

DISSERTATION

Die Rolle von Darm-Mikrobiom abhängigen Metaboliten für
Atherosklerose

The role of gut microbiome-dependent metabolites in
atherosclerosis

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Andrzej Jasina

Erstbetreuung: Prof. Dr. med. Arash Haghikia

Datum der Promotion: 29.11.2024

Vorwort

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

- Haghikia A, Zimmermann F, Schumann P, **Jasina A**, Roessler J, Schmidt D, Heinze P, Kaisler J, Nageswaran V, Aigner A, Ceglarek U, Cineus R, Hegazy AN, van der Vorst EPC, Döring Y, Strauch CM, Nemet I, Tremaroli V, Dwibedi C, Kränkel N, Leistner DM, Heimesaat MM, Bereswill S, Rauch G, Seeland U, Soehnlein O, Müller DN, Gold R, Bäckhed F, Hazen SL, Haghikia A, Landmesser U. Propionate attenuates atherosclerosis by immune-dependent regulation of intestinal cholesterol metabolism. Eur Heart J. 2022 Feb 10;43(6):518-533. doi: 10.1093/eurheartj/ehab644. PMID: 34597388.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsliste	7
Abstrakt – Deutsch	9
Abstract – English	11
1. Einleitung	13
1.1. <i>Kardiovaskuläre Erkrankungen und ihre Folgen</i>	13
1.2. <i>Atherosklerose</i>	15
1.3. <i>Darm-Mikrobiom und Atherosklerose</i>	19
1.3.1. <i>Kurzkettige Fettsäuren</i>	22
1.3.2. <i>Propionat</i>	23
1.4. <i>Fragestellungen</i>	28
2. Materialien und Methoden	30
2.1. <i>Materialien</i>	30
2.1.1. <i>Tierhaltung</i>	30
2.1.2. <i>Histologie</i>	31
2.1.3. <i>Geräte und Software</i>	31
2.2. <i>Tierexperimentelle Versuche</i>	32
2.2.1. <i>Ethischer und rechtlicher Hintergrund</i>	32
2.2.2. <i>Tierhaltung</i>	33
2.2.3. <i>Behandlungsgruppen – Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung</i>	33
2.2.4. <i>Sektion und Probenentnahme</i>	35
2.3. <i>Histologie</i>	37
2.3.1. <i>Aortenwurzel</i>	37
2.3.2. <i>Dünndarm</i>	41
2.4. <i>Analyse der Histologischen Untersuchungen</i>	41
2.4.1. <i>Mikroskopie und Aufbereitung von Bildern</i>	41
2.4.2. <i>Auswertung der Aufnahmen</i>	42

2.4.3. Statistische Analysen	44
3. Ergebnisse	45
3.1. Einfluss des Darm-Mikrobioms auf die Atherosklerose	45
3.2. Einfluss des Darm-Mikrobiom-Metaboliten Propionat auf die Atherosklerose.....	48
3.3. Wirkmechanismen des Propionat	51
4. Diskussion	56
4.1. Einfluss des Darm-Mikrobioms auf Atherosklerose	57
4.2. Einfluss des Propionats auf die Atherosklerose	57
4.3. Wirkmechanismen des Propionats	60
4.3.1. NPC1L1-Expression	60
4.3.2. Interleukin-10-Signalweg	62
4.4. Zusammenfassung	64
4.5. Limitationen	66
4.6. Schlussfolgerungen	68
Literatur	71
Eidesstattliche Versicherung.....	80
Anteilerklärung an erfolgten Publikationen	81
Curriculum vitae.....	82
Publikationsliste	83
Danksagung	84
Bescheinigung eines akkreditierten Statistikers.....	85

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung der Progression der Atherosklerose.	17
Abbildung 2 Schematische Darstellung des Gleichgewichts der T-Zellen.....	26
Abbildung 3 Schematische Darstellung der Präparation des Herzens und der Aorta.	36
Abbildung 4 Kryotom Bearbeitung eines Präparates.....	37
Abbildung 5 Schematische Darstellung der Schneidevorgangs mit dem Kryostat.	38
Abbildung 6 Zusammensetzung der Chemikalien für eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	39
Abbildung 7 Auswertung eines mit Oil-Red-O gefärbtes Aortenwurzeln Präparates.....	42
Abbildung 8 Auswertung der Fluoreszenzfärbung der Dünndarm Proben.	43
Abbildung 9 Quantifizierung von atherosklerotischen Ablagerungen in der Aortenwurzelschnitten bei einer Standard Diät.	46
Abbildung 10 Quantifizierung von atherosklerotischen Ablagerungen in der Aortenwurzelschnitten bei einer fettreichen Diät.	47
Abbildung 11 Repräsentative Bilder von Aortenwurzelschnitten mit und ohne Antibiotika Gabe.	47
Abbildung 12 Quantifizierung von atherosklerotischen Ablagerungen in der Aortenwurzelschnitten nach Propionat Gabe.	48
Abbildung 13 Repräsentative Bilder von Aortenwurzelschnitten nach Propionat Gabe.	49
Abbildung 14 Quantifizierung von atherosklerotischen Ablagerungen in der Aortenwurzelschnitten nach antibiotischer Behandlung mit und ohne Propionat Gabe.	50
Abbildung 15 Repräsentative Bilder von Aortenwurzelschnitten nach Antibiotika Gabe mit und ohne Propionat Behandlung.	51
Abbildung 16 Quantifizierung der mittleren Fluoreszenzdichte der NPC1L1-Färbung des Dünndarms von Mäusen.	52
Abbildung 17 Repräsentative Immunfärbung des Dünndarms von Mäusen mit einem NPC1L1-Antikörper.	53
Abbildung 18 Quantifizierung von atherosklerotischen Ablagerungen in der Aortenwurzelschnitten nach Propionat Behandlung mit und ohne Blockade der IL10-Signalweg.....	54
Abbildung 19 Repräsentative Bilder von Aortenwurzelschnitten nach Propionat Behandlung mit und ohne Blockade der IL-10-Signalweg.....	55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Versuchstiere	30
Tabelle 2 Versuchsdäten	30
Tabelle 3 Verbrauchsmaterialien und Geräte	30
Tabelle 4 Chemikalien und Reagenzien	30
Tabelle 5 Verbrauchsmaterialien	31
Tabelle 6 Chemikalien und Lösungen.....	31
Tabelle 7 Antikörper	31
Tabelle 8 Geräte	31
Tabelle 9 Software	32

Abkürzungsliste

AB	Antibiose
Abca1	ATP-bindende Kasette Transporter 1
Abcg5	ATP-bindende Kasette Unterfamilie G Mitglied 5
Acat2	Acetyl-CoA Acetyltransferase
AK	Antikörper
ApoE	Apolipoprotein E
ApoE -/-	ApoE-Defizienz
Asbt	Natrium-Gallensäure-Transporter
CaPa	Calciumpropionat
CO2	Kohlenstoffdioxid
CVD	Kardiovaskuläre Erkrankungen
Cyp7a1	Cholesterin-7-alpha-Hydroxylase
DMB	3,3-Dimethyl-1-butanol
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EU	Europäische Union
FABP4	Fettsäurebindender Protein 4
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting / Durchflusszytometrie
FEM	Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin
FFAR3	Fettsäurerezeptor FFAR3
Foxp3	Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-Protein P3
Fxr	Farnesoid-X-Rezeptor
GLP-1	Glucagon-like Peptide-1
GPR41	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 41
GPR43	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 43
HDAC	Histon-Deacetylasen
HDL	High-Density-Lipoprotein
HFD	High Fat Diet
Hmgcr	HMG-CoA-Reduktase
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym A
IFN- γ	Interferon- γ
IGN	intestinale Gluconeogenese
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
KHK	Koronare Herzkrankheit

LaGeSo	Landesamt für Gesundheit Berlin
LCFAs	Long chained fatty acids / langkettige Fettsäuren
LDL	Low-Density-Lipoprotein
Ldlr	LDL-Rezeptor
MS	Multiple Sklerose
NPC1L1	Niemann-Pick C1-like Protein 1
N-HDL	Non-High-Density-Lipoprotein
OCT	Tissue-freezing medium
oxLDL	Oxidativ verändertes LDL
PA	Propionat
PAGIn	Phenylacetylglutamin
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
Pcsk9	Proprotein-Convertase Subtilisin/Kexin Typ 9
PIT	Pathologische Intima-Verdickung
PPY	Peptid YY
RGB	Rot-Grün-Blau-Farbraum
RNA	Ribonukleinsäuren
SCD	Standard Chow Diet
SCFAs	Short chained fatty acids / kurzkettige Fettsäuren
Srebp2	Sterol regulatory element-binding protein
SR-B1	Scavenger-Rezeptor B1
TBS	Tris-buffered saline
TCFA	Thin-Cap Fibroatheroma
Teff	Effektor-CD4+-T-Zellen
TGF- β	Transforming growth factor - β
Th1	T-Helfer-1-Zellen
Th17	T-Helfer-17-Zellen
TMA	Trimethylamin
TMAO	Trimethylamin-N-oxid
Tregs	regulatorische T-Zellen
UN	Vereinte Nationen
3-R	Replace, Reduce, Refine

Abstrakt – Deutsch

Einleitung

Atherosklerotische Herz-Kreislauf-Erkrankungen (CVD) sind eine große Belastung für das Gesundheitswesen und eine der Hauptursachen für Mortalität und Morbidität weltweit. Dies macht eine Prävention von CVD zu einer systemrelevanten Aufgabe. Studien zeigen, dass eine adäquate Aufnahme von Ballaststoffen kardioprotektive Eigenschaften hat. Propionat (PA), eine kurzkettige Fettsäure, die durch Bakterien aus ballaststoffreicher Nahrung gewonnen wird, hat nach neueren Erkenntnissen eine immunmodulatorische Wirkung und könnte somit die für Atherosklerose charakteristische chronische Inflammation steuern.

Zielsetzung

Basierend auf bisherigen Erkenntnissen über Eigenschaften des Propionats untersuchte ich die Frage, ob eine Behandlung mit Propionat die Progression der Atherosklerose im Dyslipidämie Tiermodell (ApoE $-/-$) beeinflusst. Weiterhin wurden mögliche Mechanismen einer potenziell atheroprotektiven Wirkung von Propionat untersucht.

Methodik

Konventionell gezüchtete oder sekundär gnotobiotische atheroprone Apolipoprotein-E-Defizienz-(ApoE $-/-$)Mäuse wurden mit einer Kontroll- oder fettreichen Diät behandelt. Sie erhielten eine orale Behandlung mit Propionat oder einer Kontrolllösung. Um die Auswirkungen von Propionat zu untersuchen, wurden einige Mäuse zusätzlich mit einer intraperitonealen Injektion eines Interleukin-10-Rezeptor-Antikörpers behandelt, um den IL-10-Signalweg zu unterbrechen. Mittels histologischer und immunhistochemischer Standardfärbungen wurden die Aortenwurzeln der Mäuse auf den Schweregrad der atherosklerotischen Veränderungen hin untersucht. Darüber hinaus wurden Proben aus dem Dünndarm der Mäuse auf die Expression des Transporterproteins für Cholesterinaufnahme im Darm, des Niemann-Pick C1-like Protein 1 (NPC1L1), untersucht.

Ergebnisse

Die Verarmung der Darmmikrobiota erhöhte den Schweregrad der Atherosklerose bei ApoE ^{-/-} Mäusen. Eine Supplementierung mit dem Metaboliten Propionat reduzierte die Entwicklung der Atherosklerose. Die Behandlung mit PA bei antibiotisch behandelten ApoE ^{-/-} Mäusen führte zu einer tendenziellen Verringerung der Größe der atherosklerotischen Läsionen. Die PA-Supplementierung war mit einer Unterdrückung der Expression des NPC1L1 verbunden. Die Unterbrechung der IL-10-vermittelten Signalübertragung hob alle atheroprotektiven Eigenschaften von Propionat auf.

Schlussfolgerungen

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Entwicklung von Atherosklerose vom Mikrobiom abhängt und dass der Mikrobiom-abhängige Metabolit Propionat eine präventive Wirkung auf die Entwicklung von Atherosklerose haben könnte. Der Mechanismus beinhaltet eine PA-vermittelte Erhöhung der Anzahl regulatorischer T-Zellen und des IL-10-Spiegels im Dünndarm, was wiederum die Expression des NPC1L1, eines Cholesterintransporters, unterdrückt. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Supplementierung mit PA und die Modulation des Darm Mikrobioms durch die Ernährung ein neuer therapeutischer Ansatz für die kardiovaskuläre Prävention sein könnte.

Abstract – English

Introduction

Atherosclerotic cardiovascular disease (CVD) remains a major public health burden and a leading cause of mortality and morbidity worldwide. This demonstrates the clinical need for novel concepts to prevent CVD. Epidemiological studies suggest that intake of dietary fiber has cardioprotective properties. Propionate, a short-chain fatty acid generated by bacterial fermentation from high-fiber diets, has been shown to exert immunomodulatory effects in recent studies, and thus could control the inflammatory processes involved in atherosclerosis.

Goals

We studied the putative link between propionate, immune system, and atherosclerosis, and hypothesized that propionate might have an atheroprotective effect mediated by modulation of the adaptive immune system in the intestine.

Methods

Conventionally raised, or secondarily gnotobiotic atheroprone ApoE ^{-/-} mice were treated with control or high-fat diet. In addition, mice received oral treatment with propionate or control solution. In addition, to explore the effects of propionate, some mice were treated with an intraperitoneal injection of a monoclonal interleukin-10 receptor antibody to disrupt IL-10 receptor signaling. Using standard histological and immunohistochemical staining, the aortic roots of the mice were evaluated for the size of atherosclerotic plaques and macrophage infiltration. In addition, mouse small intestine samples were evaluated for expression of a major sterol transporter NPC1L1.

Results

Depletion of the gut microbiota increased the severity of atherosclerosis in ApoE ^{-/-} mice. Supplementation with the microbiome-derived metabolite propionate successfully inhibited the development of atherosclerosis. Treatment with PA in antibiotic-treated ApoE^{-/-} mice tended to reduce the size of atherosclerotic lesions. Propionate supplementation was associated with decreased expression of Niemann-Pick C1-like 1 protein, a major intestinal cholesterol transporter. Disruption of interleukin-10-mediated signaling abolished atheroprotective properties of propionate.

Conclusion

These results demonstrated that the development of atherosclerosis is partly driven by the gut microbiome and that the microbiome-related propionate may have a preventive effect on the development of hyperlipidemia-induced atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. Niemann-Pick C1-like Protein 1 is an intestinal cholesterol transporter in the small intestine. Suppression of NPC1L1 by interleukin-10 levels is proposed to be the mechanism. The IL-10 increase was shown to be PA-mediated, making PA supplementation a novel approach for the prevention of atherosclerotic cardiovascular disease in humans.

1. Einleitung

1.1. Kardiovaskuläre Erkrankungen und ihre Folgen

Jedes Jahr sterben in Europa rund 4 Millionen Menschen an kardiovaskulären Erkrankungen (CVD). Dies entspricht 45% aller Todesfälle in Europa und ca. 33% aller Todesfälle weltweit (1). Kardiovaskuläre Erkrankungen sind somit weltweit die häufigste Todesursache und bedeuten eine enorme Belastung für das Gesundheitswesen (1). Auch das deutsche Gesundheitswesen leidet unter CVD, wobei die Prävalenzen hierbei im europäischen Vergleich für beide Geschlechter über dem Durchschnitt liegen (Europa: 9,2%; Deutschland: 11,6% bis 14,1%). Dies bedeutet, dass jede 10. Person in Europa (Daten für das Jahr 2015) von kardiovaskulären Krankheiten betroffen ist (1).

Die durch CVD verlorenen Lebensjahre der Bevölkerung, d.h. die Summe der verbleibenden Restlebenserwartung jedes Verstorbenen, hat seit 1990 zugenommen. Dies geschieht trotz des weltweiten Rückgangs dieses Parameters, wenn man krankheitsübergreifend rechnet (2). CVD stellen eine enorme Belastung für das Gesundheitssystem dar und verursachen in der Europäischen Union (EU) hohe sozioökonomische Kosten. Insgesamt kosten CVD die EU-Wirtschaft schätzungsweise 210 Milliarden € pro Jahr, wobei 53% von den Gesamtkosten auf direkte Gesundheitskosten entfallen, 26% auf Produktivitätsverluste und 21% auf die Pflege. Die Gesamtkosten in Deutschland für 2015 wurden auf 28,3 Milliarden € geschätzt (3).

Die Vereinten Nationen (UN) haben sich eine Senkung der CVD-bedingten Mortalität um 25% bis zum Jahr 2025 als ein strategisches Ziel gesetzt. Als zielführend und notwendig sehen die UN dabei die Einführung entsprechender geschlechts-, alters- und regionsspezifischer Präventionsmaßnahmen (4). Angriffspunkte für präventive Strategien sind modifizierbare Risikofaktoren, die für CVD gut erforscht sind: Tabakkonsum, Bewegungsmangel, übermäßiger Alkoholkonsum, ungesunde Ernährung, Fettleibigkeit, familiäre Vorbelastung, Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, psychosoziale Faktoren, Armut und niedriger Bildungsstatus, Luftverschmutzung und ungesundes Schlafverhalten (5). Insgesamt tragen ernährungsbedingte Faktoren von allen verhaltensbedingten Risikofaktoren europaweit am stärksten zum CVD-Mortalitätsrisiko bei. Von den klinischen

Risikofaktoren spielt der Bluthochdruck eine zentrale Rolle (3). Es wird angenommen, dass eine Senkung der Bluthochdruckprävalenz von entscheidender Bedeutung für die Prävention von CVD ist (5). Bei Männern ist der zweitwichtigste Risikofaktor das Rauchen. Raucherentwöhnung senkt das Risiko für CVD schon 5 Jahre nach der Entwöhnung um 39% im Vergleich zur rauchenden Vergleichspopulation (5). Bei Frauen scheint die Reduktion des Übergewichts eine Rolle zu spielen (4).

Eine deutlich steigende Prävalenz von Adipositas ist bei beiden Geschlechtern ein weltweit auftretendes Phänomen. Fettleibigkeit und metabolisches Syndrom sind Hauptrisikofaktoren für die Entstehung der Atherosklerose, die für CVD ursächlich ist (2). Diabetes mellitus ist eine weitere metabolische Erkrankung mit steigender Prävalenz, die in Zusammenhang mit der Epidemie der Fettleibigkeit steht. Diabetes mellitus verdoppelt dabei das Risiko für die CVD und scheint besonders in Ländern mit niedrigem bis mittlerem Einkommen, die häufig durch eine überwiegend sitzende Arbeitsweise gekennzeichnet sind, eine große Rolle zu spielen (5). Im Gegensatz zu anderen Hauptursachen für vermeidbare Todesfälle und Behinderungen, wie Tabakkonsum, Verletzungen und Infektionskrankheiten, waren Maßnahmen des öffentlichen Gesundheitswesens zur Eindämmung der Diabetes-Epidemie weniger effektiv (6). Dies trägt dazu bei, dass die Global-Burden-of-Disease-Studie aus dem Jahr 2017 die Strategie zur Adipositasbekämpfung als „Key Challenge“ im Kampf gegen CVD eingestuft hat (2).

Ursächlich für die pathologische Entwicklung der atherosklerotischen CVD ist zum größten Teil der gestörte Cholesterinstoffwechsel, der als modifizierbarer Risikofaktor ein wichtiges Behandlungsziel die Prävention von CVD darstellt. Zwischen den Blutwerten von Low-Density-Lipoprotein (LDL) und dem kardiovaskulären Risiko besteht ein kausaler proportionaler Zusammenhang (7), und die Senkung des Gesamt-Cholesterinspiegels zeigte in vielzähligen randomisierten, placebo-kontrollierten Studien eine Senkung des kardiovaskulären Risikos (8). Dabei war die Risikoreduzierung umso effektiver, je früher die Cholesterinkonzentration gesenkt wurde (9). Darüber hinaus haben klinische Studien eindeutig gezeigt, dass das Risiko künftiger kardiovaskulärer Ereignisse umso geringer ist, je niedriger die erreichten LDL-Werte sind (10).

1.2. Atherosklerose

Die Koronare Herzkrankheit (KHK) und der Schlaganfall sind ursächlich für über 80% aller mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziierten Todesfällen. Die durch diese beiden Krankheitsbilder verursachten Todeszahlen sind in den letzten 10 Jahren gestiegen (2). Eine gemeinsame ätiologische Ursache für beide Krankheitsgruppen ist die Atherosklerose.

Die Atherosklerose ist eine entzündliche Degeneration und Kalzifizierung der arteriellen Blutgefäße. Sie beginnt häufig mit einer frühen Hyperplasie der Intima-Schicht der Gefäßwände, die im Kindesalter bereits auftreten und zu einer pathologischen Intima-Verdickung (PIT) fortschreiten kann (11). Frühe atherosklerotische Läsionen in den Koronararterien können schon im zweiten Lebensjahrzehnt beobachtet werden (12), wobei man zwischen Intima-Verdickung und intimalen Xanthomen („fatty streaks“) – beide werden als die frühesten Manifestationen der atherosklerotischen Erkrankung angesehen – unterscheiden kann. Die Intima-Hyperplasie tritt bei Kindern an ähnlichen Stellen auf wie fortgeschrittene Plaques bei Erwachsenen, während sich intimale Xanthome im Laufe des Lebens zurückbilden können (11). Die „fatty streaks“ bestehen aus von Monozyten stammenden Makrophagen und T-Lymphozyten. Wegen dieses Entzündungscharakters der frühen atherosklerotischen Läsionen und der Abfolge von sehr spezifischen zellulären und molekularen Reaktionen, die zur Atherosklerose führen, wird die Atherosklerose als ein Zustand der chronischen Inflammation beschrieben (13).

Atherosklerotische Läsionen entstehen bevorzugt an bestimmten Stellen der arteriellen Gefäße, wie Bifurkationen oder Krümmungen. An diesen Stellen kommt es zu charakteristischen Veränderungen im Blutfluss wie erhöhten Turbulenzen und verminderter Scherspannung (13). Die vaskulären Zellen in diesen Bereichen zeigen andere morphologische Eigenschaften als an den Stellen, wo der Blutfluss gleichmäßig und somit laminar ist. Sie sind polygonal und weisen keine besondere Ausrichtung auf. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Durchlässigkeit des Endothels für Makromoleküle wie LDL und ein vermehrtes Anheften, Migration und Ansammlung von Monozyten und T-Zellen (14).

Die Anhäufung von oxidativ verändertem LDL in der Intima trägt wesentlich zur Rekrutierung von Monozyten und zur Bildung von Schaumzellen bei und spielt die zentrale Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose (14). LDL gelangt durch die sog. Transzytose dabei relativ ungehindert durch Endothelzellen in die Arterienwand mit Hilfe des Scavenger-Rezeptors SR-B1 (15). Makrophagen nehmen allerdings natives LDL nicht schnell genug auf, um Schaumzellen zu bilden. In die Gefäßwand eingelagertes LDL ist ein instabiles Molekül und wird nach der Aggregation in der Intima durch Oxidation, Lipolyse und Proteolyse modifiziert (15). Die Anhäufung und Aggregation von LDL steigt mit dem systemischen LDL-Spiegel. Oxidativ veränderte Lipide und LDL (oxLDL) steigern die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Sekretion von Chemokinen durch Endothelzellen, was wiederum zu weiterer Infiltration von Immunzellen in die Intima führt (16). Auch die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) – ein wichtiger chemischer Mediator mit atheroprotektiven Eigenschaften (unter anderem Vasorelaxation) – wird von oxLDL inhibiert (14).

Das Vorhandensein von Makrophagen in der Intima weist auf das Fortschreiten der Atherogenese hin (11). Die chronische Entzündung führt zu der weiteren Infiltration und Aktivierung der Immunzellen mit Ausschüttung von hydrolytischen Enzymen, Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren. Das wiederum führt schließlich zu einer fokalen Nekrose (13). Physiologisch durchlaufen täglich viele Körperzellen die Apoptose, die aber im Gleichgewicht zu Zellwachstum und Phagozytose von apoptotischen Körpern steht. Dieses Gleichgewicht ist in der Atherosklerose gestört. Die meisten Zellen innerhalb der atherosklerotischen Plaques, darunter Endothelzellen, Lymphozyten und Makrophagen, durchlaufen nachweislich einen apoptotischen Zelltod. Dieser apoptotische Prozess und die mangelhafte phagozytäre Beseitigung der apoptotischen Körper spielen die grundlegende Rolle bei der Entstehung des nekrotischen Kerns (12). Die durch das umgebende fibröse Gewebe eingekapselte fokale Nekrose stellt – nach dem Konsens der American Heart Association – die erste fortgeschrittene Koronarläsion dar und wird als Fibroatheroma bezeichnet (11). Fibroatheroma werden von weiterer Infiltration der Makrophagen, aber auch von fokalem Verlust von Proteoglykanen und Kollagenmatrix, Ansammlung von freiem Cholesterin und Expansion der Nekrose begleitet und können sich zur sogenannten Thin-Cap Fibroatheroma entwickeln. TCFA besteht aus einem großen nekrotischen Kern, der von einer dünnen (< 65 µm) fibrösen Kappe mit reichlich

Schaumzellen umgeben ist, und gilt als instabile Form der Plaque mit erhöhtem Risiko einer Plaqueruptur (11).

Die Plaqueruptur ist die befürchtete Komplikation und Endstufe der atherosklerotischen Läsion und verantwortlich für die Mehrheit der akuten Koronarthrombosen. Die Plaqueruptur ist durch das Vorhandensein eines luminalen Thrombus gekennzeichnet, der über einer dünnen, zerrissenen fibrösen Kappe liegt. Sobald die fibröse Kappe reißt und der Inhalt des nekrotischen Kerns dem Blut ausgesetzt ist, wird die Gerinnungskaskade als Reaktion auf die Exposition von Lipiden und Gewebefaktoren aktiviert (11). Ruptur betrifft meistens die Ränder der Plaques, die reich an Schaumzellen sind. Schaumzellen weisen einen pro-inflammatorischen Charakter auf. Passend dazu ist eine Zunahme der Inzidenz von Herzinfarkten und Schlaganfällen während akuter Infektionen in der Literatur beschrieben, was die prothrombotische Rolle von bestimmten, an der Plaque Formation beteiligten, Entzündungsmediatoren unterstreicht (15).

