

DISSERTATION

**Die Rolle von Darmmikrobiom-assoziierten Metaboliten für  
kardiometabolische Erkrankungen**

**The role of gut microbiome-associated metabolites in  
cardiometabolic diseases**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Friederike Luise Zimmermann**

aus Frankfurt (Oder)

Erstbetreuer: PD Dr. Arash Haghikia

Datum der Promotion: 30.11.2023

## Vorwort

---

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

1. 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, Doring Y, Strauch CM, Nemet I, Tremaroli V, Dwibedi C, Krankel N, Leistner DM, Heimesaat MM, Bereswill S, Rauch G, Seeland U, Soehnlein O, Muller DN, Gold R, Backhed F, Hazen SL, Haghikia A and Landmesser U

**Propionate attenuates atherosclerosis by immune-dependent regulation of intestinal cholesterol metabolism.**

European Heart Journal, Volume 43, Issue 6, 7 February 2022, Pages 518-533, DOI: 10.1093/eurheartj/ehab644

2. 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 and Haghikia A

**Impact of the Gut Microbiota on Atorvastatin Mediated Effects on Blood Lipids.**

Journal of Clinical Medicine, Volume 9, Issue 5, 25 May 2020, DOI:10.3390/jcm9051596

3. Haghikia A, Li XS, Liman TG, Bledau N, Schmidt D, Zimmermann F, Krankel N, Widera C, Sonnenschein K, Haghikia A, Weissenborn K, Fraccarollo D, Heimesaat MM, Bauersachs J, Wang Z, Zhu W, Bavendiek U, Hazen SL, Endres M and Landmesser U

**Gut Microbiota-Dependent Trimethylamine N-Oxide Predicts Risk of Cardiovascular Events in Patients With Stroke and Is Related to Proinflammatory Monocytes.**

Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, Volume 38, Issue 9, September 2018, Pages 2225-2235, DOI: 10.1161/ATVBAHA.118.311023

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>5</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>8</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>9</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>14</b>
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>16</b>
1.1 KARDIOMETABOLISCHE ERKRANKUNGEN.....	16
1.2 DYSLIPIDÄMIEN UND ATHEROSKLEROSE.....	17
1.2.1 <i>Biologische Rolle von Lipiden und Lipoproteinen</i> .....	17
1.2.2 <i>Dyslipidämie</i> .....	17
1.3 DAS DARMMIKROBIOM .....	18
1.3.1 <i>Beeinflussung der Zusammensetzung des Darmmikrobioms</i> .....	19
1.3.2 <i>Darmmikrobiom und kardiometabolische Erkrankungen</i> .....	22
1.3.3 <i>Kurzkettige Fettsäuren</i> .....	25
1.3.3.1 <i>Definition und Entstehung kurzkettiger Fettsäuren</i> .....	25
1.3.3.2 <i>Signalwege und Einfluss auf kardiometabolische Erkrankungen</i> .....	26
1.3.4 <i>Analysemethoden des Darmmikrobioms - State of the art</i> .....	27
1.4 FRAGESTELLUNGEN UND ZIELSETZUNG.....	29
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>30</b>
2.1 MATERIALEN.....	30
2.1.1 <i>Chemikalien</i> .....	30
2.1.2 <i>Medikamente</i> .....	31
2.1.3 <i>Antikörper</i> .....	31
2.1.4 <i>Kits und Assays</i> .....	32
2.1.5 <i>Gebrauchtwaren</i> .....	32
2.1.6 <i>Puffer und Stammlösungen</i> .....	32
2.1.7 <i>Medien</i> .....	34
2.1.8 <i>Technische Geräte</i> .....	34
2.1.9 <i>Software</i> .....	35
2.1.10 <i>Mäuse</i> .....	35
2.1.11 <i>Experimentelle Diäten</i> .....	35
2.1.12 <i>Hep G2</i> .....	36
2.2 METHODEN .....	37
2.2.1 <i>Mausversuche</i> .....	37
2.2.1.1 <i>Sekundär abiotische Mäuse</i> .....	37
2.2.1.2 <i>Tierversuchsreihe mit Propionatbehandlung</i> .....	37
2.2.1.3 <i>Tierversuchsreihe mit Atorvastatinbehandlung</i> .....	38
2.2.1.4 <i>Probengewinnung und -vorbereitung</i> .....	39
2.2.2 <i>Molekulare Analyse des Darmmikrobioms</i> .....	39
2.2.3 <i>Glukosemessungen</i> .....	40
2.2.4 <i>Lipidprofil-Messungen</i> .....	40
2.2.4.1 <i>Murines Low-Density-Lipoprotein Assay</i> .....	40
2.2.4.2 <i>Hochleistungsflüssigkeitschromatographie</i> .....	41
2.2.5 <i>Zellkultorexperimente</i> .....	41
2.2.5.1 <i>Stimulation von HEPG2 Zellen mit Propionat</i> .....	41
2.2.5.2 <i>Stimulation von HEPG2 Zellen mit Interleukin 10 über 24 Stunden</i> .....	42
2.2.6 <i>HMG-CoA-Reduktase Aktivitäts Assay</i> .....	42
2.2.7 <i>Western Blot</i> .....	43
2.2.7.1 <i>Proteinisolation</i> .....	43
2.2.7.2 <i>Proteinquantifizierung mit Bicinchoninsäure</i> .....	44

2.2.7.3 SDS-Denaturierung.....	44
2.2.7.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Blotting .....	45
2.2.7.5 Antikörper - Färbung.....	46
2.2.7.6 Densometrie und Auswertung.....	46
2.2.8 Statistische Auswertung.....	46
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>47</b>
3.1 EINFLUSS DES DARMMIKROBIOMS FÜR DIE REGULATION DES CHOLESTERINSTOFFWECHSELS .....	47
3.1.1 Lipidprofil in konventionellen und sekundär abiotischen Mäusen.....	47
3.1.2 Lipidprofil in konventionellen und sekundär abiotischen hypercholesterämischen Mäusen .....	49
3.1.3 Zusammensetzung des Darmmikrobioms und Einfluss von Diät auf die Darmmikrobiomkomposition.....	50
3.1.4 Einfluss des Darmmikrobioms auf Leber.....	52
3.1.5 Einfluss des Darmmikrobioms auf das Körpergewicht in hypercholesterämischen Mäusen .....	53
3.1.6 Einfluss des Darmmikrobioms auf den Glukosespiegel.....	53
3.2 MÖGLICHER EINFLUSS DES DARMMIKROBIOMS AUF DIE CHOLESTERINSENKENDE WIRKUNG VON STATINEN .....	54
3.2.1 Einfluss von Atorvastatin auf die Zusammensetzung des Darmmikrobioms.....	54
3.2.2 Einfluss des Darmmikrobioms auf die cholesterinsenkende Wirkung von Atorvastatin.....	56
3.2.3 Potentielle Mechanismen des Darmmikrobiom-abhängigen Einflusses auf die cholesterinsenkende Wirkung von Statinen.....	57
3.2.3.1 Einfluss von Atorvastatin auf das Lebergewicht in konventionellen und sekundär abiotischen Mäusen.....	58
3.2.3.2 Einfluss von Atorvastatin auf das Körpergewicht in konventionellen und sekundär abiotischen Mäusen.....	59
3.3 EINFLUSS DES PROPIONATS AUF DEN CHOLESTERINSTOFFWECHSEL.....	60
3.3.1 Lipidprofil in konventionellen und abiotischen hyperlipidämischen Mäusen unter oraler Propionatgabe.....	60
3.3.2 Veränderung des Darmmikrobioms unter oraler Propionatzufuhr.....	62
3.3.3 Potentielle Molekularmechanismen der Propionat-assoziierten Regulation des hepatischen Cholesterinmetabolismus .....	64
3.3.3.1 Regulation der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase- Aktivität.....	64
3.3.3.2 Regulation von HMGCR und HMGCS1 durch Propionat in vivo.....	65
3.3.3.3 In-vitro Regulation von HMGCR und HMGCS1 durch Propionat.....	66
3.3.3.4 Regulation der Acetyl-CoA-Acetyltransferase 2 durch Propionat .....	66
3.3.3.5 Einfluss von oraler Propionatzufuhr auf das Lebergewicht in konventionellen und sekundär abiotischen Mäusen.....	67
3.3.4 Einfluss immunregulatorischer Mechanismen von Propionat auf den Cholesterinstoffwechsel.....	68
3.3.5 Auswirkung von Propionat auf das Körpergewicht.....	69
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>70</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>79</b>
<b>EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG .....</b>	<b>87</b>
<b>ANTEILSERKLÄRUNG AN ETWAIGEN ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>88</b>
<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>89</b>
<b>PUBLIKATIONS LISTE .....</b>	<b>91</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>92</b>
<b>BESCHEINIGUNG DES AKKREDITIERTEN STATISTIKERS.....</b>	<b>93</b>

## Abbildungsverzeichnis

---

<b>Abbildung 1</b> Anzahl der Publikationen zum Thema Darmmikrobiom und kardiometabolische Erkrankungen .....	19
<b>Abbildung 2</b> Versuchsaufbau mit Propionatbehandlung .....	40
<b>Abbildung 3</b> Versuchsaufbau mit Atorvastatinbehandlung.....	40
<b>Abbildung 4</b> LDL-Assay .....	41
<b>Abbildung 5</b> Design der HMG-CoA Reduktase Assay Mikroplatte, Ausschnitt von 96 well Platte .....	43
<b>Abbildung 6</b> TC, VLDL, LDL und HDL im Plasma von C57BL6 Mäusen mit intaktem (CONV) und eradiziertem Mikrobiom (AB) nach 6 Wochen Kontrolldiät (SCD) und Hochfettdiät (HFD).....	48
<b>Abbildung 7</b> Prozentualer Anteil von HDL und LDL am TC von C57BL6 Mäusen mit intaktem (CONV) und eradiziertem Mikrobiom (AB) nach 6 Wochen Kontrolldiät (SCD) und Hochfettdiät (HFD).....	48
<b>Abbildung 8:</b> TC, VLDL, LDL und HDL im Plasma von ApoE <sup>-/-</sup> Mäusen mit intaktem (CONV) und eradiziertem Mikrobiom (AB) nach 6 Wochen Kontrolldiät (SCD) und Hochfettdiät (HFD).....	50
<b>Abbildung 9</b> Prozentualer Anteil von HDL und LDL an TC von ApoE <sup>-/-</sup> Mäusen mit intaktem (CONV) und eradiziertem Mikrobiom (AB) nach 6 Wochen Kontrolldiät (SCD) und Hochfettdiät (HFD).....	50
<b>Abbildung 10</b> 16S rRNA Analyse des Darmmikrobioms in C57BL/6 Mäusen nach 6 Wochen Standarddiät (SCD) und Hochfettdiät (HFD). .....	51
<b>Abbildung 11</b> Prozentualer Anteil der Phyla im Darmmikrobiom in C57BL/6 Mäusen nach 6 Wochen Standarddiät (SCD) und Hochfettdiät (HFD).....	52
<b>Abbildung 12</b> Absolute Lebergewichte (links) und Ratio von g Leber/g Körpergewicht (rechts) von konventionellen und sekundär abiotischen Mäusen unter Kontrolldiät (SCD) und Hochfettdiät (HFD).....	52
<b>Abbildung 13</b> Gewichtsverlauf von ApoE <sup>-/-</sup> Mäusen mit (CONV) oder durch Antibiotika eradiziertem Darmmikrobiom (ABX) nach 6 Wochen Behandlung mit Kontrolldiät (SCD) oder Hochfettdiät (HFD).....	53
<b>Abbildung 14</b> Glukose im Plasma von C57Bl6 Mäusen mit intaktem (CONV) und eradiziertem Mikrobiom (AB) am Ende der Behandlung mit 6 Wochen Kontrolldiät (SCD) oder Hochfettdiät (HFD).....	54

<b>Abbildung 15</b> 16S rRNA Analyse des Darmmikrobioms nach 6 Wochen Standarddiät (SCD), Hochfett­diät (HFD) und HFD mit Atorvastatin (Ato­r) behandelten Mäusen.....	55
<b>Abbildung 16</b> 16S rRNA Analyse des Darmmikrobioms auf Phylum-Ebene nach 6 Wochen Standarddiät (SCD), Hochfett­diät (HFD) und HFD mit Atorvastatin (Ato­r) behandelten Mäusen .....	56
<b>Abbildung 17</b> Zusammensetzung des Darmmikrobioms auf Phylum-Ebene .....	56
<b>Abbildung 18</b> LDL-Cholesterin im Plasma von C57Bl6-Mäusen mit intaktem (CONV) und eradiziertem Mikrobiom (AB) nach 6 Wochen Behandlung mit Kontroll­diät (SCD), Hochfett­diät (HFD) oder HFD und Atorvastatin (HFD+A) .....	57
<b>Abbildung 19</b> Proteinexpression von SREBP2 und LDLR in der Leber von Wildtyp-Mäusen unter Kontroll­diät (SCD), Hochfett­diät (HFD) oder Hochfett­diät und täglicher Atorvastatin-Gabe (HFD+A) .....	58
<b>Abbildung 20</b> Ratio g Leber/g Körpergewicht. Lebermasse von konventionellen und sekundär abiotischen Mäusen unter Kontroll­diät (SCD), Hochfett­diät (HFD) oder Hochfett­diät und täglicher Atorvastatin-Gabe (HFD+A).....	59
<b>Abbildung 21</b> Gewichtsverlauf von C57BL6 Mäusen nach 6 Wochen Behandlung mit Kontroll­diät (SCD), Hochfett­diät (HFD) und HFD und Atorvastatin.....	60
<b>Abbildung 22</b> Gesamtcholesterin, VLDL, LDL und HDL im Plasma von ApoE-/- Mäusen mit intaktem Mikrobiom nach 6 Wochen Standard­diät (SCD), Hochfett­diät (HFD) und HFD mit Propionatgabe per os (+P).....	61
<b>Abbildung 23</b> Gesamtcholesterin, VLDL, LDL und HDL im Plasma von ApoE-/- Mäusen mit eradiziertem Mikrobiom nach 6 Wochen Standard­diät (SCD), Hochfett­diät (HFD) und HFD mit Propionatgabe per os (+P) .....	62
<b>Abbildung 24</b> 16S rRNA Analyse des Darmmikrobioms nach 6 Wochen Standard­diät (SCD), Hochfett­diät (HFD) und HFD mit Propionsäure (PA) behandelten Mäusen .....	63
<b>Abbildung 25</b> Relativer Anteil der Phyla in % .....	63
<b>Abbildung 26</b> Zusammensetzung des Darmmikrobioms.....	64
<b>Abbildung 27</b> Direkter Einfluss von Propionat und Atorvastatin auf die Enzymaktivität von HMGCR. ....	65
<b>Abbildung 28</b> Proteinexpression von HMGCR und HMGCS1 in der Leber von ApoE-/- Mäusen unter Kontroll­diät (SCD), Hochfett­diät (HFD) und Hochfett­diät und täglicher Propionat-Gavage (HFD+P) .....	65
<b>Abbildung 29</b> Proteinexpression von HMGCS1 und HMGCR in mit Calciumpropionat stimulierten HepG2-Zellen .....	66

<b>Abbildung 30</b> Hepatische Proteinexpression von ACAT2 in Wildtyp-Mäusen unter Kontrolldiät (SCD), Hochfettdiät (HFD) oder Hochfettdiät und täglicher Propionat-Gavage (HFD+PA).....	67
<b>Abbildung 31</b> Ratio g Leber/g Körpergewicht. Lebermasse von konventionellen und sekundär abiotischen Mäusen unter Kontrolldiät (SCD), Hochfettdiät (HFD) oder Hochfettdiät und täglicher Propionat-Gabe (HFD+P). .....	67
<b>Abbildung 32</b> Hepatische IL10 Proteinexpression in Mäusen mit und ohne Antibiotikabehandlung und nach 6 Wochen Kontrolldiät (SCD), Hochfettdiät (HFD) und Hochfettdiät+Propionat (HFD+P).....	68
<b>Abbildung 33</b> Proteinexpression von HMGCR und HMGCS1 in HEPG2-Zellen nach 24h Inkubation mit IL10 in verschiedenen Konzentrationen .....	69
<b>Abbildung 34</b> Gewichtsverlauf von C57BL6 Mäusen nach 6 Wochen Behandlung mit Kontrolldiät (SCD), Hochfettdiät (HFD) und HFD und Propionat (HFD+P). .....	70

## Tabellenverzeichnis

---

<b>Tabelle 1</b> Ausgewählte Metaboliten des Darmmikrobioms, deren molekulare Signalwege und Bedeutung für kardiometabolische Erkrankungen und Prozesse .....	24
<b>Tabelle 2</b> Chemische Struktur der kurzkettigen Fettsäuren .....	26
<b>Tabelle 3</b> Glykosidasen im Darmmikrobiom; adaptiert von “The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota” El Kaoutari et al. ....	26
<b>Tabelle 4</b> Nährstoffanalyse, Weender-Analyse der in G0295-16 verwendeten Futtermittel, aus ssniff Spezialdiäten GmbH, Katalog 2019.....	36
<b>Tabelle 5</b> Fettsäuren in Futtermitteln. Aus ssniff Spezialdiäten GmbH, Katalog 2019 ..	36
<b>Tabelle 6</b> Mengenangaben zur Herstellung von SDS-PAGE Gelen.....	45

## Abkürzungsverzeichnis

---

AB	sekundär abiotisch, eradiziertes Darmmikrobiom
ACAT2	Acetyl-CoA-Acetyltransferase 2
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
Bact2	<i>Bacteroides</i> 2 (=Enterotyp)
bzw.	beziehungsweise
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CONV	konventionell, mit intaktem Darmmikrobiom
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	Fetales bovines Serum
Foxp3	Forkhead-Box-Protein P3
g	Gramm
G	Gauge
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLP-1	Glucagon-like Peptid 1
h	Stunde/Stunden
HCl	Chlorwasserstoff
HDL	High Density Lipoprotein
HFD	Hochfettdiät
HMGCR	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
HMGCS1	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Synthase 1
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, high performance liquid chromatography
HRP	Horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IL	Interleukin
IMC	Iodomethylcholin
LDL	Low Density Lipoprotein
LDLR	Low Density Lipoprotein Rezeptor
Lp(a)	Lipoprotein a

LXR $\alpha$	Leber X Rezeptor alpha
mA	Milliampere
MAC	Microbiota-Accessible Carbohydrates
mg	Milligramm
min	Minute/Minuten
ml	Milliliter
NaCl	Natriumchlorid
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NFDM	Non-Fat Dry Milk
ng	Nanogramm
NPC1L1	Niemann-Pick type C1 Like-1
ns	nicht signifikant
OTU	Operational Taxonomic Units
p	P-Wert
PA	Propionsäure, Propionat, <i>propionic acid</i>
PCSK9	Proteinkonvertase Subtilisin Kexin Typ 9
pH	potentia Hydrogenii
PBS	phosphate buffered saline
PVDF	Polyvinylidene Difluorid
RNA	Ribonukleinsäure (englisch ribonucleic acid)
s	Sekunde/Sekunden
SCD	Kontrolldiät, standard chow diet
SD	standard deviation, Standardabweichung
SDS	sodium dodecyl sulfate
SPF	Spezifisch Pathogen-frei
SREBP2	Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween20
TC	Gesamtcholesterin, total cholesterol
Th1	T-Helfer 1 Zellen
Th17	T-Helfer 17 Zellen
TMA	Trimethylamin
Treg	regulatorische T-Zellen
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

T2D	Diabetes mellitus Typ 2
u.a.	unter anderem
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

# Zusammenfassung

---

## *Einleitung*

Die intestinale Flora ist integraler Bestandteil kardiometabolischer Gesundheit. Veränderungen des Darmmikrobioms sind mit kardiometabolischen Erkrankungen assoziiert. Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss des von Darmmikrobiom und Propionat, einem Metaboliten des Darmmikrobioms, im Cholesterinmetabolismus im Tiermodell zu untersuchen. Zudem untersuchten wir den Einfluss des Darmmikrobioms für cholesterinsenkende Effekte einer Statintherapie mit Atorvastatin.

## *Methoden*

Wir verwendeten Wildtyp- und Apolipoprotein E Knockout (ApoE<sup>-/-</sup>) Mäuse als etabliertes Mausmodell der Hypercholesterinämie. Mäuse mit intaktem oder durch Antibiotikagabe eradiziertem Darmmikrobiom (sekundär abiotisch) erhielten über 6 Wochen Standard- oder Hochfettdiät. Ab Woche 3 wurden die Mäuse täglich mit Propionat, Atorvastatin oder einer Kontrolllösung gavagiert. Nach 6 Wochen wurden die Mäuse getötet und Fäzes, Blut und Organe gesammelt. Blutlipide wurden durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie bestimmt. Mittels 16srRNA Genanalyse erfolgte die Analyse der Darmmikrobiomzusammensetzung auf OTU-Ebene. Expression hepatischer und intestinaler Schlüsselproteine des Cholesterinmetabolismus wurden via Western Blot untersucht. Potentielle inhibitorische Effekte von Propionat auf HMGCR wurden mittels Enzym-Aktivitäts-Assay und einer hepatischen Zelllinie untersucht. Statistische Analysen erfolgten mittels 1-way ANOVA, gefolgt von einem post hoc Tukey's oder Students T-Test.

## *Ergebnisse*

Die Darmmikrobiomzusammensetzung wurde in Wildtypmäusen durch Diät auf Ebene der Bakteriengruppen beeinflusst. Propionat und Atorvastatin zeigten Einfluss auf Phylumebene. Hyperlipidämische ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse ohne Darmmikrobiom zeigten höhere Plasmaspiegel von LDL als konventionelle Vergleichstiere. Unter oraler Propionatzufuhr zeigten Hochfettdiät gefütterte ApoE<sup>-/-</sup> Mäuse signifikant reduzierte LDL-Spiegel, wenn das Mikrobiom intakt war. Propionat hatte keinen Einfluss auf LDL-Spiegel sekundär abiotischer Tiere. Atorvastatin, jedoch nicht Propionat, wies eine Mikrobiom-abhängige Regulation hepatischer und intestinaler Schlüsselproteine des Cholesterinmetabolismus

auf. Propionat zeigte keinen Einfluss auf die HMGCR-Aktivität. Inkubation von HepG2 Zellen mit Propionat führte zu keiner Expressionsveränderung von HMGCR und HMGCS1.

### *Diskussion*

Unsere Ergebnisse unterstreichen den regulatorischen Effekt des Darmmikrobioms auf den Cholesterinmetabolismus. Propionatzufuhr führte zur Senkung der LDL-Blutspiegel hyperlipidämischer Mäuse unter Hochfettdiät mit intaktem Mikrobiom. Als potentiellen Mechanismus identifizierten wir eine veränderte Darmmikrobiomzusammensetzung. Zudem sahen wir eine Modulation des Mikrobioms durch Atorvastatin sowie Darmmikrobiom-abhängige Regulation des cholesterinsenkenden Effektes von Atorvastatin. Diese Ergebnisse könnten dazu beitragen neuartige, Darmmikrobiom-basierte Konzepte zur Prävention und Behandlung kardiometabolischer Erkrankungen zu entwickeln.

# Abstract

---

## *Introduction*

Intestinal flora is essential for cardiometabolic health. Changes of gut microbiome composition are associated with numerous disease states, including cardiovascular and cardiometabolic. Multiple gut microbial metabolites have been shown to impact cardiometabolic physiology in animal and human studies. Here we examined the influence of gut microbiota as well as of its metabolite propionate on cholesterol homeostasis in mice. Furthermore, we investigated a potential role of the gut microbiome for cholesterol lowering effects of atorvastatin.

## *Methods*

To address these objectives we used wild type and hypercholesterolemic mice. Mice with intact or antibiotics depleted gut microbiome were put on standard control or high fat diet for six weeks. From week three mice were orally applied either control vehicle, propionate or atorvastatin once daily. After six weeks mice were sacrificed and feces, organs and blood were collected. Blood lipids were determined by high performance liquid chromatography. To demonstrate community composition of the gut microbiome of the respective groups, 16S rRNA gene analysis was performed. Semiquantitative protein expression of hepatic and intestinal proteins were assessed via Western Blot. In vitro inhibitory properties of propionate on HMGCR were examined using an enzyme activity assay and hepatic cell line. Statistical analyses were performed by 1-way ANOVA followed by post hoc Tukey's multiple comparison test or students t test.

## *Results*

Gut microbiome composition was changed upon high fat diet compared to control diet in wild type mice. Propionate and atorvastatin modulated gut microbiome composition at phylum level in conventional mice. Hyperlipidemic abiotic ApoE<sup>-/-</sup> mice showed elevated LDL-level compared to mice with intact gut microbiome. Orally applied propionate lowered LDL-level in high fat diet fed ApoE<sup>-/-</sup> mice microbiota-dependent. To identify underlying pathways key enzymes in cholesterol metabolism were investigated on protein level. Atorvastatin showed a microbiota-dependent regulation of proteins, while this was not observed for propionate. Propionate did not impact HMGCR enzyme activity nor protein expression in HepG2 cells.

### *Conclusion*

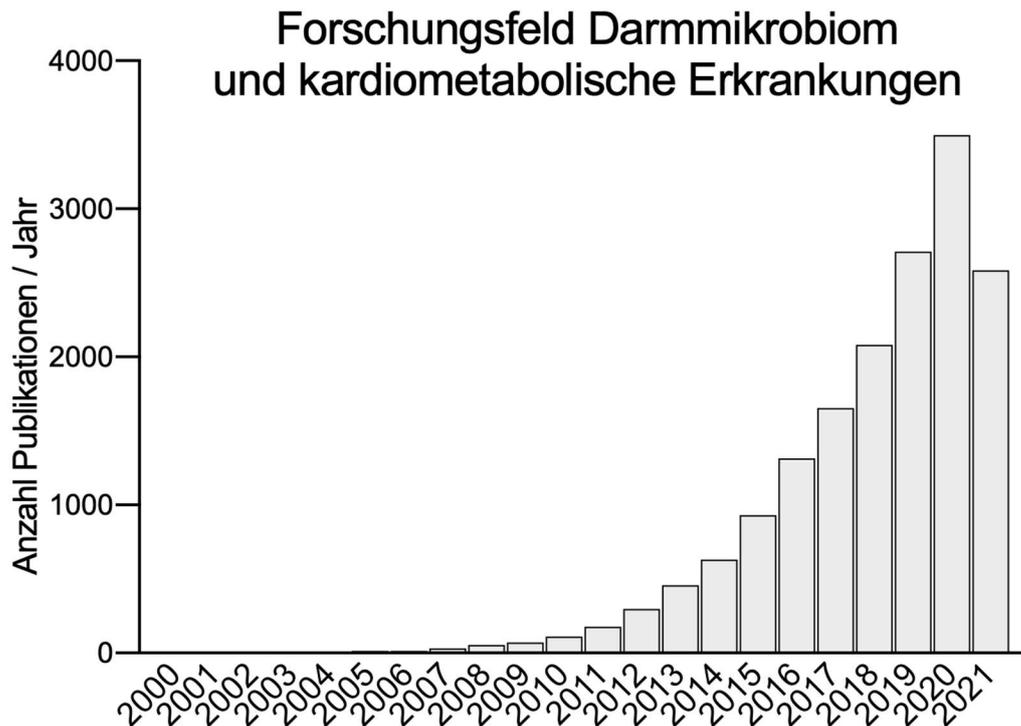
Our findings support a regulatory property of the gut microbiome for cholesterol homeostasis. We found that orally administered gut microbiota-derived metabolite propionate reduced LDL-level in HFD fed hypercholesterolemic mice. As one potential underlying mechanism we found a changed gut microbiome composition. Furthermore, we demonstrated that atorvastatin-treatment had a microbiota-dependent regulatory effect on blood lipids and changed gut microbiome composition. Our results provide novel insights into potential microbiota-related mechanisms in cholesterol metabolism and indicate the gut microbiome as a treatment target in dyslipidemia and cardiovascular prevention.

# 1. Einleitung

## 1.1 Kardiometabolische Erkrankungen

Fettstoffwechselstörungen, abdominale Adipositas, Diabetes Mellitus Typ 2 (T2D) und arterielle Hypertonie sind Volkskrankheiten, die mit hohem kardiovaskulärem Risiko assoziiert sind und zum Begriff „kardiometabolische Erkrankungen“ zusammengefasst werden. Es sind die Dysregulationen des Stoffwechsels, die maßgeblich das Risiko für Atherosklerose erhöhen, mit Folgen wie Hirn- oder Herzinfarkt. Kardiometabolische Erkrankungen haben weitreichende individuelle und populationsübergreifende Bedeutung. Trotz effektiver Therapieoptionen und Implementierung neuester Verfahren in die Versorgung akuter kardiovaskulärer Ereignisse führen Herz-Kreislauf-Erkrankungen global mit 31% und in Deutschland sogar mit etwa 40% die Todesursachenstatistik an [1, 2]. Kardiometabolische Erkrankungen haben großen Bedarf an medizinischer Fürsorge. 2008 fiel dem Sektor mit 14,5% und somit 36,8 Milliarden Euro der größte Anteil an Krankheitskosten in Deutschland zu [2]. Diese Gesundheitsversorgung umfasst primäre und sekundäre Prävention sowie die Versorgung der akuten Krankheitsbilder wie Herzinfarkt und Schlaganfall. Auf die Bedeutung des Stellenwerts der präventiven Maßnahmen wird sowohl in der gesunden Bevölkerung als auch in bereits Erkrankten von WHO, Robert-Koch-Institut und den europäischen Versorgungsleitlinien hingewiesen, da hier die Chance besteht, das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen um etwa 80% zu reduzieren [3]. Die Behandlung pathologischer Blut-Cholesterinwerte im Rahmen von Dyslipidämien steht dabei im Vordergrund.

Ungesunde Ernährung spielt eine kritische Rolle für die Pathophysiologie kardiometabolischer Erkrankungen [4]. Das Wissen über schadhafte zuckerhaltige Getränke oder gesättigte Fettsäuren ist allgemein bekannt. Werden einfache Zucker durch komplexe Kohlenhydraten ersetzt, in einer Ernährung mit Getreide und Gemüse, sinkt das Risiko für kardiometabolische Erkrankungen. Die Rolle des Darmmikrobioms und dessen hier beteiligten Prozessen ist Gegenstand eines aufsteigenden Forschungsfeldes [5]. Potenzielle therapeutische Faktoren sind noch nicht ausreichend identifiziert.



**Abbildung 1** Anzahl der Publikationen zum Thema Darmmikrobiom und kardiometabolische Erkrankungen. US National Library of Medicine National Institutes of Health, Suche am 28.9.2021 in pubmed - (gut microbiome OR gut microbiota OR gut microbes) AND (cardiovasc\* OR gut atherosclerosis OR diabetes OR obesity OR vascular OR cholesterol OR lipid)

## 1.2 Dyslipidämien und Atherosklerose

### 1.2.1 Biologische Rolle von Lipiden und Lipoproteinen

Lipoproteine sind im Blutplasma zirkulierende, nicht-kovalente Aggregate aus Cholesterin, Triglyceriden, Phospholipiden und Proteinen. Durch sie können hydrophile Lipide im Plasma zum Zielgewebe transportiert werden, wo sie für Energiebereitstellung, -speicherung, Produktion von Steroidhormonen und Gallensäureformation zur Verfügung stehen. Es gibt sechs Hauptformen: Chylomikronen, Very Low Density Lipoprotein (VLDL), Intermediate Density Lipoprotein (IDL), Low Density Lipoprotein (LDL), Lipoprotein a (Lp(a)) sowie High Density Lipoprotein (HDL).

