieren erfordert, wovon im Sinne des Leitfadens *3<sup>R</sup>-Replace-Reduce-Refine* zur Stärkung des Tierschutzes abgesehen wurde.

Die angewendete Methodik der qRT-PCR zählt zu den Standardmethoden der modernen molekularbiologischen Forschung. Allerdings lässt sich anhand der abgeleiteten mRNA-Expression nicht zwangsläufig auf die nachfolgende Translation sowie intrazelluläre Lokalisation der Proteine schließen. Zumeist sind weitere molekularbiologische Untersuchungen vonnöten, um die Ergebnisse einer qRT-PCR zu bestätigen. Im Rahmen der von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Studie (3.2.4) wurde die biologische Relevanz der qRT-PCR-Expressionsprofile durch weitere molekularbiologische Experimente (Western Blot, Immunhistochemische Färbungen) belegt (1).

Auch die molekularbiologische Methode des *ELISA* birgt Fehlerquellen. So können unspezifische Antikörper-Antigen-Interaktionen die Quantifizierung beeinflussen. Allerdings wurde die Möglichkeit unspezifischer Antikörper-Antigen-Interaktionen durch die Anwendung eines *Sandwich-ELISA*'s minimiert, da hierbei eine doppelte spezifische Antikörper-Antigen-Interaktion zur Quantifizierung benötigt wird.

## 5.5 Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit konnte gezeigt werden, dass das Darm-Mikrobiom womöglich direkt als auch indirekt an der Regulation der Expression hepatischer sowie intestinaler Cholesterin-regulierender Gene unter Fütterung einer Standarddiät beteiligt ist. Weiterhin konnte erstmalig gezeigt werden, dass das Darm-Mikrobiom zu der Atorvastatin vermittelten Regulation der Genexpression hepatischer und intestinaler

Cholesterin-regulierender Gene beiträgt und somit zum cholesterinsenkenden Effekt einer Atorvastatin-Therapie (1). Dies ist von besonderem Interesse, da Statine Medikamente der ersten Wahl zur Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen infolge einer Hypercholesterinämie darstellen (21). Möglicherweise begründet sich die interindividuelle Varianz einer Statin-Therapie in einer teilweise mangelnden mikrobiellen Einflussnahme am therapeutischen Effekt der Statine in Abhängigkeit von der individuellen Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms. Unter Beachtung der Interaktion zwischen Darm-Mikrobiom und dem Metabolismus des Wirtes könnten zukünftig neuartige Therapiestrategien zur Beeinflussung des Cholesterin-Metabolismus sowie zur Augmentation einer Statin-Therapie entwickelt werden. Allerdings sind weitere unabhängige Studien vonnöten, um die exakten Mechanismen der mikrobiellen Einflussnahme an der physiologischen Cholesterin-Homöostase sowie an der cholesterinsenkenden Wirkung einer Statin-Therapie zu untersuchen. Mögliche Schwerpunkte zukünftiger Forschungsvorhaben stellen dabei die Teilhabe der intestinalen Mikroorganismen am Gallensäuren-Metabolismus sowie an der intestinalen Cholesterinresorption dar, basierend auf einer regulatorischen Wirkung auf die Expression des *Npc1l1*.

Im Zuge dieser Forschungsarbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine Supplementation mit PA keinen langfristig stimulierenden Einfluss auf den *GLP-1*-Metabolismus hat. Ein möglicher antidiabetischer sowie cholesterinsenkender und somit kardioprotektiver Effekt der kurzkettigen Fettsäure Propionat scheint demzufolge nicht durch eine dauerhafte Steigerung der *GLP-1*-Plasmakonzentration bedingt zu sein. Daher bedarf es weiterer Studien, um den Einfluss des Propionats bzw. einer ballaststoffreichen Ernährung auf kardiometabolisch bedeutsame Stoffwechselwege zu präzisieren. Einen möglichen Ansatzpunkt stellt dabei der Einfluss von Propionat auf das intestinale Immunsystem dar, welcher über eine Steigerung der intestinalen Interleukin-10-Konzentration zu einer Reduktion der Cholesterinresorption führt, wie erst kürzlich in einer Forschungsarbeit unserer Arbeitsgruppe gezeigt (69).

## **6. Literaturverzeichnis**

1. Zimmermann F, Roessler J, Schmidt D, Jasina A, Schumann P, Gast M, Poller W, Leistner D, Giral H, Krankel N, Kratzer A, Schuchardt S, Heimesaat MM, Landmesser U, Haghikia A. Impact of the Gut Microbiota on Atorvastatin Mediated Effects on Blood Lipids. *J Clin Med*. 2020;9(5):10.3390/jcm9051596.
2. Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Backhed F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell*. 2016;165(6):1332-45.10.1016/j.cell.2016.05.041.
3. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 2006;124(4):837-48.10.1016/j.cell.2006.02.017.
4. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science*. 2005;307(5717):1915.10.1126/science.1104816.
5. Karlsson F, Tremaroli V, Nielsen J, Backhed F. Assessing the human gut microbiota in metabolic diseases. *Diabetes*. 2013;62(10):3341-9.10.2337/db13-0844.
6. Sidhu M, van der Poorten D. The gut microbiome. *Australian Family Physician*. 2017;46:206-11.
7. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015;21(29):8787-803.10.3748/wjg.v21.i29.8787.
8. Rook G, Bäckhed F, Levin BR, McFall-Ngai MJ, McLean AR. Evolution, human-microbe interactions, and life history plasticity. *The Lancet*. 2017;390(10093):521-30.10.1016/s0140-6736(17)30566-4.
9. Zmora N, Suez J, Elinav E. You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(1):35-56.10.1038/s41575-018-0061-2.
10. Korcz E, Kerenyi Z, Varga L. Dietary fibers, prebiotics, and exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: potential health benefits with special regard to cholesterol-lowering effects. *Food Funct*. 2018;9(6):3057-68.10.1039/c8fo00118a.
11. Patterson E, Cryan JF, Fitzgerald GF, Ross RP, Dinan TG, Stanton C. Gut microbiota, the pharmabiotics they produce and host health. *Proc Nutr Soc*. 2014;73(4):477-89.10.1017/S0029665114001426.
12. de Vos WM, Nieuwdorp M. A gut prediction. *Nature*. 2013;498(7452):48-9.10.1038/nature12251.
13. Muegge BD, Kuczynski J, Knights D, Clemente JC, Gonzalez A, Fontana L, Henrissat B, Knight R, Gordon JI. Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science*. 2011;332(6032):970-4.10.1126/science.1198719.
14. Sommer F, Anderson JM, Bharti R, Raes J, Rosenstiel P. The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(10):630-8.10.1038/nrmicro.2017.58.
15. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R, Gordon JI. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009;457(7228):480-4.10.1038/nature07540.
16. van der Wulp MY, Verkade HJ, Groen AK. Regulation of cholesterol homeostasis. *Mol Cell Endocrinol*. 2013;368(1-2):1-16.10.1016/j.mce.2012.06.007.