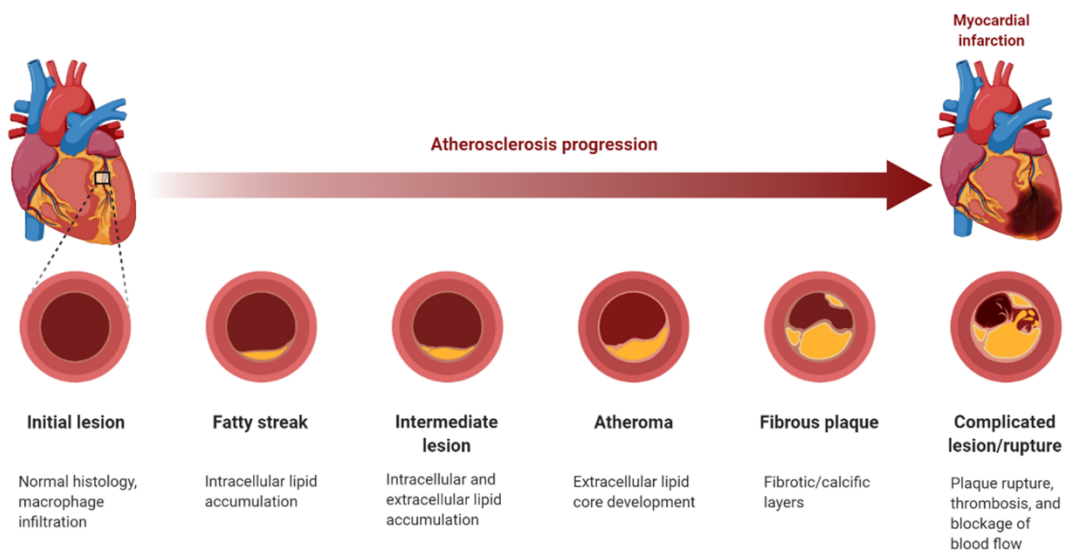


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Progression der Atherosklerose.

Quelle: BioRender.com.

Die andere Komplikation der Atherogenese und ätiologische Ursache für Koronarthrombose stellt die Plaqueerosion dar. Die Erosion bedeutet eine akute Thrombose ohne Ruptur der Läsion. Der Thrombus steht in dem Fall in direktem Kontakt zu der Intima, die aber keine Endothelschicht aufweist.

In der Literatur wird der Pathomechanismus der Atherogenese, besonders seine entzündliche Komponente, als eine sich selbst aufrechterhaltende und ausbreitende positive Rückkopplungsschleife beschrieben (15). Da die Makrophagen in der Lage sind LDL zu oxidieren und oxLDL ein Entzündungsmediator ist, der die Infiltration von weiteren Monozyten aus dem Blut ermöglicht, wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese Ereignisse eine Schleife mit positiver Rückkopplung bilden könnten (15). Die ersten Hinweise auf einen solchen Mechanismus bieten die Experimente an den Tiermodellen. In einer Studie mit Kaninchen wurden fortgeschrittene Läsionen durch eine cholesterinreiche Ernährung induziert, die aber nach der Umstellung auf das Standardfutter weiterhin progredient waren. Auch die Kalorienbegrenzung war in dem Fall ineffektiv (15).

Die pathologischen Studien haben gezeigt, dass bei Verstorbenen aufgrund von plötzlichem Herztod bei bis zu 50 bis 75% akute intraluminale Thromben nachgewiesen werden konnten. Bei den übrigen Fällen konnten zwar keine Thromben, aber eine schwere atherosklerotische Veränderung mit über 75% Einengung der Koronargefäße beobachtet werden (11). Die Genese von Atherosklerose ist multifaktoriell, genauso wie die Risikofaktoren und mögliche Ursachen. Die am besten etablierten sind erhöhtes und modifiziertes LDL, freie Radikale aufgrund von Rauchen, Bluthochdruck und Diabetes mellitus. Die genetische Komponente spielt ebenfalls eine signifikante Rolle (13). Die Atherosklerose beginnt häufig in frühen Lebensjahren (17) und schreitet, auch asymptomatisch, je nach lebenslanger Exposition gegenüber diesen genetischen und umweltbedingten Risikofaktoren weiter fort und führt zur klinisch manifesten CVD (5).

Die am besten etablierte atheroprotektive Präventionsmaßnahme stellt heutzutage immer noch die Lebensstiländerung mit Gewichtsreduktion und Begrenzung der sitzenden Tätigkeit dar. Es ist bekannt, dass die erhöhte körperliche Aktivität unabhängig von der Intensität das Risiko für vorzeitige Sterblichkeit wesentlich reduziert (5). Die Pharmakotherapie der Atherosklerose basiert grundsätzlich auf der Einstellung und Behandlung von Bluthochdruck, Hyperlipoproteinämie, Diabetes mellitus wie auch auf der Modifizierung der Gerinnungskaskade (16).

1.3. Darm-Mikrobiom und Atherosklerose

In den letzten Jahren wurde der Darmmikrobiota zunehmende Aufmerksamkeit gewidmet. Als Darmmikrobiota bezeichnet man alle Mikroorganismen, die sich im Magen-Darm-Trakt aufhalten (18). Die Größe dieser Population schätzt man auf bis zu 100 Billionen – mehr als die aller anderen mikrobiellen Floras, die sich im menschlichen Körper befinden, und bis zu 10-mal mehr als die Gesamtzahl unserer Körperzellen (19). Die Biomasse der Darmmikrobiota kann bis zu 1,5 kg erreichen und könnte als ein mehrzelliges Organ von der Größe der Leber betrachtet werden (20).

Die Gesamtheit aller Genome der Mikrobiota wird als Mikrobiom bezeichnet. Es kann die Anzahl der Gene in unserem Genom um das 100-Fache übertreffen und stellt uns genetische und metabolische Fähigkeiten zur Verfügung – z.B. unzugängliche Nährstoffe zu verwerten, die wir nicht selbst entwickelt haben (19).

Das Mikrobiom ist plastisch – seine Zusammensetzung ändert sich u.a. mit dem Alter und der Ernährung und unterscheidet sich sowohl von Mensch zu Mensch als auch von Population zu Population (20). Der fötale Darm ist keimfrei und wird erst bei der Geburt mit Mikroben aus der vaginalen und fäkalen Mikrobiota der Mutter besiedelt. In den ersten Lebenstagen kommen weitere Mikroben aus der Umwelt hinzu. Die frühe Besiedlung hängt unter anderem von der Art der Entbindung, der Ernährung, der Hygiene und eventueller antibiotischer Behandlung ab. Die ersten Besiedler sind fakultative Anaerobier (*Escherichia coli* und *Streptococcus spp.*), während obligate Anaerobier mit der Abnahme des Sauerstoffgehalts im Darm hinzukommen (20). Es wird geschätzt, dass sich die Mikrobiota des Kindes im Alter von 3 Jahren stabilisiert und von zwei Bakteriengruppen – den *Bacteroidetes* und den *Firmicutes* – dominiert wird, wobei seltener vorkommende Gruppen wie *Actinobacteria*, *Proteobacteria* und *Verrucomicrobia* ebenfalls vorhanden sind (21). Unter den zahlreichen endogenen und exogenen Faktoren hat sich die Ernährung als entscheidender Faktor für die Struktur und Funktion der Darmmikrobiota erwiesen. Es hat sich gezeigt, dass sich die Mikrobiota an größere Veränderungen in der Zusammensetzung und Menge der Nahrung wie auch an Ernährungsumstellungen durch Schlaf-Wach- und Fastenzyklen anpassen kann (22).

Das Darm-Mikrobiom beeinflusst über komplexe Stoffwechselwege die Entwicklung von diversen Krankheiten, unter anderem auch kardiovaskulären Erkrankungen, chronisch-entzündlichen Erkrankungen, Adipositas, Insulinresistenz sowie Atherosklerose und Thrombose (23). Ebenfalls ist das Darm-Mikrobiom an der Regulation des Glukose- und Cholesterinstoffwechsels des menschlichen Körpers beteiligt (24). Bei konventionell aufgezogenen Mäusen (in Anwesenheit einer intakten Darmmikrobiota) konnten – im Vergleich zu keimfreien Mäusen – kleinere aortale Läsionen, niedrigere Cholesterin- und Triglycerid-Werte im Plasma und verminderte Fettleibigkeit beobachtet werden (25). Darüber hinaus weisen die Mäuse mit intaktem Mikrobiom im Vergleich zu keimfreien Mäusen einen erhöhten Gehalt an Energiestoffwechselprodukten wie Brenztraubensäure, Zitronensäure, Fumarsäure und Apfelsäure auf (26).

Die systemische Inflammation wird ebenfalls durch die Zusammensetzung und Aktivität der Darmmikrobiota beeinflusst. Die Überführung einer proinflammatorischen Mikrobiota reicht aus, um Entzündungen und Atherosklerose in antibiotisch behandelten Mäusen, die ein dem Menschen ähnliches Lipoproteinprofil aufweisen, zu fördern (27). Dabei zeigten die Mäuse eine erhöhte Anzahl von Leukozyten (insbesondere Monozyten und Neutrophile) und proinflammatorischen Plasmazytokinen im Blut und eine Anhäufung von Neutrophilen in atherosklerotischen Plaques (27).

Zahlreiche von der Darmmikrobiota produzierte Metaboliten sind biologisch aktiv und beeinflussen damit den Phänotyp des Wirts. Die Erkenntnisse aus der Mikrobiomforschung deuten darauf hin, dass verschiedene Nährstoffe, Metaboliten und Mikroorganismen sich sowohl als vorteilhaft wie auch als nachteilig für die Gesundheit des Wirts auswirken (22). Die Darm-Metagenome der Patient:innen mit einer symptomatischen Atherosklerose zeigten beispielsweise eine Anhäufung von Genen, die für die Peptidoglykan-Synthese zuständig sind, begleitet von gleichzeitiger Reduktion an Phytoen-Dehydrogenase (ein Enzym, das an der Biosynthese von Carotinoiden beteiligt ist) und Serumspiegeln von B-Carotin. Der atheroprotektive Charakter von Phytoen-Dehydrogenase und seine Assoziation mit erhöhten Serumspiegeln der B-Carotin wurde dabei den antioxidativen Eigenschaften von B-Carotin zugeschrieben. Interessanterweise folgten auf diese Befunde auch Veränderungen in der Mikrobiota selbst. Die Gattung *Collinsella* war bei Patienten mit

symptomatischer Atherosklerose angereichert, während *Roseburia* und *Eubacterium* bei gesunden Kontrollpersonen besonders stark vertreten waren (28). Ein weiterer Plasmametabolit – Phenylacetylglutamin (PAGln) – wurde mit kardiovaskulären Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. Studien zeigten, dass das mikrobielle *porA*-Gen die Umwandlung von über die Nahrung aufgenommenem Phenylalanin in Phenylelessigsäure und die anschließende Bildung von PAGln im Wirt fördert. PAGln vermittelt zelluläre Ereignisse über adrenerge Rezeptoren (α 2A-, α 2B- und β 2-adrenerge Rezeptoren) und begünstigt Herz-Kreislauf-Erkrankungen, indem es die Thrombozytenaktivierung und das Thrombosepotenzial erhöht (29).

Einer der am intensivsten erforschten, vom Darm-Mikrobiom abhängigen Metaboliten ist das Trimethylamin-N-oxid (TMAO). Höhere TMAO-Plasmaspiegel wurden mit einem erhöhten Risiko für Herzinfarkte, wiederkehrende Schlaganfälle und kardiovaskuläre Todesfälle in Verbindung gebracht (30) und Metanalysen setzten sie mit einer erhöhten Inzidenz der Gesamtmortalität in allen untersuchten Probanden- und Untergruppen in Beziehung (31). TMAO wird aus mit der Nahrung aufgenommenem Cholin und L-Carnitin – einem Trimethylamin, das in rotem Fleisch reichlich vorhanden ist (32) – im Rahmen von Verstoffwechslungsprozessen der Mikrobiota des Darms sowie nachfolgend in der Leber produziert (30). Es ist mittlerweile eine Reihe von potenziellen mechanistischen Verbindungen zwischen TMAO und der Förderung der Atherosklerose beschrieben. In Tiermodellen führte es zu einer erhöhten Cholesterinakkumulation in Makrophagen und zur Bildung von Schaumzellen, indem es die Expression der Scavenger-Rezeptoren auf Makrophagen erhöhte (30). Darüber hinaus verringert es erheblich den reversen Cholesterintransport (32) und erhöht die Konzentration proinflammatorischer Monozyten (30). Eine Cholin-Supplementierung erhöht den Plasma-TMAO-Spiegel bei konventionell aufgezogenen Mäusen. Interessanterweise wurde dieser Anstieg der TMAO-Synthese und auch der proinflammatorischen Monozyten (30) bei Mäusen mit einer eradizierten Darmmikrobiota, z.B. nach Verabreichung von Antibiotika (33), aufgehoben. Somit war die Mikrobiota für die Produktion von TMAO aus Cholin in der Nahrung erforderlich. Die gezielte Hemmung des ersten Schritts der TMAO-Bildung wurde als potenzieller therapeutischer Ansatz für die Behandlung von kardiometabolischen Erkrankungen vorgeschlagen. Es wurde gezeigt, dass ein strukturelles Analogon von Cholin, 3,3-Dimethyl-1-butanol (DMB), sowohl die Bildung von Trimethylamin (TMA), dem

Vorläufermolekül von TMAO (34), in physiologischen kultivierten Mikroben hemmt als auch den TMAO-Spiegel senkt. DMB hemmt die durch eine Cholin-Diät verstärkte Bildung endogener Schaumzellen und die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen bei Apolipoprotein e^{-/-} Mäusen (35).

1.3.1. Kurzkettige Fettsäuren

Studien belegen, dass eine ballaststoffarme Ernährung mit einer hohen Prävalenz von Bluthochdruck verbunden ist und die Entwicklung einer Herzhypertrophie begünstigen kann (36). Darüber hinaus zeigen prospektive Studien übereinstimmend einen umgekehrten Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Ballaststoffen und dem Risiko einer ischämischen Herzerkrankung. Jeweils 10 g/Tag waren mit einem um 15% geringeren Risiko verbunden, wobei es keinen eindeutigen Unterschied zwischen den Nahrungsquellen für Ballaststoffe gab (37). Es wird vermutet, dass die zugrunde liegenden Mechanismen zum Teil auf den kurzkettigen Fettsäuren (SCFAs) beruhen. SCFAs – insbesondere Acetat, Propionat und Butyrat – sind Produkte der mikrobiellen Fermentation von Ballaststoffen, Proteinen und Peptiden, die der Verdauung durch menschliche Enzyme im oberen Verdauungstrakt entkommen (38). Im distalen Darm können SCFAs durch Diffusion oder durch Natrium-gekoppelten Monocarboxylat-Transporter 1 vermittelten Transport in die Zellen gelangen und als Energiequelle dienen (38). Ihre Konzentration im Darmlumen liegt zwischen 50 und 100 mM (39). Kurzkettige Fettsäuren haben immunmodulatorische Eigenschaften (40), spielen eine zentrale Rolle bei der kardiovaskulären Gesundheit und haben eine potenziell protektive Wirkung bei hypertensiver Herzerkrankung (41).

Mehrere Studien belegen die Eigenschaften von SCFAs bzw. von einzelnen Vertretern. Ein Mangel an präbiotischen Ballaststoffen prädisponierte Mäuse zu Bluthochdruck mit daraus resultierendem pathologischem Herz-Remodeling und Fibrose. Die Wiedereinführung von SCFAs bei Mäusen mit Ballaststoffmangel kehrte diese Effekte um (36). In einer anderen Studie senkte ein akuter SCFA-Bolus den Blutdruck bei betäubten Mäusen (42). Diese kardio-protective Wirkungen wurden in erster Linie über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren 41 und 43 (GPR41 und GPR43) – spezifischen SCFA-Rezeptoren – vermittelt. Passend dazu entwickelten GPR41-Knockout-Mäuse auch eine isolierte systolische Hypertonie (42). GPR41 und GPR43 sind am Gefäßendothel intakter Gefäße lokalisiert und vermitteln die

blutdrucksenkende Wirkung der SCFAs durch Verringerung des aktiven Gefäßtonus (42). SCFAs, die von GPR41 und GPR43 wahrgenommen werden, bewirken die Freisetzung des Peptids YY (PYY) und Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1), die das Sättigungsgefühl und die Darmpassage beeinflussen und die Insulinsekretion fördern, was nachweislich zu einer deutlichen Reduzierung der Gewichtszunahme führt (38).

Butyrat ist die primäre Energiequelle für Kolonozyten und wurde von den SCFAs am ausführlichsten untersucht. Es hat sich gezeigt, dass es vor Darmkrebs schützt, zum Teil aufgrund seiner Eigenschaft, Histon-Deacetylasen-(HDAC-)Enzyme, die die Expression unterschiedlicher Gene, einschließlich Zellproliferation, Apoptose und Differenzierung, verändern, zu hemmen (38). Als HDAC-Inhibitor ist Butyrat in der Lage, proinflammatorische Lamina-propria-Makrophagen und die Differenzierung von dendritischen Zellen aus Knochenmarkstammzellen zu beeinflussen und zu unterdrücken, wodurch unser Immunsystem hyporeagibel wird und Entzündungsprozesse vermindert werden (38). Die Butyrat-produzierende Bakterienart – *Roseburia sp.* – korreliert umgekehrt mit der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen in Mäusepopulationen. In den Studien mit keimfreien Apolipoprotein-E-defizienten Mäusen, die mit synthetischen Mikrobengemeinschaften kolonisiert wurden, beeinflusste *Roseburia intestinalis* die Genexpression im Darm, lenkte den Stoffwechsel weg von der Glykolyse und hin zur Fettsäurenverwertung, senkte die systemische Entzündung und verminderte die Atherogenese. Darüber hinaus reduzierte die intestinale Verabreichung von Butyrat die Endotoxämie und die Entwicklung von Atherosklerose (43). Des Weiteren hat sich gezeigt, dass Mäuse, die mit einer Butyrat-reichen, fettigen Diät gefüttert wurden, eine erhöhte Thermogenese und einen erhöhten Energieverbrauch entwickeln und daher resistent gegen Fettleibigkeit sind (38).

1.3.2. Propionat

Propionat ist eine weitere, mit dem Darm-Mikrobiom assoziierte kurzkettige Fettsäure. Propionate, einschließlich Propionsäure, Natriumpropionat und Kalziumpropionat, werden in großem Umfang als Konservierungsmittel für Bäckereiprodukte und einige Käseprodukte verwendet, seitdem sie im Jahr 1938 als Konservierungsmittel vorgeschlagen wurden. Die Behandlung mit Propionsäure führt zu einer Verringerung der Pilz- und Schimmelpilzpopulationen sowie zur Reduktion von *Salmonella*

typhimurium in Lebens- und Futtermitteln. Propionsäure wird zwar als Konservierungsmittel verwendet, aber natürlich gebildete Propionsäure wurde in einigen traditionellen fermentierten Produkten wie Fischsauce oder gesalzenem Fisch nachgewiesen, eine geringe Menge Propionsäure auch in anderen Lebensmitteln wie fermentierten Produkten auf Sojabasis, Essig oder fermentierter Milch (44).

Auch Propionat hat einen wesentlichen Einfluss auf die menschliche Physiologie. Propionat verringerte signifikant die kardiale Hypertrophie, Fibrose, vaskuläre Dysfunktion und Hypertonie in Wildtyp- oder Apolipoprotein-E-Knockout-Mausmodellen. Es senkte auch die Anfälligkeit für kardiale Herzrhythmusstörungen bei Angiotensin-II-infundierten Wildtyp-Mäusen (41). Darüber hinaus zeigt Propionat nicht nur kardioprotektive Eigenschaften, sondern auch eine sehr immunmodulatorische Komponente, die unter anderem bei autoimmunologischen Erkrankungen wie Multipler Sklerose (MS) untersucht wurde. Bei Patient:innen mit MS wurde eine veränderte Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms festgestellt, insbesondere in den frühen Stadien der Krankheit, was zu einer Verringerung des Propionat-Spiegels führte (40). Eine Propionat-Supplementierung wirkte sich positiv auf immunologische, neurodegenerative und klinische Parameter bei MS-Patient:innen aus, und Follow-up-Analysen ergaben eine verringerte jährliche Schubrate, eine Stabilisierung der Krankheit und eine verringerte Hirnatrophie nach 3 Jahren (40). Eine weitere experimentelle Studie zur Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) zeigte, dass langkettige Fettsäuren (LCFAs) die SCFAs im Darm konsequent dezimierten und den Krankheitsverlauf damit negativ beeinflussten. Eine Behandlung mit SCFAs, darunter Propionat, verbesserte die EAE und milderte die axonale Schädigung (45).

Die kardioprotektiven und neuroprotektiven Wirkungen von Propionat beruhen hauptsächlich auf dem Gleichgewicht der T-Zellen (40)(41)(45). T-Zellen gehören zusammen mit den B-Zellen zum adaptiven Immunsystem. Sie sezernieren sowohl pro- als auch antiinflammatorische Zytokine (CD4⁺-T-Helferzellen), können aber auch Entzündungsprozesse regulieren und unterdrücken (FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen) (46). Die orale Verabreichung von Propionat wirkt sich positiv auf die T-Zell-Homöostase aus (41), d.h. das Gleichgewicht zwischen Effektor-T-Zellen – vorwiegend Th1- und Th17-Zellen – und regulatorischen T-Zellen, das sowohl für systemische und intestinale Entzündungen als auch für das Fortschreiten

atherosklerotischer Läsionen als wesentlich angesehen wird (47). Th1-Zellen sezernieren proinflammatorische Zytokine (z.B. Interferon- γ (IFN- γ)) (48). Damit beeinflussen sie nicht nur die systemische Inflammation, sondern sind auch in der Lage, das Fortschreiten der Läsion zu fördern, die Läsion zu destabilisieren und Monozyten zu aktivieren. Damit stellen sie eine bedeutende pro-atherogene Zellpopulation der T-Helferzellen dar (48, 49). Th17-Zellen tragen sowohl positiv als auch negativ zum Entzündungsprozess bei. Sie produzieren auch IFN- γ und andere pro-atherogene Zytokine, weisen aber auch eine hohe Plastizität auf und können sich in Forkhead-Box-Protein P3-positive regulatorische T-Zellen (FoxP3+ Treg) umwandeln [P30]. Regulatorische T-Zellen haben eine immunmodulatorische Funktion und sind in der Lage, die Aktivität autoreaktiver T-Effektorzellen zu unterdrücken und somit auch das Fortschreiten der Atherogenese zu modulieren (48). Verschiedenen Studien zufolge wird die Wirkung der regulatorischen T-Zellen insbesondere durch die Zytokine IL-10 und TGF- β vermittelt (50). Th1-, Th17- und regulatorische T-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei einer Reihe von Erkrankungen, die durch systemische oder fokale Entzündungen gekennzeichnet sind (48).

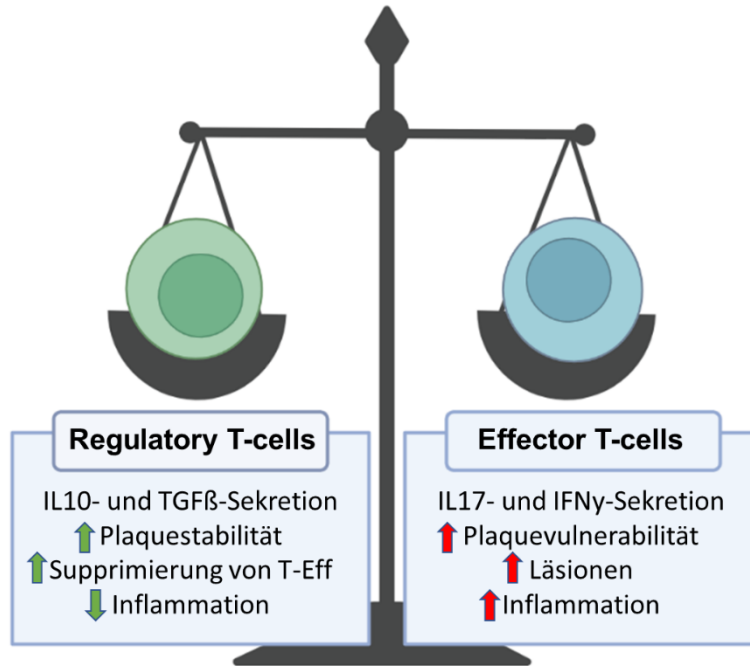


Abbildung 2 Schematische Darstellung des Gleichgewichts der T-Zellen. Gleichgewicht zwischen Effektor-T-Zellen (Th1- und Th17-Zellen) und regulatorischen T-Zellen. Teff sezernieren proinflammatorische Zytokine (z. B. IFN- γ) und beeinflussen die systemische Entzündung und das Fortschreiten der Läsion. Tffregs können Teff durch die Ausschüttung von IL-10 und TGF- β unterdrücken. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

Regulatorische T-Zellen (Tregs) des Dickdarms, die den Transkriptionsfaktor Foxp3 exprimieren, sind entscheidend für die Begrenzung der Darmentzündung, regulieren die intestinale Homöostase und können die Entzündung steuern, indem sie die Proliferation von Effektor-CD4⁺-T-Zellen (Teff) begrenzen (39). Als Modell der T-Zell-vermittelten Autoimmunität sind sowohl MS als auch EAE durch eine Zunahme proinflammatorischer autoreaktiver Effektor-T-Zellen – T-Helfer 17 (Th17) und T-Helfer 1 (Th1) – und eine Abnahme der Anzahl regulatorischer Tregs gekennzeichnet (40) (45). Die Zufuhr von Propionat bei Patienten mit Multipler Sklerose (MS) kehrte das Ungleichgewicht zwischen Treg-Zellen und Th17-Zellen um. Nach einer 2-wöchigen Einnahme von Propionat konnten ein signifikanter und anhaltender Anstieg der funktionell kompetenten Treg-Zellen und ein Rückgang der Th1- und Th17-Zellen beobachtet werden (40). Eine Mikrobiomanalyse ergab eine erhöhte Expression von Treg-Zellen-induzierenden Genen im Darm. Außerdem normalisierte Propionat die

mitochondriale Funktion und Morphologie der Tregs (40). Das Beispiel der EAE zeigt ebenfalls, dass Fettsäuren in der Nahrung die T-Zell-Differenzierung im Darm beeinflussen. LCFAs verringerten die SCFA-Spiegel im Darm und verschlechterten den Verlauf der Erkrankung möglicherweise durch Erhöhung der Th1- und/oder Th17-Zellpopulationen im Dünndarm (45). Andererseits verbesserte Propionat die EAE und verringerte die axonale Schädigung durch eine langanhaltende Prägung von Treg-Zellen, die aus der Lamina propria stammen, und erhöhte deren Differenzierung. Die kardioprotektiven und blutdrucksenkenden Wirkungen von Propionat sind ebenfalls hauptsächlich von regulatorischen T-Zellen abhängig, da sie bei Mäusen mit Angiotensin-II-Infusion, bei denen die regulatorischen T-Zellen dezimiert waren, aufgehoben wurden (41). Die orale Verabreichung von Propionat wirkte sich positiv auf die Homöostase der T-Helferzellen aus und milderte die systemische Entzündung. Dieser Effekt wurde in Form einer Verringerung der Häufigkeit von Effektor-T-Zellen unter anderem Th17-Zellen in der Milz sowie einer Verringerung der lokalen Infiltration von Immunzellen im Herzen von Wildtyp-Mäusen quantifiziert (41).