### 1.2.2 Dyslipidämie

Dyslipidämie ist eine „Störung im Fettstoffwechsel mit Verschiebung der Zusammensetzung der Lipide im Blutplasma“ [6]. Inbegriffen ist eine Reihe von Abweichungen der Lipidspiegel wie erhöhtes Gesamtcholesterin (>200 mg/dl), erhöhtes LDL (>115 mg/dl) oder erhöhte Triglyceride (>150 mg/dl). Dyslipidämie, insbesondere erhöhtes LDL, stellt eine chronisch-toxische Belastung für das Endothel der Arterien dar

und ist ein eigenständiger kausaler Risikofaktor für die Entwicklung von Atherosklerose [7]. Im chronisch-inflammatorischen Erkrankungsprozess akkumulieren Lipide und Entzündungszellen in den Gefäßwänden mittlerer und großer Arterien [8]. Prospektive Langzeitstudien zeigen konsistent, dass Menschen mit niedrigeren Lipidprofilen eine geringere Inzidenz für kardiovaskulären Erkrankungen haben [9]. Die aktuellen europäischen und deutschen Leitlinien geben als oberstes Therapieziel eine reduzierte LDL-Cholesterin Konzentration an, wobei sich das Ziel an den zusätzlichen Risikofaktoren orientiert: bis zu 70mg/dl oder weniger.

Es besteht wachsendes Interesse die Pathomechanismen von Dyslipidämien zu verstehen und therapeutische Strategien zu entwickeln. Durch Prävention und adäquate Lipidreduktion kann das kardiovaskuläre Mortalitäts- und Morbiditätsrisiko reduziert werden. Wichtige Ansätze in der präventiven Therapie sind bereits effektive pharmakologische Mittel wie 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMGCR)-, Proproteinkonvertase Subtilisin Kexin Typ 9 (PCSK9)- und Niemann-Pick-C-1-Like-1 (NPC1L1)-Inhibitoren. Es besteht jedoch weiter Bedarf, effektive nicht-medikamentöse Ansätze in der Primärprävention zu entwickeln. Die Genetik ist ein weiterer wichtiger Aspekt, der z.B. beim Krankheitsbild der Familiären Hypercholesterinämie eine wichtige Rolle spielt [10]. Die Manipulation von Genen („gene editing“) spielt derzeit in der klinischen Anwendung für kardiovaskuläre Prävention keine relevante Rolle.

Auswirkung auf die kardiometabolische Gesundheit von jedem Menschen haben intestinale Mikroben. In den letzten Jahren geriet das „Darmmikrobiom“ und dessen Bedeutung für kardiovaskuläre Erkrankungen in den Fokus der Forschung.

### **1.3 Das Darmmikrobiom**

Millionen von Mikroorganismen, die ein Vielfaches des genetischen Potenzials des Wirtes besitzen, bilden im Darm vom Menschen das Darmmikrobiom [11]. Es ist ein dynamisches Ökosystems aus Bakterien, Viren, Pilzen, Archaeen und Protozoen. Die Mehrzahl dieser Mikroorganismen sind nicht pathogen und bilden mit Enterozyten und Wirt eine Symbiose. Durch Aufspaltung unverdaulicher Nahrung greifen sie in Energiegewinn und Metabolismus ein. Nicht nur Nahrungsbestandteile sondern auch

zugeführte Medikamente werden verstoffwechselt und modifiziert. Stoffwechselprodukte wirken als Signaltransmitter. Das Immunsystem des Wirtes ist an die Erreger adaptiert, sodass in der Regel keine Immunantwort initiiert wird. Ein „dysbiotisches“ Darmmikrobiom zeichnet sich durch eine reduzierte Vielfalt oder pathogene Erreger aus und ist mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert. Hierzu zählen Immunerkrankungen wie Multiple Sklerose, chronisch entzündliche Darmerkrankungen und kolorektaler Krebs. Darüber hinaus werden die kardiometabolischen Erkrankungen Adipositas, T2D und kardiovaskuläre Erkrankungen mit einem funktionell und kompositionell veränderten Mikrobiom in Verbindung gebracht [12] [13]. In Anbetracht der weltweit steigenden Inzidenz dieser Erkrankungen, werden hierfür nicht nur Lebensstil und Ernährungsgewohnheiten, sondern auch die mit einhergehenden Veränderungen im Mikrobiom verantwortlich gemacht.

Diese Erkenntnisse basieren sowohl auf humanen als auch Studien mit keimfreien Tieren. Ein hoher Anteil des bisherigen Wissens ist auf die Datenbanken „Human Microbiome Project“ und „European metagenomics of the Human Intestinal Tract“ (MetaHIT) zurückzuführen [14] [11]. Um den Einfluss des Mikrobioms auf den Menschen und den Gesundheitszustand nachvollziehen zu können, wurden hier in 124 Europäern 3,3 Millionen mikrobielle Gene charakterisiert, die in jedem Individuum präsent waren.

### **1.3.1 Beeinflussung der Zusammensetzung des Darmmikrobioms**

Der Darm beherbergt ca. 70% der Mikroben des Körpers, die auf etwa 35.000 verschiedenen Bakterienarten geschätzt werden. Auf Stammebene setzt sich ein gesundes Darmmikrobiom hauptsächlich, zu 75%, aus *Firmicutes* und *Bacteroidetes* zusammen. Ihr Verhältnis zueinander, die *Firmicutes* : *Bacteroidetes* Ratio ist ein Parameter für eine Eu- oder Dysbiose und impliziert eine Prädisposition zu bestimmten Krankheitsbildern wie Adipositas [13]. *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* und *Cyanobacteria* vervollständigen das Mikrobiomprofil. Erreger mit pathogenem Potenzial wie *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* und *Bacteroides fragilis* kommen in nicht schadhafter Menge vor. Grundsätzlich bleibt die Zusammensetzung des Mikrobioms in einem Individuum auf der Stammebene konstant. Diese individuelle Komposition, die alpha-Diversität eines Individuums, wird von extrinsischen Faktoren wie Alter, Ethnizität, Ernährung, körperlicher Aktivität,

Vorerkrankungen und Medikamenteneinnahme mitbestimmt [15] [16] [17]. Dabei ist die Zusammensetzung des Mikrobioms in einem Individuum erstaunlich stabil.

Im ersten Lebensmonat prägen fakultativ aerobe *Enterobacteriaceae* (Proteobacteria) mit ungefähr 90% relativem Anteil den Stuhl. Bedingt durch den Geburtsmodus ist der erste mikrobielle Kontakt die Flora des Geburtskanals oder der Haut. Bei Kaiserschnitt Kindern wird am Lebensbeginn eine größere Diversität, mit einem niedrigen Anteil der *Bacteroides* (*Bacteoidetes*) beobachtet. Unabhängig vom Geburtsmodus ersetzen *Firmicutes* im Laufe des ersten Lebensjahrs die initial dominanten *Bacteroides*, *Bifidobacterium* und *Enterobacteriaceae* [18]. Nach 3 Jahren gleicht das Mikrobiom von der phylogenetischen Zusammensetzung dann dem eines Erwachsenen [19]. Mit steigendem Alter nimmt die Komplexität des Darmmikrobioms eines Erwachsenen, die alpha-Diversität, zu. Die interpersonelle Variation hingegen sinkt mit steigendem Alter und ist bei Zwillingen generell kleiner. Über die Trimester einer Schwangerschaft wird eine Abnahme der alpha-Diversität mit einhergehendem Anstieg Energie-liefernder Mikroben beobachtet [20].

Quantitative Unterschiede in der phylogenetischen Komposition spiegeln sich in geographisch auseinanderliegenden Orten wider, was in allen Altersgruppen nachvollzogen werden kann. Hinsichtlich Diversität sind beispielweise die Mikrobiome von US-Amerikanern verglichen mit denen von ursprünglich lebenden Malawis oder Inuit deutlich reduzierter [19]. Ein weiterer Aspekt der Mikrobiomformung ist mit Ethnizität assoziiert. Mitglieder einer Ethnie teilen eine größere Anzahl spezifischer Taxa als Mitglieder anderer Ethnien, auch wenn sie in der gleichen Umgebung leben. Der Einfluss war in der von Deschasaux und Kollegen beschriebenen Amsterdamer Kohorte größer als der von Ernährung oder Komorbiditäten. Damit ist jedoch nicht klar, welche Aspekte – genetische oder kulturelle- diesen Assoziationen unterliegen [21].

Ein weiterer Einflussfaktor ist Diät. Ernährung ist einfach zu modifizieren und ist als therapeutisches Mittel nutzbar. Das Darmmikrobiom kann innerhalb von 24 Stunden auf Änderungen in der Ernährung, wie dem Wechsel von fleischhaltiger auf pflanzenhaltiger oder ballaststoffarmer auf ballaststoffreicher Nahrung reagieren. Der Verzehr von Fleisch stimuliert die Gallensäuresekretion. Bakterien mit Gallensäureresistenz wie *Bilophila wadsworthia*, *Alistipes putredinis* oder *Bacteroides* sp. sind als Reaktion hierauf vermehrt

nachweisbar [22]. Ballaststoffreiche Nahrung führt zur Anreicherung der Gattung *Prevotella*, die die Fähigkeit besitzen, Cellulose und Xylan zu hydrolysieren. Unter westlicher Ernährung mit hohem Tierproteinanteil dominiert der Stamm der *Bacteroides*. Besonders deutlich wurde diese Kategorisierung in einer Studie, in welcher europäische Kinder mit typisch westlicher Diät mit hohem Tierproteinanteil und afrikanische Kinder mit hohem Nahrungsanteil an Kohlenhydraten miteinander verglichen wurden. Im Mikrobiom der Afrikaner gab es eine deutliche Überlegenheit der *Bacteroidetes* und eine Reduktion der *Firmicutes*-Bakterien [15]. Diese fehlte ganz bei den Europäern. Neben kurzfristigen Änderungen auf Nahrungsstimuli korreliert das Darmmikrobiom jedoch in Form von Clustern auf langfristige Ernährungsgewohnheiten [17]. Selbst eine zehntägige Diätintervention kann die grobe Struktur des Mikrobioms in Probanden nicht beeinflussen.

Le Chatelier et al. untersuchten das Darmmikrobiom von 292 adipösen und normalgewichtigen Probanden. Korrespondierend zum Phänotyp machte die Mikrobiomanalyse eine Unterscheidung in große und niedrige bakterielle Vielfalt, anhand der Genanzahl gemessen, möglich [22]. Eine große bakterielle Vielfalt war mit einem robusteren Mikrobiom, niedrigerer Prävalenz für metabolische Erkrankungen und weniger Übergewicht verbunden. Bakterielle Vertreter waren *Anaerotruncus colihominis*, *Butyrivibrio crossotus*, *Akkermansia sp.* und *Fecalibacterium sp.* mit einem hohen *Akkermansia (Verrucomicrobia) : Ruminococcus torque/gnavus* Verhältnis. Funktionell waren es mehr Produzenten kurzkettiger Fettsäuren und Wasserstoff. Dagegen waren in der Gruppe mit niedriger Genzahl proinflammatorische Bakterien, wie die mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung assoziierten *Bacteroides* und *Ruminococcus gnavus*, zu finden [23]. Funktionelle Merkmale des Mikrobioms waren Aminosäuredegradation und Sulfatreduktion mit Entstehung von Schwefelwasserstoff. Die Proband:innen neigten zu Adipositas, Insulinresistenz und Dyslipidämie. Die Korrelation zwischen einem bestimmten Phänotyp wie Adipositas und der Mikrobiomzusammensetzung, in diesem Fall mit einem erhöhtem Verhältnis von *Firmicutes : Bacteroidetes* ist kongruent in Mensch und Maus [13, 24].

Medikamente können die Mikrobiomkomposition beeinflussen. Antibiotika durchbrechen die Struktur kurzfristig oder können langfristige Auswirkungen auf das Mikrobiom haben [25]. Daneben treten immer mehr kardiometabolisch wirksame Medikamente in den

Fokus der Mikrobiomforschung. Metformin ist ein bei T2D häufig eingesetztes kardiometabolisch wirksames Medikament, welches u.a. die Glukosetoleranz verbessert. Die genaue Wirkungsweise ist nicht vollständig geklärt. Da es unter der Therapie signifikante Änderungen in der Zusammensetzung des Mikrobioms gibt, wird ein Teil der Wirkung auf das modifizierte Mikrobiom zurückgeführt. Nach 4 Monaten Metformintherapie in T2D-Patienten konnten signifikante Veränderungen in *Firmicutes* und *Proteobacteria* nachgewiesen werden [26] [27]. Auf funktioneller Ebene war ein veränderter Gallensäuremetabolismus mit erhöhten Plasmaspiegeln von Gallensäuren und größerer Häufigkeit von Gallensäurehydrolasen kodierender Gene auffallend.

### **1.3.2 Darmmikrobiom und kardiometabolische Erkrankungen**

Eine verminderte Vielfalt an Bakterien durch Dysbiose oder chronische Inflammation mit pathogenen Erregern aggraviert kardiometabolische Erkrankungen. Ihre Auswirkung wird an Versuchen mit gnotobiotischen Tieren deutlich. Gnotobioten sind keimfreie Tiere ohne residuelles Mikrobiom, die in einer sterilen Umgebung aufwachsen. Füttert man gnotobiotischen Mäusen eine Diät mit hohem Fettgehalt, was den westlichen Ernährungsstil imitiert, sind diese im Gegensatz zu normalen Mäusen vor Diät induzierter Gewichtszunahme geschützt, unabhängig von der Menge der Nahrungsaufnahme und des Energieverbrauches [28]. Umgekehrt zeigten Turnbaugh et al. eine Übertragung des übergewichtigen Phenotyps auf schlanke gnotobiotische Tiere, wenn sie diesen das Mikrobiom von in Folge westlicher Diät adipösen Mäusen transferiert hatten. Die Übertragung des Darmmikrobioms von schlanken Mäusen führte zu einer geringeren Fetteinlagerung [29].

Verantwortlich für den Einfluss auf die Wirtsphysiologie sind Metaboliten unterschiedlicher chemischer Klassen, welche das Darmmikrobiom kontinuierlich produziert und dessen Bezeichnung als „endokrines Organ“ rechtfertigt [30]. Über primäre und sekundäre Stoffwechselwege werden aus Nahrungsbestandteilen wie Aminosäuren und komplexen Kohlenhydraten Endprodukte mit hormon-ähnlichem Charakter geschaffen. Beispiele sind Trimethylamine-N-oxide (TMAO), sekundäre Gallensäuren, Imidazolpropionat und die kurzkettigen Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat. Die Metaboliten entfalten Ihre Wirkung über membranständige G-Protein-Rezeptoren (Bsp. TGR5, GPR41, GPR43) oder Transkriptionsfaktoren (Bsp. FXR).

Einige Metaboliten wirken dabei proatherogen, wie TMAO [31] [32]. Tabelle 1 gibt einen Überblick über ausgewählte Metaboliten.

Nahrungsbestandteil	Bioaktiver Metabolit	Molekularer Signalweg	Kardiometabolischer Phänotyp	Referenz
<b>Kohlenhydrate</b>	Kurzkettige Fettsäuren: Acetat, Propionat, Butyrat	- G-Protein gekoppelter Rezeptor 41 und 43 - Olfaktorischer Rezeptor 78 - Inhibition von Histondeacetylasen	- Blutdruck-Homöostase - Energie für Kolonozyten - Gluconeogenese - immunmodulatorisch	- De Vadder et al., Cell (2014) - Maslowski et al., Nature (2009) - Bartolomaeus et al., Circulation (2019)
<b>Histidin</b>	Imidazolpropionat	- p38γ/p62/mTORC1	- beeinträchtigte Glucose-Toleranz - verschlechterter Insulin Signalweg - T2DM	- Koh et al., Cell (2018)
<b>L-Carnitin, Cholin</b>	TMAO	- PERK (Protein Kinase R-like endoplasmic reticulum kinase) - TAAR5 (trace amine-associated receptor 5)	- Proatherogen - Endothelzellaktivierung - Inflammation - Thrombose - Kardiorenale Fibrose	- Haghikia et al., Atheroscler Thromb Vasc Biol. (2018) - Tang et al., N. Engl. J. Med. (2013)
<b>Primäre Gallensäuren (Cholsäure, Chenodesoxy-cholsäure)</b>	Sekundäre Gallensäuren: Desoxycholsäure, Lithocholsäure	- G-Protein-gekoppelter Gallensäure Rezeptor 1 - Farnesoid X Rezeptor - Leber X Rezeptor	- Insulinsensitivität - Antiinflammatorisch - Lipidmetabolismus	- Thomas et al., Nature Rev. Drug Discov. (2008) - Kawamata et al., J. Biol. Chem. (2003)
<b>Tryptophan</b>	Indoxylsulfat Indol Propionsäure p-Cresol	- Aromatischer Hydrocarbon Rezeptor	- Insulin Resistenz - Fibrose - Assoziation mit kardiovaskulärem Outcome in Urämie	- Meijers et al., Clin. J. Am. Soc. Nephrol. (2010) - Koppe et al., J. Am. Soc. Nephrol. (2013)
<b>Phenylalanin</b>	Phenylacetylglutamin	- Adrenerge Rezeptoren	- Atherosklerose - Thrombose	- Nemet et al., Cell (2020)

**Tabelle 1** Ausgewählte Metabolite des Darmmikrobioms, deren molekulare Signalwege und Bedeutung für kardiometabolische Erkrankungen und Prozesse

### 1.3.3 Kurzkettige Fettsäuren

#### 1.3.3.1 Definition und Entstehung kurzkettiger Fettsäuren

Kurzkettige Fettsäuren (short chain fatty acids, SCFA) sind Carbonsäuren mit aliphatischem Schwanz und weniger als 6 Kohlenstoffatomen [33]. Physiologisch kommen hauptsächlich Acetat (C2), Propionat (C3) und Butyrat (C4) im menschlichen Organismus vor. SCFA entstehen im Kolon bei der Fermentierung von "Microbiota-Accessible Carbohydrates" (MACs), einer Untergruppe ernährungsrelevanter Ballaststoffe [34].

Ballaststoffe sind natürlich vorkommende oder synthetisierte komplexe Kohlenhydrate mit mindestens 3 Monosacchariden. In Pflanzen sind dies Bestandteile der Zellwand (z. B. Zellulose, Lignin) oder des intrazellulären Kompartments (z. B. Speicherpolysaccharide). Für Menschen sind Ballaststoffe im Gastrointestinaltrakt aufgrund fehlender Enzyme nicht verdaulich oder absorbierbar. Ballaststoffe werden nach Wasserlöslichkeit klassifiziert. Wasserunlösliche Ballaststoffe wie Zellulose oder Lignin quellen im Darm und mindern das Risiko für kardiometabolische Erkrankungen. Wasserlösliche Ballaststoffe wie Inulin, Pektin oder Flohsamen können Glukose, LDL- und Gesamtcholesterinspiegel senken. Für die Gesundheit sind Ballaststoffe essentiell. Die deutsche Gesellschaft für Ernährung empfiehlt eine tägliche Aufnahme von 30g [35].

MACs sind durch glykosidische Bindungen zusammengesetzte Monosaccharide und partiell mit Acetyl- oder Sulfatgruppen substituiert [34]. Im Gegensatz zum Wirt besitzt das Darmmikrobiom geeignete Enzyme, um die komplexen Strukturen in verwertbare Oligo- oder Monosaccharide aufzuspalten. Je komplexer ein Glykan, desto mehr Enzyme braucht es für dessen Aufspaltung. In einem Modellmikrobiom wiesen El Kaoutari et al. in 160 Spezies rund 9400 verschiedene Glykosidasen und Polysaccharid-Lyasen nach [36]. Vergleichsweise besitzt das menschliche Genom nur 17 Glykosidasen und keine Polysaccharid-Lyase. Auf diese Weise formen MACs das mikrobielle Ökosystem direkt und indirekt. Direkt wird das Wachstum der MAC konsumierenden Bakterienstämme gefördert. Jene kreieren durch ihren Metabolismus und Interaktionspotential sekundär ein Milieu, welches wiederum Bakterienstämme fördert. Die bisher fehlende Erklärung zum Verständnis des positiven Einflusses von Ballaststoffen könnte somit auf die Fermentierung durch das Darmmikrobiom zurückzuführen sein.

Struktur der Kurzkettigen Fettsäuren		
$  \begin{array}{c}  \text{H} \\    \\  \text{H}-\text{C}-\text{C} \\    \quad // \\  \text{H} \quad \text{O} \\  \quad \quad   \\  \quad \quad \text{O}-\text{H}  \end{array}  $	$  \begin{array}{c}  \text{H} \quad \text{H} \\    \quad   \\  \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{C} \\    \quad   \quad // \\  \text{H} \quad \text{H} \quad \text{O} \\  \quad \quad \quad   \\  \quad \quad \quad \text{O}-\text{H}  \end{array}  $	$  \begin{array}{c}  \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \\    \quad   \quad   \\  \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C} \\    \quad   \quad   \quad // \\  \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{O} \\  \quad \quad \quad \quad   \\  \quad \quad \quad \quad \text{O}-\text{H}  \end{array}  $
Acetat	Propionat	Butyrat

**Tabelle 2** Chemische Struktur der kurzkettigen Fettsäuren

Phylum	Genom	Glykosidasen Gene	Polysaccharid - Lyasen Gene	Mittlere G und PL Gene pro Genom
Actinobacteria	12	351	1	29.3
Bacteroidetes	29	3,781	195	137.1
Firmicutes	104	4,050	69	39.6
Proteobacteria	22	484	13	22.6
Verrucomicrobia	1	58	0	58.0
Synergistetes	1	11	0	11.0
Spirochaetes	1	23	0	23.0
Elusimicrobia	1	6	0	6.0
Fusobacteria	2	48	0	24.0
Cyanobacteria		14	0	14.0
Tenericutes	1	1	0	1.0
Thermotogae	1	32	0	32.0
Lentisphaerae	1	261	14	275.0
Gesamtes Mini-Mikrobiom	<b>177</b>	<b>9,120</b>	<b>292</b>	<b>53.2</b>

**Tabelle 3** Glykosidasen im Darmmikrobiom; adaptiert von "The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota" El Kaoutari et al.

### 1.3.3.2 Signalwege und Einfluss auf kardiometabolische Erkrankungen

Kurzkettige Fettsäuren entfalten über verschiedene Signalwege einen Effekt auf den Wirt: Lokal sind sie Glukoneogenese-Substrat für Kolonozyten und somit wichtiger Energielieferant [37]. Ein fehlendes Mikrobiom mit folgend verminderter Konzentration an SCFA führt zu einer geringeren Energiezufuhr im Darm, was in keimfreien Mäusen u.a. eine Ausdehnung der Dünndarmpassagezeit nach sich zieht [38].

SCFA stimulieren die Sekretion des Hormons Glucagon-Like-Peptid 1 (GLP-1) [39]. GLP-1 wird in den enterendokrinen Zellen des distalen Dünndarms und im Kolon gebildet. Es reguliert verschiedene metabolische Elemente: es fördert die B-Zell-Proliferation, kontrolliert Glykämien durch Modulation an Glukose Sensoren, verlangsamt die Magenleerung, inhibiert Nahrungsaufnahme und Glukagonsekretion und stimuliert die Insulinsekretion. Keimfreie Tiere mit reduzierten Plasmaspiegeln an SCFA haben erhöhte GLP-1 Basalspiegel und exprimieren mehr Glukagon im Kolon, was durch Hinzufügen von Bakterien (mit folgender SCFA-Produktion) wieder reduziert wird [38].

Weitere Wirkungen der SCFA, insbesondere Butyrat und Acetat werden über die Inhibition von Histon Deacetylase vermittelt, was in einer Regulation der Genexpression resultiert [40].

SCFA sind Liganden der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren GPR41 und GPR43 [41]. Diese Rezeptoren werden z.B. in Endothelzellen von Blutgefäßen im Fettgewebe (GPR41) und in Immunzellen (GPR43) exprimiert. Ihre Aktivierung beeinflusst immunomodulatorische und enteroendokrine Prozesse. Bartolomaeus et al. wiesen unter oraler Propionatbehandlung in konventionellen Mäusen eine geringere systemische Inflammation nach, was sie anhand geringeren Aufkommens von Effektor T-Zellen und Th17-Zellen in der Milz sowie verminderter Immunzell-Infiltration in das Myokard zeigen konnten. Sie wiesen einen modulierenden Einfluss von Propionat auf kardiale Hypertrophie, Fibrose, vaskuläre Dysfunktion und Arterielle Hypertonie nach [42]. In einer Experimentreihe mit Mäusen ohne regulatorische T-Zellen waren die kardioprotektiven Effekte oraler Propionatzufuhr abgeschwächt. Daraus schlossen sie, dass die kardioprotektiven Effekte von Propionat abhängig von T- Zellen seien.

Anlehnend an diese Beobachtungen gibt es weitere Hinweise eines positiven immunomodulatorischen Einflusses von SCFA. In einer klinischen Studie von Duscha et al. wurde der Effekt der oralen Zufuhr von Propionat bei Patient:innen mit Multiple Sklerose, einer neurologischen Autoimmunerkrankung mit einhergehender Dysbalance der regulatorischen T-Zellen (Treg)/TH17 Ratio untersucht [43]. Hier konnte unter Propionatzufuhr eine Erhöhung der Treg-Anzahl und -Funktion nachgewiesen werden.

SCFA können die Glukose-Regulation und Insulinsensitivität verbessern und inflammatorische Prozesse, sowohl systemisch als auch auf das Fettgewebe bezogen, reduzieren. Die Rolle wurde bisher vor allem den Krankheitsbildern Adipositas und metabolischem Syndrom zugeordnet. Weiterhin beschrieben Chambers et al. einen gewichtsreduzierenden Effekt von Propionat, wenn man es direkt in das Kolon von adipösen Menschen appliziert [44].

#### **1.3.4 Analysemethoden des Darmmikrobioms - State of the art**

Die Vielfalt des Darmmikrobioms, die Anzahl der Spezies und die Variabilität zwischen Individuen ist immens. Dank großer Datenbanken und Projekten wie dem „Human

Microbiome Project“ und „MetaHIT“ konnte bereits ein Anteil charakterisiert werden [45] [46]. Seit der Entwicklung der „High-throughput“ Sequenzierung steigt die Anzahl der Mikrobiomstudien. Zuvor war der bakterielle Nachweis über Kulturen notwendig. Jedoch können >90% der Mikroben nicht in Kultur nachgewiesen werden [47]. Vorteilhaft in der Kultivierung ist die Gewinnung von Informationen über Metabolismus und Wachstumsbedingungen der Mikroben.

Eine weit verbreitete Analysemethode ist die 16S rRNA-Sequenzierung. Zusammengefasst wird in dieser Methode die 16S rRNA, eine etwa 1500 Nukleotide lange, ribosomale Kette, mittels PCR transkribiert und amplifiziert. Die dabei eingesetzten Primer erkennen für alle Bakterien universal vorkommende, konservierte sowie funktional bedeutende Sequenzen, die eine hochvariable, individuelle und funktionell nachrangige Sequenz einrahmen [48]. Anhand der vervielfältigten variablen Region, werden die bakteriellen DNA-Sequenzen in taxonomische Einheiten (OTU, Operational taxonomic units) gruppiert und auf Basis vorhandener Datenbanken sind diese OTUs Bakteriengattungen oder funktionellen Einheiten zuweisbar. Limitierend für diese Methode ist, dass mit den resultierenden OTUs keine genauen Bakterienarten identifizierbar sind.

Eine zweite wichtige Methode ist die Schrotschuss-Sequenzierung (eng. = Shotgun Sequencing). Sie wurde etwa 1980 entwickelt und ermöglicht die Sequenzierung des gesamten Mikrobioms. Diese Methode generiert viele zufällige Millionen DNA-Fragmente. Mit Hilfe großer Datenbanken, wo die Gensequenzen des Mikrobioms hinterlegt sind, können diese Fragmente OTUs, Bakterienarten oder Genen zugeordnet und die Datenmenge bioinformatisch aufgearbeitet werden, was aufwendig und teuer ist [49]. Der Vorteil ist, dass die Bakterien genau bis auf die Artenebene (Spezies) definiert werden können.

In der Analyse des Darmmikrobioms liegen viele mögliche präanalytische Fehlerquellen, wie Patientenselektion oder die Umstände vor Probensammlung wie Fastenzeit, Medikamenteneinnahme oder Tageszeit. Das Darmmikrobiom unterscheidet sich in der Zusammensetzung zudem abhängig von der Lokalisation im Gastrointestinaltrakt. Die größte Anzahl und Vielfalt herrscht im Dickdarm vor [50]. Auch hier gibt es, abhängig von der Lokalisation im Darmquerschnitt, von Lumen bis in die Krypten, Unterschiede in den

Konzentrationen der Bakterien. Die Art der Materialsammlung, ob intraoperativ aus dem Zäkum oder durch Sammlung von Stuhlproben im Käfig, kann daher unterschiedliche Untersuchungsergebnisse liefern. Die anschließende Lagerung bietet ebenso Raum für Bias, wobei eine sofortige Tiefkühlung auf  $-80^{\circ}\text{C}$  empfohlen wird, um DNA Degradation zu vermeiden. All diese Faktoren müssen sorgfältig in die Dateninterpretation einfließen.

Fortschritte in "Nächster-Generation" genomischer Technologien werden künftig detaillierte Informationen über die Zusammensetzung des Darmmikrobioms erlauben.

#### **1.4 Fragestellungen und Zielsetzung**

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, einen möglichen Einfluss des Darmmikrobioms und von Propionat, als Metabolit des Darmmikrobioms, auf den Cholesterinstoffwechsel zu untersuchen und potentielle unterliegende Wirkmechanismen aufzuzeigen. Folgende Fragestellungen werden dabei untersucht:

1. Welche Rolle spielt das Darmmikrobiom für die Regulation des Cholesterinstoffwechsels?

- a. Wie unterscheidet sich das Lipidom konventioneller Mäuse von Mäusen, deren Darmmikrobiom durch Antibiotika eradiziert wurde?
- b. Wie unterscheidet sich das Lipidom hyperlipidämischer Mäuse von Mäusen, deren Darmmikrobiom durch Antibiotika eradiziert wurde?
- c. Wie setzt sich das Darmmikrobiom in konventionellen Mäusen zusammen?  
Welchen Einfluss hat Diät auf die Komposition des Darmmikrobioms?

2. Beeinflusst das Darmmikrobiom die cholesterinsenkende Wirkung von Statinen?

- a. Wie beeinflusst Atorvastatin das Darmmikrobiom?
- b. Wie unterscheidet sich das Lipidom Atorvastatin behandelter konventioneller Mäuse gegenüber Atorvastatin behandelten Mäusen ohne Darmmikrobiom?
- c. Was sind die potentiellen Mechanismen?

3. Beeinflusst die kurzkettige Fettsäure Propionat den Cholesterinstoffwechsel?

- a. Wie beeinflusst die orale Zufuhr von Propionat das Lipidprofil von Mäusen mit und ohne Darmmikrobiom?

