

DISSERTATION

**Die Rolle des Darm-Mikrobiom abhängigen Metaboliten Imidazol-  
Propionats für die Immunzellendifferenzierung und  
koronare Herzkrankheit**

**The role of the gut microbiome-dependent metabolite imidazole  
propionate in immune cell differentiation and coronary artery disease**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Leander Reinshagen

Erstbetreuung: Prof. Dr. med. Arash Haghikia

Datum der Promotion: 29.11.2024

## Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden eingereicht in:  
Science Translational Medicine am 20.03.2024

V Nageswaran, A Carreras, **L Reinshagen**, K R. Beck, J Steinfeldt, M Ståhlman, P Ramezani Rad, J Lim, E T. Strässler, B Verhaar, Y Döring, C Weber, M König, E Steinhagen-Thiessen, I Demuth, N Kränkel, D M. Leistner, M Nieuwdorp, P Knaus, M Ferrell, M Potente, S L. Hazen, U Landmesser, F Bäckhed, A Haghikia; **Gut microbial metabolite imidazole propionate impairs endothelial cell function and promotes the development of atherosclerosis;**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	3
<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b> .....	6
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	7
<b>Abstrakt – Deutsch</b> .....	10
<b>Abstract – English</b> .....	11
<b>1. Einleitung</b> .....	13
1.1 Atherosklerose und koronare Herzkrankheit (KHK).....	13
1.2 Die Pathogenese der Atherosklerose.....	14
1.3 Die Bedeutung von Immunzellendifferenzierung in der Pathogenese der Atherosklerose.....	17
1.4 Darmmikrobiom und die Bedeutung seiner Metaboliten für die Atherogenese.....	25
1.5 Fragestellungen der Arbeit.....	29
<b>2. Materialien und Methodik</b> .....	30
2.1 Materialien.....	30
2.2 Klinische Studie.....	32
2.2.1 Patient:innenkohorte und Studiendesign.....	32
2.2.2 Quantifizierung des Imidazol-Propionats im Blutplasma.....	33
2.3 Tierexperiment.....	35
2.3.1 Mausstamm und Herkunft.....	35
2.3.2 Haltungsbedingungen und Vorbereitung der Tiere auf den Versuch.....	36
2.3.3 Ablauf des Tierexperiments.....	36
2.3.4 Behandlung mit Imidazol-Propionat oder Trinkwasser.....	37
2.3.5 Durchführung der Carotisverletzung an der Maus.....	38

2.3.6	Durchführung der Tötung, Organentnahme und Zellisolation.....	38
2.4	Durchflusszytometrische Analysen.....	39
2.4.1	Das Prinzip der Durchflusszytometrie.....	39
2.4.2	Antikörperfärbung der Immunzellen.....	42
2.4.3	Durchflusszytometrische Messungen.....	49
2.4.4	Analyse der durchflusszytometrischen Messergebnisse.....	50
2.4.5	Ausschluss von Proben.....	51
2.5	Statistik.....	51
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>52</b>
3.1	Klinische Studie.....	52
3.2	Tierexperiment.....	53
3.2.1	Einfluss von Imidazol-Propionat auf die T-Helferzellen, den Subpopulationen und T-regulatorischen Zellen im Blut.....	54
3.2.2	Einfluss von Imidazol-Propionat auf die T-Helferzellen, den Subpopulationen und T-regulatorischen Zellen in der Milz.....	58
3.2.3	Einfluss von Imidazol-Propionat auf die zytotoxischen T-Zellen und deren Subpopulationen im Blut.....	62
3.2.4	Einfluss von Imidazol-Propionat auf die zytotoxischen T-Zellen und deren Subpopulationen in der Milz.....	65
3.2.5	Einfluss von Imidazol-Propionat auf die Ly6C <sup>low</sup> und Ly6C <sup>hi</sup> Monozyten Homöostase im Knochenmark.....	68
3.2.6	Einfluss von Imidazol-Propionat auf die Ly6C <sup>low</sup> und Ly6C <sup>hi</sup> Monozyten Homöostase in der Milz.....	71
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>75</b>
4.1	Diskussion der klinischen Studie.....	76
4.2	Diskussion der Experimente mit Imidazol-Propionat.....	76
4.3	Methodendiskussion.....	89
4.4	Imidazol-Propionat im translationalen Kontext.....	91

<b>5. Schlussfolgerung</b> .....	92
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	94
<b>Eidesstattliche Erklärung</b> .....	101
<b>Lebenslauf</b> .....	102
<b>Publikationsliste</b> .....	104
<b>Danksagung</b> .....	105
<b>Bescheinigung des akkreditierten Statistikers</b> .....	106

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b> Übersicht ausgewählter T-Zellen und den zugehörigen Zytokinen.....	21
<b>Tabelle 2:</b> Klinische Parameter und Laborparameter der Patient:innenkohorte.....	35
<b>Abbildung 1</b> Darstellung der zytotoxischen T-Zell Subtypen.....	22
<b>Abbildung 2</b> Darstellung des Synthese-Pfades des Imidazol-Propionats.....	28
<b>Abbildung 3</b> Ablaufschema des Experiments.....	37
<b>Abbildung 4</b> Darstellung des Prozesses der Durchflusszytometrie.....	41
<b>Abbildung 5</b> Gating Strategie zur Identifikation der Monozyten Subpopulationen.....	43
<b>Abbildung 6</b> Gating Strategie zur Identifikation der TC-1 und TC-17 Zellen.....	46
<b>Abbildung 7</b> Gating Strategie zur Identifikation der Th-1 und Th-17 Zellen.....	47
<b>Abbildung 8</b> Gating Strategie zur Identifikation der CD25 positiven und FoxP3 positiven Zellen.....	49
<b>Abbildung 9</b> Darstellung der Fluoreszenz-Minus-One (FMO) Methode anhand von CD8 und CD4 positiven Populationen.....	50
<b>Abbildung 10</b> Korrelation des ImP-Plasma-Spiegels mit vorhandener KHK.....	52-53
<b>Abbildung 11</b> Analyse des Blutes auf CD4+ Lymphozyten.....	54
<b>Abbildung 12</b> Analyse des Blutes auf Th1 Zellen.....	56
<b>Abbildung 13</b> Analyse des Blutes auf Th17 Zellen.....	57
<b>Abbildung 14</b> Analyse des Blutes auf T-regulatorische Zellen.....	58
<b>Abbildung 15</b> Analyse des Milzgewebes auf CD4+ Zellen.....	59
<b>Abbildung 16</b> Analyse des Milzgewebes auf Th1-Zellen.....	60
<b>Abbildung 17</b> Analyse des Milzgewebes auf Th17-Zellen.....	61
<b>Abbildung 18</b> Analyse des Milzgewebes auf T-regulatorische Zellen.....	62
<b>Abbildung 19</b> Analyse des Blutes auf CD8+ Zellen.....	63
<b>Abbildung 20</b> Analyse des Milzgewebes auf TC1 Zellen.....	64
<b>Abbildung 21</b> Analyse des Blutes auf TC17 Zellen.....	65
<b>Abbildung 22</b> Analyse des Milzgewebes auf CD8+ Zellen.....	66
<b>Abbildung 23</b> Analyse des Milzgewebes auf TC1.....	67
<b>Abbildung 24</b> Analyse des Milzgewebes auf TC17 Zellen.....	68
<b>Abbildung 25</b> Analyse des Knochenmarks auf Ly6C <sup>hi</sup> .....	69
<b>Abbildung 26</b> Analyse des Knochenmarks auf Ly6C <sup>low</sup> .....	70
<b>Abbildung 27</b> Analyse des Knochenmarks auf Ly6C <sup>neg</sup> .....	71
<b>Abbildung 28</b> Analyse des Milzgewebes auf Ly6C <sup>hi</sup> .....	72
<b>Abbildung 29</b> Analyse des Milzgewebes auf Ly6C <sup>low</sup> .....	73
<b>Abbildung 30</b> Analyse des Milzgewebes auf Ly6C <sup>neg</sup> .....	74

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
ACS	Acute Coronary Syndrome
ApoE	Apolipoprotein E
CAD	Coronary Artery Disease
CD115	Cluster of differentiation 115
CD11b	Cluster of differentiation 11b
CD16/32	Cluster of differentiation 16/32
CD25	Cluster of differentiation 25
CD36	Cluster of differentiation 36
CD4	Cluster of differentiation 4
CD8	Cluster of differentiation 8
cDC	Konventionelle dendritische Zellen
CI	Konfidenzintervalle/ Carotid Injury
CRP	C-Reaktives Protein
CV	Variationskoeffizient
DM	Diabetes Mellitus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EG	Europäische Gemeinschaft
EU	Europäische Union
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

FMO	Fluorescence Minus One
FMO3	Flavin-Monooxygenase 3
FoxP3	Forkhead-Box-Protein 3
FSC	Forward Scatter
FXR	Farnesoid-X-Rezeptor
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IL-17	Interleukin 17
IL-3	Interleukin 3
IL-4	Interleukin 4
ImP	Imidazol Propionat
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	Low-density lipoprotein
Ldlr	Low-Density Lipoprotein Receptor
LOQ	Limit of quantification
Ly6C <sup>hi</sup>	Lymphocyte antigen 6C high
Ly6C <sup>low</sup>	Lymphocyte antigen 6C low
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MAPK	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
MHC	Majorhistokompatibilitätskomplex
MMSE	Mini-mental state examination
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
mTORC1	Rapamycin-Complex 1
NaCl	Natrium-Chlorid

nM	Nanomolar
OR	Odds Ratio
oxLDL	Oxidiertes Low-density lipoprotein
PALS	Periarterioläre Lymphatische Scheide
PBS	Phosphat Buffered Saline
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RBC	Red Blood Cell Lysis Buffer
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SSC	Sideward Scatter
T-regs	Regulatorische T-Zellen
TCR	T-Zell-Rezeptor
TC-1	Zytotoxische T-Zellen 1
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor beta
Th-Zellen	T-Helferzellen
TMAO	Trimethylamin-N-oxid
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
UHPLC	Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie
VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1

## Abstrakt – Deutsch

### **Einleitung**

Herz-Kreislauf-Erkrankungen gehören in westlichen Ländern zu den häufigsten Todesursachen und Hospitalisierungsindikationen. Aktuelle Studien berichten, dass die Darmmikrobiota und ihre Metaboliten an der Entstehung und dem Fortschreiten von Herz-Kreislauf-Erkrankungen beteiligt sind. Durch kombinierte metagenomische und metabolomische Analysen wurden bioaktive mikrobiotabezogene Metaboliten bestimmter Nährstoffe identifiziert. Diese Metaboliten scheinen nach der Aufnahme durch den Wirt zur Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen beizutragen.

Ein solcher Metabolit ist Imidazol-Propionat (ImP), von dem erst kürzlich berichtet wurde, dass er diabetogene Wirkungen hat. Ob ImP jedoch auch einen Effekt auf die Atherosklerose hat, wurde bislang nicht untersucht.

### **Zielsetzung**

In dieser Arbeit wurde ein möglicher Zusammenhang mit ImP-Plasmaspiegeln und atherosklerotischer koronarer Herzkrankheit untersucht. Darüber hinaus wurde im Tierexperiment die Wirkung von ImP auf die Differenzierung von Immunzellen in Richtung proatherogener Untergruppen untersucht.

### **Methodik**

In einer klinischen Studie wurden 831 Patient:innen mit bekannter oder vermuteter koronarer Herzkrankheit einer Koronarangiographie unterzogen. Die Plasmaspiegel von ImP wurden analysiert und zwischen Patient:innen mit koronarer Herzkrankheit (KHK) und Patient:innen mit KHK-Ausschluss verglichen. Darüber hinaus wurde die Differenzierung der Immunzellen bei Mäusen mit und ohne ImP-Behandlung untersucht. Insbesondere wurde der Anteil an T-Helferzellen (Th1 und Th17), regulatorischen T-Zellen und zytotoxischen T-Zellen im zirkulierenden Blut und in der Milz mittels Durchflusszytometrie analysiert. Darüber hinaus wurden Monozyten-Untergruppen (Ly6C<sup>hi</sup> und Ly6C<sup>low</sup>-Zellen) im Knochenmark und in der Milz analysiert. Die Mäuse wurden in zwei Gruppen eingeteilt: Die eine erhielt eine chirurgische Gefäßverletzung mittels Kauterisation, die andere nur eine Scheinoperation.

## **Ergebnisse**

In der klinischen Studie wurde eine signifikante Korrelation zwischen ImP und bestehender KHK festgestellt. Die ImP-Plasmaspiegel waren bei Patient:innen mit invasiv bestätigter KHK im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Im Tierversuch wurde bei der Behandlung mit ImP in der Schein-OP-Gruppe ein signifikanter Anstieg der Th1- und TC1-Zellzahlen sowohl in der Milz als auch im Blut festgestellt.

## **Zusammenfassung**

Es wurde erstmals gezeigt, dass ImP einen signifikanten Zusammenhang mit dem Vorhandensein einer KHK von Patient:innen aufweist. Auch im Tierversuch konnte ein kausaler Zusammenhang nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass ImP durch die Proliferation von pro-atherogenen Immunzellen wie Th1 und TC1 eine überwiegend pro-atherogene Wirkung erzielt und vermutlich deren Migration in die Läsionsstelle der Atherosklerose fördert. In dieser Arbeit wurde erstmals ein weiterer wichtiger Akteur in der Pathogenese der Arteriosklerose identifiziert.

## **Abstract – English**

### **Introduction**

Cardiovascular diseases and the metabolic syndrome are one of the most common causes of death and hospitalization indications in western countries. This medical and socioeconomic burden necessitate the examination of novel therapeutic and preventive strategies. Recent studies report that the gut microbiota and its metabolites are involved in the development and progression of cardiovascular diseases. Through combined metagenomic and metabolomic analyses bioactive microbiota-related metabolites of certain nutrients were identified. These metabolites appear to contribute to the development of cardiovascular disease after absorption by the host.

One such metabolite is imidazole propionate (ImP) which was recently reported to have diabetogenic effects. However, whether ImP has atherogenic effects has not been studied, so far.

## **Goals**

In this work, a potential link with ImP plasma levels and atherosclerotic coronary heart disease was investigated. Moreover, the effect of ImP on immune cell differentiation towards proatherogenic subsets was explored in experimental studies.

## **Methods**

In a clinical study 831 patients with known or suspected coronary heart disease underwent coronary angiography. Plasma levels of ImP were analyzed and compared between patients with coronary heart disease (CAD) and patients with exclusion of CAD. Moreover, the immune cell differentiation in mice with and without ImP treatment was examined. In particular, the proportion of T-helper cells (Th1 and Th17), regulatory T-cells, and cytotoxic T-cells were analyzed in the circulatory blood and spleen using flow cytometry. In addition, monocyte subsets (Ly6C<sup>hi</sup> and Ly6C<sup>low</sup> cells) were analyzed in the bone marrow and spleen. The mice were divided into two groups: one received a surgical vascular injury using cauterization, the other only received a sham operation.

## **Results**

In the clinical study, a significant correlation was established between ImP and existing CAD. The ImP plasma levels were significantly increased in patients with invasively confirmed CAD compared to the control group. In animal experiments, a significant increase in Th1 and TC1 cell numbers in both the spleen and blood was found upon treatment with ImP in the sham surgery group. In mice with carotid injury, however, the result was the opposite; the proportion of these cells was significantly higher in the untreated group.

## **Conclusion**

It was shown for the first time that ImP has a significant correlation with the presence of CAD in the blood plasma of patients. A causal involvement could also be proven in animal experiment. It was shown that ImP achieves a predominantly pro-atherogenic effect through the proliferation of pro-atherogenic immune cells, such as Th1 and TC1, and probably promotes their migration into the lesion site of atherosclerosis. In this work, another important player in the pathogenesis of atherosclerosis has been identified for the first time.

## 1. Einleitung

Erkenntnisse aus den Forschungsarbeiten der letzten Jahre zeigen, dass die bakterielle Darmflora, das sogenannte Darm Mikrobiom, die Entwicklung von kardiometabolischen, kardiovaskulären und inflammatorischen Erkrankungen im Wirtsorganismus beeinflusst (1, 2).

Imidazol Propionat (ImP) ist ein mikrobiell produzierter Metabolit der Aminosäure Histidin (3). Es wurde gezeigt, dass das Imidazol Propionat die Entstehung von Typ-2-Diabetes Mellitus (DM) durch Beeinträchtigung der Insulin-Rezeptoraktivität im Wirt begünstigt (4). Weitere Studien zeigen, dass die Plasmakonzentration von ImP einen prädiktiven Wert für die Entwicklung von Typ-2 DM aufweist (5).

In dieser Arbeit wird im ersten Teil eine mögliche Assoziation des im Blutserum mit der koronaren Herzkrankheit in einer prospektiven klinischen Beobachtungsstudie untersucht. Im zweiten Teil wird im Mausversuch untersucht, ob eine chronische Behandlung mit ImP einen potenziell pro-atherogenen Immunphänotyp fördert. Hierfür wird verschiedenes biologisches Material der Mäuse durchflusszytometrisch untersucht, um ein umfängliches Bild der Immunphänotypisierung zu erhalten.

In der folgenden Einleitung wird vorerst auf die Atherosklerose als häufigste kausale Ursache der koronaren Herzkrankheit (KHK), deren epidemiologischen Zahlen sowie Pathomechanismus eingegangen. Nachfolgend wird die Rolle verschiedener Subpopulationen von T-Zellen und Monozyten erläutert und im Kontext der KHK betrachtet.

Des Weiteren wird die Zusammensetzung und Funktion des Darm-Mikrobioms sowie das Vorkommen und die Synthese des Imidazol Propionats genauer erläutert. Abschließend kommt es zur Beschreibung der Forschungsfragen dieser wissenschaftlichen Dissertation.

### 1.1 Atherosklerose und koronare Herzkrankheit (KHK)

#### **Globale und nationale Bedeutung der koronaren Herzkrankheit**

Die KHK stellt die häufigste Todesursache sowohl in Industrie- als auch Entwicklungsländern dar und ist durch äußere Einflüsse, Genetik aber auch Lifestyle wie Ernährung und Sport bestimmt (6-8). Weltweite Daten zeigen eine Prävalenz von 5-8% der KHK, Daten der „REACH“-Studie sprechen sogar von einer Prävalenz von 18-35% (9).

In den meisten Fällen ist die KHK durch Atherosklerose bedingt (8). Hierbei sorgen durch Ablagerungen an den Gefäßwänden verursachte Einengungen des Lumens für eine Reduktion des Sauerstoffangebotes für das nachfolgende Myokard (obstruktive KHK) (7, 8). Dieses Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot und -Bedarf wird in Myokardischämie mit Blick auf die verringerte Blutversorgung des Herzmuskels, oder als Koronarinsuffizienz, die die Ursache bei den Koronarien beschreibt, differenziert (8).

## 1.2 Die Pathogenese der Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine multifokale inflammatorische Erkrankung, welche einer Vielzahl an Risikofaktoren unterliegt (7, 8). Insbesondere Leukozyten, aber auch Endothelzellen sowie die glatte Muskulatur der Intimaschicht der Blutgefäße spielen bei der Entwicklung der Atherosklerose eine Rolle (10). Wie eingangs erwähnt ist sie die häufigste Ursache für die Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung und trägt auch wesentlich zur Pathogenese des Apoplexes bei und ist damit Ursache für die häufigsten letalen Erkrankungen in Industrieländern (6, 11).

### **Risikofaktoren**

Neben der Vielzahl an Risikofaktoren ist das erhöhte Plasma-Cholesterin, insbesondere das low-density lipoprotein (LDL) einer der wichtigsten Faktoren, der suffizient allein die Entwicklung der Atherosklerose, auch in Abwesenheit anderer Risikofaktoren, vorantreibt (10, 12). Andere Risikofaktoren, wie arterielle Hypertension, Diabetes mellitus, Rauchen beschleunigen das Fortschreiten der atherogenen Prozesse der Lipoproteine, (10, 13).

### **Schritt 1: Endotheliale Dysfunktion**

Die Wände der meisten Blutgefäße lassen sich in drei Schichten einteilen: Die Tunica intima, Tunica media und Tunica adventitia oder externa (14, 15). Die Endothelzellen bilden die innerste Schicht der Blutgefäße und kleiden diese damit aus (14, 15). Hierdurch bilden sie eine Barriere, die unter anderem auch die unbeabsichtigte Aggregation durch Kontakt mit

umgebenem Kollagen der extrazellulären Matrix verhindert, aber dennoch das gezielte Einwandern von Leukozyten im Falle einer Immunreaktion mittels Diapedese erlaubt (16, 17).

Der atherosklerotische Prozess beginnt mit einem dysfunktionalen Endothel, welches sich bei größeren Läsionen im Verlauf de-endothelialisiert und somit Zugang zum Subendothelialraum öffnet (18). Die Dysfunktionalität des Endothels entsteht durch eingangs erwähnter Risikofaktoren. So kann beispielweise die arterielle Hypertension durch ihren erhöhten intraarteriellen Druck kleine Läsionen im Endothel verursachen und so den Zugang zum Subendothelialraum eröffnen (19). Hier werden atherogene Lipoproteine wie das LDL modifiziert, vor allem durch Oxidation, und hiermit zytotoxisch, proinflammatorisch und proatherogen (10, 19).

### **Schritt 2: Low-density lipoprotein (LDL)**

Das im Subendothelialraum akkumulierte LDL wird biochemisch durch Proteasen und Lipasen modifiziert was zu ihrer Aggregation und erhöhter Proteoglykanbindung führt (20). Die oxidativen Modifikationen entstehen durch u.a. Myeloperoxidasen, Lipoxygenasen und reaktive Sauerstoffspezies (ROS), was zum so genannten oxidierten LDL (oxLDL) führt (20). Als Antwort auf dieses modifizierte Lipoprotein oxLDL im Subendothelialraum kommt es zur Rekrutierung von Monozyten sowie weiteren Leukozyten (20). Durch die Stimulation des Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) differenzieren die infiltrierten Monozyten zu Makrophagen (20, 21).

### **Schritt 3: Bildung der Schaumzellen**

Als Resultat ihrer stetigen Rekrutierung, Differenzierung und lokaler Proliferation stellen differenzierte Monozyten die größte immunologische Zellpopulation in atherosklerotischen Plaques dar (20, 22). Die immer fortwährende Aufnahme von oxLDL durch Makrophagen führt zu einer Transformation der Makrophagen in Schaumzellen (23). Dennoch wird die tatsächliche Relevanz und ihre Wichtigkeit verschiedener Lipoproteine und Aufnahmemechanismen für Schaumzellen in vivo kontrovers diskutiert (20, 23). Makrophagen exprimieren Scavenger-Rezeptoren, insbesondere sind die Rezeptorklasse A und das CD36 besonders wichtig für die Aufnahme von modifiziertem LDL (23). Anders als LDL-Rezeptoren verfügen diese

Scavenger-Rezeptoren jedoch nicht über einen Mechanismus zur Herunterregulierung als Antwort auf bereits intrazellulär befindliches Cholesterol (20). Die hierdurch nicht zu sättigende Aufnahme der Makrophagen von Lipoproteinen führt zu der Transformation der Makrophagen in Schaumzellen (23).

Diese Schaumzellen befinden sich in der Intima der Arterie und verringern hierdurch die Migrationskapazität (23). Zudem gehen sie zum Teil unter und bilden ein Kernareal in der Plaque welches aus apoptotischen sowie nekrotischen Zellen, Cholesterol-Kristallen und anderen extrazellulärem Material besteht (20, 23, 24).

Makrophagen selbst werden zum derzeitigen Stand in M1 und M2 Subtypen klassifiziert (25). Die Wirkung der M1 Makrophagen gilt als besonderes pro-inflammatorisch. Beide Subtypen sind abhängig von ihrem Stimulus (26). So werden M2 Makrophagen üblicherweise von Interleukin-4 (IL-4) oder Interleukin 3 (IL-3) aktiviert, die Aktivierung der M1 Makrophagen ist vermittelt durch Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) und Lipopolysacchariden (26). Diese einfache Einteilung der Makrophagen wird der immensen Heterogenität und Komplexität dieser Klasse der Immunzellen jedoch bei weitem nicht gerecht. Makrophagen zeigen einen außerordentlichen Grad an Plastizität und Interaktion mit anderen Zellen (26, 27). So wurden bereits glatte Muskelzellen beobachtet die durch Lipid-Beladung Makrophagen ähnliche Eigenschaften annehmen (20).

#### **Schritt 4: Plaqueruptur, Erosion und Atherothrombose**

Die Atherosklerose verursacht ein akutes Koronarsyndrom, wenn beispielsweise die fibrotische Kappe auf der Plaque nicht mehr in der Lage ist dem Widerstand der pulsatilen Kräfte des Blutdruckes und des Gefäßtonus standzuhalten und sich Risse, meist nah der Ränder des Plaques, bilden (20, 28). Besonders vulnerable Plaques kennzeichnen sich durch eine nur sehr dünne fibrotische Kappe, einen großen lipidgefüllten nekrotischen Kern und einer stattfindenden Inflammation (29). Solche vulnerablen Plaques sind demnach prädestiniert für eine mögliche Ruptur.

Plaquerupturen sind verantwortlich für rund 70% aller thrombotisch bedingten akuten Koronarsyndrome (20, 30). Kollagen ist für die Stabilisierung des Plaques entscheidend, so können glatte Muskelzellen aber auch T-regulatorische Zellen Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) exprimieren, welches ein potenter Stimulator für die Expression extrazellulärer Matrix darstellt und somit wesentlich zur Plaquestabilität beiträgt (20, 28). Als Gegenspieler lassen

sich Th1 Zellen nennen, deren Sekretion von IFN $\gamma$  eine starke destabilisierende Wirkung besitzt, da dieses Zytokin die Zelldifferenzierung und Proliferation der glatten Muskelzellen sowie die Kollagensynthese inhibiert (20). Eine Plaqueruptur kann unmittelbar zu einem thrombotischen Ereignis führen, welches neben dem bereits angesprochenen Herzinfarkt auch zum Schlaganfall, der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit oder zur Niereninsuffizienz führen kann (28). Durch die Bildung von atherosklerotischen Plaques kann es neben thrombotischen Ereignissen auch zu stenotischen Veränderungen kommen. Geschieht dies in den Koronargefäßen sprechen wir von einer koronaren Herzkrankheit (31).

### 1.3 Die Bedeutung von Immunzellendifferenzierung in der Pathogenese der Atherosklerose

Im Folgenden werden die für die Atherosklerose sowie für diese Arbeit wichtigen Immunzellen charakterisiert und deren Einfluss im Prozess der Atherogenese nach dem aktuellen Status quo der Wissenschaft erläutert.

#### **Die Rolle der Monozyten/Makrophagen**

Monozyten bilden eine Komponente des mononukleären- phagozytären Systems, dass sie sich mit Makrophagen und konventionellen dendritischen Zellen (cDC) teilen (32). Monozyten sind genauer definiert als zirkulierende Zellen im Blut, die ungefähr 10% der menschlichen peripheren Leukozyten und circa 4% der peripheren Leukozyten der Maus ausmachen (32, 33). Man nimmt derzeit an, dass sich Blutmonozyten im erwachsenen Knochenmark aus einem sich teilenden gemeinsamen myeloischen Vorläufer entwickeln, dieser wird mit Erythrozyten, Thrombozyten, cDC und Granulozyten geteilt (32). Monozyten selbst migrieren in entzündete Areale und differenzieren sich dort zu gewebständigen Makrophagen (32, 34). Eine wesentliche Aufgabe ist die Phagozytose von Pathogenen sowie die Präsentation spezifischer Antigene zur Auslösung der sekundären Immunantwort (35). Hierfür werden zudem zahlreiche Zytokine zur genauen Inflammationsmodulation sezerniert (36).

#### **Monozyten Subtypen**

Monozyten unterscheiden sich im humanen sowie murinen Blut (37). So werden Monozyten der Maus anhand der Expression des Oberflächenmarkers „Lymphocyte antigen 6 complex“

(Ly6C) unterschieden, diese Unterscheidung findet im humanen Blut ebenso statt, analog hierzu werden jedoch die Oberflächenmarker CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> und CD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> verwendet (33, 37, 38). Des Weiteren ist bekannt, dass Monozyten mit einer hohen Expression des Ly6C, so genannte Ly6C<sup>hi</sup>, den inflammatorischen Prozess begünstigen, wobei Monozyten mit einer geringen Expression des Ly6C Oberflächenmarkers einen regenerativen Effekt bewirken (37, 38). Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten sind inflammatorisch, sammeln sich im Gewebe lokaler Entzündungen an und differenzieren sich zu Makrophagen aus, während sie durch Ausschüttung von Zytokinen für einen inflammatorischen Progress sorgen (39, 40).

Im Unterschied hierzu zirkulieren Ly6C<sup>low</sup> Monozyten im Blut zur Detektion von Gewebeschäden durch sterbende oder infizierte Zellen und beseitigen diese (39, 40).

### **Der Einfluss von Monozyten/Makrophagen auf die Atherosklerose**

Während der Inflammation wandern im Blut lokalisierte Monozyten in nicht-lymphoides und lymphoides Gewebe als Antwort auf chemotaktische Signale durch Infektion oder Gewebsschädigung ein (36). Hier phagozytieren sie andere Zellen und toxische Moleküle (wie oxLDL), produzieren inflammatorische Zytokine und differenzieren in Makrophagen oder Schaumzellen (39).

In der Pathogenese der Atherosklerose werden Monozyten insbesondere in der Intima und Subintima rekrutiert (39). Durch ihre Scavenger Rezeptoren können sie oxLDL und andere Lipide aufnehmen (40). Hierdurch differenzieren sie sich in die bereits erwähnten Schaumzellen und bilden in der frühen Phase bereits eine Vorstufe der atherosklerotischen Plaques, sowie „fatty streaks“ in der Intima (39). Durch Ausschüttung der Zytokine werden weitere Immunzellen, unter anderem T-Zellen, angelockt und sorgen für ein Fortschreiten der inflammatorischen Prozesse (36).

### **Die Bedeutung der Monozyten für die Plaquestabilität**

Durch die Sekretion von Zytokinen, Proteasen und anderen Faktoren erhöhen entzündliche Makrophagen die zelluläre Expansion in Läsionen und verursachen Veränderungen in der Plaquemorphologie, die eine Plaqueruptur und akute Thrombosen auslösen können (41, 42). Zwei wichtige Veränderungen in der Plaquemorphologie, die durch entzündliche Makrophagen gefördert werden, sind Plaquenekrosen und die Ausdünnung der schützenden kollagenen Kappe

(31). Umgekehrt führen die anti-inflammatorischen (resolving) Makrophagen Funktionen aus, die mit der Plaque-Stabilisierung verbunden sind (31). Zu diesen Funktionen gehören die Entfernung abgestorbener Zellen (Efferozytose), die Plaques stabilisieren, indem sie eine postapoptische Zellnekrose verhindern; das Absondern von Kollagen, das eine schützende Kappe über der Läsion bilden kann; und die Herstellung von Proteinen und Lipiden die Entzündungen unterdrücken und die Gewebereparatur fördern (31, 41).