SCFAs werden von den Epithelzellen des Dickdarms aufgenommen, diffundieren aber auch durch das Epithel in die Lamina propria, wo sie ihre Wirkung direkt entfalten können. Die Zugabe von SCFAs zum Trinkwasser von keimfreien Mäusen über 3 Wochen führte zu einer erhöhten Häufigkeit und Anzahl von Tregs im Dickdarm. Wie vorher erwähnt sind die Kolon-Tregs in der Lage, die intestinale Homöostase zu regulieren, indem sie die Proliferation von Effektor-CD4⁺-T-Zellen begrenzen, und die Zugabe von SCFAs zu Treg- und Teff-Kokulturen steigerte diese unterdrückende Fähigkeit (39). Sowohl in vivo als auch in vitro führte die Propionat Stimulation von Tregs, die aus keimfreien Mäusen isoliert wurden, zu einer signifikant erhöhten Expression von Foxp3 und Interleukin-10 (IL-10), das Schlüsselzytokin bei der Treg-vermittelten Suppression. Die In-vitro-Behandlung steigerte die IL-10-Produktion, nicht aber den transformierenden Wachstumsfaktor- β (TGF- β) - ein weiteres Treg-vermitteltes Zytokin - was darauf hindeutet, dass SCFAs spezifisch Foxp3⁺ IL-10-produzierende Tregs induzieren (39). Eine Verringerung der Tregs auf ein ähnliches Niveau wie bei keimfreien Mäusen wurde nach einer Behandlung mit dem Antibiotikum Vancomycin berichtet, das auf Gram-positive Bakterien abzielt und die Darmmikrobiota stört. Bei einer Behandlung mit einer Kombination aus Vancomycin und SCFA wurde die Verringerung der Tregs jedoch vollständig wiederhergestellt.

Insgesamt deuten diese Ergebnisse auf eine wichtige Rolle von Propionat in der Treg-Homöostase hin (39).

Eine metagenomweite Assoziationsstudie an Stuhlproben von Patient:innen mit atherosklerotischer CVD bestätigte, dass bei Personen mit atherosklerotischer CVD im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen weniger Butyrat produzierende Bakterien wie *Roseburia spp.* und *F. prausnitzii* sowie unbenannte Clostridien vorkommen. In ähnlicher Weise war eine Bakterien-Gruppe, das an der Propionat-Synthese beteiligt ist, bei Patienten mit atherosklerotischer CVD im Vergleich zu Kontrollpersonen in geringerer Menge vorhanden. Das Potenzial für den Stoffwechsel von Glycerolipiden und den Abbau von Fettsäuren war bei atherosklerotischer CVD erhöht, während das Potenzial für die Synthese der entzündungshemmenden kurzkettigen Fettsäuren geringer war (34). Darüber hinaus wurde berichtet, dass das Darm-Mikrobiom bei Patienten mit kardiometabolischen Erkrankungen insgesamt weniger fermentativ und entzündungsfördernd ist, was darauf hinweist, dass die Wiederherstellung einiger Mitglieder des gesunden Darm-Mikrobioms das Risiko dieser Erkrankungen positiv beeinflussen könnte (34).

1.4. Fragestellungen

Atherosklerotische Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen weltweit eine große Belastung für das Gesundheitssystem und eine der Hauptursachen für Mortalität und Morbidität dar. Sollte sich die Entwicklung der kardiovaskulären Risikofaktoren mit aktuellen Trends fortsetzen, kann es z.B. in Osteuropa sogar zu dem erneuten Anstieg der CVD-bezogenen Sterblichkeit kommen (4). Das macht die wirksame und effektive Prävention der CVD zu einer systemrelevanten Aufgabe und muss deswegen weiterhin verbessert werden.

Epidemiologische Studien deuten darauf hin, dass eine ausreichende Aufnahme von Ballaststoffen zur Vorbeugung von atherosklerotischen Gefäßerkrankungen beitragen kann (37). Intestinaler Cholesterinstofftransport und die Absorption sind eine Schlüsselkomponente des Cholesterinstoffwechsels, der einen wichtigen Faktor in der Entwicklung der Atherosklerose darstellt. Propionat zeigte nach den jüngsten Erkenntnissen eine modulierende Wirkung auf die intestinale T-Zell-Immunität (45) und deren Beteiligung an der Kontrolle des systemischen Stoffwechsels (51). Tregs haben

die Fähigkeit die chronische Inflammation, aber auch den Cholesterinstoffwechsel zu modulieren (52). Die Zunahme der Treg-Zellpopulation als Reaktion auf Propionat wurde von erhöhten Konzentrationen von Interleukin IL10, dem wichtigsten Treg-Zytokin, in der Dünndarmwand begleitet (39). In Anbetracht der sich daraus ergebenden potenziellen Verbindung zwischen Propionat, Tregs und Lipidkontrolle stellten wir die Hypothese auf, dass Propionat eine atheroprotektive Wirkung haben könnte, die durch die Modulation des adaptiven Immunsystems im Darm vermittelt wird. Dies war die Grundlage für die Zielsetzung dieser Arbeit, die folgende Fragestellungen beantworten sollte:

- 1. Beeinflusst die Depletion des Darm-Mikrobioms den Schweregrad der Atherosklerose im Mausmodell der Atherosklerose?**
- 2. Beeinflusst der vom Darm-Mikrobiom stammende Metabolit Propionat den Schweregrad der Atherosklerose im Mausmodell?**
- 3. Kann Propionat seine Eigenschaften in Abwesenheit des Darm-Mikrobioms beibehalten?**
- 4. Beeinflusst Propionat die intestinale Expression von Niemann-Pick C1-like Protein 1 (NPC1L1)?**
- 5. Wird der Wirkmechanismus von Propionat durch das Interleukin-10 vermittelt?**

Zur Beantwortung der Fragestellungen beschäftige ich mich mit histologischen Untersuchungen der atherosklerotischen Veränderungen der Aortenwurzel und der Veränderungen der Expression des NPC1L1 im Dünndarm unter verschiedenen experimentellen Bedingungen.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Tierhaltung

Tabelle 1 Versuchstiere

Stamm	Zucht
C57BL/6J	Charles River
C57BL/6J, ApoE -/-	Charles River

Tabelle 2 Versuchsdiäten

Diät	Standard Chow Diet (SCD)	High Fat Diet (HFD)
Trockensubstanz	95,2%	94,0%
Rohprotein	20,8%	24,1
Rohfett	4,2%	34,6%
Cholesterin (mg/kg)	14	290
Rohfaser	5,0%	6,0%
Rohasche	5,6%	6,1%
Stickstoff – freie Extrakte	59,4%	23,3%
Stärke	46,8%	0,5%
Zucker	10,8%	9,5%
Dextrin	-	15,3%
Hersteller	Sniff (Kat.: E15000)	Sniff (Kat.: E15741)

Tabelle 3 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Materialien	Hersteller
Haarnetz	B. Braun Melsungen AG
Mundschutz	B. Braun Melsungen AG
Handschuhe / sterile Handschuhe	B. Braun Melsungen AG
Spritzen – 1 ml	B. Braun Melsungen AG
Falcons – 50 ml, 10 ml	Beckton Dickinson (BD)
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf
Käfige	Tecniplast
Trinkflaschen	Tecniplast

Tabelle 4 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Hersteller
Ethanol	Carl Roth
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich
MilliQ-Wasser	Merckmillipore
Propionat (PA)	Sigma-Aldrich (Calciumpropionat)
Antibiose-Cocktail	Ampicillin/Sulbactam, Vancomycin, Ciprofloxacin, Imipenem, Metronidazol
Dulbeccos Phosphate Buffered Saline	Thermo Fisher Scientific

2.1.2. Histologie

Tabelle 5 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
Sterifilter 0,2 µm	Kisker Biotech
Handschuhe	B. Braun Melsungen AG
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf
Pipettenspitzen	Sarstedt AG
Falcons (50 ml)	Becton Dickinson (BD)
Kryoeinbettformen	Tissue-Tek
Objektträger SuperFrost® plus	R. Langenbrick GmbH
Deckgläser	Roth

Tabelle 6 Chemikalien und Lösungen

Chemikalien / Lösungen	Hersteller
Ethanol	Carl Roth
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma
O.C.T. Compound	Tissue-Tek
Paraformaldehyd 4% / 10%	Sigma-Aldrich
Oil-Red-O Arbeitslösung	
Methanol	Carl Roth
Oil-Red-O Pulver	Sigma-Aldrich
Natronlauge	Sigma-Aldrich
Glyceringelatine	Sigma-Aldrich
Hämalaun nach Mayer	Carl Roth
Eosin Y	Sigma-Aldrich
Xylol	Carl Roth
Eukitt	ORSAtec
ABC Peroxidase Standard Staining Kit	Thermo Scientific
Carbazol	Sigma-Aldrich
Tris-buffered saline	Fisher BioReagents
Essigsäure	Sigma-Aldrich
N,N-Dimethylformamid	Sigma-Aldrich

Tabelle 7 Antikörper

Antikörper	Hersteller
IL-10R Monoklonal Antikörper (1B1.2)	Invitrogen
Anti-CD68 antibody (ab53444)	Abcam
Rabbit Anti-Rat IgG AB, Biotinylated	Vector Laboratories
NPC111 polyclonal Rabbit Antibody	Novus Biologicals

2.1.3. Geräte und Software

Tabelle 8 Geräte

Gerät	Hersteller
Pipetten	Eppendorf
Gefriergerät -80 °C MDF-U72	Sanyo

<i>Gefriergerät -20 °C</i>	Bosch
<i>Kühlgerät +4 °C</i>	Bosch
<i>Fluoreszenzmikroskop</i>	Keyence
<i>Kryostat Microm HM 560</i>	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 9 Software

Software	Hersteller
<i>Microsoft Excel 2016</i>	Microsoft Corp.
<i>Microsoft Word 2016</i>	Microsoft Corp.
<i>Microsoft PowerPoint 2016</i>	Microsoft Corp.
<i>GraphPad PRISM 8.4.2</i>	GraphPad Software
<i>ImageJ 1.52i</i>	Wayne Rasband (NIH)
<i>GIMP 2.8.22</i>	The GIMP Team

2.2. Tierexperimentelle Versuche

2.2.1. Ethischer und rechtlicher Hintergrund

Alle tierexperimentellen Vorhaben wurden vorab vom Landesamt für Gesundheit Berlin (LaGeSo) evaluiert und genehmigt (Tierversuchnummer G0295/16). Die Experimente wurden in Übereinstimmung mit geltenden deutschen und europäischen Tierschutzgesetzen durchgeführt. Um die optimale Betreuung von den Tieren zu gewährleisten, wurde vorab die Funktion A „Durchführung von Verfahren an Tieren“ (Teilnahme am tierexperimentellen Basisfachkudkurs Maus/Ratte (15.-17.11.2017) der Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin (FEM, Charité Universitätsmedizin Berlin)) erworben.

Die Planung des hier vorgestellten Vorhabens erfolgte unter strikter Beachtung des ethischen 3-R-Prinzips (Replace, Reduce, Refine), um die Anzahl und Belastung der Tiere auf ein notwendiges Minimum zu beschränken. Wo immer möglich wurden tierexperimentelle Untersuchungen durch z.B. In-vitro-Verfahren ersetzt („replace“), die Zahl der Tiere so groß wie nötig, aber so klein wie möglich gehalten („reduce“) und unser experimentelles Vorgehen ständig nach den neusten Vorgaben optimiert („refine“).

2.2.2. Tierhaltung

Alle Mäuse gehörten zur Tierart *Mus Musculus* (Hausmaus) und entstammten der Phylum C57B1/6J ApoE^{-/-} (Charles River). Sie wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen in den Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin (FEM, Charité Universitätsmedizin Berlin) gezüchtet und aufgezogen. Anschließend wurden die Mäuse im Tierstall des Instituts für Mikrobiologie (Experimentalstandort der Charité – Campus Benjamin Franklin) untergebracht, wo sie erst nach der Akklimatisation von jeweils 2 Wochen in die Experimente eingeschlossen wurden.

Die Tiere wurden in gängigen, autoklavierten Käfigen (je 3-5 weibliche Mäuse pro Käfig), die mit – ebenfalls autoklaviertem - Papier ausgestattet worden sind, gehalten. Die Käfige wurden in Räumen mit stabiler Raumtemperatur und festem Tag-Nacht-Zyklus (20 °C; 12h-12h) gehalten. Alle Mäuse hatten unbegrenzten Zugang zu Wasser und Futter (ad libitum) und wurden täglich auf eventuelle Kriterien für einen Abbruch des Tierversuchs untersucht (54).

2.2.3. Behandlungsgruppen – Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung

Alle Mäuse waren homozygot für die Deletion des Apolipoprotein-E-Gens (n = 84). Die ApoE^{-/-} Mäuse weisen eine Hypercholesterinämie durch die gestörte Absorption von Lipoproteinen über den LDL-Rezeptor auf. Sie eignen sich deswegen besonders gut für die Erforschung von Ursachen, Mechanismen und Folgen von Atherosklerose (55–57).

2.2.3.1. Sekundär gnotobiotische Mäuse

Für die Fragestellung nach dem potenziellen Zusammenhang des Darm-Mikrobioms und der Entwicklung der Atherosklerose wurde bei 25 ApoE^{-/-} Mäusen eine sekundäre Eradikation des Darm-Mikrobioms durchgeführt. Die Eradikation von Mikrobiota erfolgte durch Behandlung mit einer Quadrupel-Antibiose (Ampicillin/Sulbactam (1 g/L), Vancomycin (500 mg/L), Ciprofloxacin (200 mg/L), Imipenem (250 mg/L), Metronidazol (1 g/L)), welche in autoklaviertem Wasser zubereitet und den Mäusen über die Dauer des gesamten Experiments ad libitum verabreicht wurde. Die erfolgreiche Eradikation des Mikrobioms wurde durch die Kolleg:innen der

Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Heimesaat (AG Gastrointestinale Mikrobiologie, Institut für Mikrobiologie und Infektionsimmunologie) vor Beginn der Experimente wöchentlich anhand von Fäzesproben (Bakterienkultur) überprüft und zusätzlich durch eine Analyse bakterieller ribosomaler RNA bestätigt.

Alle Tiere wurden stets unter strengen aseptischen Bedingungen behandelt. Sie wurden dabei in keimfreien Käfigen untergebracht. Alle Mäuse wurden täglich gewogen und auf eventuelle Auffälligkeiten untersucht. Um die sterilen Voraussetzungen sicherzustellen, fand das Wiegen immer zu zweit statt, wobei eine Person strikt steril gearbeitet hat.

Alle Mäuse waren 12-16 Wochen alt und wurden anhand der erhaltenen Diät in zwei Gruppen unterteilt. Eine Gruppe (n = 5) erhielt die Standard Chow Diet (SCD: Rohfett 4,1%, Cholesterol 14 mg/kg; Sniff, Soest, Deutschland, E15000), die andere (n = 7) erhielt High Fat Diet (HFD: Rohfett 34,6%, Cholesterol 290 mg/kg; Sniff, Soest, Deutschland, E1574). Das gesamte Experiment dauerte 6 Wochen. Die restlichen sekundär gnotobiotischen Mäuse (n = 13) wurden für die Beantwortung weiterer Fragestellungen mit Propionsäure behandelt (in separatem Kapitel besprochen). Als Kontrollgruppen dienten Mäuse entsprechender Diät-Gruppen ohne eradiziertem Mikrobiom (n = 24).

2.2.3.2. Behandlung mit Propionsäure

Auch für die Frage nach der Auswirkung von Propionsäure auf die Atherosklerose wurden die ApoE^{-/-} Mäuse (12-16 Wochen alt, n = 45) anhand entsprechender Diät in zwei Gruppen aufgeteilt (SCD (n = 20) und HFD (n = 25)). Nach 2 Wochen wurden beide Gruppen weiter in eine Interventions- und eine Kontrollgruppe unterteilt. Die Interventionsgruppe (n = 21) erhielt an Calcium gebundenes Propionat (PA); 150 mMolare in 0,2 ml MilliQ-Wasser) via oraler Gavage. Die Kontrollgruppe (n = 24) wurde mit 0,2 ml MilliQ-Wasser behandelt. Alle Mäuse wurden täglich und zur selben Uhrzeit gavagiert und im Anschluss auf die eventuelle Abbruchkriterien untersucht. Diese Behandlung lief über einen Zeitraum von 4 Wochen. Calcium als Trägersubstanz wurde aufgrund seines im Vergleich mit anderen Substanzen kleineren Einflusses auf das kardiovaskuläre System gewählt. Die orale Applikation via Gavage erfolgte aufgrund der Darm-Mikrobiom-entspringenden Herkunft von Propionat im

menschlichen Organismus und der bekannten, effektiven Erhöhung der gemessenen systemischen Propionatwerte (58). Das Experiment endete jeweils nach 6 Wochen.

2.2.3.3. Wirkung von Propionsäure bei Eradikation von Darm-Mikrobiom

Durch die Behandlung sekundär gnotobiotischer Tiere mit Propionat (n = 25) wurde untersucht, ob die Eigenschaften von Propionat durch das Darm-Mikrobiom vermittelt sind und ggf. dieses ersetzen könnten. Dafür wurden die Mäuse nach der Eradikation des Mikrobioms in zwei Gruppen anhand der Diät (SCD (n = 10) vs. HFD (n = 15)) unterteilt und ab der 3. Woche des Experiments nach dem üblichen Protokoll über den Zeitraum von 4 Wochen entweder mit Propionat (n = 13) oder Kontrollflüssigkeit (MilliQ, n = 12) behandelt. Nach 6 Wochen wurden die Tiere euthanasiert und sezirt.

2.2.3.4. Behandlung mit IL10-Rezeptor-Antikörper

Um den potenziell Interleukin-10-übermittelten Wirkungsmechanismus von Propionat zu untersuchen, wurden 15 Mäuse (ApoE^{-/-}, 12-16 Wochen alt) mit intraperitonealer Injektion von IL-10 Rezeptor-Antikörper (monoklonal; clone 1B1.2) behandelt. Die Intervention bewirkte eine Inhibition des IL-10 Rezeptor-vermittelten Signalwegs. Die Injektion fand wöchentlich ab der 3. Experimentwoche (1 mg AK per Maus, per Woche) statt. Alle Mäuse erhielten für 6 Wochen die High-Fat-Diät ad libitum und wurden, ebenfalls ab der 3. Woche, mit PA (n = 8) oder MilliQ-Wasser (n = 7) per oraler Gavage (0,2 ml Flüssigkeit täglich) behandelt. Nach 6 Wochen fand die Sektion statt.

2.2.4. Sektion und Probenentnahme

Alle Experimente endeten nach jeweils 6 Wochen mit Sektion der Versuchstiere. Die Mäuse wurden durch die Zufuhr von 100% Kohlenstoffdioxid (CO₂) eingeschläfert. Durch die Überprüfung des Zwischenzehenreflexes stellten wir den Bewusstseinsverlust der Tiere sicher (59). Der endgültige Tod erfolgte im Anschluss durch die perthorakale Punktion des Herzens. Nach der Entnahme des Blutes (0,5-0,7 ml Vollblut) aus dem linken Ventrikel wurden das Herz und die Aorta mit Injektion von Phosphat-gepufferter Salzlösung gespült. Nachfolgend entnahmen wir die Organe und bereiteten sie für die Aufbewahrung entsprechend vor.

Nach der Entfernung der restlichen Organe wurden, unter mikroskopischer Sicht und mit Hilfe von mikrochirurgischem Besteck, das Herz und die Aorta präpariert (**Abbildung 3A**). Durch die Entfernung der umliegenden Weichteile sowie von Bindegewebe und Fett konnte die Aorta von der Aorta ascendens bis zur iliakalen Bifurkation „au face“ dargestellt werden. Anschließend erfolgte die Entnahme der Proben. Das distale und mittlere Drittel des Herzens sowie weitere Teile der Aorta wurden weggefroren und für weitere Experimente bei -80 °C aufbewahrt. Nach der Trennung von der Aorta (**Abbildung 3B**) wurde das proximale Drittel des Herzens zentral und flach in einer mit OCT vorgefüllten Form platziert und auf Trockeneis weggefroren. Die Proben wurden dann bei -80 °C bis auf weiteres aufbewahrt.

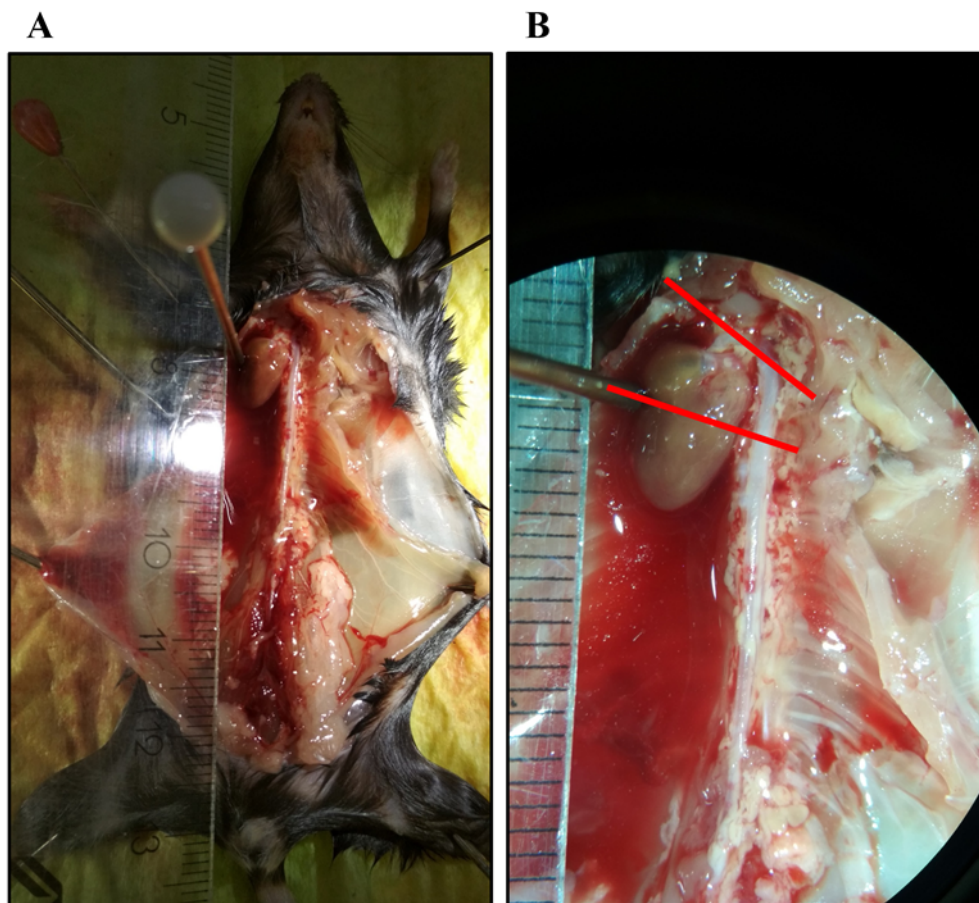


Abbildung 3 Schematische Darstellung der Präparation des Herzens und der Aorta. Im Anschluss an die Organentnahme wurden das Herz und die Aorta au face präpariert und in voller Länge dargestellt (A). Die Proben für die nachfolgenden Analysen der Aortenwurzeln wurden durch Entnahme des proximalen Drittels des Herzens gewonnen (B).

2.3. Histologie

2.3.1. Aortenwurzel

Zur Visualisierung und Quantifizierung der atherosklerotischen Veränderungen wurde die entsprechend präparierte Aortenwurzel (Bereich der Aorta an ihrer Abgangsstelle aus dem Herzen) mit zwei histologischen und einem immunhistochemischen Färbeverfahren getestet. Zur Darstellung der Größe der atherosklerotischen Plaques, bzw. der von ihnen bedeckten Fläche, wurde eine Anfärbung der Lipide mittels Oil-Red-O-Protokoll ausgewählt. Zur weiteren Beschreibung der Plaque wurde sich für eine Standard-Hämatoxylin-Eosin-Färbung und die Anfärbung mittels CD68+ Antikörpern, also eine Färbung der Makrophagen, entschieden.