- b. Wie beeinflusst Propionat das Darmmikrobiom?
- c. Welche potentiellen Molekularmechanismen liegen der Propionat-assoziierten Regulation des Cholesterinmetabolismus zugrunde ?
- d. Welche Rolle hat das intestinale Immunsystem mögliche Propionat-abhängige Mechanismen des Lipidstoffwechsels?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

20x PBS	Santa Cruz, Dallas, USA (sc362299)
Acrylamide/Bis Solution, 29:1	Serva, Heidelberg, Deutschland (10680.03)
Ammonium Persulfate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA (BP179-100)
Atorvastatin Calcium Salz	Santa Cruz, Dallas, USA (sc-217671)
Bromophenol Blue	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA (B5525)
Calcium propionate	Sigma Aldrich, St. Louis, USA (21230)
Cell Lysis Buffer (10x)	Cell Signaling, Danvers, USA (9803)
cComplete™, Mini,	Roche, Basel, Schweiz
Control Diet	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland (E15000-04)
DMEM	GE Healthcare, Chicago, USA (E15-806)
DMSO	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA (D12345)
Endothelial Cell Basal Medium 2	Promo Cell, Heidelberg, Deutschland (C-222 11)
Fetales Bovines Serum	Sigma Aldrich, St. Louis, USA (12103C)
Glycine	Merck, Darmstadt, Deutschland (104201)
High Fat Diet	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland (E15741)
IL10, human, recombinant	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA (PHC0105)
Matrigel	Corning, Corning, USA (356230)

N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA (T9281)
Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium	Life Technologies, Carlsbad, USA (11058021)
PageRuler™ Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA (26619)
Palmitinsäure	Sigma Aldrich, St. Louis, USA (P0500)
PBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA (D8537)
Penicillin/Streptomycin 100X	GE Healthcare, Chicago, USA (SV30010)
PhosSTOP™	Roche, Basel, Schweiz
Proteinkinase K	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
RPMI Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA (11875093)
SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA (34075)
Thioglykolat-Nährmedium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypsin/EDTA-Lösung	Sigma Aldrich, St. Louis, USA (59428C)
Tween® 20 (Polysorbat)	VWR Chemical, Darmstadt, Deutschland (663648B)
VEGF, human, recombinant	Pepro Tech, Rocky Hill, USA (100-20)

### 2.1.2 Medikamente

Ampicillin/Sulbactam	Pfizer, Berlin, Deutschland
Ciprofloxacin	Fresenius Kabi, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland
Impinem/Cilastatin	Fresenius Kabi, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland
Metronidazol	Braun, Kronberg im Taunus, Deutschland
Vancomycin	Hikma Pharmaceuticals, London, Großbritannien

### 2.1.3 Antikörper

Anti-ACAT2 (ab187712)	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Anti-Actin (ACTN05 (C4))	Thermo Fisher Scientific

Anti-FGF1P1 (ab215353)	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Anti-GAPDH (2118)	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-HMGCR(ab174830)	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Anti-HMGCS1(ab155787)	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Anti-IL10 (ab9969)	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Anti-Kaninchen, HRP-verlinkt (7074)	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-Maus, HRP-verlinkt (7076)	Cell Signaling, Danvers, USA
Anti-Niemann-Pick type C1 Like-1 (NB400-127)	Novus Biologicals, Littleton, USA

### 2.1.4 Kits und Assays

HMG-CoA-Reductase Activity Assay	Abcam, Cambridge, Großbritannien (ab204701)
Mouse LDL-Cholesterol Kit	Crystal Chem, Downers Grove, USA (79980)
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA (23227)

### 2.1.5 Gebrauchtwaren

0,2µm PVDF Membran	Merck, Darmstadt, Deutschland (ISEQ00010)
1mm Spacer Plates	Bio Rad, München, Deutschland (1653311)
6 Well Mikroplatte	Corning, Corning, USA (353046)
96 Well Mikroplatte, Cellstar	Greiner, Kremsmünster, Österreich (655180)
Haemozytometer, „Neubauer“	Karl Hecht, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland
Short Plates	Bio Rad, München, Deutschland (1653308)
Superose® 6 Increase 10/300 GL	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA (GE29-0915-96)
Whatmanpaper	GE Healthcare, Chicago, USA (3030-672)
Zellkulturflaschen, 2µm Vent Cap	Corning, Corning, USA (430641U)

### 2.1.6 Puffer und Stammlösungen

0,5M EDTA (pH8,0)	93,05g EDTA in 400ml Aqua dest. lösen pH auf 8,0 mit NaOH einstellen auf 500ml mit Aqua dest. auffüllen
-------------------	--

Sammelgelpuffer	0,5M Tris/HCl (pH 6,8) 6,06g Tris Base in 70ml Aqua dest. pH auf 6,8 mit HCl einstellen auf 100ml mit Aqua dest. Auffüllen
Trenngelpuffer	1,5M Tris/HCl (pH 8,8) 18,2g Tris Base in 70ml Aqua dest. lösen pH auf 8,8 mit HCl einstellen auf 100ml mit Aqua dest. Auffüllen
5% NFDM	5g Magermilchpulver 100ml TBS-T
10% SDS	10g SDS 100ml Aqua dest.
Mild Stripping Buffer	15g Glycin 1g SDS 10ml Tween 20 in 800ml Aqua dest. Lösen pH auf 2,2 mit HCl einstellen auf 1000ml mit Aqua dest. auffüllen
Lämmli Puffer (6x)	60% Glycerol 300mM Tris (pH 6,8) 12mM EDTA 12% SDS 846mM beta-Mercaptoethanol 0,05% Bromphenol Blau
Laufpuffer (10x)	30g Tris Base 144g Glycine auf 1000ml Aqua dest. auffüllen



ChemoCam Imager	Intas, Göttingen
Heracell 150i CO <sub>2</sub> Inkubator	Thermo Fisher Scientific
Infinite M200 Pro Multimode Microplate Reader	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio Rad, München
Power Pac	Bio Rad, München
Turrax T8 Homogenisierer	Janke & Kunkel (IKA), Staufen, Deutschland

### **2.1.9 Software**

Excel 2016	Microsoft, Redmond, USA
Image J 1.48v	National Institute of Health, USA
GraphPad Prism 7.0	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
Motic Images Plus 3.0	Motic, Hongkong, China
PowerPoint 2016	Microsoft, Redmond, USA

### **2.1.10 Mäuse**

Für in-vivo Versuche wurden unter der Tierversuchsnummer G0295-16 weibliche, mindestens 6 Wochen alte C57BL/6J und C57BL/6J, ApoE<sup>-/-</sup> Tiere von Charles River Laboratories bezogen. Nach Ankunft in der Tiereinrichtung Garystraße 5, 14195 Berlin hatten die Mäuse mindestens 1 Woche Zeit um sich zu akklimatisieren ehe sie in den Versuch gingen. Sie hausten in einer maximalen Gruppengröße von fünf Tieren in autoklavierten Typ III Vollhaubenkäfigen (Makrolonkäfige mit Filterhaube) ausgelegt mit Hygienic Animal Breeding Streu (Lignocel, Rosenberg, Deutschland) und Papier. Die Temperatur lag konstant bei 22°C und das Verhältnis von Licht zu Dunkelheit betrug 12 Stunden zu 12 Stunden. Der Zugang zu Wasser und Futter war stets unbegrenzt. Alle Tierversuche wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt.

### **2.1.11 Experimentelle Diäten**

Gereinigte Futtermittel in pelletierter Form wurden von der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH bezogen. Zur Imitation einer fettreichen Ernährung bekamen die Mäuse die Hochfettdiät E15741. Diese hat 94% Trockensubstanzanteil, einen hohen Rohfettanteil von 34,6% mit originalem Cholesteringehalt von 290mg/kg und einem Energiegehalt von 24,4 MJ/kg. Addiert sind vor allem die Talgfette wie Ölsäure (C18:1), Palmitinsäure

(C16:0) und Stearinsäure (C18:0) zu 12,13%, 8,06% und 5,61%. Es prädisponiert die Induzierung von Adipositas und erhöht die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten atherosklerotischer Plaques. Die Kontrolldiät E15000 hat bei 95,2% Trockensubstanzanteil dagegen einen Rohfettanteil von 4,2% und einen Energiegehalt von 18,0 MJ/kg.

Bestandteil	Hochfett-diät E15741	Kontroll-diät E15000
Trockensubstanz	94,0%	95,2%
Rohprotein	24,1%	20,8%
Rohfett	<b>34,6%</b>	<b>4,2%</b>
Rohfaser	6,0%	5,0%
Rohasche	6,1%	5,6%
N-freie Extraktstoffe	23,3%	59,4%
Stärke	0,5%	46,8%
Zucker	9,5%	10,8%
Dextrin	15,3%	

**Tabelle 4** Nährstoffanalyse, Weender-Analyse der in G0295-16 verwendeten Futtermittel, aus ssniff Spezialdiäten GmbH, Katalog 2019

Fettsäure	Hochfett-diät E15741	Kontroll-diät E15000
C12:0	0,03 %	-
C14:0	1,03 %	0,02 %
C16:0	<b>8,06 %</b>	<b>0,45 %</b>
C16:1	0,78 %	0,02 %
C17:0	0,38 %	-
C18:0	<b>5,61 %</b>	<b>0,19 %</b>
C18:1	<b>12,13 %</b>	<b>1,07 %</b>
C18:2	2,37 %	2,12 %
C18:3	0,33 %	0,26 %
C20:0	0,04 %	0,02 %
C20:1	0,01 %	-
C20:4	0,07 %	-

**Tabelle 5** Fettsäuren in Futtermitteln. Aus ssniff Spezialdiäten GmbH, Katalog 2019

### 2.1.12 Hep G2

Für in-vitro Zellkulturexperimente wurde die humane Zelllinie Hep G2 verwandt. Ihr Ursprung geht auf ein Hepatozelluläres Karzinom eines 15jährigen Kaukasiers zurück. Die Zellen sind epithelial, adhärent und dienen als Modell für humane Hepatozyten. Zur Erforschung des Lipidmetabolismus ist die Verwendung der HepG2 Zelllinie allgemein anerkannt [51]. Die Zellen wurden im Inkubator bei 37°C Temperatur und 5% CO<sub>2</sub> gehalten. Als Basiskulturmedium diente „Dulbecco's Modified Eagle Medium“ (DMEM) inklusive 1g/l Glucose, L-Glutamin, 10% FBS und 1% Streptomycin/Penicillin. Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt. Bei einer Konfluenz von 80% wurden die Zellen passagiert oder für den Versuch verwendet. Zum Passagieren wurden die Zellen

zunächst zweimal mit 37°C warmen PBS gespült. Dann wurde pro T75 Flasche 3ml Trypsin/ Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) hinzugegeben, für 3min im Inkubator belassen und unter dem Mikroskop das Lösen der Zellen vom Flaschenboden beurteilt. Anschließend wurde das Trypsin mit Vollmedium inaktiviert und die Zellen durch mehrfaches Herauf- und Herunterpipettieren gänzlich vom Flaschenboden gelöst. In einem 15ml Zentrifugenröhrchen wurden die Zellen bei 280g und Raumtemperatur für 5min zur Bildung eines Zellpellets zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 4ml neues Medium hinzugegeben. Mittels Trypanblau wurden Zellen 1:1 gefärbt und die Zellzahl lebender Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Passage 4-9 wurde in den Experimenten verwendet.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Mausversuche**

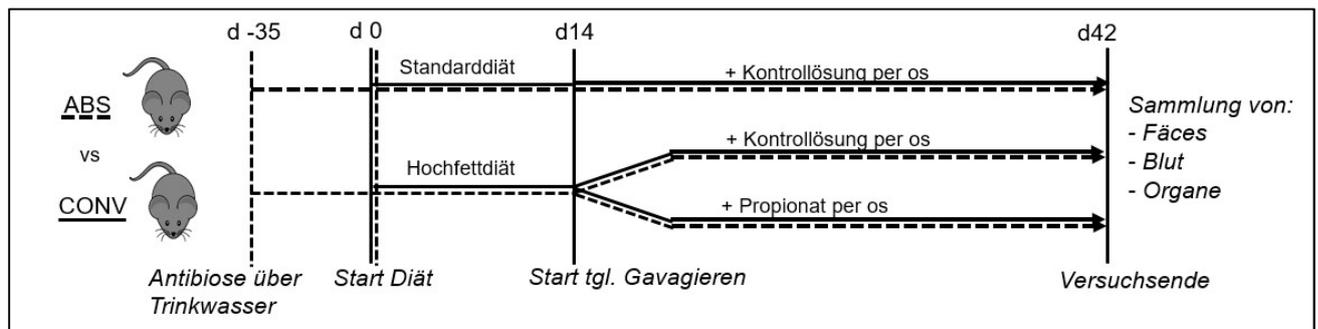
#### **2.2.1.1 Sekundär abiotische Mäuse**

Zur Depletion des Darmmikrobioms erhielten die Tiere einen Breitband-Antibiotika-Cocktail wie bei Fiebiger et al. beschrieben [52]. Dieser besteht aus den 5 Komponenten Ampicillin/Sulbactam (1g/l), Vancomycin (500mg/l), Ciprofloxacin (200mg/l), Imipenem (250mg/l) und Metronidazol (1g/l) und wurde für mindestens 4 Wochen plus die Versuchsdauer ad libitum per os über das Trinkwasser gereicht. Um dessen Wirkung nachzuweisen wurden in der 4.-6. Woche jeweils fäkale Proben gesammelt, in Thioglykolat-Nährmedium gegeben und für mindestens 7 Tage inkubiert, um das Wachstum von Bakterien- und Pilzkulturen auszuschließen. Zur Aufrechterhaltung des abiotischen Zustandes wurden die Mäuse in autoklavierten Vollhaubenkäfigen gehalten, erhielten autoklaviertes, steril filtriertes oder gammabestrahltes Futter und Flüssigkeit und wurden streng aseptisch gehandhabt.

#### **2.2.1.2 Tierversuchsreihe mit Propionatbehandlung**

Um einen potentiellen Einfluss des Darmmikrobioms auf den Cholesterinstoffwechsel zu untersuchen, wurden Wildtyp Mäuse (C57BL6/J Weibchen, 8 Wochen) mit intaktem Darmmikrobiom (CONV, konventionell, n=15) und mit durch Antibiotika eradiziertem Darmmikrobiom (AB, sekundär abiotisch, n=15) für 6 Wochen mit Standard-„Kontroll-Diät“ (SCD, standard chow diet) oder Hochfettdiät (HFD, high fat diet) ad libitum gefüttert. Um einen möglichen Einfluss von Propionat zu untersuchen, wurden ab der 3. Woche 5

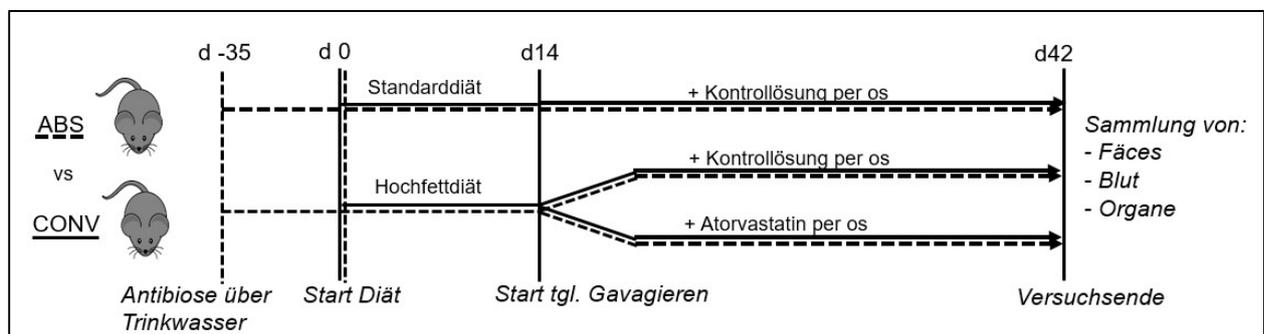
Tieren der HFD täglich 250µl steril filtrierte Propionatlösung (5,58mg Calciumpropionat) oral über eine Gavagiersonde appliziert (HFD+P, high fat diet und propionic acid). Die restlichen Tiere erhielten als Kontrolllösung eine äquivalentes Volumen steril filtriertes Laborwasser. Die Versuchsarme wurden in hypercholesterämischen ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen wiederholt.



**Abbildung 2** Versuchsaufbau mit Propionatbehandlung

### 2.2.1.3 Tierversuchsreihe mit Atorvastatinbehandlung

Darüber hinaus interessierten wir uns für einen möglichen Einfluss des Darmmikrobioms auf die LDL-Cholesterin senkende Wirkung von Atorvastatin. Für weitere kardiometabolische Medikamente wurde bereits ein solcher Effekt nachgewiesen [53]. Hierfür erhielten konventionelle und keimfreie Mäuse über 6 Wochen entweder eine SCD (n=10) oder eine HFD (n=20). Ab der 3. Woche wurden täglich via Gavagiersonde 300µl 5% DMSO/Wasser allein (Kontrolllösung) oder mit 0,25mg Atorvastatin (10mg/kg Körpergewicht/Maus/Tag) appliziert.



**Abbildung 3** Versuchsaufbau mit Atorvastatinbehandlung

#### **2.2.1.4 Probengewinnung und -vorbereitung**

Das Körpergewicht wurde täglich ab Tag 0 in g erhoben. Vor Beginn der Diät und nach Abschluss der 6 Wochen wurden fäkale Proben jedes Tieres gesammelt, in Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  zwischengelagert für spätere molekulare und metabolische Analysen. Am Sektionstag wurden die Tiere einzeln mit 5%  $\text{CO}_2$  getötet. Der Tod wurde durch das Fehlen des Zehenzwischenreflexes geprüft. Nach dem Eintauchen in 70% Ethanol wurde die Haut durch einen Schnitt von Schwanzwurzel zum Hals eröffnet und aufgeklappt. Mit einer 26G Nadel wurde das Herz von sternal punktiert und das Blut in 10% 0.5M EDTA aufgefangen und auf Eis gestellt. Zur Erlangung von Plasma wurden die Proben bei  $4^{\circ}\text{C}$  ohne Bremse für 15min und 3.000g zentrifugiert, der Überstand abpipettiert, aliquotiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Es folgte nacheinander die Entnahme von mesenterialen Lymphknoten, Milz, Leber, Gastrointestinaltrakt, Lunge und Herz. Das Darmlumen wurde mit PBS Lösung gespült. Die Proben für Protein- und RNA Analysen wurden in Stickstoff schockgefroren und bis zur Bearbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Gefrierschnitte wurden in Einbettförmchen mit OCT ummantelt und zum schockfrieren auf Trockeneis gelegt.

#### **2.2.2 Molekulare Analyse des Darmmikrobioms**

Die Charakterisierung des Darmmikrobioms erfolgte durch unsere Kooperationspartner der AG Markus Heimesaat, Charité Berlin. Die hauptsächlich in der murinen Flora vorkommenden Bakteriengruppen wurden als Menge der 16S rRNA Gen Kopien per ng DNA durch quantitative Polymerase-Kettenreaktion mit entsprechenden spezies-oder gruppenspezifischen 16S rRNA Gen Primern (Tib MolBiol, Berlin) aus den eingesammelten Fäzes nachgewiesen. Zunächst wurde DNA extrahiert, indem die Proben in PBS suspendiert, zentrifugiert ( $16.000\times\text{g}/10\text{ min}/4^{\circ}\text{C}$ ) und anschließend in 0,5ml Lysepuffer (500 mM Tris (pH 9.0), 20 mM EDTA, 10 mM NaCl, 1% SDS) suspendiert wurden. Es folgte 1 Stunde Inkubation bei  $56^{\circ}\text{C}$  mit Proteinkinase K. Anschließend wurde, nach Aufschlüsselung des Materials mit Hilfe von „Beads“, die DNA mit Phenol Extraktion isoliert und mit dem Quant-iT PicoGreen Reagent (Invitrogen<sup>TM</sup>, Carlsbad, CA, USA) quantifiziert.

### **2.2.3 Glukosemessungen**

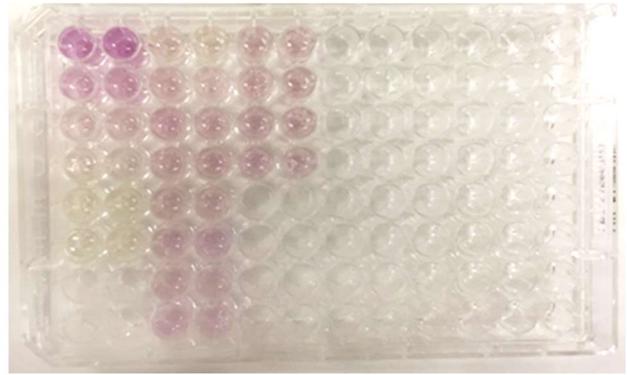
Zur Bestimmung des Glukosespiegels wurde ein Glukosemeter mit zugehörigen Teststreifen verwandt. Pro Messung wurden 1µl Plasma aufgetragen. Die Bestimmung erfolgte pro Tier als Duplikat.

### **2.2.4 Lipidprofil-Messungen**

#### **2.2.4.1 Murines Low-Density-Lipoprotein Assay**

Mittels kommerziellem Mouse LDL-Cholesterin Kit (Crystal Chem) wurde der LDL-Gehalt im Plasma nach Herstellerangaben bestimmt. Das Kit nutzt das Präzipitieren von LDL, VLDL und Chylomikronen unter Zugabe eines Vinylsulfonsäure und Polyethylene-Glycol Methylether (PEGME) haltigen Reaktionspuffers aus. Durch den Reaktionskomplex sind diese drei Lipoproteine, im Gegensatz zu HDL, vor der Degradation durch die Enzyme Cholesteroxidase und Cholesterolesterase geschützt. Im zweiten Schritt wird LDL unter Zugabe eines spezifischen Detergens enthaltenden, zweiten Reaktionspuffers aus dem Vinylsulfonsäure /PEGME-Komplex freigesetzt. Nun wird LDL von der Peroxidase umgesetzt und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird frei. Unter Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und Peroxidase findet die Trinder-Reaktion mit Bildung von 4-(p-Benzochinon-monoimino)-phenazon statt und das Reaktionsvolumen färbt sich violett. Die Farbintensität wird mittels Photometer bestimmt. Die tiefgefrorenen Plasmaproben wurden zum Auftauen auf Eis gestellt und die im Kit enthaltenen Reaktionspuffer für mindestens 30 Minuten auf Raumtemperatur äquiliibriert. Der lyophilisierte Kalibrator wurde in 1ml Aqua dest. in einer Konzentration von 123mg/dl angesetzt. Die Durchführung erfolgte auf einer durchsichtigen 96well-Platte in Duplikaten. Zunächst wurden jeweils 3µl Probe, Kalibrator und dessen Verdünnungsreihe sowie Aqua dest. als Blankowert gefolgt von 225µl des ersten Reaktionspuffers aufpipettiert. Nach 5 Minuten unter Lichtschutz in 37°C Umgebung wurde die Absorption im Mikroplatten-Leser bei 600nm ermittelt. Diese ersten Werte stellten den 1. Lese punkt dar. Im zweiten Schritt wurden 75µl des 2. Puffers aufgetragen wieder gefolgt von 5 Minuten dunkel-warmer Inkubation und Auslesen bei 600nm. Rechnerisch wird die Differenz der Absorption „5 min“ – „0 min“ bestimmt, die technischen Duplikate gemittelt und mittels einer Standardkurve der LDL-Gehalt im Serum in mg/dl angegeben.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	123	123	1	1	11	11						
B	61,5	61,5	2	2	12	12						
C	30,8	30,8	5	5	13	13						
D	15,4	15,4	6	6	14	14						
E	H2O	H2O	7	7								
F			8	8								
G			9	9								
H			10	10								



**Abbildung 4** LDL-Assay. Links: Pipettiervorlage der 96well Platte. In den Spalten 1+2 ist die Standardreihe in absteigender Konzentration von 123mg/dl beginnend angeordnet. In den Spalten 3-6 sind in diesem Beispiel die Plasmaproben der Mäuse 1-14 aus dem „Atorvastatin“ Experiment vorgesehen. Auftragung in Duplikaten. Rechts: Violetter Farbumschlag nach 2. Auslesepunkt

#### 2.2.4.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Durchführung der Lipidmessungen im Plasma mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie erfolgte durch unsere Kooperationspartnerin Frau Dr. rer. nat. Yvonne Döring (Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, Klinikum der Universität München (KUM) Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München). Die Plasmaproben wurden mittels Trennsäule (Superose 6) filtriert. Die unterschiedlichen Lipoprotein- Fraktionen (VLDL, LDL, HDL) sowie Gesamtcholesterin (TC; total cholesterol) wurden anhand der Durchflusszeit getrennt und evaluiert.

#### 2.2.5 Zellkulturexperimente

##### 2.2.5.1 Stimulation von HEPG2 Zellen mit Propionat

Um einen direkten Effekt von Propionat auf hepatische Zellen zu untersuchen, wurden HepG2-Passagen 4-9 verwandt. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 80% erreicht hatten, wurden sie 24 Stunden in Hunger-Medium gehalten. Dann folgte der Zusatz von 0.5 mM Calcium Propionat über 0h/1h/2h/6h/12h/24h. Für anschließende semiquantitative Analysen von Zielproteinen erfolgte die Proteinisolation. Hierfür wurde zunächst das Medium abgesaugt, die Zellen kurz mit kalten PBS gewaschen und anschließend eine Zellyse mittels Hinzugabe von Zellysepuffer durchgeführt. Zielproteine waren 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMGCR) und 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Synthase 1 (HMGCS1). Als normalisierendes Haushaltsprotein wurde GAPDH auf den Western Blots bestimmt.

### **2.2.5.2 Stimulation von HEPG2 Zellen mit Interleukin 10 über 24 Stunden**

Um einen direkten Effekt von Interleukin 10 (IL10) auf die Proteinexpression von HMGCR und HMGCS1 in hepatischen Zellen zu untersuchen, wurden HepG2 24 Stunden in Hunger-Medium gehalten ehe die Zugabe von 0/1/10 oder 100ng/ml IL10 für 24 Stunden erfolgte. Anschließend erfolgte die semiquantitative Analyse äquivalent zum obigen Experiment. Das Experiment wurde zweimal mit je 2 technischen Replikaten ausgeführt.

### **2.2.6 HMG-CoA-Reduktase Aktivitäts Assay**

Für die Erhebung des direkten inhibitorischen Potentials von Propionsäure wurde ein HMG CoA-Reductase Activity Assay Kit verwandt und wie vom Zulieferer beschrieben ausgeführt. Das Assay hat ein kolorimetrisches Messprinzip und nutzt die Tatsache, dass die HMG-CoA Reduktase bei der enzymatischen Reaktion den Co-Faktor NADPH zu NADP umwandelt. Die Abnahme von NADPH verursacht eine Abnahme der Extinktion bei einer Optischen Dichte von 340nm. Zu Beginn wurden alle enthaltenen Reagenzien, d.h. der HMG-Coa Reduktase Assay Puffer, die HMG-CoA Reduktase, HMG-CoA, NADPH und der mitgelieferte Inhibitor Atorvastatin vorbereitet. Der Puffer wurde auf Raumtemperatur äquilibriert. Das Enzym wurde in 550µl Puffer auf 0,7mg/ml rekonstituiert. HMG-CoA und NADPH wurden in 1400µl und 440µl Aqua bidest. aufgelöst und mit dem Enzym zusammen auf Eis gekühlt. Als zu testenden Inhibitor wurde Propionsäure mit Aqua bidest. zu drei verschiedenen 100x Konzentrationen angemischt (1000µM, 10 000µM, 100 000µM) um folgende Endkonzentration zu erzielen: 10µM, 100µM, 1000µM. Als Lösungsmittelkontrolle diente im Assay Aqua bidest. Direkt vor Start des Assays wurden alle Reagenzien auf Raumtemperatur angeglichen. Auf einer flachen, transparenten 96well Mikroplatte wurde das Assay in Duplikaten folgend aufpipettiert: Zuerst 2µl des Testinhibitors, dessen Kontrolle oder Atorvastatin in ihre entsprechend gekennzeichneten Testwells. Anschließend folgten 5µl HMG-CoA Reduktase in alle Wells, außer C1/2, welches nur mit 10µl Assay Puffer befüllt wurde. In das „Enzyme Control“ Well wurden 5µl Assay Puffer, in die restlichen Wells 3µl pipettiert. Zuletzt wurden in jedes Well 190µl Mastermix, bestehend aus 12µl HMG-COA, 4µl NADPH und 174µl HMG-CoA Reduktase Assay Puffer pipettiert und durch mehrfaches Herunterpipettieren durchmischt.

	1	2	3	4	5	6
A	EC	EC	10µM	10µM	1µM	1µM
B	SC	SC	100µM	100µM	10µM	10µM
C	AB	AB	1000µM	1000µM		
D	Propionsäure			Atorvastatin		
E						
F						

**Abbildung 5** Design der HMG-CoA Reduktase Assay Mikroplatte, Ausschnitt von 96 well Platte

Die Mikroplatte wurde umgehend in den abgedunkelten Absorbance Scanner bei 37°C eingelegt und die Messung bei einer Optischen Dichte von 340nm gestartet sowie alle 2 Minuten erneut durchgeführt. Zur Berechnung der (1) Enzymaktivität und der (2) Inhibition in Prozent wurden Mittelwerte der Duplikate am Zeitpunkt 0 Minuten und 5 Minuten ermittelt und die Ergebnisse in folgende Gleichungen eingesetzt:

(1) Enzymaktivitätsgleichung:

$$\text{Sample HMG-CoA Reductase Activity} = \frac{\left( \frac{-\Delta A_{340nm} \text{Test}}{\Delta T} - \frac{-\Delta A_{340nm} \text{Reagent Background}}{\Delta T} \right) \times (0.2)}{(12.44) \times V \times P \times (0.55)} = \text{Units/mg protein}$$

Legende: 0.2 = 0,2ml Reaktionsvolumen

12.44 = Millimolar Extinktionskoeffizient von NADPH x 2  
(in jeder Reaktion werden 2xNADPH verbraucht)

V = Enzym Volumen

P = Initiale Enzymkonzentration in mg Protein/ml (mgP/ml)

0.55 = Lichtweg (cm)

(2) Inhibition:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\frac{-A_{340nm}(\text{Enzyme})}{\Delta T} - \frac{-A_{340nm}(\text{Enzyme} + \text{Inhibitor})}{\Delta T}}{\frac{-A_{340nm}(\text{Enzyme})}{\Delta T}} * 100$$

Das Experiment wurde insgesamt 4 Mal durchgeführt (n=4). Alle Gleichungen sind dem Protokoll des ab204701 HMG-CoA Reductase Activity Assay Kits (Abcam) entnommen.

## 2.2.7 Western Blot

### 2.2.7.1 Proteinisolation

Für die Proteinisolation aus Gewebe erfolgte die Gewichtsbestimmung des gefrorenen Gewebestückes mittels Feinwaage. Auf 10mg Gewebe wurden 100µl 1x Zellysepuffer

gegeben und mit einem Homogenisator für etwa 10s auf Eis homogenisiert. Für die Proteinisolation aus adhären Zellen wurden diese zunächst mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend pro 9,6cm<sup>2</sup> mit 100µl 1x Zellysepuffer inkubiert. Die Multiwellplatte wurde sofort auf Eis gestellt. Mithilfe einer Pipettenspitze wurde für 80s lang der Zellysepuffer gründlich überall verteilt. Nach 20min Stehen auf Eis wurden die Proben 15min lang bei 4°C und 12000g bis zur Bildung eines Pellets zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß übertragen und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis belassen oder bei mindestens -20°C gelagert.

#### **2.2.7.2 Proteinquantifizierung mit Bicinchoninsäure**

Zur Bestimmung des Proteingehaltes in µg/µl wurde der Bicinchoninsäure(BCA)-Test angewandt, der chemikalisch in zwei Reaktionsschritten abläuft [54]. Im ersten Schritt, der Biuretreaktion, reagieren Peptidbindungen in stark alkalischer Umgebung mit zweiwertigen Kupferionen zu einem violetten Chelatkomplex und setzen einwertige Kupferionen frei. Mit diesen verbindet sich im zweiten Schritt das wasserlösliche BCA zu einem stabilen, violetten Chelatkomplex. Die Intensität der Farbe ist proportional zur Proteinkonzentration und kann bei einer Wellenlänge von 562nm bestimmt werden. Durch eine definierte Verdünnungsreihe aus Rinderserumalbumin (2mg/ml – 1mg/ml – 0,5mg/ml – 0,25mg/ml – 0,125mg/ml 0,025mg/ml – 0mg/ml), die mit zugehörigen Absorptionwerten eine Standardkurve ergibt, lässt sich auf die Proteinmenge der Proben schließen. Die Standardreihe und das mit Aqua dest. verdünnte Proteinlysate wurde in Duplikaten auf eine 96-Mikropipettierplatte aufgetragen, gefolgt vom BCA-Reagent im Verhältnis 1:20. Nach 30min Inkubation unter Lichtschutz und bei 37°C wurde durch den Infinite M200 Pro Multimode Microplate Reader bei 562nm photometrisch die Absorption bestimmt.

#### **2.2.7.3 SDS-Denaturierung**

Zur Proteindenaturierung wurde den Proteinlysaten im Verhältnis 1:6 6x Lämmli-Puffer zugesetzt und gut durchmischt. Für 5min wurde das Gemisch auf 95°C erhitzt und anschließend 15min auf Eis gestellt.