17. Afonso MS, Machado RM, Lavrador MS, Quintao ECR, Moore KJ, Lottenberg AM. Molecular Pathways Underlying Cholesterol Homeostasis. *Nutrients*. 2018;10(6):10.3390/nu10060760.
18. Kidambi S, Patel SB. Cholesterol and non-cholesterol sterol transporters: ABCG5, ABCG8 and NPC1L1: a review. *Xenobiotica*. 2008;38(7-8):1119-39.10.1080/00498250802007930.
19. Morgan AE, Mooney KM, Wilkinson SJ, Pickles NA, Mc Auley MT. Cholesterol metabolism: A review of how ageing disrupts the biological mechanisms responsible for its regulation. *Ageing Res Rev*. 2016;27:108-24.10.1016/j.arr.2016.03.008.
20. Kriaa A, Bourgin M, Potiron A, Mkaouar H, Jablaoui A, Gerard P, Maguin E, Rhimi M. Microbial impact on cholesterol and bile acid metabolism: current status and future prospects. *J Lipid Res*. 2019;60(2):323-32.10.1194/jlr.R088989.
21. Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, Chapman MJ, De Backer GG, Delgado V, Ference BA, Graham IM, Halliday A, Landmesser U, Mihaylova B, Pedersen TR, Riccardi G, Richter DJ, Sabatine MS, Taskinen MR, Tokgozoglu L, Wiklund O, Group ESCSD. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J*. 2020;41(1):111-88.10.1093/eurheartj/ehz455.
22. Ramasamy I. Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clin Chem Lab Med*. 2014;52(12):1695-727.10.1515/cclm-2013-0358.
23. Lammert F, Wang DQ. New insights into the genetic regulation of intestinal cholesterol absorption. *Gastroenterology*. 2005;129(2):718-34.10.1016/j.gastro.2004.11.017.
24. Yamanashi Y, Takada T, Kurauchi R, Tanaka Y, Komine T, Suzuki H. Transporters for the Intestinal Absorption of Cholesterol, Vitamin E, and Vitamin K. *J Atheroscler Thromb*. 2017;24(4):347-59.10.5551/jat.RV16007.
25. Altmann SW, Davis HR, Zhu L-j, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SPN, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP. Niemann-Pick C1 Like 1 Protein Is Critical for Intestinal Cholesterol Absorption. *Science*. 2004;303(5661):1201.10.1126/science.1093131.
26. Nguyen TM, Sawyer JK, Kelley KL, Davis MA, Rudel LL. Cholesterol esterification by ACAT2 is essential for efficient intestinal cholesterol absorption: evidence from thoracic lymph duct cannulation. *J Lipid Res*. 2012;53(1):95-104.10.1194/jlr.M018820.
27. Hussain MM. Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Curr Opin Lipidol*. 2014;25(3):200-6.10.1097/MOL.0000000000000084.
28. Cases S, Novak S, Zheng Y-W, Myers HM, Lear SR, Sande E, Welch CB, Lusis AJ, Spencer TA, Krause BR, Erickson SK, Farese RV. ACAT-2, A Second Mammalian Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase: ITS CLONING, EXPRESSION, AND CHARACTERIZATION. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(41):26755-64.10.1074/jbc.273.41.26755.
29. Masson CJ, Plat J, Mensink RP, Namiot A, Kisielewski W, Namiot Z, Fullekrug J, Eehalt R, Glatz JF, Pelsers MM. Fatty acid- and cholesterol transporter protein expression along the human intestinal tract. *PLoS One*. 2010;5(4):e10380.10.1371/journal.pone.0010380.
30. Brunham LR, Kruit JK, Iqbal J, Fievet C, Timmins JM, Pape TD, Coburn BA, Bissada N, Staels B, Groen AK, Hussain MM, Parks JS, Kuipers F, Hayden MR. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest*. 2006;116(4):1052-62.10.1172/JCI27352.