2.3.1.1. Aufbereitung von Proben

Einen Tag vor der Präparation wurden die gefrorenen Herzproben von -80 °C in den -20 °C -Gefrierschrank gebracht, um über die nächsten 24 Stunden die optimale Präparationstemperatur zu erreichen. Der Kryostat (Microm HM 560, Thermo Fisher Scientific) wurde mit Arbeitstemperatur von -20 °C eingestellt. Mit entsprechender Temperatureinstellung kann das optimale Durchdringen des Messers durch das Präparat erreicht werden. Die richtige Platzierung des eingefrorenen Präparats

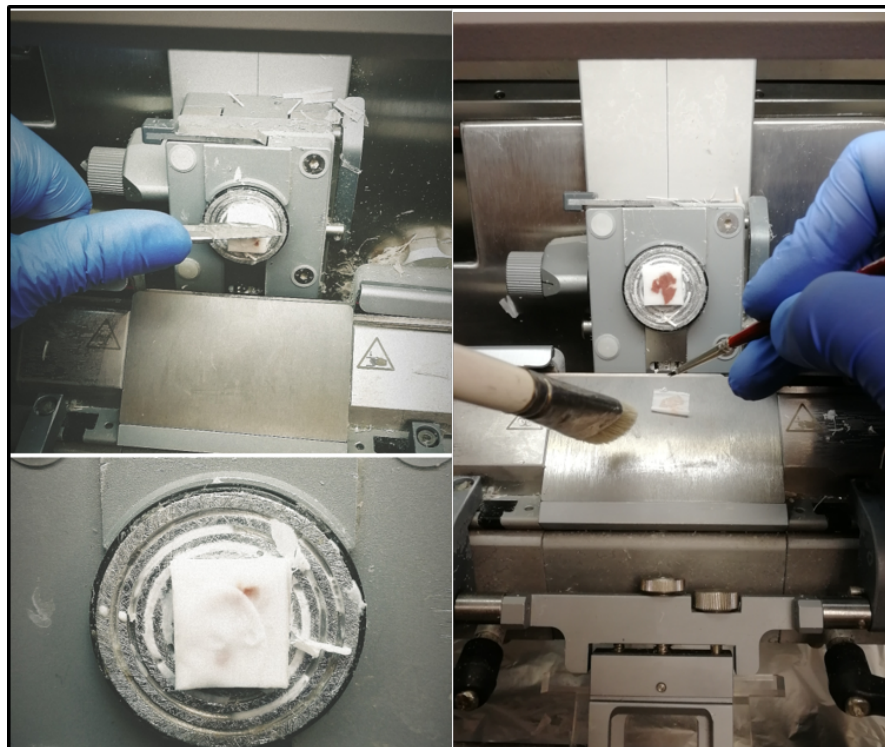


Abbildung 4 Kryotom-Bearbeitung eines Präparats

während des Schneidens ist hingegen für die exakte Darstellung der Aortenwurzel essenziell (**Abbildung 4**).

Die Präparation erfolgte sukzessiv von apikal bis basal mit zunächst groben Schnitten von 30 μm und wurde bei Auffinden des Aortenwurzel-nahen Bereichs mit 5 μm -Feinschnitten fortgesetzt (**Abbildung 5**). Die Ebene wurde während des Schneidevorganges unter dem Mikroskop wiederholt engmaschig kontrolliert, um die korrekte Höhe des Präparats festzustellen. Pro Maus wurden 10 Objektträger fertiggestellt, auf denen die gleichen Schnittebenen mit 5 μm -Verschiebung dargestellt wurden. Die fertigen Objektträger wurden dann bei einer Temperatur von -20 °C bis auf weiteres aufbewahrt.

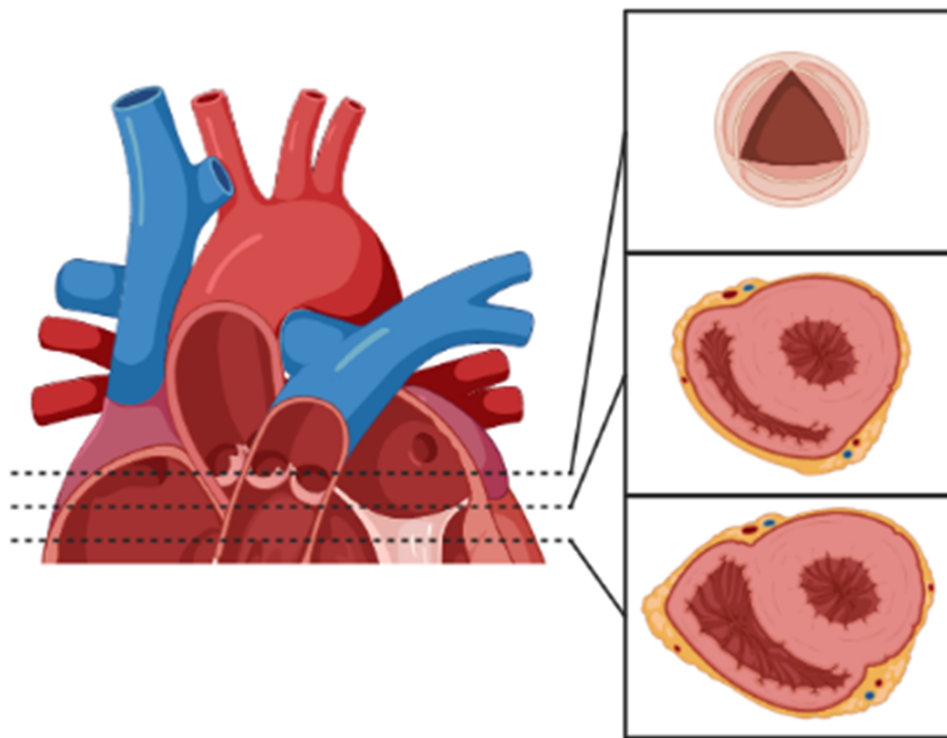


Abbildung 5 Schematische Darstellung des Schneidevorgangs mit dem Kryostat. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

2.3.1.2. Oil-Red-O-Färbung

Die atherosklerotischen Plaques wurden durch die Darstellung der Lipide detektiert. Dafür wurde 1 Objektträger pro Maus nach dem Oil-Red-O Protokoll gefärbt. Zuerst wurden die Präparate für 10 Minuten in 10% Formalin fixiert und anschließend 2-mal je 5 Minuten in PBS-Puffer (Phosphate-buffered saline) gewaschen. Im nächsten Schritt fand die Inkubation in 78% Methanol über 5 Minuten statt. Die eigentliche

Färbung der Lipide und Triglyceride lief im Anschluss in der Oil-Red-O-Arbeitslösung. Die Arbeitslösung bestand aus in Methanol gelöstem Oil-Red-O-0,5%-Pulver und Natronlauge (10 ml 1M NaOH mit 35 ml Oilred-O-Lösung). Der Färbevorgang dauerte immer 10 Minuten. Anschließend wurden die Hintergrundfärbung und Restfarbstoff mit destilliertem Wasser gefolgt von warmem Leitungswasser entfernt. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Glyceringelatine eingedeckt.

2.3.1.3. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Analog zu der Färbung mit Oil-Red-O wurde auch für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung 1 Objektträger pro Maus genommen. Das Fixieren der Gewebe erfolgte in 10% Formalin für 10 Minuten mit anschließendem 5-minütigem Waschvorgang in PBS. Zellkerne wurden mit Hämalaun nach Mayer (10 Sekunden) gefärbt und für 10 Minuten für Bläuen der Kerne in Leitungswasser inkubiert. Anschließend fand die Anfärbung des Cytoplasmas der Zellen in Eosin (5 Sekunden) statt. Die Schnitte wurden danach in 95% und 100% Ethanol entwässert. Die Entfernung des Alkohols verlief in Xylol. Die Schnitte wurden am Ende in Eukitt eingedeckt. Die Zusammensetzung der Alkoholreihe und des Färbevorgangs wurde exemplarisch in **Abbildung 6** dargestellt.

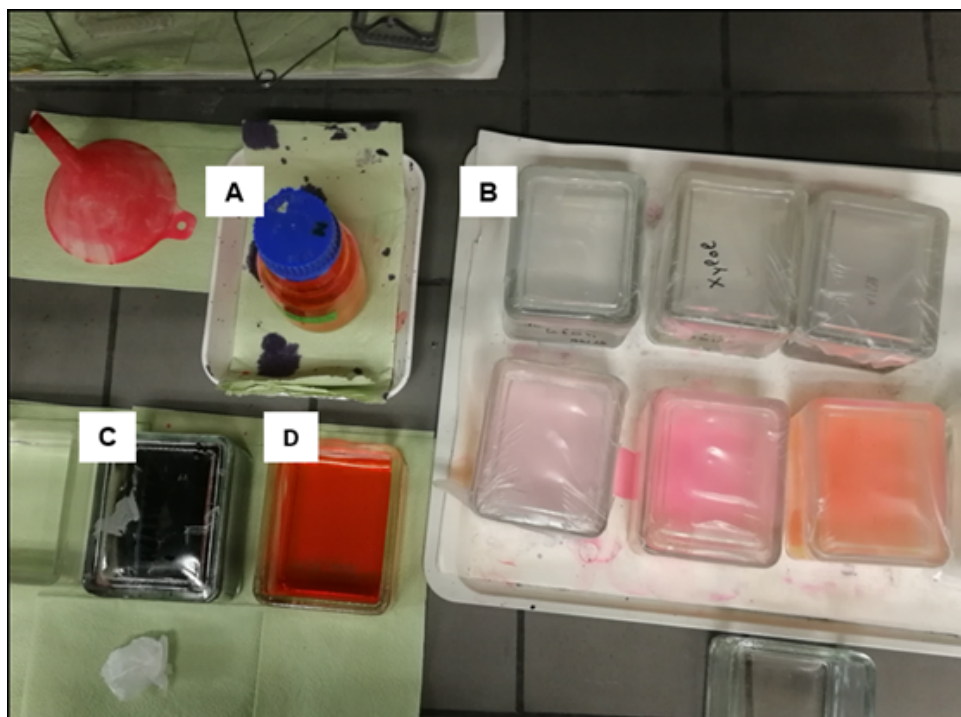


Abbildung 6 Zusammensetzung der Chemikalien für eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung A – Eukitt; B – Alkoholreihe und Xylol; C – Hämalaun nach Mayer; D – Eosin

2.3.1.4. Immunhistochemische Verfahren

In Rahmen der immunhistochemischen Verfahren wurden die CD68+ Makrophagen mittels ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex) gefärbt. Dafür wird das Gewebe zuerst nacheinander mit 2 verschiedenen Antikörpern behandelt. Bei dieser Methode bindet das Vitamin Biotin irreversibel an das Protein Avidin. Durch die Herstellung einer Biotin-Bindung über Avidin zwischen einem entsprechendem Peroxidase-Enzym und dem sekundären Antikörper kann das Enzym anschließend an der Stelle lokalisiert werden, an der der primäre Antikörper mit der Probe interagiert. Dadurch kann das Zielgewebe detektiert und gefärbt werden. Da die Antikörper sehr spezifisch mit Oberflächen-Antigenen reagieren, kann so eine gezielte Färbung erreicht werden. Für unsere CD68+ wurden sekundäre Antikörper vom sogenannten „Rabbit anti Rat“-Typ genutzt, was bedeutet, dass die Antikörper gegen Rattengewebe gerichtet waren und in einem Kaninchen hergestellt wurden. Der am Ende des Vorgangs dazugegebene ABC-Komplex ermöglicht nach der Zugabe des endgültigen Färbestoffs die Darstellung der in atherosklerotischen Plaques enthaltenen CD68+ Makrophagen. Somit kann eine Aussage über die immunologische Komponente der Plaques getroffen werden.

Das Protokoll für die CD68+ Färbung beinhaltet mehrere Schritte, die mit hoher Sorgfalt durchgeführt werden müssen, um eine potenzielle Verletzung oder eine falsche Färbung der Gewebe zu vermeiden. Als Erstes erfolgt die Blockade des endogenen Enzyms Peroxidase mittels in Tris-buffered saline (TBS) gelöstem 30% Wasserstoffperoxid für 7 Minuten. Die Objektträger werden im Anschluss in reinem TBS für 5 Minuten gewaschen und 30 Minuten lang in einer Lösung aus Kaninchenserum, Avidin und TBS inkubiert. Danach werden die Schnitte mit gegen CD68+ gerichteten Antikörpern in 1:600-Verdünnung (Abcam AB53444) mit Zugabe von Biotin (60 Minuten) inkubiert. Die Proben werden erneut in TBS gewaschen (2 x 5 Minuten) und für weitere 60 Minuten mit dem 2. Antikörper (Kaninchen gegen Ratte, 1:250 – Dako 0468) inkubiert. Nach einem Waschvorgang in TBS erfolgt die Bearbeitung der Proben mit dem ABC-Reagenz. Beide Antikörper wie auch der ABC-Komplex werden durch vorsichtiges Pipettieren auf die Biopsiefelder aufgetragen. Als Nächstes werden die Schnitte gefärbt – dafür bereitet man die Färbe- (Wasser + Acetat + Essigsäure) und Substratlösungen (Carbazol + Dimethylformamid) und inkubiert so die Proben im Dunkeln (z.B. unter einer Kiste) nach Zugabe von 30%

Wasserstoffperoxid für 12 Minuten. Wenn die Proben entsprechend gewaschen sind, folgt der letzte Schritt – die Gegenfärbung mit Hämalaun und Bläuen in warmem Wasser. Am Ende werden die Objektträger mit Glyceringelatine blasenfrei eingedeckt.

2.3.2. Dünndarm

Für die Evaluation der potenziellen Rolle des Propionats im Cholesterinstoffwechsel wurden auch die Ileum-Proben von Mäusen entnommen und histologisch gefärbt. Von besonderem Interesse war die Expression von Niemann-Pick C-like Protein 1 (NPC1L1) – ein wichtiger transmembranöser Transporter, der für die intestinale Resorption von Cholesterin verantwortlich ist. Für die Darstellung und Quantifizierung wurden die Proben immunhistochemisch gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Die im Rahmen der Sektion entnommenen Ileum-Proben wurden in Paraffin fixiert und anschließend präpariert. Die 1-2 µm dicken Schnitte wurden dann mit polyklonalem Kaninchen-Antikörper (Novus Biologicals, #NB400-127) für die Darstellung von NPC1L1 gefärbt. Die NPC1L1-Färbung erfolgte durch das Core Unit Immunpathologie für Experimentelle Modelle (iPATH Berlin).

2.4. Analyse der Histologischen Untersuchungen

2.4.1. Mikroskopie und Aufbereitung von Bildern

Die nach der Oil-Red-O, HE und CD68+ gefärbten Aortenwurzelpräparate wurden im Labor der Klinik für Kardiologie am Campus Benjamin Franklin der Charité fotografiert. Um eine ausreichende Vergrößerung und Qualität der Bilder zu gewährleisten, wurde ein Fluoreszenz-Mikroskop der Firma Keyence (Biorevo BZ-9000) genutzt. Die Bilder wurden als .tiff-Datei im Rot-, Grün-, Blaubereich mit Multicolor und Z-Stack-Einstellung (4x- oder 20x-Vergrößerung und 4380 x 3072 Pixel Auflösung) aufgenommen. Es wurden immer alle Schnittebenen eines Präparats abgebildet, jedoch wurden ausschließlich die Ebenen mit Aortenwurzel ausgewertet. Die Einstellungen blieben für alle Bilder unverändert.

Wie im vorherigen Kapitel erwähnt, wurden die Aufnahmen der Darmpräparate mit Unterstützung des iPATH unter Leitung von Frau PD Dr. Anja Kühls angefertigt. Für

die Darstellung der NPC1L1-Färbungen im Dünndarm erfolgten sowohl lichtmikroskopische als auch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen.

2.4.2. Auswertung der Aufnahmen

Für die Analyse und Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen wurde die Software ImageJ (Version 1.52i) verwendet. Zunächst musste ein repräsentatives Bild für jede Maus gewählt werden. Für die Auswertung wurde immer die Schnittebene genommen, die die Aortenwurzel am besten abbildet. Als Messwerte wurden die Fläche der Aortenwurzel und die Größe der atherosklerotischen Plaques erhoben und der prozentuale Plaqueanteil an der Gesamtfläche wurde errechnet. Es bestand keine Möglichkeit zur Automatisierung des Vorgangs. Die Aortenwurzel und die Plaques wurden manuell markiert, wie in **Abbildung 7** dargestellt. Ebenfalls wurden die HE-gefärbten Proben hinsichtlich der Plaquegröße ausgewertet.

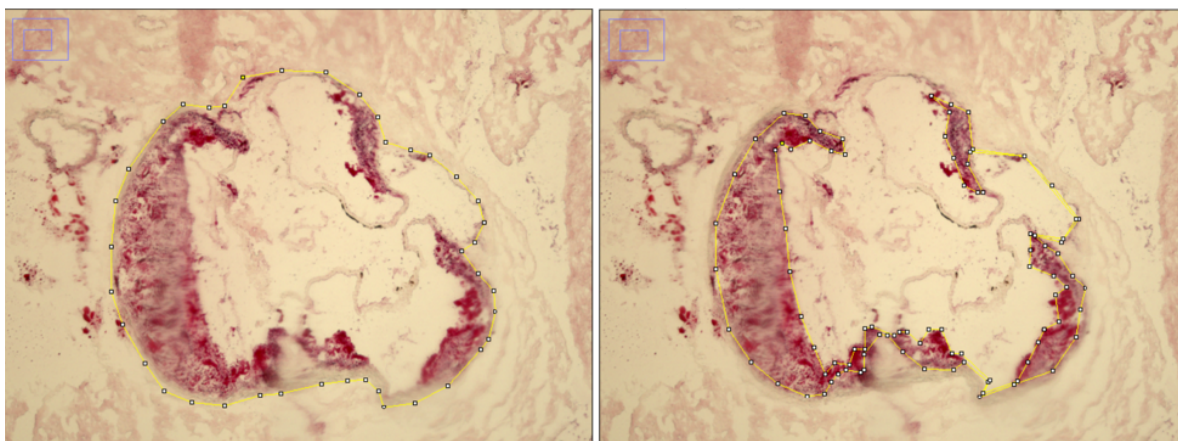


Abbildung 7 Auswertung eines mit Oil-Red-O gefärbten Aortenwurzeln Präparates. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von ImageJ Software. Die Aortenwurzel- (links) und atherosklerotische Plaques (rechts) wurden anhand des Signals manuell markiert.

Für die Auswertung der Darmpräparate wurde die mittlere Fluoreszenzintensität der NPC1L1-Färbung, definiert als mittlerer Grauwert, ausgewertet (**Abbildung 8**). Der mittlere Grauwert ist die Summe der Grauwerte aller Pixel in der Auswahl geteilt durch die Anzahl der Pixel. Bei Aufnahmen im RGB-Farbspektrum (Rot, Grün, Blau) wird der Mittelwert durch Umwandlung jedes Pixels in Graustufen berechnet. Die Bilder mit Standardfärbung, ohne Fluoreszenz, dienen dem qualitativen Vergleich mit Fluoreszenzdaten.

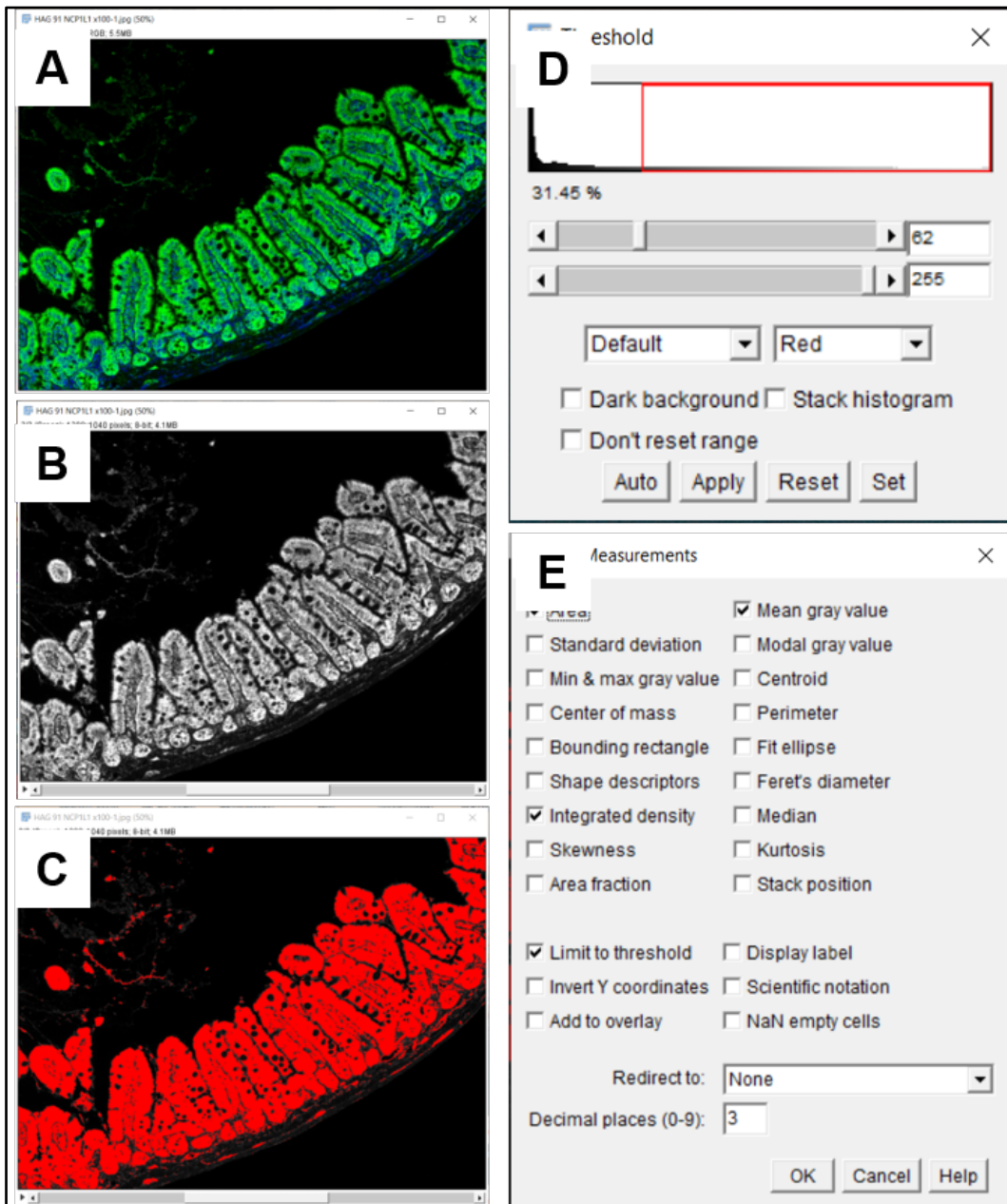


Abbildung 8 Auswertung der Fluoreszenzfärbung der Dünndarmproben. Die Originaldatei (A) wurde zuerst in den RGB-Stack (B) umgewandelt, um anschließend den signal-positiven Threshold (C) zu markieren. (D) zeigt beispielhaft die Einstellungen für den Threshold und für die Messung. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der ImageJ Software.

2.4.3. Statistische Analysen

Die Datenbankverwaltung und die statistischen Analysen wurden mit PRISM (Version 8.2.0) durchgeführt. Im Vorfeld der Auswertung erfolgte eine Beratung durch das Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Zur Prüfung der Hypothese wurde ein t-Test verwendet, mit dessen Hilfe festgestellt werden sollte, ob ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der beiden Gruppen besteht. Die Differenz zwischen den Mittelwerten jedes Datensatzes, die Standardabweichung jeder Gruppe und die Anzahl der Datenwerte waren zu jedem Zeitpunkt bekannt.

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen des intestinalen Mikrobioms und insbesondere eines aus dem Mikrobiom stammenden Metaboliten, Propionat (PA), auf die Größe atherosklerotischer Läsionen untersucht. Darüber hinaus wurde die Wirkung der Propionatverabreichung auf die intestinale Expression von Niemann-Pick C1-like Protein 1 (NPC1L1), einem wichtigen Transmembrantransporter, der für die intestinale Cholesterinabsorption verantwortlich ist, analysiert. Die Interventionen wurden an hypercholesterinämischen und atheropronen Apolipoprotein-E-defizienten (ApoE^{-/-}) Mäusen durchgeführt.

3.1. Einfluss des Darm-Mikrobioms auf die Atherosklerose

Zunächst wurde der Einfluss der Depletion der Darm-Mikrobiota auf die Atherosklerose untersucht. Zu diesem Zweck wurden konventionell aufgezogene und mit Antibiotika behandelte Apolipoprotein-E-depletierte (ApoE^{-/-}) Mäuse, die in der Folge eine dezimierte Darmmikrobiota aufwiesen, 6 Wochen lang entweder mit Standardfutter (SCD) oder mit fettreicher Nahrung (HFD) gefüttert.

Nach 6 Wochen Ernährung mit einer Standardfutterdiät (SCD) wurde, wie in **Abbildung 9** dargestellt, eine signifikante Zunahme der Größe der atherosklerotischen Läsion nach der Depletion des Darm-Mikrobioms im Vergleich zu konventionell gefütterten Mäusen beobachtet („SCD“ vs. „SCD+AB“: „ $5,45 \pm 1,03$ N=8“ vs. „ $19,26 \pm 2,58$ N = 5“; $p = 0,0001$). Die Größe der Läsion ist als Prozentsatz der mit Läsion bedeckten Aortenwurzelfläche nach der Oil-Red-O-Färbung ausgedrückt. Ein signifikanter Anstieg wurde auch nach Färbung mit einer Standard-HE-Färbung festgestellt („SCD“ vs. „SCD+AB“: „ $4,99 \pm 1,23$ N = 7“ vs. „ $19,26 \pm 2,58$ N = 5“; $p = 0,0003$).