#### 2.2.7.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Blotting

Zur Auftrennung der Proteine nach Ihrer Ladung und Größe wurde die Gelelektrophorese mit Polyacrylamid-Gelen verwandt. Je nach zu detektierender Proteinzielgröße wurde entweder ein 10% (30-90kDa) oder 12% (<30kDa) Trenngel verwandt. Zur Herstellung der Gele wurden Aqua dest., Acrylamid, Trenn- oder Sammelgelpuffer und SDS vorbereitend miteinander gemischt (Tabelle 6). Vor dem Auftragen zwischen 2 Glasplatten mit 1mm Spalt wurden 10%iges Ammoniumpersulfat und Tetramethylethylendiamin zur Initiierung und Katalysierung der Polymerisation ergänzt. Zum Ausgleichen von Unebenheiten wurden über die Trenngelphase 100µl 0,1% SDS pipettiert. Nach 30min Polymerisationszeit bei Raumtemperatur wurde das SDS abgegossen und der Glasspalt ganz mit Trenngel aufgefüllt. Zuletzt wurde ein Kamm mit 9 oder 15 Wells blasenfrei eingetaucht. Nach weiteren 30min Wartezeit konnten die Gele sofort genutzt oder bei 4°C für weitere 2 Tage aufbewahrt werden.

Ingredienz	Gel 5 %	Gel 10 %	Gel 12 %
Aqua dest.	4,5ml	4,8 ml	4,3 ml
40 % Acrylamid 29:1	0,95ml	2,5 ml	3 ml
0,5M Tris (pH 6,8)	1,9ml		
1,5M Tris (pH 8.8)		2,5 ml	2,5 ml
10 % SDS	80µl	100 µl	100 µl
10 % APS	70µl	100µl	100µl
TEMED	6,5µl	6,5µl	6,5µl

**Tabelle 6** Mengenangaben zur Herstellung von SDS-PAGE Gelen

Die Gele wurden in die Blotting-Kammer eingesetzt, mit Laufpuffer überdeckt und in die Gelkerben je Lauf die gleiche µg-Proteinmenge aufgetragen. Als Größenreferenz wurde stets ein Proteinstandard mitpipettiert. An die Kammer wurde dann Strom angelegt: zuerst 70V für 20 Minuten, gefolgt von 100V für 100 Minuten. Nach dem Gellauf folgte der Blotting-Vorgang. In einer zusammenklappbaren Halterung wurde in folgender Reihenfolge übereinander gelegt: Schwämmchen, Whatmanpapier, Gel, in Methanol aktivierte PVDF-Membran, Whatmanpapier, Schwämmchen. Der „Sandwich“ wurde zusammengeklappt und in die mit Kühlaggregat und Transferpuffer gefüllte Transferkammer eingesetzt. Für 90 Minuten wurde Strom über 100 Volt angelegt, was den Proteintransfer von Gel auf Membran initiierte.

### **2.2.7.5 Antikörper - Färbung**

Zur Vermeidung späterer unspezifischer Antikörperbindungen wurden die Membranen für 1h bei Raumtemperatur mit 5% Magermilchpulver/TBST-Lösung blockiert. Dem schloss sich die Inkubation mit dem aus Maus oder Kaninchen stammenden Primärantikörper über Nacht für 12h und 4°C an. Alle Antikörper wurden in einer vom Zulieferer empfohlenen Konzentration in einer 5% Magermilchpulver/TBST-Lösung angesetzt. Am nächsten Morgen wurde die Membran 3 Mal für 10min mit TBST gewaschen, ehe der gegen Maus- oder Kaninchen-IgG gerichtete und mit Meerrettichperoxidase konjugierte Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur hinaufgegeben wurde. Danach wurde die Membran wieder 3 Mal für 10min mit TBST gewaschen und anschließend 2 Mal für 10min mit PBS. Für die Entwicklung wurde Chemilumineszenz-Entwicklerlösung für 5min auf die Membran gegeben und in Dunkelheit belassen. Die Detektion der Signale erfolgte mittels Kamera und „Chemostar“-Software. Abhängig von der Signalstärke wurde Belichtungszeiten von 10Sekunden bis 1 Minute im Setting „Sequential Integrate“ gewählt. Die Speicherung der Bilder erfolgte im tif-Format und zur Größenbestimmung der Proteine wurde stets ein Vergleichsbild des Proteinmarker mit aufgenommen.

### **2.2.7.6 Densometrie und Auswertung**

Die semiquantitative Auswertung der Bilddateien erfolgte mit der Software ImageJ. Die Banden wurden mit dem Auswahlwerkzeug markiert und daraufhin ein Densometriediagramm erstellt. Hier erfolgte die Markierung der entsprechenden Peaks, die durch die Software durch Zahlen hinterlegt wurde. Ein hoher Peak entsprach einem stärkeren Bildsignal und wurde durch eine höhere Zahl gewertet. Für jedes Zielprotein wurde stets auch die Densometrie des Haushaltsproteins durchgeführt und hierzu ins Verhältnis gesetzt um eine höhere Signalstärke durch eine vermehrte Proteinauftragung auszuschließen.

### **2.2.8 Statistische Auswertung**

Die statistischen Analysen wurden mit PRISM Version 8.2.0 (GraphPad Software Inc., USA) ausgeführt. Signifikante Außenlieger aus Datensätzen wurden mittels „Grubbs' Test“ und einem Signifikanzlevel von  $\alpha = 0,05$  identifiziert und aus der Analyse exkludiert. Datensätze wurden mit Hilfe von Kolmogorov–Smirnov und Shapiro–Wilk Test

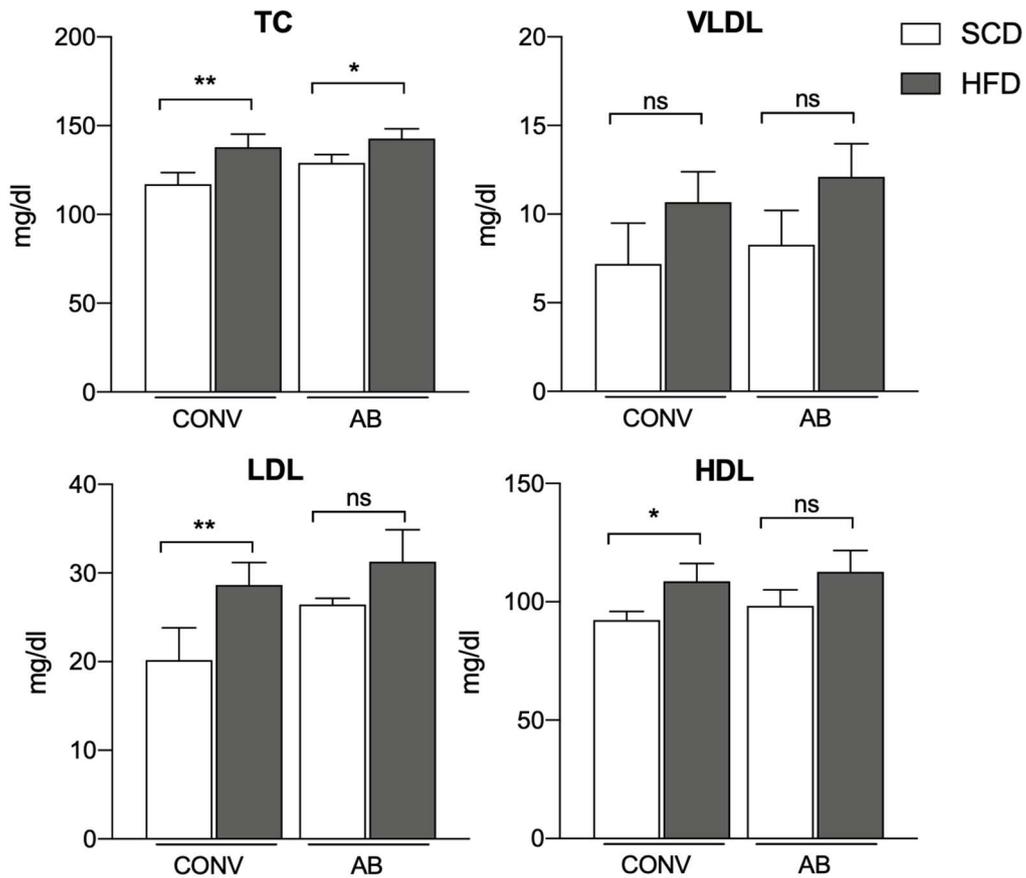
auf Normalverteilung getestet. Die Angaben erfolgen als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (standard deviation, SD). Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurden durch einen zweiseitigen, ungepaarten T-Test oder Mann-Whitney U Test durchgeführt. Um mehr als 2 Gruppen zu vergleichen wurde „1-way ANOVA“ gefolgt von einer post hoc Tukey's Test Analyse angewandt. Als statistisch signifikant werden zweiseitige P-Werte  $< 0,05$  erachtet: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  oder \*\*\* $p < 0,001$ .

### **3. Ergebnisse**

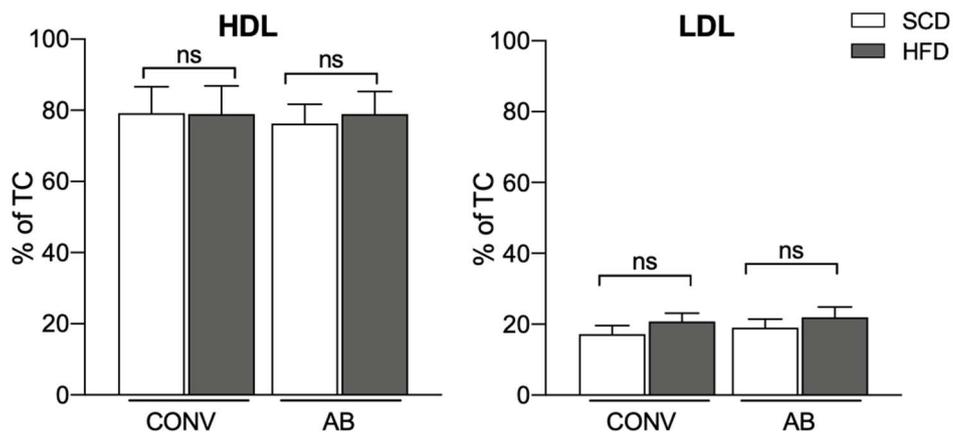
#### **3.1 Einfluss des Darmmikrobioms für die Regulation des Cholesterinstoffwechsels**

##### **3.1.1 Lipidprofil in konventionellen und sekundär abiotischen Mäusen**

Wir interessierten uns für einen potentiellen Einfluss des Mikrobioms auf den LDL-Spiegel sowie TC, VLDL und HDL im Plasma von konventionellen und sekundär abiotischen C57BL6 Mäusen. Lipoproteine wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie im Plasma nach 6 Wochen SCD oder HFD bestimmt. Tiere mit intaktem Mikrobiom zeigten unter HFD erhöhte Plasmaspiegel von TC, LDL und HDL gegenüber SCD gefütterten Tieren (TC: CONV SCD vs. CONV HFD:  $117,0 \pm 6,6$  vs.  $138,0 \pm 7,2$  mg/dl,  $p < 0,01$ ), (LDL: CONV SCD vs. CONV HFD:  $20,2 \pm 3,6$  vs.  $28,6 \pm 2,6$  mg/dl,  $p < 0,01$ ), (HDL: CONV SCD vs. CONV HFD:  $92,3 \pm 3,6$  vs.  $108,7 \pm 7,5$  mg/dl,  $p = 0,02$ ). Die TC-Plasmaspiegel waren in Tieren ohne Darmmikrobiom unter HFD höher als in abiotischen Tieren unter SCD (TC: AB SCD vs. AB HFD:  $129,0 \pm 4,7$  vs.  $142,8 \pm 5,4$  mg/dl,  $p = 0,03$ ). Die Abwesenheit des Mikrobioms hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Plasmaspiegel der Lipoproteine weder in SCD noch HFD gefütterten Tieren (TC: CONV SCD vs. AB SCD:  $117,0 \pm 6,6$  vs.  $129,0 \pm 4,7$  mg/dl,  $p = 0,07$ ; CONV HFD vs. AB HFD:  $138,0 \pm 7,2$  vs.  $142,8 \pm 5,4$  mg/dl,  $p = 0,66$ ), (VLDL: CONV SCD vs. AB SCD:  $7,2 \pm 2,3$  vs.  $8,3 \pm 1,9$  mg/dl,  $p = 0,86$ ; CONV HFD vs. AB HFD:  $10,7 \pm 1,7$  vs.  $12,1 \pm 1,9$  mg/dl,  $p = 0,70$ ), (LDL: CONV SCD vs. AB SCD:  $20,2 \pm 3,6$  vs.  $26,5 \pm 0,7$  mg/dl,  $p = 0,07$ ; CONV HFD vs. AB HFD:  $28,6 \pm 2,6$  vs.  $31,3 \pm 3,6$  mg/dl,  $p = 0,57$ ), (HDL: CONV SCD vs. AB SCD:  $92,3 \pm 3,6$  vs.  $98,3 \pm 6,8$  mg/dl,  $p = 0,64$ ; CONV HFD vs. AB HFD:  $108,7 \pm 7,5$  vs.  $112,6 \pm 9,0$  mg/dl,  $p = 0,84$ ). In den C57BL6 Mäusen stellte HDL in konventionellen und abiotischen Bedingungen den größten prozentualen Anteil des Gesamtcholesterins dar (Abb. 9). Der relative Anteil von HDL und LDL am Gesamtcholesterin wurde weder durch Diät noch durch ein durch Antibiotika-Gabe eradiziertes Mikrobiom signifikant beeinflusst.



**Abbildung 6** TC, VLDL, LDL und HDL im Plasma von C57BL6 Mäusen mit intaktem (CONV) und eradiziertem Mikrobiom (AB) nach 6 Wochen Kontrolldiät (SCD) und Hochfett diät (HFD). n=4-5, \*= p<0,05, \*\*= p<0,01

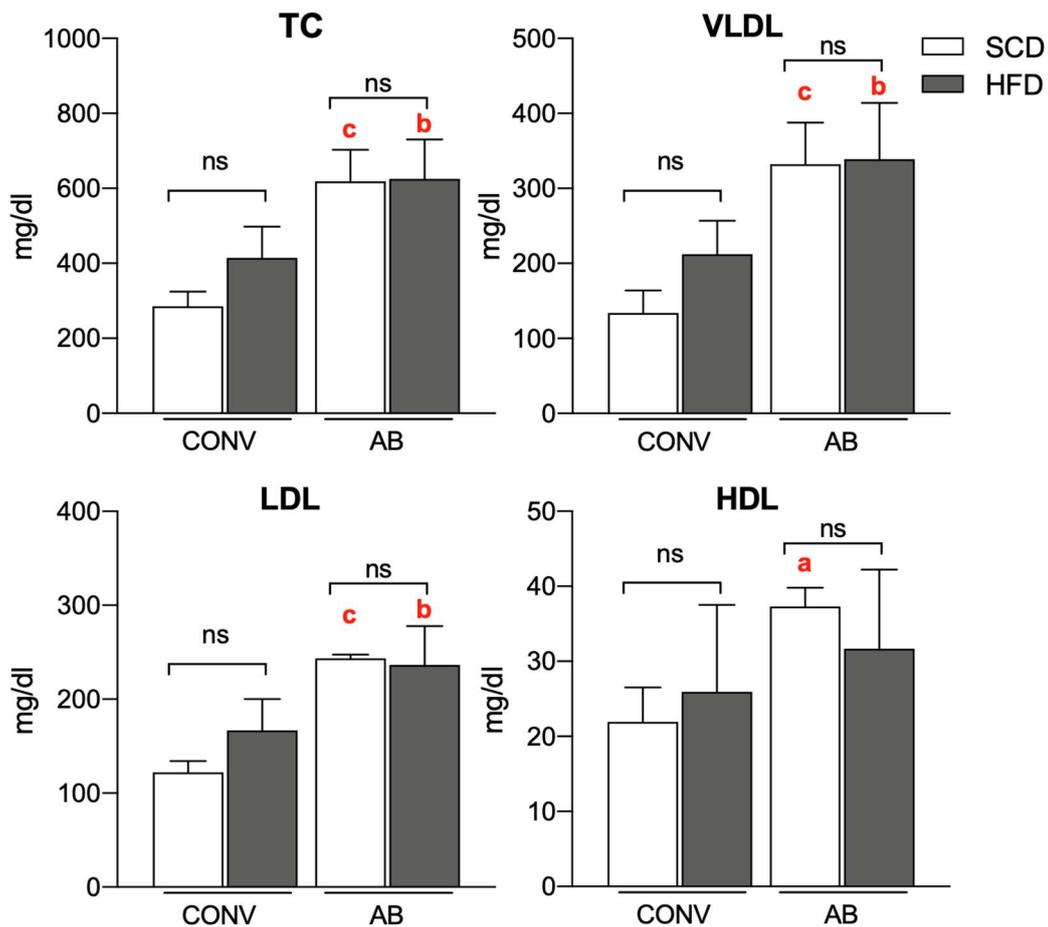


**Abbildung 7** Prozentualer Anteil von HDL und LDL am TC von C57BL6 Mäusen mit intaktem (CONV) und eradiziertem Mikrobiom (AB) nach 6 Wochen Kontroll diät (SCD) und Hochfett diät (HFD). n=4-5.

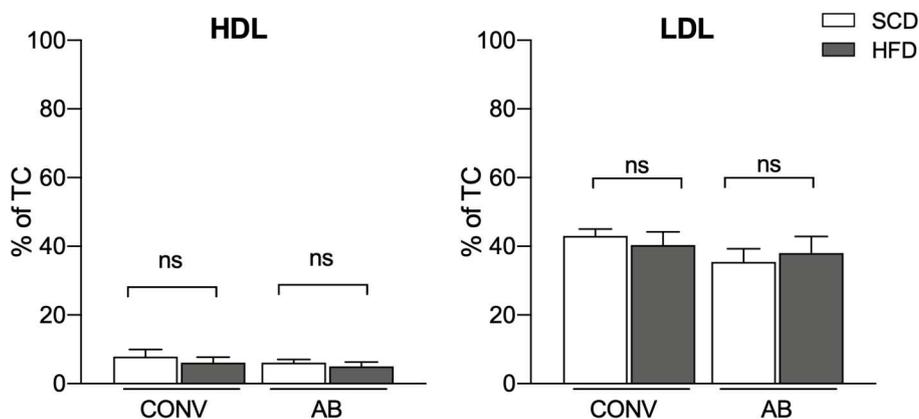
### 3.1.2 Lipidprofil in konventionellen und sekundär abiotischen hypercholesterämischen Mäusen

Im nächsten Schritt untersuchten wir den potentiellen Einfluss des Mikrobioms auf Lipoprotein-Spiegel von hypercholesterämischen ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen. Hierfür wurden Lipoproteine in sekundär abiotischen und konventionellen ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen nach 6 Wochen SCD oder HFD bestimmt. Die Diät hatte weder in konventionellen noch abiotischen Mäusen einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtcholesterin oder die Lipoproteine (TC: CONV SCD vs. CONV HFD: 285,2 ± 39,3 vs. 414,3 ± 83,2 mg/dl, p = 0,06; AB SCD vs. AB HFD: 618,8 ± 83,9 vs. 625,1 ± 105,8 mg/dl, p = 0,99), (VLDL: CONV SCD vs. CONV HFD: 133,8 ± 30,3 vs. 212,4 ± 44,4 mg/dl, p = 0,10; AB SCD vs. AB HFD 332,1 ± 55,8 vs. 338,9 ± 74,8 mg/dl, p = 0,99), (LDL: CONV SCD vs. CONV HFD: 122,1 ± 12,0 vs. 166,9 ± 33,3 mg/dl, p = 0,08 ; AB SCD vs. AB HFD: 243,5 ± 3,9 vs. 236,5 ± 41,2 mg/dl, p = 0,99), (HDL: CONV SCD vs. CONV HFD: 21,9 ± 4,6 vs. 25,9 ± 11,6 mg/dl, p = 0,85; AB SCD vs. AB HFD: 37,3 ± 2,5 vs. 31,7 ± 10,5 mg/dl, p = 0,72). SCD gefütterte abiotische Tiere hatten signifikant höhere Cholesterin- und Lipoproteinwerte als SCD gefütterte Mäuse mit intaktem Mikrobiom (TC: CONV SCD vs. AB SCD: 285,2 ± 39,3 vs. 618,8 ± 83,9 mg/dl, p < 0,01), (VLDL: CONV SCD vs. AB SCD: 133,8 ± 30,3 vs. 332,1 ± 55,8 mg/dl, p < 0,01), (LDL: CONV SCD vs. AB SCD: 122,1 ± 12,0 vs. 243,5 ± 3,9 mg/dl, p < 0,01), (HDL: CONV SCD vs. AB SCD: 21,9 ± 4,6 vs. ± 37,3 ± 2,5 mg/dl, p = 0,04). Unter HFD hatten abiotische Tiere höhere Plasmaspiegel an Gesamtcholesterin, VLDL und LDL als die konventionelle, HFD gefütterte Tiere (TC: CONV HFD vs. AB HFD: 414,3 ± 83,2 vs. 625,1 ± 105,8 mg/dl, p < 0,01), VLDL: CONV HFD vs. AB HFD: 212,4 ± 44,4 vs. 338,9 ± 74,8 mg/dl, p < 0,01), (LDL: CONV HFD vs. AB HFD: 166,9 ± 33,3 vs. 236,5 ± 41,2 mg/dl, p < 0,01). Nur HDL-Spiegel unterschieden sich nicht zwischen HFD-gefütterten Tieren mit und ohne intaktem Mikrobiom (HDL: CONV HFD vs. AB HFD: 25,9 ± 11,6 vs. 31,7 ± 10,5 mg/dl, p = 0,65).

Der prozentuale Anteil von LDL und HDL am TC war in hypercholesterämischen Mäusen weder durch Diät noch durch ein durch Antibiotika-Gabe eradiziertes Mikrobiom signifikant beeinflusst. In den ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen überwog der prozentuale Anteil von LDL mit im Mittel zwischen 35-43% Anteil vom TC. Das HDL erreichte im Mittel maximal 8 % Anteil vom TC (CONV SCD).



**Abbildung 8:** TC, VLDL, LDL und HDL im Plasma von ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen mit intaktem (CONV) und eradiziertem Mikrobiom (AB) nach 6 Wochen Kontrolldiät (SCD) und Hochfett diät (HFD). n=4-7, a= p<0,05, b= p<0,01, c= p<0,001; a-c vergleichen CONV SCD vs. AB

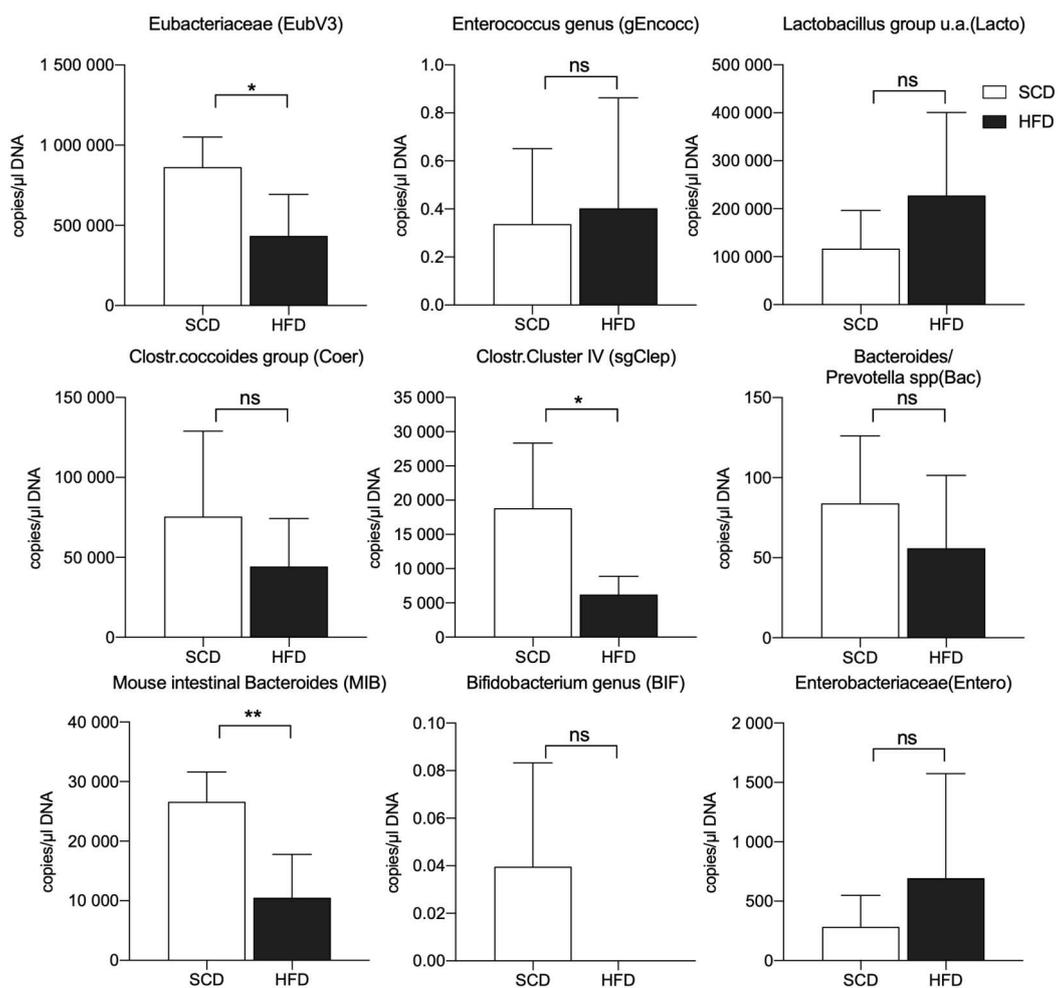


**Abbildung 9** Prozentualer Anteil von HDL und LDL an TC von ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen mit intaktem (CONV) und eradiziertem Mikrobiom (AB) nach 6 Wochen Kontrolldiät (SCD) und Hochfett diät (HFD). n=4-7.

### 3.1.3 Zusammensetzung des Darmmikrobioms und Einfluss von Diät auf die Darmmikrobiomkomposition

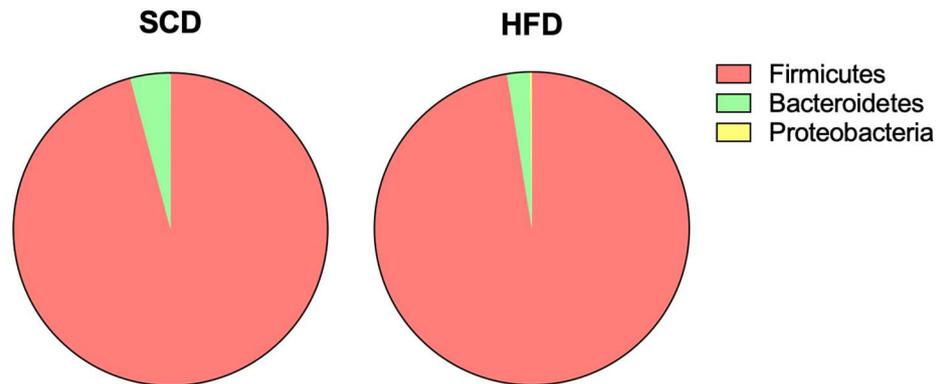
Mittels 16S rRNA Analyse wurde die Zusammensetzung des Darmmikrobioms auf Ebene der hauptsächlich vorkommenden bakteriellen Gruppen in fäkalen Proben, die nach 6 Wochen Behandlung in konventionellen Wild Typ Mäusen gesammelt wurden,

untersucht. Die Angaben werden in Genekopien je  $\mu\text{l}$  DNA gemacht. Alle untersuchten Gruppen *Eubacteriaceae*, *Enterococcus* genus, *Lactobacillus*, *Clostridium coccoides*, *Clostridium Cluster IV*, *Bacteroides*, *Mouse intestinal Bacteroides*, *Bifidobacterium* genus und *Enterobacteriaceae* waren in den Proben nachweisbar. Ein signifikant geringeres Vorkommen unter HFD zeigten die zum Phylum *Firmicutes* gehörigen *Eubacteriaceae* (SCD vs. HFD:  $863000 \pm 187547$  vs.  $434800 \pm 257721$  Kopien/ $\mu\text{l}$  DNA,  $p = 0,02$ ) und *Clostridium Cluster IV* (SCD vs. HFD:  $18828 \pm 9507$  vs.  $6213 \pm 2657$  Kopien/ $\mu\text{l}$  DNA,  $p = 0,04$ ). Ebenfalls signifikant und um mehr als 50% vermindert nachweisbar in den HFD gefütterten Mäusen waren *Mouse intestinal Bacteroides* (SCD vs. HFD:  $26600 \pm 5018$  vs.  $10516 \pm 7255$  Kopien/ $\mu\text{l}$  DNA,  $p < 0,01$ ). Die weiteren untersuchten bakteriellen Gruppen waren im Vorkommen nicht signifikant verändert. *Enterococcus* genus, *Lactobacillus*, *Clostridium coccoides*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium* genus und *Enterobacteriaceae* waren nicht durch den Faktor Diät im Vorkommen beeinflusst.



**Abbildung 10** 16S rRNA Analyse des Darmmikrobioms in C57BL/6 Mäusen nach 6 Wochen Standarddiät (SCD) und Hochfettdiät (HFD).  $n=3-5$ ,  $*$  =  $p < 0,05$ ,  $**$   $p < 0,01$

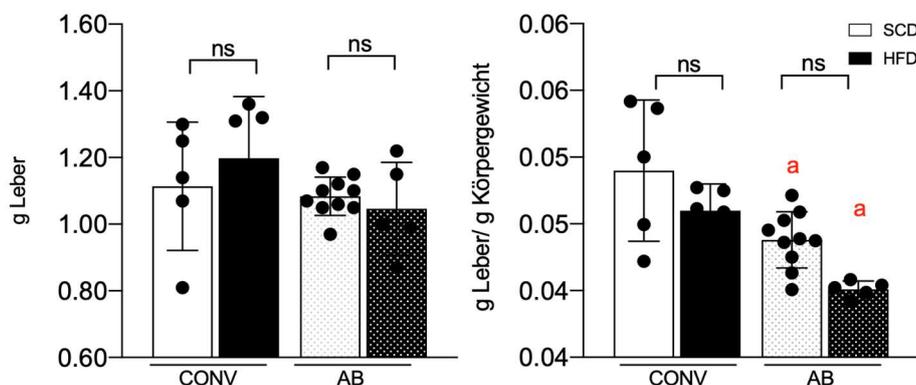
Das Gesamtmikrobiom zeigte keine signifikante Veränderung in der Zusammensetzung (Abbildung 11). *Firmicutes* stellten die relative Mehrheit des Darmmikrobioms sowohl unter SCD als auch unter HFD dar (SCD vs. HFD:  $95,9 \pm 3,7$  vs.  $97,5 \pm 3,4$  % des relativen Vorkommens). *Bacteroidetes* stellten das zweithäufigste Phylum mit höchstens 4% Anteil am untersuchten Mikrobiom dar (SCD vs. HFD:  $4,1 \pm 3,7$  vs.  $2,4 \pm 3,1$  % des relativen Vorkommens). Das Verhältnis *Firmicutes* : *Bacteroidetes* war durch die Diät beeinflusst: SCD vs. HFD: 23:1 vs. 41:1.



**Abbildung 11** Prozentualer Anteil der Phyla im Darmmikrobiom in C57BL/6 Mäusen nach 6 Wochen Standarddiät (SCD) und Hochfettdiät (HFD).