## **Die Rolle der T-Zellen**

T-Helferzellen gehören zu der großen Gruppe der T-Lymphozyten und spielen sowohl in der zellulären als auch humoralen Immunantwort mittels Zytokinausschüttung eine Rolle (43).

CD4 positive T-Zellen regulieren Immun- und Nicht-Immun-Zellen durch die Produktion von Zytokinen, weshalb sie auch T-Helferzellen genannt werden (44). Durch diese Aktivierung differenzieren sich T-Zellen in der Folge zu Effektor Zellen und produzieren Zytokine und weitere Immunmediatoren (43). In Abhängigkeit ihres Zytokin-Expressionsprofils und ihres funktionellen Einflusses auf die Immunantwort werden die T-Helferzellen in verschiedene Subtypen klassifiziert (45).

So unterscheidet man in Th1-Lymphozyten, die im wesentlichen IFN- $\gamma$ , IL-2 und Tumornekrose-Faktor alpha (TNF- $\alpha$ ) ausschütten, Th2-Lymphozyten welche neben der Ausschüttung von Interleukinen eine Rolle bei der B-Zell Interaktion spielen und die Th17-Lymphozyten, welche mit der Ausschüttung von u.a. IL-17 eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Inflamationsprozessen spielen (43, 44).

Hierzu kommen die T-regulatorischen Zellen, die insbesondere durch IL-10 und TGF- $\beta$  einen modulierenden Einfluss auf Immunprozesse nehmen (46).

CD4 positive T-Zellen sind Regulatoren des adaptiven Immunsystems, ihre Funktionen lassen sich auf zwei wesentliche Merkmale zurückführen: Die Förderung von Inflammation sowie die Stimulation der Antikörperproduktion in B-Zellen (43).

Im Folgenden wird genauer auf die einzelnen Effektor T-Helferzellen sowie deren Zytokin-Sekretion und Wirkung in der Pathogenese der Atherosklerose eingegangen.

## **Effektor Th1- Zellen**

Eine Schlüsselrolle nehmen insbesondere die Th1-Lymphozyten bei der Pathogenese der Atherosklerose ein (47).  $\text{INF-}\gamma$  ist eines der entscheidenden Zytokine dieses T-Helferzell-Subtypus, denn es hat eine mannigfaltige pathogene Wirkung in der Ausbildung der Atherosklerose, wie die Verringerung der Kollagenfasern, einer Verstärkung der Expression von „Major histocompatibility complex class II“ (MHC II), vermehrte Protease- und Chemokin-Expression, eine Hochregulation von Adhäsionsmolekülen, die Induktion von proinflammatorischen Zytokinen sowie die gesteigerte Aktivierung von Makrophagen und Endothelzellen (47, 48). Durch diese Wirkmechanismen erhöhen Th1-Zellen das Risiko einer Plaqueruptur und stellen somit durch die Ausschüttung des  $\text{INF-}\gamma$  den bedeutendsten pro-atherogenen Subtypen der T-Zellen dar und sind entscheidend an der Pathogenese der KHK beteiligt (49).

## **Effektor Th17-Zellen**

Die Rolle der Th-17 Zellen ist hingegen zum derzeitigen Stand nicht so eindeutig, ihr Einfluss in der Pathogenese der Atherosklerose wird derzeit noch kontrovers diskutiert (50, 51). So ist IL-17 mRNA in atherosklerotischen Plaques vorhanden, das IL-17 Protein selbst wurde zudem in verschiedenen Zelltypen von atherosklerotischem Gewebe gefunden, dazu gehören T-Zellen, Mastzellen, B-Zellen, Neutrophile Granulozyten sowie glatte Muskulatur (47, 52, 53). Die pro-atherogenen Bedingungen sowie das Vorhandensein des oxLDL führen zur vermehrten Th17-Zelldifferenzierung (50).

Bei einem Mangel des IL-17 in  $\text{ApoE}^{-/-}$  Mäusen zeigten sich in mehreren Studien sowohl vergrößerte, verkleinerte als auch unveränderte Läsionen (20). Eine pro-atherogene Wirkung des IL-17 konnte aber in  $\text{Ldlr}^{-/-}$  Mäusen gezeigt werden (47). Am wahrscheinlichsten können diese Widersprüche durch Differenzen im Darmmikrobiom erklärt werden, das die Induktion und die verschiedenen Wirkungen von IL-17a in verschiedenen Phasen der Krankheitsentwicklung der Th17-Zellen maßgeblich beeinflusst (20, 54). Die Anwendung von IL-17a-neutralisierenden Antikörpern und anderen IL-17a-Blockade-Methoden führte zu schlüssigeren Resultaten im Vergleich zu den genetischen Knockouts, diese Maßnahmen führten in der Regel zu einer Verringerung des Läsionsumfangs (20, 55).

Patient:innen mit akutem Koronarsyndrom zeigten eine erhöhte Plasmakonzentration von Th17 Zellen sowie IL-17a (20). Außerdem zeigte sich bei den Patient:innen mit niedrigen IL-17a Spiegeln ein erhöhtes Risiko für ein erneutes kardiovaskuläres Event (20, 56). Zudem scheint IL-17a eine direkte Stimulation der Kollagen-Synthese der glatten Muskulatur in Gefäßen zu induzieren (20, 57). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass Th17-Zellen auf der einen Seite eine atherogene Wirkung zeigen, auf der anderen Seite jedoch eine gewisse Plaque stabilisierende Rolle einnehmen (20, 51).

### T-regulatorische Zellen

Die nächste wichtige Gruppe mit Einfluss auf die Pathogenese der Atherosklerose stellen die T-regulatorischen Zellen (T-regs) dar. Bei hypercholesterinämischen Mäusen zeigte die Depletion von T-regs eine verstärkte atherogene Wirkung, im Gegensatz dazu scheint der Transfer von T-regs protektiv (20, 58, 59). Außerdem führt eine erhöhte Anzahl von T-regs zu einer Abschwächung der Atherosklerose und erhöht außerdem die Plaquestabilität im Mausexperiment (20, 60, 61). Einige Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass die IL-10 Zytokine eine antiinflammatorische Wirkung haben, und ein Fortschreiten der Atherosklerose behindern (20). Andere Zytokine, die mit T-reg in Verbindung stehen, wie TGF- $\beta$ , haben eine viel komplexere Funktion und verschiedene Wirkungen (20). Einer der wichtigsten Effekte stellt jedoch die Stimulation der Kollagensynthese dar, die zur Plaquestabilität beiträgt (20, 51). T-regulatorische Zellen stellen mit ihrer modulierenden und anti-inflammatorischen Wirkung einen wichtigen anti-atherogenen Gegenspieler dar (51).

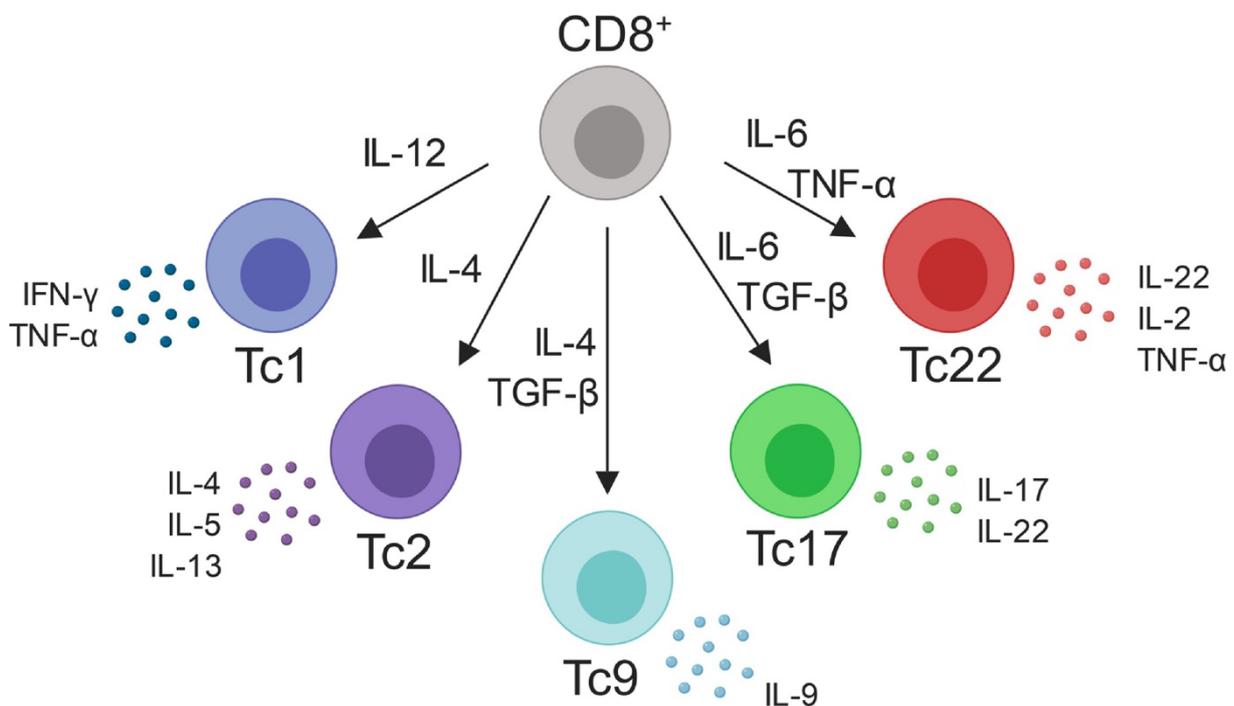
**Tabelle 1: Übersicht ausgewählter T-Zellen und den zugehörigen Zytokinen, sowie deren wichtigsten Wirkeffekte**

Th-1 Zellen	Th-17 Zellen	T-regulatorische Zellen
Interferon- $\gamma$	Interleukin-17a	Interleukin 10 und TGF- $\beta$
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erhöhte Plaque-Instabilität</li> <li>• Pro-inflammatorische Wirkung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vergrößerung der Endothel-Läsion</li> <li>• Erhöhte Plaque-Stabilität</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anti-inflammatorische Wirkung</li> <li>• Erhöhte Plaque-Stabilität</li> </ul>

## Zytotoxische T-Zellen

Zu den zytotoxischen T-Zellen zählen zahlreiche Subtypen der CD8-positiven T-Zellen. In dieser Arbeit wird sich vor allem auf die zytotoxischen T-Zellen 1 (TC1) und zytotoxischen T-Zellen 17 (TC17) fokussiert. Die Aufgabe zytotoxischer T-Zellen ist im Wesentlichen das Erkennen und Ausschalten von infizierten oder kanzerös veränderten Zellen (62, 63). Dies gelingt über die Rezeptorbindung des MHC-I und dem T-Zell Rezeptor (TCR) CD8 (64, 65). Hierüber wird ein gezielter apoptotischer Zelltod mittels Perforinen und Granzymen induziert (66, 67). In entzündeten Arealen arterieller Gefäßwände finden sich zahlreiche CD8-positive Zellen, so wurden 65% der in Läsionen untersuchten Immunzellen als CD4-positiv und CD8-positiv identifiziert (68). Zudem wurde im Experiment mit *Apoe<sup>-/-</sup>* „high fat diet“ Mäusen eine nach vier Wochen angestiegene CD8-positive T-Zell Anzahl beobachtet, die zu Beginn sogar

die der CD4-positiven T-Zellen überstieg (68, 69). Dies deutet darauf hin, dass CD8-positive T-Zellen insbesondere bei der immunologischen Frühantwort auf Hypercholesterinämie eine dominante Rolle spielen (69). Außerdem wurde ein Beitrag CD8-positiver T-Zellen beim Zelltod innerhalb von Läsionen in Plaque-nekrotischen Kernbereichen nachgewiesen, was sowohl die Inflammation als auch den Progress atherosklerotischer Plaques begünstigt (68, 70, 71).



**Abbildung 1 Darstellung der zytotoxischen T-Zell Subtypen** (Abbildung modifiziert aus (72)):

Dargestellt sind alle Klassen der zytotoxischen T-Zellen und ihrer charakteristischen Zytokine. Zudem ist ersichtlich, welche Zytokine die Differenzierung aus den naïven T-Zellen initiieren.

### **Effektor zytotoxische T-Zellen Typ 1 (TC1)**

Bei der Unterscheidung von CD8-positiven naïven T-Zellen in TC1 sind die Wirkungen von Zytokinen wie IL-12 und IL-2 von großer Bedeutung (73). Die Anfangsaktivierung von CD8-positiven T-Zellen ist mit der verstärkten Regulation von Oberflächenmarkierungen wie CD44 und CD69 verbunden (73, 74). Neben TNF- $\alpha$  sezernieren TC1 auch IFN- $\gamma$ . Diese Zytokine beschleunigen die adaptive und angeborene Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene (65, 73). Die TC1 tragen vermutlich durch ihre zytotoxische Immunantwort direkt zum Läsionsgeschehen atherosklerotischer Plaques bei. Insbesondere die Rolle im späteren subakuten Verlauf der Atherosklerose ist jedoch immer noch unklar (68). Durch die Sekretion von unter anderem IFN- $\gamma$  tragen die TC1 jedoch wesentlich zum entzündlichen Prozess bei (73).

### **Effektor zytotoxische T-Zellen Typ 17 (TC17)**

Die Zytokine IL-6 sowie IL-21 sorgen mit TGF- $\beta$  für die Differenzierung naïver T-Zellen in die IL-17 produzierenden TC17 (73). Entzündungsfördernde Eigenschaften von TC17-Zellen wurden während Transplantation und entwickelter Autoimmunität weiter nachgewiesen (73). Hierbei sind sie im Mausexperiment an der Allograft-Transplantat Abstoßung beteiligt sowie bei der Entwicklung autoimmuner Myokarditiden (73, 75, 76). TC17-Zellen bilden im geringeren Ausmaße Proteine, die für TC1-Zellen charakteristisch sind, wie IFN- $\gamma$ , Granzym B und Perforin (73, 77, 78). Folglich üben TC17-Zellen eine beeinträchtigte zytotoxische Funktion aus (73). Eine direkte atherosklerotische Wirkung von TC17 lässt sich zum heutigen Zeitpunkt nicht nachweisen (68). Die Sekretion von IL-17 legt jedoch einen immunmodulatorischen Wirkeffekt auf andere Immunzellen des adaptiven und angeborenen Immunsystems nahe und somit einen gewissen Einfluss auf den Progress und Genese der Atherosklerose.

## **Einfluss zytotoxischer T-Zellen auf Monozyten**

Im Mausmodell gelang es, die Bildung von atherosklerotischen Läsionen bei Apoe<sup>-/-</sup> und Ldlr<sup>-/-</sup>-Mäusen zu reduzieren, indem die CD8-positiven T-Zellen verringert wurden (68). Dies führte zu einem Rückgang der Ansammlung von Plaque-Makrophagen (68, 70, 71). Beide CD8<sup>+</sup>-Zellmangelstudien, der eben genannten Mausmodelle, zeigten niedrigere Plasmaspiegel von Chemokin-Liganden 2 (CCL2), was für die Mobilisierung von Knochenmark-Monozyten und die Läsioneninfiltration von Bedeutung ist (68, 70, 71). Darüber hinaus liegen Hinweise dafür vor, dass CD8-positive T-Zellen in Makrophagen die CCL2-Expression auf IFN- $\gamma$ -abhängige Weise in Gang setzen können (68, 70). CD8-positive T-Zellen können die Monozytose direkt beeinflussen, so nimmt die Monozytenzahl ab, wenn sich die zytotoxischen T-Zellen verringern (68). Insbesondere die Sekretion von IFN- $\gamma$  trägt mindestens teilweise zur Monozytose im Knochenmark und damit auch zur Ly6C<sup>hi</sup>-Monozytose während der Atherogenese bei (68).

## **Die Bedeutung der Homöostase von regulatorischen T-Zellen und Effektor-T-Zellen auf die Plaquestabilität**

Insgesamt ist die Plaquestabilität und auch die Progression der Atherosklerose abhängig von der Homöostase der beteiligten Effektor Zellen Th1 und Th17, sowie der modulierenden T-regulatorischen Zellen. Ein Überhang auf Seiten der Effektorzellen führt zu einer Destabilisierung der Plaque und einen Progress der Atherosklerose, wohingegen ein Überhang auf Seiten der T-regulatorischen Zellen einen gegenteiligen Effekt erzielt (41).

In dieser Arbeit wird unter anderem die Homöostase zwischen den Effektorzellen und T-regulatorischen Zellen, als wichtiger Parameter für die Progression der Atherosklerose, in verschiedenen Organen und Geweben der Maus nach Behandlung mit dem Darm-Mikrobiom Metaboliten Imidazol Propionat untersucht.

## 1.4 Darmmikrobiom und die Bedeutung seiner Metaboliten für die Atherogenese

Im Folgenden wird eine Übersicht über den aktuellen Kenntnisstand des Darm-Mikrobioms und dessen Rolle in der Physiologie sowie Pathologie des Menschen erörtert. Des Weiteren werden bereits bekannte Wirkmechanismen sowie die Stoffwechselwege des Imidazol-Propionats beschrieben.

### **Aufbau, Funktion und Pathologie in Assoziation mit dem humanen Darm-Mikrobiom**

Zu den Mikroorganismen, die im menschlichen Körper vorkommen, gehören Bakterien, Viren, Protozoen, Archaeen und Pilze (79, 80). Diese bilden die kommensale Mikrobiota, die sich vor allem im Darm befinden (79, 80). Obwohl es Unterschiede in der Anzahl der Bakterienarten gibt, sind die Mikrobiota auf höheren taxonomischen Ebenen zwischen Individuen vergleichbar (80, 81). Anders als in anderen Umgebungen dominieren die Darmmikrobiota zwei bakterielle Phyla, Bacteroidetes oder Firmicutes (79, 80). Diese bilden über 90% der Taxa im menschlichen Darm. Actinobakterien, Cyanobakterien, Fusobakterien, Proteobakterien und Verrucomikrobien sind in geringerem Maße anzutreffen (79, 80).

Die Bakteriendichte nimmt im Gastrointestinaltrakt Richtung aboral zu. Im Magen beträgt sie noch etwa  $10^3$  Keimen/ml, während sie im Dickdarm mit etwa  $10^{12}$  Keimen/ml ihren Höhepunkt erreicht. (82).

Im physiologischen Sinne profitiert der Wirt des Mikrobioms hauptsächlich von der Herstellung von lebenswichtigen Vitaminen wie Vitamin B und K, der Verdauung von Kohlenhydraten, dem Lernen des Immunsystems sowie der Herstellung von Signalmolekülen wie sekundäre Gallensäuren und kurzkettige Fettsäuren (80).

Daher kann das Darmmikrobiom die Wirtsphysiologie erheblich beeinflussen. Andererseits kann der Wirt das Mikrobiom auch durch Faktoren wie Genetik, Ernährung, Medikamente, Lebensstil und Hygiene direkt oder indirekt beeinflussen (80, 83).

Studien aus den vergangenen 15 Jahren deuten darauf hin, dass das Mikrobiom nicht nur vorteilhafte Effekte hat, sondern auch mit einer Vielzahl von Erkrankungen wie Übergewicht, Diabetes mellitus Typ 2, Atherosklerose und anderen kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung steht (80). Es wird dargelegt, dass Metaboliten, die von Darmmikrobiomen abhängig sind, kardiovaskuläre Erkrankungen beeinflussen, obwohl die genauen Mechanismen

bislang noch nicht bekannt sind (80). Atherosklerose ist eine vielschichtige Krankheit, bei der sowohl entzündliche als auch metabolische Stoffwechselwege betroffen sind, die alle durch das Darmmikrobiom moduliert werden können (80).

### **Der Einfluss des Mikrobioms auf die Atherogenese**

Das Mikrobiom kann Atherosklerose auf drei verschiedenen Wegen beeinflussen.

Als erstes zu nennen ist die bakterielle Infektion, welche das Immunsystem aktiviert und eine schädigende inflammatorische Antwort provoziert (80). Sowohl eine periphere Infektion als auch eine lokale Bakterieninvasion in die atherosklerotische Plaque können eine pro-atherogene Reaktion hervorrufen (80, 84). Infektionen verursachen eine Zunahme von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, diese erhöhen die Expression des Toll-like-Rezeptors 4 in Makrophagen (84). Diese pro-inflammatorische Antwort, unabhängig davon ob es eine direkte Infektion der Gefäßwand oder eine entferntere Infektion darstellt, hat einen Einfluss auf die Progression der Atherosklerose und vermutlich auch der Vulnerabilität der Plaque (80).

Als nächstes ist der Einfluss des Mikrobioms auf die Atherosklerose durch einen veränderten Cholesterin-Metabolismus zu nennen. Das Mikrobiom verändert sowohl die Serum-Level von Triglyceriden als auch des Cholesterins im Blut (80). Zudem ist das Darm-Mikrobiom wichtig für die Modifikation von Gallensäuren, welche z.B. als Signalmolekül am Farnesoid-X-Rezeptor (FXR) wirken (80, 85). Das Enzym Flavin-Monooxygenase 3 (FMO3) wird durch die Aktivierung des FXR in der Leber freigesetzt, dieses Enzym wandelt Trimethylamin in Trimethylamin-N-Oxid (TMAO) um (80). Dieses ist bereits als direkt pro-atherogen wirkender Metabolit bekannt (80).

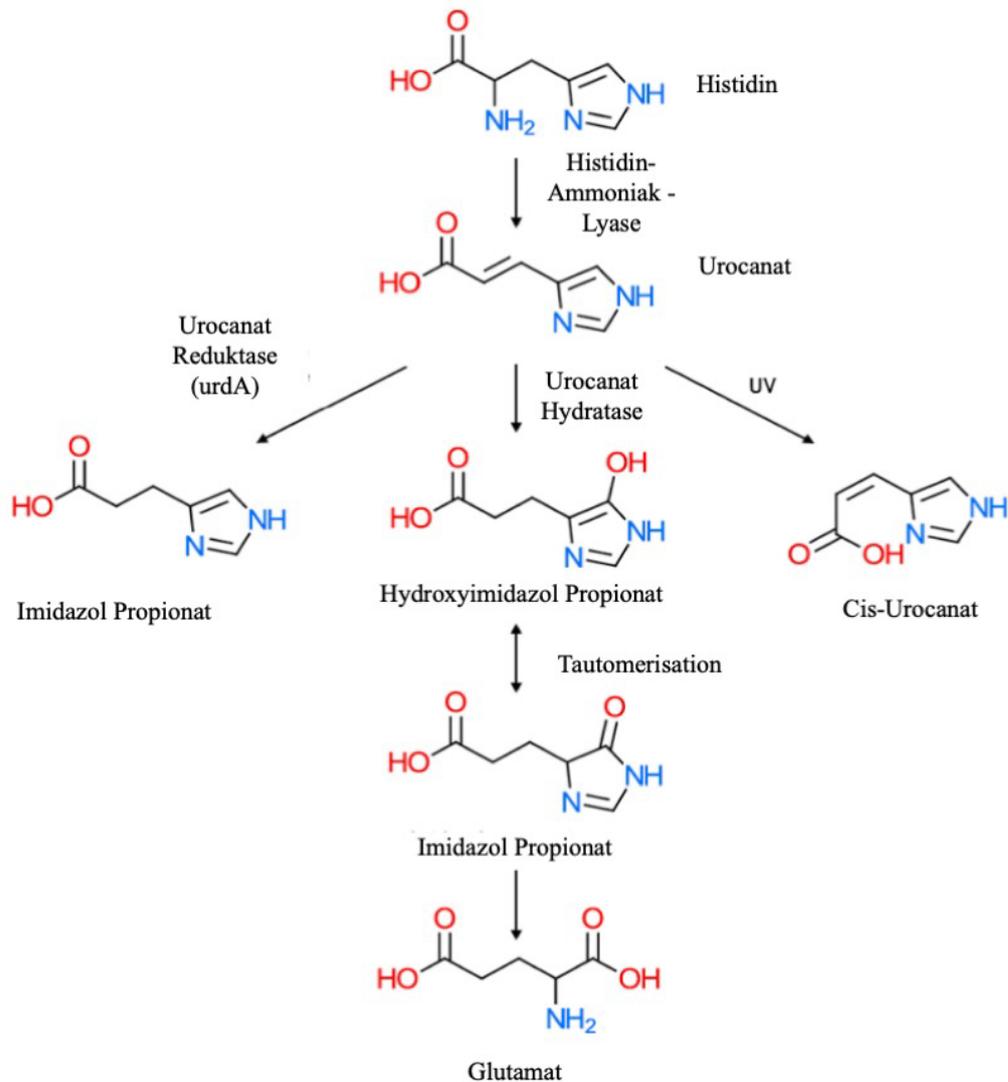
Zuletzt, als dritter Einflussfaktor, sind spezifische Nahrungsbestandteile und Mikrobiom-abhängige Metaboliten zu nennen, die sowohl einen positiven als auch negativen Einfluss auf die Entwicklung der Atherosklerose nehmen können. So sind bei dem bereits oben genannten Metaboliten TMAO mehrere Mechanismen, die zur Progression der Atherosklerose beitragen bekannt. TMAO, das von Darmbakterien aus Cholin und Carnitin hergestellt wird, hemmt unter anderem den reversen Cholesteroltransport, erhöht die Bildung von Schaumzellen und hat eine

indirekte metabolische Wirkung auf die Hemmung bestimmter Enzyme, die an der Gallensäuresynthese beteiligt sind und es kann auch die Plaquebildung beeinflussen (80, 86).

### **Imidazol-Propionat (ImP)**

Neben dem oben bereits als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen genannten Metaboliten TMAO zeigen neuere Studien immer wieder, dass derzeit noch fast unbekannte Metaboliten durchaus essenziellen Einfluss auf die Pathogenese verschiedener Erkrankungen nehmen können. Ein weiterer systemisch wirksamer Metabolit ist das Imidazol-Propionat, der aus der semi-essenziellen Aminosäure Histidin durch Bakterien des Darm-Mikrobioms synthetisiert wird (3). Histidin wird durch die Histidin-Ammoniak-Lyase in Urocanat katalysiert, aus diesem kann entweder die Urocanat-Reduktase direkt Imidazol-Propionat katalysieren, oder die Urocanat-Hydratase lässt die Vorstufe Hydroxyimidazol-Propionat entstehen (3). Durch Tautomerisation entsteht dann aus Hydroxyimidazol-Propionat Imidazol-Propionat (3).

Vor kurzem wurde beschrieben, dass die ImP-Konzentrationen bei Patient:innen mit Diabetes mellitus Typ 2 höher sind als bei Gesunden und die Glucosetoleranz beeinträchtigt (3, 4). Hierbei hat sich herausgestellt, dass ImP den Insulin-Signalweg, auf dem Level der Insulin-Rezeptoren, durch die Aktivierung von p38 $\gamma$  Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), welches die p62 Phosphorylierung fördert und anschließend das mechanistische Ziel des Rapamycin-Complex 1 (mTORC1) aktiviert (3). Diese Ergebnisse legen eine entscheidende Rolle des Metaboliten ImP in der Pathogenese des Typ 2 Diabetes nahe und zeigen, dass ImP auch auf Ebene der Signaltransduktionen entscheidenden Einfluss nehmen kann.



**Abbildung 2 Darstellung des Synthese-Pfades des Imidazol-Propionats.** Die Abbildung zeigt, wie aus der Aminosäure Histidin über verschiedene katalytische Pfade ImP prozessiert wird. (Abbildung modifiziert aus (3)).

Darüber hinaus zeigten Ergebnisse einer klinischen Studie, dass ImP auch mit kardiovaskulären Risikofaktoren korreliert und signifikant erhöhte ImP Plasma Konzentrationen bei Patient:innen mit Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen bestehen (87). So zeigte sich, dass der diastolische Blutdruck bei Patient:innen mit Übergewicht mit der ImP Plasma Konzentration korreliert (87).

Ein Zusammenhang zwischen kardiovaskulären Risikofaktoren/Erkrankungen und ImP lässt sich somit stark vermuten. Als Genese insbesondere der koronaren Herzkrankheit steht die Atherosklerose im Mittelpunkt. ImP als Einflussfaktor auf die Genese einer solchen

Erkrankung ist zum heutigen Zeitpunkt noch nicht erforscht, die Korrelation dieser liegt aber nahe. Basierend auf den erwähnten Studien untersucht die vorliegende Arbeit erstmalig den Einfluss des Darm-Mikrobiom abhängigen Metaboliten ImP auf die Entwicklung und den Progress der Atherosklerose auf Basis ihrer immunvermittelten Genese und der Immunzellendifferenzierung.

### 1.5 Fragestellungen dieser Arbeit

In dieser Arbeit wird der Einfluss des Darm-Mikrobiom abhängigen Metaboliten ImP auf die die koronare Herzkrankheit und die Genese der Atherosklerose untersucht. Hierfür wird die Plasma ImP Konzentration bei Patient:innen mit bekannter KHK gemessen und verglichen und im Mausversuch durchflusszytometrisch die Differenzierung, Anzahl und Immunphänotypisierung der oben ausführlich beschriebenen Immunzellen, den Monozyten und T-zellen, untersucht.

#### **Fragestellung der klinischen Studie**

Imidazol-Propionat wurde bisher nur in klinischen Studien mit Bezug auf Diabetes mellitus Typ 2 oder kardiovaskulären Risikofaktoren untersucht. In dieser Arbeit soll erstmals der Zusammenhang der Plasma-Konzentration des ImP mit dem Auftreten einer KHK. Hierbei soll die folgende Fragestellung beantwortet werden:

1. Gibt es bei Patient:innen mit koronarer Herzkrankheit einen signifikanten Anstieg des Plasma ImP-Spiegels?

#### **Fragestellungen im Mausexperiment**

Im Mausmodell soll in dieser Arbeit der direkte Einfluss des ImP auf die Immunzellendifferenzierung und Anzahl der Monozyten und T-Zellen sowie deren spezifischen Subtypen, die an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt sind, untersucht werden. Hierfür wird auf folgende Fragestellungen eingegangen:

1. Welche inflammatorischen Prozesse werden durch ImP aktiviert? Führt dieser Metabolit zu Veränderungen der Monozyten-Homöostase (Effekt auf Ly6C<sup>low</sup>/ Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten)?
2. Stellt ImP ein Modulator zur Immunzellendifferenzierung pro-atherogener Zellen dar? Gibt es in der Maus unter Behandlung mit ImP einen Shift zu pro-atherogenen T-Helferzellen des Typ 1 oder Typ 17 im Vergleich zur unbehandelten Gruppe?
3. Wird auch die atheroprotektive Immunzellendifferenzierung durch ImP moduliert? Beeinflusst die Behandlung von ImP die Homöostase der atheroprotektiven T-regulatorischen Zellen?
4. Wird die vaskuläre Läsion nach Verletzung durch eine erhöhte Anzahl CD8-positiver T-zellen verstärkt? Ist die Anzahl der zytotoxischen TC1- und TC17-Zellen in der mit ImP behandelten Mausgruppe, die der Unbehandelten überlegen?