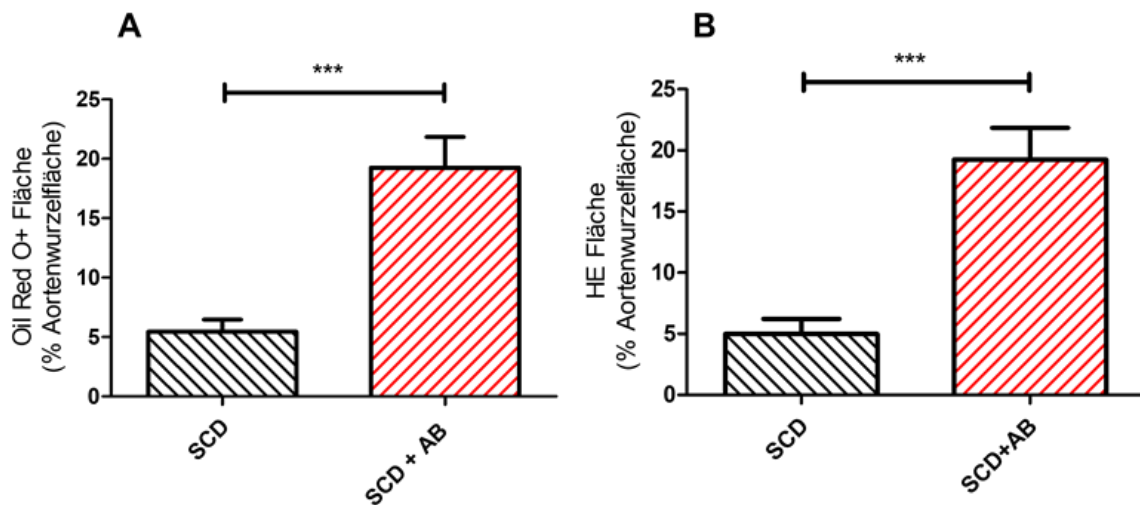


Abbildung 9 Quantifizierung von atherosklerotischen Ablagerungen in den Aortenwurzelschnitten bei einer Standarddiät. Die Schnitte wurden mit Oil-Red-O- (A) und HE- (B) Färbungen anbereitet. Vergleich von mit Standard Chow Diet gefütterten Mäusen mit und ohne Antibiotikagabe. Die Daten wurden mittels eines zweiseitigen, ungepaarten t-Tests zwischen zwei Gruppen analysiert. SCD, Standard Chow Diet; AB, Antibiotikum

Eine Zunahme der atherosklerotischen Plaquegröße nach Depletion der intestinalen Mikrobiota wurde auch nach 6-wöchiger Fütterung von Mäusen mit einer fettreichen Diät (HFD) beobachtet. Wie in **Abbildung 10** aufgezeigt, war die Zunahme sowohl nach Oil-Red-O- („HFD“ vs. „HFD+AB“: „ $12,17 \pm 0,88$ N = 8“ vs. „ $25,53 \pm 3,15$ N = 6“; $p = 0,0006$) als auch nach HE-Färbungen („HFD“ vs. „HFD+AB“: „ $13,68 \pm 1,13$ N = 8“ vs. „ $25,53 \pm 3,15$ N = 6“; $p = 0,002$) statistisch signifikant. Wie erwartet war die Plaquegröße bei Mäusen, die mit einer fettreichen Diät gefüttert wurden, deutlich größer als bei Mäusen, die die Kontrolldiät erhielten.

Repräsentative Beispiele von Aortenwurzeln aus Gruppen, die mit Standardfutter und fettreicher Nahrung gefüttert wurden, sowohl konventionell aufgezogen als auch nach Antibiotikabehandlung, sind in **Abbildung 11** dargestellt. Die gefärbte Fläche der Aortenwurzeln ist in den Gruppen mit dezimierter Mikrobiota deutlich größer, was die Ergebnisse der statistischen Analyse verdeutlicht. Die CD68+-Färbung wurde nicht quantifiziert und sollte vielmehr den entzündlichen Charakter der Plaques durch die Darstellung der Makrophageninfiltration belegen.

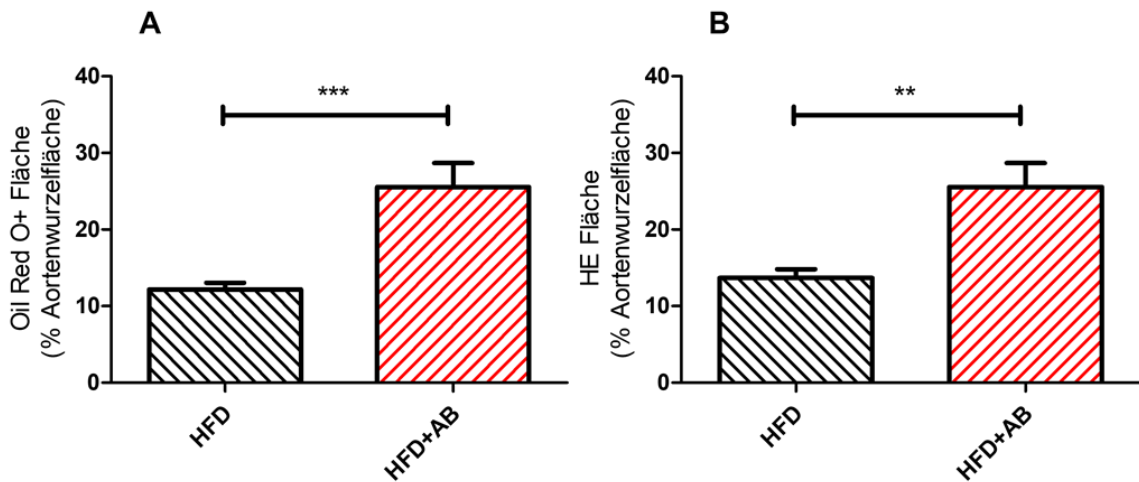


Abbildung 10 Quantifizierung von atherosklerotischen Ablagerungen in den Aortenwurzelfschnitten bei einer fettreichen Diät. Die Schnitte wurden mit Oil-Red-O- (A) und HE- (B) Färbungen angefertigt. Vergleich von mit High Fat Diet gefütterten Mäusen mit und ohne Antibiotikagabe. Die Daten wurden mittels eines zweiseitigen, ungepaarten t-Tests zwischen zwei Gruppen analysiert. HFD, High Fat Diet; AB, Antibiotikum

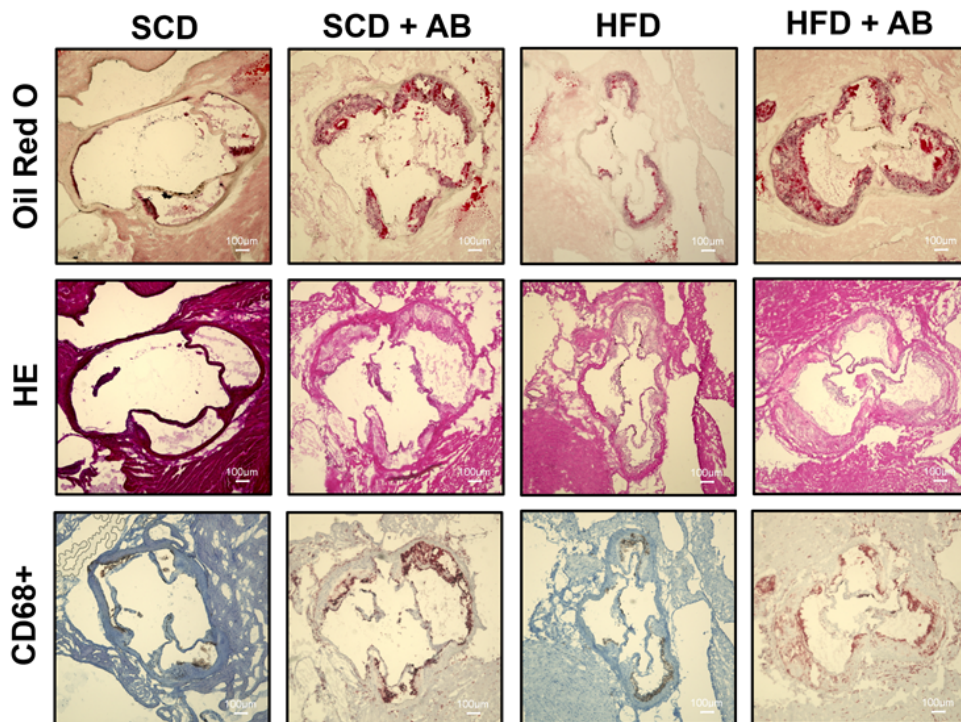


Abbildung 11 Repräsentative Bilder von Aortenwurzelfschnitten mit und ohne Antibiotikagabe. Die Schnitte wurden mit Oil-Red-O-, HE- und CD68+-Färbungen angefertigt. SCD, Standard Chow Diet; HFD, High Fat Diet; AB, Antibiotika; Maßstab: 100 µm

3.2. Einfluss des Darm-Mikrobiom-Metaboliten Propionat auf die Atherosklerose

Als Nächstes wurde die Wirkung exogener Propionatzufuhr auf die Größe atherosklerotischer Läsionen untersucht. Propionat wurde den Mäusen über eine orale Schlundsonde täglich verabreicht. Die Mäuse wurden für 6 Wochen entweder mit Standard- (SCD) oder fettreichem Futter (HFD) ernährt.

Wie erwartet entwickelten Mäuse, die mit einer fettreichen Diät gefüttert wurden, signifikant größere atherosklerotische Läsionen im Vergleich zu Mäusen, die mit Standardfutter gefüttert wurden („SCD“ vs. „HFD“: $5,45 \pm 1,03$ N = 8“ vs. $12,17 \pm 0,88$ N = 8“; $p = 0,0002$). Diese Zunahme der Läsionsgröße konnte durch eine 4-wöchige orale Verabreichung von Propionat erfolgreich verhindert werden („HFD“ vs. „HFD+PA“: $12,17 \pm 0,88$ N = 8“ vs. $6,59 \pm 0,64$ N = 11“; $p < 0,0001$). Diese Befunde wurden auch in einer HE-Färbung gesehen und waren für beide Färbungen statistisch signifikant, wie in **Abbildung 12** dargestellt.

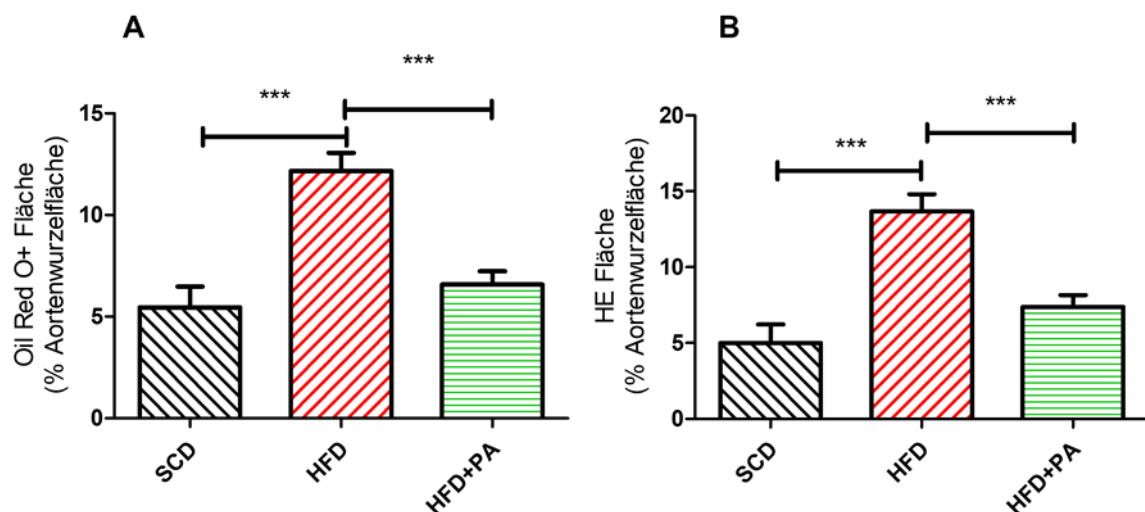


Abbildung 12 Quantifizierung von atherosklerotischen Ablagerungen in den Aortenwurzelschnitten nach Propionatgabe. Die Schnitte wurden mit Oil-Red-O- (A) und HE- (B) Färbungen angefertigt. Vergleich von Mäusen gefüttert mit Standard Chow Diet und High Fat Diet mit und ohne Propionatgabe. Die Daten wurden mittels eines zweiseitigen, ungepaarten t-Tests zwischen zwei Gruppen analysiert. SCD, Standard Chow Diet; HFD, High Fat Diet; PA, Propionat

Abbildung 13 zeigt repräsentative Beispiele von Aortenwurzeln, die mit Oil Red O und HE gefärbt wurden (Quantifizierung der Lipidspeicherung und Plauegröße) sowie CD68+-Antikörper (Darstellung der Makrophageninfiltration). Die sichtbare Zunahme der Plaueschwere in der Gruppe mit der fettreichen Diät konnte durch die orale Verabreichung von Propionat erfolgreich verhindert werden, was die Ergebnisse der statistischen Analyse bestätigt.

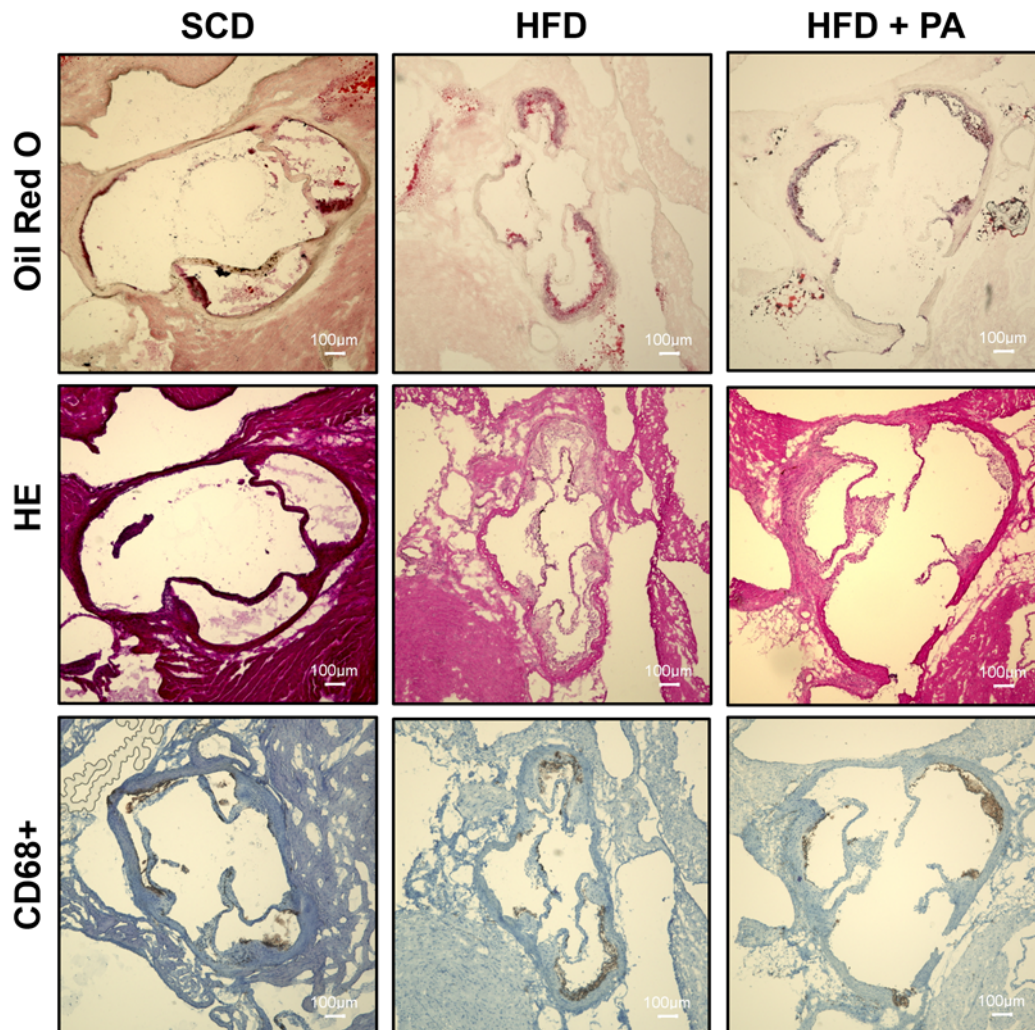


Abbildung 13 Repräsentative Bilder von Aortenwurzelschnitten nach Propionatgabe. Die Schnitte wurden mit Oil-Red-O-, HE- und CD68+-Färbungen angefertigt. SCD, Standard Chow Diet, HFD, High Fat Diet; PA, Propionat; Maßstab: 100 µm

Um zu überprüfen, ob Propionat seine Eigenschaften auch in Abwesenheit des Darm-Mikrobioms behalten kann, wurden die Auswirkungen der oralen Propionatzufuhr in den gleichen ApoE -/- Mausmodellen mit dezimierten Darmmikrobiota untersucht. Um die Mikrobiota zu auszulöschen, wurden die Mäuse mit oralen Antibiotika im

Trinkwasser behandelt. Nach der Sicherstellung des Eradikationserfolges wurden die Mäuse mit HFD ernährt und mit Propionat (PA) oder Kontrollsubstanz täglich gavagiert.

Die Behandlung mit PA verringerte die Größe der atherosklerotischen Läsionen in antibiotisch behandelten und mit HFD gefütterten ApoE^{-/-} Mäusen, obwohl dieser Effekt keine statistische Signifikanz erreichte („HFD+AB“ vs. „HFD+AB+PA“: „25,53 ± 3,15 N = 6“ vs. „19,55 ± 1,31 N = 7“; p = 0,09. Eine ähnliche Tendenz konnte auch nach der HE-Färbung beobachtet werden (**Abbildung 14**).

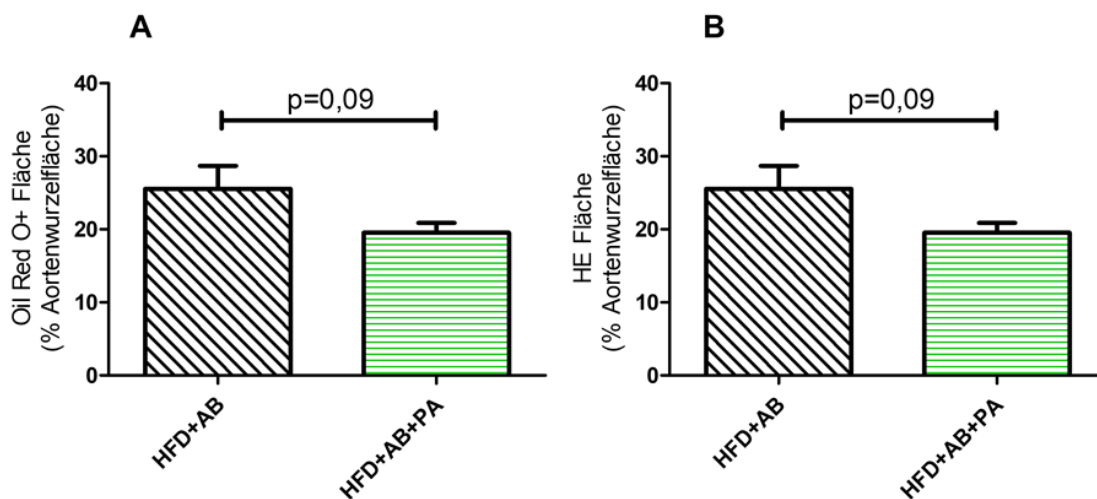


Abbildung 14 Quantifizierung von atherosklerotischen Ablagerungen in den Aortenwurzelschnitten nach antibiotischer Behandlung mit und ohne Propionatgabe. Die Schnitte wurden mit Oil-Red-O- (**A**) und HE- (**B**) Färbungen anbereitet. Vergleich von mit High Fat Diet gefütterten Mäusen mit Antibiotikabehandlung mit und ohne Propionatgabe. Die Daten wurden mittels eines zweiseitigen, ungepaarten t-Tests zwischen zwei Gruppen analysiert. HFD, High Fat Diet; AB, Antibiotika; PA, Propionat

Abbildung 15 zeigt repräsentative Aortenwurzeln von Mäusen, die mit einer fettreichen Diät gefüttert wurden: mit und ohne orale Verabreichung von Propionat. Die Proben wurden mit Oil Red O, HE und CD68⁺-Antikörpern gefärbt, um die Größe der Plaques und die Lipidablagerungen zu quantifizieren und die Makrophageninfiltration im Inneren der Plaques darzustellen.

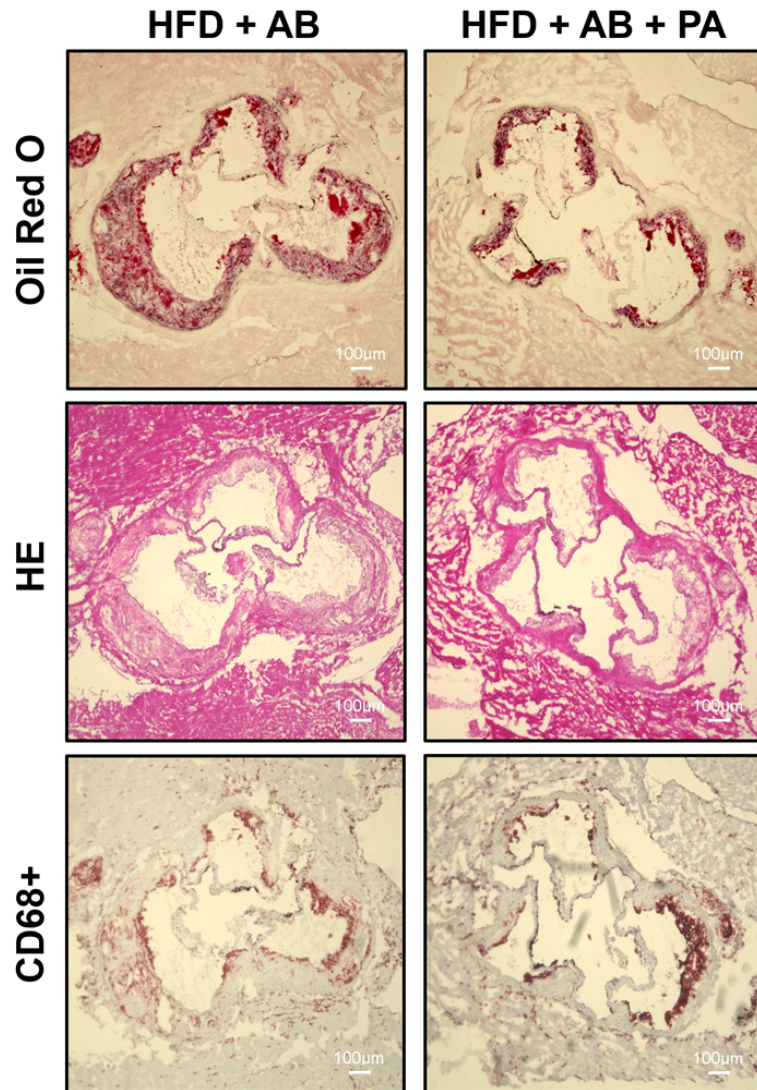


Abbildung 15 Repräsentative Bilder von Aortenwurzelnschnitten nach Antibiotikagabe mit und ohne Propionatbehandlung. Die Schnitte wurden mit Oil-Red-O-, HE- und CD68+-Färbungen angefertigt. HFD, High Fat Diet, AB, Antibiotika; PA, Propionat; Maßstab: 100 µm

3.3. Wirkmechanismen des Propionat

Zur Bewertung der potenziellen Wirkmechanismen des Propionats wurde auch die Expression von Niemann-Pick C-like Protein 1 (NPC1L1) im Dünndarm untersucht. NPC1L1 ist ein wichtiger Transmembrantransporter, der für die intestinale Absorption von Cholesterin verantwortlich ist und somit eine bedeutsame Rolle bei der Atherogenese spielt. Ileumproben wurden von ApoE ^{-/-} Mäusen gewonnen, die 6 Wochen lang entweder mit Standardfutter oder mit fettreicher Nahrung gefüttert und 4

Wochen lang entweder mit täglicher oraler Verabreichung von Propionat oder einer Kontrolllösung behandelt wurden. Zur Darstellung und Quantifizierung wurden die Proben immunhistochemisch gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

In histologischen Schnitten des Dünndarms von ApoE^{-/-} Mäusen, die mit HFD gefüttert wurden, wurde im Vergleich zu Mäusen, die mit SCD gefüttert wurden, eine erhöhte Dichte von NPC1L1 beobachtet („SCD“ vs. „HFD“: „48,15 ± 2,97 N = 9“ vs. „63,69 ± 2,38 N=7“; p = 0,002). Dieser Anstieg konnte unter PA-Behandlung verhindert werden („HFD“ vs. „HFD+PA“: „63,69 ± 2,38 N = 7“ vs. „49,67 ± 2,88 N = 9“; p = 0,003). Der Unterschied wurde, wie in **Abbildung 16** aufgezeigt, als mittlere Fluoreszenzdichte quantifiziert und war sowohl für den Vergleich SCD vs. HFD als auch HFD vs. HFD mit PA statistisch signifikant.

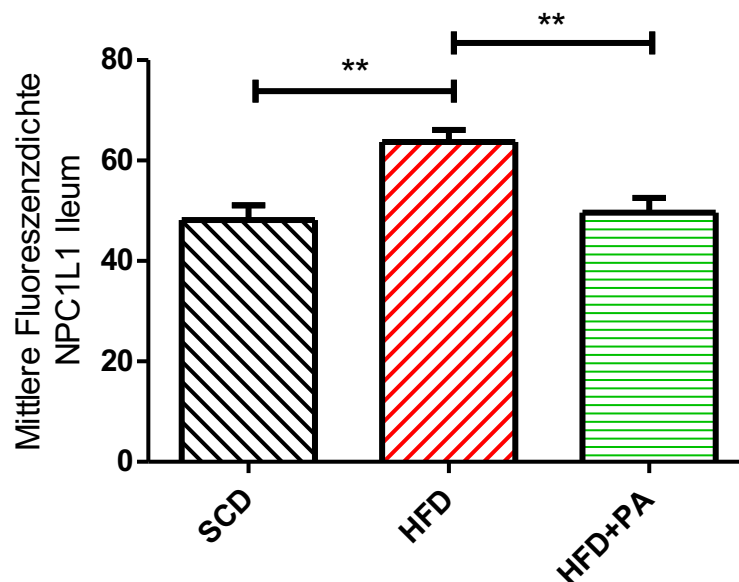


Abbildung 16 Quantifizierung der mittleren Fluoreszenzdichte der NPC1L1-Färbung des Dünndarms von Mäusen. Vergleich von Mäusen gefüttert mit Standard Chow Diet und High Fat Diet mit und ohne Propionatgabe. Die Daten wurden mittels eines zweiseitigen, ungepaarten t-Tests zwischen zwei Gruppen analysiert. SCD, Standard Chow Diet; HFD, High Fat Diet; PA, Propionat

Repräsentative Immunfärbungen des Dünndarms mit einem NPC1L1-Antikörper sind in **Abbildung 17** sowohl als immunhistochemische Färbung (zur Veranschaulichung) wie auch als Immunfluoreszenzfärbung (für die statistische Analyse) dargestellt. Es

zeigt sich eine deutliche Zunahme der positiven Färbung nach einer fettreichen Ernährung, die durch orale Verabreichung von Propionat verhindert wurde. Diese Färbungen stimmen mit der statistischen Quantifizierung überein.