31. Feingold KR, Grunfeld C. Introduction to Lipids and Lipoproteins. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dungan K, et al., editors. Endotext. South Dartmouth (MA)2000.
32. Biggerstaff KD, Wooten JS. Understanding lipoproteins as transporters of cholesterol and other lipids. *Advances in Physiology Education*. 2004;28(3):105-6.10.1152/advan.00048.2003.
33. Lin XL, Xiao LL, Tang ZH, Jiang ZS, Liu MH. Role of PCSK9 in lipid metabolism and atherosclerosis. *Biomed Pharmacother*. 2018;104:36-44.10.1016/j.biopha.2018.05.024.
34. Lagace TA. PCSK9 and LDLR degradation: regulatory mechanisms in circulation and in cells. *Curr Opin Lipidol*. 2014;25(5):387-93.10.1097/MOL.000000000000114.
35. Chiang JY. Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res*. 2009;50(10):1955-66.10.1194/jlr.R900010-JLR200.
36. Rizzolo D, Buckley K, Kong B, Zhan L, Shen J, Stofan M, Brinker A, Goedken M, Buckley B, Guo GL. Bile Acid Homeostasis in a Cholesterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase and Sterol 27-Hydroxylase Double Knockout Mouse Model. *Hepatology*. 2019;70(1):389-402.10.1002/hep.30612.
37. Xiao L, Pan G. An important intestinal transporter that regulates the enterohepatic circulation of bile acids and cholesterol homeostasis: The apical sodium-dependent bile acid transporter (SLC10A2/ASBT). *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2017;41(5):509-15.10.1016/j.clinre.2017.02.001.
38. Li T, Chiang JY. Bile acids as metabolic regulators. *Curr Opin Gastroenterol*. 2015;31(2):159-65.10.1097/MOG.000000000000156.
39. Ding L, Yang L, Wang Z, Huang W. Bile acid nuclear receptor FXR and digestive system diseases. *Acta Pharm Sin B*. 2015;5(2):135-44.10.1016/j.apsb.2015.01.004.
40. Lye HS, Rusul G, Liong MT. Removal of cholesterol by lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol. *J Dairy Sci*. 2010;93(4):1383-92.10.3168/jds.2009-2574.
41. Reis SA, Conceicao LL, Rosa DD, Siqueira NP, Peluzio MCG. Mechanisms responsible for the hypocholesterolaemic effect of regular consumption of probiotics. *Nutr Res Rev*. 2017;30(1):36-49.10.1017/S0954422416000226.
42. Huang Y, Wu F, Wang X, Sui Y, Yang L, Wang J. Characterization of *Lactobacillus plantarum* Lp27 isolated from Tibetan kefir grains: A potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Journal of Dairy Science*. 2013;96(5):2816-25.10.3168/jds.2012-6371.
43. Huang Y, Zheng Y. The probiotic *Lactobacillus acidophilus* reduces cholesterol absorption through the down-regulation of Niemann-Pick C1-like 1 in Caco-2 cells. *British Journal of Nutrition*. 2010;103(4):473-8.10.1017/S0007114509991991.
44. Jones BV, Begley M, Hill C, Gahan CG, Marchesi JR. Functional and comparative metagenomic analysis of bile salt hydrolase activity in the human gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(36):13580-5.10.1073/pnas.0804437105.
45. Out C, Patankar JV, Doktorova M, Boesjes M, Bos T, de Boer S, Havinga R, Wolters H, Boverhof R, van Dijk TH, Smoczek A, Bleich A, Sachdev V, Kratky D, Kuipers F, Verkade HJ, Groen AK. Gut microbiota inhibit Asbt-dependent intestinal bile acid reabsorption via Gata4. *J Hepatol*. 2015;63(3):697-704.10.1016/j.jhep.2015.04.030.
46. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, Britt EB, Fu X, Wu Y, Li L, Smith JD, DiDonato JA, Chen J, Li H, Wu GD, Lewis JD, Warriar M, Brown JM, Krauss RM, Tang WH, Bushman FD, Lusis AJ, Hazen SL. Intestinal microbiota

- metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med*. 2013;19(5):576-85.10.1038/nm.3145.
47. Villette R, Kc P, Beliard S, Salas Tapia MF, Rainteau D, Guerin M, Lesnik P. Unraveling Host-Gut Microbiota Dialogue and Its Impact on Cholesterol Levels. *Front Pharmacol*. 2020;11:278.10.3389/fphar.2020.00278.
  48. D'Alessio D. Is GLP-1 a hormone: Whether and When? *J Diabetes Investig*. 2016;7 Suppl 1:50-5.10.1111/jdi.12466.
  49. Nauck MA, Meier JJ. Incretin hormones: Their role in health and disease. *Diabetes Obes Metab*. 2018;20 Suppl 1:5-21.10.1111/dom.13129.
  50. Tian L, Jin T. The incretin hormone GLP-1 and mechanisms underlying its secretion. *J Diabetes*. 2016;8(6):753-65.10.1111/1753-0407.12439.
  51. Drucker DJ. The Cardiovascular Biology of Glucagon-like Peptide-1. *Cell Metab*. 2016;24(1):15-30.10.1016/j.cmet.2016.06.009.
  52. Kahles F, Ruckbeil MV, Mertens RW, Foldenauer AC, Arrivas MC, Moellmann J, Lebherz C, Biener M, Giannitsis E, Katus HA, Marx N, Lehrke M. Glucagon-like peptide 1 levels predict cardiovascular risk in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2020;41(7):882-9.10.1093/eurheartj/ehz728.
  53. Sandoval DA, D'Alessio DA. Physiology of proglucagon peptides: role of glucagon and GLP-1 in health and disease. *Physiol Rev*. 2015;95(2):513-48.10.1152/physrev.00013.2014.
  54. Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev*. 2007;87(4):1409-39.10.1152/physrev.00034.2006.
  55. Everard A, Cani PD. Gut microbiota and GLP-1. *Rev Endocr Metab Disord*. 2014;15(3):189-96.10.1007/s11154-014-9288-6.
  56. Psichas A, Sleeth ML, Murphy KG, Brooks L, Bewick GA, Hanyaloglu AC, Ghatei MA, Bloom SR, Frost G. The short chain fatty acid propionate stimulates GLP-1 and PYY secretion via free fatty acid receptor 2 in rodents. *Int J Obes (Lond)*. 2015;39(3):424-9.10.1038/ijo.2014.153.
  57. Wichmann A, Allahyar A, Greiner TU, Plovier H, Lunden GO, Larsson T, Drucker DJ, Delzenne NM, Cani PD, Backhed F. Microbial modulation of energy availability in the colon regulates intestinal transit. *Cell Host Microbe*. 2013;14(5):582-90.10.1016/j.chom.2013.09.012.
  58. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473(7347):317-25.10.1038/nature10146.
  59. Brown RA, Shantsila E, Varma C, Lip GY. Current Understanding of Atherogenesis. *Am J Med*. 2017;130(3):268-82.10.1016/j.amjmed.2016.10.022.
  60. Ference BA, Graham I, Tokgozoglul L, Catapano AL. Impact of Lipids on Cardiovascular Health: JACC Health Promotion Series. *J Am Coll Cardiol*. 2018;72(10):1141-56.10.1016/j.jacc.2018.06.046.
  61. Boekholdt SM, Hovingh GK, Mora S, Arsenault BJ, Amarenco P, Pedersen TR, LaRosa JC, Waters DD, DeMicco DA, Simes RJ, Keech AC, Colquhoun D, Hitman GA, Betteridge DJ, Clearfield MB, Downs JR, Colhoun HM, Gotto AM, Jr., Ridker PM, Grundy SM, Kastelein JJ. Very low levels of atherogenic lipoproteins and the risk for cardiovascular events: a meta-analysis of statin trials. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(5):485-94.10.1016/j.jacc.2014.02.615.
  62. Einarson TR, Acs A, Ludwig C, Panton UH. Prevalence of cardiovascular disease in type 2 diabetes: a systematic literature review of scientific evidence from across the world in 2007-2017. *Cardiovasc Diabetol*. 2018;17(1):83.10.1186/s12933-018-0728-6.