### 3.1.4 Einfluss des Darmmikrobioms auf Leber

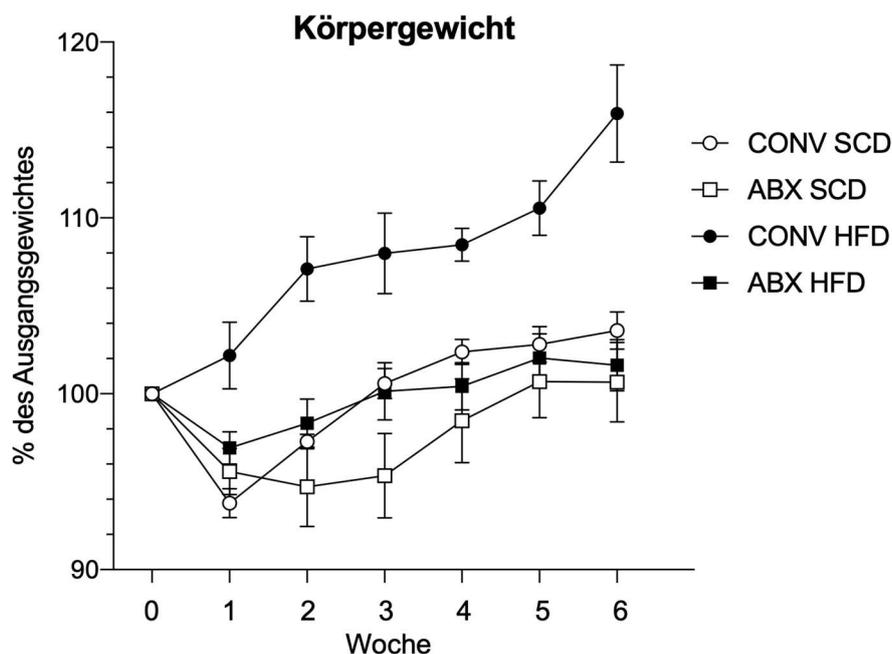
Die Analyse der Lebergewichte ergab keinen Einfluss des Mikrobiomstatus auf die Absolutwerte der Lebergewichte (CONV SCD vs. AB SCD:  $1,11 \pm 0,19$  vs.  $1,08 \pm 0,06$  g,  $p = 0,98$ ) (CONV HFD vs. AB HFD:  $1,2 \pm 0,29$  vs.  $1,05 \pm 0,14$  g,  $p = 0,32$ ). Das Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht war hingegen ohne Darmmikrobiom reduziert gegenüber der Kontrollgruppe sowohl unter SCD als auch unter HFD (CONV SCD vs. AB SCD:  $0,049 \pm 0,005$  vs.  $0,044 \pm 0,002$  g/g,  $p = 0,02$ ) (CONV HFD vs. AB HFD:  $0,046 \pm 0,002$  vs.  $0,040 \pm 0,001$  g/g,  $p = 0,02$ ).



**Abbildung 12** Absolute Lebergewichte (links) und Ratio von g Leber/g Körpergewicht (rechts) von konventionellen und sekundär abiotischen Mäusen unter Kontrolldiät (SCD) und Hochfettdiät (HFD).  $n=5-10$ , a vergleicht CONV vs. AB  $p < 0,05$

### 3.1.5 Einfluss des Darmmikrobioms auf das Körpergewicht in hypercholesterämischen Mäusen

HFD führte nach insgesamt 6 Wochen in konventionellen ApoE<sup>-/-</sup> Tieren zu einer signifikanten Zunahme des Körpergewichtes gegenüber den SCD gefütterten Tieren (CONV SCD vs. CONV HFD:  $103,6 \pm 2,8$  vs.  $115,9 \pm 6,8$  % von Ausgangsgewicht,  $n = 6-7$ ,  $p = 0,02$ ). Die sekundär abiotischen Tieren nahmen unter sechswöchiger HFD verglichen zur SCD gefütterten Gruppe nicht signifikant zu (ABX SCD vs. ABX HFD:  $100,7 \pm 4,5$  vs.  $101,6 \pm 3,9$  % von Ausgangsgewicht,  $n = 4-7$ ,  $p = 0,98$ ). Der Vergleich der über 6 Wochen mit HFD behandelten Tieren mit und ohne Darmmikrobiom zeigte eine signifikant geringere Gewichtszunahme der Tiere unter Abwesenheit des Darmmikrobioms (CONV HFD vs. ABX HFD:  $115,9 \pm 6,8$  vs.  $101,6 \pm 3,9$  % von Ausgangsgewicht,  $n = 6-7$ ,  $p < 0,01$ ). Das Körpergewicht war in Mäusen mit und ohne Mikrobiom nach 6 Wochen SCD nicht unterschiedlich (CONV SCD vs. ABX SCD:  $103,6 \pm 2,8$  vs.  $100,7 \pm 4,5$  % von Ausgangsgewicht,  $n = 4-7$ ,  $p = 0,67$ ).

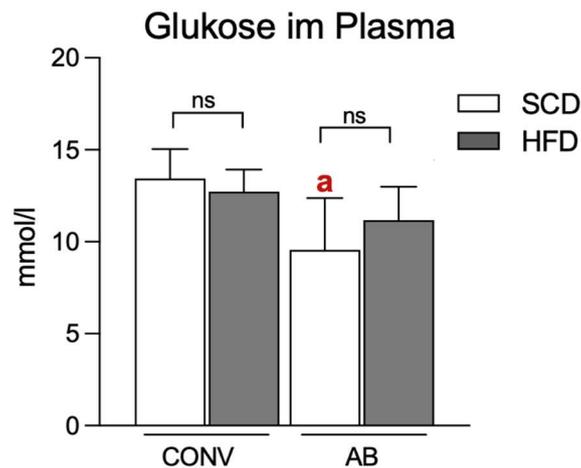


**Abbildung 13** Gewichtsverlauf von ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen mit (CONV) oder durch Antibiotika eradiziertem Darmmikrobiom (ABX) nach 6 Wochen Behandlung mit Kontrolldiät (SCD) oder Hochfettdiät (HFD).

### 3.1.6 Einfluss des Darmmikrobioms auf den Glukosespiegel

Das Darmmikrobiom reguliert einen Teil der wirtsphysiologischen Glukose-Homöostase. Durch Bestimmung der Plasma-Glukose untersuchten wir den Einfluss des Darmmikrobioms mit intaktem und depletiertem Mikrobiom auf den Blutzuckerspiegel von

Mäusen unter SCD und HFD. HFD allein zeigte keine signifikante Auswirkung auf den Plasma-Glukosespiegel, weder im konventionellen noch im abiotischen Setting (CONV SCD vs. CONV HFD:  $13,4 \pm 1,6$  vs.  $12,7 \pm 1,2$  mmol/l,  $n = 5$ ,  $p = 0,90$ ; AB SCD vs. AB HFD:  $9,6 \pm 2,8$  vs.  $11,2 \pm 1,8$  mmol/l,  $n = 4-5$ ,  $p = 0,60$ ). Ein signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen den Mäusen mit intaktem und eradiziertem Mikrobiom unter SCD (CONV SCD vs. AB SCD:  $13,4 \pm 1,6$  vs.  $9,6 \pm 2,8$  mmol/l,  $n = 4-5$ ,  $p = 0,03$ ).



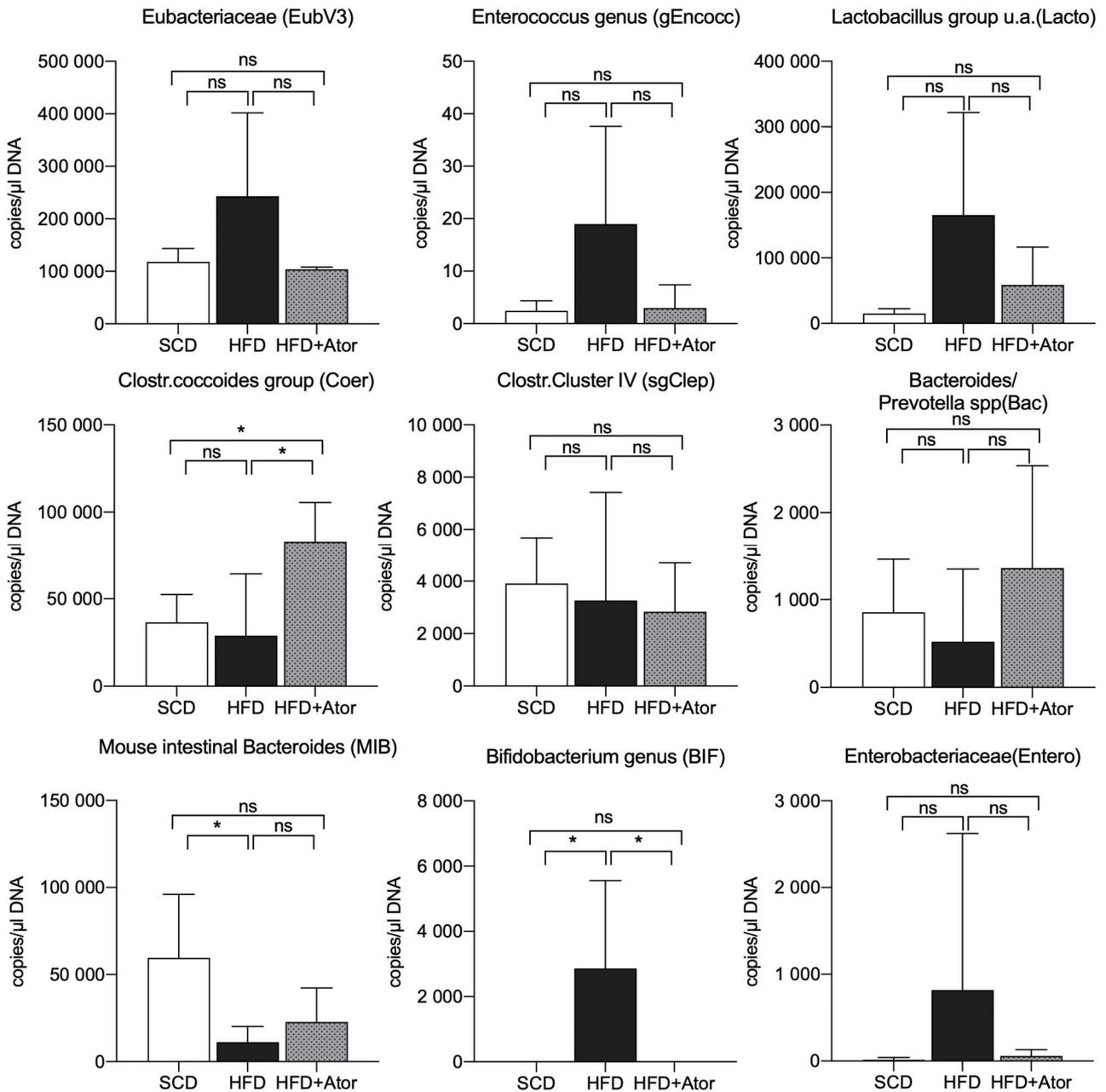
**Abbildung 14** Glukose im Plasma von C57Bl6 Mäusen mit intaktem (CONV) und eradiziertem Mikrobiom (AB) am Ende der Behandlung mit 6 Wochen Kontrolldiät (SCD) oder Hochfettdiät (HFD). a=  $p < 0,05$ ; a vergleicht CONV SCD vs. AB SCD.

## 3.2 Möglicher Einfluss des Darmmikrobioms auf die cholesterinsenkende Wirkung von Statinen

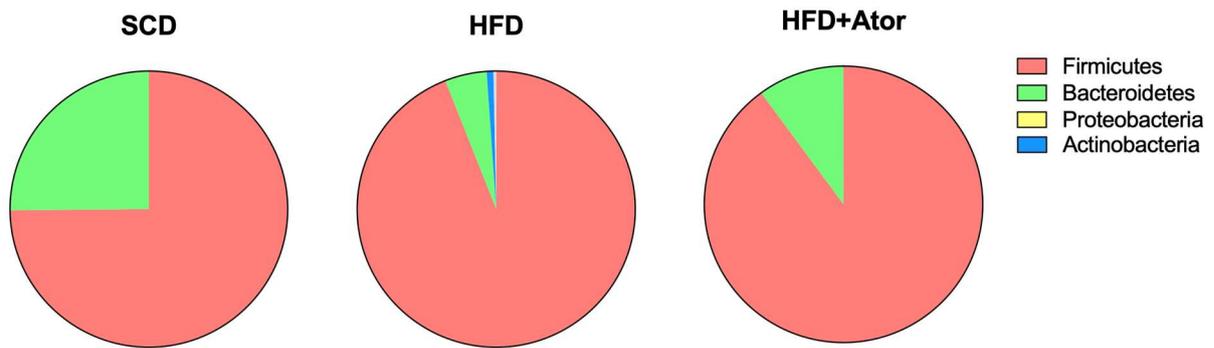
### 3.2.1 Einfluss von Atorvastatin auf die Zusammensetzung des Darmmikrobioms

Wir untersuchten den Einfluss der Therapie mit Atorvastatin auf die Zusammensetzung des Darmmikrobioms auf Ebene der Bakterienfamilien und -gruppen. Es zeigte sich ein signifikant höheres Vorkommen von *Clostridium coccoides* in Mäusen, die zusätzlich zur HFD per os mit Atorvastatin behandelt wurden (HFD vs. HFD+Ator:  $28912 \pm 35406$  vs.  $83120 \pm 22395$  Kopien/ $\mu$ l DNA,  $n = 5$ ,  $p = 0,02$ ). Darüber hinaus war *Bifidobacterium genus* in Tieren mit HFD und Atorvastatin-Behandlung nicht und somit signifikant weniger exprimiert als in Tieren unter HFD allein (HFD vs. HFD+Ator:  $2864 \pm 2694$  vs.  $0 \pm 0$  Kopien/ $\mu$ l DNA,  $n = 5$ ,  $p = 0,03$ ). Mäuse mit SCD hatten ebenfalls signifikant weniger *Bifidobacterium genus* im Darmmikrobiom als Tiere unter HFD (SCD vs. HFD:  $0,32 \pm 0,68$  vs.  $2864 \pm 2694$  Kopien/ $\mu$ l DNA,  $n = 5$ ,  $p = 0,03$ ). Auf Ebene der Phyla zeigte sich eine Zunahme der Ratio *Firmicutes* : *Bacteroidetes* unter HFD (SCD vs. HFD: 3 : 1 vs. 19 : 1).

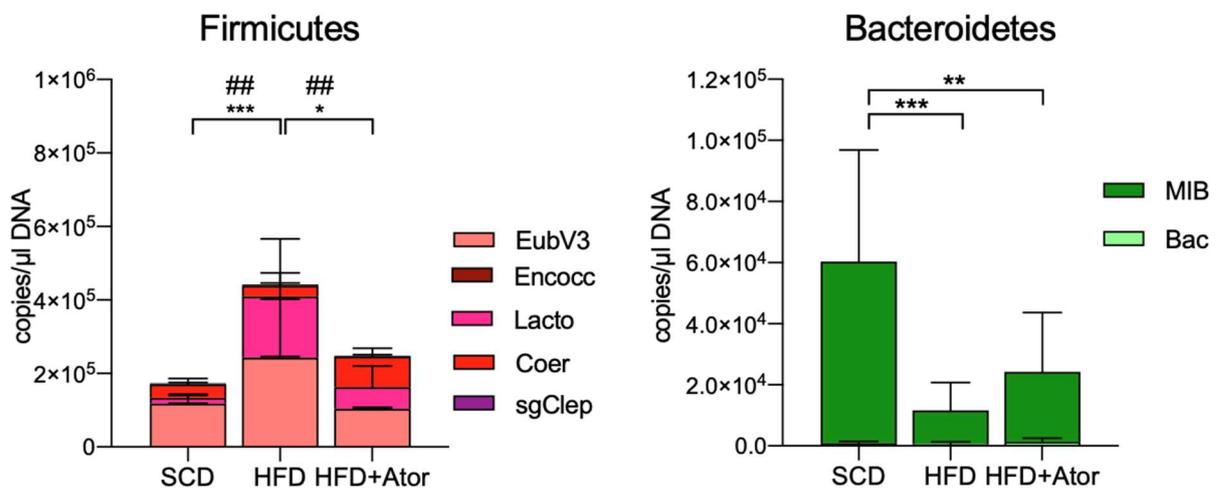
Unter der Therapie mit Atorvastatin war das Verhältnis *Firmicutes* : *Bacteroidetes* verringert gegenüber der HFD allein (HFD vs. HFD+Ator: 19 : 1 vs. 9 : 1).



**Abbildung 15** 16S rDNA Analyse des Darmmikrobioms nach 6 Wochen Standarddiät (SCD), Hochfettdiät (HFD) und HFD mit Atorvastatin (Ator) behandelten Mäusen. n=3-5, \* = p<0,05



**Abbildung 16** 16S rRNA Analyse des Darmmikrobioms auf Phylum-Ebene nach 6 Wochen Standarddiät (SCD), Hochfettdiät (HFD) und HFD mit Atorvastatin (Ator) behandelten Mäusen.. Angaben in % der Gesamtexpression der Bakteriengruppen

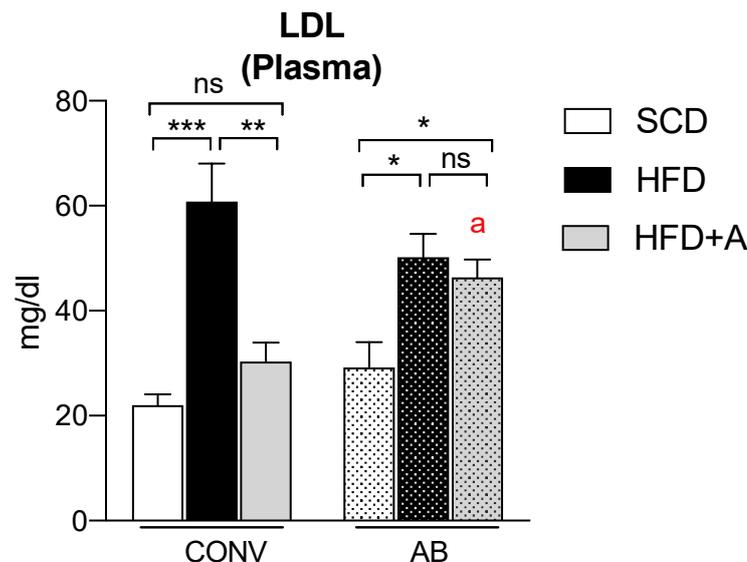


**Abbildung 17** Zusammensetzung des Darmmikrobioms auf Phylum-Ebene. Links: Firmicutes: EubV3 = Eubacteriaceae, Encocc = Enterococcus genus, Lacto = Lactobacillus Gruppe, Coer = Clostridium coccoides, sgClep = Clostridium Cluster IV. ## vergleichen EubV3,  $p < 0,001$ . \* vergleicht Lacto,  $* = p < 0,05$ ,  $*** = p < 0,001$ , Rechts: Bacteroidetes: MIB = Mouse Intestinal Bacteroides, Bac = Bacteroides/Prevotella spp. \* vergleichen MIB,  $** = p < 0,01$ ,  $*** = p < 0,001$

### 3.2.2 Einfluss des Darmmikrobioms auf die cholesterinsenkende Wirkung von Atorvastatin

Das Mikrobiom moduliert die Gesundheit des Wirtes unter anderem durch die Verstoffwechslung von Medikamenten. Um eine potentielle Rolle des Darmmikrobioms für die LDL-Cholesterin senkende Wirkung von Atorvastatin zu untersuchen, bestimmten wir das Plasma-LDL in konventionellen und abiotischen Tieren unter Atorvastatintherapie. HFD steigerte das Plasma-LDL gegenüber den SCD gefütterten Tieren signifikant, sowohl in den konventionellen als auch in den antibiotisch behandelten Tieren (CONV SCD vs. CONV HFD:  $22,01 \pm 4,65$  vs.  $60,87 \pm 16,00$  mg/dl,  $p < 0,01$ ) (AB SCD vs. AB HFD:  $29,22 \pm 11,80$  mg/dl vs.  $50,21 \pm 9,94$  mg/dl,  $p = 0,03$ ). Atorvastatin

reduzierte den Plasma-LDL-Spiegel signifikant in der HFD-Gruppe der konventionellen Tiere (CONV HFD vs. CONV HFD+Ator :  $60,87 \pm 16,00$  vs.  $30,36 \pm 8,07$  mg/dl,  $p < 0,01$ ). In den Mikrobiom-depletierten Tieren zeigte Atorvastatin keinen signifikanten Einfluss auf das LDL (AB HFD vs. AB HFD+Ator:  $50,21 \pm 9,94$  vs.  $46,36 \pm 7,62$  mg/dl,  $p = 0,99$ ). Der Vergleich zwischen Mikrobiom-depletierten und konventionellen Tieren erbrachte nur in den Atorvastatin behandelten Tieren einen signifikanten Unterschied (CONV HFD+Ator vs. AB HFD+Ator:  $30,36 \pm 8,07$  vs.  $46,36 \pm 7,62$  mg/dl,  $p = 0,01$ ).

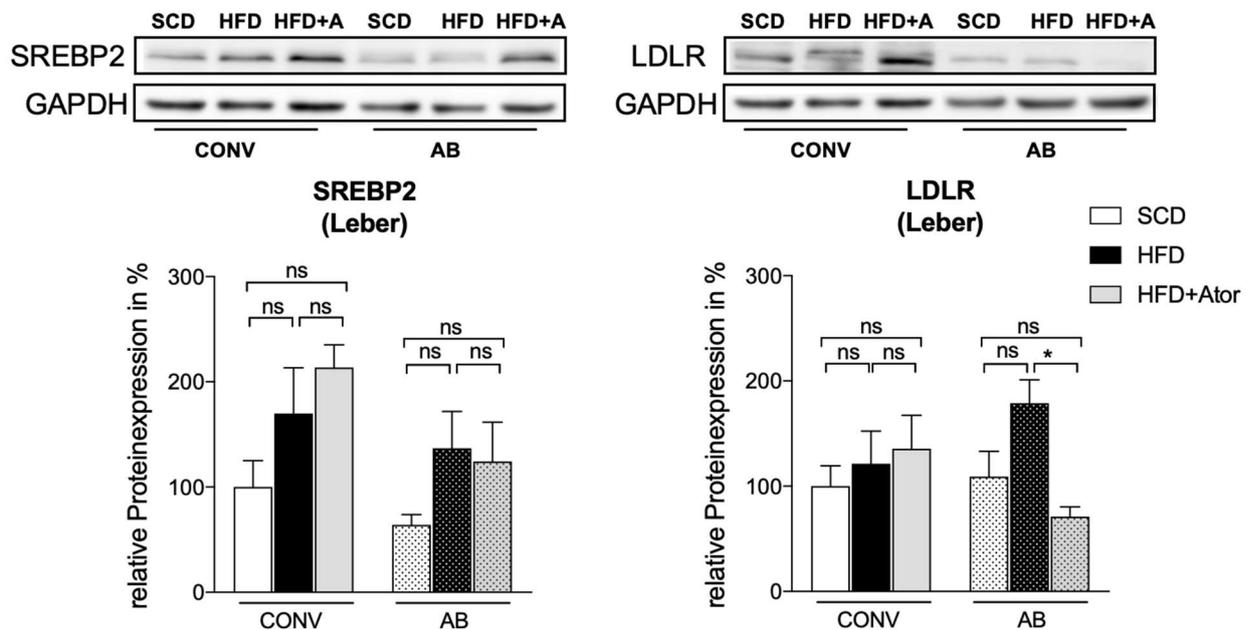


**Abbildung 18** LDL-Cholesterin im Plasma von C57Bl6-Mäusen mit intaktem (CONV) und eradiziertem Mikrobiom (AB) nach 6 Wochen Behandlung mit Kontrolldiät (SCD), Hochfettdiät (HFD) oder HFD und Atorvastatin (HFD+A).  $n=5$ ,  $*/a=p<0,05$ ,  $**=p<0,01$ ,  $***=p<0,001$ ; a vergleicht CONV HFD+Ator vs. AB HFD+Ator.

### 3.2.3 Potentielle Mechanismen des Darmmikrobiom-abhängigen Einflusses auf die cholesterinsenkende Wirkung von Statinen

In konventionellen Tieren war die Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2 (SREBP2) Proteinexpression in der Leber weder unter HFD noch unter zusätzlicher oraler Atorvastatingabe gegenüber der Kontrollgruppe reguliert (CONV SCD vs. CONV HFD:  $100,0 \pm 56,1$  vs.  $169,8 \pm 97,6$  % relative Proteinexpression,  $p = 0,60$ ) (CONV HFD vs. CONV HFD+Ator:  $169,8 \pm 97,6$  vs.  $213,7 \pm 48,0$  % relative Proteinexpression,  $p = 0,90$ ). Das Vorhandensein des Darmmikrobioms hatte keinen regulatorischen Effekt auf die SREBP2 Proteinexpression (CONV SCD vs. AB SCD:  $100,0 \pm 56,09$  vs.  $64,14 \pm 21,7$ ,  $p = 0,9$ ). Die Expression von Low Density Lipoprotein Rezeptor (LDLR), einem Rezeptor der für die Aufnahme des LDL aus dem Blut nach intrazellulär verantwortlich ist, war in Mikrobiom-depletierten, HFD gefütterten Tieren signifikant reduziert, wenn Atorvastatin

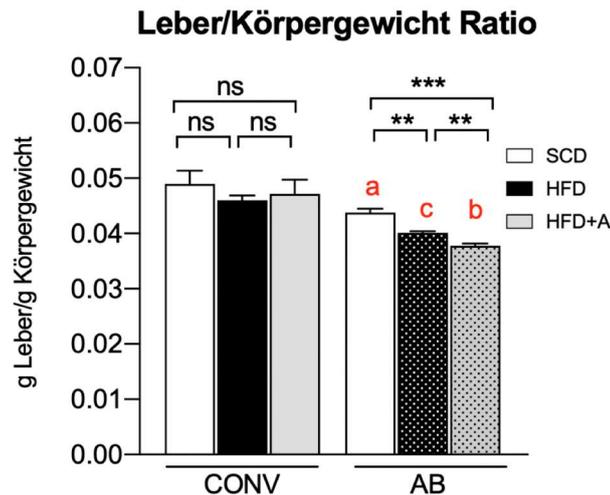
appliziert wurde (AB HFD vs. AB HFD+Ator:  $178,9 \pm 49,6$  vs.  $71,2 \pm 20,5$  % relative Proteinexpression,  $p = 0,03$ ). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen konventionellen und abiotischen Tieren in der LDLR Proteinexpression (CONV SCD vs. AB SCD:  $100,0 \pm 43,5$  vs.  $109,0 \pm 54,1$  % relative Proteinexpression,  $p = 0,99$ ).



**Abbildung 19** Proteinexpression von SREBP2 und LDLR in der Leber von Wildtyp-Mäusen unter Kontrolldiät (SCD), Hochfettdiät (HFD) oder Hochfettdiät und täglicher Atorvastatin-Gabe (HFD+A). Exemplarische Western Blots.

### 3.2.3.1 Einfluss von Atorvastatin auf das Lebergewicht in konventionellen und sekundär abiotischen Mäusen

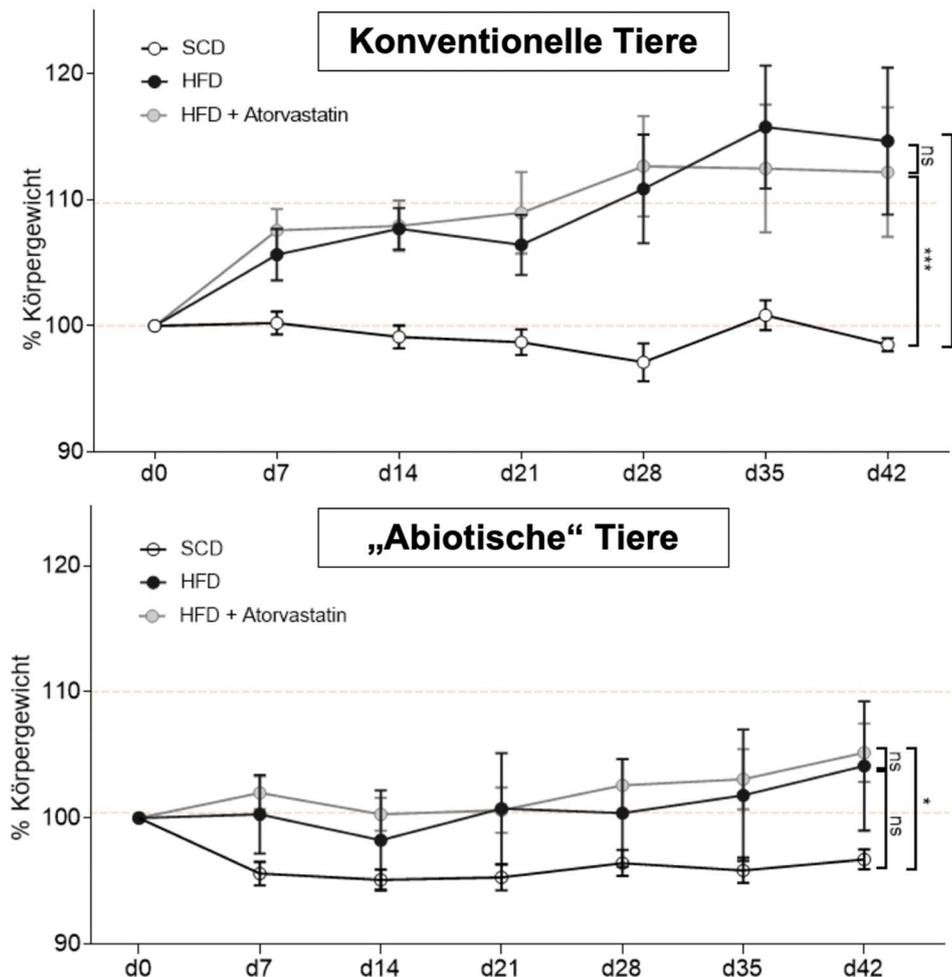
Abiotische Tiere zeigten ein niedrigeres Lebergewicht/Körpergewicht- Verhältnis gegenüber den konventionellen Tieren (CONV SCD vs. AB SCD:  $0,049 \pm 0,005$  vs.  $0,044 \pm 0,002$  g Leber/g Körpergewicht,  $p = 0,02$ ), (CONV HFD vs. AB HFD:  $0,046 \pm 0,002$  vs.  $0,040 \pm 0,0006$  g Leber/g Körpergewicht,  $p < 0,01$ ), (CONV HFD+Ator vs. AB HFD+Ator:  $0,047 \pm 0,005$  vs.  $0,038 \pm 0,0009$  g Leber/g Körpergewicht,  $p = 0,01$ ). Die Therapie mit Atorvastatin hatte in konventionellen Tieren keinen Einfluss auf die Lebergewicht/Körpergewicht-Ratio. In abiotischen Tieren führte die Behandlung mit Atorvastatin zu einem erniedrigten Lebergewicht/Körpergewicht Verhältnis (AB SCD vs. AB HFD+Ator:  $0,044 \pm 0,002$  vs.  $0,038 \pm 0,0009$  g Leber/g Körpergewicht,  $p < 0,01$ ; AB HFD vs. AB HFD+Ator:  $0,040 \pm 0,0006$  vs.  $0,038 \pm 0,0009$  g Leber/g Körpergewicht,  $p < 0,01$ ). HFD allein führte in den abiotischen Tieren zu einem niedrigeren Lebergewicht/Körpergewicht Verhältnis verglichen zur SCD (AB SCD vs. AB HFD:  $0,044 \pm 0,002$  vs.  $0,040 \pm 0,0006$  g Leber/g Körpergewicht,  $p < 0,01$ ).



**Abbildung 20** Ratio g Leber/g Körpergewicht. Lebermasse von konventionellen und sekundär abiotischen Mäusen unter Kontrolldiät (SCD), Hochfettdiät (HFD) oder Hochfettdiät und täglicher Atorvastatin-Gabe (HFD+A).