## 2. Materialien und Methodik

### 2.1 Materialien

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Fetale Bovine Serum (FBS)	Sigma Aldrich
Imidazol Propionat (ImP)	Chem-Cruz
Monensin Solution	BioLegend
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma
Ionomycin Calcium Salt	EMD Millipore Corporation
EDTA	Carl Roth GmbH

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
70 µm Cell Strainer	MACS Miltenyi Biotech

<b>Lösungen</b>	<b>Hersteller</b>
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) modified without calcium chloride and magnesium chloride	Sigma
Fixationslösung	PBS mit 1% PFA
Stopplösung bei T-Zellen	PBS mit 10% FBS
Stopplösung bei Monozyten	PBS + 0,5% BSA
Einbettmedium für die Milz	RPMI + 5 % FBS
Flow Cytometry Staining Buffer	Thermofisher
Permeabilization Buffer (Permbuffer)	Thermofisher
Fix/Perm-Buffer	Thermofisher
Red Blood Cell (RBC) Lysis Buffer	Thermofisher
Gibco RPMI Medium 1640	Thermofisher

<b>Antikörper für die Durchflusszytometrie</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-mouse IFN- $\gamma$ APC	BD Pharmingen
Anti-mouse CD16/32	Invitrogen
Anti-mouse CD25 APC	Invitrogen
Anti-mouse CD8a Pacific Blue	Invitrogen
Anti-mouse CD4 FITC	BioLegend
Anti-mouse FOXP3 PE	Invitrogen
Anti-mouse IL-17a PE	BioLegend
Anti-mouse CD11b Brilliant Violet 711	BioLegend
Anti-mouse CD115 Alexa Fluor 488	BioLegend
Anti-mouse Ly-6C PerCP/Cyanine5.5	BioLegend
Anti-mouse CD45 PE/Cyanine7	BioLegend

<b>Geräte und Software</b>	<b>Hersteller</b>
Attune Nxt Sequencing Flow Cytometer	Thermofisher
Kaluza Analysis 2.1	Beckman Coulter

GraphPad Prism 9	GraphPad Software
Force FX	Valley Lab
SPSS Statistics 28.0.1.0.	IBM
EndNote X9	Clarivate Analytics

## 2.2 Klinische Studie

### 2.2.1 Patient:innenkohorte und Studiendesign

Im Rahmen der klinischen Studie wurden Blutproben von Patient:innen aus der LipidCardio Studie (Deutsches Register Klinischer Studien (drks.de) Identifikationsnummer: DRKS0002091) verwendet. Die Untersuchung erhielt eine Genehmigung der örtlichen Ethikkommission (Genehmigungsnummer: EA1/135/16) und alle Teilnehmer:innen erklärten sich schriftlich mit den Bedingungen der Studie einverstanden. Die Untersuchung umfasst Patient:innen ab 18 Jahren, die an einem akademischen Herzzentrum (Deutsches Herzzentrum der Charité, Campus Benjamin Franklin) einen Linksherzkatheter erhielten. Dabei wurden Troponin-positive akute Koronarsyndrome (ACS) nicht berücksichtigt (88). Die Durchführung des Linksherzkatheters und der Koronarangiographie erfolgte nach Ermessen des interventionellen Kardiologen und gemäß den Standardprotokollen der Abteilung für interventionelle Kardiologie (88). Beim interventionellen Kardiologen wurden die diagnostischen Ergebnisse regelmäßig dokumentiert (88). Umfassende angiographische Ergebnisse zum Zeitpunkt der Aufnahme wurden in der Studiendatenbank erfasst und dokumentiert (88). Im Zeitraum von Oktober 2016 bis März 2018 wurden die während der Koronarangiographie entnommenen Blutproben sofort eingefroren. Daraus resultierte eine Gesamtzahl von 1005 Patient:innen, von denen 831 für die aktuelle Studie verfügbar waren. Nach der Verabreichung von Heparin wurde während des Herzkatheters Blut entnommen, entweder in Form von arteriellem Blut direkt aus der Arteria radialis oder Arteria femoralis, oder in Form von venösem Blut aus dem peripheren Zugang (88). Komorbiditäten und kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Diabetes, Arterielle Hypertension und Dyslipidämien wurden ebenso evaluiert (88). Die Patient:innen wurden zu ihren demografischen Daten, Einnahme frei verkäuflicher Medikamente sowie Gesundheitsverhalten in Bezug auf Drogen- und Alkoholkonsum, Tabakkonsum sowie physischer Aktivität befragt (88). Zudem wurde ein

standardisierter Fragebogen zur Familienanamnese, sowie der „Mini-mental state examination“ (MMSE) durchgeführt (88). Dauermedikationen wurden vom vorhandenen Medikationsplan übernommen (88). Zudem wurden Vordiagnosen, chronische Erkrankungen sowie bereits stattgefundenen Revaskularisationen im Herzkatheter eingesehen und dokumentiert (88).

Das Studienprotokoll sowie Design der LipidCardio Studie wurde bereits zuvor von König et alii veröffentlicht (88).

Das Durchschnittsalter der Studienteilnehmer beträgt  $70.9 \pm 11.1$  Jahre (70% männlich) (88). Durch die Koronarangiographie wurden bei 69,9% der Teilnehmer eine obstruktive koronare Herzkrankheit (KHK) festgestellt (88). Die Patient:innen, bei denen eine KHK nachgewiesen wurde, waren signifikant häufiger männlich, inaktiv, Diabetiker und besitzen eine familiäre Prädisposition bezüglich der KHK (88). Etwa 20 % der Patient:innen hatten Lipoprotein(a) (Lp(a))-Konzentrationen über 106,9 nmol/L (fünftes Quintil) (88). Diese Patient:innen hatten eine signifikant erhöhte Wahrscheinlichkeit einer obstruktiven KHK im Vergleich zu den Teilnehmern in den Quintilen 1–4 (OR 1,70, 95 %-KI 1,17 bis 2,48,  $p = 0,005$ ) (88).

### 2.2.2 Quantifizierung des ImP im Blutplasma

Um einen potenziellen Zusammenhang zwischen ImP und KHK zu ermitteln, haben wir die Plasmaspiegel und Risikofaktoren für KHK der oben beschriebenen Kohorte ( $n = 831$ ) analysiert. Tabelle 2 enthält die demografischen Informationen, Laborparameter und klinischen Merkmale dieser Gruppe. Darüber hinaus haben wir diese Werte mit denen der höchsten ImP-Plasmaspiegel im vierten Quartil ( $n = 208$ ) und den Patient:innen mit den niedrigsten ImP-Plasmaspiegeln (erstes Quartil,  $n = 209$ ) verglichen.

Die GeneBank hat im Rahmen der Cleveland Clinic-Studie („Molecular Determinants of Coronary Artery Disease“, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00590200) Patient:innenproben und klinische Daten erhalten, mit denen die ImP-Spiegel mit den löslichen „vascular cell adhesion molecule 1“ (VCAM-1)-Spiegeln verglichen werden konnten. Durch aufeinanderfolgende Patient:innen, die eine elektive diagnostische Koronarangiographie oder eine elektive kardiale computertomographische Angiographie mit einer ausführlichen klinischen und labortechnischen Charakterisierung und einer Längsschnitt-Follow-up durchlaufen, entsteht die GeneBank, ein zentraler Probenspeicher. Die Teilnehmer:innen waren

von 2001 bis 2007 rekrutiert worden. Bei GeneBank wurden Patient:innen ausgeschlossen, die bei der Rekrutierung einen kürzlich erlittenen Myokardinfarkt (< 4 Wochen) oder ein erhöhtes Troponin I (> 0,03 mg/dl) hatten. Als Patient:innen wurden Proband:innen mit atherosklerotischer koronarer Herzkrankheit definiert, die zum Zeitpunkt der Koronarangiographie eine gesicherte Diagnose einer stabilen oder instabilen Angina pectoris, eines Myokardinfarkts, einer vorangegangenen koronaren Revaskularisation oder eines angiographischen Nachweises einer Stenose von mindestens 50 % mindestens einer großen Koronararterie hatten. Das Cleveland Clinic Institutional Review Board hat sämtliche klinischen Studienprotokolle und die Einverständniserklärung genehmigt. Es wurde von sämtlichen Personen eine schriftliche Zustimmung beantragt. Ein großes Blutbild, Gesamtcholesterin, LDL, Triglyceride und Kreatinin wurden im Labor untersucht. Die Blutproben wurden umgehend bearbeitet und bei -80 °C in der Zentralen Biomaterialbank Charité für zusätzliche Analysen aufbewahrt. Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie (UHPLC) in Kombination mit Tandemmassenspektrometrie wurde verwendet, um die ImP-Plasmaspiegel zu messen. Die Untersuchungen fanden in zwei unterschiedlichen Labors statt: LipidCardio in Schweden und die GeneBank an der Cleveland Clinic in den Vereinigten Staaten. Beide Laboratorien nutzten denselben internen Standard (13C3-ImP) für die Vorbereitung ihrer Proben. Die europäischen Kohorte-Proben wurden nach einer bereits veröffentlichten Methode vorbereitet und analysiert, wobei nur geringfügige Anpassungen vorgenommen wurden. (Koh et al., 2018) (3). Vor dem Trocknen der Proben unter Stickstoffstrom wurden 25 µl Plasmaproben mit 6 Volumina Acetonitril mit 100 nM internem Standard (ImP-13C3, Astra Zeneca, Cambridge, UK) entnommen. Danach erfolgte eine Rekonstitution der Proben in 1-Butanol mit 5 % HCl (37 %), eine n-Butylester-Derivatisierung und schließlich eine Rekonstitution in 150 µL Wasser: Acetonitril (9:1).

Ein chromatographisches System, das aus zwei Shimadzu LC-30 AD-Pumpen (Nexera X2), einem CTO 20AC Ofen bei 30 °C und einem SIL-30 AC sowie einem MP-Autosampler im Tandem mit einem 8050-Triple-Vierfach-Massenspektrometer (Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Columbia, MD, USA) bestand, wurde für die LC-MS/MS-Analyse der Proben der GeneBank-Studie verwendet. Die Messgrenze (LOQ) lag bei 5 nM, wobei der Signal-Rausch-Grenzwert 10:1 betrug. Die Werte, die unter dem LOQ lagen, wurden als halber LOQ-Wert ausgedrückt. Drei Qualitätskontrollproben wurden für jede Charge genommen. Die Variationen zwischen den Chargen, die als Variationskoeffizient (CV) ausgedrückt wurden, lagen unter 10 %. Für die Auswertung der Daten kam die Software LabSolution (Version 5.89;

Shimadzu) zum Einsatz. In Bezug auf die Identität der Proben waren die Forscher:innen, die die Analysen durchführten, mit Ausnahme des Barcode-Etiketts verblindet.

**Tabelle 2: Klinische Parameter und Laborparameter der Patient:innenkohorte**

Charakteristika	Gesamt, N = 831 <sup>1</sup>	KHK, N = 577 <sup>1</sup>	Keine KHK, N = 254 <sup>1</sup>	p-Wert <sup>2</sup>
Alter, in Jahren	75 (66, 81)	76 (67, 81)	72 (62, 79)	<0.001
Biologisches Geschlecht				<0.001
Weiblich	248 (30%)	124 (21%)	124 (49%)	
Männlich	583 (70%)	453 (79%)	130 (51%)	
Imidazol Propionat (nM)	12 (8, 24)	13 (8, 26)	10 (7, 18)	<0.001
Art. Hypertension	668 (80%)	477 (83%)	191 (75%)	0.012
Hypercholesterinämie	497 (60%)	378 (66%)	119 (47%)	<0.001
Diabetes Mellitus	232 (28%)	178 (31%)	54 (21%)	0.005
Raucher	140 (17%)	98 (17%)	42 (17%)	0.9
Kreatinin, mg/dl	0.97 (0.84, 1.16)	1.00 (0.84, 1.19)	0.92 (0.81, 1.05)	<0.001

<sup>1</sup>Median (IQR); n (%)

<sup>2</sup>Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test; Pearson's Chi-Quadrat Test

## 2.3 Tierexperiment

### 2.3.1 Mausstamm und Herkunft

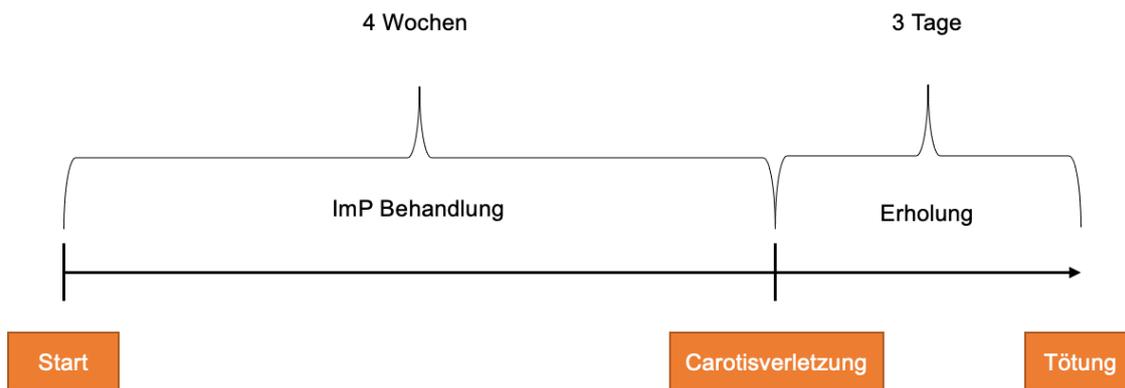
Für das Mausexperiment werden männliche Tiere des Inzuchtstammes C57BL/6N genutzt, diese werden durch das Unternehmen Charles River gezüchtet und geliefert.

### 2.3.2 Haltungsbedingungen und Vorbereitung der Tiere auf den Versuch

Die Haltungsbedingungen entsprechen den Standardhaltungsbedingungen von Mäusen in der Zucht und im Experiment auf der Grundlage der EU-Richtlinie 2010/63/EU sowie die EU-Leitlinien für die Unterbringung und Pflege von Tieren, die für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden (2007/526/EG). Die Käfige der Mäuse enthalten Einstreu, Zellstoff, Trinkwasser und Haltungsfutter ad libitum. Alle Materialien werden vor Kontakt autoklaviert (Käfig mit Einstreu, Futter, Wasser, Zellstoff). Die Tiere werden in Gruppen (max. 5 Tiere in einem Käfig) gehalten. Alle Materialien, die potenziell kontaminiert sind, werden im Anschluss sofort autoklaviert. Es wird darüber hinaus ein Tag/Nachtrhythmus von 12h/12h eingehalten, um eine Störung der zirkadianen Rhythmik zu vermeiden.

### 2.3.3 Ablauf des Tierexperiments

Die C57BL/6J Mäuse bekommen nach der örtlichen Eingewöhnungsphase ihre Behandlung mit Imidazol-Propionat (400µg/Tag/Maus) oral über Trinkwasser für vier Wochen, der Kontrollgruppe wird nichts zusätzlich ins Trinkwasser gegeben. Drei Tage vor der Operation erhalten die Mäuse Metamizol (200mg/kg KG), ebenfalls über das Trinkwasser, zur Analgesie, diese Therapie wird bis zur Tötung fortgesetzt. Nach dieser Behandlung erfolgt die Verletzung der Arteria carotis communis mittels Kauterisation, drei Tage nach der Verletzung erfolgt die Tötung sowie Organentnahme zwecks Antikörperfärbung und durchflusszytometrischer Analysen.



**Abbildung 3 Ablaufschema des Experiments** Die Tiere werden 4 Wochen mit ImP oder Trinkwasser behandelt, nach dieser Zeit erfolgt die Durchführung der OP an der Carotis zu Endothelschädigung, alternativ wurde zu diesem Zeitpunkt bei der anderen Gruppe eine Schein-OP durchgeführt. Nach dreitägiger Erholungsphase findet die Tötung und die damit einhergehende Zellisolation der verschiedenen Gewebe statt.

#### 2.3.4 Behandlung mit Imidazol-Propionat oder Trinkwasser

Insgesamt wurden 24 C57BL/6N Mäuse verwendet, alle Mäuse waren ausschließlich männlich und zwischen 12-16 Wochen alt. Die 24 Mäuse wurden in vier Gruppen je 6 Mäuse eingeteilt. Zwei Gruppen, in denen die insgesamt 12 Mäuse alle eine Carotisverletzung erhalten, 6 bekamen vorher ImP über das Trinkwasser, die restlichen 6 bekamen unbehandeltes Trinkwasser. In den restlichen beiden Gruppen erfolgte die Behandlung ebenfalls einmal mit ImP und einmal mit Trinkwasser, jedoch erfolgte keine Carotisverletzung, sondern eine Schein-OP. Die Schein-OP hatte die Gemeinsamkeit, dass die Mäuse ebenfalls sediert wurden und ein Hautschnitt sowie das Freipräparieren der Carotis erfolgte, im Gegensatz zur OP-Gruppe wurde die Carotis jedoch nicht verletzt. Die Verletzung der Carotis dient vor allem der Simulation einer Endothelschädigung wie sie bei KHK-Patient:innen durch kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie arterielle Hypertonie, üblich ist. So gehen Mikroverletzungen durch kardiovaskuläre Risikofaktoren wie der arteriellen Hypertonie meist der Atherosklerose voraus. Dies wird im Experiment durch eine manuelle Schädigung des Endothels simuliert.

Die Mäuse der ImP Gruppe erhalten 400µg/Tag/Maus ImP im Trinkwasser über eine Dauer von 4 Wochen. Die Wasserflasche wird alle 3-Tage ausgetauscht, das Austauschen der Trinkflasche erfolgt auch bei den Kontrollgruppen, die unbehandeltes Trinkwasser bekommen.

### 2.3.5 Durchführung der Carotisverletzung an der Maus

Zur Sicherung von Fäzes und Urin wird die Maus am OP-Tag auf einem trockenen leeren Käfig platziert und mit der Hand fixiert. Hierbei wird Fäzes und Urin mittels Mikroreaktionsgefäßen aufgefangen und unmittelbar in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Maus wird mit einer Isofluran-Inhalationsnarkose (2% Isofluran, 70% N<sub>2</sub>O und 30% O<sub>2</sub>) in einer Kammer anästhesiert. Die Tiefe der Narkose wird mittels Zehenreflextest überprüft, nach Erlöschen des Reflexes wird die Maus aus der Narkosekammer auf der OP-Unterlage fixiert, die Narkose wird durch eine Nasenmaske weiter aufrechterhalten. Um ein Austrocknen der Augen zu verhindern, werden diese mit Bepanthen<sup>®</sup>-Augensalbe perioperativ geschützt, zur Regelung der Körperkerntemperatur während der Narkosedauer wird diese mittels dauerhafter Rektalmessung kontrolliert und mit Hilfe einer Wärmeunterlage sowie Rotlichtlampe auf etwa 37°C Normaltemperatur gehalten. Zur Verletzung der linken Arteria carotis wird die ventrale Halsseite mittels Rasierer gründlich rasiert und anschließend mit 70% Ethanol desinfiziert. Es wird mit einer Hautschere eine Hautinzision an der Papilla incisiva und des Musculus sternohyoideus gesetzt und der Halsbereich der Maus durch einen ca. 1,5cm langen Schnitt entlang der Körperachse eröffnet. Die Wundränder werden mit einer stumpfen Pinzette gespreizt, die seitliche Halsmuskulatur, insbesondere der Musculus sternocleidomastoideus ist nun ersichtlich, dieser wird möglichst atraumatisch außerhalb des OP-Feldes fixiert. Die Arteria carotis communis wird stumpf freipräpariert und langgestreckt und dann mit einem bipolaren Mikroregulator (Force FX, Valley-Lab) auf einer Länge von 4mm und einer Leistung von 2W bei einer Dauer von 2 Sekunden kauterisiert. Die exakte Länge des zu verletzenden Bereiches wird durch Millimeterpapier gemessen. Der Wundverschluss erfolgt durch eine Einzelknopfnahnt sowie Acrylgewebekleber. Das Ausleiten der Narkose erfolgt weiterhin unter der Rotlichtlampe in einem sauberen Käfig.

### 2.3.6 Durchführung der Tötung, Organentnahme und Zellisolation

Durch die durchgeführte Analgesie mit Metamizol wird das Schmerzniveau deutlich gesenkt, die Maus wird mittels Isofluran-Sauerstoffgemisch erneut narkotisiert bis der Zehenreflex erlischt. Die Tötung erfolgt durch Exsanguination unter Narkose mittels Herzpunktion. Das aufgezogene Blut wird in ein Mikroreaktionsgefäß mit 50µl 0,5%igen EDTA überführt, um eine Koagulation des Blutes zu verhindern. Nach Eintritt des Todes wird die Wunde der

Carotis-OP eröffnet und die A. carotis communis freipräpariert und in Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) auf Eis gelagert, die unkauterisierte Gegenseite wird ebenfalls entnommen. Hiernach erfolgt die Öffnung der Bauchdecke und des Brustkorbes. Zur Entnahme der Splen empfiehlt sich ein medialer Zug mit der Pinzette am Gaster, wodurch diese zum Vorschein kommt. Der Splen wird mittels chirurgischer Schere von der A. und V. splenica getrennt und adipozytäre Anlagerungen werden entfernt. Der Splen wird nun auf Eis in 4ml RPMI-1640 mit 5% fetalen Rinderserum (FBS) gelagert. Zur Herstellung einer Zellsuspension wird der Splen durch ein 70µm Cell Strainer gepresst, der die einzelnen Zellen mobilisiert und Zellverbände aufhebt sowie zugleich Fremdmaterial wie Fettgewebe herausfiltert. Zur Zellisolation des Knochenmarks werden beide Tibiae benötigt, Ziel ist es diese mit Lösung durchzuspülen und so das Knochenmark zu mobilisieren. Hierfür erfolgt eine beidseitige Amputation am proximalen Femurschaft nahe des Articulatio coxae. Beide Amputate werden mit stumpfen Pinzetten von Muskulatur und Fell befreit, sodass die Knochen isoliert sichtbar sind. Nun erfolgt eine Durchtrennung der Tibia leicht distal des Articulatio genus und proximal des Articulatio talocruralis. In der Sagittalebene zeigt sich am proximalen sowie am distalen Ende der Tibia ein Einblick in die cavitas medullaris, welche durch die rötliche Färbung der nun ersichtlichen Medulla ossium rubra imponiert. Das Knochenmark wird nun während der Penetration der cavitas medullaris durch eine 26G Kanüle durch 4ml RPMI-1640 ausgespült und in einem 50ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen und unmittelbar nach dieser Zellisolation kühl auf Eis gelagert.

## 2.4 Durchflusszytometrische Analysen

### 2.4.1 Das Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch „Fluorescence Activated Cell Sorting“ (FACS) genannt, bietet die Möglichkeit der Analyse molekularer Eigenschaften von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom (89). Dies geschieht durch die Markierung von Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen auf Grundlage der Antigen-Antikörper-Reaktion (89). Das Verfahren dient der quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen (89).

Wenn gezielt Antigen-Strukturen durch bereits mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörper gebunden werden, werden diese markierten Zellen im Durchflusszytometer mittels

eines Flüssigkeitsstromes an Lasern vorbeigeführt (89). Diese ermöglichen durch ihre unterschiedliche Wellenlänge und dem Fluoreszenzfarbstoff eine Detektion einzelner Zellen auf den Photodetektoren (89). In Abhängigkeit der Struktur, Größe und Färbung der Zellen erfolgt eine Selektion des emittierten optischen Signals durch Linsen und eine Weiterleitung durch Filter sowie Spiegeln (89, 90). Bei den Detektoren des Durchflusszytometers handelt es sich um Photomultiplikator-Röhren, diese messen jedes einzelne Fragment und gewinnen hieraus quantitative Informationen (89).

Für die genauere Analyse der Parameter lassen sich die genannten Detektoren in verschiedene, so genannte, „Scatter“ unterteilen (89). Wesentlich sind hier der „Forward Scatter“ (FSC) sowie der „Sideward Scatter“ (SSC) zu nennen, diese machen sich das physikalische Prinzip der Streuung zu Nutze (89). Die Vorwärtsstreuung entsteht durch die Beugung des Lichtes, welches im flachen Winkel auf den zu analysierenden Partikel trifft, diese korreliert direkt mit dem Volumen bzw. der Größe des Partikels (89). Die Seitwärtsstreuung hingegen stellt ein Maß der oberflächlichen sowie internen Komplexität des Partikels dar, denn hier beugt sich das Licht beim Auftreffen auf solche Konformitäten im rechten Winkel und wird vom SSC erfasst (91).

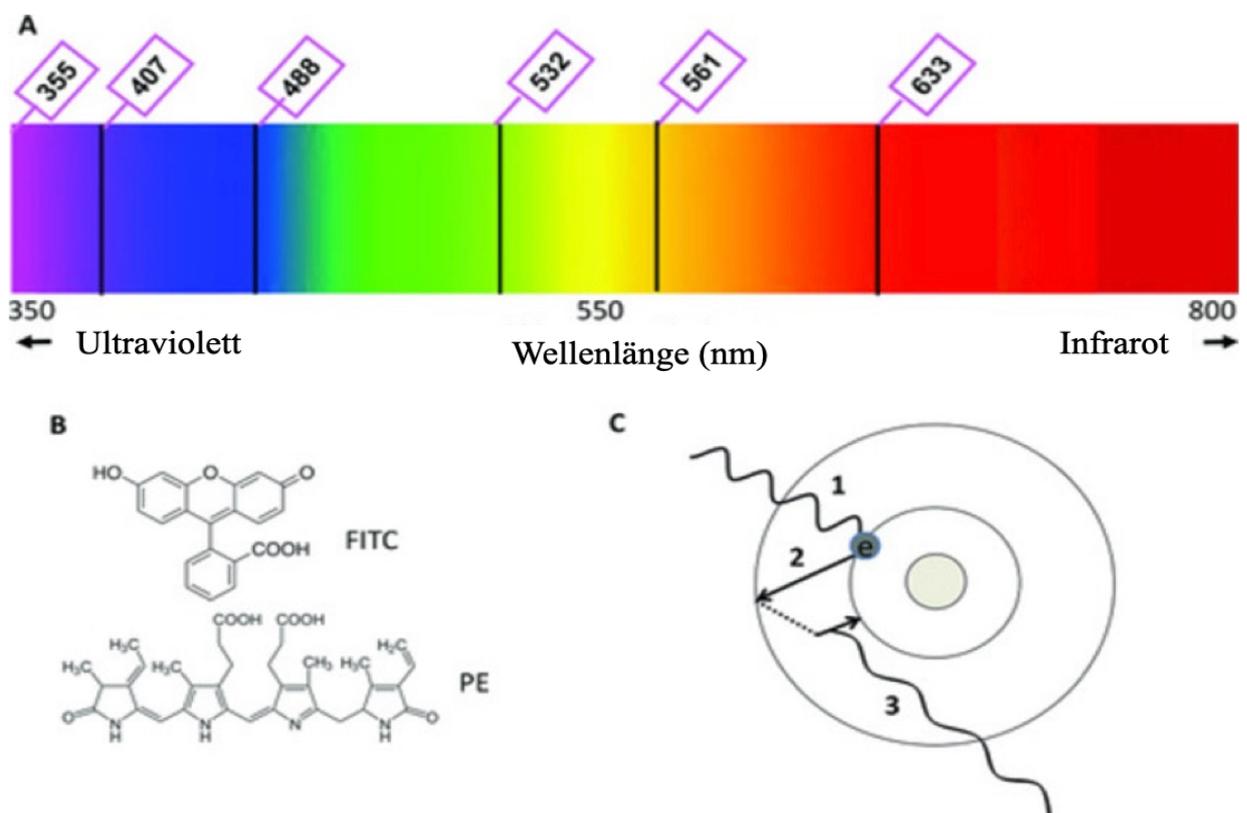
Am Beispiel des Blutes lassen nun die Ergebnisse des SSCs und des FSCs bereits qualitative Aussagen über Zellen zu, so besitzen Granulozyten ein größeres Volumen sowie eine höhere Granularität als vergleichsweise Lymphozyten (89).

Neben dieser Lichtstreuung kann der Durchflusszytometer Fluoreszenzstrahlung messen, welche von Zellen emittiert wird (92). Meist ist jedoch die Autoemission einzelner Zellen zu gering, sodass diese durch Fluoreszenzmarker markiert werden (92). Dies gelingt durch die bereits genannte Antigen-Antikörper-Reaktion (92). Spezifische Antigene der jeweiligen Zelle werden durch synthetisch hergestellte Antikörper gekoppelt (92). Der nun gebundene Antikörper führt einen spezifischen Fluoreszenzfarbstoff mit sich, der die Zielstruktur eindeutig durch sein emittiertes Licht identifizieren lässt (92). Die Farbstoffe werden durch bestimmte Wellenlängen der Laser angeregt und emittieren optische Signale, welche durch die dadurch entstehende Spannung an den Detektoren gemessen werden kann (92).

Zudem lassen sich mehrere Fluoreszenzmarker gleichzeitig einsetzen, dies dient dazu mehrere Zielstrukturen anzufärben und so zum einen mehrere Zelltypen voneinander zu differenzieren,

aber auch gewisse Subtypen heraus zu klassifizieren (92). Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass die Wellenlänge  $\lambda$ , die in Nanometer gemessen wird, sich nicht mit der Wellenlänge eines weiteren fluoreszenzmarkierten Antikörpers überschneidet (92). Eine solche Überschneidung führt im Bereich der Wellenlänge zu Interferenzen, diese können destruktiv oder konstruktiv sein, zu einem falschen Messergebnis führen sie jedoch zweifelsohne (92).

Um etwaige Überlappungen der Emissionsspektren vorzubeugen, muss eine vorherige Kompensation erfolgen (92). Diese Überlappung kann deshalb zustande kommen, da sich die Bereiche des sichtbaren Lichtes in ihren Wellenlängen überschneiden (**Abbildung 2**) (92).



**Abbildung 4** Darstellung des Prozesses der Durchflusszytometrie sowie dessen Laser-Wellenlängen (Abbildung modifiziert aus (92)):

(A) zeigt die üblich vorhandenen Laser der gängigen Durchflusszytometer, hierbei sind die Wellenlängen und deren sichtbare Farben zu sehen. Die Kompensation ist insbesondere dann essenziell, wenn Farbspektren auch in den Messbereich anderer Farben überlappen. (B) zeigt die Molekularstruktur der häufigsten und auch in dieser Arbeit verwendeten Fluorochrome FITC (Fluorescein) und PE (Phycoerythrin). In (C) ist der vereinfacht dargestellte Prozess der Fluoreszenz erkennbar. Bei [1] ist ein ruhendes Elektron abgebildet, dieses absorbiert die Energie des Lasers, wird angeregt und springt hierdurch auf ein instabileres höheres Energieniveau [2]. Hierbei geht Energie, meist in Form von Wärme verloren. Die restliche Energie wird re-emittiert, während das Elektron

wieder zurück in seinen Ruhezustand springt [3]. Hierbei fluoresziert es mit einer erhöhten Wellenlänge und geringerer Energie. Das hierdurch emittierte Licht wird nun von den Photodetektoren erfasst und in messbare Spannung an der Platte umgewandelt. Abbildung modifiziert aus: (92).