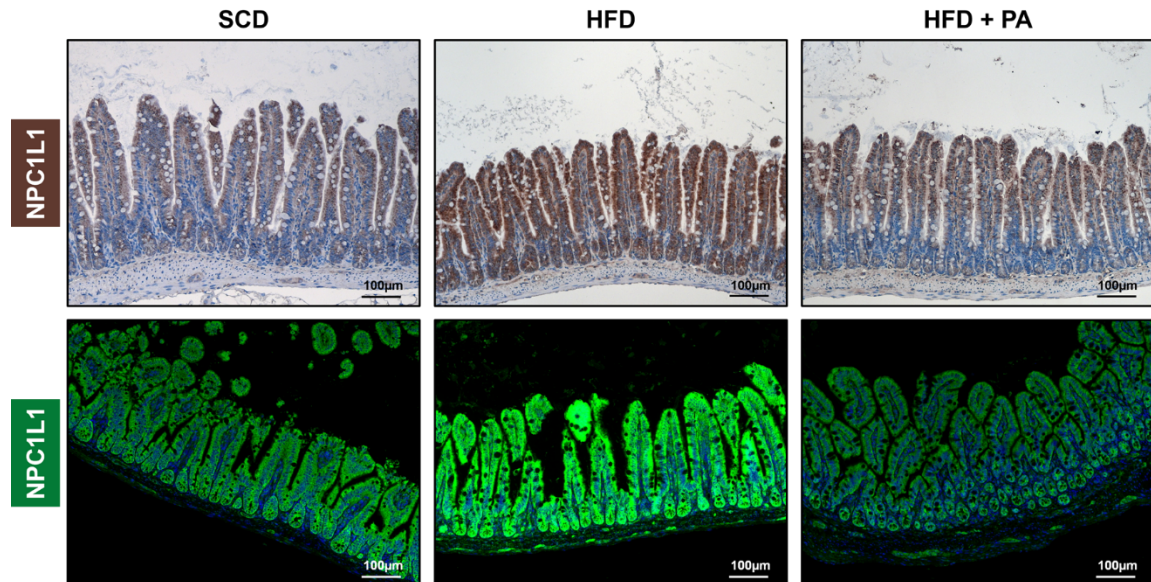


Abbildung 17 Repräsentative Immunfärbung des Dünndarms von Mäusen mit einem NPC1L1-Antikörper. Vergleich von Mäusen gefüttert mit Standard Chow Diet und High Fat Diet mit und ohne Propionatgabe. Obere Reihe: Immunhistochemie; untere Reihe: Immunfluoreszenz. Maßstab: 100 µm. SCD, Standard Chow Diet; HFD, High Fat Diet; PA, Propionat; NPC1L1, Niemann-Pick C1-like Protein 1

In klinischen Studien, in denen rekombinantes humanes IL-10, ein wichtiges Treg-Zytokin, getestet wurde, zeigte sich eine cholesterinsenkende Wirkung für das IL-10 (60). In der Literatur wurde die Zunahme der Treg-Zellpopulation, begleitet von erhöhten Konzentrationen von Interleukin IL-10 in der Dünndarmwand, als Reaktion auf Propionat beschrieben (39). Um die funktionelle Bedeutung der IL-10 für die atheroprotektiven Eigenschaften des Propionats weiter zu untersuchen, sollte die IL-10-Signalübertragung mit einem monoklonalen Anti-IL-10-Rezeptor-Antikörper blockiert werden.

ApoE^{-/-} Mäuse wurden mit einer wöchentlichen, intraperitonealen Injektion von IL-10-Rezeptor-Antikörpern behandelt, um die Inhibition des Signalwegs von IL-10 zu gewährleisten. Alle Mäuse erhielten für 6 Wochen die High-Fat-Diät und wurden für 4 Wochen täglich mit Propionat oder Kontrolllösung gavagiert.

Propionat verlor seine atheroprotektiven Wirkungen nach der Blockade des IL-10-Rezeptor-Signalwegs. Wie in **Abbildung 18** dargestellt, zeigte die Interventionsgruppe (fettreiche Ernährung, Propionateinnahme und Blockade des IL-10-Rezeptors) eine hochsignifikante Zunahme der Schwere der atherosklerotischen Läsion im Vergleich zur Gruppe ohne Blockade des IL-10-Signalwegs („HFD+PA“ vs. „HFD+PA+IL10rAB“: „ $6,59 \pm 0,64$ N = 11“ vs. „ $16,44 \pm 2,06$ N = 7“; $p < 0,0001$). Darüber hinaus gab es keinen signifikanten Unterschied in demselben Aspekt hinsichtlich des Schweregrades der Läsion zwischen den beiden Gruppen mit Blockade des IL-10-Signalwegs unabhängig davon ob, PA verabreicht wurde („HFD+PA+IL10rAB“ vs. „HFD+IL10rAB“: „ $16,44 \pm 2,06$ N = 7“ vs. „ $19,32 \pm 1,98$ N = 4“; $p = 0,38$).

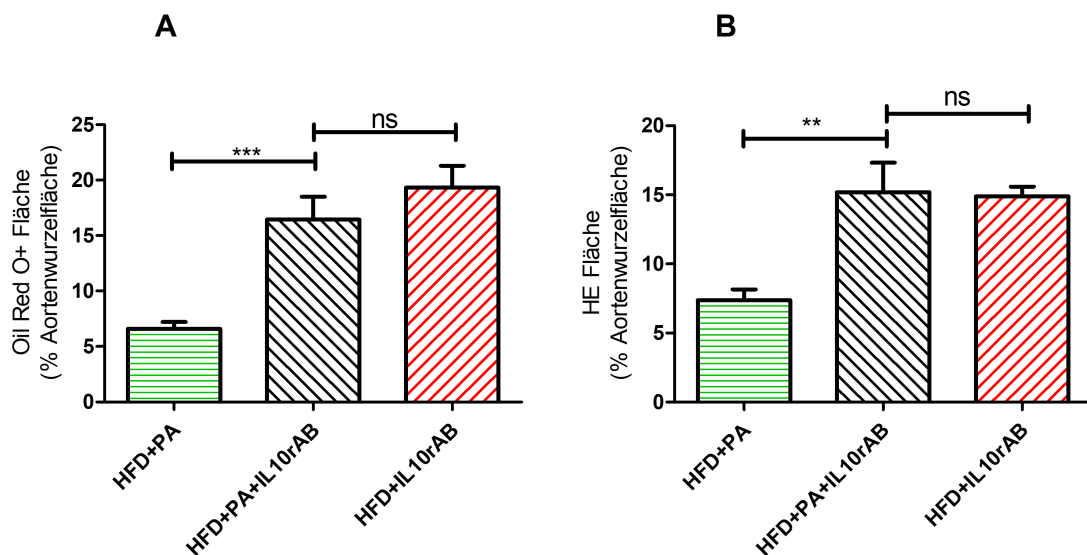


Abbildung 18 Quantifizierung von atherosklerotischen Ablagerungen in den Aortenwurzelschnitten nach Propionatbehandlung mit und ohne Blockade des IL-10-Signalwegs. Die Schnitte wurden mit Oil-Red-O- (A) und HE- (B) Färbungen angefertigt. HFD, High Fat Diet; PA, Propionat; IL10rAB, Interleukin-10-Rezeptor-Antikörper; die Daten wurden mittels eines zweiseitigen, ungepaarten t-Tests zwischen zwei Gruppen analysiert.

Repräsentative Beispiele von Aortenwurzeln aus allen drei Gruppen sind in **Abbildung 19** dargestellt, wobei beide Gruppen mit der Blockade des IL-10-Signalwegs im Vergleich zur Kontrollgruppe unabhängig von der verwendeten Färbung (Oil Red O, HE, CD68+) deutlich schwerere Läsionen aufweisen. Die orale Verabreichung von Propionat hatte bei diesen Mäusen keine Auswirkung, was die Ergebnisse der oben beschriebenen statistischen Analyse deutlich macht.

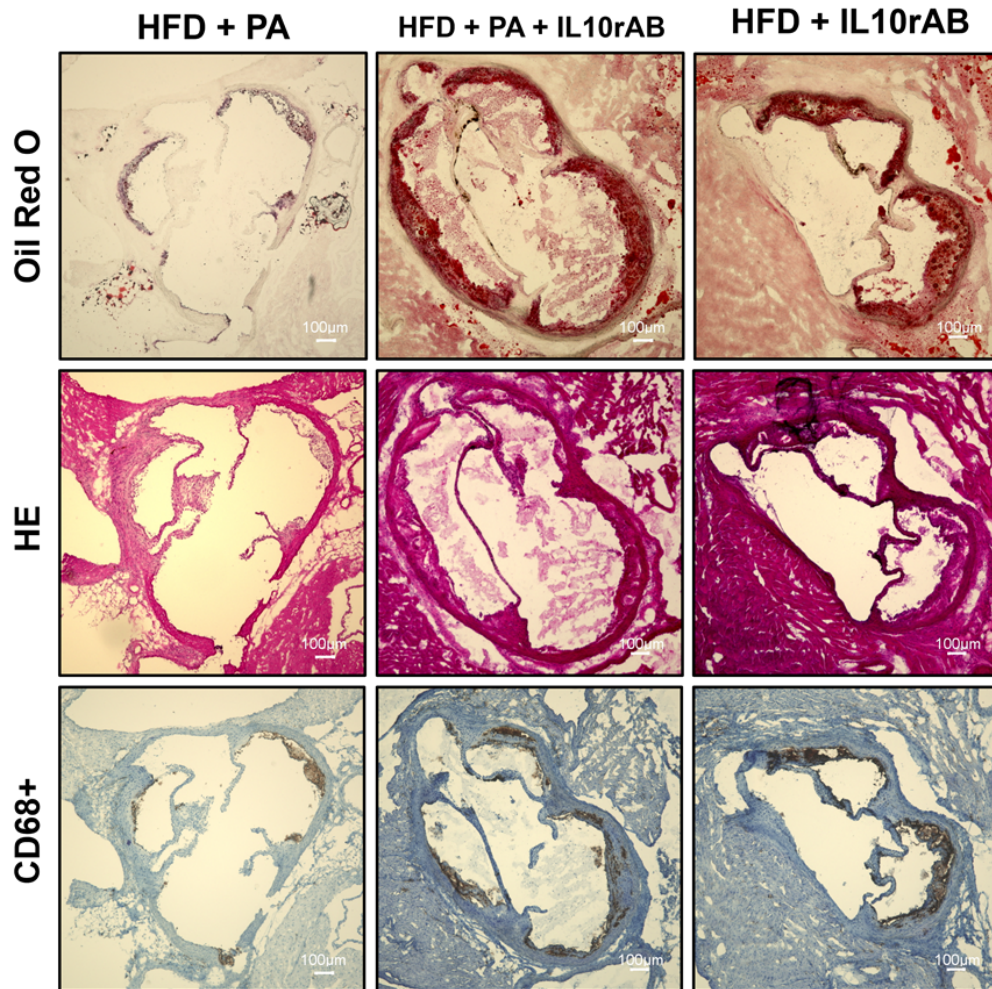


Abbildung 19 Repräsentative Bilder von Aortenwurzelschnitten nach Propionatbehandlung mit und ohne Blockade der IL-10-Signalwegs. Die Schnitte wurden mit Oil-Red-O-, HE- und CD68+-Färbungen angefertigt. HFD, High Fat Diet; PA, Propionat; IL10rAB, Interleukin-10-Rezeptor-Antikörper; Maßstab: 100 µm

4. Diskussion

Herz-Kreislauf-Erkrankungen (KHK) sind weltweit die häufigste Todesursache (4), verursachen hohe sozioökonomische Kosten (3) und stellen eine enorme Belastung für das Gesundheitssystem dar (1). Dies macht die effiziente Prävention von CVD zu einer systemrelevanten Aufgabe und muss daher weiter angestrebt, erforscht und verbessert werden. Atherosklerose ist eine entzündlich-degenerative Erkrankung der arteriellen Blutgefäße und die ätiologische Ursache der koronaren Herzkrankheit (KHK) und eine der Hauptursachen des ischämischen Schlaganfalls und damit ursächlich für über 80% aller mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen verbundenen Todesfälle (2). Epidemiologische Studien deuten darauf hin, dass eine ausreichende Zufuhr von Ballaststoffen zur Vorbeugung von atherosklerotischen Gefäßerkrankungen beitragen kann (37). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind vermutlich weitgehend auf kurzkettige Fettsäuren (SCFAs), einschließlich Propionat, zurückzuführen, die Produkte der mikrobiellen Fermentation von Ballaststoffen sind (38). Jüngsten Erkenntnissen zufolge hat Propionat eine modulierende Wirkung auf die intestinale T-Zell-Immunität (45) und eine Beteiligung an der Kontrolle des systemischen Stoffwechsels (51). Tregs haben die Fähigkeit, chronische Entzündungen, aber auch den Cholesterinstoffwechsel zu modulieren (52). Die Zunahme der Treg-Zellpopulation als Reaktion auf Propionat ging mit einem Anstieg des Interleukins IL-10 in der Dünndarmwand einher (39). Angesichts der sich daraus ergebenden möglichen Verbindung zwischen Propionat, Tregs und Lipidkontrolle stellten wir die Hypothese auf, dass Propionat eine atheroprotektive Wirkung haben könnte, die durch die Modulation des adaptiven Immunsystems im Darm und die Beeinflussung der intestinalen Expression von Niemann-Pick C1-like Protein 1 (NPC1L1) vermittelt wird. Dies war die Grundlage für das Forschungsziel dieser Arbeit und die Fragestellungen, die in den folgenden Kapiteln beantwortet werden sollen.

4.1. Einfluss des Darm-Mikrobioms auf Atherosklerose

Beeinflusst die Depletion des Darm-Mikrobioms den Schweregrad der Atherosklerose im Atheropronen-Mausmodell?

Bei Mäusen mit einer dezimierten Darmmikrobiota fanden wir nach 6 Wochen eine Erhöhung der Größe der atherosklerotischen Läsionen im Vergleich zu konventionell aufgezogenen Mäusen. Die Vorgehensweise zur Depletion der Mikrobiota wurde im methodischen Kapitel (2.2.3.1) ausführlich erläutert. Die Zunahme konnte unabhängig von der an die Mäuse verabreichten Diät beobachtet werden, wobei Mäuse, die eine fettreiche Diät erhielten, im Vergleich zu Mäusen, die mit Standardfutter gefüttert wurden, größere Läsionen entwickelten. In beiden Gruppen nahm der Schweregrad der Läsionen nach der Eradikation des Mikrobioms weiter zu. In anderen Analysen unserer Arbeitsgemeinschaft an der gleichen Gruppe von Mäusen wurde ein deutlicher Anstieg des Gesamt- und LDL-Cholesterins bei Mäusen mit dezimierter Mikrobiota beobachtet (61). Da erhöhte Cholesterinwerte eine der wichtigsten Ursachen für Atherosklerose sind (62), lassen diese Ergebnisse auf eine funktionelle Rolle der von der Darmmikrobiota abhängigen Stoffwechselwege bei der Regulierung der Atherogenese schließen.

4.2. Einfluss des Propionats auf die Atherosklerose

Beeinflusst der vom Darm-Mikrobiom stammende Metabolit Propionat den Schweregrad der Atherosklerose im Atheropronen-Mausmodell?

Als Nächstes untersuchten wir die Auswirkung der exogenen Verabreichung von Propionat, das über eine tägliche orale Schlundsonde verabreicht wurde, auf die Atherogenese in ApoE^{-/-} Mäusen. Wie erwartet, führte die fettreiche Diät zu einem signifikanten Anstieg der atherosklerotischen Plaques in den Aortenwurzeln der Mäuse. Diese HFD-induzierte Steigerung der Ablagerungen wurde durch die Behandlung mit Propionat erfolgreich verhindert. Bei weiterführenden Untersuchungen dieser Mäusepopulation durch unsere Gruppe wurde außerdem festgestellt, dass die mit HFD gefütterten Mäuse signifikant höhere Werte an Gesamt-, VLDL- und LDL-Cholesterin aufwiesen, und dieser HFD-induzierte Anstieg konnte durch Propionat

vermieden werden (61). Darüber hinaus erhöhte HFD verschiedene Cholesterinester, von denen einige durch die PA-Behandlung reduziert wurden (61). Die Korrelation zwischen der Zunahme des Schweregrads atherosklerotischer Plaques und erhöhten Gesamt- und LDL-Cholesterinspiegeln steht im Einklang mit umfangreichen Erkenntnissen aus epidemiologischen, genetischen und klinischen Interventionsstudien, die gezeigt haben, dass LDL eine kausale Rolle bei der Atherogenese spielt (62).

Frühere Studien weisen ebenfalls auf atheroprotektive und cholesterinsenkende Eigenschaften von Propionat hin. Ratten, die mit Milchsäurebakterienstämmen gefüttert wurden, wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höhere Propionsäurekonzentrationen auf und zeigten nach einer 4-wöchigen Fütterungszeit eine signifikante Verringerung des Gesamtcholesterins, der Triglyceride und des LDL-Cholesterins bei gleichzeitiger Erhöhung des HDL (63). Darüber hinaus wurde eine signifikante Verringerung des Cholesteringehalts in der Leber beobachtet (63).

Bartolomaeus et al. beobachteten eine signifikante Abnahme der atherosklerotischen Läsionsfläche in der Aorta bei Propionat-behandelten Apolipoprotein-E-/- Mäusen (41), was die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse bestätigt. Darüber hinaus zeigte Propionat weitere kardioprotektive Eigenschaften, indem es Herzhypertrophie, Fibrose, vaskuläre Dysfunktion und Bluthochdruck in Mäusemodellen deutlich abschwächte. Propionat verringerte auch die Anfälligkeit für kardiale Herzrhythmusstörungen (41).

In jüngsten experimentellen Studien wurde belegt, dass Propionat die Reparaturkapazität nach einem Myokardinfarkt fördert (64). Der physiologische Zustand und die Überlebensrate von Mäusen nach einem Myokardinfarkt waren nach einer SCFA-Supplementierung deutlich verbessert (64). Der Herzinfarkt war mit einer Umstrukturierung der mikrobiellen Darmflora verbunden, z.B. mit einer Verringerung des Lactobacillus, der in anderen Studien eine Propionat-steigernde Wirkung zeigte (63). Die Verabreichung eines Lactobacillus-Probiotikums an antibiotisch behandelte Mäuse vor einem Herzinfarkt hatte kardioprotektive Auswirkungen und veränderte das Gleichgewicht der SCFAs in Richtung Propionat (64).

Ein weiterer wichtiger Aspekt des systemischen Einflusses von Propionat sind die Auswirkungen auf den Glukosestoffwechsel, wobei sowohl protektive als auch

möglicherweise ungünstige Eigenschaften diskutiert wurden. Kürzlich wurde berichtet, dass PA die Glykogenolyse und Hyperglykämie stimuliert, indem es die Plasmakonzentrationen von Glukagon und Fettsäurebindendem Protein 4 (FABP4) durch Aktivierung des sympathischen Nervensystems erhöht und damit das Risiko einer Insulinresistenz steigert (65). Diese Ergebnisse konnten in den Analysen unserer Gruppe nicht beobachtet werden, in denen PA weder die Glukagonplasmakonzentrationen noch die FABP4 beeinflusste und die Nüchternglukose- und HbA1C-Werte nicht veränderte. Dies lässt jedoch nur vermuten, dass eine PA-Behandlung in der in unserer Studie verwendeten Dosierung und Dauer den Glukosestoffwechsel nicht beeinflusst. Auf der anderen Seite zeigten frühere Studien, dass die SCFAs Propionat und Butyrat in der Lage sind, die intestinale Gluconeogenese zu stimulieren, was sich positiv auf die Glucose- und Energiehomöostase auswirkt (66). Propionat, selbst ein Substrat der intestinalen Gluconeogenese (IGN), aktiviert die IGN-Genexpression über einen neuronalen Regelkreis zwischen Darm und Gehirn unter Beteiligung des Fettsäurerezeptors FFAR3 (66). Es wird angenommen, dass dieser Mechanismus metabolische Vorteile für die Energiehomöostase mit einer Verringerung von Adipositas und Körpergewicht sowie einer besseren Glukosekontrolle mit sich bringt (66). Zusammengenommen kann PA je nach Wirkungsort unterschiedliche Auswirkungen auf die Glukosekontrolle haben. In der von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Studie an Menschen, die eine 8-wöchige Propionatbehandlung erhielten, wurde jedoch keine relevante Gewichtsveränderung beobachtet (61). Die Teilnehmer:innen wiesen jedoch, ähnlich wie im Mäusemodell, eine signifikante Senkung des Cholesterinspiegels auf (61), was darauf hindeutet, dass die cholesterinsenkende Wirkung von Propionat nicht mit einer Gewichtsreduktion zusammenhängt.

Kann Propionat seine Eigenschaften in Abwesenheit des Darm-Mikrobioms beibehalten?

Die Behandlung mit PA führte bei antibiotisch behandelten und HFD-gefütterten ApoE^{-/-} Mäusen zu einer leichten Verringerung der Größe der atherosklerotischen Läsionen. In weiteren Analysen unserer Arbeitsgruppe senkte die PA-Behandlung signifikant das Gesamt-, LDL- und VLDL-Cholesterin in antibiotisch behandelten und HFD-gefütterten ApoE^{-/-} Mäusen (61), was demonstriert, dass PA den deregulierten intestinalen

Cholesterinstoffwechsel in Mäusen mit dezimierter Darmmikrobiota teilweise kompensieren kann. Bemerkenswerterweise erreichte der Effekt der Propionataufnahme auf die Größe der atherosklerotischen Läsionen in diesem Fall keine statistische Signifikanz, was darauf hindeutet, dass die vom Darm-Mikrobiom abhängigen atheroprotektiven Mechanismen über die intestinale Cholesterinregulation hinausgehen.

4.3. Wirkmechanismen des Propionats

4.3.1. NPC1L1-Expression

Der intestinale Cholesterinstoffwechsel, insbesondere der Cholesterintransport und die Cholesterinabsorption, sind Schlüsselkomponenten der Cholesterinhomöostase (67). Daher wurde eine mögliche regulatorische Rolle von Propionat auf die intestinale Expression von Niemann-Pick C1-like Protein 1 (NPC1L1), einem wichtigen Transmembrantransporter, der für die intestinale Cholesterinabsorption verantwortlich ist, untersucht (68).

Beeinflusst Propionat die intestinale Expression von Niemann-Pick C1-like Protein 1 (NPC1L1)?

In histologischen Dünndarmschnitten von ApoE^{-/-} Mäusen, die mit HFD gefüttert wurden, wurde eine erhöhte Dichte von NPC1L1 im Vergleich zu Mäusen, die mit SCD gefüttert wurden, beobachtet. Dieser erhöhte Dichtegrad wurde bei HFD-gefütterten Mäusen unter PA-Behandlung verhindert. In einer erweiterten Analyse unserer Gruppe zeigte sich, dass PA auch den HFD-induzierten Anstieg der NPC1L1-Genexpression im Dünndarm normalisiert (61).

Bei ApoE^{-/-} Mäusen, die mit HFD gefüttert wurden, wurde ein erhöhter Gehalt an Stigmasterin und Sitosterin im Vergleich zu SCD berichtet (61). Die Plasmakonzentration von Phytosterinen hängt von der Nahrungsaufnahme und der intestinalen Sterinabsorptionskapazität ab, so dass die Plasmaspiegel von Phytosterinen als Indikator für die intestinale Sterinabsorptionsrate dienen (69). Dies weist auf die funktionelle Bedeutung der veränderten NPC1L1-Expression in ApoE^{-/-} Mäusen hin, die mit HFD gefüttert wurden. Diese Veränderungen im Phytosterolspiegel wurden durch die Behandlung mit PA verhindert (61). Darüber

hinaus wurden bei HFD-gefütterten Mäusen, die mit PA behandelt wurden, erhöhte Cholesterinwerte im Stuhl im Vergleich zu Mäusen ohne PA-Behandlung beobachtet (61). Dies deutet darauf hin, dass PA die intestinale Cholesterinabsorptionskapazität moduliert, was im Einklang mit der festgestellten Herunterregulierung von NPC1L1 durch PA steht.

In weiteren Berichten unserer Arbeitsgruppe wurden keine signifikanten Unterschiede in der Expression von Genen, die den Lipidfluss durch die Dünndarm-Enterozyten regulieren, einschließlich ATP-bindende Kasette Unterfamilie G Mitglied 5 (Abcg5), Acetyl-CoA Acetyltransferase (Acat2) und ATP-bindende Kasette Transporter 1 (Abca1), zwischen PA-behandelten und -unbehandelten Mäusen gefunden (61). PA hatte auch keinen Einfluss auf die HFD-induzierte Expression des apikalen Natrium-Gallensäure-Transporters (Asbt) (61), der die aktive Aufnahme konjugierter Gallensäuren vermittelt, um deren enterohepatische Rezirkulation aufrechtzuerhalten (70).

Neben dem intestinalen Cholesterinstoffwechsel, dem Transport und der Absorption sind die hepatische Cholesterin-Clearance und -Synthese weitere Schlüsselkomponenten der Cholesterin-Homöostase (67). Obwohl HFD bei ApoE-/- Mäusen einen Anstieg der Expression wichtiger Gene, die am hepatischen Cholesterinstoffwechsel beteiligt sind, wie das Sterol regulatory element-binding protein (Srebp2) und die Cholesterin-7-alpha-Hydroxylase (Cyp7a1), induzierte, wurde nur die Expression von Srebp2 durch die PA-Behandlung rückgängig gemacht (61). Andere Gene, die an der hepatischen Cholesterin- und Gallensäuresynthese beteiligt sind, darunter der LDL-Rezeptor (Ldlr), die Proprotein-Convertase Subtilisin/Kexin Typ 9 (Pcsk9), die 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzym A (HMG-CoA)-Reduktase (Hmgcr) und der Farnesoid-X-Rezeptor (Fxr), wurden durch HFD oder zusätzliche PA-Behandlung nicht signifikant verändert (61). Auch die enzymatische Aktivität der HMG-CoA-Reduktase wurde durch PA nicht beeinflusst (61).