### 3.2.3.2 Einfluss von Atorvastatin auf das Körpergewicht in konventionellen und sekundär abiotischen Mäusen

In konventionellen und abiotischen Mäusen führte die HFD zu einer signifikanten Zunahme des Körpergewichtes gegenüber den Tieren, die eine SCD erhalten haben (CONV SCD vs. CONV HFD:  $100,3 \pm 1,2$  vs.  $116,1,9 \pm 4,7$  % vom Ausgangsgewicht,  $n = 5$ ,  $p < 0,01$ ; AB SCD vs. AB HFD:  $96,7 \pm 2,5$  vs.  $104,1 \pm 11,5$  % vom Ausgangsgewicht,  $n = 5$ ,  $p = 0,02$ ). Unter Atorvastatinbehandlung waren weder Tiere mit intaktem noch mit Antibiotika eradiziertem Mikrobiom verändert im Gewichtsverhalten gegenüber Tieren mit HFD allein (CONV HFD vs. CONV HFD+Ator:  $116,1,9 \pm 4,7$  vs.  $112,8 \pm 5,2$  % vom Ausgangsgewicht,  $n = 5$ ,  $p = 0,62$ ), (AB HFD vs. AB HFD+Ator:  $104,7 \pm 5,3$  vs.  $105,2 \pm 2,4$  % vom Ausgangsgewicht,  $n = 5$ ,  $p = 0,81$ ).



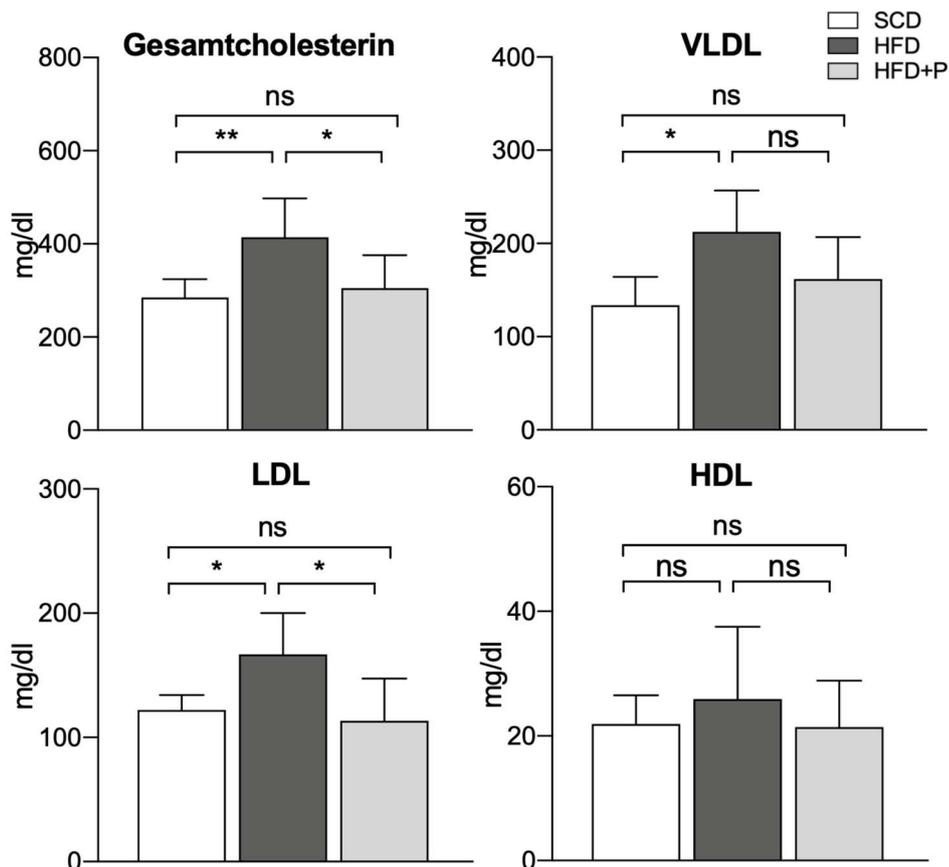
**Abbildung 21** Gewichtsverlauf von C57BL6 Mäusen nach 6 Wochen Behandlung mit Kontrolldiät (SCD), Hochfettdiät (HFD) und HFD und Atorvastatin. d=Tag nach Experimentbeginn. \*= p<0,05; \*\*\*= p <0,001; ns=nicht signifikant

### 3.3 Einfluss des Propionats auf den Cholesterinstoffwechsel

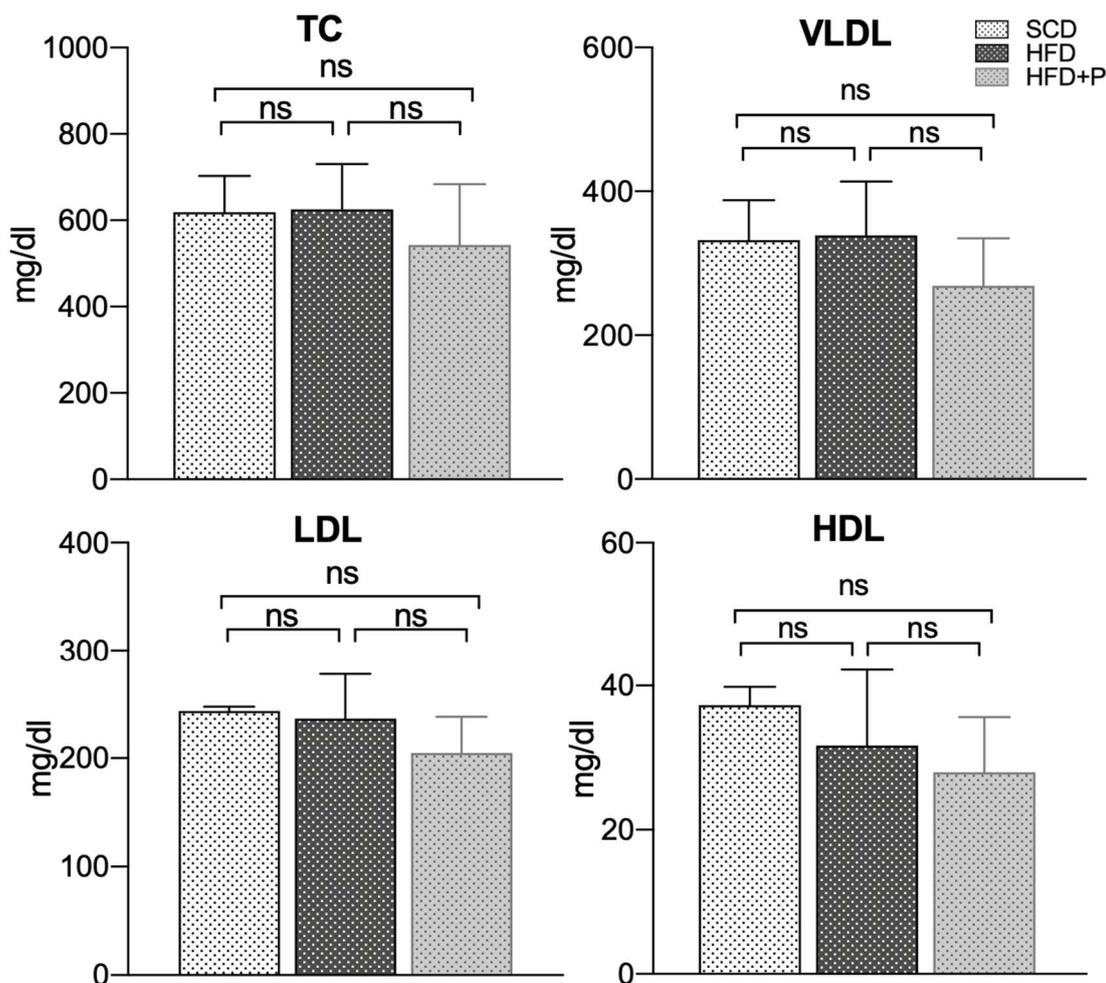
#### 3.3.1 Lipidprofil in konventionellen und abiotischen hyperlipidämischen Mäusen unter oraler Propionatgabe

Wir interessierten uns für einen potentiellen Einfluss einer täglichen Propionat-Behandlung per os in Tieren mit und ohne intaktem Mikrobiom auf das Plasma-LDL sowie weiterer Spiegel von Lipoproteinen und des Gesamtcholesterins. Die Daten wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie in abiotischen und konventionellen ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen nach 6 Wochen SCD oder HFD mit und ohne Propionatgabe bestimmt. In Tieren mit intaktem Mikrobiom wurden unter HFD signifikant erhöhte Gesamtcholesterin-, VLDL- und LDL-Spiegel erhoben (TC: CONV SCD vs. CONV HFD: 285,2 ± 39,28 vs. 414,3 ± 83,18 mg/dl, p < 0,01) (VLDL: CONV SCD vs. CONV HFD: 133,8 ± 30,29 vs. 212,4 ± 44,4 mg/dl, p = 0,01) (LDL: CONV SCD vs. CONV HFD: 122,1

$\pm 11,99$  vs.  $166,9 \pm 33,29$  mg/dl,  $p = 0,04$ ). Unter zusätzlicher oraler Zufuhr von Propionat waren TC- und LDL-Spiegel in diesen konventionellen Mäusen unter HFD signifikant niedriger (TC: CONV HFD vs. CONV HFD+P:  $414,3 \pm 83,18$  vs.  $305,2 \pm 70,22$  mg/dl,  $n = 5-8$ ,  $p = 0,02$ ) (LDL: CONV HFD vs. CONV HFD+P:  $166,9 \pm 33,29$  vs.  $113,3 \pm 34,08$  mg/dl,  $n = 5-8$ ,  $p = 0,01$ ). Weder die Diät noch die Propionatgabe hatten einen Einfluss auf den HDL-Spiegel konventioneller Mäuse (HDL: CONV SCD vs. CONV HFD:  $21,93 \pm 4,6$  vs.  $25,9 \pm 11,6$  mg/dl,  $n = 5-7$ ,  $p = 0,67$ ; CONV HFD vs. CONV HFD+P:  $25,9 \pm 11,6$  vs.  $21,4 \pm 7,4$  mg/dl,  $n = 5-8$ ,  $p = 0,59$ ). In abiotischen Tieren ohne Mikrobiom war unter HFD und Propionatzufuhr kein Unterschied in den Lipoproteinspiegeln nachweisbar (TC: CONV HFD vs. CONV HFD+P:  $625,1 \pm 105,8$  vs.  $542,6 \pm 140,8$  mg/dl,  $n = 7$ ,  $p = 0,41$ ) (VLDL: CONV HFD vs. CONV HFD+P:  $338,9 \pm 74,8$  vs.  $268,6 \pm 66,3$  mg/dl,  $n = 7$ ,  $p = 0,16$ ) (LDL: CONV HFD vs. CONV HFD+P:  $236,5 \pm 41,2$  vs.  $230,8 \pm 75,1$  mg/dl,  $n = 7$ ,  $p = 0,27$ ) (HDL: CONV HFD vs. CONV HFD+P:  $31,7 \pm 10,5$  vs.  $27,9 \pm 7,6$  mg/dl,  $n = 7$ ,  $p = 0,69$ ).



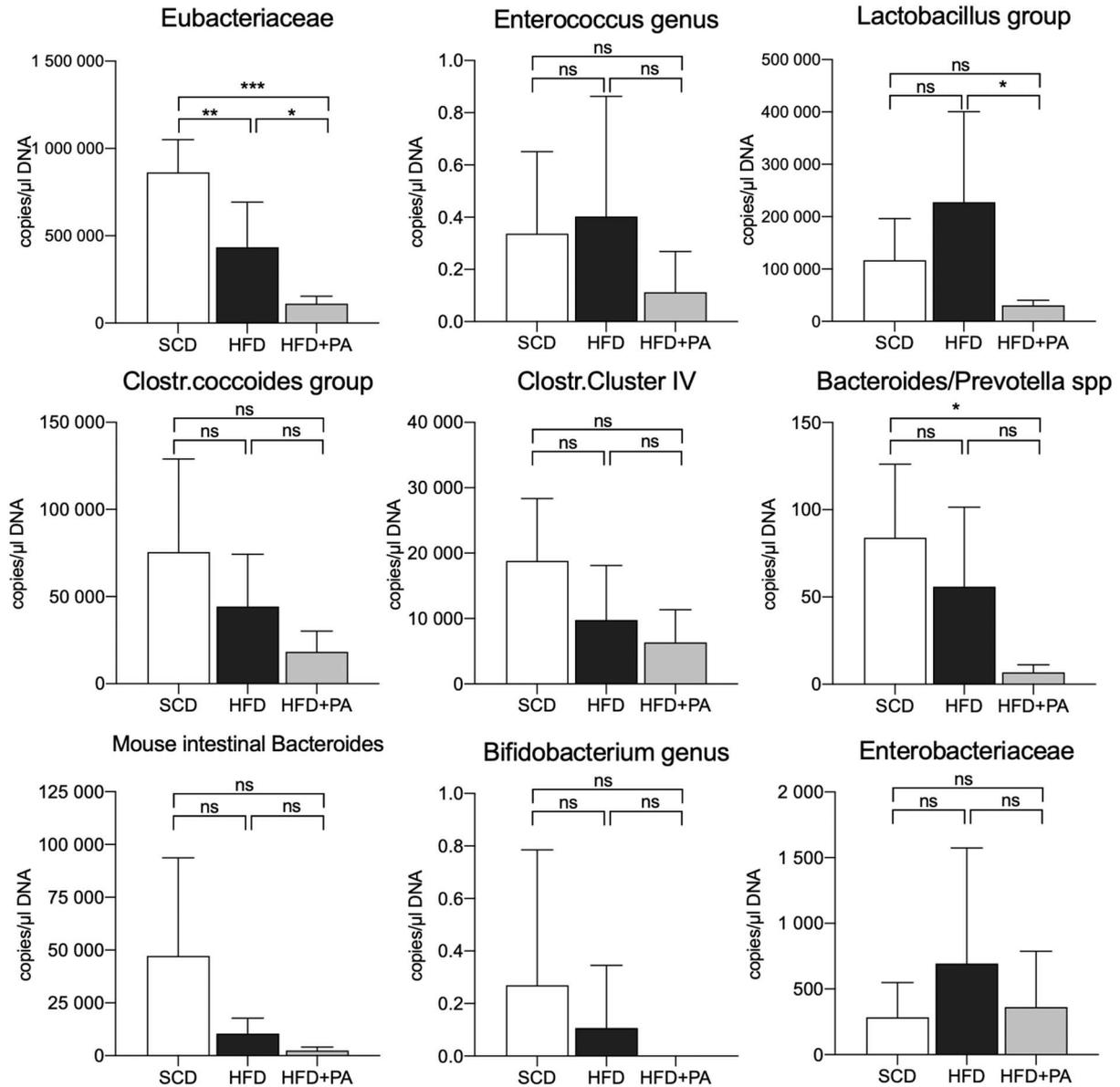
**Abbildung 22** Gesamtcholesterin, VLDL, LDL und HDL im Plasma von ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen mit intaktem Mikrobiom nach 6 Wochen Standarddiät (SCD), Hochfettdiät (HFD) und HFD mit Propionatgabe per os (+P).  $n=5-8$ , \* =  $p<0,05$ , \*\* =  $p<0,01$ .



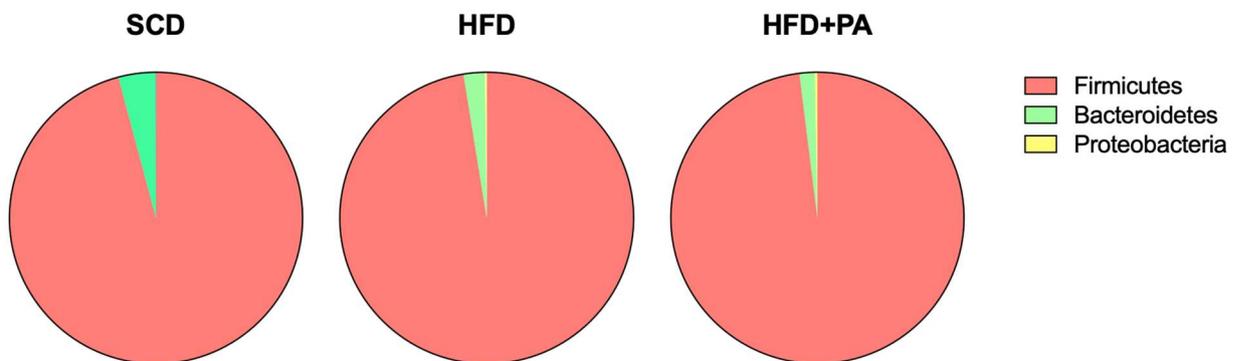
**Abbildung 23** Gesamtcholesterin, VLDL, LDL und HDL im Plasma von ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen mit eradiziertem Mikrobiom nach 6 Wochen Standarddiät (SCD), Hochfett-diät (HFD) und HFD mit Propionatgabe per os (+P). n=4-7

### 3.3.2 Veränderung des Darmmikrobioms unter oraler Propionatzufuhr

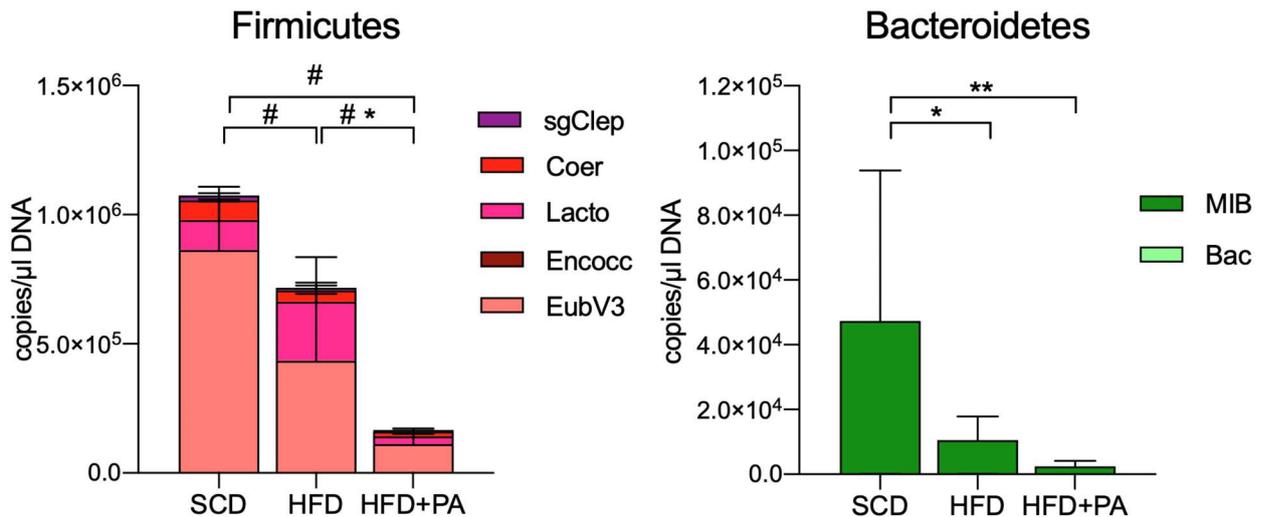
Als möglichen Modulator für die beobachteten Veränderungen der Cholesterinspiegel interessierten wir uns für den möglichen Einfluss der oralen Zufuhr von Propionat auf die Zusammensetzung des Darmmikrobioms auf Ebene der Bakterienfamilien und -gruppen. Es zeigte sich ein signifikant geringeres Vorkommen von *Eubacteriaceae* in Mäusen, die zusätzlich zur HFD per os mit Propionat behandelt wurden (CONV HFD vs. CONV HFD+P:  $434800 \pm 257721$  vs.  $111500 \pm 43402$  Kopien/ $\mu$ l DNA, n = 5, p = 0,04). Weiterhin war *Lactobacillus group* in HFD gefütterten Tieren unter Propionatgabe signifikant reduziert präsent im Darmmikrobiom (CONV HFD vs. CONV HFD+P:  $227820 \pm 172750$  vs.  $30440 \pm 9823$  Kopien/ $\mu$ l DNA, n = 5, p = 0,04). Auf Ebene der Phyla zeigte sich eine relative Zunahme der Ratio *Firmicutes* : *Bacteroidetes* unter Propionatzufuhr (HFD vs. HFD+P: 41 : 1 vs. 58 : 1).



**Abbildung 24** 16S rRNA Analyse des Darmmikrobioms nach 6 Wochen Standarddiät (SCD), Hochfettdiät (HFD) und HFD mit Propionsäure (PA) behandelten Mäusen. n=3-5, \*= p<0,05



**Abbildung 25** Relativer Anteil der Phyla in %. Zu Firmicutes zählen *Eubacteriaceae*, *Enterococcus genus*, *Lactobacillus*, *Clostridium coccoides* und *Clostridium Cluster IV*. Zu *Bacteroidetes* zählen *Bacteroides* und *Proteobakterien* werden durch *Enterobacteriaceae* repräsentiert.



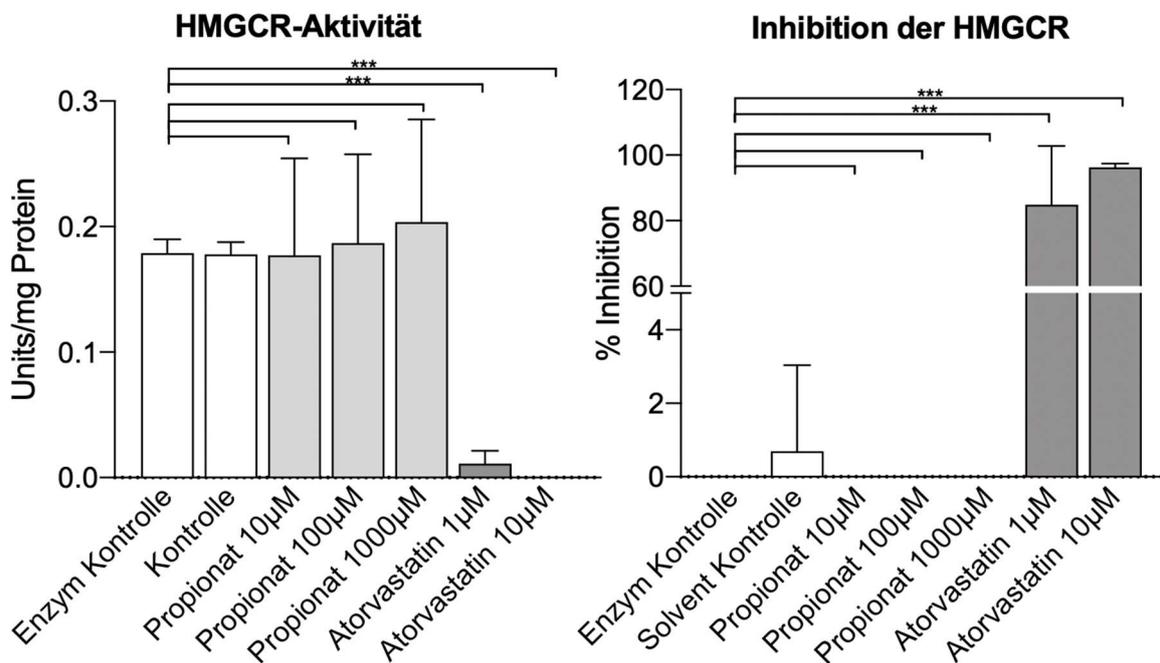
**Abbildung 26** Zusammensetzung des Darmmikrobioms. 7a: *Firmicutes*: EubV3 = *Eubacteriaceae*, Encocc = *Enterococcus* genus, Lacto = *Lactobacillus* Gruppe, Coer = *Clostridium coccoides*, sgClep = *Clostridium* Cluster IV. # vergleicht EubV3,  $p < 0,0001$ . \* vergleicht Lacto,  $p < 0,01$ . 7b: *Bacteroidetes*: MIB = *Mouse Intestinal Bacteroides*, Bac = *Bacteroides/Prevotella* spp. \* vergleichen MIB,  $*p < 0,05$ ,  $** p < 0,01$ .

### 3.3.3 Potentielle Molekularmechanismen der Propionat-assoziierten Regulation des hepatischen Cholesterinmetabolismus

#### 3.3.3.1 Regulation der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase-Aktivität

Zur Untersuchung eines möglichen direkten Effektes von Propionat auf das hepatische Schlüsselenzym der Cholesterin-de-novo-Synthese HMGR wurde ein Aktivitätsassay verwendet. Hier zeigte die Hinzugabe von Propionat in keiner Konzentration einen signifikanten Einfluss auf die HMGR-Aktivität gegenüber der Kontrollgruppe (Propionat 10  $\mu$ M vs. Enzyme Control:  $0,18 \pm 0,04$  vs.  $0,18 \pm 0,01$  Units/mg Protein,  $n = 4$ ,  $p = 0,97$ ), (Propionat 100  $\mu$ M vs. Enzyme Control:  $0,19 \pm 0,04$  vs.  $0,18 \pm 0,01$  Units/mg Protein,  $n = 4$ ,  $p = 0,85$ ), (Propionat 1000  $\mu$ M vs. Enzyme Control:  $0,20 \pm 0,04$  vs.  $0,18 \pm 0,01$  Units/mg Protein,  $n = 4$ ,  $p = 0,57$ ). Entsprechend stellte sich die Inhibition der HMGR-Aktivität nicht signifikant verändert unter Propionatgabe gegenüber der Kontrolle dar. Das Hinzufügen von Atorvastatin als Positivkontrolle senkte die Aktivität des Enzyms signifikant auf 0 – 0,2 Unit/mg Protein (Atorvastatin 1  $\mu$ M vs. Enzyme Control:  $0,01 \pm 0,01$  vs.  $0,18 \pm 0,01$  Units/mg Protein,  $n = 4$ ,  $p < 0,01$ ), (Atorvastatin 10  $\mu$ M vs. Enzyme Control:  $< 0,0 \pm 0,02$  vs.  $0,18 \pm 0,01$  Units/mg Protein,  $n = 4$ ,  $p < 0,01$ ). Umgerechnet zeigte Atorvastatin eine 100%ige Inhibition der HMGR gegenüber der Kontrollgruppe (Atorvastatin 1  $\mu$ M vs. Enzyme Control:  $84,83 \pm 8,96$  vs. 0 Prozent Inhibition,  $n = 4$ ,  $p <$

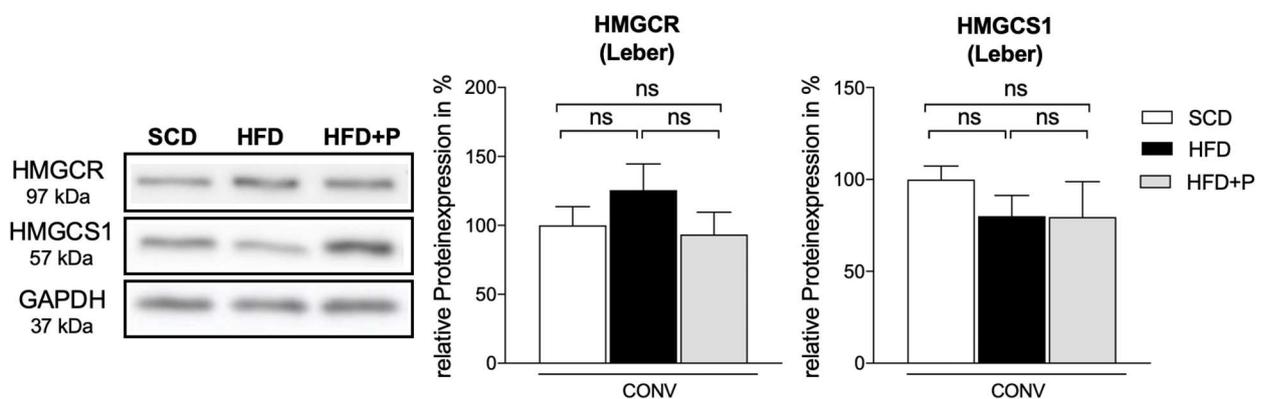
0,01), (Atorvastatin 10 $\mu$ M vs. Enzyme Control: 96,23  $\pm$  0,57 vs. 0  $\pm$  0,0 Prozent Inhibition, n = 4, p < 0,01).



**Abbildung 27** Direkter Einfluss von Propionat und Atorvastatin auf die Enzymaktivität von HMGR. Darstellung als Aktivität und Inhibition.

### 3.3.3.2 Regulation von HMGR und HMGS1 durch Propionat in vivo

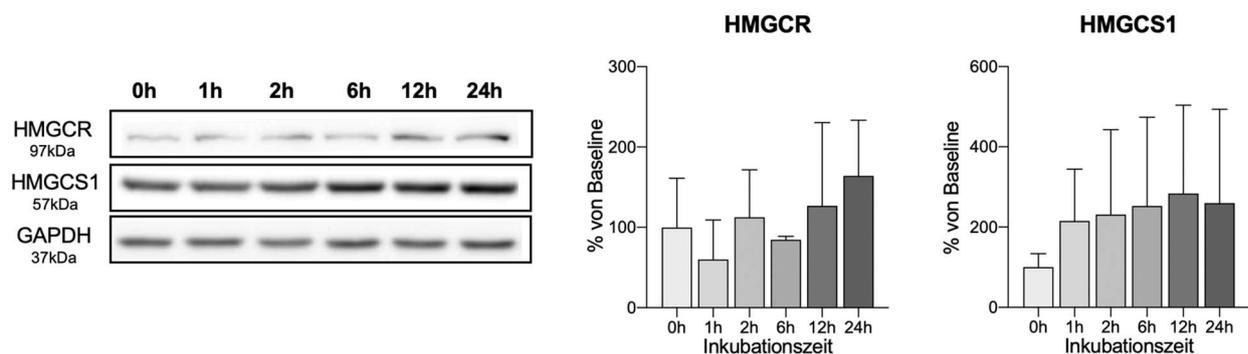
Im Lebergewebe wurde die Proteinexpression von HMGR und HMGS1 mittels Western Blot bestimmt. Es konnte kein Unterschied in der semiquantitativen Proteinexpression unter HFD oder unter oraler Propionat-Zufuhr nachgewiesen werden.



**Abbildung 28** Proteinexpression von HMGR und HMGS1 in der Leber von ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen unter Kontrolldiät (SCD), Hochfettdiät (HFD) und Hochfettdiät und täglicher Propionat-Gavage (HFD+P). Links: Exemplarischer Western Blot. Rechts: Kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen der regulierenden Enzyme.

### 3.3.3.3 In-vitro Regulation von HMGCR und HMGCS1 durch Propionat

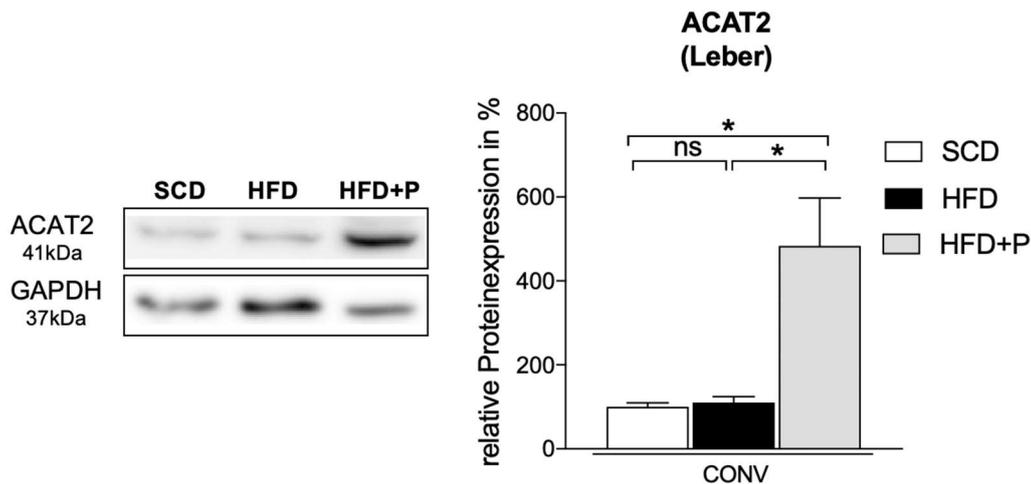
Durch Zugabe von Propionat ins Zellmedium zur hepatischen, HMGCR- und HMGCS1 exprimierenden Zelllinie HepG2 wurde ein potentieller direkter Einfluss auf die Proteinexpression der Cholesterinmetabolismus regulierenden Enzyme HMGCR und HMGCS1 untersucht. Hierfür wurde in Abhängigkeit der Zeit von 0 bis 24 Stunden eine Konzentration von 0,5mM Calciumpropionat verwandt. Die semiquantitative Analyse ergab keinen Hinweis auf signifikante Veränderungen und somit auf keine direkte, regulierenden Rolle (n = 2).