Für die Kompensation werden synthetisch hergestellte Zellen, so genannte „Beads“, welche eine Vielzahl verschiedener Rezeptoransatzpunkte haben, mit den gewünschten Antikörpern markiert (92). Die nun entstehenden Farbemissionen können im Durchflusszytometer gemessen werden, softwareseitig wird nun die Intensität der Farbstoffe angepasst (92). Eine korrekte Analyse der Proben ist in der Durchflusszytometrie stets nur mittels durchgeführter Kompensation valide, um mögliche Interferenzen auszuschließen (89, 91, 92).

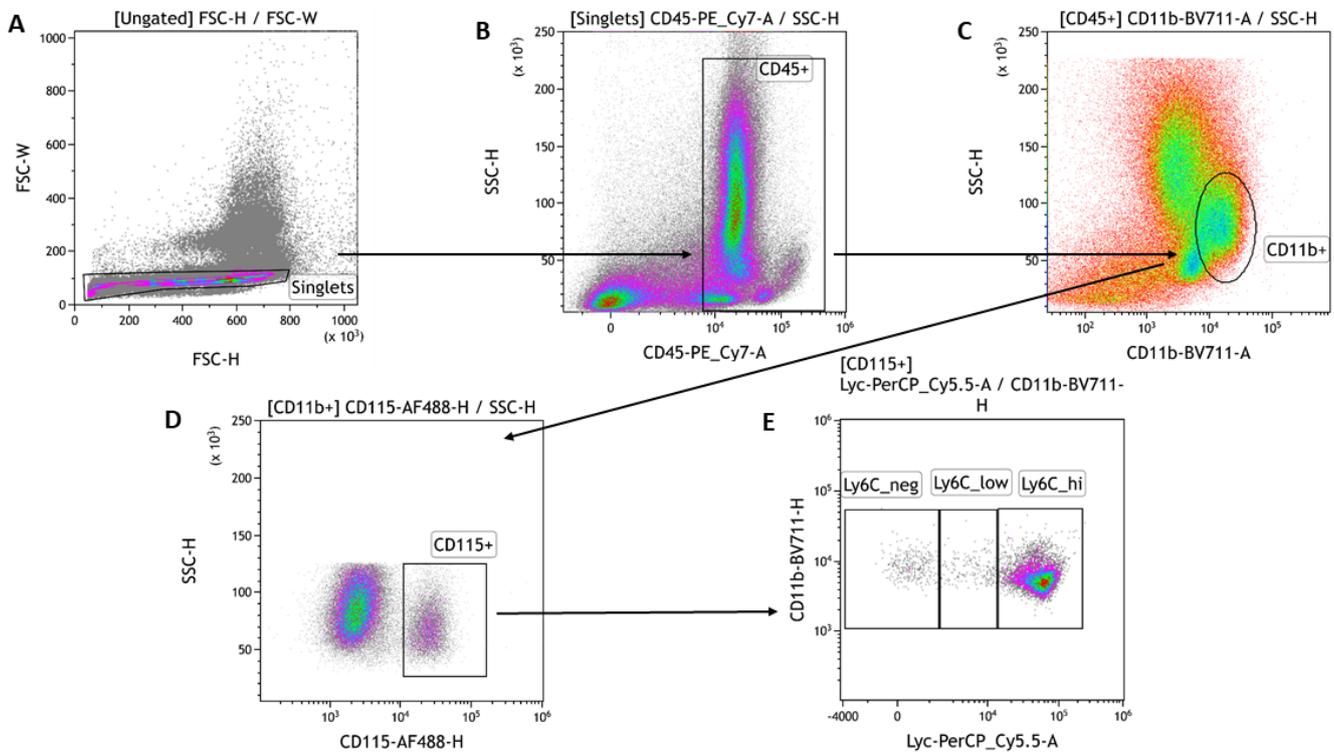
#### 2.4.2 Antikörperfärbungen der Immunzellen

##### **Antikörperfärbung der Monozyten**

Zur durchflusszytometrischen Analyse ist es unabdingbar, gezielt Strukturen durch Antikörperfärbung sichtbar zu machen. Im Falle der Monozyten handelt es sich hierbei um folgende Antikörper, die durch das „Cluster of differentiation“ nummeriert sind: CD115, CD45, CD11b sowie Ly6C.

Die hergestellten Zellsuspensionen der Milz und des Knochenmarks werden zuerst für 7 Minuten bei 300g in Raumtemperatur zentrifugiert, dies geschieht ohne Bremse, der Überstand wird verworfen. Das vorhandene Pellet wird nun in 1ml „Red blood cell (RBC) lysis Buffer“ resuspendiert und 3-4 Minuten inkubiert. Hiernach erfolgt bei der Zellsuspension des Knochenmarks eine Inaktivierung mit dreifacher Menge PBS mit 0,5% BSA gegenüber dem RBC-Puffer. Bei der Milzzellsuspension wird PBS mit 10% FBS bei gleichem Verfahren zur Inaktivierung genutzt. Nach erfolgter Inaktivierung werden die Proben erneut für 7 Minuten bei 300g und 4°C ohne Bremse zentrifugiert, der Überstand wird verworfen. 50µl des vorhandenen Vollblutes werden nun wie die entstandenen Pellets auf Eis gelagert und mit jeweils 50µl Staining Buffer und 1µl FC-Blocker CD16/32 resuspendiert. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis erfolgt eine erneute Zugabe von 50µl Staining Buffer sowie den oben aufgelisteten Antikörpern. Diese werden jeweils im Volumen von 1µl hinzugegeben und anschließend 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zur Konservierung der Proben und der entstandenen Antikörperbindung erfolgt anschließend eine Hinzugabe von 850µl 1%iges PFA,

am Tag der FACS-Messung wird 200µl der Probe entnommen und mit 800µl PBS aufgefüllt und gemessen.



**Abbildung 5 Gating Strategie zur Identifikation der Monozyten Subpopulationen Ly6C<sup>hi</sup> und Ly6C<sup>low</sup>:**

(A) stellt zur Elimination möglicher Doublets die Eingrenzung der Singlets dar, hierfür wurden alle Events aus Forward-Scatter Width und Forward-Scatter Height gegenübergestellt. Aus den Singlets lassen sich nun über den Sideward-Scatter und der CD45 Detektion mehrere Populationen identifizieren, die eindeutig CD45 positiv sind (B). Aus der Population der CD45 positiven Zellen lassen sich mit der CD11b Detektion gegen den Sideward-Scatter eine seitlich der Gesamtpopulation anliegende CD11b positive Population identifizieren (C). Es lassen sich nun mit der CD115 Detektion die CD115 negativen Zellen von den CD115 positiven Zellen diskriminieren (D) und anschließend aus der positiven Population der Lymphozytenantigen-6 Besatz in negativ, low und high graduieren (E).

Die Gating Strategie der Monozyten Subpopulationen wird in **Abbildung 5** ersichtlich. Hierfür wurden zuerst die Leukozyten eingegrenzt, dies gelingt durch das Gaten der CD45 positiven Population. Aus dieser Leukozytenpopulation lassen sich nun die CD11b Positiven gaten, aus diesem Gate lassen sich die CD115 positiven Zellen herausfiltern. Aus dieser Population lassen sich nun alle mit dem Oberflächenantigen Ly6C gefärbten Zellen eingrenzen, hier wird in den folgenden Analysen in Ly6C<sup>hi</sup> und Ly6C<sup>low</sup> unterschieden. Im Gating werden diese

Subpopulationen der Ly6C positiven Monozyten im Verhältnis als Ratio zueinander angegeben. Diese Ratio ist deshalb entscheidend, da Ly6C<sup>low</sup> Monozyten, sprich mit einem geringen Anteil des Lymphozyten Antigen 6C auf ihrer Oberfläche unter anderem ein kardiales remodelling und reparatives Verhalten im Falle einer Inflammation zugesprochen wird (93).

### **Antikörperfärbung der T-Zellen**

Die T-Zellen werden in einem gemeinsamen Schritt für das Staining vorbereitet. Hierfür wird die aus der Milz hergestellte Zellsuspension, sowie Vollblut verwendet. 50µl der jeweiligen Probe wird mit 1ml RBC-Buffer resuspendiert und anschließend 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Inaktivierung erfolgt nun durch 3ml PBS mit 10% FBS. Die entstandene Suspension wird nun bei 300g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand wird verworfen. Das entstandene Pellet wird nun in 1ml RPMI-1640 resuspendiert, woraufhin die Proben halbiert werden, sodass zwei 0,5ml Proben pro Probe entstehen.

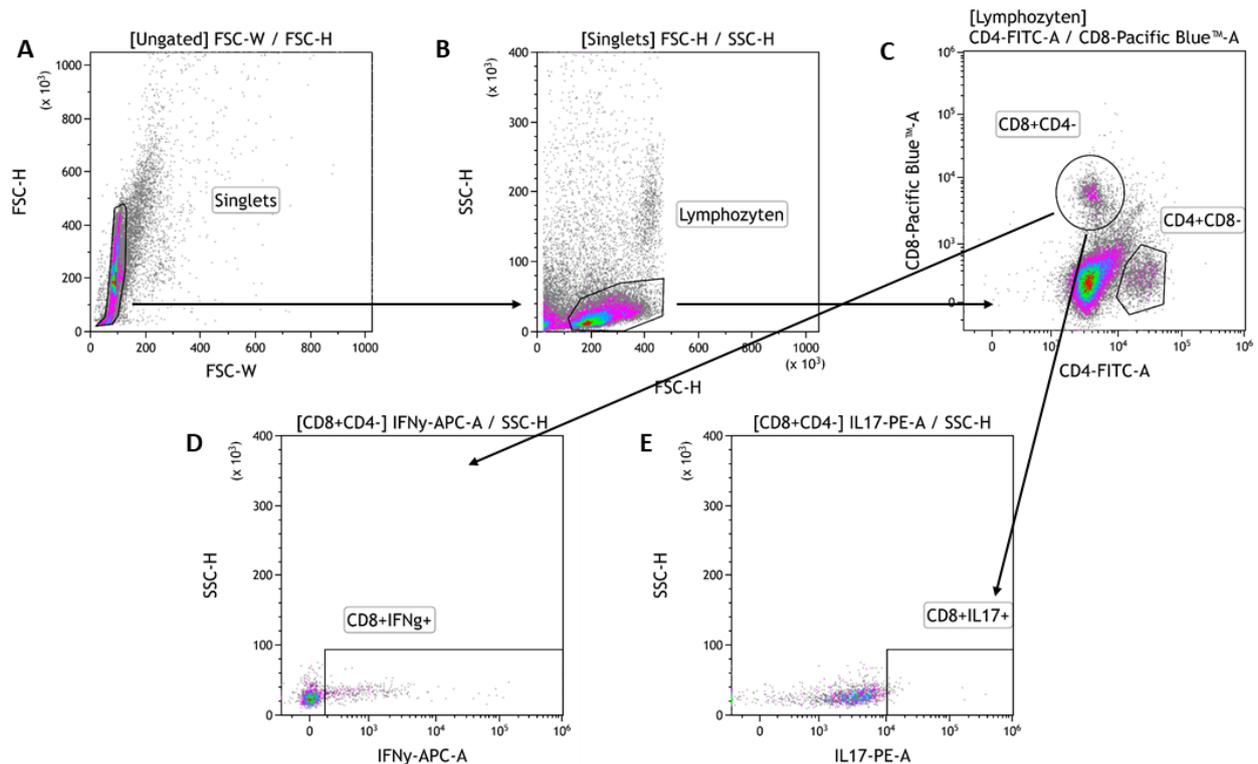
Hier endet der gemeinsame Schritt.

### **Th1, Th17, TC1 und TC17 Färbung**

Die Bestimmung der intrazellulären Konzentration des IL-17, sowie IFN-γ in CD4 positiven Zellen erfolgte anhand der beschriebenen Methodik in anderen Studien (94). Die Stimulation mit PMA und Ionomycin dient der Zytokinausschüttung der T-Zellen. Damit die produzierten Zytokine nicht durch den Vesikeltransport wieder aus der Zelle transportiert werden und damit noch anfärbbar bleiben, wird Monensin als Stopper des Golgi-Apparates verwendet. Mit der gleichen Methode werden die zytotoxischen T-Zellen des Typs TC1 und TC17 identifiziert. Hierbei werden lediglich die IL-17 Positiven sowie IFN-γ Positiven aus der Population der CD8 positiven Zellen eruiert.

Zwei Proben mit einem jeweiligen Volumen von 0,5ml werden auf 1ml mittels RPMI und 10% FBS aufgefüllt. Zusätzlich werden 1µg/ml Ionomycin sowie 50ng/ml PMA hinzugeben und in einem 37°C warmen Wasserbad für 30 Minuten inkubiert. Zum Stoppen der Aktivität des Golgi-Apparates wird nun 1µl Monensin Lösung hinzugefügt und für 3,5 Stunden weiter im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgt eine Resuspension mit jeweils 2ml PBS und einer Zentrifugation bei 500g und 4°C für 5 Minuten ohne Bremsen, der

Überstand wird verworfen. Dieser Waschschrift wird ein weiteres Mal wiederholt. Das entstandene Pellet wird mit jeweils 100µl PBS sowie 1µl CD4 und 1µl CD8 resuspendiert und für 30 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach der erfolgten Inkubation werden die Proben bei 500g und 4°C für 5 Minuten ohne Bremse zentrifugiert, der Überstand wird wieder verworfen. Das Pellet wird mit 1ml FC-Staining Buffer resuspendiert und erneut bei 500g und 4°C für 5 Minuten ohne Bremse zentrifugiert, der Überstand wird verworfen. Das hieraus entstandene Pellet wird mit 500µl Fix/Perm Buffer Solution resuspendiert und für 30 Minuten im Dunkeln auf Eis gelagert. Nach der Inkubationszeit erfolgt eine Resuspension mit jeweils 2ml Perm Buffer und einer Zentrifugation bei 500g und 4°C für 5 Minuten ohne Bremsen, der Überstand wird verworfen. Dieser Schritt wird ein weiteres Mal wiederholt und ist notwendig zur Permeabilisierung der Membran, sodass die folgenden intrazellulären Antikörper in die Zellen eindringen können und dort binden. Nun werden die intrazellulären Antikörper IL17 und IFN $\gamma$  mit einem jeweiligen Volumen von 3µl in jeweils 100µl Perm Buffer hinzugefügt. Es erfolgt eine Inkubation von einer Stunde, nach dieser werden erneut 2ml Perm Buffer hinzugefügt und die Proben bei 500g und 4°C für 5 Minuten ohne Bremse zentrifugiert, der Überstand wird verworfen und das entstandene Pellet wird in 500µl FC-Staining Buffer und 500µl 1%iges PFA resuspendiert.



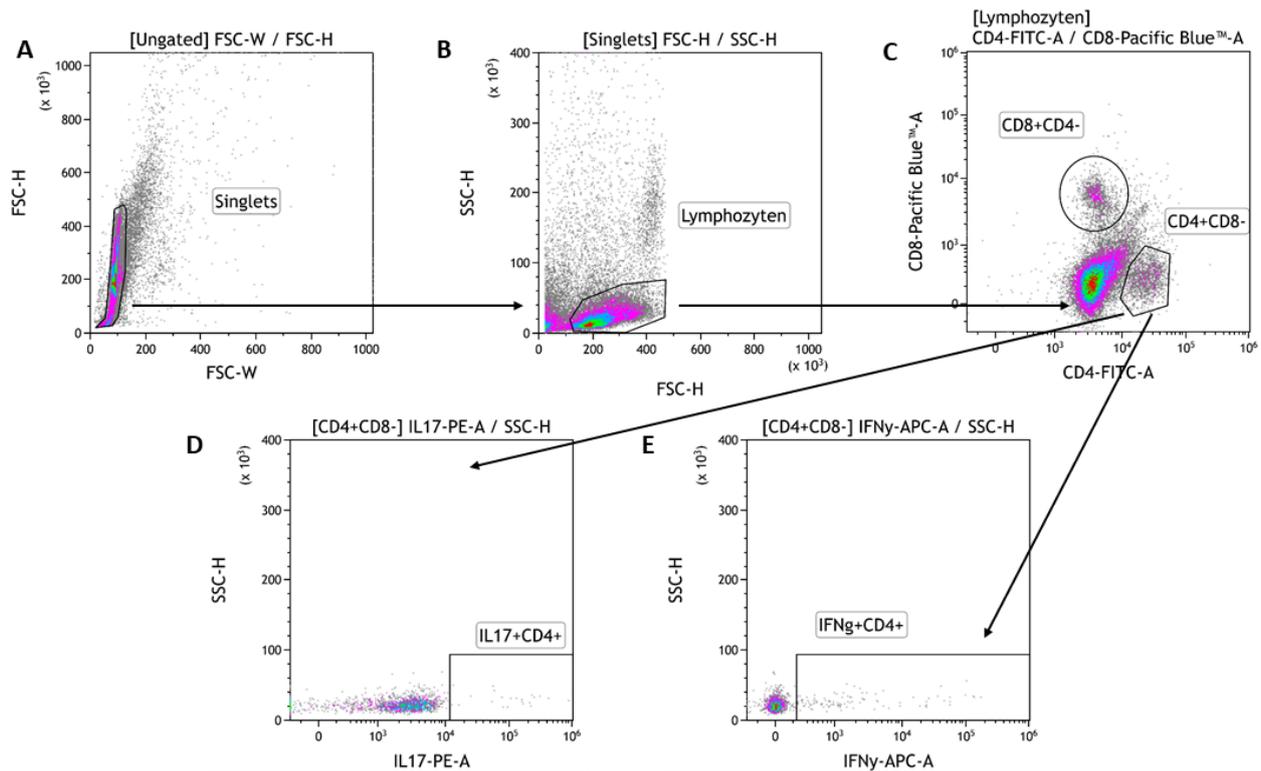
**Abbildung 6 Gating Strategie zur Identifikation der TC-1 und TC-17 Zellen:**

(A) stellt die aus allen gemessenen Ereignissen selektierten Singlets dar, diese werden anhand der beiden Forward Scatter Height und Width zur Entfernung der Doublets verwendet. Aus dieser Population der Singlets werden die Lymphozyten anhand der Area des Sideward Scatters sowie Forward Scatters definiert (B). Die CD8 sowie CD4 positiven Zellen lassen sich aus den zuvor definierten Lymphozyten gut unterscheiden, hierfür werden die Messkanäle der jeweiligen Farbspektren auf den Achsen gegenübergestellt (C). Aus der Population der CD8 positiven zytotoxischen T-Zellen werden die TC-1 sowie TC-17 Zellen gated. Die Population der Interleukin-17 positiven Zellen wurde nun als TC-17 identifiziert (D), die Interferon- $\gamma$  positive Population stellen die TC-1 Zellen dar (E). Die Gates wurden anhand der Fluoreszenz-Minus-One (FMO) Methode gesetzt.

In **Abbildung 6** wird die Gating-Strategie der CD8-positiven TC-Zellen dargestellt. Um die Subtypen der zytotoxischen T-Zellen zu unterscheiden, werden zuerst alle zytotoxischen T-Zellen anhand ihrer CD8-Positivität identifiziert. Aus dieser Population werden im Anschluss die zusätzlich IFN $\gamma$  oder IL-17 positiven Zellen herausgefiltert um diese als TC-1 oder TC-17 Zellen identifizieren zu können.

Die Gating-Strategien der Th1 sowie Th17 Zellen werden in **Abbildung 7** dargestellt.

Für das Gating der Th1 sowie Th17 Zellen werden zunächst alle T-Helferzellen über CD4 positive Zellen aus den Lymphozyten selektiert. Da Th1 IFN $\gamma$  positiv sind und Th17-Zellen IL-17 positiv werden diese nun in Gates gesetzt. Diese einzelnen Populationen werden nun im relativen Anteil aller T-Helferzellen betrachtet und analysiert.



**Abbildung 7 Gating Strategie zur Identifikation der Th-1 und Th17 Zellen:**

(A) zeigt die aus allen gemessenen Ereignissen selektierten Singlets, welche anhand der beiden Forward Scatter Height und Width der Doubles Diskriminierung dienen. Aus den bestimmten Singlets wird die Population der Lymphozyten anhand der Area des Sideward Scatters sowie Forward Scatters definiert (B). Aus den Lymphozyten lassen sich die beiden Populationen der CD4 positiven sowie CD8 positiven T-Zellen voneinander diskriminieren, hierfür werden die Messkanäle der jeweiligen Farbspektren auf den Achsen gegenübergestellt (C). Aus der Population der CD4 positiven T-Helferzellen werden die Th1 sowie Th17 Zellen gated. Die Population der Interleukin-17 positiven Zellen wurde nun als Th17 identifiziert (D), die Interferon- $\gamma$  positive Population stellen die Th1 Zellen dar (E). Die Gates wurden anhand der Fluoreszenz-Minus-One (FMO) Methode gesetzt.

## **Antikörperfärbung der T-regulatorischen-Zellen**

Die Färbung der T-regulatorischen Zellen erfolgte mit geringen Abweichungen vom Firmenprotokoll des genutzten Mouse Regulatory T-Cell Staining Kit von ThermoFisher.

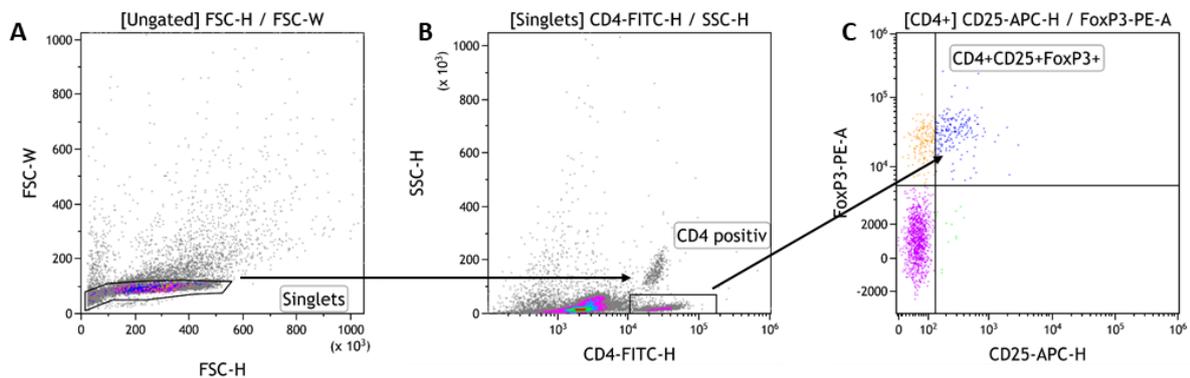
Zwei der jeweils auf 0,5ml halbierte Proben des gemeinsamen Schrittes der T-Zellfärbung werden nun mit 1µl CD4 und 1µl CD25 sowie 200µl PBS versehen, wonach eine Inkubation von 30 Minuten im Dunkeln auf Eis erfolgt. Die Proben werden nun bei 500g und 4°C für 5 Minuten ohne Bremse zentrifugiert, der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird in 1ml FC-Staining Buffer resuspendiert und erneut bei 500g und 4°C für 5 Minuten ohne Bremse zentrifugiert, der Überstand wird wieder verworfen.

Es erfolgt eine Resuspension des Pellets in 500µl Fix/Perm Solution woraufhin sich eine 30-minütige Inkubationszeit im Dunkeln bei Zimmertemperatur anschließt.

Nach der Inkubation werden die Proben bei 500g und 4°C für 5 Minuten ohne Bremse zentrifugiert, der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird nun in 2ml PBS resuspendiert und anschließend erneut wie zuvor zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird inklusive Zentrifugation genauso wiederholt. Das entstandene Pellet wird in 100µl Perm Buffer und 1µl des Antikörpers FoxP3 resuspendiert und für eine Stunde bei Zimmertemperatur im Dunkeln inkubiert.

Nun werden jeweils 2ml Perm Buffer hinzugegeben und die Proben bei 500g und 4°C für 5 Minuten ohne Bremse zentrifugiert, der Überstand wird wieder verworfen. Das entstandene Pellet wird in 500µl FC-Staining Buffer und 500µl 1%igen PFA resuspendiert.

**Abbildung 8** zeigt die Gatingstrategie der T-regulatorischen Zellen. Da es sich bei den T-regulatorischen Zellen offenkundig auch um T-Zellen handelt, werden zuerst aus der Population der Lymphozyten alle CD4 positiven Zellen gated. Alle Zellen der CD4 positiven Population die sowohl CD25 positiv als auch zugleich FoxP3 positiv sind, werden als T-regulatorische Zellen betrachtet. In der Auswertung werden die T-regulatorischen Zellen in Relation zu der Gesamtzahl der T-Zellen gesetzt.



**Abbildung 8 Gating Strategie zur Identifikation der CD25 positiven und FoxP3 positiven Zellen:**

Alle gemessenen Ereignisse werden im Forward Scatter dargestellt, hier wird nach einzelnen Zellen, den Singlets, selektiert (A). Es werden anhand des Sideward Scatters und der CD4 Detektion die Population der CD4 positiven Zellen eingegrenzt (B). Aus dieser Population werden nun anhand der FoxP3 sowie CD25 Positivität die T-regulatorischen Zellen identifiziert. Die Gates wurden anhand der Fluoreszenz-Minus-One (FMO) Methode gesetzt (C).

**2.4.3 Durchflusszytometrische Messung**

Die Messung der Proben erfolgte mit Hilfe des Attune Nxt Flow Cytometer von ThermoFisher. Die Proben wurden fixiert mit dem im Protokoll beschriebenen PFA gemessen, dies erfolgte frühestens nach einem Tag, spätestens jedoch nach dem Dritten. Eine Ergebnisdifferenz, bei nach Protokoll fixierten Proben, bedingt durch den Messzeitraum konnte bei einem vorab durchgeführten Probelauf nicht festgestellt werden. Vor Durchführung der ersten Messung des Experiments erfolgte eine Anpassung der Spannung der Laser für eine hinreichende Diskriminierungsstärke zwischen positiver und negativer Färbung der einzelnen Floreszenzen im Sinne einer Kompensation. Zwischen den Messungen einzelner Proben erfolgte ein

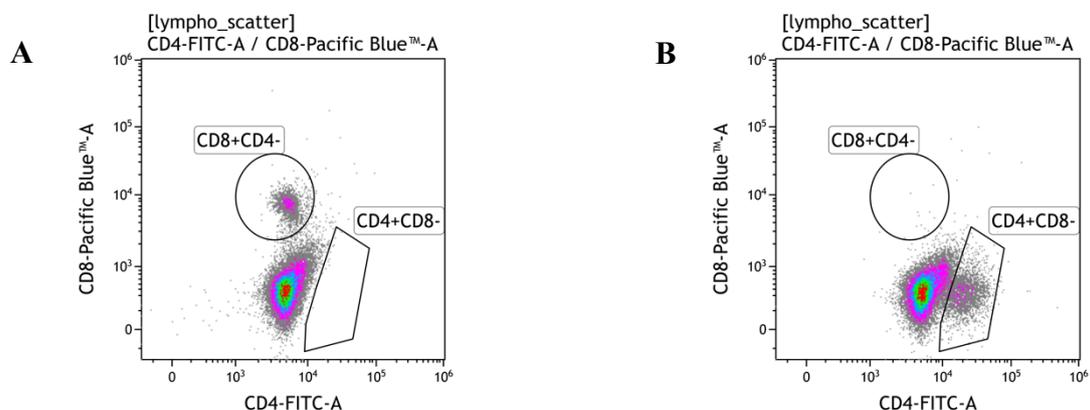
Waschschritt mit 500µl PBS. Erfolgte ein Wechsel der Organe wurde zusätzlich ein Waschschritt mit 500µl 10% Bleach in Aqua dest. durchgeführt. Dies dient der Beseitigung vorher gemessener Rückstände der Fluoreszenzmarker und Zellbestandteile.

#### 2.4.4 Analyse der durchflusszytometrischen Messergebnisse

Für die Analyse der Messergebnisse wurde die Software Kaluza Analysis in der Version 2.1 von Beckman Coulter verwendet.

Durch das Verwenden von Fluoreszenz-Minus-One (FMO) Proben wurden die genauen Grenzen der Gates gesetzt und auf alle Proben einer Mausreihe standardisiert angewandt. Zudem wurden durch die Verwendung von Compensation Beads am Attune Nxt Flow Cytometer vorab individuell nach dem Versuchspanel Kompensationen erstellt, welche elektronisch vom Gerät in die Kaluza Analysesoftware übertragen wurden und dort auf die Proben angewandt wurden.

Um exakt die gewünschte Population zu definieren, ist es nicht ausreichend die Gates ausschließlich anhand einer Full-stained Probe zu setzen. Um einer Populationsdefinition exakte Gewissheit zu geben, ist die Methodik der Fluoreszenz-Minus-One, wie in diesem Experiment erfolgt, Goldstandard. Hierbei wird der jeweilige Fluoreszenzmarker nicht hinzugegeben, dessen Gate gesetzt werden soll. Somit ergibt sich ein Negativ der Population, welches anhand der **Abbildung 9** exemplarisch anhand von CD8 und CD4 positiven Populationen deutlich gemacht wird.



**Abbildung 9 Darstellung der Fluoreszenz-Minus-One (FMO) Methode anhand von CD8 und CD4 positiven Populationen:**

(A) Dargestellt ist die FMO-Probe ohne CD4 Antikörper. Somit fehlt die Population der CD4 positiven Zellen, diese lässt sich in **B** hingegen darstellen und damit genau in einem Gate definieren. Vice versa verhält sich dies im Beispiel mit der CD8 positiven Population (**B**).

#### 2.4.5 Ausschluss von Proben

Auf Grund einzelner experimenteller Unzulänglichkeiten kam es im Rahmen dieses Versuchs auch zum Ausschluss von Proben, insofern wesentliche Abweichungen vom Protokoll unbeabsichtigt erfolgten. Sollte die Zellzahl einer Probe unmessbar niedrig sein, so wurde sie ebenfalls von der durchflusszytometrischen Analyse ausgeschlossen. Konkrete und individuelle Gründe für den Ausschluss einzelner Proben können den Primärdaten entnommen werden.

#### 2.5 Statistik

In der Auswertung der Studienergebnisse sind Odds Ratios (ORs) und entsprechende 95 % Konfidenzintervalle (CIs) für KHK basierend auf den ImP-Quartilen unter Verwendung sowohl univariabler als auch multivariabler logistischer Regressionsmodelle berechnet worden. In den multivariablen Modellen wurden Anpassungen für kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Alter, Geschlecht, Raucherstatus, Bluthochdruck, Hypercholesterinämie und Diabetes vorgenommen. Signifikanz wurde bei einem zweiseitigen P-Wert von  $P \leq 0,05$  angenommen.