Das Fehlen eines signifikanten Einflusses von PA auf die Expression wichtiger Gene, die am hepatischen Cholesterinstoffwechsel beteiligt sind, wie Cyp7a1, Ldlr, Pcsk9, Hmgcr, Fxr, und die enzymatische Aktivität der HMG-CoA-Reduktase, spricht gegen eine relevante Rolle von PA bei der hepatischen Regulation des Cholesterinstoffwechsels. Darüber hinaus hat PA keinen Einfluss auf die Expression des Natrium-Galle-Transporters (Asbt) oder von Genen, die den Lipidfluss im

Dünndarm regulieren, wie *Abcg5*, *Acat2*, *Abca1*. Dies deutet darauf hin, dass PA die intestinale Cholesterinabsorption und damit den systemischen Lipidspiegel über die beobachtete Herunterregulierung von NPC1L1 moduliert.

Interessanterweise berichtete unsere Gruppe über keine direkte Auswirkung von PA auf die Expression des NPC1L1-Gens in einem Modell eines Organoid-Kultursystems für Darmepithelzellen der Maus (61) nach spezifischer Expansion von adulten Darmstammzellen (71). Diese Ergebnisse deuten auf einen komplexeren Regulationsmechanismus von NPC1L1 durch PA hin. Die regulierende Rolle von PA bei der Modulation von NPC1L1 muss daher weiter untersucht und evaluiert werden.

4.3.2. Interleukin-10-Signalweg

Es wurde bereits berichtet, dass PA modulierende Effekte auf die intestinale T-Zell-Immunität hat (45, 72), die wiederum an der Kontrolle des systemischen Stoffwechsels beteiligt sein soll (73). Darüber hinaus wurde kürzlich beobachtet, dass das Immunsystem des Darms, insbesondere bestimmte Untergruppen (Integrin b7+) der intraepithelialen T-Lymphozyten des Darms, den systemischen Cholesterinspiegel modulieren (51). In Übereinstimmung mit diesen früheren Berichten beobachtete unsere Arbeitsgruppe einen Anstieg der CD25+ Foxp3+ T-regulatorischen Zellen (Tregs) in den mesenterialen Lymphknoten (MLNs) und im peripheren Kreislauf von HFD-gefütterten ApoE^{-/-} Mäusen als Reaktion auf PA (61). Die Tregs-Population in der Milz war nicht verändert, was darauf hindeutet, dass der Dünndarm die primäre Quelle dieser Treg-Zunahme war. Die anderen Komponenten des Gleichgewichts der T-Zell-Immunität – T-Helferzellen (Th1 und Th17) – wurden durch die PA-Behandlung weder in den MLN noch im peripheren Kreislauf oder in der Milz verändert (61). Die Zunahme der Treg-Zellpopulation als Reaktion auf PA wurde von erhöhten Konzentrationen von Interleukin-10 (IL-10), dem wichtigsten Treg-Zytokin, in der Dünndarmwand begleitet (61). Andere Zytokine, die mit Th1- oder Th17-Zellen oder Monozyten in Verbindung stehen, einschließlich Tumornekrosefaktor-alpha, Monozyten-Chemoattractant-Protein-1, IL-6 und Interferon gamma, wurden durch PA nicht verändert (61).

Unsere Beobachtungen stimmen mit früheren Studien überein, die einen Anstieg der Treg-Anzahl und -Funktion durch zusätzliche PA-Behandlung zeigten (40).

Mechanistisch ergab die Analyse des funktionellen Mikrobioms eine erhöhte Expression von Treg-Zell-induzierenden Genen (wie CD3e und CD28) im Darm sowie eine normalisierte mitochondriale Funktion und Morphologie der Treg-Zellen, was zu einer gesteigerten funktionellen Kapazität der Tregs mit erhöhter IL-10-Produktion führte (40). Angesichts dieser Ergebnisse und neuerer Erkenntnisse aus der Literatur (45, 72) stellten wir die Hypothese auf, dass die PA-bedingten Veränderungen des Cholesterinstoffwechsels, einschließlich der NPC1L1-Expression im Dünndarm, zumindest teilweise durch eine Modulation des adaptiven Immunsystems des Darms und der IL-10-Signaling-Wege vermittelt werden.

Wird der Wirkmechanismus von Propionat durch Interleukin-10 vermittelt?

Der IL-10-Signalweg wurde mit einem Anti-IL-10-Rezeptor-Antikörper blockiert, der während der PA-Behandlung einmal pro Woche intraperitoneal injiziert wurde, um die funktionelle Bedeutung von IL-10 für die Regulierung der NPC1L1-Expression und damit für die PA-bedingte Atheroprotektion zu untersuchen. Die Blockade des IL-10-Rezeptors verstärkte den Schweregrad der atherosklerotischen Läsionen in HFD-gefütterten ApoE^{-/-} Mäusen trotz der Behandlung mit PA und hob dessen atheroprotektive Eigenschaften vollständig auf. Es schwächte auch die PA-bedingte Senkung des Gesamt-, LDL-, VLDL- und HDL-Cholesterins ab, wie von unserer Gruppe nach weiteren Analysen der Mäusepopulation berichtet wurde (61). Darüber hinaus wurden auch erhöhte Phytosterol-Plasmaspiegel beobachtet, was eine verstärkte intestinale Sterolabsorption hindeutet (61). Zudem zeigten die bereits erwähnten Experimente unserer Gruppe an intestinalen Epithelorganoiden der Maus, die sowohl den IL-10R1- als auch den IL-10R2-Rezeptor exprimieren (74), eine dosisabhängige Herunterregulierung der NPC1L1-Genexpression nach Behandlung mit rekombinanten Maus-IL-10 (61).

Diese Ergebnisse unterstützen einen Regelkreis, in dem die PA-induzierte Erhöhung der Treg-Zellfrequenz und die lokalen IL-10-Konzentrationen im Dünndarm die Expression des bedeutenden Steroltransporters NPC1L1 regulieren. Somit ist PA in der Lage, die Cholesterinaufnahme indirekt zu regulieren, was sich präventiv auf die Entwicklung von Atherosklerose in ApoE^{-/-} Mäusen auswirkt.

Über die cholesterinsenkende Wirkung von IL-10 wurde bereits in klinischen Studien berichtet, in denen rekombinantes humanes IL-10 und seine Verwendung bei

Autoimmun- und neoplastischen Erkrankungen getestet wurden (75, 76). Der zugrunde liegende Mechanismus der Kontrolle des Fettstoffwechsels blieb jedoch unklar. Die Ergebnisse unserer Gruppe zeigen, dass IL-10 die Cholesterinaufnahme im Darm reguliert, indem es die Expression von NPC1L1 beeinflusst. Im Gegensatz zu einer systemischen Immuntherapie mit rekombinantem IL-10 könnte die Ergänzung der intestinalen Mikroumgebung durch PA ohne Nebenwirkungen einer systemischen IL-10 Behandlung die Atheroprotektion fördern.

4.4. Zusammenfassung

Die vom Darm-Mikrobiom generierten Metaboliten sind wichtige Modulatoren der Wirtsphysiologie (23). Darüber hinaus haben epidemiologische Studien ergeben, dass eine langfristige Aufnahme von Ballaststoffen zur Vorbeugung von Dyslipidämie und atherosklerotischen Herz-Kreislauf-Erkrankungen (CVDs) beitragen kann (37). Kurzkettigen Fettsäuren (SCFAs), die aus der Fermentation unverdauter Nährstoffe wie Ballaststoffen stammen, werden weitere gesundheitsfördernde Eigenschaften zugeschrieben, z.B. durch Senkung des Blutdrucks (77) oder Modulation von Entzündungsreaktionen (45). Diese Studie zeigt eine deutliche Vergrößerung der atherosklerotischen Läsionen, und weitere Berichte unserer Gruppe belegen einen Anstieg des Gesamt- und LDL-Cholesterinspiegels bei ApoE^{-/-} Mäusen, die mit Antibiotika behandelt wurden, um eine Verarmung der Darmmikrobiota zu bewirken, im Vergleich zu konventionell aufgezogenen Mäusen (61). Diese Ergebnisse belegen die funktionelle Rolle der von der Darmmikrobiota abhängigen Signalwege bei der Kontrolle des Cholesterinspiegels im Blut und folglich der Atherogenese.

Die experimentelle Arbeit unserer Gruppe, einschließlich dieser Dissertation, stimmt auch mit früheren Studien überein, die atheroprotektive Wirkungen des SCFA Propionat (PA) (41, 63) beschrieben haben, und erweitert die Berichte um den Nachweis der Eigenschaften von Propionat, die intestinale Cholesterinabsorption über einen immunmodulatorischen Weg zu regulieren und zu verringern. Dieser Weg beinhaltet einen neuartigen Mechanismus, bei dem erhöhtes IL-10 in der Darmumgebung den intestinalen Cholesterintransporter NPC1L1 herunterreguliert.

Bartolomaeus et al. (41) zeigten bereits zuvor vasoprotektive Wirkungen von PA in einem Mausmodell für Angiotensin-II-induzierte hypertensive kardiovaskuläre

Schäden, wobei PA die Angiotensin-II-induzierte proinflammatorische Infiltration von Immunzellen am Herzen verhindern konnte. Es ist zudem bekannt, dass PA bei Mäusen über den endothelialen G-Protein-gekoppelten Rezeptor blutdrucksenkend wirkt, indem es die Widerstandsgefäße auf endothelabhängige Weise erweitert (42). Diese Wirkungen von PA waren jedoch lipidunabhängig, während sich unsere Studie auf die lipidmodulierenden Eigenschaften von PA zur Prävention der Atheroskleroseentwicklung konzentrierte.

Atherosklerose beginnt häufig schon in jungen Jahren (78) und schreitet je nach lebenslanger Exposition gegenüber genetischen und umweltbedingten Risikofaktoren weiter fort (5). Umfangreiche Belege aus epidemiologischen, genetischen und klinischen Interventionsstudien haben gezeigt, dass LDL in diesem Prozess eine kausale Rolle spielt und daher einen der wichtigsten Risikofaktoren darstellt (62). Deshalb ist die Senkung des LDL-Cholesterinspiegels in den frühen Stadien der Atherosklerose von entscheidender Bedeutung für die Prävention der Entwicklung von CVDs (10).

In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass PA die intestinale Expression des intestinalen Cholesterintransporters von Niemann-Pick C1-like Protein 1 (NPC1L1) reguliert, indem es den IL-10-Spiegel in der intestinalen Mikroumgebung erhöht. Daher beeinflusst PA den zirkulierenden LDL-Cholesterinspiegel und dämpft die Entwicklung von Atherosklerose. Die Senkung des LDL-Cholesterins mit potenziell atheroprotektiven Effekten durch eine zusätzliche PA-Behandlung könnte somit eine neuartige Anwendung eines aus der Mikrobiota stammenden Metaboliten darstellen. Darüber hinaus wurde die klinische Relevanz der experimentellen Beobachtungen von unserer Arbeitsgruppe in einer randomisierten, Placebo kontrollierten Doppelblindstudie hervorgehoben, in der die LDL-Cholesterin-senkende Wirkung einer oralen Supplementierung von PA bei Menschen mit Hypercholesterinämie bestätigt wurde (61). Dies zeigt das translationale Potenzial unserer Ergebnisse, allerdings sind weitere Studien erforderlich, um die langfristigen Auswirkungen von PA auf die Entwicklung von Atherosklerose beim Menschen zu untersuchen.

Zusätzlich zu den traditionellen kardiovaskulären Risikofaktoren wurden in den letzten Jahren deutliche Veränderungen in der Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms bei Patienten mit atherosklerotischer CVD beschrieben (23). Eine große metagenomweite Assoziationsstudie an Stuhlproben von Personen mit atherosklerotischer CVD und

gesunden Kontrollpersonen belegte eine erhöhte Abundanz von *Enterobacteriaceae* und *Streptococcus spp.* und eine verringerte Anzahl Butyrat- und Propionatproduzierender Bakterien bei Patient:innen mit atherosklerotischer CVD. Dies zeigt nicht nur einmal mehr die funktionelle Rolle von SCFAs bei der Förderung der kardiovaskulären Gesundheit, sondern auch, dass eine veränderte Darmmikrobiota selbst ein möglicher kardiovaskulärer Risikofaktor ist (34).

4.5. Limitationen

Da die Wirkung von PA unter atherogenen Bedingungen untersucht werden sollte, verwendeten wir ApoE^{-/-} Mäuse für die weiteren Experimente mit PA. Es ist sehr wichtig zu betonen, dass die in Tiermodellen gewonnenen Erkenntnisse der Grundlagenforschung nicht zu 100% direkt auf den Menschen übertragen werden können. Unsere Tierversuche fanden unter standardisierten Bedingungen statt, die sich in klinischen Studien oder im wirklichen Leben nur bedingt reproduzieren lassen. Zudem unterscheidet sich der Lipidstoffwechsel von Mäusen und Menschen. Mäuse transportieren einen besonders hohen Anteil ihres Plasmacholesterins mit HDL, während beim Menschen der Großteil des Plasmacholesterins an LDL gebunden ist (79). Nichtsdestotrotz weist die Maus eine ähnliche Proteinviefalt im LDL und HDL auf wie der Mensch, was das Mausmodell zu einem häufig verwendeten Tiermodell bei Studien des Fettstoffwechsels beim Menschen macht (79).

Bei unseren Versuchen hielten wir uns strikt an die internationalen Richtlinien zur Ersetzung, Verfeinerung und Verringerung von Tieren, die für Tierversuche entwickelt wurden (80). Allerdings sind alle Tiere, die in einem wissenschaftlichen Versuch eingesetzt werden, externen Stressfaktoren ausgesetzt, die den Versuch selbst beeinflussen können. Die Verabreichung von PA erfolgte täglich mittels oraler Schlundsonde, um eine feste und reproduzierbare Dosierung während des Versuchs zu gewährleisten. Die orale Verabreichung von PA kann zu Verletzungen des oberen Magen-Darm-Trakts führen und stellt daher einen großen Stressfaktor für die Mäuse dar. Um für alle Mäuse möglichst ähnliche Bedingungen sicherzustellen, verabreichten wir den Mäusen in der Kontrollgruppe die entsprechenden Kontrolllösungen. Um die Sicherheit und das Wohlergehen der Mäuse zu gewährleisten, beobachteten wir alle Mäuse nach jeder Verabreichung mehrere Minuten lang genau, um eventuelle

Anzeichen von Verletzungen oder Schmerzen zu erkennen. Ein Teil der Tiere erhielt in unserem Versuch auch mehrere Wochen lang Breitbandantibiotika im Trinkwasser. Anschließend wurden sie unter streng sterilen Bedingungen gehalten (steriles Futter, autoklavierte Käfige, steriles Arbeiten während der Magenspülung). Während der Sektionen stellten wir fest, dass einige dieser Mäuse eine Kolitis mit Megaappendix entwickelten, die bei sekundär gnotobiotischen Mäusen bekannt ist, deren systemische Folgen jedoch noch unklar sind. Ein weiterer wichtiger Aspekt war die Gewichtszunahme der Mäuse. Da die Mäuse ad libitum Zugang zu Futter und Wasser hatten, war es nicht möglich, die Futter- und Wasseraufnahme für einzelne Mäuse auszugleichen. So zeigten unsere Experimente, dass nicht alle Mäuse unter HFD-Diät eine signifikante Gewichtszunahme aufwiesen. Bei diesen Mäusen könnte eine mögliche Wirkung von PA auf die durch HFD hervorgerufenen Veränderungen schwächer sein.

Unsere Ergebnisse wurden bei weiblichen Mäusen erzielt. Daher wurden mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede bei den Tierversuchen nicht berücksichtigt. Ein Studiendesign zur Berücksichtigung eines geschlechtsspezifischen Einflusses hätte eine wesentlich größere Anzahl von Versuchstieren erfordert, was dem Grundgedanken des 3-R-Prinzips (Replace, Reduce, Refine) widerspricht. Außerdem wurden nur weibliche Mäuse verwendet, da es bei der Haltung von weiblichen Tieren in Käfigen seltener zu Konflikten kommt (53). Es besteht daher die Möglichkeit, dass bei männlichen Mäusen andere Wirkungen von PA beobachtet werden könnten. Jedoch wurden in anderen klinischen Humanstudien unserer Gruppe, in denen Frauen ebenfalls in der Mehrheit waren, signifikante cholesterinsenkende Effekte bei PA-Behandlung auch bei männlichen Studienteilnehmern beobachtet (61). Das deutet darauf hin, dass die Effekte nicht vom Geschlecht abhängig sind. Die Geschlechtsunabhängigkeit der cholesterinsenkenden Wirkung von PA muss jedoch noch in größeren Studien bestätigt werden.

Die angewandte histologische Methodik ist eine der Standardmethoden der modernen biologischen Forschung, um die Progression der Atherosklerose oder die Expression von Zelltransportern in der Darmwand zu beurteilen. Die daraus gewonnenen Ergebnisse geben jedoch keinen Aufschluss über die intrazelluläre Lokalisation der Proteine, die Genexpression und zeigen manchmal eher qualitative als quantitative Nachweise. In den meisten Fällen sind weitere molekularbiologische Untersuchungen

notwendig, um die Ergebnisse zu bestätigen. In den weiterführenden Studien unserer Arbeitsgruppe konnte jedoch die biologische Relevanz der histologischen Färbungen von Aortenwurzeln und Dünndarm durch molekularbiologische Experimente (Western Blot, PCR, FACS) nachgewiesen werden (61).

Die histologische Methodik selbst birgt ein gewisses Risiko von Fehlerquellen in sich. So können beispielsweise falsche Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen die Quantifizierung beeinträchtigen. Die Möglichkeit unspezifischer Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen wurde jedoch durch negative und positive Färbekontrollen minimiert. Darüber hinaus birgt die Färbung von Proben, selbst bei exakt gleichem Protokoll, Fehlerquellen, wenn ein Schritt des Protokolls auch nur geringfügig abweicht. Anatomische Proben wie Herz oder Aorta sind auch sehr anfällig für Beschädigungen, z.B. durch Entnahme, Bearbeitung, Präparation oder Lagerung. Dies kann die Zahl der für die Quantifizierung verfügbaren Proben erheblich beeinflussen. Außerdem konnte die Auswertung der histologischen Färbungen von ApoE^{-/-} Mäusen nicht automatisiert werden und musste manuell durchgeführt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die angewandte histologische Methodik zu den modernen biologisch-wissenschaftlichen Standardmethoden im Bereich der Atheroskleroseforschung gehört. Und obwohl die histologische Methodik ein gewisses Fehlerrisiko in sich birgt, wurde die biologische Relevanz der für diese Arbeit verwendeten histologischen Färbungen durch weitere molekulare und biologische Experimente unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen.

4.6. Schlussfolgerungen

Diese Studie zeigte, dass die Entwicklung von Atherosklerose zumindest teilweise vom Mikrobiom abhängt und der aus dem Mikrobiom stammende Metabolit – die kurzkettige Fettsäure Propionat – die Entwicklung der durch Hyperlipidämie induzierten Atherosklerose in ApoE^{-/-} Mäusen präventiv beeinflussen kann. Der Mechanismus beinhaltet eine PA-vermittelte Erhöhung der Anzahl regulatorischer T-Zellen und des Interleukin-10-Spiegels im Dünndarm, was wiederum die Expression des Niemann-Pick C1-like Protein 1, eines wichtigen intestinalen Cholesterintransporters, unterdrückt. Auf diese Weise reguliert PA indirekt die

Aufnahme von Cholesterin, was wiederum die Entwicklung der durch Hyperlipidämie ausgelösten Atherosklerose beeinflusst.

Die klinische Relevanz dieser experimentellen Beobachtungen wurde in weiteren Studien unserer Arbeitsgruppe verdeutlicht. In einer randomisierten, placebokontrollierten Doppelblindstudie an Proband:innen mit Hypercholesterinämie senkte Propionat nach einer 8-wöchigen Supplementierung signifikant die Gesamt- und LDL-Cholesterinwerte (61).

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Supplementierung mit PA die Cholesterinhomöostase verbessern und zur kardiovaskulären Gesundheit beitragen kann. Darüber hinaus zeigen diese Daten, dass das Immunsystem des Darms ein neues potenzielles therapeutisches Ziel für die kardiovaskuläre Prävention beim Menschen darstellt, und zwar sowohl durch die Supplementierung mit exogenem Propionat als auch durch die Modulation des Darm-Mikrobioms mit Hilfe von Nahrungsmitteln oder Präbiotika. Weitere Studien sind erforderlich, um die langfristigen metabolischen Auswirkungen und den Einfluss von Propionat auf die kardiovaskuläre Gesundheit beim Menschen zu bestimmen.

Im Hinblick auf die zu Beginn des wissenschaftlichen Vorhabens formulierten Fragestellungen lassen sich zusammenfassend die folgenden Schlussfolgerungen ziehen:

- 1. Die Verarmung der Darmmikrobiota erhöht den Schweregrad der Atherosklerose bei ApoE^{-/-} Mäusen und zeigt, dass das Fortschreiten der Atherosklerose durch das Darm-Mikrobiom beeinflusst werden kann.**
- 2. Eine Supplementierung mit dem aus dem Mikrobiom stammenden Metaboliten PA kann die Entwicklung von Atherosklerose bei ApoE^{-/-} Mäusen senken.**
- 3. Die Behandlung mit PA führte zu einer Verringerung der Größe atherosklerotischer Läsionen in antibiotisch behandelten ApoE^{-/-} Mäusen, was zeigt, dass PA das beschleunigte Fortschreiten der Atherosklerose in Verbindung mit einer verarmten Darmmikrobiota nur tendenziell, jedoch nicht signifikant, kompensieren kann.**

4. Die Propionat-Supplementierung war mit einer Unterdrückung der Expression des Niemann-Pick C1-like Protein 1, eines wichtigen intestinalen Cholesterin-Transporters, in ApoE^{-/-} Mäusen verbunden.

5. Der Mechanismus beinhaltet eine PA-vermittelte Erhöhung des IL-10-Spiegels im Dünndarm, der wiederum die Expression des Niemann-Pick C1-like Protein 1 unterdrückt.

Literatur

1. Townsend N, Wilson L, Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Rayner M, Nichols M. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur Heart J* 2016; 37(42):3232–45. doi: 10.1093/eurheartj/ehw334.
2. GBD 2017 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet* 2018; 392(10159):1736–88. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32203-7.
3. Wilkins E, Wilson L, Wickramasinghe K, Bhatnagar P, Leal J, Luengo-Fernandez R, Burns R, Rayner M, Townsend N. European cardiovascular disease statistics 2017. 2017.
4. Roth GA, Nguyen G, Forouzanfar MH, Mokdad AH, Naghavi M, Murray CJ. Estimates of global and regional premature cardiovascular mortality in 2025. *Circulation*. 2015;132(13):1270-82.
5. Ray KK, Laufs U, Cosentino F, Lobo MD, Landmesser U. The year in cardiology: cardiovascular prevention. *Eur Heart J* 2020; 41(11):1157–63. doi: 10.1093/eurheartj/ehz929.
6. Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML, Gortmaker SL. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *The Lancet* 2011; 378(9793):804–14. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60813-1.
7. Michos ED, McEvoy JW, Blumenthal RS. Lipid Management for the Prevention of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *N Engl J Med* 2019; 381(16):1557–67. doi: 10.1056/NEJMra1806939.
8. Prospective Studies Collaboration. Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55 000 vascular deaths. *The Lancet*. 2007;370(9602):1829-39.
9. Multinational Cardiovascular Risk Consortium. Application of non-HDL cholesterol for population-based cardiovascular risk stratification: results from the Multinational Cardiovascular Risk Consortium. *The Lancet* 2019; 394(10215):2173–83. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32519-X.
10. 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. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J* 2020; 41(1):111–88. doi: 10.1093/eurheartj/ehz455.
11. Otsuka F, Yasuda S, Noguchi T, Ishibashi-Ueda H. Pathology of coronary atherosclerosis and thrombosis. *Cardiovasc Diagn Ther* 2016; 6(4):396–408. doi: 10.21037/cdt.2016.06.01.
 12. Otsuka F, Kramer MCA, Woudstra P, Yahagi K, Ladich E, Finn AV, de Winter RD, Kolodgie F, Wight T, Davis H, Joner M, Virmani R. Natural progression of atherosclerosis from pathologic intimal thickening to late fibroatheroma in human coronary arteries: A pathology study. *Atherosclerosis* 2015; 241(2):772–82. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.05.011.
 13. Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *New England journal of medicine*. 1999;340(2):115-26.
 14. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407(6801):233–41. doi: 10.1038/35025203.
 15. Poston RN. Atherosclerosis: integration of its pathogenesis as a self-perpetuating propagating inflammation: a review. *Cardiovasc Endocrinol Metab* 2019; 8(2):51–61. doi: 10.1097/XCE.0000000000000172.
 16. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med* 2011; 17(11):1410–22. doi: 10.1038/nm.2538.
 17. Berenson Gerald S., Srinivasan Sathanur R., Bao Weihang, Newman William P., Tracy Richard E., Wattigney Wendy A. Association between Multiple Cardiovascular Risk Factors and Atherosclerosis in Children and Young Adults.
 18. Kiouptsi K, Reinhardt C. Contribution of the commensal microbiota to atherosclerosis and arterial thrombosis. *Br J Pharmacol* 2018; 175(24):4439–49. doi: 10.1111/bph.14483.
 19. Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *science*. 2005;307(5717):1915-20.
 20. Karlsson F, Tremaroli V, Nielsen J, Bäckhed F. Assessing the human gut microbiota in metabolic diseases. *Diabetes* 2013; 62(10):3341–9. doi: 10.2337/db13-0844.
 21. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006; 124(4):837–48. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.017.
 22. Zmora N, Suez J, Elinav E. You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019; 16(1):35–56. doi: 10.1038/s41575-018-0061-2.
 23. Tang WHW, Bäckhed F, Landmesser U, Hazen SL. Intestinal Microbiota in Cardiovascular Health and Disease: JACC State-of-the-Art Review. *Journal of the American College of Cardiology* 2019; 73(16):2089–105. doi: 10.1016/j.jacc.2019.03.024.