**Abbildung 29** Proteinexpression von HMGCS1 und HMGCR in mit Calciumpropionat stimulierten HepG2-Zellen Links: Western Blot. Rechts: Unter Propionat zeigt sich kein signifikanter Anstieg der zellulären HMGCR und HMGCS1 -Expression gegenüber den Kontrollen.

### 3.3.3.4 Regulation der Acetyl-CoA-Acetyltransferase 2 durch Propionat

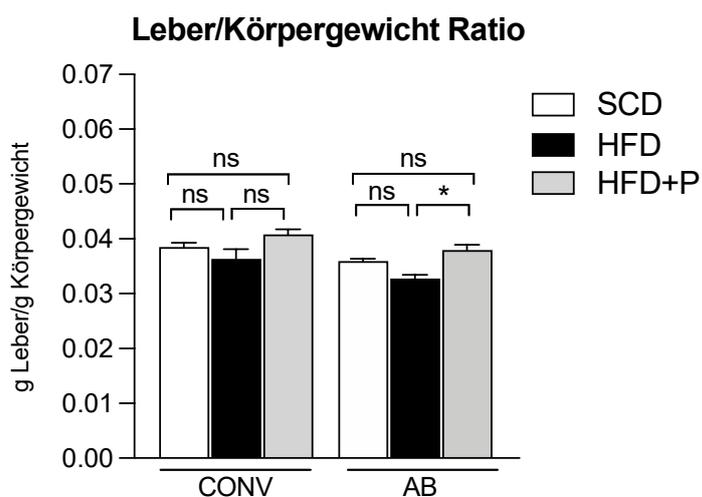
Die hepatische Proteinexpression der Acetyl-CoA-Acetyltransferase 2 (ACAT2) wurde nicht signifikant durch HFD beeinflusst (SCD vs. HFD:  $100,0 \pm 21,06$  vs.  $110,1 \pm 32,49$  % relative Proteinexpression, n = 5, p = 0,58). In konventionellen Mäusen, die mit HFD und Propionat behandelt wurden, ergab die semiquantitative Analyse eine signifikant höhere ACAT2-Expression als bei Tieren mit HFD ohne Propionatbehandlung (HFD vs. HFD+P:  $110,1 \pm 32,49$  vs.  $483,6 \pm 255,1$  % relative Proteinexpression, n = 5, p = 0,01).



**Abbildung 30** Hepatische Proteinexpression von ACAT2 in Wildtyp-Mäusen unter Kontrolldiät (SCD), Hochfett-diät (HFD) oder Hochfett-diät und täglicher Propionat-Gavage (HFD+PA). Links: Exemplarische Western Blot Analysen. Rechts: Unter Propionat zeigt sich ein signifikanter Anstieg der semiquantitativen hepatischen ACAT2-Expression gegenüber den Nicht-Propionat behandelten Gruppen. Hochfett-diät hat keinen signifikanten Einfluss auf die ACAT2-Expression.

### 3.3.3.5 Einfluss von oraler Propionatzufuhr auf das Lebergewicht in konventionellen und sekundär abiotischen Mäusen

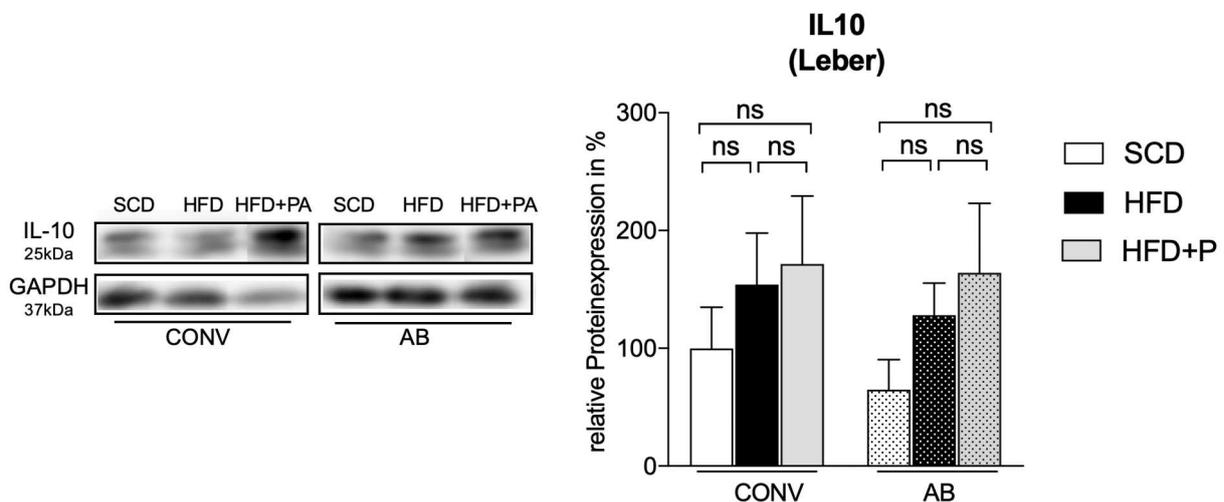
Die Diät und die Zufuhr von Propionat hatten in konventionellen Tieren keinen Einfluss auf die Ratio von Lebergewicht zu Körpergewicht. In abiotischen und mit HFD gefütterten Mäusen führte die orale Propionatgabe zu einem erhöhten Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht (AB HFD vs. AB HFD+P:  $0,033 \pm 0,002$  vs.  $0,038 \pm 0,002$  g Leber/g Körpergewicht,  $n = 4-5$ ,  $p = 0,02$ ).



**Abbildung 31** Ratio g Leber/g Körpergewicht. Lebermasse von konventionellen und sekundär abiotischen Mäusen unter Kontrolldiät (SCD), Hochfett-diät (HFD) oder Hochfett-diät und täglicher Propionat-Gabe (HFD+P). \* =  $p < 0,05$

### 3.3.4 Einfluss immunregulatorischer Mechanismen von Propionat auf den Cholesterinstoffwechsel

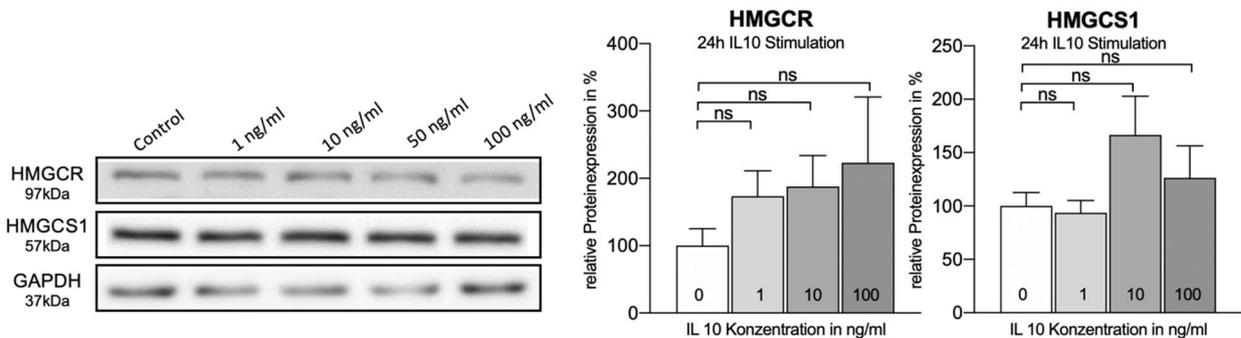
Es verdichtet sich die Evidenz, dass das Propionat einen modulatorischen Effekt auf die intestinale T-Zell-Immunantwort ausübt [55]. Wir haben die Beobachtung gemacht, dass eine HFD eine Verminderung der Anzahl von Tregs im Darm hervorruft [56], wogegen die Behandlung mit Propionat die Treg-Population wieder anhebt. Damit einhergehend beobachteten wir einen Anstieg des IL10 im Darm, was insbesondere von Tregs freigesetzt wird. Im Rahmen dieser Arbeit interessierten wir uns, ob nach einer Propionatbehandlung ebenfalls die hepatische Expression von IL10 verändert wird. Die IL10 Expression in der Leber wurde weder durch eine HFD noch durch die Propionatzugabe signifikant verändert (CONV SCD vs. CONV HFD:  $100,0 \pm 78,0$  vs.  $154,2 \pm 97,8$  % relative Proteinexpression,  $n = 5$ ,  $p = 0,36$ ; CONV HFD vs. CONV HFD+P:  $154,2 \pm 97,8$  vs.  $171,7 \pm 129,3$  % relative Proteinexpression,  $n = 5$ ,  $p = 0,82$ ). Es gab keinen Unterschied zwischen konventionellen und abiotischen Tieren (CONV SCD vs. AB SCD:  $100,0 \pm 78,0$  vs.  $64,9 \pm 51,0$  % relative Proteinexpression,  $n = 4-5$ ,  $p = 0,47$ ; CONV HFD vs. AB HFD:  $154,2 \pm 97,8$  vs.  $128,2 \pm 61,1$  % relative Proteinexpression,  $n = 5$ ,  $p = 0,63$ ; CONV HFD+P vs. AB HFD+P:  $171,7 \pm 129,3$  vs.  $164,1 \pm 132,0$  % relative Proteinexpression,  $n = 5$ ,  $p = 0,93$ ).



**Abbildung 32** Hepatische IL10 Proteinexpression in Mäusen mit und ohne Antibiotikabehandlung und nach 6 Wochen Kontrolldiät (SCD), Hochfettdiät (HFD) und Hochfettdiät+Propionat (HFD+P). IL10-Proteinexpression war nicht signifikant verändert.  $n = 4-5$ .

Eine mögliche Regulation der Proteinexpression der in der Cholesterin-de-novo-Synthese beteiligten Enzyme HMGCR und HMGCS1 durch IL10 wurde in vitro an HEP2

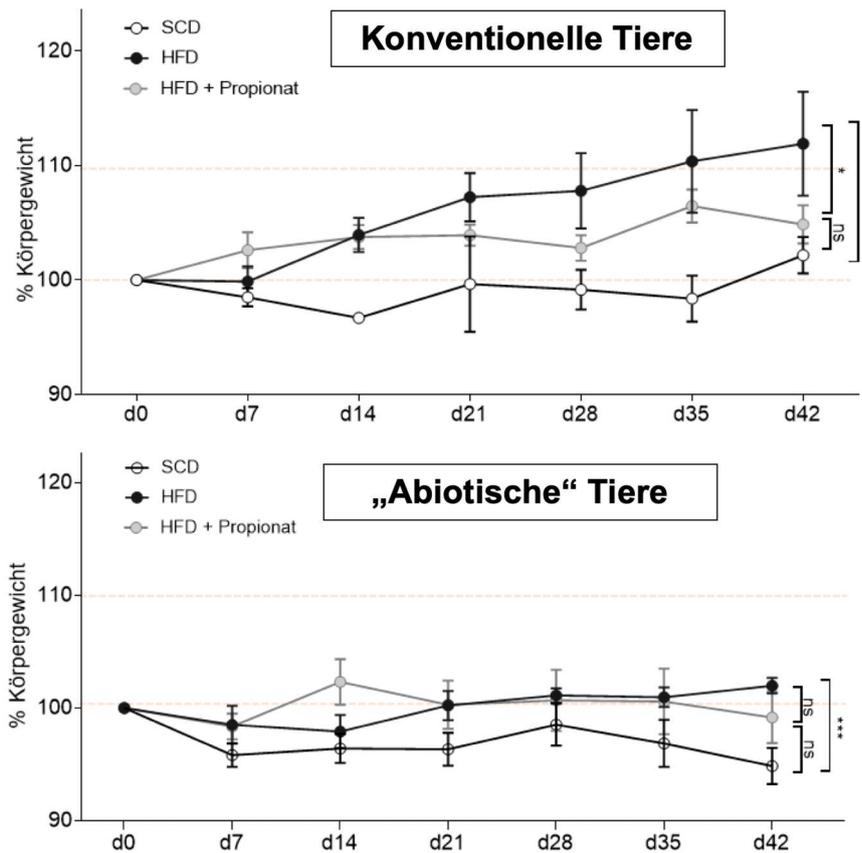
Zellen untersucht. HEPG2 Zellen wurden über 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von IL10 inkubiert. Die folgende semiquantitative Analyse der Proteinexpression ergab jedoch keine signifikante Änderung der Proteinexpression, verglichen zum Zeitpunkt 0.



**Abbildung 33** Proteinexpression von HMGCR und HMGCS1 in HEPG2-Zellen nach 24h Inkubation mit IL10 in verschiedenen Konzentrationen. Links: Exemplarischer Western Blot, 20 $\mu$ g Protein. Rechts: Semiquantitative Analyse der Proteinexpression von HMGCR und HMGCS1, n = 4.

### 3.3.5 Auswirkung von Propionat auf das Körpergewicht

Um eine Aussage über mögliche weitere kardiometabolische Effekte der oralen Propionatapplikation zu treffen bestimmten wir das Körpergewicht in konventionellen und sekundär abiotischen Tieren unter SCD, HFD und HFD und zusätzlicher Propionatgabe. Dabei wurde beobachtet, dass das Propionat in konventionell gezüchteten C57BL6 Mäusen nach 6 Wochen eine HFD induzierte Gewichtszunahme verhinderte (CONV HFD vs. CONV HFD+P:  $111,9 \pm 10,1$  vs.  $104,9 \pm 3,8$  % des Ausgangskörpergewichtes, n = 5, p = 0,03). Bei den entsprechenden Gruppen mit eradiziertem Mikrobiom gab es keinen signifikanten Einfluss von Propionat (AB HFD vs. AB HFD+P:  $102,0 \pm 1,5$  vs.  $99,15 \pm 5,0$  % des Ausgangskörpergewichtes, n = 5, p = 0,20).



**Abbildung 34** Gewichtsverlauf von C57BL6 Mäusen nach 6 Wochen Behandlung mit Kontrolldiät (SCD), Hochfettdiät (HFD) und HFD und Propionat (HFD+P). n = 5. d = Tag nach Experimentbeginn. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; ns = nicht signifikant.

## 4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des Darmmikrobioms für den Cholesterinstoffwechsel zu verdeutlichen. Die Metaboliten, die durch das Darmmikrobiom generiert werden sind wichtiger Bestandteil der Wirtphysiologie und -metabolismus [30]. Dazu gehören SCFA, die im Darm durch das Mikrobiom aus komplexen Kohlenhydraten generiert werden. Für SCFA sind gesundheitsfördernde Eigenschaften wie die Senkung von Blutdruck und die Modulation von inflammatorischen Prozessen beschrieben. Menschen mit metabolischen und entzündlichen Erkrankungen haben weniger SCFA-produzierende Bakterien im Darm [57]. Zudem wurde in epidemiologische Studien ein präventiver Effekt von ballaststoffreicher Ernährung für Dyslipidämien und die Entwicklung von Atherosklerose nachgewiesen. Ballaststoffe werden als Ausgangsprodukt durch das Darmmikrobiom zu SCFA fermentiert. Dies hat sogar Einzug in die europäischen Versorgungsleitlinien mit einer Grad B Empfehlung für eine ballaststoffreiche Ernährung gehalten [58]. Wir konnten mit dieser Arbeit einen

regulatorischen Einfluss der kurzkettigen Fettsäure Propionat auf die Cholesterin-Homöostase im Mausmodell nachweisen.

SCFA haben atheroprotektive Eigenschaften. In einer experimentellen Arbeit mit hyperlipidämischen und synthetisch kolonisierten Apo-E KO Mäusen untersuchten Kasahar et al. den Einfluss des Butyrat-produzierenden Bakterien-Genus *Roseburia* auf die Entwicklung atherosklerotischer Plaques [59]. Tiere die zusätzlich mit *Roseburia* kolonisiert waren hatten einen höheren Anteil von Butyrat im Zäkum und exprimierten durchschnittlich 30% kleinere Atheroskleroseareale im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Dieser Effekt war hier unabhängig von den Cholesterin-Plasmawerten. Bartolomaeus et al. zeigten vasoprotektive Effekte im Mausmodell der Angiotensin II induzierten hypertensiven kardiovaskulären Schädigung von oral appliziertem Propionat. Eine weitere vasoprotektive Auswirkung von Propionat wurde in Mäusen durch Blutdrucksenkung beschrieben [42]. Pluznick et al. applizierten in Wildtyp-Mäusen intravenöses Propionat, welches eine akute blutdrucksenkende Antwort hervorrief, die zudem dosisabhängig war [60]. Endotheliale G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die Propionat als Ligand bindet, vermitteln über eine Dilatation der Gefäße die blutdrucksenkende Wirkung. In diesen genannten Studien wurden die kardioprotektiven Effekte unabhängig vom Lipidmetabolismus aufgezeigt, während sich diese Arbeit auf die lipidmodellierenden Eigenschaften der Wirkung von Propionat konzentriert.

Wir konnten mit dieser Arbeit einen cholesterinsenkenden Effekt von oral appliziertem Propionat in hyperlipidämischen, mit HFD gefütterten und intaktem Darmmikrobiom besiedelten Mäusen nachweisen. Unter der oralen Propionatzufuhr waren TC- und LDL-Spiegel signifikant reduziert gegenüber den HFD allein behandelten Tieren und vergleichbar mit dem Level der SCD gefütterten Tiere. Somit war die diätinduzierte Hypercholesterinämie durch die Gabe von Propionat reversibel. Diesen protektiven Effekt konnten wir in Mäusen ohne intaktem Mikrobiom nicht replizieren. Somit lässt sich anhand der erhobenen LDL Daten vermuten, dass Propionat nicht direkt in den Wirtsmetabolismus interveniert, sondern möglicherweise über Veränderungen des Darmmikrobioms und seiner Metaboliten protektiv auf die Entwicklung der Hypercholesterinämie wirkt. Hierfür untersuchten wir die Zusammensetzung des Darmmikrobioms in den mit Propionat behandelten Mäusen über 16S rRNA Analysen der Fäzes. Unter oraler Propionatzufuhr sahen wir auf Phylum-Ebene eine relative Zunahme

der Ratio zwischen *Firmicutes* : *Bacteroidetes*. Dabei waren *Eubacteriaceae* und *Lactobacillus* group als Mitglieder des *Firmicutes*-Phylums unter Propionattherapie signifikant reduziert im relativen Vorkommen. Interessanterweise sind für *Lactobacillus* cholesterinsenkende Eigenschaften beschrieben über die metabolische Aktivität der intestinalen Mikroflora. Außerdem gehören einige Spezies des *Lactobacillus* Genus wie *L. gasseri* oder *L. acidophilus* zu Bildnern von der SCFA Propionat. Über die mögliche Bedeutung von *Eubacteriaceae* für den Cholesterinstoffwechsel und kardiometabolische Erkrankungen ist bisher nichts in der Literatur beschrieben. Weitere für Propionatproduktion bekannte Bakterien wie *Bacteroides spp.* waren nicht signifikant verändert. Bisherige Studien zeigten einen inhibitorischen Einfluss von Propionat auf das Wachstum zellulärer Pathogene wie gram-positiver oder gram-negativer Bakterien und Pilze. Es bedarf weiterführende Analysen des Mikrobioms, sowohl in anderen Darmabschnitten als auch in humanen Proben und weitere funktionelle Untersuchungen um den möglichen Einfluss der Zusammensetzung des Darmmikrobioms auf den Cholesterinstoffwechsel zu bestimmen.

In einer kürzlich publizierten Arbeit zeigte unsere Arbeitsgruppe, dass nicht nur die Cholesterinwerte erniedrigt waren, sondern damit einhergehend auch das Ausmaß der atherosklerotischen Plaques auf Höhe der Aortenwurzel [56]. Diese präklinischen Beobachtungen der cholesterinsenkenden Eigenschaften von Propionat konnten in einer über diese Beobachtungen entwickelten klinischen Studie repliziert werden. Hierfür wurde eine randomisierte, doppelblinde und Placebo-kontrollierte Humanstudie mit 62 Proband:innen mit erhöhtem Baseline LDL durchgeführt. Die Proband:innen erhielten täglich 1000mg Propionat per os über insgesamt 8 Wochen. Hierbei zeigten sich am Ende der 8 Wochen signifikant reduzierte TC- und LDL-Plasmalevel. Veränderungen im Körpergewicht der Proband:innen waren zwischen den beiden Behandlungsgruppen nicht signifikant. Propionat-assoziierte schwere Nebenwirkungen während der Studienzeit traten nicht auf. Langfristige Folgen einer chronischen Propionatbehandlung müssen allerdings noch untersucht werden.

Als potentiell zugrunde liegende Wirkmechanismen der cholesterinsenkenden Effekte von Propionat konnte unsere Arbeitsgruppe auf mRNA-Ebene und mittels Histologie eine signifikante Herunterregulation des intestinalen Cholesterintransportproteins NPC1L1 zeigen mit konsekutiver Abnahme der Cholesterinabsorption. Funktionell wurde in den

Mäusen zudem eine erhöhte Cholesterinausscheidung über Fäzes unter der oralen Propionattherapie festgestellt. Interessanterweise konnte durch eine andere Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass der Steroltransporter NPC1L1 einer möglichen Beeinflussung durch das Darmmikrobiom unterliegt. So beschrieben Pathal et al. eine Beeinflussung der NPC1L1 Expression durch die orale Zugabe von Cholin, welches im Darm durch das Mikrobiom zu Trimethylamin (TMA) verstoffwechselt wird [61]. Durch den Inhibitor der bakteriellen Trimethylamin Lyase Iodomethylcholin (IMC) konnte die Bildung von Trimethylamin gehemmt werden und nachfolgend die jejunale mRNA Expression von NPC1L1 signifikant reduziert werden. Die im Cholesterinmetabolismus involvierten, jejunalen Gene *Abcg5*, *Abcg8* und *Abca1* blieben unbeeinflusst. Die IMC-induzierte Suppression von NPC1L1 konnte ebenfalls auf Proteinebene via Western Blot im Jejunum nachgewiesen werden. Einen genauen Mechanismus, wie die reduzierte Konzentration von TMA zu einer Suppression der NPC1L1 Expression führt konnten sie nicht darstellen, diskutierten jedoch einen unabhängigen Weg über den Leber X Rezeptor alpha (LXR $\alpha$ ), da die hierüber regulierten Gene *Abca1*, *Abcg5* und *Abcg8* unbeeinflusst blieben. Eine Reorganisation der Mikrobiomstruktur wurde ebenfalls beobachtet und als möglicher modulierender Faktor für die NPC1L1 Expression diskutiert.

In der Leber, als Ort der Cholesterin-de-novo-Synthese konnten wir in Propionat-behandelten Mäusen mittels semiquantitativer Proteinanalyse keinen signifikanten Einfluss auf die Schlüsselproteine HMGCR und HMGCS1 zeigen. Diese Beobachtungen gehen mit den mRNA-Ergebnissen von Haghikia et al. einher. Weiterhin konnte ich mittels HMGCR-Aktivitätsassay keine direkte Auswirkung von Propionat auf die Enzymaktivität beobachten. Zudem sah ich keinen direkten Einfluss von Propionat auf die semiquantitative Expression der Cholesterin-synthetisierenden Enzyme HMGCR und HMGCS1 in der Leberzelllinie HEPG2. Der LDL-senkende Effekt von Propionat kann mit unseren Daten somit weder über eine direkte noch über eine indirekte Enzyminhibition in der Cholesterin-de-novo Synthese erklärt werden. In Mäusen ergab die semiquantitative Analyse der hepatischen Proteinexpression von ACAT2 eine signifikant höhere ACAT2-Expression unter Propionatzufuhr. Brown et al. zeigten im Mausmodell, in welchem das ACAT2 - Gen ausgeschaltet war, eine reduzierte intestinale Cholesterinabsorption und ein Fehlen der hepatischen Veresterung von Cholesterin [62]. Tiere ohne ACAT2 waren geschützt vor Atherosklerose. Weiterhin sahen sie eine vollständige Abwesenheit von hepatischer Ablagerung von ApoB-haltigen Lipoproteinen in ACAT2-defizienten Mäusen.

Sie stufen konsekutiv ACAT2 als einziges Cholesterol-veresterndes Enzym in der murinen Leber und als essenziellen Regulator des hepatischen Cholesterinmetabolismus ein.

Aufgrund der bisher bekannten Interaktionen des Darmmikrobioms und seiner Metaboliten mit dem Immunsystem sowie der Bedeutung für kardiovaskuläre und -metabolische Erkrankungen interessierten wir uns zudem für den Einfluss von Propionat auf die immunonologische Regulation des Cholesterinstoffwechsels. Bereits Bartohlmäus et al. erklärten die kardioprotektiven Effekte von oral appliziertem Propionat in ihrem Modell der Angiotensin II induzierten hypertensiven kardiovaskulären Schädigung durch eine modulierende Wirkung auf die systemische und kardiale Inflammation [42]. Insbesondere zeigten sie eine reduzierte Anzahl von T-Helfer und T-Gedächtniszellen. Außerdem beschrieben sie im Myokard der mit Angiotensin II behandelten Mäuse eine durch orale Propionatzufuhr induzierte Protektion vor lokaler proinflammatorischer Immunzellinfiltration. Ihre These, dass die Wirkung des Propionats immunvermittelt und T-Zell-abhängig sei, stützten sie durch Experimente an einem T-Zell-depletierten Mausmodell durch Applikation eines CD25 Antikörpers. Dadurch waren die Effekte von Propionat hinsichtlich der Kardioprotektion deutlich abgeschwächt.

Tregs sind eine Untergruppe CD4<sup>+</sup>T-Zellen und spezifisch über den Transkriptionsfaktor „forkhead box protein 3“ (Foxp3) charakterisiert. Sie können inflammatorische Prozesse über multiple Mechanismen supprimieren. Autoimmune Erkrankungen mit einer Dysbalance der Treg-Aktivität können durch Propionat positiv beeinflusst werden. Duscha et al. konnten bspw. in therapienaiven Patient:innen mit Multiple Sklerose mittels oral supplementiertem Propionat einen signifikanten Anstieg von Tregs beobachten [43]. Klinisch wurden reduzierte Schubraten, Stabilisierung der Erkrankung und eine reduzierte Hirnatrophie nach 3 Jahren von Propionateinnahme beobachtet. Einen atheroprotektiven Effekt üben Tregs über die Sekretion von IL10 und TGFβ aus, wodurch die Proliferation proinflammatorischer Effektor-T-Zellen unterdrückt wird. Die artifizielle Depletion von Tregs führt bspw. zu einer verstärkten Atherosklerose in Hyperlipidämie-Mäusen. Wir untersuchten einen potentiellen Zusammenhang zwischen IL10 als eines der Hauptzytokine von Treg Zellen und dem Cholesterinmetabolismus. Um einen möglichen modulierenden Effekt des Mikrobioms auf die hepatische Treg-Homöostase zu evaluieren, wurde die IL10 Expression in der Leber zwischen konventionellen und

abiotischen Tieren miteinander verglichen. Die hepatische IL10-Expression ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Auch die orale Gabe von mit Propionat behandelten Tieren blieb ohne Einfluss auf die IL10 Expression in der Leber. Im in vitro Versuch mit der hepatischen Zelllinie HEPG2, die HMGCR und HMGCS1 exprimiert, blieb die Stimulation mit IL10 über 24 Stunden ohne signifikante Veränderung der Proteinexpression. Mit den Ergebnissen dieser Arbeit ließ sich kein IL10-abhängiger Einfluss des hepatischen Cholesterinmetabolismus nachweisen. Haghikia et al. konnten im gleichen Mausmodell jedoch einen Propionat-abhängigen Einfluss der intestinalen und systemischen Treg-Population sowie einen Anstieg der intestinalen IL10-Konzentration nachweisen. Unter oraler Propionatzufuhr zeigten HFD gefütterte ApoE KO Mäuse einen erhöhten Anteil an Tregs in mesenterialen Lymphknoten und im Blut im Gegensatz zur Kontrollgruppe, die nur mit HFD gefüttert wurde [56]. Begleitend wurden hier erhöhte Konzentrationen von IL10 im Plasma erhoben. T-Helfer 1 (Th1) oder T-Helfer 17 Zellen (Th17) waren nicht signifikant beeinflusst. In intestinalen Organoiden zeigte sich einhergehend unter Hinzugabe von IL10 eine inverse, dosisabhängige Expression von NPC1L1 auf mRNA-Ebene. Weiterführend sahen sie im Mausmodell eine folglich supprimierte NPC1L1 Expression. Umgekehrt führte die systemische, durch Antikörperapplikation herbeigeführte Blockade von IL10 Rezeptoren zu einer abgeschwächten Wirkung des oral zugeführten Propionats mit höheren TC- und LDL-Plasmawerten und größerer Atheroskleroselast in hyperlipidämischen Mäusen. In der korrespondierenden klinischen Studie wurden bei Proband:innen unter oraler Propionatgabe ebenfalls erhöhte Tregs im Vergleich zu den Placebo behandelten Proband:innen im Plasma gemessen. Die Th1 und Th17 Zellkonzentrationen blieben unbeeinflusst. Unabhängig vom Cholesterinmetabolismus wirkt der Mikrobiomstatus auf inflammatorische Prozesse wie Zytokinproduktion und Differenzierung von inflammatorischen Zellen und hat somit eine Auswirkung auf Atheroskleroseprogression. Brandsma et al. exponierten in einer experimentellen Studie mit der Fragestellung ob ein proinflammatorisches Darmmikrobiom Atherosklerose beeinflusst, *LDL*<sup>-/-</sup> Mäuse mit dem veränderten Darmmikrobiom von *Casp*<sup>-/-</sup> Tieren, welche in vorigen Studien eine Neigung zur Entwicklung von inflammatorischen Erkrankungen zeigten [63]. *Casp*<sup>-/-</sup> Mäuse haben im Gegensatz zu konventionellen Wildtypmäusen ein anderes Verhältnis von *Firmicutes* zu *Bacteroidetes* und insbesondere einen anderen Anteil der Familien *Lachnospiraceae*, *Porphyromonadaceae* und *Prevotellaceae* [64]. SCFA-produzierende Bakterientaxen wie *Akkermansia*, *Christensenellaceae*, *Clostridium* und *Odoribacter* waren in den mit

*Casp1*<sup>-/-</sup> kolonisierten Tieren ebenfalls supprimiert mit konsekutiv reduzierten Konzentrationen der SCFA Acetat, Propionat und Butyrat im Zäkum der Mäuse. Die Plasmakonzentrationen der SCFA wurden hier nicht ermittelt. Die Autor:innen sahen in den mit *Casp1*<sup>-/-</sup> Darmmikrobiom kolonisierten *LDL*<sup>-/-</sup> Mäusen unter HFD eine größere Atherosklerosefläche mit erhöhter Neutrophilendichte in den Plaques sowie erhöhte Level an Leukozyten und proinflammatorischen Zytokinen im Plasma. Die Lipidlevel zeigten sich in diesem Experiment nicht signifikant verändert.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse meiner Experimente eine cholesterinsenkende Wirkung des Propionats, das allerdings keinen Einfluss auf die hepatischen Cholesterinsynthese hat. Darüber hinaus zeigten weitere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe eine IL10 abhängige Wirkung des Propionats auf die intestinale NPC1L1 Expression und folglich einen Einfluss auf die intestinale Cholesterinabsorption.