63. Kaur R, Kaur M, Singh J. Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies. *Cardiovasc Diabetol.* 2018;17(1):121.10.1186/s12933-018-0763-3.
64. Marso SP, Bain SC, Consoli A, Eliaschewitz FG, Jodar E, Leiter LA, Lingvay I, Rosenstock J, Seufert J, Warren ML, Woo V, Hansen O, Holst AG, Pettersson J, Vilsboll T, Investigators S-. Semaglutide and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2016;375(19):1834-44.10.1056/NEJMoa1607141.
65. Marso SP, Daniels GH, Brown-Frandsen K, Kristensen P, Mann JF, Nauck MA, Nissen SE, Pocock S, Poulter NR, Ravn LS, Steinberg WM, Stockner M, Zinman B, Bergenstal RM, Buse JB, Committee LS, Investigators LT. Liraglutide and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2016;375(4):311-22.10.1056/NEJMoa1603827.
66. Rakipovski G, Rolin B, Nohr J, Klewe I, Frederiksen KS, Augustin R, Hecksher-Sorensen J, Ingvorsen C, Poley-Wolf J, Knudsen LB. The GLP-1 Analogs Liraglutide and Semaglutide Reduce Atherosclerosis in ApoE(-/-) and LDLr(-/-) Mice by a Mechanism That Includes Inflammatory Pathways. *JACC Basic Transl Sci.* 2018;3(6):844-57.10.1016/j.jacbts.2018.09.004.
67. He S, Kahles F, Rattik S, Nairz M, McAlpine CS, Anzai A, Selgrade D, Fenn AM, Chan CT, Mindur JE, Valet C, Poller WC, Halle L, Rotllan N, Iwamoto Y, Wojtkiewicz GR, Weissleder R, Libby P, Fernandez-Hernando C, Drucker DJ, Nahrendorf M, Swirski FK. Gut intraepithelial T cells calibrate metabolism and accelerate cardiovascular disease. *Nature.* 2019;566(7742):115-9.10.1038/s41586-018-0849-9.
68. Brown JM, Hazen SL. Microbial modulation of cardiovascular disease. *Nature Reviews Microbiology.* 2018;16(3):171-81.10.1038/nrmicro.2017.149.
69. Haghikia A, Zimmermann F, Schumann P, Jasina A, Roessler J, Schmidt D, Heinze P, Kaisler J, Nageswaran V, Aigner A, Ceglarek U, Cineus R, Hegazy AN, van der Vorst EPC, Döring Y, Strauch CM, Nemet I, Tremaroli V, Dwibedi C, Kränkel N, Leistner DM, Heimesaat MM, Bereswill S, Rauch G, Seeland U, Soehnlein O, Müller DN, Gold R, Bäckhed F, Hazen SL, Haghikia A, Landmesser U. Propionate attenuates atherosclerosis by immune-dependent regulation of intestinal cholesterol metabolism. *European Heart Journal.* 202110.1093/eurheartj/ehab644.
70. Robert Henry AF. *Cereal Genomics Methods and Protocols.* Humana Press. 2014;109910.1007/978-1-62703-715-0.
71. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques.* 2005;39(1):75-85.10.2144/05391RV01.
72. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HRH. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics.* 2005;5(2):209-19.10.1586/14737159.5.2.209.
73. Acosta-Maspons A, González-Lemes I, Covarrubias AA. Improved protocol for isolation of high-quality total RNA from different organs of *Phaseolus vulgaris* L. *BioTechniques.* 2019;66(2):96-8.10.2144/btn-2018-0129.
74. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.10.1006/meth.2001.1262.
75. Sakamoto S, Putalun W, Vimolmangkang S, Phoolcharoen W, Shoyama Y, Tanaka H, Morimoto S. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *J Nat Med.* 2018;72(1):32-42.10.1007/s11418-017-1144-z.

76. Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(31):11070-5.10.1073/pnas.0504978102.
77. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444(7122):1022-3.10.1038/4441022a.
78. Turnbaugh PJ, Backhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe*. 2008;3(4):213-23.10.1016/j.chom.2008.02.015.
79. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006;444(7122):1027-31.10.1038/nature05414.
80. Berg A, Bischoff SC, Colombo-Benkmann M, Ellrott T, Hauner H, Heintze C, Kanthak U, Kunze D, Stefan N, Teufel M, Wabitsch M, Wirth A. Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur „Prävention und Therapie der Adipositas“. Deutsche Adipositas-Gesellschaft (DAG) eV, Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG), Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) eV, Deutsche Gesellschaft für Ernährungsmedizin (DGEM) eV. 2014;2
81. Huang X, Fang S, Yang H, Gao J, He M, Ke S, Zhao Y, Chen C, Huang L. Evaluating the contribution of gut microbiome to the variance of porcine serum glucose and lipid concentration. *Scientific Reports*. 2017;7(1):14928.10.1038/s41598-017-15044-x.
82. Le Roy T, Lecuyer E, Chassaing B, Rhimi M, Lhomme M, Boudebouze S, Ichou F, Haro Barcelo J, Huby T, Guerin M, Giral P, Maguin E, Kapel N, Gerard P, Clement K, Lesnik P. The intestinal microbiota regulates host cholesterol homeostasis. *BMC Biol*. 2019;17(1):94.10.1186/s12915-019-0715-8.
83. Kong B, Wang L, Chiang JYL, Zhang Y, Klaassen CD, Guo GL. Mechanism of tissue-specific farnesoid X receptor in suppressing the expression of genes in bile-acid synthesis in mice. *Hepatology*. 2012;56(3):1034-43.10.1002/hep.25740.
84. Kasahara K, Tanoue T, Yamashita T, Yodoi K, Matsumoto T, Emoto T, Mizoguchi T, Hayashi T, Kitano N, Sasaki N, Atarashi K, Honda K, Hirata K-i. Commensal bacteria at the crossroad between cholesterol homeostasis and chronic inflammation in atherosclerosis. *Journal of Lipid Research*. 2017;58(3):519-28.10.1194/jlr.M072165.
85. Zhong C-Y, Sun W-W, Ma Y, Zhu H, Yang P, Wei H, Zeng B-H, Zhang Q, Liu Y, Li W-X, Chen Y, Yu L, Song Z-Y. Microbiota prevents cholesterol loss from the body by regulating host gene expression in mice. *Scientific Reports*. 2015;5(1):10512.10.1038/srep10512.
86. Akpovi CD, Murphy BD, Erickson RP, Pelletier R-M. Dysregulation of Testicular Cholesterol Metabolism Following Spontaneous Mutation of the Niemann-Pick C1 Gene in Mice<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*. 2014;91(2)10.1095/biolreprod.114.119412.
87. Joyce SA, MacSharry J, Casey PG, Kinsella M, Murphy EF, Shanahan F, Hill C, Gahan CG. Regulation of host weight gain and lipid metabolism by bacterial bile acid modification in the gut. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(20):7421-6.10.1073/pnas.1323599111.
88. Lou J, Zhou H, Li C, Hu L, Lu X, Li J, Yao H, Li W, Zhang X, Xu M. ABCA1 and ABCG1 Expression in the Small Intestine of Type 2 Diabetic Rats. *Laboratory Medicine*. 2014;45(1):17-24.10.1309/lmo485spyxbqanxj.
89. Stepankova R, Tonar Z, Bartova J, Nedorost L, Rossman P, Poledne R, Schwarzer M, Tlaskalova-Hogenova H. Absence of Microbiota (Germ-Free Conditions)



- Accelerates the Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice Fed Standard Low Cholesterol Diet. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 2010;17(8):796-804.10.5551/jat.3285.
90. Danielsson H, Gustafsson B. On serum-cholesterol levels and neutral fecal sterols in germ-free rats. Bile acids and steroids 59. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1959;83(2):482-5.[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90056-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90056-6).
91. Velagapudi VR, Hezaveh R, Reigstad CS, Gopalacharyulu P, Yetukuri L, Islam S, Felin J, Perkins R, Boren J, Oresic M, Backhed F. The gut microbiota modulates host energy and lipid metabolism in mice. *J Lipid Res*. 2010;51(5):1101-12.10.1194/jlr.M002774.
92. Caesar R, Nygren H, Oresic M, Backhed F. Interaction between dietary lipids and gut microbiota regulates hepatic cholesterol metabolism. *J Lipid Res*. 2016;57(3):474-81.10.1194/jlr.M065847.
93. Sayin SI, Wahlstrom A, Felin J, Jantti S, Marschall HU, Bamberg K, Angelin B, Hyotylainen T, Oresic M, Backhed F. Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metab*. 2013;17(2):225-35.10.1016/j.cmet.2013.01.003.
94. Mistry RH, Verkade HJ, Tietge UJF. Reverse Cholesterol Transport Is Increased in Germ-Free Mice. *Brief Report. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2017;37(3):419-22.doi:10.1161/ATVBAHA.116.308306.
95. Zarrinpar A, Chaix A, Xu ZZ, Chang MW, Marotz CA, Saghatelian A, Knight R, Panda S. Antibiotic-induced microbiome depletion alters metabolic homeostasis by affecting gut signaling and colonic metabolism. *Nature Communications*. 2018;9(1):2872.10.1038/s41467-018-05336-9.
96. Lindskog Jonsson A, Caesar R, Akrami R, Reinhardt C, Fak Hallenius F, Boren J, Backhed F. Impact of Gut Microbiota and Diet on the Development of Atherosclerosis in Apoe(-/-) Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018;38(10):2318-26.10.1161/ATVBAHA.118.311233.
97. Rabot S, Membrez M, Bruneau A, Gerard P, Harach T, Moser M, Raymond F, Mansourian R, Chou CJ. Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. *FASEB Journal*. 2010;24(12):4948 - +.10.1096/fj.10-164921.
98. Akyea RK, Kai J, Qureshi N, Iyen B, Weng SF. Sub-optimal cholesterol response to initiation of statins and future risk of cardiovascular disease. *Heart*. 2019;105(13):975.10.1136/heartjnl-2018-314253.
99. Vieira-Silva S, Falony G, Belda E, Nielsen T, Aron-Wisnewsky J, Chakaroun R, Forslund SK, Assmann K, Valles-Colomer M, Nguyen TTD, Proost S, Prifti E, Tremaroli V, Pons N, Le Chatelier E, Andreelli F, Bastard JP, Coelho LP, Galleron N, Hansen TH, Hulot JS, Lewinter C, Pedersen HK, Quinquis B, Rouault C, Roume H, Salem JE, Sondertoft NB, Touch S, MetaCardis C, Dumas ME, Ehrlich SD, Galan P, Gotze JP, Hansen T, Holst JJ, Kober L, Letunic I, Nielsen J, Oppert JM, Stumvoll M, Vestergaard H, Zucker JD, Bork P, Pedersen O, Backhed F, Clement K, Raes J. Statin therapy is associated with lower prevalence of gut microbiota dysbiosis. *Nature*. 2020;581(7808):310-5.10.1038/s41586-020-2269-x.
100. Khan TJ, Ahmed YM, Zamzami MA, Mohamed SA, Khan I, Baothman OAS, Mehanna MG, Yasir M. Effect of atorvastatin on the gut microbiota of high fat diet-induced hypercholesterolemic rats. *Sci Rep*. 2018;8(1):662.10.1038/s41598-017-19013-2.
101. Porreca E, Di Febbo C, Baccante G, Di Nisio M, Cuccurullo F. Increased transforming growth factor-beta<sub>1</sub> circulating levels and production in human monocytes after 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme a reductase inhibition