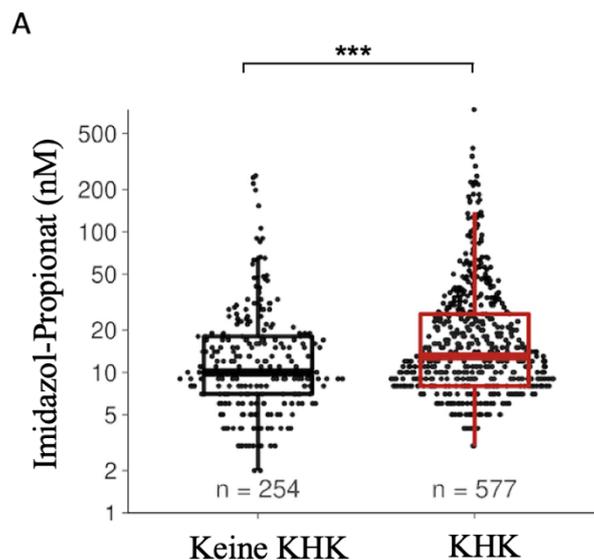
Für die statistische Analyse des Tierexperimentes wurde das Programm GraphPad Prism der Firma GraphPad Software in der Version 9 verwendet.

Die statistische Analyse begann mittels Grubb's Ausreißertest, hierdurch wurden mögliche statistische Extremwerte aus den Auswertungen ausgeschlossen. Zur Testung auf Signifikanz wurde bei der vorhandenen Gruppenstärke ein nicht-parametrischer T-Test angewandt, der Mann-Whitney-U-Test. Das Signifikanzniveau wurde ebenso auf 5% ( $P \leq 0,05$ ) festgelegt.

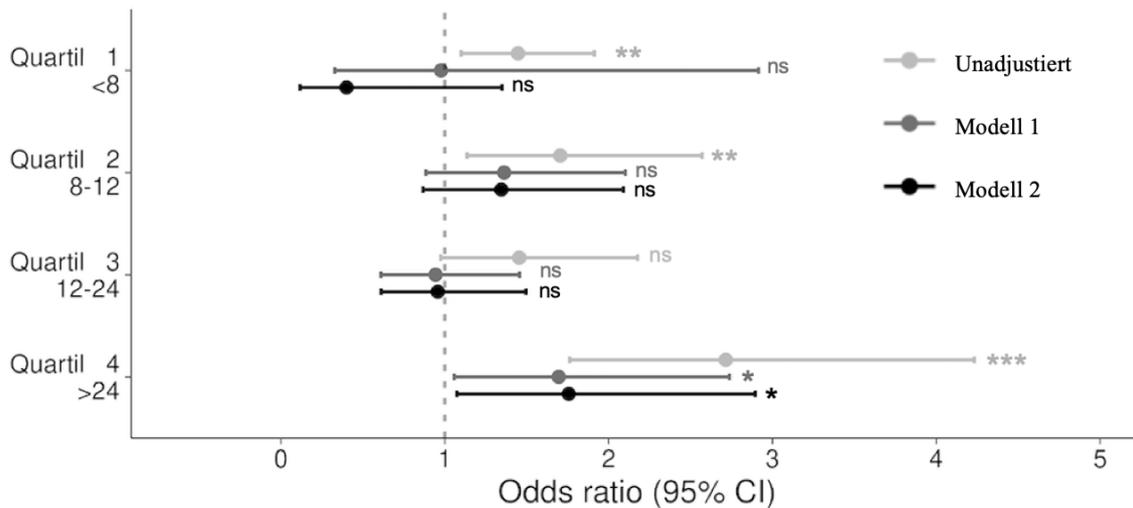
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Klinische Studie

Zur Feststellung einer Korrelation zwischen erhöhten ImP Blutplasma-Spiegeln und einer KHK entnahmen wir Blutproben in einer Kohorte von Patient:innen (n = 831) die sich einer elektiven Herzkatheter-Untersuchung unterzogen. Hierbei fanden wir erstmalig heraus, dass Patient:innen mit signifikanter Stenosierung in den Koronargefäßen ( $\geq 50\%$  stenosiert), welche angiographisch erfasst und mittels Herzkatheter als manifeste KHK diagnostiziert wurde, erhöhte ImP Blutplasma-Spiegel aufwiesen ( $P < 0.001$ ) (**Abbildung 10 A**). Darüber hinaus fanden wir eine dosisabhängige Beziehung zwischen ImP-Spiegeln und dem Risiko einer vorliegenden KHK (**Abbildung 10 B**).



B



**Abbildung 10 (A) Korrelation des ImP-Plasma-Spiegels mit vorhandener KHK oder ohne signifikanter Stenose. (B) Darstellung der Odds ratio in Relation zum zugeordneten ImP Quartil**

(A) Darstellung der Patient:innen mit positivem KHK-Befund im Herzkatheter und Gruppe mit entsprechend negativem und deren Korrelation mit dem ImP Plasma-Spiegel. Es ist erkennbar, dass die Gruppe mit deutlicher Stenose mindestens eines Koronargefäßes ( $\geq 50\%$  stenose) signifikant erhöhte ImP-Plasma Spiegel haben. In (B) sind die Plasmaspiegel in Quartile unterteilt, so ist in Quartil 1 mit unter 8 nM ImP die mit der geringsten, Quartil 4 mit über 24 nM der höchsten ImP Plasma Konzentration. In Modell 1 wurden die Gruppen in Alter und Geschlecht adjustiert, Modell 2 zusätzlich mit kardiovaskulären Risikofaktoren.

Dieses erhöhte Risiko war besonders ersichtlich bei Patient:innen im vierten Quartil mit entsprechend hohen ImP Plasma-Spiegeln, die nach Anpassungen für Alter und Geschlecht signifikant blieb und sogar nach weiteren Anpassungen für kardiovaskuläre Risikofaktoren einschließlich Bluthochdruck, Dyslipidämie, Diabetes und Rauchen signifikant blieb.

### 3.2 Tierexperiment

Die Tierkohorte wurde, wie im Methodik-Teil beschrieben, in vier Gruppen geordnet. Jeweils in mit ImP behandelte sowie unbehandelte Gruppen und in Carotid Injury (CI) und Schein-OP (Sham) Gruppen. Der Hintergrund hierbei sind weitere Untersuchungen, an der Modulation der endothelialen Immunreaktion durch ImP in einer anderen Arbeit. Das ImP wurde oral über das Trinkwasser der behandelten Mäuse aufgenommen, dies stellt zudem auch die physiologischste

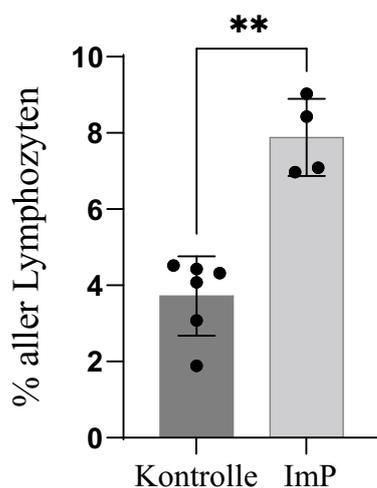
Art der Supplementierung dar, da die Menge des ImP die die Blut-Darm-Schranke überwindet den physiologischen Gegebenheiten des Organismus unterliegen.

### 3.2.1 Einfluss von Imidazol-Propionat auf die T-Helferzellen, deren Subpopulationen und T-regulatorischen Zellen im Blut

C57BL/6N Mäuse wurden über vier Wochen mit ImP über das Trinkwasser behandelt, die Kontrollgruppe erhielt unbehandeltes Trinkwasser. In **Abbildung 11** wird die Gesamtpopulation aller CD4-positiven T-Helferzellen im Blut in Relation der gesamten Lymphozyten durchflusszytometrisch gemessen. Hier wird ersichtlich, dass der Gesamtanteil der T-Helferzellen in der Gruppe der carotisverletzten Tiere nach ImP Behandlung signifikant steigt. In Kontrast hierzu ist kein signifikanter Unterschied der gesamten T-Helferzellen in der Gruppe der Schein-OP ohne Gefäßverletzung zu verzeichnen.

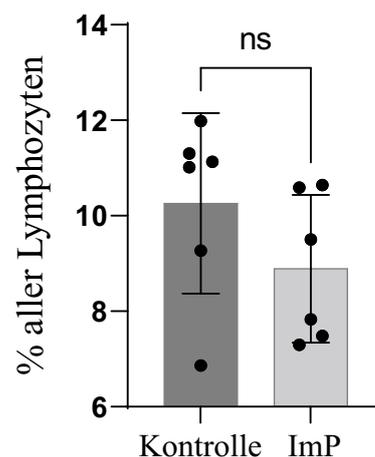
**A**

CD4+ CI-Blut



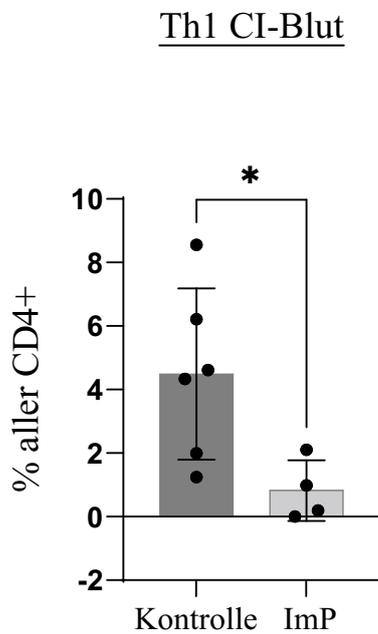
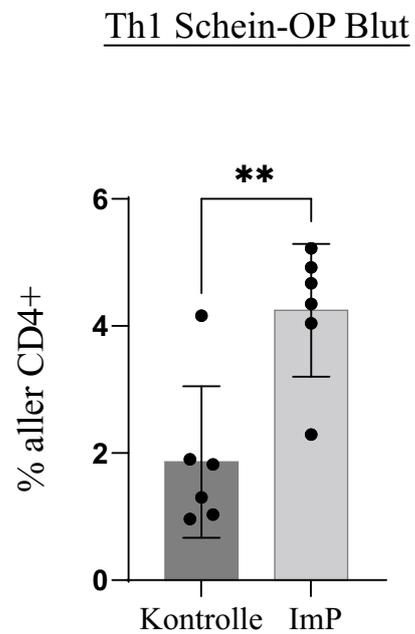
**B**

CD4+ Schein-OP Blut



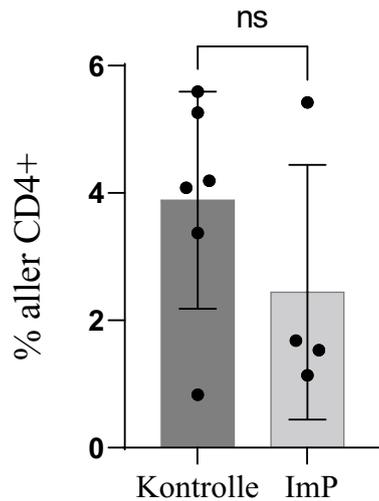
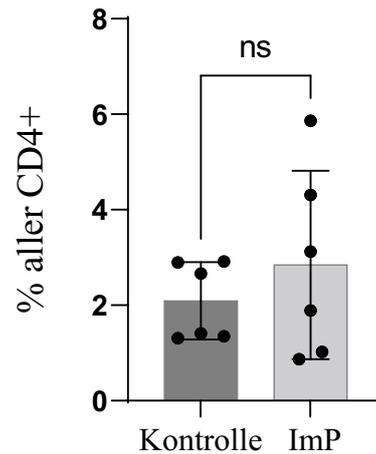
*Abbildung 11: Analyse des Blutes auf CD4+ Lymphozyten In (A) zeigt sich in der carotisverletzten Gruppe (CI) ein signifikant höherer Anteil an CD4+ Lymphozyten nach ImP Behandlung. (B) zeigt keinen signifikanten Unterschied im Blut der Kontrollgruppe nach Schein-OP.*

Mit Blick auf die erste Subpopulation der CD4-positiven Zellen im Blut, den Th1 Zellen, in **Abbildung 12**, fällt auf, dass in der Gruppe der gefäßverletzten Mäuse der Anteil der Th1-Zellen an der Gesamt CD4-positiven Population in der Kontrollgruppe signifikant größer ist als in der behandelten Gruppe. Anders verhält sich dies in der Gruppe der Schein-OPs, hier ist der Anteil der Th1-Zellen in der Gruppe der ImP behandelten Mäuse signifikant, in Relation zur Kontrollgruppe, erhöht. Die alleinige Behandlung mit ImP in der Gruppe der Schein-OPs scheint ohne Verletzung der Arterie bereits eine signifikante Erhöhung der Th1-Zellen hervorzurufen, die Rekrutierung von Th1-Zellen stellt ein großer negativer Prädiktor für die Entstehung einer Atherosklerose dar. In der Gruppe der gefäßverletzten Mäuse unterliegt jedoch der Anteil der Th1-Zellen der behandelten Mäuse denen der Kontrollgruppe. Hier scheint es bei den unbehandelten Mäusen einen höheren Nachweis frei im Blut zirkulierender Zellen mit CD4+ Zellbesatz zu geben.

**A****B**

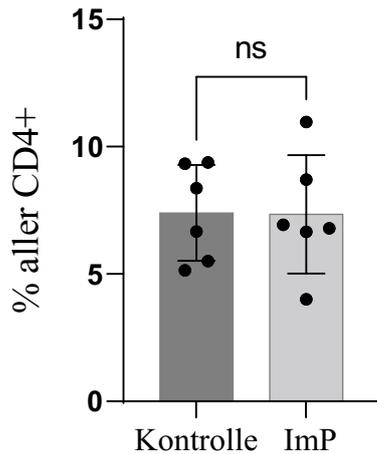
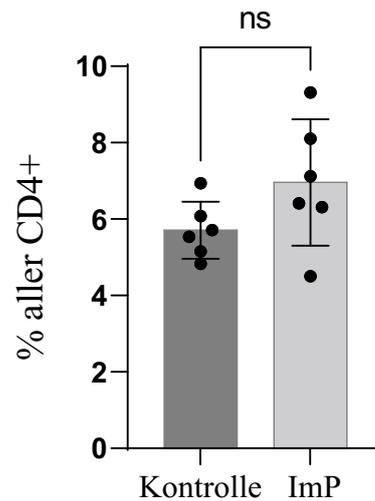
**Abbildung 12: Analyse des Blutes auf Th1 Zellen** In (A) zeigt sich in der carotisverletzten Gruppe (CI) ein signifikant höherer Anteil an Th1 Zellen in der Kontrollgruppe. (B) zeigt einen signifikant höheren Anteil an Th1 Zellen im Blut der ImP behandelten Gruppe nach Schein-OP.

In **Abbildung 13** zeigen sich bei der Subpopulation Th17-Zellen keine signifikanten Veränderungen zwischen den behandelten und unbehandelten Mäusen der gefäßverletzten Gruppe. Ebenso ließen sich in der Gruppe der Schein-OP Mäuse keine signifikanten Veränderungen der Th17 Populationen erkennen.

**A**Th17 CI-Blut**B**Th17 Schein-OP Blut

**Abbildung 13: Analyse des Blutes auf Th17 Zellen** In (A) zeigt sich in der carotisverletzten Gruppe (CI) ein nicht signifikant höherer Anteil an Th17 Zellen in der Kontrollgruppe. (B) zeigt einen ebenso nicht signifikant höheren Anteil an Th17 Zellen im Blut der ImP behandelten Gruppe nach Schein-OP.

Mit Blick auf die T-regulatorischen Zellen, die eine immunmodulierende Rolle einnehmen, zeigte sich, wie in **Abbildung 14** ersichtlich, keine signifikante Veränderung der T-regs unter Behandlung mit ImP. Sowohl in der Gruppe der Carotisverletzung als auch der Schein-OP gab es keinen signifikanten Einfluss des ImP auf den Anteil der T-regs an der Gesamtzahl der CD4 positiven Zellen im Blut.

**A**Tregs CI-Blut**B**Tregs Schein-OP Blut

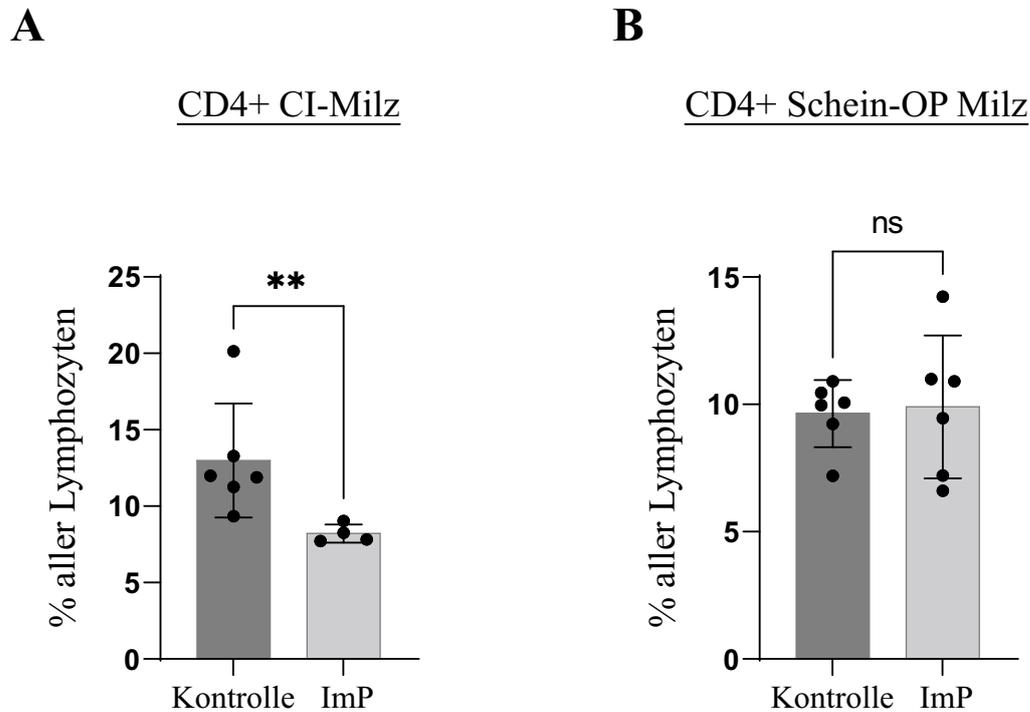
**Abbildung 14: Analyse des Blutes auf T-regulatorische Zellen** In (A) zeigt sich in der carotisverletzten Gruppe (CI) kein signifikanter Unterschied an Tregs Zellen. (B) zeigt einen ebenso nicht signifikanten Unterschied an Tregs Zellen im Blut der ImP behandelten Gruppe nach Schein-OP.

### 3.2.2 Einfluss von Imidazol-Propionat auf die T-Helferzellen, deren Subpopulationen und T-regulatorischen Zellen in der Milz

T-Zellen reichern sich in der Milz vor allem in den periarteriellen lymphatischen Scheiden (PALS) um Gefäße an, sie bildet eine Art Speicherort für Immunzellen wie den T-Helferzellen, die bei notwendiger Immunantwort in das arterielle Gefäßsystem entlassen werden können (95). Daher ist die Betrachtung der Milz als wichtiges lymphatisches und immunologisches Organ von Bedeutung.

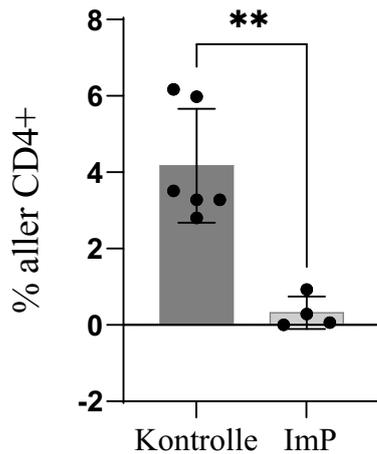
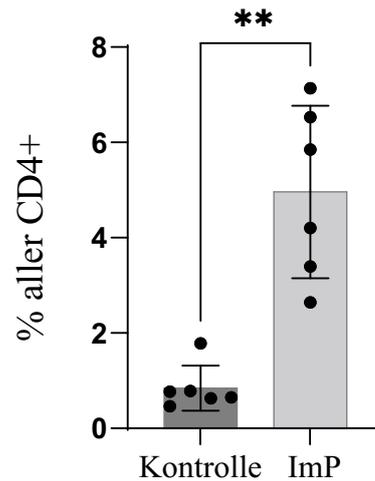
**Abbildung 15** zeigt den Anteil aller CD4 positiven Zellen an der gesamten Lymphozytenpopulation in den Milzzellen. Hier zeigt sich in der Milz, ähnlich wie im Blut, ein

signifikant erhöhter Anteil an CD4 positiven T-Helferzellen bei der gefäßverletzten Gruppe nach Behandlung mit ImP im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Gruppe der Schein-OP Mäuse gab es hingegen keine signifikanten Änderungen.



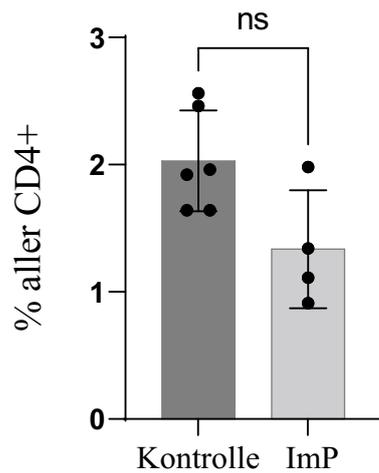
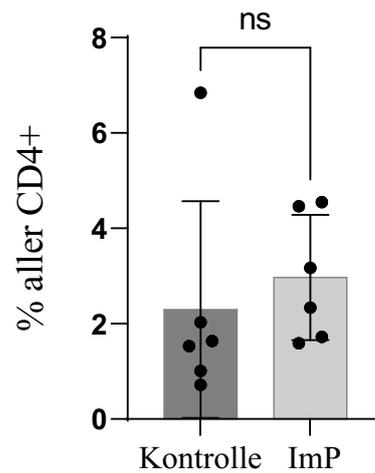
**Abbildung 15: Analyse des Milzgewebes auf CD4+ Zellen** In (A) zeigt sich in der carotisverletzten Gruppe (CI) ein signifikant höherer Anteil an CD4+ Lymphozyten in der Kontrollgruppe. (B) zeigt keine Differenz im Milzgewebe nach Schein-OP.

Bei genauer Betrachtung der Subtypen der CD4 positiven T-Helferzellen zeigt sich ein ähnliches Bild wie bereits im Blut. In **Abbildung 16** ist der Anteil der Th1-Zellen an der Gesamtpopulation der CD4 positiven Zellen in der gefäßverletzten Gruppe, besonders bei den unbehandelten Mäusen, signifikant erhöht. In der Schein-OP Gruppe zeigt sich das Bild vice versa, hier ist der Anteil der Th1 Zellen in der behandelten Gruppe signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle.

**A**Th1 CI-Milz**B**Th1 Schein-OP Milz

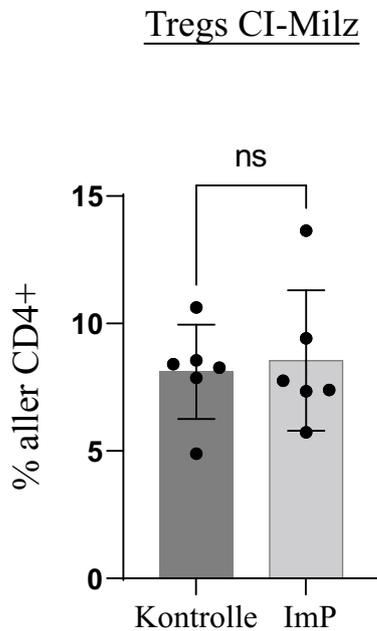
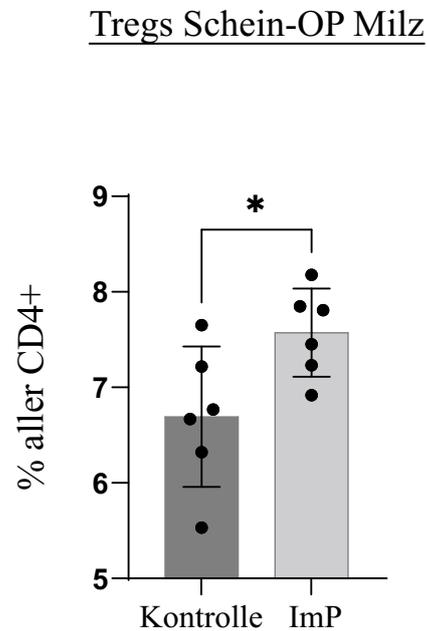
**Abbildung 16: Analyse des Milzgewebes auf Th1-Zellen** In (A) zeigt sich in der carotisverletzten Gruppe (CI) ein signifikant höherer Anteil an Th1-Zellen in der Kontrollgruppe. (B) zeigt einen signifikant höheren Anteil an Th1-Zellen in der mit ImP behandelten Gruppe nach Schein-OP.

Bei den Th17-Zellen zeigten sich, in **Abbildung 17** erkennbar, keine signifikanten Veränderungen am Anteil der Th17-Zellen bei behandelten und unbehandelten Mäusen in der Gruppe der gefäßverletzten Tiere. Ähnlich ist das Bild auch in der Gruppe der Schein-OP Tiere, auch hier gab es keine signifikanten Änderungen in der Th17 Population beider Behandlungsgruppen.

**A**Th17 CI-Milz**B**Th17 Schein-OP Milz

**Abbildung 17: Analyse des Milzgewebes auf Th17-Zellen** In (A) zeigt sich in der carotisverletzten Gruppe (CI) ein nicht-signifikant höherer Anteil an Th17-Zellen in der Kontrollgruppe. (B) zeigt einen ebenso nicht-signifikant höheren Anteil an Th17-Zellen in der mit ImP behandelten Gruppe nach Schein-OP.

Die immunmodulierenden T-regulatorischen Zellen zeigen in der Gruppe der Schein-OPs eine signifikante Erhöhung ihres Anteils an der CD4 positiven Population in der Milz (**Abbildung 18**). Keine signifikanten Unterschiede am T-reg Anteil zeigen die gefäßverletzten Mäuse.

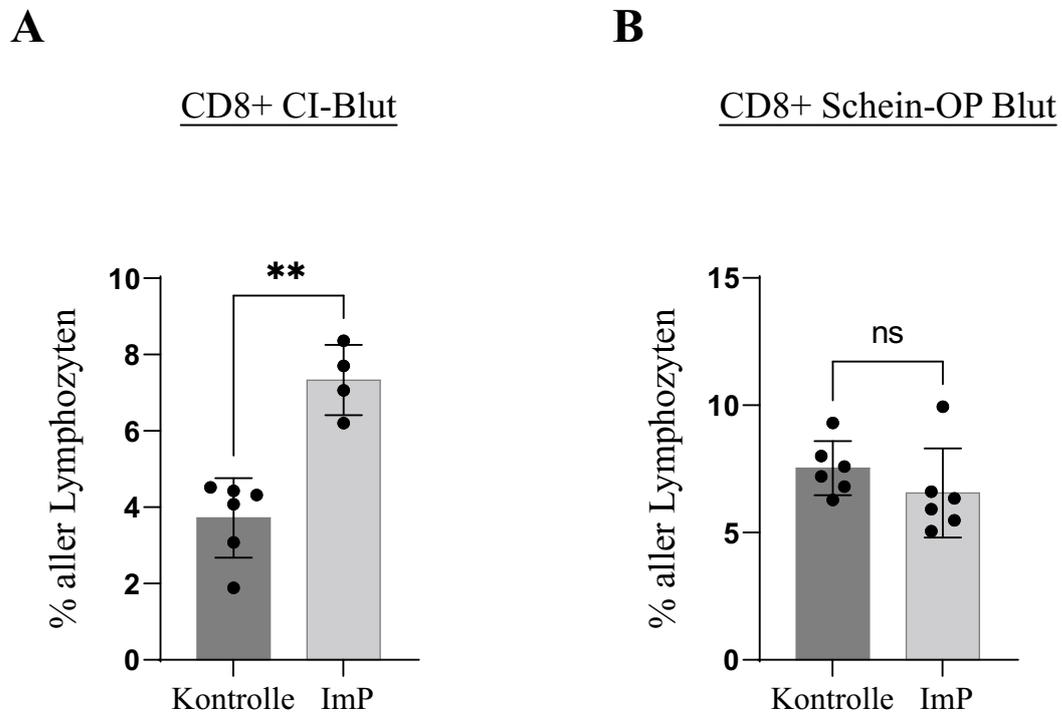
**A****B**

**Abbildung 18: Analyse des Milzgewebes auf T-regulatorische Zellen** In (A) zeigt sich in der carotisverletzten Gruppe (CI) kein Unterschied am Anteil der Tregs Zellen. (B) zeigt einen signifikant höheren Anteil an Tregs Zellen in der mit ImP behandelten Gruppe nach Schein-OP.

### 3.2.3 Einfluss von Imidazol-Propionat auf die zytotoxischen T-Zellen und deren Subpopulationen im Blut

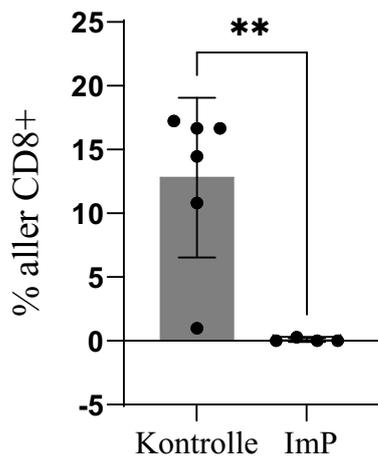
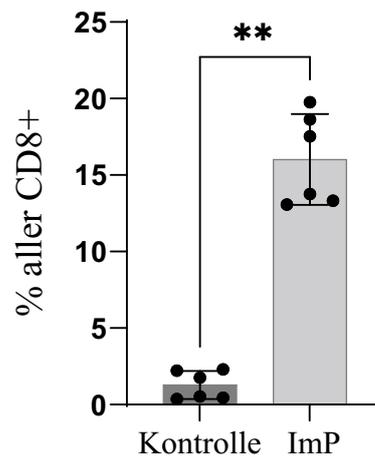
In **Abbildung 19** wird der Anteil der zytotoxischen T-Zellen anhand des Markers CD8 dargestellt. Die zytotoxischen T-Zellen werden ebenfalls anteilig an der Lymphozyten-Population betrachtet. Auch hier ist zu erkennen, dass ähnlich der T-Helferzellen auch die

zytotoxischen T-Zellen in der Gruppe mit Verletzung der Arterie signifikant steigen. Ebenso lässt sich in der Gruppe der Schein-OP kein signifikanter Unterschied erkennen.