Ein weiterer Gegenstand meiner Arbeit war der Einfluss des Darmmikrobioms auf die Wirkung des cholesterinsenkenden Medikamentes Atorvastatin. Statine sind die am meisten verwendeten Medikamente zur Senkung des LDL-Cholesterols. Ein bekannter Wirkmechanismus ist die Inhibition der hepatischen HMGCR. Hinsichtlich einer beachtlichen interindividuellen Varianz der cholesterinsenkenden Wirkung von Statinen, untersuchten wir einen möglichen Einfluss des Darmmikrobioms im Mausmodell. Eine Mikrobiom-abhängige Therapiewirkung ist bereits für das kardiometabolisch wirksame Medikament Metformin vorbeschrieben [27, 65]. Metformin erreicht oral appliziert hohe Konzentrationen im Dünndarm und niedrigere Konzentrationen im Serum, weshalb eine Wirkung über den intestinalen Signalweg vermutet wurde. Es beeinflusste die Mikrobiomstruktur im Maus- und Humanmodell. So wird durch das Metformin der Anteil von *Bacteroides fragilis* reduziert. HFD gefütterte und mit dem Bakterium kolonisierte Mäuse neigten mehr zur Glucoseintoleranz und der therapeutische Effekt von Metformin war abgeschwächt. In meinem oben beschriebenen Atorvastatin-Tierversuch war der cholesterinsenkende Effekt abhängig vom Vorhandensein des Mikrobioms. In den konventionellen, HFD gefütterten Tieren senkte das Atorvastatin signifikant den Plasma-LDL Spiegel. Dieser Effekt konnte in den Antibiotika-behandelten Tieren nicht repliziert werden. Dabei fiel auf, dass die orale Applikation von Atorvastatin einen signifikanten Einfluss auf die Zusammensetzung des Darmmikrobioms auf Phylumebene hat. Hierfür wurden in der Arbeit die Fäzes der Tiere nach 6 Wochen SCD, HFD und HFD mit

zusätzlicher Gabe von Atorvastatin mittels 16S rRNA Analyse auf die Häufigkeit der Phyla Phylum *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* und *Proteobacteria* untersucht. Die Relation der hauptsächlich im Darm vertretenen Phyla *Firmicutes* : *Bacteroidetes* war unter HFD verglichen zu den Bedingungen unter SCD zugunsten *Firmicutes* verschoben. Diese erhöhte Ratio war unter Atorvastatintherapie abgemildert und der erhöhte Anteil von *Firmicutes* zu *Bacteroidetes* relativ geringer als unter HFD. Daraus kann geschlossen werden, dass das Atorvastatin die ungünstigen, durch HFD induzierten Veränderungen in der Mikrobiomzusammensetzung teilweise aufheben kann. Somit könnte die Regulation des Darmmikrobioms zum therapeutische Effekt von Atorvastatin beitragen. Diese Beobachtungen werden durch Daten von Vieira-Silva et al. unterstützt, die im Rahmen der europäischen MetaCardis-Beobachtungsstudie eine Reduktion der Prävalenz der Adipositas-assoziierten Dysbiose unter Statintherapie sahen [66]. Hierfür haben sie Mikrobiomdaten von fast 900 Patient/-innen untersucht. Der Enterotyp *Bacteroides2* (*Bact2*) wird als intestinaler Phänotyp bzw. Konfiguration des Mikrobioms beschrieben, der durch einen hohen Anteil an *Bacteroides* und niedrigen Anteil an *Faecalibacterium* charakterisiert ist. Häufig ist *Bact2* in Patienten mit CED, bis zu 78% Prävalenz, und bis zu 13% in der Gesamtpopulation zu finden. In MetaCardis war *Bact2* zu fast 18% in übergewichtigen Proband/-innen und nur zu 4% in schlanken Proband/-innen prävalent. Übergewichtige Patient/-innen, die unter der Medikation mit Statinen waren, hatten mit etwa 6% eine weitaus geringere Prävalenz des *Bact2* Enterotyps. Damit unterstreichen sie die Bedeutung der Mikrobiom-modifizierenden Eigenschaften von Statinen. Diese potentiellen positiven Effekte der Statine bedürfen weiterer, prospektiver klinischer Studien um den Nutzen und klinische Konsequenzen, z.B. als Darmmikrobiom modulierende Therapie zu evaluieren. Um den zugrunde liegenden Mechanismus zu eruieren untersuchten wir die semiquantitative Proteinexpression von für den hepatischen Cholesterinmetabolismus relevanten Proteinen. Einen Mikrobiom-abhängigen, signifikanten Unterschied fanden wir in der hepatischen Proteinexpression des LDLR. Dieser Rezeptor transportiert das LDL aus dem Blut nach intrazellulär. Eine Minderexpression dieses Rezeptors, z.B. im Rahmen eines Gendefektes, führt in den Betroffenen zu erhöhten LDL-Serumspiegeln mit konsekutiv erhöhtem kardiovaskulären Risiko. In Mikrobiom-depletierten, HFD gefütterten Tieren war dieser Rezeptor unter der Therapie mit Atorvastatin reduziert gegenüber den Mikrobiom-depletierten, HFD gefütterten Tieren ohne zusätzliche Atorvastatinapplikation. Hingegen zeigte sich in Tieren mit erhaltenem Darmmikrobiom kein Unterschied in der hepatischen

Proteinexpression. Daraus lässt sich ein mikrobiomabhängiger Mechanismus in der cholesterinsenkenden Wirkung von Atorvastatin über eine verminderte LDL-Elimination aus dem Plasma über den hepatischen LDLR vermuten. Eine Mikrobiom-abhängige Regulation von Atorvastatin auf die hepatische SREBP2 Proteinexpression konnten wir nicht nachweisen. In einer weiterführenden Arbeit unserer Arbeitsgruppe wurden zusätzlich zu den Proteinanalysen mRNA Daten ausgewertet, wobei sich ein mikrobiomabhängiger regulatorischer Effekt von Atorvastatin auf die hepatische mRNA Expression des Transkriptionsfaktors *Srebp2* zeigte [67]. In konventionellen Tieren war hier eine Hochregulation unter Atorvastatintherapie, in mikrobiomdepletierten Tieren eine relative Herunterregulation gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet worden. Hepatische mRNA Level von *Cyp7a1*, einem Schlüsselenzym in der Gallensäuresynthese, waren unabhängig vom Mikrobiomstatus durch Atorvastatin beeinflusst. Darüber hinaus war der im Ileum exprimierte, transmembrane Cholesteroltransporter NPCL1L auf mRNA Ebene durch Atorvastatin in mikrobiomdepletierten Mäusen signifikant gesteigert. Hingegen war in konventionellen Mäusen mit intaktem Mikrobiom unter Atorvastatin eine reduzierte Expression von NPC1L1 beobachtet worden, woraus eine Mikrobiom-abhängige Regulation des intestinalen Cholesteroltransporters NPC1L1 durch Atorvastatin vermutet wurde. Insgesamt deuten diese Untersuchungen auf eine Mikrobiom-abhängige Komponente der cholesterinsenkenden Wirkung von Statinen hin und könnten zum besseren Verständnis der interindividuellen Varianz der Statinwirkung beitragen.

Zusammenfassend unterstreichen die Ergebnisse meiner Promotionsarbeit die Bedeutung des Darmmikrobioms für den Cholesterinstoffwechsel und somit für atherosklerotische und kardiovaskuläre Erkrankungen. Der translationale Wert liegt vor allem in der Perspektive, dass orale Supplementation von Propionat zu einer Verbesserung des Cholesterinstoffwechsels führen kann und somit einen positiven Einfluss auf die kardiovaskuläre Gesundheit haben könnte. Des Weiteren könnte eine gezielte Modulation des Darmmikrobioms, z.B. durch Gabe von Probiotika oder durch diätetische Maßnahmen, den Effekt von kardiometabolischen Medikamenten, z.B. von Statinen, erhöhen und die protektive Wirkung auf kardiometabolische Erkrankungen potenzieren. Somit bieten das Darmmikrobiom und seine Metaboliten auf unterschiedliche Ebenen neue Möglichkeiten für die Prävention und Therapie von kardiometabolischen und kardiovaskulären Erkrankungen.

## Literaturverzeichnis

---

- 1 (Hrsg.) WHO. Cardiovascular diseases (CVDs). 2017; .
- 2 (Hrsg.) RKI-I. Gesundheit in Deutschland 2015. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Gemeinsam getragen von RKI und Destatis. RKI, Berlin. 2015; .
- 3 Catapano AL, Graham I, De Backer G, Wiklund O, Chapman MJ, Drexel H, Hoes AW, Jennings CS, Landmesser U, Pedersen TR, Reiner Z, Riccardi G, Taskinen MR, Tokgozoglu L, Verschuren WMM, Vlachopoulos C, Wood DA, Zamorano JL, Cooney MT and Group ESCSD. 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias. *Eur Heart J* 37 2016; 39: 2999-3058.
- 4 Yu E, Rimm E, Qi L, Rexrode K, Albert CM, Sun Q, Willett WC, Hu FB and Manson JE. Diet, Lifestyle, Biomarkers, Genetic Factors, and Risk of Cardiovascular Disease in the Nurses' Health Studies. *Am J Public Health* 106 2016; 9: 1616-1623.
- 5 Tang WHW, Backhed F, Landmesser U and Hazen SL. Intestinal Microbiota in Cardiovascular Health and Disease: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol* 73 2019; 16: 2089-2105.
- 6 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 and Group ESCSD. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J* 41 2020; 1: 111-188.
- 7 Goldstein JL and Brown MS. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 46 1977; 897-930.
- 8 Hansson GK and Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol* 12 2011; 3: 204-212.
- 9 Anderson KM, Castelli WP and Levy D. Cholesterol and mortality. 30 years of follow-up from the Framingham study. *JAMA* 257 1987; 16: 2176-2180.
- 10 Ripatti S, Tikkanen E, Orho-Melander M, Havulinna AS, Silander K, Sharma A, Guiducci C, Perola M, Jula A, Sinisalo J, Lokki ML, Nieminen MS, Melander O, Salomaa V, Peltonen L and Kathiresan S. A multilocus genetic risk score for coronary heart disease: case-control and prospective cohort analyses. *Lancet* 376 2010; 9750: 1393-1400.

- 11 Li J, Jia H, Cai X, Zhong H, Feng Q, Sunagawa S, Arumugam M, Kultima JR, Prifti E, Nielsen T, Juncker AS, Manichanh C, Chen B, Zhang W, Levenez F, Wang J, Xu X, Xiao L, Liang S, Zhang D, Zhang Z, Chen W, Zhao H, Al-Aama JY, Edris S, Yang H, Wang J, Hansen T, Nielsen HB, Brunak S, Kristiansen K, Guarner F, Pedersen O, Dore J, Ehrlich SD, Meta HITC, Bork P, Wang J and Meta HITC. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol* 32 2014; 8: 834-841.
- 12 Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N and Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 2007; 34: 13780-13785.
- 13 Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S and Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444 2006; 7122: 1022-1023.
- 14 Human Microbiome Project C. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486 2012; 7402: 207-214.
- 15 De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, Collini S, Pieraccini G and Lionetti P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 2010; 33: 14691-14696.
- 16 Spor A, Koren O and Ley R. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nat Rev Microbiol* 9 2011; 4: 279-290.
- 17 Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, Bewtra M, Knights D, Walters WA, Knight R, Sinha R, Gilroy E, Gupta K, Baldassano R, Nessel L, Li H, Bushman FD and Lewis JD. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 334 2011; 6052: 105-108.
- 18 Bokulich NA, Chung J, Battaglia T, Henderson N, Jay M, Li H, A DL, Wu F, Perez-Perez GI, Chen Y, Schweizer W, Zheng X, Contreras M, Dominguez-Bello MG and Blaser MJ. Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Sci Transl Med* 8 2016; 343: 343ra382.
- 19 Yatsunenkov T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Baldassano RN, Anokhin AP, Heath AC, Warner B, Reeder J, Kuczynski J, Caporaso JG, Lozupone CA, Lauber C, Clemente JC, Knights D, Knight R and Gordon JI. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486 2012; 7402: 222-227.

- 20 Koren O, Goodrich JK, Cullender TC, Spor A, Laitinen K, Backhed HK, Gonzalez A, Werner JJ, Angenent LT, Knight R, Backhed F, Isolauri E, Salminen S and Ley RE. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell* 150 2012; 3: 470-480.
- 21 Deschasaux M, Bouter KE, Prodan A, Levin E, Groen AK, Herrema H, Tremaroli V, Bakker GJ, Attaye I, Pinto-Sietsma SJ, Van Raalte DH, Snijder MB, Nicolaou M, Peters R, Zwinderman AH, Backhed F and Nieuwdorp M. Depicting the composition of gut microbiota in a population with varied ethnic origins but shared geography. *Nat Med* 24 2018; 10: 1526-1531.
- 22 Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, Almeida M, Arumugam M, Batto JM, Kennedy S, Leonard P, Li J, Burgdorf K, Grarup N, Jorgensen T, Brandslund I, Nielsen HB, Juncker AS, Bertalan M, Levenez F, Pons N, Rasmussen S, Sunagawa S, Tap J, Tims S, Zoetendal EG, Brunak S, Clement K, Dore J, Kleerebezem M, Kristiansen K, Renault P, Sicheritz-Ponten T, De Vos WM, Zucker JD, Raes J, Hansen T, Meta HITC, Bork P, Wang J, Ehrlich SD and Pedersen O. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 500 2013; 7464: 541-546.
- 23 Joossens M, Huys G, Cnockaert M, De Preter V, Verbeke K, Rutgeerts P, Vandamme P and Vermeire S. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut* 60 2011; 5: 631-637.
- 24 Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD and Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 2005; 31: 11070-11075.
- 25 Jernberg C, Lofmark S, Edlund C and Jansson JK. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology* 156 2010; Pt 11: 3216-3223.
- 26 Wu H, Esteve E, Tremaroli V, Khan MT, Caesar R, Manneras-Holm L, Stahlman M, Olsson LM, Serino M, Planas-Felix M, Xifra G, Mercader JM, Torrents D, Burcelin R, Ricart W, Perkins R, Fernandez-Real JM and Backhed F. Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naive type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. *Nat Med* 23 2017; 7: 850-858.
- 27 Lee H and Ko G. Effect of metformin on metabolic improvement and gut microbiota. *Appl Environ Microbiol* 80 2014; 19: 5935-5943.

- 28 Backhed F, Manchester JK, Semenkovich CF and Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 2007; 3: 979-984.
- 29 Turnbaugh PJ, Backhed F, Fulton L and Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* 3 2008; 4: 213-223.
- 30 Brown JM and Hazen SL. The gut microbial endocrine organ: bacterially derived signals driving cardiometabolic diseases. *Annu Rev Med* 66 2015; 343-359.
- 31 Donia MS and Fischbach MA. HUMAN MICROBIOTA. Small molecules from the human microbiota. *Science* 349 2015; 6246: 1254766.
- 32 Haghikia A, Li XS, Liman TG, Bledau N, Schmidt D, Zimmermann F, Krankel N, Widera C, Sonnenschein K, Haghikia A, Weissenborn K, Fraccarollo D, Heimesaat MM, Bauersachs J, Wang Z, Zhu W, Bavendiek U, Hazen SL, Endres M and Landmesser U. Gut Microbiota-Dependent Trimethylamine N-Oxide Predicts Risk of Cardiovascular Events in Patients With Stroke and Is Related to Proinflammatory Monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38 2018; 9: 2225-2235.
- 33 Layden BT, Angueira AR, Brodsky M, Durai V and Lowe WL, Jr. Short chain fatty acids and their receptors: new metabolic targets. *Transl Res* 161 2013; 3: 131-140.
- 34 Sonnenburg ED and Sonnenburg JL. Starving our microbial self: the deleterious consequences of a diet deficient in microbiota-accessible carbohydrates. *Cell Metab* 20 2014; 5: 779-786.
- 35 EU (2011) Regulation (EU) No 1169/2011 of the European parliament and of the Council on the provision of food information to consumers. *Official Journal of the European Union* 2011; 18-63.
- 36 El Kaoutari A, Armougom F, Gordon JI, Raoult D and Henrissat B. The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nat Rev Microbiol* 11 2013; 7: 497-504.
- 37 Sonnenburg JL and Backhed F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature* 535 2016; 7610: 56-64.
- 38 Wichmann A, Allahyar A, Greiner TU, Plovier H, Lunden GO, Larsson T, Drucker DJ, Delzenne NM, Cani PD and Backhed F. Microbial modulation of energy availability in the colon regulates intestinal transit. *Cell Host Microbe* 14 2013; 5: 582-590.
- 39 Tolhurst G, Heffron H, Lam YS, Parker HE, Habib AM, Diakogiannaki E, Cameron J, Grosse J, Reimann F and Gribble FM. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like

peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes* 61 2012; 2: 364-371.

40 Davie JR. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr* 133 2003; 7 Suppl: 2485S-2493S.

41 Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, Eilert MM, Tcheang L, Daniels D, Muir AI, Wigglesworth MJ, Kinghorn I, Fraser NJ, Pike NB, Strum JC, Steplewski KM, Murdock PR, Holder JC, Marshall FH, Szekeres PG, Wilson S, Ignar DM, Foord SM, Wise A and Dowell SJ. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem* 278 2003; 13: 11312-11319.

42 Bartolomaeus H, Balogh A, Yakoub M, Homann S, Marko L, Hoges S, Tsvetkov D, Krannich A, Wundersitz S, Avery EG, Haase N, Kraker K, Hering L, Maase M, Kusche-Vihrog K, Grandoch M, Fielitz J, Kempa S, Gollasch M, Zhumadilov Z, Kozhakhmetov S, Kushugulova A, Eckardt KU, Dechend R, Rump LC, Forslund SK, Muller DN, Stegbauer J and Wilck N. Short-Chain Fatty Acid Propionate Protects From Hypertensive Cardiovascular Damage. *Circulation* 139 2019; 11: 1407-1421.

43 Duscha A, Gisevius B, Hirschberg S, Yissachar N, Stangl GI, Eilers E, Bader V, Haase S, Kaisler J, David C, Schneider R, Troisi R, Zent D, Hegelmaier T, Dokalis N, Gerstein S, Del Mare-Roumani S, Amidror S, Staszewski O, Poschmann G, Stuhler K, Hirche F, Balogh A, Kempa S, Trager P, Zaiss MM, Holm JB, Massa MG, Nielsen HB, Faissner A, Lukas C, Gatermann SG, Scholz M, Przuntek H, Prinz M, Forslund SK, Winklhofer KF, Muller DN, Linker RA, Gold R and Haghikia A. Propionic Acid Shapes the Multiple Sclerosis Disease Course by an Immunomodulatory Mechanism. *Cell* 180 2020; 6: 1067-1080 e1016.

44 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, Dhillo WS, Bloom SR, Morley W, Clegg S and Frost G. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut* 64 2015; 11: 1744-1754.

45 Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian

M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Dore J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Meta HITC, Bork P, Ehrlich SD and Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464 2010; 7285: 59-65.

46 Group NHW, Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, Bonazzi V, McEwen JE, Wetterstrand KA, Deal C, Baker CC, Di Francesco V, Howcroft TK, Karp RW, Lunsford RD, Wellington CR, Belachew T, Wright M, Giblin C, David H, Mills M, Salomon R, Mullins C, Akolkar B, Begg L, Davis C, Grandison L, Humble M, Khalsa J, Little AR, Peavy H, Pontzer C, Portnoy M, Sayre MH, Starke-Reed P, Zakhari S, Read J, Watson B and Guyer M. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res* 19 2009; 12: 2317-2323.

47 Rappe MS and Giovannoni SJ. The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol* 57 2003; 369-394.

48 Sanschagrín S and Yergeau E. Next-generation sequencing of 16S ribosomal RNA gene amplicons. *J Vis Exp* 2014; 90: .

49 Kuczynski J, Lauber CL, Walters WA, Parfrey LW, Clemente JC, Gevers D and Knight R. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nat Rev Genet* 13 2011; 1: 47-58.

50 Aron-Wisnewsky J, Dore J and Clement K. The importance of the gut microbiota after bariatric surgery. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9 2012; 10: 590-598.

51 Javitt NB. Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. *FASEB J* 4 1990; 2: 161-168.

52 Fiebigler U, Bereswill S and Heimesaat MM. Dissecting the Interplay Between Intestinal Microbiota and Host Immunity in Health and Disease: Lessons Learned from Germfree and Gnotobiotic Animal Models. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 6 2016; 4: 253-271.

53 Haiser HJ, Gootenberg DB, Chatman K, Sirasani G, Balskus EP and Turnbaugh PJ. Predicting and manipulating cardiac drug inactivation by the human gut bacterium *Eggerthella lenta*. *Science* 341 2013; 6143: 295-298.

54 Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ and Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150 1985; 1: 76-85.

55 Haghikia A, Jorg S, Duscha A, Berg J, Manzel A, Waschbisch A, Hammer A, Lee DH, May C, Wilck N, Balogh A, Ostermann AI, Schebb NH, Akkad DA, Grohme DA,

Kleinewietfeld M, Kempa S, Thone J, Demir S, Muller DN, Gold R and Linker RA. Dietary Fatty Acids Directly Impact Central Nervous System Autoimmunity via the Small Intestine. *Immunity* 44 2016; 4: 951-953.

56 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, Doring Y, Strauch CM, Nemet I, Tremaroli V, Dwibedi C, Krankel N, Leistner DM, Heimesaat MM, Bereswill S, Rauch G, Seeland U, Soehnlein O, Muller DN, Gold R, Backhed F, Hazen SL, Haghikia A and Landmesser U. Propionate attenuates atherosclerosis by immune-dependent regulation of intestinal cholesterol metabolism. *Eur Heart J* 2021; .

57 Karlsson FH, Fak F, Nookaew I, Tremaroli V, Fagerberg B, Petranovic D, Backhed F and Nielsen J. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat Commun* 3 2012; 1245.

58 Bundesärztekammer (BäK) KRBK, Arbeitsgemeinschaft Der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (Awmf). Nationale Versorgungsleitlinie Chronische Khk – Langfas- Sung, 5. Auflage. Version 1. 2019 [Cited: 2021-12-12]. Doi: 10.6101/Azq/000419. [www.khk.versorgungsleitlinien.de](http://www.khk.versorgungsleitlinien.de).

59 Kasahara K, Krautkramer KA, Org E, Romano KA, Kerby RL, Vivas EI, Mehrabian M, Denu JM, Backhed F, Lusic AJ and Rey FE. Interactions between *Roseburia intestinalis* and diet modulate atherogenesis in a murine model. *Nat Microbiol* 3 2018; 12: 1461-1471.

60 Pluznick JL, Protzko RJ, Gevorgyan H, Peterlin Z, Sipos A, Han J, Brunet I, Wan LX, Rey F, Wang T, Firestein SJ, Yanagisawa M, Gordon JI, Eichmann A, Peti-Peterdi J and Caplan MJ. Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 2013; 11: 4410-4415.

61 Pathak P, Helsley RN, Brown AL, Buffa JA, Choucair I, Nemet I, Gogonea CB, Gogonea V, Wang Z, Garcia-Garcia JC, Cai L, Temel R, Sangwan N, Hazen SL and Brown JM. Small molecule inhibition of gut microbial choline trimethylamine lyase activity alters host cholesterol and bile acid metabolism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 318 2020; 6: H1474-H1486.

62 Brown JM, Bell TA, 3rd, Alger HM, Sawyer JK, Smith TL, Kelley K, Shah R, Wilson MD, Davis MA, Lee RG, Graham MJ, Crooke RM and Rudel LL. Targeted depletion of

hepatic ACAT2-driven cholesterol esterification reveals a non-biliary route for fecal neutral sterol loss. *J Biol Chem* 283 2008; 16: 10522-10534.

63 Brandsma E, Kloosterhuis NJ, Koster M, Dekker DC, Gijbels MJJ, Van Der Velden S, Rios-Morales M, Van Faassen MJR, Loreti MG, De Bruin A, Fu J, Kuipers F, Bakker BM, Westerterp M, De Winther MPJ, Hofker MH, Van De Sluis B and Koonen DPY. A Proinflammatory Gut Microbiota Increases Systemic Inflammation and Accelerates Atherosclerosis. *Circ Res* 124 2019; 1: 94-100.

64 Brinkman BM, Hildebrand F, Kubica M, Goosens D, Del Favero J, Declercq W, Raes J and Vandenabeele P. Caspase deficiency alters the murine gut microbiome. *Cell Death Dis* 2 2011; e220.

65 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 and Jiang C. Gut microbiota and intestinal FXR mediate the clinical benefits of metformin. *Nat Med* 24 2018; 12: 1919-1929.

66 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 and Raes J. Statin therapy is associated with lower prevalence of gut microbiota dysbiosis. *Nature* 581 2020; 7808: 310-315.

67 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 and Haghikia A. Impact of the Gut Microbiota on Atorvastatin Mediated Effects on Blood Lipids. *J Clin Med* 9 2020; 5: .

## Eidesstattliche Versicherung

---

„Ich, Friederike Luise Zimmermann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Die Rolle von Darmmikrobiom-assoziierten Metaboliten für kardiometabolische Erkrankungen, The role of gut microbiome-associated metabolites in cardiometabolic diseases, 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

## Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

---

Friederike Luise Zimmermann hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

### Publikation 1:

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, Doring Y, Strauch CM, Nemet I, Tremaroli V, Dwibedi C, Krankel N, Leistner DM, Heimesaat MM, Bereswill S, Rauch G, Seeland U, Soehnlein O, Muller DN, Gold R, Backhed F, Hazen SL, Haghikia A and Landmesser U, **Propionate attenuates atherosclerosis by immune-dependent regulation of intestinal cholesterol metabolism**. Eur Heart J, 2021

Beitrag im Einzelnen: Koordination und Durchführung der Mausexperimente. Präparation der Serumproben und Entnahme der Organe. Design des Graphical Abstracts.

### Publikation 2:

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 and Haghikia A, **Impact of the Gut Microbiota on Atorvastatin Mediated Effects on Blood Lipids**. J Clin Med 9, 2020

Beitrag im Einzelnen: Koordination und Durchführung der Mausexperimente. Präparation der Serumproben und Entnahme der Organe. Durchführung der Western Blot Analysen. Design von Figure 8.

### Publikation 3:

Haghikia A, Li XS, Liman TG, Bledau N, Schmidt D, Zimmermann F, Krankel N, Widera C, Sonnenschein K, Haghikia A, Weissenborn K, Fraccarollo D, Heimesaat MM, Bauersachs J, Wang Z, Zhu W, Bavendiek U, Hazen SL, Endres M and Landmesser U, **Gut Microbiota-Dependent Trimethylamine N-Oxide Predicts Risk of Cardiovascular Events in Patients With Stroke and Is Related to Proinflammatory Monocytes**. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2018

Beitrag im Einzelnen: Koordination und Durchführung der Mausexperimente.

---

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## Lebenslauf

---

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

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

## Publikationsliste

---

1. Giral H, Franke V, Moobed M, Mueller MF, Luebking L, James DM, Hartung J, Kuschnerus K, Meteva D, Seppelt C, Jakob P, Klingenberg R, Kraenkel N, Leistner D, Zeller T, Blankenberg S, Zimmermann F, Haghikia A, Luescher TF, Akalin A, Landmesser U and Kratzer A. Rapid Inflammation Activation Is Attenuated in Post-Myocardial Infarction Monocytes. *Frontiers in Immunology* 13 2022; .
2. Haghikia A, Li XMS, Liman TG, Bledau N, Schmidt D, Zimmermann F, Krankel N, Widera C, Sonnenschein K, Haghikia A, Weissenborn K, Fraccarollo D, Heimesaat MM, Bauersachs J, Wang ZN, Zhu WF, Bavendiek U, Hazen SL, Endres M and Landmesser U. Gut Microbiota-Dependent Trimethylamine N-Oxide Predicts Risk of Cardiovascular Events in Patients With Stroke and Is Related to Proinflammatory Monocytes. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 38 2018; 9: 2225-2235.
3. 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, Doring Y, Strauch CM, Nemet I, Tremaroli V, Dwibedi C, Krankel N, Leistner DM, Heimesaat MM, Bereswill S, Rauch G, Seeland U, Soehnlein O, Muller DN, Gold R, Backhed F, Hazen SL, Haghikia A and Landmesser U. Propionate attenuates atherosclerosis by immune-dependent regulation of intestinal cholesterol metabolism. *European Heart Journal* 43 2022; 6: 518-533.
4. Reinthaler M, Grosshauser J, Schmidt T, Unger J, Morgan R, Zimmermann F, Hartung J, Seppelt C, Meteva D, Haider W, Landmesser U and Skurk C. Preclinical assessment of a modified Occlutech left atrial appendage closure device in a porcine model. *Scientific Reports* 11 2021; 1: .
5. Zimmermann F and Landmesser U. Left atrial appendage closure for stroke prevention in atrial fibrillation An update. *Herz* 45 2020; 4: 397-406.
6. 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 and Haghikia A. Impact of the Gut Microbiota on Atorvastatin Mediated Effects on Blood Lipids. *Journal of Clinical Medicine* 9 2020; 5: .

## Danksagung

---

Ich bedanke mich von Herzen bei meinen Eltern, die mir für die Umsetzung dieser Arbeit stets den Rücken freigehalten haben. Der größte Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Arash Haghikia für eine zuverlässige und allseits unterstützende Betreuung sowie die Chance, in die Welt des Mikrobioms und der experimentellen Herz-Kreislauf-Forschung einsteigen zu dürfen. Danke an alle meine Mit-Doktoranden der AG Haghikia: David, Paul, Andrzej, Johann, Philipp und Vanasa, die in allen Labmeetings und neuen Experimentierreihen geduldig, mit viel Humor und Unterstützung an meiner Seite waren. Vielen Dank an Professor Landmesser für die Möglichkeit, als Teil eines reichhaltigen und sympathischen Teams, welches in verschiedenen Feldern der kardiovaskulären Forschung arbeitet, zu wirken. Danke an Zehra, Hector, Heidi, Nicolle, Minoo, Sabine, Denitsa, Claudio, Harsha, Julia und Marianna. Besten Dank auch an unsere Kooperationspartner der AG Heimesaat.

# Bescheinigung des akkreditierten Statistikers



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBike)

Direktor: Prof. Dr. Frank Konietzschke

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

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



**Zimmermann, Friederike Luise**

**friederike.zimmermann@charite.de**

**145306 (Matrikelnummer)**

**Promotionsbetreuerin: PD Dr. Arash Haghikia**

**Medizinische Klinik für Kardiologie, Charité Campus Benjamin  
Franklin**

## Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Frau Zimmermann innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBike) bei mir eine statistische Beratung zu ihrem Promotionsvorhaben „**Die Rolle von Darmmikrobiom-assoziierten Metaboliten für kardiometabolische Erkrankungen**“ wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 27.06.2022
- Termin 2: 20.09.2022

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

- Empfehlung der Nutzung des Statistik-Programms „IBM SPSS Statistics“ zwecks statistischer Auswertung der erhobenen Daten
  - Weiterhin Instruktion über die adäquate Eingabe der Werte
- Instruktion über die adäquate Deskription der kategorialen und metrischen Variablen
- Empfehlung zur korrekten Anwendung geeigneter statistischer Test in Abhängigkeit von den Fragestellungen
  - Kruskal-Wallis-Test: Gruppenvergleich zwischen den ENMC-Subklassen und dem EULAR/ACR-Score (Signifikanztest)
  - Mann-Whitney-U-Test: Paarvergleich zwischen den ENMC-Subklassen und dem EULAR/ACR-Score (post-hoc Signifikanztests)
  - Cohens Kappa: Erhebung des Übereinstimmungskoeffizienten zum Vergleich der zwei Klassifizierungssysteme (ENMC und EULAR/ACR)

- McNemar-Test: Signifikanztest zur Gegenüberstellung der Diagnostikverfahren Muskelbiopsie und Antikörperdiagnostik (genauer: Dermatomyositis-spezifischer-Antikörper)
- Chi-Quadrat-Test nach Pearson: Signifikanztest zur Relation zwischen antiTIF1 $\gamma$ -Nachweis (Antikörper) und tumorösen Pathologien.
- Hinweise zur Erstellung von Kreuztabellen und Grafiken
- Hinweise zur Interpretation der Ergebnisse
- Hinweis darauf, dass auf Grund des explorativen Charakters auf eine Adjustierung bzgl. multiplen Testens verzichtet wird
- Hinweis auf Erwähnung im Diskussions-Abschnitt der Monographie, dass die in dieser explorativen Arbeit gefundenen Resultate 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.

Datum: 21.09.2022

Name des Beraters/ der Beraterin:

A. Stroux

Unterschrift BeraterIn, Institutsstempel


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