- with pravastatin. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002;39(11):1752.10.1016/S0735-1097(02)01857-0.
102. Kim J, Lee H, An J, Song Y, Lee CK, Kim K, Kong H. Alterations in Gut Microbiota by Statin Therapy and Possible Intermediate Effects on Hyperglycemia and Hyperlipidemia. *Front Microbiol*. 2019;10:1947.10.3389/fmicb.2019.01947.
103. Sun L, Xie C, Wang G, Wu Y, Wu Q, Wang X, Liu J, Deng Y, Xia J, Chen B, Zhang S, Yun C, Lian G, Zhang X, Zhang H, Bisson WH, Shi J, Gao X, Ge P, Liu C, Krausz KW, Nichols RG, Cai J, Rimal B, Patterson AD, Wang X, Gonzalez FJ, Jiang C. Gut microbiota and intestinal FXR mediate the clinical benefits of metformin. *Nat Med*. 2018;24(12):1919-29.10.1038/s41591-018-0222-4.
104. Yoo D-H, Kim IS, Van Le TK, Jung I-H, Yoo HH, Kim D-H. Gut Microbiota-Mediated Drug Interactions between Lovastatin and Antibiotics. *Drug Metabolism and Disposition*. 2014;42(9):1508.10.1124/dmd.114.058354.
105. Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojärvi J, Kootte RS, Bartelsman JFWM, Dallinga-Thie GM, Ackermans MT, Serlie MJ, Oozeer R, Derrien M, Druesne A, Van Hylckama Vlieg JET, Bloks VW, Groen AK, Heilig HGJ, Zoetendal EG, Stroes ES, de Vos WM, Hoekstra JBL, Nieuwdorp M. Transfer of Intestinal Microbiota From Lean Donors Increases Insulin Sensitivity in Individuals With Metabolic Syndrome. *Gastroenterology*. 2012;143(4):913-6.e7.<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.06.031>.
106. Zhao L, Zhang F, Ding X, Wu G, Lam YY, Wang X, Fu H, Xue X, Lu C, Ma J, Yu L, Xu C, Ren Z, Xu Y, Xu S, Shen H, Zhu X, Shi Y, Shen Q, Dong W, Liu R, Ling Y, Zeng Y, Wang X, Zhang Q, Wang J, Wang L, Wu Y, Zeng B, Wei H, Zhang M, Peng Y, Zhang C. Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes. *Science*. 2018;359(6380):1151.10.1126/science.aao5774.
107. De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Goncalves D, Vinera J, Zitoun C, Duchamp A, Bäckhed F, Mithieux G. Microbiota-Generated Metabolites Promote Metabolic Benefits via Gut-Brain Neural Circuits. *Cell*. 2014;156(1):84-96.10.1016/j.cell.2013.12.016.
108. Lin HV, Frassetto A, Kowalik Jr EJ, Nawrocki AR, Lu MM, Kosinski JR, Hubert JA, Szeto D, Yao X, Forrest G, Marsh DJ. Butyrate and Propionate Protect against Diet-Induced Obesity and Regulate Gut Hormones via Free Fatty Acid Receptor 3-Independent Mechanisms. *PLOS ONE*. 2012;7(4):e35240.10.1371/journal.pone.0035240.
109. Reimer RA, McBurney MI. Dietary fiber modulates intestinal proglucagon messenger ribonucleic acid and postprandial secretion of glucagon-like peptide-1 and insulin in rats. *Endocrinology*. 1996;137(9):3948-56.10.1210/endo.137.9.8756571.
110. Gil-Lozano M, Hunter PM, Behan LA, Gladanac B, Casper RF, Brubaker PL. Short-term sleep deprivation with nocturnal light exposure alters time-dependent glucagon-like peptide-1 and insulin secretion in male volunteers. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2016;310(1):E41-50.10.1152/ajpendo.00298.2015.
111. Gil-Lozano M, Mingomataj EL, Wu WK, Ridout SA, Brubaker PL. Circadian secretion of the intestinal hormone GLP-1 by the rodent L cell. *Diabetes*. 2014;63(11):3674-85.10.2337/db13-1501.
112. Chambers ES, Viardot A, Psichas A, Morrison DJ, Murphy KG, Zac-Varghese SE, MacDougall K, Preston T, Tedford C, Finlayson GS, Blundell JE, Bell JD, Thomas EL, Mt-Isa S, Ashby D, Gibson GR, Kolida S, Dhillon WS, Bloom SR, Morley W, Clegg S, Frost G. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut*. 2015;64(11):1744-54.10.1136/gutjnl-2014-307913.