24. Villette R, Kc P, Beliard S, Salas Tapia MF, Rainteau D, Guerin M, Lesnik P. Unraveling Host-Gut Microbiota Dialogue and Its Impact on Cholesterol Levels. *Front Pharmacol* 2020; 11:278. doi: 10.3389/fphar.2020.00278.
25. Lindskog Jonsson A, Caesar R, Akrami R, Reinhardt C, Fåk Hållenius F, Borén J, Bäckhed F. Impact of Gut Microbiota and Diet on the Development of Atherosclerosis in Apoe^{-/-} Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2018; 38(10):2318–26. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311233.
26. Velagapudi VR, Hezaveh R, Reigstad CS, Gopalacharyulu P, Yetukuri L, Islam S, Felin J, Perkins R, Boren J, Oresic M, Bäckhed F. The gut microbiota modulates host energy and lipid metabolism in mice. *J Lipid Res* 2010; 51(5):1101–12. doi: 10.1194/jlr.M002774.
27. 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, Koonen DPY. A Proinflammatory Gut Microbiota Increases Systemic Inflammation and Accelerates Atherosclerosis. *Circ Res* 2019; 124(1):94–100. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313234.
28. Karlsson FH, Fåk F, Nookaew I, Tremaroli V, Fagerberg B, Petranovic D, Bäckhed F, Nielsen J. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat Commun* 2012; 3:1245. doi: 10.1038/ncomms2266.
29. Nemet I, Saha PP, Gupta N, Zhu W, Romano KA, Skye SM, Cajka T, Mohan ML, Li L, Wu Y, Funabashi M, Ramer-Tait AE, Prasad SVN, Fiehn O, Rey FE, Tang WHW, Fischbach MA, DiDonato JA, Hazen SL. A Cardiovascular Disease-Linked Gut Microbial Metabolite Acts via Adrenergic Receptors. *Cell* 2020; 180(5):862-877.e22. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.016.
30. Haghikia A, Li XS, Liman TG, Bledau N, Schmidt D, Zimmermann F, Kränkel 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, 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*. 2018;38(9):2225-35.
31. Schiattarella GG, Sannino A, Toscano E, Giugliano G, Gargiulo G, Franzone A, Trimarco B, Esposito G, Perrino C. Gut microbe-generated metabolite trimethylamine-N-oxide as cardiovascular risk biomarker: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Eur Heart J* 2017; 38(39):2948–56. doi: 10.1093/eurheartj/ehx342.
32. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, Britt EB, Fu X, Wu Y, Li L, Smith JD, DiDonato JA, Chen J, Li H, Wu GD, Lewis JD, Warriar M, Brown JM, Krauss RM,

- Tang WHW, Bushman FD, Lusis AJ, Hazen SL. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med* 2013; 19(5):576–85. doi: 10.1038/nm.3145.
33. Tang WHW, Wang Z, Levison BS, Koeth RA, Britt EB, Fu X, Wu Y, Hazen SL. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2013; 368(17):1575–84. doi: 10.1056/NEJMoa1109400.
 34. Jie Z, Xia H, Zhong S-L, Feng Q, Li S, Liang S, Zhong H, Liu Z, Gao Y, Zhao H, Zhang D, Su Z, Fang Z, Lan Z, Li J, Xiao L, Li J, Li R, Li X, Li F, Ren H, Huang Y, Peng Y, Li G, Wen B, Dong B, Chen JY, Geng QS, Zhang ZW, Yang H, Wang J, Wang J, Zhang X, Madsen L, Brix S, Ning G, Xu X, Liu X, Hou Y, Jia H, He K, Kristiansen K. The gut microbiome in atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Commun* 2017; 8(1):845. doi: 10.1038/s41467-017-00900-1.
 35. Wang Z, Roberts AB, Buffa JA, Levison BS, Zhu W, Org E, Gu X, Huang Y, Zamanian-Daryoush M, Culley MK, DiDonato AJ, Fu X, Hazen JE, Krajcik D, DiDonato JA, Lusis AJ, Hazen SL. Non-lethal Inhibition of Gut Microbial Trimethylamine Production for the Treatment of Atherosclerosis. *Cell* 2015; 163(7):1585–95. doi: 10.1016/j.cell.2015.11.055.
 36. Kaye DM, Shihata WA, Jama HA, Tsyganov K, Ziemann M, Kiriazis H, Horlock D, Vijay A, Giam B, Vinh A, Johnson C, Fiedler A, Donner D, Snelson M, Coughlan MT, Phillips S, Du XJ, El-Osta A, Drummond G, Lambert GW, Spector TD, Valdes AM, Mackay CR, Marques FZ. Deficiency of Prebiotic Fiber and Insufficient Signaling Through Gut Metabolite-Sensing Receptors Leads to Cardiovascular Disease. *Circulation* 2020; 141(17):1393–403. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.043081.
 37. Crowe FL, Key TJ, Appleby PN, Overvad K, Schmidt EB, Egeberg R, Tjønneland A, Kaaks R, Teucher B, Boeing H, Weikert C, Trichopoulou A, Ouranos V, Valanou E, Masala G, Sieri S, Panico S, Tumino R, Matullo G, Bueno-de-Mesquita HB, Boer JMA, Beulens JWJ, van der Schouw YT, Quiros JR, Buckland G, Sanchez MJ, Dorransoro M, Huerta JM, Moreno-Iribas C, Hedblad B, Jansson JH, Wennberg P, Khaw KT, Wareham N, Ferrari P, Illner AK, Chuang SC, Norat T, Danesh J, Riboli E. Dietary fibre intake and ischaemic heart disease mortality: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-Heart study. *Eur J Clin Nutr* 2012; 66(8):950–6. doi: 10.1038/ejcn.2012.51.
 38. Koh A, Vadder F de, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell* 2016; 165(6):1332–45. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.041.

39. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-Y M, Glickman JN, Garrett WS. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* 2013; 341(6145):569–73. doi: 10.1126/science.1241165.
40. Duscha A, Gisevius B, Hirschberg S, Yissachar N, Stangl GI, Dawin 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, Stühler K, Hirche F, Balogh A, Kempa S, Träger 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, Müller DN, Linker RA, Gold R, Haghikia A. Propionic Acid Shapes the Multiple Sclerosis Disease Course by an Immunomodulatory Mechanism. *Cell* 2020; 180(6):1067-1080.e16. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.035.
41. Bartolomaeus H, Balogh A, Yakoub M, Homann S, Markó L, Höges S, Tsvetkov D, Krannich A, Wundersitz S, Avery EG, Haase N, Kräker 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, Müller DN, Stegbauer J, Wilck N. Short-Chain Fatty Acid Propionate Protects From Hypertensive Cardiovascular Damage. *Circulation* 2019; 139(11):1407–21. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036652.
42. Natarajan N, Hori D, Flavahan S, Stepan J, Flavahan NA, Berkowitz DE, Pluznick JL. Microbial short chain fatty acid metabolites lower blood pressure via endothelial G protein-coupled receptor 41. *Physiological Genomics* 2016; 48(11):826–34. doi: 10.1152/physiolgenomics.00089.2016.
43. Kasahara K, Krautkramer KA, Org E, Romano KA, Kerby RL, Vivas EI, Mehrabian M, Denu JM, Bäckhed F, Lusic AJ, Rey FE. Interactions between *Roseburia intestinalis* and diet modulate atherogenesis in a murine model. *Nat Microbiol* 2018; 3(12):1461–71. doi: 10.1038/s41564-018-0272-x.
44. Lee H-J, Ahn H-J, Kang C-S, Choi J-C, Choi H-J, Lee K-G, Kim J-I, Kim H-Y. Naturally occurring propionic acid in foods marketed in South Korea. *Food Control* 2010; 21(2):217–20. doi: 10.1016/j.foodcont.2009.04.006.
45. Haghikia A, Jörg 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, Thöne J, Demir S, Müller DN, Gold R, Linker RA. Dietary Fatty Acids Directly Impact Central Nervous System Autoimmunity via the Small Intestine. *Immunity* 2015; 43(4):817–29. doi: 10.1016/j.immuni.2015.09.007.

46. Murphy K, Weaver C. *Janeway immunologie*: Springer-Verlag; 2018.
47. Tabas I, Lichtman AH. Monocyte-Macrophages and T Cells in Atherosclerosis. *Immunity* 2017; 47(4):621–34. doi: 10.1016/j.immuni.2017.09.008.
48. Gisterå A, Hansson GK. The immunology of atherosclerosis. *Nat Rev Nephrol* 2017; 13(6):368–80. doi: 10.1038/nrneph.2017.51.
49. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407(6801):233–41. doi: 10.1038/35025203.
50. Albany CJ, Trevelin SC, Giganti G, Lombardi G, Scottà C. Getting to the Heart of the Matter: The Role of Regulatory T-Cells (Tregs) in Cardiovascular Disease (CVD) and Atherosclerosis. *Front Immunol* 2019; 10:2795. doi: 10.3389/fimmu.2019.02795.
51. He S, Kahles F, Rattik S, Nairz M, McAlpine CS, Anzai A, Selgrade D, Fenn AM, Chan CT, Mindur JE, Valet C, Poller WC, Halle L, Rotllan N, Iwamoto Y, Wojtkiewicz GR, Weissleder R, Libby P, Fernández-Hernando C, Drucker DJ, Nahrendorf M, Swirski FK. Gut intraepithelial T cells calibrate metabolism and accelerate cardiovascular disease. *Nature* 2019; 566(7742):115–9. doi: 10.1038/s41586-018-0849-9.
52. Klingenberg R, Gerdes N, Badeau RM, Gisterå A, Strodtzoff D, Ketelhuth DFJ, Lundberg AM, Rudling M, Nilsson SK, Olivecrona G, Zoller S, Lohmann C, Lüscher TF, Jauhiainen M, Sparwasser T, Hansson GK. Depletion of FOXP3⁺ regulatory T cells promotes hypercholesterolemia and atherosclerosis. *J Clin Invest* 2013; 123(3):1323–34. doi: 10.1172/JCI63891.
53. Theil JH, Ahloy-Dallaire J, Weber EM, Gaskill BN, Pritchett-Corning KR, Felt SA, Garner JP. The epidemiology of fighting in group-housed laboratory mice. *Sci Rep* 2020; 10(1):16649. doi: 10.1038/s41598-020-73620-0.
54. Zintzsch A, Noe E, Reißmann M, Ullmann K, Krämer S, Jerchow B, Kluge R, Gösele C, Nickles H, Puppe A, Rüllicke T. Guidelines on severity assessment and classification of genetically altered mouse and rat lines. *Lab Anim* 2017; 51(6):573–82. doi: 10.1177/0023677217718863.
55. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 1992; 71(2):343–53. doi: 10.1016/0092-8674(92)90362-g.
56. Piedrahita JA, Zhang SH, Hagaman JR, Oliver PM, Maeda N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(10):4471–5. doi: 10.1073/pnas.89.10.4471.

57. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 1992; 258(5081):468–71. doi: 10.1126/science.1411543.
58. Shubitowski TB, Poll BG, Natarajan N, Pluznick JL. Short-chain fatty acid delivery: assessing exogenous administration of the microbiome metabolite acetate in mice. *Physiol Rep* 2019; 7(4):e14005. doi: 10.14814/phy2.14005.
59. Boivin GP, Hickman DL, Creamer-Hente MA, Pritchett-Corning KR, Bratcher NA. Review of CO₂ as a Euthanasia Agent for Laboratory Rats and Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 20; 56(5):491–9.
60. Chan IH, van Hoof D, Abramova M, Bilardello M, Mar E, Jorgensen B, McCauley S, Bal H, Oft M, Van Vlasselaer P, Mumm JB. PEGylated IL-10 Activates Kupffer Cells to Control Hypercholesterolemia. *PLoS ONE* 2016; 11(6):e0156229. doi: 10.1371/journal.pone.0156229.
61. Haghikia A, Zimmermann F, Schumann P, Jasina A, Roessler J, Schmidt D, Heinze P, Kaisler J, Nageswaran V, Aigner A, Ceglarek U, Cineus R, Hegazy AN, van der Vorst EPC, Döring Y, Strauch CM, Nemet I, Tremaroli V, Dwibedi C, Kränkel N, Leistner DM, Heimesaat MM, Bereswill S, Rauch G, Seeland U, Soehnlein O, Müller DN, Gold R, Bäckhed F, Hazen SL, Haghikia A, Landmesser U. Propionate attenuates atherosclerosis by immune-dependent regulation of intestinal cholesterol metabolism. *Eur Heart J* 2022; 43(6):518–33. doi: 10.1093/eurheartj/ehab644.
62. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, Hegele RA, Krauss RM, Raal FJ, Schunkert H, Watts GF, Borén J, Fazio S, Horton JD, Masana L, Nicholls SJ, Nordestgaard BG, van de Sluis B, Taskinen MR, Tokgözoğlu L, Landmesser U, Laufs U, Wiklund O, Stock JK, Chapman MJ, Catapano AL. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J* 2017; 38(32):2459–72. doi: 10.1093/eurheartj/ehx144.
63. Wang J, Zhang H, Chen X, Chen Y, Menghebilige, Bao Q. Selection of potential probiotic lactobacilli for cholesterol-lowering properties and their effect on cholesterol metabolism in rats fed a high-lipid diet. *J Dairy Sci* 2012; 95(4):1645–54. doi: 10.3168/jds.2011-4768.
64. Tang TWH, Chen H-C, Chen C-Y, Yen CYT, Lin C-J, Prajnamitra RP, Chen LL, Ruan SC, Lin JH, Lin PJ, Lu HH, Kuo CW, Chang CM, Hall AD, Vivas EI, Shui JW, Chen P, Hacker TA, Rey FE, Kamp TJ, Hsieh PCH. Loss of Gut Microbiota Alters Immune System

- Composition and Cripples Postinfarction Cardiac Repair. *Circulation* 2019; 139(5):647–59. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035235.
65. Tirosh A, Calay ES, Tuncman G, Claiborn KC, Inouye KE, Eguchi K, Alcalá M, Rathaus M, Hollander KS, Ron I, Livne R, Heianza Y, Qi L, Shai I, Garg R, Hotamisligil GS. The short-chain fatty acid propionate increases glucagon and FABP4 production, impairing insulin action in mice and humans. *Sci Transl Med* 2019; 11(489). doi: 10.1126/scitranslmed.aav0120.
66. Vadder F de, Kovatcheva-Datchary P, Goncalves D, Vinera J, Zitoun C, Duchamp A, Bäckhed F, Mithieux G. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell* 2014; 156(1-2):84–96. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.016.
67. Michos ED, McEvoy JW, Blumenthal RS. Lipid Management for the Prevention of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *N Engl J Med* 2019; 381(16):1557–67. doi: 10.1056/NEJMra1806939.
68. Altmann SW, Davis HR, Zhu L-J, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 2004; 303(5661):1201–4. doi: 10.1126/science.1093131.
69. Silbernagel G, Fauler G, Genser B, Drechsler C, Krane V, Scharnagl H, Grammer TB, Baumgartner I, Ritz E, Wanner C, März W. Intestinal cholesterol absorption, treatment with atorvastatin, and cardiovascular risk in hemodialysis patients. *Journal of the American College of Cardiology* 2015; 65(21):2291–8. doi: 10.1016/j.jacc.2015.03.551.
70. Dawson PA, Haywood J, Craddock AL, Wilson M, Tietjen M, Kluckman K, Maeda N, Parks JS. Targeted deletion of the ileal bile acid transporter eliminates enterohepatic cycling of bile acids in mice. *J Biol Chem* 2003; 278(36):33920–7. doi: 10.1074/jbc.M306370200.
71. Huch M, Koo B-K. Modeling mouse and human development using organoid cultures. *The Company of Biologists* 2015; (142):3113–25. doi: 10.1242/dev.118570.
72. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veeken J, deRoos P, Liu H, Cross JR, Pfeffer K, Coffey PJ, Rudenski AY. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* 2013; 504(7480):451–5. doi: 10.1038/nature12726.
73. He S, Kahles F, Rattik S, Nairz M, McAlpine CS, Anzai A, Selgrade D, Fenn AM, Chan CT, Mindur JE, Valet C, Poller WC, Halle L, Rotllan N, Iwamoto Y, Wojtkiewicz GR, Weissleder R, Libby P, Fernández-Hernando C, Drucker DJ, Nahrendorf M, Swirski FK. Gut

- intraepithelial T cells calibrate metabolism and accelerate cardiovascular disease. *Nature* 2019; 566(7742):115–9. doi: 10.1038/s41586-018-0849-9.
74. Biton M, Haber AL, Rogel N, Burgin G, Beyaz S, Schnell A, Ashenberg O, Su CW, Smillie C, Shekhar K, Chen Z, Wu C, Ordovas-Montanes J, Alvarez D, Herbst RH, Zhang M, Tirosh I, Dionne D, Nguyen LT, Xifaras ME, Shalek AK, von Andrian UH, Graham DB, Rozenblatt-Rosen O, Shi HN, Kuchroo V, Yilmaz OH, Regev A, Xavier RJ. T Helper Cell Cytokines Modulate Intestinal Stem Cell Renewal and Differentiation. *Cell* 2018; 175(5):1307-1320.e22. doi: 10.1016/j.cell.2018.10.008.
75. Kimball AB, Kawamura T, Tejura K, Boss C, Hancox AR, Vogel JC, Steinberg SM, Turner ML, Blauvelt A. Clinical and immunologic assessment of patients with psoriasis in a randomized, double-blind, placebo-controlled trial using recombinant human interleukin 10. *Arch Dermatol* 2002; 138(10):1341–6. doi: 10.1001/archderm.138.10.1341.
76. Chan IH, van Hoof D, Abramova M, Bilardello M, Mar E, Jorgensen B, McCauley S, Bal H, Oft M, Van Vlasselaer P, Mumm JB. PEGylated IL-10 Activates Kupffer Cells to Control Hypercholesterolemia. *PLoS ONE* 2016; 11(6):e0156229. doi: 10.1371/journal.pone.0156229.
77. Kaye DM, Shihata WA, Jama HA, Tsyganov K, Ziemann M, Kiriazis H, Horlock D, Vijay A, Giam B, Vinh A, Johnson C, Fiedler A, Donner D, Snelson M, Coughlan MT, Phillips S, Du X-J, El-Osta A, Drummond G, Lambert GW, Spector TD, Valdes AM, Mackay CR, Marques FZ. Deficiency of Prebiotic Fiber and Insufficient Signaling Through Gut Metabolite-Sensing Receptors Leads to Cardiovascular Disease. *Circulation* 2020; 141(17):1393–403. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.043081.
78. Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, Newman WP, Tracy RE, Wattigney WA. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. *New England journal of medicine*. 1998;338(23):1650-6.
79. Gordon SM, Li H, Zhu X, Shah AS, Lu LJ, Davidson WS. A comparison of the mouse and human lipoproteome: suitability of the mouse model for studies of human lipoproteins. *J Proteome Res* 2015; 14(6):2686–95. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00213.
80. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biology* 2010; 8(6). doi: 10.1371/journal.pbio.1000412.t001.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Andrzej Jasina, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema **„Die Rolle von Darm-Mikrobiom abhängigen Metaboliten für Atherosklerose“** / **„The role of gut microbiome-dependent metabolites in atherosclerosis“** 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) 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

Anteilerklärung an erfolgten Publikationen

Andrzej Jasina 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, Döring Y, Strauch CM, Nemet I, Tremaroli V, Dwibedi C, Kränkel N, Leistner DM, Heimesaat MM, Bereswill S, Rauch G, Seeland U, Soehnlein O, Müller DN, Gold R, Bäckhed F, Hazen SL, Haghikia A, Landmesser U. Propionate attenuates atherosclerosis by immune-dependent regulation of intestinal cholesterol metabolism. *Eur Heart J.* 2022 Feb 10;43(6):518-533. doi: 10.1093/eurheartj/ehab644. PMID: 34597388.

Beitrag im Einzelnen:

Andrzej Jasina hat an der Durchführung der Mausversuche mitgewirkt, histologische und immunohistochemische Färbungen und anschließende Analysen der Proben durchgeführt. Aus den Ergebnissen sind Teile der Abbildungen 1, 2, 3 und 5 des Artikels entstanden.

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Unterschrift des Betreuers/der Betreuerin

Curriculum vitae

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

Publikationsliste

Journal-Artikel mit Peer-Review-Verfahren

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, Döring Y, Strauch CM, Nemet I, Tremaroli V, Dwibedi C, Kränkel N, Leistner DM, Heimesaat MM, Bereswill S, Rauch G, Seeland U, Soehnlein O, Müller DN, Gold R, Bäckhed F, Hazen SL, Haghikia A, Landmesser U. Propionate attenuates atherosclerosis by immune-dependent regulation of intestinal cholesterol metabolism. *Eur Heart J*. 2022 Feb 10;43(6):518-533. doi: 10.1093/eurheartj/ehab644. PMID: 34597388.

Publikation 2: Zimmermann F, Roessler J, Schmidt D, **Jasina A**, Schumann P, Gast M, Poller W, Leistner D, Giral H, Kränkel N, Kratzer A, Schuchardt S, Heimesaat MM, Landmesser U, Haghikia A. Impact of the Gut Microbiota on Atorvastatin Mediated Effects on Blood Lipids. *J Clin Med*. 2020 May 25;9(5):1596. doi: 10.3390/jcm9051596. PMID: 32466086; PMCID: PMC7290826.

Publikation 3: Gast M, Rauch BH, Nakagawa S, Haghikia A, **Jasina A**, Haas J, Nath N, Jensen L, Stroux A, Böhm A, Friebel J, Rauch U, Skurk C, Blankenberg S, Zeller T, Prasanth KV, Meder B, Kuss A, Landmesser U, Poller W. Immune system-mediated atherosclerosis caused by deficiency of long non-coding RNA MALAT1 in ApoE^{-/-}-mice. *Cardiovasc Res*. 2019 Feb 1;115(2):302-314. doi: 10.1093/cvr/cvy202. PMID: 30101304.

Publikation 4: Kirschbaum S, Kakzhad T, Granrath F, **Jasina A**, Oronowicz J, Perka C, Kopf S, Gwinner C, Pumberger M. Significant increase in quantity and quality of knee arthroplasty related research in KSSTA over the past 15 years. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2022 Apr;30(4):1239-1249. doi: 10.1007/s00167-021-06555-2. Epub 2021 Apr 10. PMID: 33837808; PMCID: PMC8035607.

Publikation 5: **Jasina A**, Enz A, Knoop A, Jones G, Ellenrieder M, Mittelmeier W, Lutter C. Constrained metal-on-metal hip arthroplasty: ever heard of a 50-year survival story? *Orthopadie (Heidelb)*. 2023 Jun;52(6):504-508. doi: 10.1007/s00132-023-04380-8. Epub 2023 May 12. PMID: 37171637; PMCID: PMC10261217.

Danksagung

Meinem Großvater, in ewigem Dank. **Dziadkowi, w wiecznej wdzięczności.**

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Arash Haghikia – meinem Doktorvater und Betreuer dieser Arbeit – für die Möglichkeit bedanken, über dieses Thema zu forschen. Prof. Haghikia hat mich in die Welt der Wissenschaft eingeführt und mir gleichzeitig die höchsten Standards wissenschaftlichen Arbeitens beigebracht, die für mich der Maßstab für Professionalität für den Rest meiner wissenschaftlichen Karriere sein werden. Arash, ich danke Dir für Deine Geduld, Deinen Rat und Deinen persönlichen Umgang.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. med. Ulf Landmesser für die Möglichkeit, meine Dissertation in der Abteilung für Kardiologie der Charité Campus Benjamin-Franklin und in seinem Forschungslabor zu verfassen.

Ferner möchte ich mich bei Nicolle und dem Team der AG Landmesser für ihre Unterstützungsbereitschaft bedanken. Insbesondere möchte ich Herrn Georg Zingler, der mir die Grundlagen der Histologie und die Kunst der Kryotomhandhabung beigebracht hat, für sein außerordentliches Fachwissen und seine Kryotomzauberei meinen Dank aussprechen.

Ein großes Dankeschön geht auch an mein Team der Arbeitsgruppe Haghikia. Neben dem Offensichtlichen – der Unterstützung und der fachlichen Zusammenarbeit – ist die gemeinsam verbrachte Zeit eine der schönsten Erinnerungen an diese Zeit und daher unbezahlbar. Friederike, David, Johann, Paul – danke!

Ich möchte mich zudem auch bei Prof. Wolfram Mittelmeier, Prof. Christoph Lutter und PD Dr. Andreas Enz von der Orthopädischen Klinik der Universitätsmedizin Rostock für ihr bedingungsloses Vertrauen und ihre tatkräftige Unterstützung in der Endphase der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Ich werde mir erlauben, ein allerletztes Dankeswort in meiner Muttersprache zu verfassen: Dziękuję moim Rodzicom, Babci, Bratu i mojej Partnerce za bezwarunkowe i nieustające wsparcie. Dziękuję również moim Przyjaciołom za uświadomienie, że ego to mój wróg.



Jasina, Andrzej

andrzej.jasina@charite.de

219188 (Matrikelnummer)

Promotionsbetreuer:

PD Dr med Arash Haghikia

Klinik / Institut für Kardiologie

Charité, Campus Benjamin Franklin

Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Frau xx innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE) bei mir eine statistische Beratung zu ihrem Promotionsvorhaben „Rolle von Darmabhängigen Metaboliten für die Atherosklerose“ wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 30.05.2022
- Termin 2: 13.06.2022

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 bzgl. der adäquaten Deskription der erhobenen Daten zur Gegenüberstellung der jeweils zwei Tiergruppen
- Instruktion bzgl. der Verwendung angemessener grafischer Darstellungen, insbesondere Boxplots
- Empfehlung zur korrekten Anwendung geeigneter statistischer Tests in Abhängigkeit von den Fragestellungen (parametrische (t-Test) bzw. nicht-parametrische (MW-U-Test) Tests für unverbundene Stichproben)
- Hinweise zur Interpretation der Ergebnisse

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:

Name des Beraters/ der Beraterin:

Unterschrift BeraterIn, Institutsstempel



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