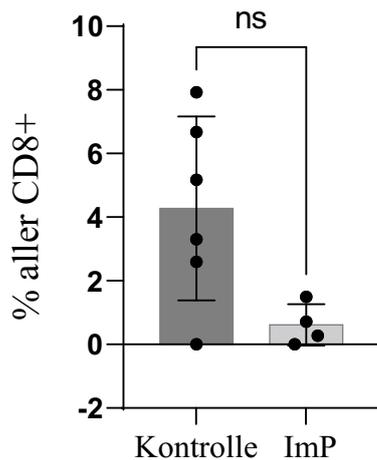
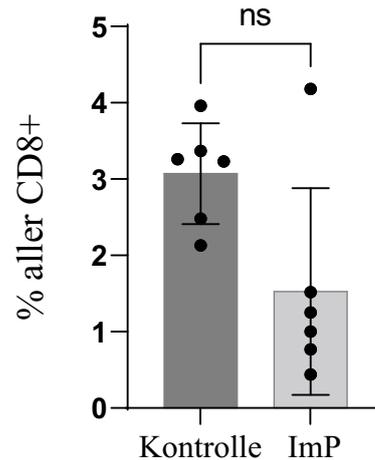
**Abbildung 19: Analyse des Blutes auf CD8+ Zellen** In (A) zeigt sich in der carotisverletzten Gruppe (CI) ein signifikant höherer Anteil der CD8+ Zellen in der mit ImP behandelten Gruppe. (B) zeigt keine signifikante Differenz nach Schein-OP.

In **Abbildung 20** wird die erste Subpopulation der zytotoxischen T-Zellen betrachtet. Hierbei handelt es sich um die TC1-Zellen, die in der Gruppe der gefäßverletzten Mäuse einen signifikant höheren Anteil an der Gesamt-CD8-positiven Population der unbehandelten Kontrollgruppe im Vergleich zur behandelten ImP Gruppe ausmacht. In der Gruppe der Schein-OP Mäuse hingegen gibt es einen deutlichen und signifikanten Anstieg der TC1-Zellen auf Seiten der mit ImP behandelten Tiere. Bei vorhandener Gefäßverletzung sind signifikant mehr TC1 Zellen auf Seiten der unbehandelten Mäuse frei im zirkulierenden Blut zu finden.

**A**TC1 CI-Blut**B**TC1 Schein-OP Blut

**Abbildung 20: Analyse des Blutes auf TC1 Zellen** In (A) zeigt sich in der carotisverletzten Gruppe (CI) ein signifikant höherer Anteil der TC1 Zellen in der Kontrollgruppe. (B) zeigt keine signifikante Differenz nach Schein-OP.

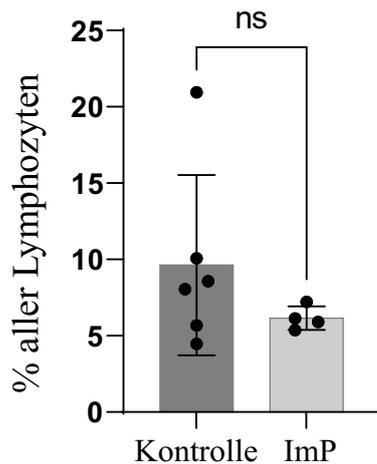
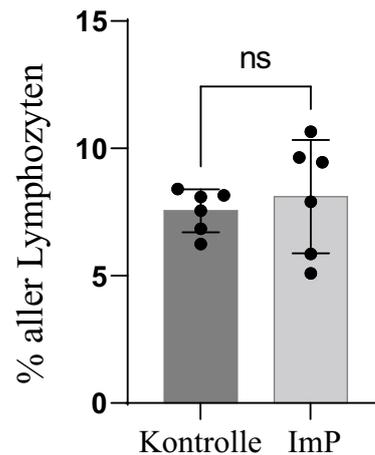
**Abbildung 21** zeigt den Anteil der TC17-Zellen an der CD8-positiven Population im Blut. Hierbei zeigt sich in der Gruppe gefäßverletzten Tiere auf Seiten der Kontrollgruppe einen Trend im Anstieg der TC17-Zellen im Verhältnis zur behandelten Gruppe, der jedoch nicht zur Signifikanz führte. Die Gruppe der Schein-OP Tiere zeigte ebenso keine signifikanten Unterschiede im Anteil der TC17-Zellen auf.

**A**TC17 CI-Blut**B**TC17 Schein-OP Blut

**Abbildung 21: Analyse des Blutes auf TC17 Zellen** In (A) zeigt sich in der carotisverletzten Gruppe (CI) ein nicht-signifikant höherer Anteil der TC17 Zellen in der Kontrollgruppe. (B) zeigt einen ebenso nicht-signifikant höheren Anteil an TC17 Zellen in der Kontrollgruppe nach Schein-OP.

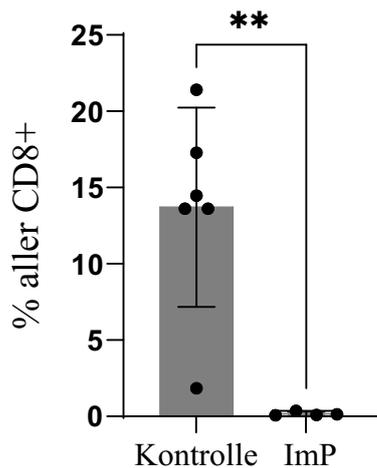
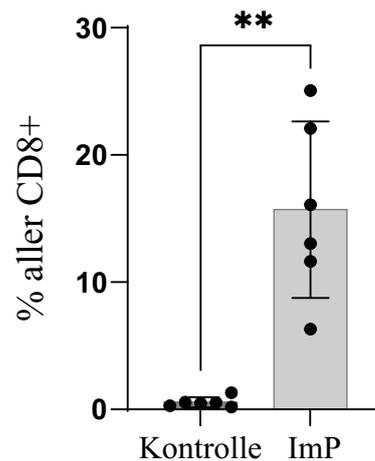
3.2.4 Einfluss von Imidazol-Propionat auf die zytotoxischen T-Zellen und deren Subpopulationen in der Milz

Der Anteil der Gesamtpopulation der CD8 positiven Zellen an allen Lymphozyten wird in **Abbildung 22** in der Milz ersichtlich. Hier gibt es keine signifikanten Unterschiede in der Gruppe der gefäßverletzten Tiere anhand der CD8 positiven Population. Ebenso erreichte die Schein-OP Gruppe keine Signifikanz.

**A**CD8+ CI-Milz**B**CD8+ Schein-OP Milz

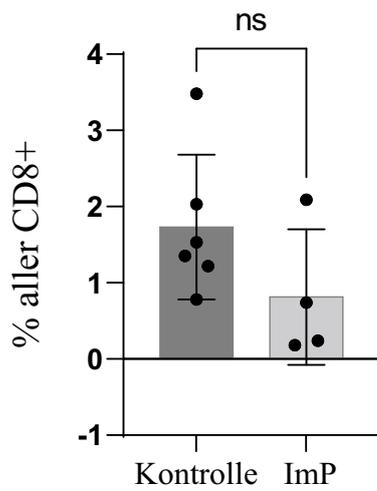
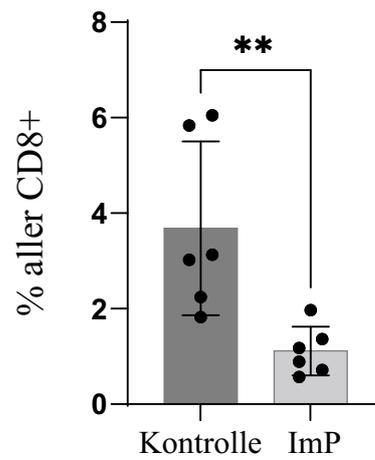
**Abbildung 22: Analyse des Milzgewebes auf CD8+ Zellen** In (A) zeigt sich in der carotisverletzten Gruppe (CI) keine Differenz am Anteil der CD8+ Zellen in der Kontrollgruppe. (B) zeigt keine signifikante Differenz nach Schein-OP.

Die TC1-Zellen und deren Anteile in der Gesamtpopulation der CD8-positiven Zellen der Milz sind in **Abbildung 23** zu sehen. Die Gruppe der gefäßverletzten Mäuse zeigt einen signifikanten anteiligen Unterschied der TC1 Populationen. So wird ersichtlich, dass die Kontrollgruppe einen bedeutend höheren Anteil an TC1-Zellen besitzt als die mit ImP behandelte Gruppe. Ebenso ein signifikanter Unterschied lässt sich in der Schein-OP Gruppe beobachten. Hier ist der Anteil der TC1-Zellen in der Gruppe der mit ImP behandelten Mäuse signifikant höher als in der Kontrollgruppe.

**A**TC1 CI-Milz**B**TC1 Schein-OP Milz

**Abbildung 23: Analyse des Milzgewebes auf TC1 Zellen** In (A) zeigt sich in der carotisverletzten Gruppe (CI) ein signifikant höherer Anteil der TC1 Zellen in der Kontrollgruppe. (B) zeigt einen signifikant höheren Anteil an TC1 Zellen in der mit ImP behandelten Gruppe nach Schein-OP.

In **Abbildung 24** wird die zweite hier untersuchte Subpopulation der CD8 positiven Zellen in der Milz, die TC17, ersichtlich. Die Gruppe der gefäßverletzten Mäuse zeigt keine signifikanten Unterschiede in ihren Anteilen der TC17, es lässt sich jedoch ein Trend erkennen, dass in der Kontrollgruppe der Anteil höher ist. In der Schein-OP Gruppe lässt sich ein deutlicher und signifikanter Unterschied des TC17 Anteils zwischen Kontroll- und ImP-Gruppe erkennen. So ist der Anteil der TC17-Zellen in der Kontrollgruppe signifikant höher.

**A**TC17 CI-Milz**B**TC17 Schein-OP Milz

**Abbildung 24: Analyse des Milzgewebes auf TC17 Zellen** In (A) zeigt sich in der carotisverletzten Gruppe (CI) ein nicht-signifikant höherer Anteil der TC17 Zellen in der Kontrollgruppe. (B) zeigt einen signifikant höheren Anteil an TC17 Zellen in der Kontrollgruppe nach Schein-OP.

### 3.2.5 Einfluss von Imidazol-Propionat auf die Ly6C<sup>low</sup> und Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten-Homöostase im Knochenmark

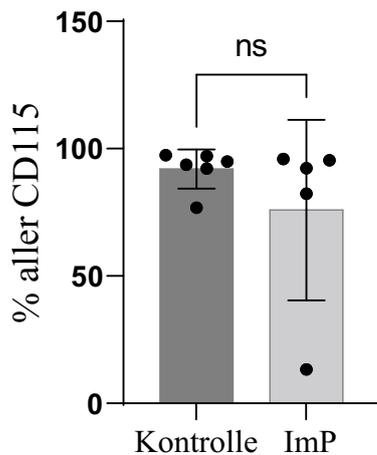
Monozyten werden durch Hämatopoiese im Knochenmark gebildet. Spezifischen Stimuli folgend entwickeln sich aus multipotenten Stammzellen und Progenitorzellen Monozyten (96). Somit besitzt das Knochenmark als Syntheseort der Monozyten eine hohe Relevanz und wurde auch in dieser Arbeit untersucht. Die Proliferation der Monozyten ist auch von Signalmolekülen aus Entzündungsreaktionen gesteuert und kann diesen somit unterliegen. Die Wirkung der Monozyten im entzündlichen Geschehen kann unter anderem durch den Besatz des Oberflächenmarkers Ly6C bestimmt werden. Ly6C<sup>hi</sup> tragen entscheidend zum Progress eines

inflammatorischen Geschehens bei, wohingegen  $\text{Ly6C}^{\text{low}}$  eine immunmodulierende Wirkung besitzen (38, 39).

In **Abbildung 25** werden die  $\text{Ly6C}^{\text{hi}}$  im Knochenmark anteilig an allen CD115 positiven Zellen analysiert. In der Gruppe der gefäßverletzten Mäuse lassen sich keine signifikanten Unterschiede am Anteil der  $\text{Ly6C}^{\text{hi}}$  erkennen. In der Schein-OP Gruppe hingegen gibt es einen signifikanten Unterschied, die Kontrollgruppe hat einen deutlich höheren Anteil an  $\text{Ly6C}^{\text{hi}}$  als die mit ImP behandelten Tiere.

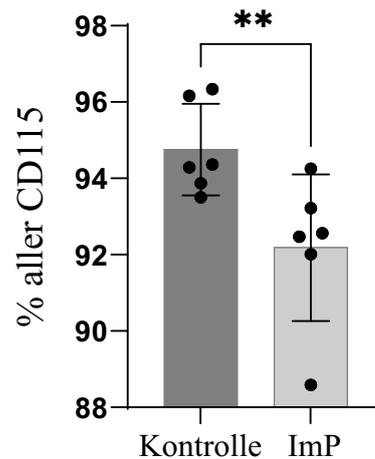
**A**

$\text{Ly6C}^{\text{hi}}$  CI-Knochenmark



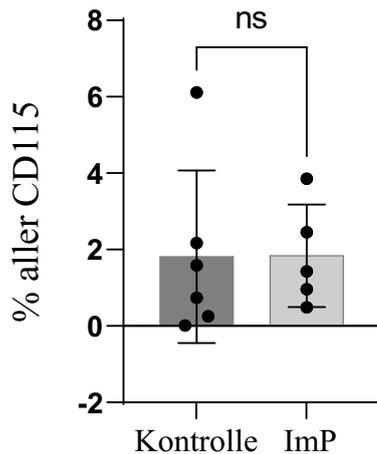
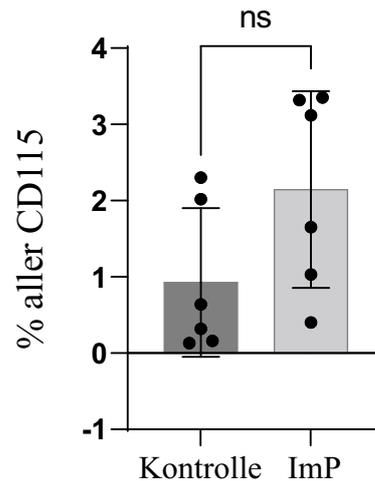
**B**

$\text{Ly6C}^{\text{hi}}$  Schein-OP Knochenmark



**Abbildung 25: Analyse des Knochenmarks auf  $\text{Ly6C}^{\text{hi}}$**  In (A) zeigt sich in der carotisverletzten Gruppe (CI) keine signifikante Differenz im Anteil der  $\text{Ly6C}^{\text{hi}}$ . (B) zeigt einen signifikant höheren Anteil der  $\text{Ly6C}^{\text{hi}}$  in der Kontrollgruppe nach Schein-OP.

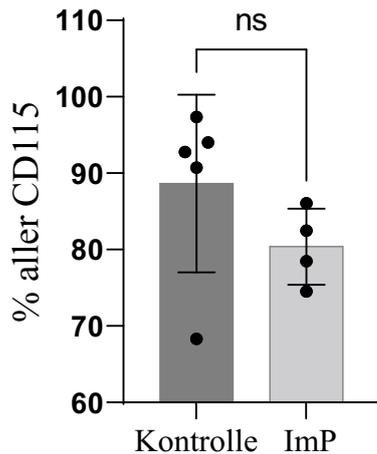
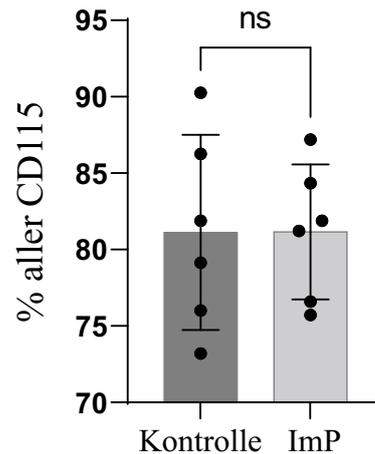


**A**Ly6C<sup>neg</sup> CI-Knochenmark**B**Ly6C<sup>neg</sup> Schein-OP Knochenmark

**Abbildung 27: Analyse des Knochenmarks auf Ly6C<sup>neg</sup>** In (A) zeigt sich in der carotisverletzten Gruppe (CI) keine signifikante Differenz im Anteil der Ly6C<sup>neg</sup>. (B) zeigt ebenso keine signifikante Differenz im Anteil der Ly6C<sup>neg</sup> nach Schein-OP.

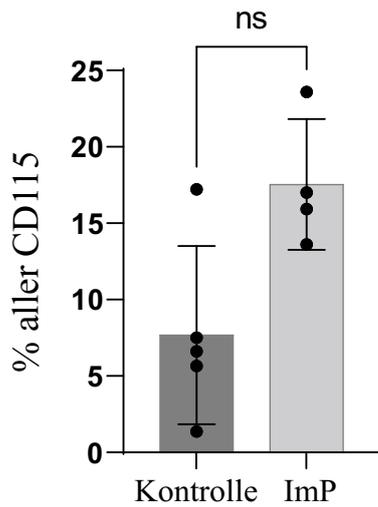
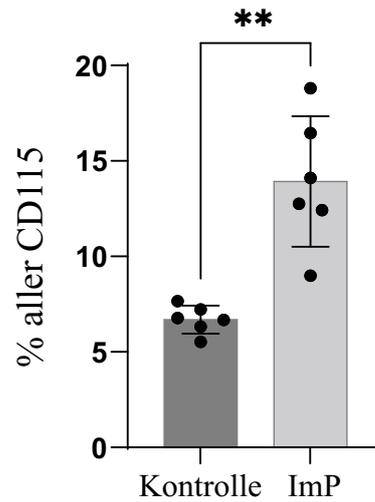
### 3.2.6 Einfluss von Imidazol-Propionat auf die Ly6C<sup>low</sup> und Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten-Homöostase in der Milz

In **Abbildung 28** ist der Anteil der Ly6C<sup>hi</sup> an allen CD115-positiven Zellen in der Milz zu sehen. In der Gruppe der gefäßverletzten Tiere gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und ImP behandelter Gruppe. Jedoch lässt sich ein Trend erkennen, dass hier die Kontrollgruppe einen im Durchschnitt höheren Anteil an Ly6C<sup>hi</sup> besitzt. In der Gruppe der Schein-OP Tiere ist kein signifikanter Unterschied, oder ein Trend zu erkennen.

**A**Ly6C<sup>hi</sup> CI-Milz**B**Ly6C<sup>hi</sup> Schein-OP Milz

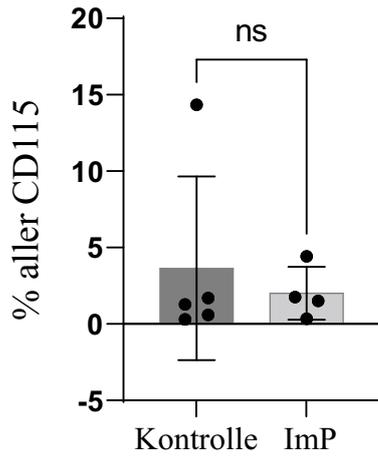
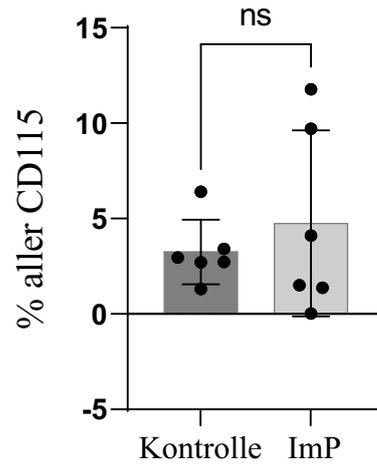
**Abbildung 28:** Analyse des Milzgewebes auf Ly6C<sup>hi</sup>. In (A) zeigt sich in der carotisverletzten Gruppe (CI) keine signifikante Differenz im Anteil der Ly6C<sup>hi</sup>. (B) zeigt ebenso keine signifikante Differenz im Anteil der Ly6C<sup>hi</sup> nach Schein-OP.

**Abbildung 29** zeigt die anteiligen Verhältnisse der Ly6C<sup>low</sup> in der Milz. In der Gruppe der gefäßverletzten Mäuse ist ein klarer Trend zu erkennen, dass im Verhältnis zur Kontrollgruppe, die mit ImP behandelte Gruppe einen höheren Ly6C<sup>low</sup> Anteil aufweist. In der Gruppe der Schein-OP Mäuse zeigt sich ein signifikanter Unterschied, hier ist der Anteil der Ly6C<sup>low</sup> in der mit ImP behandelten Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe.

**A**Ly6C<sup>low</sup> CI-Milz**B**Ly6C<sup>low</sup> Schein-OP Milz

**Abbildung 29: Analyse des Milzgewebes auf Ly6C<sup>low</sup>** In (A) zeigt sich in der carotisverletzten Gruppe (CI) keine signifikante Differenz im Anteil der Ly6C<sup>low</sup>. (B) zeigt einen signifikant höheren Anteil an Ly6C<sup>low</sup> Monozyten in der mit ImP behandelten Gruppe nach Schein-OP.

Die Ly6C-negativen Monozyten der Milz sind in **Abbildung 30** zu sehen. Hier zeigen sich sowohl in der gefäßverletzten Gruppe als auch der Schein-OP Gruppe keine signifikanten Veränderungen in den Anteilen der Ly6C-Negativen an den CD115 positiven Zellen.

**A**Ly6C<sup>neg</sup> CI-Milz**B**Ly6C<sup>neg</sup> Schein-OP Milz

**Abbildung 30: Analyse des Milzgewebes auf Ly6C<sup>neg</sup>** In (A) zeigt sich in der carotisverletzten Gruppe (CI) keine signifikante Differenz im Anteil der Ly6C<sup>neg</sup>. (B) zeigt ebenso keine signifikante Differenz im Anteil der der Ly6C<sup>neg</sup> nach Schein-OP.

## 4. Diskussion

In dieser Dissertationsarbeit wurde erstmalig im Rahmen einer klinischen Studie die Assoziation zwischen den Plasma Spiegeln des Imidazol-Propionats und der koronaren Herzkrankheit von Patient:innen untersucht. Zudem wurde der Einfluss des Darm-Mikrobiom Metaboliten Imidazol-Propionats auf die Immunzellendifferenzierung sowie der koronaren Herzkrankheit am Tiermodell untersucht.

Das Darm-Mikrobiom rückte in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen. Immer wieder werden Korrelationen von gewissen Metaboliten des Mikrobioms mit Erkrankungen des Herz- Kreislaufsystems gefunden, das Potential des vergleichsweise noch wenig untersuchten Darm-Mikrobioms ist hier sehr groß.

Imidazol-Propionat stellt hier eine besondere Rolle dar, als ein noch wenig untersuchter Metabolit sind bereits jetzt schon Korrelationen zu anderen systemischen Erkrankungen wie Diabetes Mellitus Typ 2 bekannt (3, 4). Nicht nur erhöhte ImP-Konzentrationen wurden bei vorhandenem Diabetes Typ 2 im Plasma von Patient:innen gefunden, es wurde auch ein wesentlicher Einfluss auf die Pathogenese auf Ebene der Signaltransduktion gefunden (4). Auch ein Zusammenhang zwischen ImP und kardiovaskulären Risikofaktoren wie insbesondere dem diastolischen Blutdruck wurde bereits nachgewiesen (87).

Diese Ergebnisse zeigen, dass das ImP in der Lage ist, kausal Einfluss auf Signaltransduktionen, aber auch kardiovaskulären Risikofaktoren zu nehmen und zeigen, dass ImP und dessen Rolle noch bei weitem nicht vollständig verstanden ist.

Eine wissenschaftliche Untersuchung eines kausalen Zusammenhangs zwischen ImP und kardiovaskulären Erkrankungen wie der KHK ist demnach nicht nur naheliegend sondern notwendig. Schließlich sind noch keine konkreten Zusammenhänge zwischen ImP und der Immunzellendifferenzierung, die zu atherosklerotischen Umbauten führen, bekannt.

#### 4.1 Diskussion der klinischen Studie

##### **Gibt es bei Patient:innen mit koronarer Herzkrankheit einen signifikanten Anstieg des Plasma ImP-Spiegels?**

Die koronare Herzkrankheit lässt sich nach klinischem Verlauf oder Gefäßbeteiligung einteilen. Sie kann sich je nach Verlauf durch unterschiedliche Symptomkonstellationen manifestieren, hier unterteilen die ESC-Guidelines in das Akute Koronarsyndrom, sowie das Chronische Koronarsyndrom (97). Abseits der klinischen Präsentation der Patient:innen, kann die Schwere der KHK aber auch am Ausmaß der atherosklerotischen Gefäßbeteiligung festgemacht werden (97). So unterscheidet man anhand der Anzahl der betroffenen Gefäße in Ein-, Zwei- und Drei-Gefäß KHK (97).

In der klinischen Studie konnte erstmalig an Patient:innen die interventionell eine bestätigte KHK von über 50% Stenosierung haben, eine Korrelation mit ImP gezeigt werden. So zeigte sich, dass Patient:innen mit KHK einen signifikant höheren Plasma-ImP-Spiegel aufwiesen als Patient:innen, bei denen eine KHK kathetergestützt ausgeschlossen werden konnte.

Dies zeigt, dass offensichtlich eine signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten einer KHK und dem Metaboliten ImP besteht. Zur Beantwortung der Frage, ob ImP nun auf Grund der KHK erhöht und damit nur eine indirekte Korrelation hat, oder ob es neben weiteren Risikofaktoren ein kausaler Faktor im Prozess der KHK-Entwicklung darstellt und damit pathophysiologische Relevanz hat, wurde dies im weiteren Verlauf im Tierexperiment untersucht.

#### 4.2 Diskussion der Experimente mit Imidazol-Propionat

In dieser Arbeit wurde erstmalig der Einfluss des ImP auf die Immunzellendifferenzierung mit Fokus der Immunzellen in Zusammenhang mit der Atherosklerose untersucht.

Atherosklerose ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Arterienwand und die Hauptursache für Herz-Kreislauf-Erkrankungen (49). Verschiedene Ansätze in der Vergangenheit wie in-vivo Bildgebung, Studien mit Knock-Out-Mäusen, Zelllinienverfolgung aber auch klinisch interventionelle Studien haben die Aufmerksamkeit auf die Rolle von T-

Zellen als kritische Treiber und Modifikatoren der Pathogenese der Atherosklerose gelenkt (49).

Diese können sowohl pro- als auch anti-atherogenen Einfluss nehmen. So ist bereits bekannt, dass Th1 Zellen pro-atherogene und T-regulatorische Zellen anti-atherogene Rollen in diesem Prozess einnehmen können (20, 49, 51). Dennoch wurde immer wieder eine Form des Wirkungsdualismus beobachtet, manche T-Zellen haben hiernach gegenteilige Effekte, so können die bereits erwähnten T-regulatorischen und Th17 Zellen sowohl pro-atherogene, als auch anti-atherogene Effekte bewirken (49).

Einen ähnlichen Wirkungsdualismus zeigen CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Auf der einen Seite bewirken diese eine inflammatorische Antwort und ihre Zytotoxizität greift auch Plaque-stabilisierende Zellen wie Endothelzellen an, was eine Progression und zunehmende Instabilität des atherosklerotischen Läsionsort zur Folge hat (98), auf der anderen Seite kann die zytotoxische Aktivität gegen Antigen präsentierenden Zellen sowie der Präsenz von regulatorischen CD8<sup>+</sup> Zellen die Inflammation dämpfen und damit die atherogenen Prozesse limitieren (98). Auch hier ist demnach eine Differenzierung in Subtypen vonnöten.

Basierend auf den bisherigen Ergebnissen zu ImP und dessen Einflussnahme auf kardiovaskuläre Risikofaktoren und Diabetes Mellitus Typ 2 stellen wir die Arbeitshypothese auf, dass ImP aktiv zu einer Immunzellendifferenzierung von anti-atherogenen hin zu pro-atherogenen Immunzellen führt. Hierfür haben wir bereits bekannte und noch diskutabile pro-atherogen wirkende Immunzellen nach Behandlung mit ImP untersucht.

### **Welche inflammatorischen Prozesse werden durch ImP aktiviert? Führt dieser Metabolit zu Veränderungen der Monozyten-Homöostase (Effekt auf Ly6C<sup>low</sup>/ Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten)?**

Monozyten sind Vorläufer der gewebständigen Makrophagen und können in ihrem Einfluss auf die Atherosklerose durch den Oberflächenmarker Ly6C differenziert werden (37, 38). So ist die sehr differente Wirkung in Abhängigkeit des Marker Ly6C auf Monozyten bereits gut beschrieben (39, 40). Monozyten, die eine erhöhte Expression des Ly6C Oberflächenmarkers besitzen, werden als Ly6C<sup>hi</sup> bezeichnet und begünstigen den inflammatorischen Prozess,

wohingegen Monozyten mit einer geringen Expression, die Ly6C<sup>low</sup>, einen gegenteilig protektiv-regenerativen Effekt besitzen (37, 38).

Im Experiment wurden diese Monozyten ebenso in Ly6C<sup>hi</sup> und Ly6C<sup>low</sup> differenziert, um einen Einblick in die gegensätzliche Wirkung und eine mögliche Dysbalance der Homöostase dieser Monozyten Subtypen zu untersuchen. Hierbei wurde das Knochenmark als Syntheseort der Monozyten sowie die Milz als lymphatisches Organ untersucht.

### **Monozyten im Knochenmark**

Im Knochenmark zeigte sich im Experiment bei den Monozyten mit keiner oder einer geringen Expression des Ly6C Oberflächenmarkers, den so genannten Ly6C<sup>neg</sup> beziehungsweise Ly6C<sup>low</sup>, keine signifikante Differenz im Anteil dieser zwischen der Kontrollgruppe und der behandelten Gruppe im Modell der carotisverletzten Maus. Ebenfalls zeigte sich bei den mit ImP behandelten Mäusen, kein signifikanter Unterschied zwischen den Monozyten Subtypen im Vergleich zur unbehandelten Gruppe.

Ebenso zeigte sich in der Gruppe der Schein-OP Mäuse keine signifikante Differenz im Anteil der Ly6C<sup>neg</sup> beziehungsweise Ly6C<sup>low</sup> an der Gesamtzahl der CD115 positiven Zellen im Knochenmark.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass ImP in der Differenzierung und Synthese der Monozyten, die im Knochenmark stattfindet (32), keinen relevanten Einfluss hat.

Die Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten präsentierten sich in der carotisverletzten Mausgruppe nicht signifikant. Diese Differenz war hingegen in der Schein OP-Gruppe signifikant. Hier zeigte sich, dass die mit ImP behandelte Gruppe einen signifikant geringeren Anteil Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten im Knochenmark im Vergleich zur unbehandelten Gruppe besaß.

Betrachten wir die Homöostase, d.h. die Balance zwischen Monozyten mit hohem und niedrigem Ly6C Oberflächenmarker Besatz, fällt auf, dass in der Schein-OP Gruppe die Mäuse mit ImP Behandlung höhere Anteile an Ly6C<sup>neg</sup> und Ly6C<sup>low</sup> besitzen.

## **Monozyten in der Milz**

In der Milz zeigten sich in der Gruppe der carotisverletzten Mäuse keine signifikanten Unterschiede in den Anteilen der Ly6C<sup>neg</sup> und Ly6C<sup>low</sup> Monozyten zwischen behandelter und unbehandelter Gruppe.

In der Gruppe der Schein-OP Mäuse jedoch wurde eine deutliche Signifikanz bei den Ly6C<sup>low</sup> Monozyten erreicht, hier wurde ein höherer Anteil an Monozyten mit geringem Ly6C Marker-Anteil auf Seiten der mit ImP behandelten Mäuse ersichtlich.