113. Roshanravan N, Mahdavi R, Alizadeh E, Jafarabadi MA, Hedayati M, Ghavami A, Alipour S, Alamdari NM, Barati M, Ostadrahimi A. Effect of Butyrate and Inulin Supplementation on Glycemic Status, Lipid Profile and Glucagon-Like Peptide 1 Level in Patients with Type 2 Diabetes: A Randomized Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Horm Metab Res.* 2017;49(11):886-91.10.1055/s-0043-119089.
114. Clarke G, Stilling RM, Kennedy PJ, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG. Minireview: Gut Microbiota: The Neglected Endocrine Organ. *Molecular Endocrinology.* 2014;28(8):1221-38.10.1210/me.2014-1108.
115. Pingitore A, Chambers ES, Hill T, Maldonado IR, Liu B, Bewick G, Morrison DJ, Preston T, Wallis GA, Tedford C, Castanera Gonzalez R, Huang GC, Choudhary P, Frost G, Persaud SJ. The diet-derived short chain fatty acid propionate improves beta-cell function in humans and stimulates insulin secretion from human islets in vitro. *Diabetes Obes Metab.* 2017;19(2):257-65.10.1111/dom.12811.
116. Gordon SM, Li H, Zhu X, Shah AS, Lu LJ, Davidson WS. A comparison of the mouse and human lipoproteome: suitability of the mouse model for studies of human lipoproteins. *Journal of proteome research.* 2015;14(6):2686-95.10.1021/acs.jproteome.5b00213.

## 7. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Johann Rößler, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der Einfluss des Darm-Mikrobioms auf die Genexpression von hepatischen und intestinalen Stoffwechselgenen: Rolle für kardiometabolische Erkrankungen/Impact of gut microbiota on expression of genes involved in hepatic and intestinal metabolism: Role for cardiometabolic 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.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, 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.“

Datum

Unterschrift

### 7.1 Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Johann Rößler hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

1. F. Zimmermann\*, **J. Roessler\***, D. Schmidt, A. Jasina, P. Schumann, M. Gast, W. Poller, D. Leistner, H. Giral, N. Krankel, A. Kratzer, S. Schuchardt, M. M. Heimesaat, U. Landmesser, and A. Haghikia, "Impact of the Gut Microbiota on Atorvastatin Mediated Effects on Blood Lipids," *J Clin Med*, vol. 9, no. 5, May 25 2020, doi: 10.3390/jcm9051596. **\*equally contributed as first author**

Beitrag im Einzelnen:

Johann Rößler hat an den Tierversuchen mitgewirkt, sowie die Genexpressionsanalysen durchgeführt aus denen die Abbildungen 6 (**A-F**) und 7 (**A-F**) entstanden sind. Zudem hat Johann Rößler die statistische Auswertung der Sphingolipide vorgenommen, aus welcher die Abbildung 4 (**A-B**) entstanden ist, sowie die histologischen Schnitte angefertigt, welche für die Färbungen in Abbildung 7 (**G**) verwendet wurden. Weiterhin war Johann Rößler an der Erstellung des Manuskripts, sowie der Revisionsarbeit im Zuge des Peer-Reviews beteiligt.

2. Haghikia A, Zimmermann F, Schumann P, Jasina A, **Roessler J**, Schmidt D, Heinze P, Kaisler J, Nageswaran V, Aigner A, Ceglarek U, Cineus R, Hegazy AN, van der Vorst EPC, Döring Y, Strauch CM, Nemet I, Tremaroli V, Dwibedi C, Kränkel N, Leistner DM, Heimesaat MM, Bereswill S, Rauch G, Seeland U, Soehnlein O, Müller DN, Gold R, Bäckhed F, Hazen SL, Haghikia A, Landmesser U. Propionate attenuates atherosclerosis by immune-dependent regulation of intestinal cholesterol metabolism. *European Heart Journal*. 2021;10.1093/eurheartj/ehab644.

Beitrag im Einzelnen:

Johann Rößler hat an den Tierversuchen mitgewirkt, sowie Genexpressionsanalysen durchgeführt. Weiterhin hat Johann Rößler die statistische Auswertung der Plasma-Metabolite durchgeführt.

---

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## **8. Curriculum vitae**

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



## 9. Publikationsliste

### Artikel (Peer-Review):

- F. Zimmermann\*, **J. Roessler\***, D. Schmidt, A. Jasina, P. Schumann, M. Gast, W. Poller, D. Leistner, H. Giral, N. Krankel, A. Kratzer, S. Schuchardt, M. M. Heimesaat, U. Landmesser, and A. Haghikia, "Impact of the Gut Microbiota on Atorvastatin Mediated Effects on Blood Lipids," *J Clin Med*, vol. 9, no. 5, May 25 2020, doi: 10.3390/jcm9051596.

#### **\* equally contributed as first authors**

- Haghikia A, Zimmermann F, Schumann P, Jasina A, **Roessler J**, Schmidt D, Heinze P, Kaisler J, Nageswaran V, Aigner A, Ceglarek U, Cineus R, Hegazy AN, van der Vorst EPC, Döring Y, Strauch CM, Nemet I, Tremaroli V, Dwibedi C, Kränkel N, Leistner DM, Heimesaat MM, Bereswill S, Rauch G, Seeland U, Soehnlein O, Müller DN, Gold R, Bäckhed F, Hazen SL, Haghikia A, Landmesser U. Propionate attenuates atherosclerosis by immune-dependent regulation of intestinal cholesterol metabolism. *European Heart Journal*. 2021;10.1093/eurheartj/ehab644.

### Posterpräsentationen:

- DGK-Herztage 10.-12.Oktober.2019 in Berlin, Sven-Effert-Posterpreis-Session:
  - o Implication of the gut microbiome for atorvastatin-related regulation of the serum lipidome (**J. Rößler**, F. L. Zimmermann, D. Schmidt, U. Escher, A. Jasina, M. Heimesaat, M. Gast, W. Poller, P. Schumann, N. Kränkel, A. Kratzer, H. Giral, D. Leistner, U. Landmesser, A. Haghikia (Berlin) ) (PP147(6))
    - **Auszeichnung: Sven-Effert-Posterpreis, 1. Platz**
- ESC Congress 2020 – The Digital Experience, Advances in Lipids and Cardiovascular Diseases–Session (31.August.2020):
  - o Impact of the gut microbiome on the atorvastatin-dependent modulation of the serum lipidome (**J Roessler** (Berlin,DE), F Zimmermann (Berlin,DE), D Schmidt (Berlin,DE), U Escher (Berlin,DE), A Jasina (Berlin,DE), MM Heimesaat (Berlin,DE), M Gast (Berlin,DE), W Poller (Berlin,DE), H Giral-Arnal (Berlin,DE), P Schumann (Berlin,DE), DM Leistner (Berlin,DE), U Landmesser (Berlin,DE), A Haghikia (Berlin,DE))
- DGK-Herztage 30.September – 02.Oktober.2021 in Bonn, Signaltransduktion und Metabolismus – Session:
  - o Gut microbiota-dependent metabolite propionate mediates atheroprotective effects by immune-dependent modulation of intestinal cholesterol absorption (**J. Roessler**, F. Zimmermann, P. Schumann, A. Jasina, D. Schmidt, V. Nageswaran, U. Ceglarek, R. Cineus, A. N. Hegazy, E.P.C. van der Vorst, Y. Döring, N. Kränkel, D. M. Leistner, M. M. Heimesaat, S. Bereswill, O. Soehnlein, D. N. Müller, A. Haghikia, U. Landmesser, A. Haghikia)



## **10. Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Arash Haghikia für die Überlassung dieses spannenden Forschungsthemas sowie für die hervorragende Betreuung dieser Forschungsarbeit bedanken. Der engmaschige, freundliche, problemorientierte sowie fachlich hochqualitative Austausch bereitete stets Freude und Motivation. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Arash Haghikia explizit für die Förderung meines wissenschaftlichen Werdegangs herzlichst bedanken und freue mich auf weitere gemeinsame Projekte.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei dem Klinikdirektor Herrn Prof. Dr. med. Ulf Landmesser für die Möglichkeit bedanken in der Medizinischen Klinik für Kardiologie der Charité-Campus Benjamin-Franklin meine Dissertation abzulegen.

Auch bin ich allen Mitarbeitern der AG Landmesser zu besonderem Dank verpflichtet, welche mir stets bei meiner Laborarbeit geholfen haben. Insbesondere möchte ich mich bei Frau Xiaomin Wang sowie Frau Minoo Moobed bedanken, welche mir mit ihrer freundlichen Art und außerordentlichen Expertise die Laborarbeit erleichtert haben.

Auch allen weiteren Doktoranden der AG Haghikia möchte ich für die schöne und konstruktive Zusammenarbeit danken. So hat es immer Freude bereitet gemeinsame Arbeiten zu erledigen.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank meinen lieben Eltern, meinen beiden Brüdern und meiner Freundin, welche mich stets auf meinem Weg begleitet haben und ohne die die Erstellung dieser Forschungsarbeit so nicht möglich gewesen wäre.

# 11. Bescheinigung Statistik



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE)

Direktor: Prof. Dr. Geraldine Rauch

Postanschrift:  
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin  
Besucheranschrift:  
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171  
geraldine.rauch@charite.de  
<https://biometrie.charite.de/>



**Name, Vorname:** Rößler, Johann  
**Emailadresse:** [johann.roessler@charite.de](mailto:johann.roessler@charite.de)  
**Matrikelnummer:** 221261  
**PromotionsbetreuerIn:** PD Dr. med. Arash Haghikia  
**Promotionsinstitution/ Klinik:** Medizinische Klinik für Kardiologie (CBF)

## Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Herr Rößler innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE) bei mir eine statistische Beratung zu seinem Promotionsvorhaben „Der Einfluss des Darm-Mikrobioms auf die Genexpression von hepatischen und intestinalen Stoffwechselgenen: Rolle für kardiometabolische Erkrankungen“ wahrgenommen hat.

Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

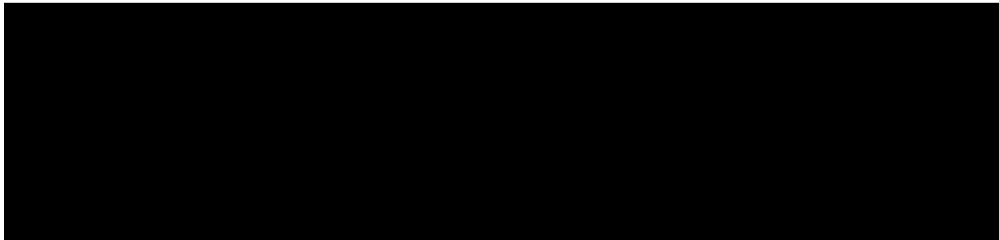
- Termin 1: 15.10.2019
- Termin 2: 30.10.2019
- Termin 3: 21.10.2020
- Termin 4: 26.10.2020

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Empfehlung zur adäquaten Deskription der jeweiligen Gruppen je nach Art und Verteilung der Variablen
- Empfehlungen zur Überprüfung der Normalverteilungsannahme
- Empfehlungen zur korrekten Anwendung geeigneter statistischer Tests in Abhängigkeit von den Fragestellungen (parametrisch (t-Test) vs. nicht-parametrische Testverfahren (Mann-Whitney-U/ Wilcoxon-Test; MANOVA-Analyse zur Gruppengegenüberstellung bei Zeitverläufen))
- Empfehlung zur korrekten Interpretation sowie Darstellung der Ergebnisse
- Empfehlung zur Erwähnung, dass die Ergebnisse teilweise von explorativen Charakter und im Rahmen der Grundlagenforschung entstanden sind.

- Anmerkung innerhalb der Diskussion, dass die explorativen Resultate dieser Arbeit durch weitere unabhängige Studien bestätigt werden müssen.

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.



 CHARITÉ  
UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN  
Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie  
Campus Charité Mitte  
Charitéplatz 1 | D-10117 Berlin