Die Ly6C<sup>neg</sup> Zellen stellten sich hingegen als nicht signifikanter Differenz zwischen Behandlung und Nicht-Behandlung mit ImP heraus.

Ein Blick auf die Ly6C<sup>hi</sup> Populationen zeigte keine Signifikanz zwischen behandelter und unbehandelter Mausgruppe. Dies war sowohl in der Gruppe der carotisverletzten sowie der Schein-OP Gruppe der Fall und deckt sich ebenso mit der Beobachtung im Knochenmark, dass ImP aller Voraussicht nach keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation von Monozyten mit hohem Ly6C Oberflächenmarker-Besatz hat.

### **Zusammenfassung: Monozyten**

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen keinen direkten Zusammenhang der Monozyten Population und dem Metaboliten ImP. Demnach hat das ImP keinen Einfluss auf die Proliferation oder Rekrutierung von Monozyten der hier untersuchten Subtypen Ly6C<sup>hi</sup>, Ly6C<sup>neg</sup> und Ly6C<sup>low</sup>.

**Stellt ImP ein Modulator zur Immunzellendifferenzierung pro-atherogener T-Zellen dar?  
Gibt es in der Maus unter Behandlung mit ImP einen Shift zu pro-atherogenen T-Helferzellen des Typ 1 oder Typ 17 im Vergleich zur unbehandelten Gruppe?**

## **CD4+ T-Helferzellen im Blut**

Im Mausexperiment zeigt der Blick auf den Gesamtanteil der CD4+ T-Helferzellen einen signifikanten Shift zwischen behandelter und unbehandelter Mausgruppe. So zeigte sich, dass in der Gruppe der carotisverletzten Tiere mit ImP Behandlung eine signifikante Erhöhung des

CD4+ T-Helferzellen-Anteils, im Blut, im Vergleich zur unbehandelten Gruppe bestand. Diese signifikante Differenz ist bei der Gruppe, die eine Schein-OP erhalten haben, nicht im Blut zu beobachten.

Dieses Ergebnis zeigt, dass es eine signifikant erhöhte Rekrutierung von CD4+ Helferzellen unter ImP im Blut gibt. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass ImP in der Gruppe der bereits Endothel-verletzten Mäuse einen signifikanten Einfluss auf die Modulation der T-Helferzellen besitzt. So ist es denkbar, dass ImP die inflammatorischen Prozesse und somit die Rekrutierung von T-Zellen begünstigt. Um jedoch genauer beurteilen zu können, ob es sich hierbei um einen pro- oder anti-inflammatorischen Effekt handelt, ist die genauere Betrachtung der Subpopulationen vonnöten.

### **Th1-Zellen im Blut**

T-Helferzellen des Typ 1 erkennen LDL als Antigen und produzieren proinflammatorische Zytokine und Mediatoren wie Interferon- $\gamma$  und Tumor Nekrosefaktor (20, 99).

Diese inflammatorischen Mediatoren produzieren in den atherosklerotischen Arterienwänden unter anderem IL-6, welches die Aktivierung von Akute Phase Proteinen in der Leber triggert und die Freisetzung des C-reaktiven Proteins (CRP) im systemischen Kreislauf fördert (20, 100). Unter anderem deshalb sind Th1 Zellen als pro-atherogen anzusehen (20).

Bei Betrachtung des ersten Subtyps im Blut, den pro-atherogenen Th1-Zellen, zeigte sich in der Gruppe der Carotisverletzten eine signifikante Erhöhung des Th1-Zellanteils an der Gesamt-CD4+-T-Helferpopulation auf Seiten der nicht mit ImP behandelten Mausgruppe. Eine umgekehrte Signifikanz zeigte sich in der Schein-OP Gruppe, hier ist der Anteil der Th1-Zellen nach ImP Behandlung im Blut signifikant erhöht.

Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist, dass aufgrund der Gefäßläsion der größte Anteil der Th1-Zellen bereits in das lädierte Gewebe und Gefäß eingewandert ist und somit die relative Population in der Milz und im Blut erniedrigt ist. Unter Bedingungen ohne Gefäßverletzung erscheint das ImP die Differenzierung zu Th1-Zellen deutlich zu fördern.

Diese vermehrte Einwanderung in die Läsion könnte ein Erklärungsansatz sein, weshalb freimessbare Th1-Zellen im Blut der ImP behandelten Mäuse erniedrigt sind. Die signifikante Verminderung des Th1-Anteils im Blut der behandelten Mäuse könnte sogar ein Hinweis für eine vermehrte Infiltration der pro-atherogenen Th1 Zellen und damit einen verstärkenden Effekt auf die Gefäßläsion als in der nicht-behandelten Mausgruppe sein. Diese These wird mit Blick auf die Gruppe der Schein-OP Mäuse gestützt. So ist in dieser Gruppe kein Läsionsort vorhanden, der Anteil der Th1 Zellen nach ImP Behandlung ist jedoch signifikant im Blut erhöht. Dies zeugt davon, dass das physiologische Maß an Th1 Zellen, wie sie in der Kontrollgruppe zu sehen ist, allein durch die Behandlung mit ImP signifikant überstiegen wird.

### **Th17-Zellen im Blut**

Th17-Zellen werden durch IL-23 aktiviert und IL-17 ist ihr charakteristisches Zytokin (49, 101). Experimentelle Studien führten zu unterschiedlichen Ergebnissen zu der Wirkung von IL-17 auf den Progress der Atherosklerose, einige wiesen darauf hin, dass IL-17 pro-atherogen ist, andere fanden atheroprotektive Eigenschaften, wieder andere Studien legten nahe, dass IL-17 keine Wirkung auf die Atherosklerose hat (49). Diese Kontroverse sorgt dafür, dass zum derzeitigen Stand eine klare Zuordnung der Th17-Zellen schwierig ist.

Im Experiment zeigten sich im Blut der carotisverletzten Tiere keine signifikanten Unterschiede im Anteil der Th17-Zellen zwischen mit ImP behandelten und unbehandelten Mäusen. Lediglich ein Trend ließ sich in der unbehandelten Gruppe erkennen, hier war der Anteil der Th17-Zellen im Blut höher als im Blut der mit ImP behandelten Tiere. Auch in der Gruppe der Schein-OP Mäuse konnte keine signifikante Immunzellendifferenzierung zwischen behandelten und unbehandelten Mäusen festgestellt werden.

Es ist immer noch nicht abschließend geklärt, ob Th17-Zellen durch ihre Plaque-stabilisierende Wirkung atheroprotektiv oder durch ihre proinflammatorischen Eigenschaften pro-atherogen wirken (49). Die Ergebnisse des Experimentes zeigen jedoch, dass ImP keinen signifikanten Einfluss auf die Immunzellendifferenzierung der Th17 Zellen im Blut hat.

## **CD4+ T-Helferzellen in der Milz**

Die Milz als lymphatisches Organ besitzt die sogenannte rote und weiße Pulpa. In der weißen Pulpa formen sich um Arteriolen Lymphozyten, dies wird als Periarteriöläre Lymphatische Scheide, kurz PALS, bezeichnet (102). CD4+ T-Helferzellen sind ebenso in der PALS zu finden, hier helfen sie B-Zellen in den Follikeln bei der Produktion hochaffiner Antikörper durch Zytokinproduktion und Co-Stimulation (102). Demnach hat die Milz als lymphatisches Organ samt seiner Immunzellen in seiner PALS auch Einfluss auf die systemische Inflammation durch Zytokine und Interaktion mit B-Zellen (102).

Im Tierexperiment zeigte sich ein signifikant höherer Anteil an CD4+ T-Zellen in der Milz bei der Gruppe der carotisverletzten Tiere ohne ImP Behandlung, gesehen am Gesamtanteil aller Lymphozyten. Einen solchen signifikanten Unterschied zeigte sich in der Gruppe der Schein-OP hingegen nicht. Hier lässt sich keine Signifikanz zwischen behandelter und unbehandelter Gruppe in der Milz erkennen.

Eine Erklärung für dieses Ergebnis könnte ebenfalls sein, dass die relative Anzahl der CD4+ T-Zellen in der carotisverletzten Maus in der Peripherie, in diesem Fall der Milz, erniedrigt ist, da ein Großteil der CD4+ T-Zellen im Läsionsort, offenbar beeinflusst durch ImP, eingewandert sind. Möglich wäre auch, dass ImP die Wahrscheinlichkeit der Diapedese von T-Zellen im Läsionsort erhöht, was eine Förderung der Progression der Plaquebildung zur Folge hätte.

## **Th1-Zellen in der Milz**

Bei Differenzierung der CD4+ T-Zellen in ihre Subtypen, fällt im Experiment auf, dass die Th1 Zellen, ebenso wie der Gesamtanteil der CD4+ T-Zellen, in der Milz bei den carotisverletzten Tieren signifikant geringer in der Gruppe der ImP behandelten ist als in der unbehandelten Gruppe.

Es wäre möglich, dass ImP in der verletzten Maus im Läsionsort die Rekrutierung von Th1 Zellen erhöht. Dies könnte den signifikant verringerten Anteil der Th1 Zellen in der Milz im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe erklären. Da Th1 Zellen eine pro-atherogene Wirkung besitzen, würde eine tatsächliche Einwanderung in den Läsionsort des geschädigten

Blutgefäßes, welches im Einklang mit der relativen Erniedrigung des Th1-Zell Anteils in der Peripherie steht, einen atherosklerotischen Umbau fördern (20).

In der Gruppe der Schein-OP Mäuse zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Th1-Zellen in der Milz in der Gruppe der mit ImP behandelten Mäuse in Relation zum Gesamtanteil aller CD4+ T-Zellen.

Möglicherweise rekrutiert ImP so vermehrt Th1 Zellen, die bei nicht vorhandener Läsion, wie in dieser Schein-OP Gruppe, keinen Einwanderungsort haben und demnach ein erhöhter relativer Anteil frei in der Peripherie, wie der Milz, nachweisbar ist.

### **Th17-Zellen in der Milz**

Im Experiment wurden keine signifikanten Unterschiede im Anteil der Th17 Zellen im Milzgewebe in der Gruppe der carotisverletzten Tiere sichtbar. Der Anteil der Th17-Zellen an der Gesamtzahl der CD4+ Zellen war bei behandelten wie unbehandelten Tieren annähernd identisch. Ebenso verhielt es sich bei den Mäusen der Schein OP. Auch hier gab es keine signifikanten Unterschiede am Th17 Anteil in der Milz.

Es lässt daher den Rückschluss zu, dass ähnlich wie im Blut, ImP keinen relevanten Einfluss auf die Immunzellendifferenzierung der Th17-Zellen hat und dies die annähernd gleichen Zahlen dieses Subtyps im Vergleich zur Kontrollgruppe auch in der Milz erklärt.

### **Zusammenfassung: T-Helferzellen**

Erstmals zeigt diese Arbeit ein Zusammenhang zwischen ImP und CD4+ Helferzellen. Mäuse, die eine durch Verletzung der Carotis simulierte, endotheliale Dysfunktion erhalten haben, besitzen einen signifikant höheren Anteil an CD4+ Zellen gemessen an der Gesamtzahl aller Lymphozyten, wenn sie mit ImP behandelt wurden. Dies zeigte sich ebenso signifikant im Blut, als auch im Milzgewebe. Dies könnten darauf hindeuten, dass Mäuse die ImP erhalten und gleichzeitig einen Läsionsort besitzen, signifikant mehr T-Helferzellen dieses Typs rekrutieren. Am Gesamtanteil der CD4+ Zellen lässt sich jedoch noch kein Rückschluss über pro- oder anti-atherogene Effekte ziehen. Hierfür wurde sich in dieser Arbeit mit den beiden Subtypen, den Th1 und Th17 Zellen befasst.

In der Untersuchung der Th17 Zellen, deren Rolle in der Atherosklerose bis zum heutigen Stand noch nicht gänzlich geklärt ist, zeigte sich keine signifikante Differenz zwischen ImP behandelter und unbehandelter Mäuse. Hier ist von keinem signifikanten Effekt von ImP auf diesen T-Helferzell-Subtyp auszugehen.

Mit Blick auf die Th1 Zellen, die bereits hinlänglich als pro-atherogen beschrieben sind, zeigten sich signifikante Änderungen am Anteil zwischen den behandelten und unbehandelten Mäusen (20, 49, 51). In den Gruppen der Tiere, die einen Läsionsort zugefügt bekamen, zeigte sich eine signifikante Verminderung der Anteile an Th1 Zellen in der Peripherie, also dem Blut und der Milz. Dies legt die Vermutung nahe, dass es hier bedingt durch ImP bedeutend häufiger zur Einwanderung pro-atherogener Th1 Zellen in den Läsionsort kam. Dieses Ergebnis wird mit Blick auf die Schein-OP Mausgruppe, ohne Läsionsort, bestärkt. Hier zeigte sich, dass der Anteil der Th1 Zellen im Blut und der Milz nach ImP Behandlung signifikant höher ist als in der Kontrollgruppe. Es scheint, dass ImP Th1 Zellen rekrutiert und im Falle einer Läsion möglicherweise auch die Diapedese fördert.

**Wird auch die atheroprotektive Immunzellendifferenzierung durch ImP moduliert? Beeinflusst die Behandlung von ImP die Homöostase der atheroprotektiven T-regulatorischen Zellen?**

### **T-regulatorische Zellen im Blut**

T-regulatorische Zellen nehmen überwiegend eine atheroprotektive Rolle in der Modulation der Entzündungsreaktion ein, zudem lassen sie sich eindeutig durch den Marker FOXP3 zuverlässig identifizieren (49). Insbesondere die Sekretion von IL-10 durch Tregs zeigte in Studien eine entzündungshemmende und damit, in Bezug auf die Progression der Atherosklerose, protektive Wirkung (49).

Das durchgeführte Experiment zeigte im Blut der Gruppe der Carotisverletzten keine signifikanten Unterschiede der Anteile an T-regulatorischen Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl CD4<sup>+</sup>-Zellen. Einen ebenso nicht signifikanten Unterschied lässt sich in der Gruppe der Schein-OP Mäusen erkennen, auch hier gab es keine relevanten Veränderungen von T-regs im Blut zwischen mit ImP behandelten und unbehandelten Mäusen. Insbesondere

dadurch, dass sich auch kein insignifikanter Trend erkennen lässt, scheint es, als nehme ImP keinerlei Einfluss auf die Differenzierung und Population der T-regs im Blut.

### **T-regulatorische Zellen in der Milz**

In der Milz zeigte sich experimentell kein signifikanter Unterschied in der Gruppe der carotisverletzten Tiere im Anteil der Treg-Zellen. In der behandelten als auch in der unbehandelten Gruppe gab es einen annähernd gleichen Anteil an T-regulatorischen Zellen gemessen an der Gesamtzahl aller CD4+ Zellen.

Offensichtlich scheint ImP keine Rolle bei Mäusen, die eine Verletzung des Gefäßes erlitten haben, in der Rekrutierung oder Suppression der T-reg Zellen in der Milz zu spielen.

In der Schein-OP Gruppe wurde eine signifikante Differenz zwischen nicht-behandelter und behandelter Gruppe im Anteil der Tregs deutlich. Hier zeigte sich, dass nach ImP Behandlung die Mäuse einen signifikant höheren Anteil an Tregs im Milzgewebe aufweisen.

Ein möglicher Erklärungsansatz wäre, da ImP bereits bei den Th1 Zellen eine deutliche und signifikante Erhöhung in der Milz gezeigt hat, die signifikante Erhöhung der Tregs eine modulierende Gegenreaktion darstellt. Da es in den anderen Auswertungen keine Hinweise auf einen direkten Einfluss des ImP auf Tregs gab, könnte die hier stattfindende signifikante Erhöhung ein Hinweis auf eine Gegenregulation der Th1 Zellerhöhung sein, die es in der Kontrollgruppe nicht gab.

#### **Zusammenfassung: T-regulatorischen Zellen**

Diese Arbeit zeigte, dass ImP keine signifikanten Einflüsse auf den Anteil der Tregs im Blut hat. In keiner Mausgruppe konnten hier signifikante Differenzen im Anteil der Tregs im Blut festgestellt werden, sodass davon auszugehen ist, dass ImP keine entscheidende Rolle in der Immunzellendifferenzierung dieser Zellen im Blut spielt.

In der Milz zeigte sich ebenso bei der carotisverletzten Mausgruppe keine signifikante Differenz im Anteil der Tregs an der Gesamtzahl der CD4+ Zellen. Lediglich in der Schein-OP Gruppe konnte ein signifikant erhöhter Anteil an Tregs im Milzgewebe der ImP behandelten Mäuse gefunden werden. Da bei allen vorherigen Mausgruppen, auch mit Blick auf die

Untersuchung des Blutes, keine Einflüsse von ImP an der Proliferation von Tregs festgestellt werden konnte, ist davon auszugehen, dass auch hier nicht das ImP die direkte Kausalität dafür darstellt. Vielmehr könnte der erhöhte Anteil an Tregs in dieser Mausgruppe eine Form der modulierenden Gegenreaktion des Organismus darstellen, da in dieser Gruppe zuvor schon signifikant höhere Th1, also entzündungsfördernde T-Helferzellen, gefunden worden sind.

**Wird das Läsionsgeschehen durch eine erhöhte Anzahl CD8-positiver T-zellen verstärkt? Ist die Anzahl der zytotoxischen TC1- und TC17-Zellen in der mit ImP behandelten Mausgruppe, die der Unbehandelten überlegen?**

Zytotoxische T-Zellen können in diverse Subtypen differenziert werden. In dieser Arbeit wurden die TC1 und TC17 Zellen im Mausmodell untersucht. Die Differenzierung von naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen in TC1 unterliegt verschiedenen Zytokinen wie IL-12 und IL-2 (73, 74). Wichtig ist die genauere Betrachtung der Sezernierung von Zytokinen aus TC1 Zellen, hier wurde gezeigt, dass diese insbesondere Tumornekrosefaktor- $\alpha$  sowie Interferon- $\gamma$  sezernieren (65, 73).

Durch diese inflammatorischen Zytokine tragen insbesondere in der Akutphase die TC1 Zellen zum anfänglichen Progress der Inflammation bei Atherosklerose bei (73).

Die TC17-Zellen produzieren insbesondere das Zytokin IL-17 welches durchaus nachgewiesenermaßen entzündungsfördernde Eigenschaften besitzt (73). Anders als bei den TC1 Zellen und ihren Zytokinen ist bei den TC17 jedoch zum derzeitigen Stand noch kein direkter Effekt auf die Atherosklerose bekannt (73).

### **Zytotoxische T-Zellen im Blut**

Im Experiment konnte in der Gruppe der carotisverletzten Mäuse ein signifikant höherer Anteil an TC1 Zellen im Blut auf Seiten der unbehandelten Mäuse gezeigt werden. Die Mäuse, die mit ImP behandelt wurden, hatten nicht nur einen signifikant niedrigeren Anteil an TC1 Zellen im Blut, dieser Anteil lag sogar im Mittel nur knapp über 0%, gemessen an der Gesamtzahl aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Blut.

Ein ähnliches Bild zeigte sich auch, wie zuvor beschrieben, bei den Th1-Zellen, die ebenfalls Tumornekrosefaktor- $\alpha$  sowie Interferon- $\gamma$  sezernieren, sodass offensichtlich insbesondere Zellen dieses Zytokin-Typs von ImP beeinflusst werden. Da eine schnelle Einwanderung aus

dem Blut zum Läsionsort für diesen Zelltyp typisch ist, ist eine fördernde Wirkung auf die Diapedese von inflammatorischen und der Atherosklerose begünstigende Zellen durch ImP denkbar. Es scheint, als würde ImP bei vorhandener endothelialer Verletzung die Einwanderung atherogener Immunzellen, wie den TC1 Zellen fördern.

In der Gruppe der Schein-OP Mäuse zeigt sich daher ein genau umgekehrtes Bild. Hier ist der Anteil der TC1 Zellen im Blut der ImP behandelten Mäuse signifikant höher als bei den Mäusen ohne Behandlung. Wie bei den Th1 Zellen, die ein ähnliches Verteilungs- und Anteilsmuster im Blut aufwiesen, legt es die Vermutung nahe, dass die TC1 Zellen ohne vorhandene endotheliale Dysfunktion keinen Ort der Infiltration haben und damit vermehrt im Blut zirkulieren.

Bei Abwesenheit dieser Läsion gibt es jedoch signifikant höhere TC1-Zellanteile in der ImP behandelten Maus als in der Kontrollgruppe, hiernach scheint ImP nicht nur die Diapedese der Zellen, wie zuvor in der carotisverletzten Gruppe beobachtet, zu fördern, sondern auch die Proliferation und damit Erhöhung der atherogenen TC1 Zellen am Gesamtanteil der CD8-Zellen.

In der Untersuchung der TC17 Zellen im Blut zeigten sich in der Gruppe der carotisverletzten Tiere keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelter und unbehandelter Kontrollgruppe am Gesamtanteil der CD8+-Zellen. Lediglich ein Trend ist hier zu finden, indem der Anteil der TC17 Zellen in der unbehandelten Gruppe höher ist als in der mit ImP behandelten. Ein ähnliches Bild zeigte sich in der Schein-OP Gruppe. Auch hier gibt es nur eine insignifikante Erhöhung der TC17 Zellen in der unbehandelten Mausgruppe im Vergleich zur mit ImP behandelten Gruppe. ImP scheint keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation und die Verteilung der TC17 Zellen im Blut zu nehmen.

### **Zytotoxische T-Zellen in der Milz**

In der Milz wurde in der Gruppe der carotisverletzten Mäuse, ebenso wie im Blut, ein signifikant höherer Anteil an TC1 Zellen bei den unbehandelten Mäusen ersichtlich. Gemessen am Gesamtanteil aller CD8+Zellen sind somit in der Milz mehr TC1 Zellen ohne ImP Behandlung. Dieses Ergebnis lässt sich auf die bereits geäußerte These zurückführen, bei der eine erhöhte Einwanderung der TC1 Zellen am Ort der Läsion zu einer verminderten Anzahl

der TC1 Zellen in der Peripherie führt. Die Ergebnisse innerhalb des Milzgewebes stützen diese Vermutung.

So auch das gegenteilige Ergebnis der Schein-OP Gruppe, durch die Förderung der Proliferation der TC1 Zellen durch ImP findet sich hier ein signifikant höherer Anteil in der Gruppe der behandelten Mäuse im Milzgewebe. Da jedoch kein Läsionsort vorhanden ist, findet keine Diapedese statt und die Zellen finden sich vermehrt in der Peripherie wie hier der Milz.

Bei den TC17 Zellen konnte keine Signifikanz in der carotisverletzten Gruppe zwischen Behandlung versus unbehandelt erreicht werden. So zeigten sich hier im Milzgewebe keine signifikanten Unterschiede am Anteil der TC17 Zellen.

Anders scheint dies bei der Schein-OP Gruppe zu sein, hier wurde eine signifikante Erhöhung des TC17 Zellanteils in der unbehandelten Gruppe ersichtlich.

Möglicherweise liegt der niedrigere Anteil der TC17 Zellen in der ImP Gruppe darin begründet, dass es prozentual an der Gesamt-CD8-Zellzahl einen höheren TC1 Zellanteil in dieser Gruppe gibt, der den relativen Anteil der TC17 Zellen erniedrigt. Somit wäre diese Signifikanz kein Ausdruck eines direkten Einflusses von ImP auf die TC17 Population, worauf es auch bei den vorherigen Ergebnissen keinen Hinweis gibt, sondern lediglich eine sich statistisch ergebene Konsequenz.

#### **Zusammenfassung: Zytotoxische T-Zellen**

Diese Arbeit untersuchte erstmalig den Zusammenhang von ImP und zytotoxischen T-Zellen, mit Blick auf die Subtypen TC1 und TC17.

Es gab keinen Hinweis darauf, dass ImP die zytotoxischen T-Zellen des Typs TC17 in ihrer Proliferation oder Diapedese beeinflusst. Hier ist nicht von einem Zusammenhang zwischen dem Metaboliten und den TC17 Zellen auszugehen.

Ähnlich wie bei den Th1 Zellen, konnte auch bei den TC1 eine signifikante Reduzierung des Anteils in den Mäusen mit Läsionsort und ImP Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Gruppe gezeigt werden. Dieses Ergebnis zeigte sich sowohl im Blut als auch im Milzgewebe. Genau entgegengesetzt sah dies bei der Schein-OP Gruppe aus. Hier zeigte sich nach ImP

Behandlung ein signifikant höherer Anteil an TC1 Zellen. Die Differenzen sind zur jeweiligen unbehandelten Gruppe sehr deutlich ausgeprägt und lassen sich am ehesten wie folgt deuten. ImP scheint die Proliferation der TC1 Zellen besonders zu fördern, dies wird in der Gruppe ohne Läsionsort deutlich. Hier gibt es keinen Ort der Einwanderung für diese Zellen, typischerweise infiltrieren TC1 Zellen mittels Diapedese bei endothelialer Dysfunktion und haben hierbei einen deutlich pro-atherogenen Effekt auf die Läsion (73). Hierdurch ist der Anteil der TC1 Zellen im Blut und der Milz signifikant bei den Mäusen erhöht, die mit ImP behandelt wurden.

In der Gruppe der Mäuse, die jedoch genau diesen Läsionsort chirurgisch zugefügt bekamen, zeigte sich eine signifikante Reduktion der TC1 Zellen in der Peripherie. Dies lässt den Rückschluss zu, dass ImP ebenso die Einwanderung der TC1 Zellen in den Läsionsort fördert.

Somit wirkt ImP über den Mechanismus der Zellproliferation sowie Diapedese, mit Blick auf den TC1 Subtyp, deutlich pro-atherogen.

#### 4.3 Methodendiskussion

In diesem Abschnitt erfolgt eine Diskussion der Methoden sowie Limitationen dieser Arbeit.

### **Klinische Studie**

#### **Kohorte**

Die Kohorte der klinischen Studie zeichnet sich zum einen durch ihre Quantität und durch ihre Qualität aus (88). Diese Kohorte hat zum Zeitpunkt der Intervention aktuelle koronarangiographische Ergebnisse erhalten, wobei die Mehrheit der Teilnehmenden eine bestätigte obstruktive koronare Herzkrankheit aufwies. Zudem gab es eine große Vergleichsgruppe, die interventionell bestätigt keine signifikant erkennbare koronare Herzkrankheit besitzt (88). Darüber hinaus wurde eine Vielzahl an klinischen Informationen, aber auch Lifestyle, Medikamente sowie ein ausführliches kardiovaskuläres Risikoprofil dieser Patient:innen erstellt (88). Eine Limitation der Patient:innenkohorte stellt der Rekrutierungsort dar. Es wurden ausschließlich Patient:innen aus der Universitätsmedizin der Charité Benjamin

Franklin rekrutiert. Zur Bestätigung der Ergebnisse bedarf es einer weiteren multizentrische Kohortenstudie (88).

## **Tierexperimente**

### **Verwendete Mäuse**

In dieser Arbeit wurden ausschließlich männliche C57BL/6N Mäuse verwendet. Es ist möglich, dass ImP einen, auf Grund der differenten geschlechtsspezifischen Charakteristika, anderen Effekt auf weibliche Tiere besitzt. Im Sinne des 3R Prinzips nahmen wir jedoch Abstand davon, beide Geschlechter zu untersuchen, da dies eine bedeutend höhere Anzahl an Tiere erfordert hätte.

### **Versuchsdurchführung**

Die Mäuse hatten jederzeit ad-libitum Zugang zum Trinkwasser sowie Futter. Das Trinkwasser wurde bei den behandelten Mäusen mit ImP angereichert. Eine Bilanzierung der ImP Aufnahme war durch das Ablesen der Trinkmenge nach 24h in Kombination mit der zuvor berechneten hinzugefügten ImP Konzentration möglich. Da jeweils 5 Tiere pro Käfig gehalten wurden, ist jedoch nur ein Mittelwert pro Tier errechenbar, somit könnten Tiere, die besonders wenig oder viel tranken, diesen Wert möglicherweise für einzelne Tiere verzerren.

Die standardisierten Bedingungen des Tierexperimentes wie die Haltung, Fütterung und Behandlung der Tiere, die dazu dient ausschließlich eine Variable, nämlich Behandlung und Nicht-Behandlung zuzulassen, ist in klinischen Studien nur bedingt reproduzierbar.

### **Immunzellfärbung und durchflusszytometrische Analyse**

Die Isolation der Zellen sowie die Färbung dieser erfolgte immer gekühlt unmittelbar im Anschluss der Zellgewinnung. Nach der Konservierung der gefärbten Zellen wurden diese spätestens bis 2 Tage nach Konservierung durchflusszytometrisch analysiert. Zudem wurden die Proben gekühlt sowie lichtgeschützt transportiert. Darüber hinaus wurden die Monozyten der Maus korrekterweise über CD115 und CD11b identifiziert und später in ihren Oberflächenmarkerbesatz unterteilt. Beim Menschen werden jedoch die Oberflächenmarker

CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> und CD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> zur Identifikation verwendet (33, 37, 38). Ergebnisse aus der Grundlagenforschung, die insbesondere am Tiermodell erhoben werden, können nie exakt auf den Menschen reproduziert werden.

Um eine klare Aussage über die Einwanderung der Immunzellen und deren Anzahl in die Endothelläsion zu treffen, wäre eine Isolation von Endothelzellen und Färbung sowie durchflusszytometrische Analyse sinnvoll, auch der Nachweis der Monozyten im Blut könnte neben der Milz als Peripherie und systemischen Einfluss von Interesse sein.

#### 4.4 Imidazol-Propionat im translationalen Kontext

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen überwiegend schädlichen Einfluss von ImP auf die koronare Herzkrankheit mit besonderem Blick auf die Pathogenese der Atherosklerose. Vergangene Untersuchungen stützen einen überwiegend gesundheitsschädlichen Einfluss von ImP auf den Organismus, so zeigten sich bereits höhere Exkretionen von ImP im Kot sowie Urin von Patient:innen mit intestinalen Erkrankungen, wohingegen bei Gesunden ImP nahezu gänzlich unnachweisbar in den Exkrementen war (3, 103). Dieses Ergebnis stützte das Konzept von ImP als mikrobiellen Metaboliten mit schädlichem Gesundheitseinfluss (3, 103). Koh et al. zeigte zudem deutlich höhere ImP Konzentrationen bei Patient:innen mit Typ 2 Diabetes Mellitus, unter anderem auch in portalem sowie peripheren Blut, was auch auf einen systemisch relevanten Einfluss des ImP hinweist (3).

Um die Produktion von Darmmikrobiom Metaboliten zu modifizieren ist ein genauerer Blick auf den metabolischen Stoffwechselweg zu werfen (3).

Wie zuvor beschrieben wird die Aminosäure Histidin zu Urocanat und Glutamat abgebaut, die Urocanat-Reduktase, die Urocanat zu Imidazol Propionat katalysiert, wurde hingegen erst kürzlich in *Shewanella oneidensis* entdeckt (3, 104). Es ist davon auszugehen, dass eine Veränderung der Darmumgebung aufgrund von Ernährungsumstellungen und einem veränderten Immunsystem zur Ausbreitung von Imidazolpropionat-produzierenden Bakterien beitragen können (3, 105). Da Urocanat als Elektronenakzeptor in Urocanat-Reduktase-haltigen Bakterien verwendet werden kann, kann der Abbau anderer üblicher Elektronenakzeptoren wie Fumarat, Eisenionen und Nitrat diesen Bakterien einen Wachstumsvorteil verleihen (3, 104). Da die Urocanat-Reduktase außerdem bei neutralem pH-Wert aktiv ist und der proximale

Dickdarm einen sauren pH-Wert aufweist, steigt der pH-Wert an, was möglicherweise auf eine verminderte Produktion kurzkettiger Fettsäuren und eine erhöhte Proteinferrmentation im Darm zurückzuführen ist, erhöht dies die Produktion von Imidazol Propionat (3, 104). Basierend auf diesen Erkenntnissen lässt sich sagen, dass ImP auch durch Ernährungsumstellungen modifizierbar zu sein scheint, jedoch auch viele andere Faktoren, die zu einem veränderten Immunsystem führen können. Hier ist noch weitere Forschung erforderlich, um herauszufinden, durch welche Mittel und Wege eine effektive Reduktion der ImP Produktion durch Nutrition zu erreichen ist.

## 5. Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurde erstmals der Einfluss des Imidazol Propionats als Darmmikrobiom-Metabolit auf die koronare Herzkrankheit untersucht.

Es konnte erstmals eine signifikante Korrelation zwischen ImP Plasma Spiegeln und einer Katheter gesicherten koronaren Herzkrankheit bei Patient:innen gezeigt werden. Auch unter Berücksichtigung klassischer kardiovaskulärer Risikofaktoren wie Bluthochdruck, Dyslipidämie, Diabetes und Rauchen zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen KHK und ImP.

Hieraus ergibt sich die Frage, ob diese Korrelation auch einen kausalen Zusammenhang mit der Pathogenese der KHK besitzt. Hierfür wurde erstmals der direkte Einfluss von ImP auf die Immunzellendifferenzierung der für die Pathogenese der Atherosklerose verantwortlichen Zellen untersucht. Es wurden im Mausexperiment Tiere mit ImP behandelt und einer Kontrollgruppe gegenübergestellt. Darüber hinaus wurden diese Tiere noch einmal in zwei Gruppen unterteilt, eine Gruppe erhielt eine chirurgisch durchgeführte Endothelläsion, die in der Pathogenese der Atherosklerose üblicherweise im frühen Stadium beteiligt ist. Die andere Gruppe unterzog sich zum Vergleich einer Schein-OP. Hierbei wurden signifikante Differenzen am Anteil der für die Atherosklerose kausal verantwortlichen Immunzellen zwischen der mit ImP behandelten und unbehandelten Gruppe erreicht. So zeigten sich unter anderem die bereits ausführlich proatherogen beschriebenen T-Helferzellen 1 in den Mäusen mit ImP Behandlung und Schein-OP deutlich und signifikant erhöht. Bei vorhandener Endothelläsion dreht sich dieses Bild und der Anteil der Th1 Zellen in den behandelten Mäusen wird signifikant geringer als in den Unbehandelten. Eine Erklärung für diesen Befund ist die vermehrte Einwanderung der Zellen

in den Läsionsort, was bedeuten würde, dass ImP nicht nur die Proliferation von pro-atherogenen Zellen fördert, sondern auch deren Diapedese.

Es erfordert noch weitere Forschung, um die Möglichkeiten der Modifikation des Darm-Mikrobioms mit dem Ziel der Senkung der ImP-Produktion zu untersuchen. So gibt es bereits jetzt schon Hinweise darauf, dass die Produktion von ImP durch angepasste Ernährung und den damit verbundenen Einfluss auf die Zusammensetzung der Darm-Bakterien verringert werden könnte (3).

Die hier erstmalig durchgeführten Untersuchungen des Metaboliten, sowie die erstmalige Klärung des Zusammenhangs zwischen KHK und ImP sowohl im Patient:innen als auch auf immunzellulärer Ebene, legen den Grundstein für weitere Forschung und mögliche klinische Translation zu neuen Darm-Mikrobiom basierten Konzepten zur Prävention und Therapie der KHK.

## Literaturverzeichnis

1. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, Feldstein AE, Britt EB, Fu X, Chung YM, Wu Y, Schauer P, Smith JD, Allayee H, Tang WH, DiDonato JA, Lusis AJ, Hazen SL. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*. 2011;472(7341):57-63.
2. Tang WHW, Li DY, Hazen SL. Dietary metabolism, the gut microbiome, and heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2019;16(3):137-54.
3. Koh A, Molinaro A, Stahlman M, Khan MT, Schmidt C, Manneras-Holm L, Wu H, Carreras A, Jeong H, Olofsson LE, Bergh PO, Gerdes V, Hartstra A, de Brauw M, Perkins R, Nieuwdorp M, Bergstrom G, Backhed F. Microbially Produced Imidazole Propionate Impairs Insulin Signaling through mTORC1. *Cell*. 2018;175(4):947-61 e17.
4. Molinaro A, Bel Lassen P, Henricsson M, Wu H, Adriouch S, Belda E, Chakaroun R, Nielsen T, Bergh PO, Rouault C, Andre S, Marquet F, Andreelli F, Salem JE, Assmann K, Bastard JP, Forslund S, Le Chatelier E, Falony G, Pons N, Prifti E, Quinquis B, Roume H, Vieira-Silva S, Hansen TH, Pedersen HK, Lewinter C, Sonderskov NB, MetaCardis C, Kober L, Vestergaard H, Hansen T, Zucker JD, Galan P, Dumas ME, Raes J, Oppert JM, Letunic I, Nielsen J, Bork P, Ehrlich SD, Stumvoll M, Pedersen O, Aron-Wisnewsky J, Clement K, Backhed F. Imidazole propionate is increased in diabetes and associated with dietary patterns and altered microbial ecology. *Nat Commun*. 2020;11(1):5881.
5. Menni C, Zhu J, Le Roy CI, Mompeo O, Young K, Rebholz CM, Selvin E, North KE, Mohny RP, Bell JT, Boerwinkle E, Spector TD, Mangino M, Yu B, Valdes AM. Serum metabolites reflecting gut microbiome alpha diversity predict type 2 diabetes. *Gut Microbes*. 2020;11(6):1632-42.
6. Malakar AK, Choudhury D, Halder B, Paul P, Uddin A, Chakraborty S. A review on coronary artery disease, its risk factors, and therapeutics. *J Cell Physiol*. 2019;234(10):16812-23.
7. Taqueti VR, Di Carli MF. Coronary Microvascular Disease Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Options: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. 2018;72(21):2625-41.
8. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*. 2005;111(25):3481-8.
9. Bauersachs R, Zeymer U, Briere JB, Marre C, Bowrin K, Huelsebeck M. Burden of Coronary Artery Disease and Peripheral Artery Disease: A Literature Review. *Cardiovasc Ther*. 2019;2019:8295054.
10. Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47(8 Suppl):C7-12.
11. Truelsen T, Krarup LH, Iversen HK, Mensah GA, Feigin VL, Sposato LA, Naghavi M. Causes of Death Data in the Global Burden of Disease Estimates for Ischemic and Hemorrhagic Stroke. *Neuroepidemiology*. 2015;45(3):152-60.
12. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*. 2001;104(4):503-16.
13. Kroon AA, Stalenhoef AF. LDL-cholesterol lowering and atherosclerosis--clinical benefit and possible mechanisms: an update. *Neth J Med*. 1997;51(1):16-27.
14. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. 5. Auflage ed: Thieme Verlag; 2015. 272-9 p.
15. Tennant M, McGeachie JK. Blood vessel structure and function: a brief update on recent advances. *Aust N Z J Surg*. 1990;60(10):747-53.
16. Filippi MD. Mechanism of Diapedesis: Importance of the Transcellular Route. *Adv Immunol*. 2016;129:25-53.

17. Manon-Jensen T, Kjeld NG, Karsdal MA. Collagen-mediated hemostasis. *J Thromb Haemost.* 2016;14(3):438-48.
18. Davies MJ, Woolf N, Rowles PM, Pepper J. Morphology of the endothelium over atherosclerotic plaques in human coronary arteries. *Br Heart J.* 1988;60(6):459-64.
19. Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol.* 2018;100:1-19.
20. Gistera A, Hansson GK. The immunology of atherosclerosis. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13(6):368-80.
21. Wolf D, Ley K. Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. *Circ Res.* 2019;124(2):315-27.
22. Fowler S, Shio H, Haley NJ. Characterization of lipid-laden aortic cells from cholesterol-fed rabbits. IV. Investigation of macrophage-like properties of aortic cell populations. *Lab Invest.* 1979;41(4):372-8.
23. Chistiakov DA, Melnichenko AA, Myasoedova VA, Grechko AV, Orekhov AN. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. *J Mol Med (Berl).* 2017;95(11):1153-65.
24. Park YM, Febbraio M, Silverstein RL. CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. *J Clin Invest.* 2009;119(1):136-45.
25. Emile JF, Abla O, Freitag S, Horne A, Haroche J, Donadieu J, Requena-Caballero L, Jordan MB, Abdel-Wahab O, Allen CE, Charlotte F, Diamond EL, Egeler RM, Fischer A, Herrera JG, Henter JI, Janku F, Merad M, Picarsic J, Rodriguez-Galindo C, Rollins BJ, Tazi A, Vassallo R, Weiss LM, Histiocyte S. Revised classification of histiocytoses and neoplasms of the macrophage-dendritic cell lineages. *Blood.* 2016;127(22):2672-81.
26. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol.* 2000;164(12):6166-73.
27. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, Seifi B, Mohammadi A, Afshari JT, Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol.* 2018;233(9):6425-40.
28. Rognoni A, Cavallino C, Veia A, Bacchini S, Rosso R, Facchini M, Secco GG, Lupi A, Nardi F, Rametta F, Bongo AS. Pathophysiology of Atherosclerotic Plaque Development. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2015;13(1):10-3.
29. Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G, Fayad Z, Stone PH, Waxman S, Raggi P, Madjid M, Zarrabi A, Burke A, Yuan C, Fitzgerald PJ, Siscovick DS, de Korte CL, Aikawa M, Airaksinen KE, Assmann G, Becker CR, Chesebro JH, Farb A, Galis ZS, Jackson C, Jang IK, Koenig W, Lodder RA, March K, Demirovic J, Navab M, Puri SG, Reekter MD, Bahr R, Grundy SM, Mehran R, Colombo A, Boerwinkle E, Ballantyne C, Insull W, Jr., Schwartz RS, Vogel R, Serruys PW, Hansson GK, Faxon DP, Kaul S, Drexler H, Greenland P, Muller JE, Virmani R, Ridker PM, Zipes DP, Shah PK, Willerson JT. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation.* 2003;108(15):1772-8.
30. Kubo T, Imanishi T, Takarada S, Kuroi A, Ueno S, Yamano T, Tanimoto T, Matsuo Y, Masho T, Kitabata H, Tsuda K, Tomobuchi Y, Akasaka T. Assessment of culprit lesion morphology in acute myocardial infarction: ability of optical coherence tomography compared with intravascular ultrasound and coronary angiography. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50(10):933-9.

31. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res*. 2014;114(12):1852-66.
32. Williams M, Mildner A, Yona S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity*. 2018;49(4):595-613.
33. Ziegler-Heitbrock L, Hofer TP. Toward a refined definition of monocyte subsets. *Front Immunol*. 2013;4:23.
34. Dalton HJ, Armaiz-Pena GN, Gonzalez-Villasana V, Lopez-Berestein G, Bar-Eli M, Sood AK. Monocyte subpopulations in angiogenesis. *Cancer Res*. 2014;74(5):1287-93.
35. Jakubzick CV, Randolph GJ, Henson PM. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(6):349-62.
36. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):762-74.
37. Narasimhan PB, Marcovecchio P, Hamers AAJ, Hedrick CC. Nonclassical Monocytes in Health and Disease. *Annu Rev Immunol*. 2019;37:439-56.
38. Kimball A, Schaller M, Joshi A, Davis FM, denDekker A, Boniakowski A, Bermick J, Obi A, Moore B, Henke PK, Kunkel SL, Gallagher KA. Ly6C(Hi) Blood Monocyte/Macrophage Drive Chronic Inflammation and Impair Wound Healing in Diabetes Mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018;38(5):1102-14.
39. Sunderkotter C, Nikolic T, Dillon MJ, Van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA, Leenen PJ. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol*. 2004;172(7):4410-7.
40. Hristov M, Heine GH. Monocyte subsets in atherosclerosis. *Hamostaseologie*. 2015;35(2):105-12.
41. Tabas I, Lichtman AH. Monocyte-Macrophages and T Cells in Atherosclerosis. *Immunity*. 2017;47(4):621-34.
42. Wu XB, Huang LX, Huang ZR, Lu LM, Luo B, Cai WQ, Liu AM, Wang SW. The lymphocyte-to-monocyte ratio predicts intracranial atherosclerotic stenosis plaque instability. *Front Immunol*. 2022;13:915126.
43. Dong C. Cytokine Regulation and Function in T Cells. *Annu Rev Immunol*. 2021;39:51-76.
44. Kumar BV, Connors TJ, Farber DL. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity*. 2018;48(2):202-13.
45. Taleb S. Inflammation in atherosclerosis. *Arch Cardiovasc Dis*. 2016;109(12):708-15.
46. Sakaguchi S, Mikami N, Wing JB, Tanaka A, Ichiyama K, Ohkura N. Regulatory T Cells and Human Disease. *Annu Rev Immunol*. 2020;38:541-66.
47. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol*. 2011;12(3):204-12.
48. Hansson GK, Robertson AK, Soderberg-Naucler C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol*. 2006;1:297-329.
49. Saigusa R, Winkels H, Ley K. T cell subsets and functions in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 2020;17(7):387-401.
50. Taleb S, Tedgui A, Mallat Z. IL-17 and Th17 cells in atherosclerosis: subtle and contextual roles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(2):258-64.
51. Tse K, Tse H, Sidney J, Sette A, Ley K. T cells in atherosclerosis. *Int Immunol*. 2013;25(11):615-22.
52. Eid RE, Rao DA, Zhou J, Lo SF, Ranjbaran H, Gallo A, Sokol SI, Pfau S, Pober JS, Tellides G. Interleukin-17 and interferon-gamma are produced concomitantly by human coronary artery-infiltrating T cells and act synergistically on vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 2009;119(10):1424-32.

53. de Boer OJ, van der Meer JJ, Teeling P, van der Loos CM, Idu MM, van Maldegem F, Aten J, van der Wal AC. Differential expression of interleukin-17 family cytokines in intact and complicated human atherosclerotic plaques. *J Pathol.* 2010;220(4):499-508.
54. Ivanov, II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, Wei D, Goldfarb KC, Santee CA, Lynch SV, Tanoue T, Imaoka A, Itoh K, Takeda K, Umesaki Y, Honda K, Littman DR. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell.* 2009;139(3):485-98.
55. Gao Q, Jiang Y, Ma T, Zhu F, Gao F, Zhang P, Guo C, Wang Q, Wang X, Ma C, Zhang Y, Chen W, Zhang L. A critical function of Th17 proinflammatory cells in the development of atherosclerotic plaque in mice. *J Immunol.* 2010;185(10):5820-7.
56. Simon T, Taleb S, Danchin N, Laurans L, Rousseau B, Cattan S, Montely JM, Dubourg O, Tedgui A, Kotti S, Mallat Z. Circulating levels of interleukin-17 and cardiovascular outcomes in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2013;34(8):570-7.
57. Gistera A, Robertson AK, Andersson J, Ketelhuth DF, Ovchinnikova O, Nilsson SK, Lundberg AM, Li MO, Flavell RA, Hansson GK. Transforming growth factor-beta signaling in T cells promotes stabilization of atherosclerotic plaques through an interleukin-17-dependent pathway. *Sci Transl Med.* 2013;5(196):196ra00.
58. Klingenberg R, Gerdes N, Badeau RM, Gistera A, Strodtzoff D, Ketelhuth DF, Lundberg AM, Rudling M, Nilsson SK, Olivecrona G, Zoller S, Lohmann C, Luscher 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.
59. Ait-Oufella H, Salomon BL, Potteaux S, Robertson AK, Gourdy P, Zoll J, Merval R, Esposito B, Cohen JL, Fisson S, Flavell RA, Hansson GK, Klatzmann D, Tedgui A, Mallat Z. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med.* 2006;12(2):178-80.
60. Dinh TN, Kyaw TS, Kanellakis P, To K, Tipping P, Toh BH, Bobik A, Agrotis A. Cytokine therapy with interleukin-2/anti-interleukin-2 monoclonal antibody complexes expands CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells and attenuates development and progression of atherosclerosis. *Circulation.* 2012;126(10):1256-66.
61. Takeda M, Yamashita T, Sasaki N, Nakajima K, Kita T, Shinohara M, Ishida T, Hirata K. Oral administration of an active form of vitamin D3 (calcitriol) decreases atherosclerosis in mice by inducing regulatory T cells and immature dendritic cells with tolerogenic functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(12):2495-503.
62. Zhang N, Bevan MJ. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity.* 2011;35(2):161-8.
63. Gattinoni L, Klebanoff CA, Restifo NP. Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(10):671-84.
64. Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol.* 2015;33:257-90.
65. Kaech SM, Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(11):749-61.
66. Halle S, Halle O, Forster R. Mechanisms and Dynamics of T Cell-Mediated Cytotoxicity In Vivo. *Trends Immunol.* 2017;38(6):432-43.
67. Catalfamo M, Henkart PA. Perforin and the granule exocytosis cytotoxicity pathway. *Curr Opin Immunol.* 2003;15(5):522-7.
68. Schafer S, Zerneck A. CD8(+) T Cells in Atherosclerosis. *Cells.* 2020;10(1).

69. Kolbus D, Ramos OH, Berg KE, Persson J, Wigren M, Bjorkbacka H, Fredrikson GN, Nilsson J. CD8<sup>+</sup> T cell activation predominate early immune responses to hypercholesterolemia in Apoe(-)/(-) mice. *BMC Immunol.* 2010;11:58.
70. Cochain C, Koch M, Chaudhari SM, Busch M, Pelisek J, Boon L, Zerneck A. CD8<sup>+</sup> T Cells Regulate Monopoiesis and Circulating Ly6C-high Monocyte Levels in Atherosclerosis in Mice. *Circ Res.* 2015;117(3):244-53.
71. Kyaw T, Winship A, Tay C, Kanellakis P, Hosseini H, Cao A, Li P, Tipping P, Bobik A, Toh BH. Cytotoxic and proinflammatory CD8<sup>+</sup> T lymphocytes promote development of vulnerable atherosclerotic plaques in apoE-deficient mice. *Circulation.* 2013;127(9):1028-39.
72. St Paul M, Ohashi PS. The Roles of CD8(+) T Cell Subsets in Antitumor Immunity. *Trends Cell Biol.* 2020;30(9):695-704.
73. Mittrucker HW, Visekruna A, Huber M. Heterogeneity in the differentiation and function of CD8(+) T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2014;62(6):449-58.
74. Joshi NS, Cui W, Chandele A, Lee HK, Urso DR, Hagman J, Gapin L, Kaeck SM. Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity.* 2007;27(2):281-95.
75. Burrell BE, Csencsits K, Lu G, Grabauskiene S, Bishop DK. CD8<sup>+</sup> Th17 mediate costimulation blockade-resistant allograft rejection in T-bet-deficient mice. *J Immunol.* 2008;181(6):3906-14.
76. Rangachari M, Mauermann N, Marty RR, Dirnhofer S, Kurrer MO, Komnenovic V, Penninger JM, Eriksson U. T-bet negatively regulates autoimmune myocarditis by suppressing local production of interleukin 17. *J Exp Med.* 2006;203(8):2009-19.
77. Yen HR, Harris TJ, Wada S, Grosso JF, Getnet D, Goldberg MV, Liang KL, Bruno TC, Pyle KJ, Chan SL, Anders RA, Trimble CL, Adler AJ, Lin TY, Pardoll DM, Huang CT, Drake CG. Tc17 CD8 T cells: functional plasticity and subset diversity. *J Immunol.* 2009;183(11):7161-8.
78. Huber M, Heink S, Grothe H, Guralnik A, Reinhard K, Elflein K, Hunig T, Mittrucker HW, Brustle A, Kamradt T, Lohoff M. A Th17-like developmental process leads to CD8(+) Tc17 cells with reduced cytotoxic activity. *Eur J Immunol.* 2009;39(7):1716-25.
79. Human Microbiome Project C. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 2012;486(7402):207-14.
80. Jonsson AL, Backhed F. Role of gut microbiota in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2017;14(2):79-87.
81. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Dore J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Meta HITC, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010;464(7285):59-65.
82. Haller D, Hörmannspurger G. Die intestinale Mikrobiota als externes „Organ“. In: *Darmgesundheit und Mikrobiota. essentials.* Springer Spektrum, Wiesbaden. [https://doi.org/10.1007/978-3-658-07648-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-658-07648-1_3). Springer Spektrum, Wiesbaden. 2015.
83. Sommer F, Backhed F. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol.* 2013;11(4):227-38.
84. Epstein SE, Zhu J, Burnett MS, Zhou YF, Vercellotti G, Hajjar D. Infection and atherosclerosis: potential roles of pathogen burden and molecular mimicry. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(6):1417-20.

85. Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev.* 2009;89(1):147-91.
86. Tang WH, 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.
87. van Son J, Serlie MJ, Stahlman M, Backhed F, Nieuwdorp M, Aron-Wisniewsky J. Plasma Imidazole Propionate Is Positively Correlated with Blood Pressure in Overweight and Obese Humans. *Nutrients.* 2021;13(8).
88. Konig M, Joshi S, Leistner DM, Landmesser U, Sinning D, Steinhagen-Thiessen E, Demuth I. Cohort profile: role of lipoproteins in cardiovascular disease-the LipidCardio study. *BMJ Open.* 2019;9(9):e030097.
89. Givan AL. Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol Biol.* 2011;699:1-29.
90. Buscher M. Flow Cytometry Instrumentation - An Overview. *Curr Protoc Cytom.* 2019;87(1):e52.
91. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol.* 2018;120:5 1 - 5 1 11.
92. Maciorowski Z, Chattopadhyay PK, Jain P. Basic Multicolor Flow Cytometry. *Curr Protoc Immunol.* 2017;117:5 4 1-5 4 38.
93. Lu W, Ma G, Sheng Z, Wang Q, Chen L, Qi J, Shi R, Ji J, Ji Z, Dai Q. MSCs Contribute to the Conversion of Ly6C(high) Monocytes into Ly6C(low) Subsets under AMI. *Stem Cells Int.* 2020;2020:2460158.
94. Haghikia A, Jorg S, Duscha A, Berg J, Manzel A, Waschbisch A, Hammer A, Lee DH, May C, Wilck N, Balogh A, Ostermann AI, Schebb NH, Akkad DA, Grohme DA, Kleinewietfeld M, Kempa S, Thone J, Demir S, Muller DN, Gold R, Linker RA. Dietary Fatty Acids Directly Impact Central Nervous System Autoimmunity via the Small Intestine. *Immunity.* 2016;44(4):951-3.
95. Berger CT. Die Milz als immunologisches Organ. *PIPETTE – SWISS LABORATORY MEDICINE | WWWSULMCH.* 2018:6-8.
96. Stiekema LCA, Willemsen L, Kaiser Y, Prange KHM, Wareham NJ, Boekholdt SM, Kuijk C, de Winther MPJ, Voermans C, Nahrendorf M, Stroes ESG, Kroon J. Impact of cholesterol on proinflammatory monocyte production by the bone marrow. *Eur Heart J.* 2021;42(42):4309-20.
97. Knuuti J, Wijns W, Saraste A, Capodanno D, Barbato E, Funck-Brentano C, Prescott E, Storey RF, Deaton C, Cuisset T, Agewall S, Dickstein K, Edvardsen T, Escaned J, Gersh BJ, Svtil P, Gilard M, Hasdai D, Hatala R, Mahfoud F, Masip J, Muneretto C, Valgimigli M, Achenbach S, Bax JJ, Group ESCSD. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *Eur Heart J.* 2020;41(3):407-77.
98. van Duijn J, Kuiper J, Slutter B. The many faces of CD8+ T cells in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2018;29(5):411-6.
99. Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, Hansson GK. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(9):3893-7.
100. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;352(16):1685-95.
101. McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL. The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. *Immunity.* 2019;50(4):892-906.
102. Lewis SM, Williams A, Eisenbarth SC. Structure and function of the immune system in the spleen. *Sci Immunol.* 2019;4(33).

103. van der Heiden C, Wadman SK, de Bree PK, Wauters EA. Increased urinary imidazolepropionic acid, N-acetylhistamine and other imidazole compounds in patients with intestinal disorders. *Clin Chim Acta*. 1972;39(1):201-14.
104. Bogachev AV, Bertsova YV, Bloch DA, Verkhovsky MI. Urocanate reductase: identification of a novel anaerobic respiratory pathway in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Mol Microbiol*. 2012;86(6):1452-63.
105. Schroeder BO, Backhed F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat Med*. 2016;22(10):1079-89.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Leander Reinshagen, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Rolle des Darm-Mikrobiom abhängigen Metaboliten Imidazol-Propionats für die Immunzellendifferenzierung und koronare Herzkrankheit; The role of the gut microbiome-dependent metabolite imidazole propionate in immune cell differentiation and coronary artery disease“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

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

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

29.03.2024

–

Datum

Unterschrift

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



## Publikationsliste

V Nageswaran, A Carreras, **L Reinshagen**, K R. Beck, J Steinfeldt, M Ståhlman, P Ramezani Rad, J Lim, E T. Strässler, B Verhaar, Y Döring, C Weber, M König, E Steinhagen-Thiessen, I Demuth, N Kränkel, D M. Leistner, M Nieuwdorp, P Knaus, M Ferrell, M Potente, S L. Hazen, U Landmesser, F Bäckhed, A Haghikia; **Gut microbial metabolite imidazole propionate impairs endothelial cell function and promotes the development of atherosclerosis; In submission**

**L Reinshagen\***, V Nageswaran\*, H Heidecke, K Schulze-Forster, A Beatrice Wilde, P Ramezani Rad, W Poller, E Asmus, S Simmons, W M. Kuebler, M Witzenrath, L Markó, K Jakobs, D M. Leistner, U Rauch-Kröhnert, N Kränkel, S K. Forslund, U Landmesser, D N. Müller, A Haghikia, **Protease-activated receptor-1 IgG autoantibodies in patients with COVID-19; In Revision** \*geteilte Erstautorenschaft; Thrombosis and Haemostasis

Jakobs K, **Reinshagen L**, Puccini M, Friebel J, Wilde AB, Alsheik A, Rroku A, Landmesser U, Haghikia A, Kränkel N, Rauch-Kröhnert U. **Disease Severity in Moderate-to-Severe COVID-19 Is Associated With Platelet Hyperreactivity and Innate Immune Activation.** Front Immunol. 2022 Mar 11;13:844701. doi: 10.3389/fimmu.2022.844701. PMID: 35359931; PMCID: PMC8963244.

Puccini M, Jakobs K, **Reinshagen L**, Friebel J, Schencke PA, Ghanbari E, Landmesser U, Haghikia A, Kränkel N, Rauch U. **Galectin-3 as a Marker for Increased Thrombogenicity in COVID-19.** Int J Mol Sci. 2023 Apr 22;24(9):7683. doi: 10.3390/ijms24097683. PMID: 37175392; PMCID: PMC10178107.

Ghanbari EP, Jakobs K, Puccini M, **Reinshagen L**, Friebel J, Haghikia A, Kränkel N, Landmesser U, Rauch-Kröhnert U. **The Role of NETosis and Complement Activation in COVID-19-Associated Coagulopathies.** Biomedicines. 2023 May 5;11(5):1371. doi: 10.3390/biomedicines11051371. PMID: 37239041; PMCID: PMC10216097.

Asmus E, Karle W, Brack MC, Wittig C, Behrens F, **Reinshagen L**, Pfeiffer M, Schulz S, Mandzimba-Maloko B, Erfinanda L, Perret PL, Michalick L, Smeele PJ, Lim EHT, van den Brom CE, Vonk ABA, Kaiser T, Suttorp N, Hippenstiel S, Sander LE, Kurth F, Rauch U, Landmesser U, Haghikia A, Preissner R, Bogaard HJ, Witzenrath M, Kuebler WM, Szulcek R, Simmons S. **Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators attenuate platelet activation and aggregation in blood of healthy donors and COVID-19 patients.** Eur Respir J. 2023 Mar 23;61(3):2202009. doi: 10.1183/13993003.02009-2022. PMID: 36958745; PMCID: PMC10033930.

## **Danksagung**

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Arash Haghikia für die intensive und langjährige Betreuung meiner Promotion bedanken. Durch seine Unterstützung durfte ich bereits viele wertvolle Erfahrungen im Bereich der Wissenschaft sammeln und bin dankbar für die persönliche Förderung meiner Laufbahn.

Zudem möchte ich mich zutiefst bei Vanasa Nageswaran bedanken. Deine Akribie, Genauigkeit und Perfektion haben unser Projekt erst möglich gemacht, für deine Unterstützung und die vielen Stunden im Labor, die wir zusammen verbracht haben, bin ich sehr dankbar.

Zuletzt danke ich meiner Familie und meiner Freundin für die Unterstützung und den steten Glauben an mich.



### Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Herr Reinshagen innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBiKE) bei mir eine statistische Beratung zu ihrem Promotionsvorhaben „Die Rolle des Darm-Mikrobiom abhängigen Metaboliten Imidazol-Propionats für die Immunzellendifferenzierung und kardiovaskulären Erkrankungen“ wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 11.01.2022
- Termin 2: 17.01.2022
- Termin 3: 13.04.2022

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

- Empfehlung der Nutzung des Statistik-Programms „IBM SPSS Statistics“ zwecks statistischer Auswertung der erhobenen Daten
  - Weiterhin Instruktion über die adäquate Eingabe der Werte
- Instruktion über die adäquate Deskription der kategorialen und metrischen Variablen
- Empfehlung zur korrekten Anwendung geeigneter statistischer Test in Abhängigkeit von den Fragestellungen (T-Test, Mann-Whitney-U-Test in Abhängigkeit von der Schiefe der Verteilung)
- Hinweise zur Erstellung von Grafiken (Boxplots)
- Hinweise zur Interpretation der Ergebnisse
- Hinweis auf Erwähnung im Diskussions-Abschnitt der Monographie, dass die in dieser Arbeit gefundenen Resultate durch weitere unabhängige Studien bestätigt werden müssen und

dass auf Grund der geringen Fallzahl die Daten nicht geeignet sind zur Durchführung multipler Regressionsanalysen

- Hinweis auf den korrekten Umgang mit multiplen Testen bzw. die Unterscheidung zwischen den konfirmatorischen und dem explorativen Teil der Arbeit

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: 13.04.2022

Name der Beraterin: