

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

DISSERTATION

Der Einfluss von Darmmikrobiom-abhängigen Metaboliten auf  
Endothelzellphysiologie und Immunzellendifferenzierung

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

David Schmidt

aus Berlin

Datum der Promotion: 17.9.2021

## Vorwort

Teilweise wurden die Ergebnisse der Experimente der hier vorliegenden Dissertation bereits vorab in folgender Publikation (Originalarbeit) veröffentlicht:

- Haghikia A, Li XS, Liman TG, Bledau N, **Schmidt D**, Zimmermann F, Krankel N, Widera C, Sonnenschein K, Haghikia A, Weissenborn K, Fraccarollo D, Heimesaat MM, Bauersachs J, Wang Z, Zhu W, Bavendiek U, Hazen SL, Endres M, Landmesser U. Gut Microbiota-Dependent Trimethylamine N-Oxide Predicts Risk of Cardiovascular Events in Patients With Stroke and Is Related to Proinflammatory Monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38(9):2225-35.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>3</b>
<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>9</b>
<b>Abstrakt - Deutsch.....</b>	<b>11</b>
<b>Abstract – English .....</b>	<b>13</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>15</b>
1.1 Atherosklerose .....	15
1.2 Bedeutung der Endothelzellen während der Atherogenese .....	18
1.3 Bedeutung von Immunzellen für Atherogenese und Plaquestabilität .....	20
1.4 Darmmikrobiom und Bedeutung seiner Metabolite für die Atherogenese .....	28
1.5 Fragestellungen dieser Arbeit .....	35
<b>2. Materialien und Methodik .....</b>	<b>38</b>
2.1 Materialien .....	38
2.2 Zellkultur .....	41
2.2.1 Verwendete Zelllinien .....	41
2.2.2 Kultivierung und Passagierung von HAEC .....	41
2.2.3 Kultivierung und Passagierung von THP1-Monozyten .....	42
2.2.4 Calciumpropionat im Medium .....	42
2.2.5 TMAO im Medium.....	43
2.3 Mausversuche.....	43
2.3.1 Haltungsbedingungen und rechtlicher Rahmen.....	43
2.3.2 Behandlungsgruppen der verschiedenen Mausversuche.....	44
2.3.3 Mausektion und Probengewinnung.....	46
2.3.4 Murine Zellisolation.....	47
2.4 Durchflusszytometrische Analysen .....	48

2.4.1	Das Prinzip der Durchflusszytometrie.....	48
2.4.2	Messung von Apoptose sowie Adhäsionsmolekülen von HAEC.....	50
2.4.3	Monozytenadhäsion bei Behandlung der Monozyten mit TMAO .....	53
2.4.4	Monozytenadhäsion bei Behandlung der HAEC mit Propionat .....	54
2.4.5	Färbung und durchflusszytometrische Analysen der murinen Zellen.....	55
2.4.6	Messung der Daten im Durchflusszytometer .....	62
2.4.7	Analyse der durchflusszytometrischen Daten .....	62
2.4.8	Ausschluss von Proben .....	63
2.5	Statistik .....	63
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>64</b>
3.1	TMAO.....	64
3.1.1	Einfluss von TMAO auf Monozytensubpopulationen im Blut .....	64
3.1.2	Einfluss von TMAO auf Monozytensubpopulationen im Knochenmark .....	66
3.1.3	Einfluss von TMAO auf Hämatopoetische Stammzellen und Monozytenprogenitorzellen im Knochenmark.....	67
3.1.4	Einfluss von TMAO auf Monozytenadhäsion .....	68
3.2	Propionat.....	69
3.2.1	Einfluss von Propionat auf Monozytensubpopulationen im Blut .....	69
3.2.2	Einfluss von Propionat auf Monozytensubpopulationen in MLN .....	72
3.2.3	Einfluss von Propionat auf Monozytensubpopulationen im Knochenmark ....	72
3.2.4	Einfluss von Propionat auf Monozytenprogenitorzellen und Hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark.....	73
3.2.5	Einfluss von Propionat auf T-Zell-Populationen .....	74
3.2.6	Einfluss von Propionat auf die Expression von ICAM und VCAM durch HAEC .....	81
3.2.7	Einfluss von Propionat auf den Apoptoseanteil von HAEC.....	82
3.2.8	Einfluss von Propionat auf Monozytenadhäsion .....	83
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>85</b>

4.1 Diskussion der Experimente mit TMAO .....	85
4.2 Diskussion der Experimente mit Propionat .....	89
4.3 Methodendiskussion .....	98
4.4 Therapeutische Relevanz der Ergebnisse im translationalen Kontext .....	100
4.5 Zusammenfassung.....	103
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>105</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>112</b>
<b>Anteilerklärung an erfolgten Publikationen .....</b>	<b>113</b>
<b>Curriculum vitae .....</b>	<b>114</b>
<b>Publikationsliste .....</b>	<b>116</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>117</b>

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>Abbildung 1</b> Darstellung des Versuchsaufbaus für den Mausversuch mit cholinreicher Diät. ....	44
<b>Abbildung 2</b> Darstellung des Versuchsaufbaus für den Mausversuch mit Propionat bei Wildtyp-Mäusen. ....	45
<b>Abbildung 3</b> Darstellung des Versuchsaufbaus für den Mausversuch mit Propionat bei ApoE <sup>-/-</sup> -Mäusen. ....	46
<b>Abbildung 4</b> Darstellung des grundlegenden Prinzips der Durchflusszytometrie. ....	50
<b>Abbildung 5</b> Gating-Strategie zur Analyse von Apoptotischen, Nekrotischen und Lebenden HAEC sowie zur Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM und ICAM. ....	52
<b>Abbildung 6</b> Gating-Strategie zur Identifikation von mit CFSE-angefärbten THP1-Zellen im Adhäsionsexperiment. ....	55
<b>Abbildung 7</b> Gating-Strategie zur Identifikation von Monozytensubpopulationen. ....	57
<b>Abbildung 8</b> Gating-Strategie zur Identifikation von Monozytenprogenitorzellen (MDP) sowie Hämatopoetischen Stammzellen (HSC). ....	58
<b>Abbildung 9</b> Gating-Strategie zur Identifikation IL17A-positiven Th17-Zellen sowie IFN $\gamma$ -positiven Th1-Zellen. ....	60
<b>Abbildung 10</b> Gating-Strategie zur Identifikation CD25-positiven, FoxP3-positiven Tregs. ....	61
<b>Abbildung 11</b> Beispiel für das Erstellen einer Gating-Strategie mittels FMO anhand von CD25- und FoxP3-positiven Tregs. ....	63
<b>Abbildung 12</b> Einfluss von cholinreicher Diät auf die Anzahl von Ly6C-high- und Ly6C-low-Monozyten im Blut. ....	65
<b>Abbildung 13</b> Darstellung exemplarischer Gates von Ly6C-low- und Ly6C-high-Monozyten im Blut. ....	65
<b>Abbildung 14</b> Einfluss von cholinreicher Diät auf die Anzahl von Ly6C-high- und Ly6C-low-Monozyten im Knochenmark. ....	66
<b>Abbildung 15</b> Einfluss von cholinreicher Diät auf den Anteil von hämatopoetischen Stammzellen sowie Monozytenvorläuferzellen an Lineage-negativen Knochenmarkszellen. ....	67
<b>Abbildung 16</b> Einfluss von TMAO auf die Monozytenadhäsion an HAEC unter inflammatorischen Bedingungen. ....	68

<b>Abbildung 17</b> Einfluss von Propionat auf die Ly6C-high/low-Ratio sowie den Anteil der Monozyten im Blut. ....	70
<b>Abbildung 18</b> Einfluss von Propionat auf die Ly6C-high/low-Ratio sowie den Anteil der Monozyten im Blut. ....	71
<b>Abbildung 19</b> Einfluss von Propionat auf die Ly6C-high/low-Ratio der Monozyten in MLN. ....	72
<b>Abbildung 20</b> Einfluss von Propionat auf die Ly6C-high/low-Ratio sowie den Anteil der Monozyten im Knochenmark. ....	73
<b>Abbildung 21</b> Einfluss von Propionat auf den Anteil von hämatopoetischen Stammzellen sowie Monozytenvorläuferzellen an Lineage-negativen Knochenmarkszellen. ....	74
<b>Abbildung 22</b> Einfluss von Propionat auf den Anteil von CD25-positiven, FoxP3-positiven Tregs im Blut. ....	76
<b>Abbildung 23</b> Einfluss von Propionat auf den Anteil von IL17A-positiven Th17-Zellen sowie IFN $\gamma$ -positiven Th1-Zellen im Blut. ....	76
<b>Abbildung 24</b> Einfluss von Propionat auf den Anteil von CD25-positiven, FoxP3-positiven Tregs in MLN. ....	77
<b>Abbildung 25</b> Einfluss von Propionat auf den Anteil von IL17A-positiven Th17-Zellen sowie IFN $\gamma$ -positiven Th1-Zellen in MLN. ....	78
<b>Abbildung 26</b> Einfluss von Propionat auf den Anteil von CD25-positiven, FoxP3-positiven Tregs in der Leber. ....	78
<b>Abbildung 27</b> Einfluss von Propionat auf den Anteil von IL17A-positiven Th17-Zellen sowie IFN $\gamma$ -positiven Th1-Zellen in der Leber. ....	79
<b>Abbildung 28</b> Einfluss von Propionat auf den Anteil von CD25-positiven, FoxP3-positiven Tregs in der Milz. ....	80
<b>Abbildung 29</b> Einfluss von Propionat auf den Anteil von IL17A-positiven Th17-Zellen sowie IFN $\gamma$ -positiven Th1-Zellen in der Milz. ....	80
<b>Abbildung 30</b> Einfluss von Propionat auf die Monozytenadhäsion an HAEC unter inflammatorischen Bedingungen. ....	84
<b>Tabelle 1</b> Übersicht der Zytokinsekretion sowie der wichtigsten Wirkeffekte ausgewählter T-Zellen ....	26
<b>Tabelle 2</b> Zusammenfassung bekannter Wirkmechanismen und Wirkeffekte durch Propionat ....	35

<b>Tabelle 3</b> Einfluss verschiedener Konzentrationen von $\text{TNF}\alpha$ im Medium auf den Anteil VCAM- und ICAM-positiver HAEC.....	81
<b>Tabelle 4</b> Einfluss von Propionat bei verschiedenen Konzentrationen von $\text{TNF}\alpha$ im Medium auf den Anteil VCAM- positiver HAEC. ....	81
<b>Tabelle 5</b> Einfluss von Propionat bei verschiedenen Konzentrationen von $\text{TNF}\alpha$ im Medium auf den Anteil VCAM- positiver HAEC. ....	82
<b>Tabelle 6</b> Einfluss verschiedener Konzentrationen von $\text{TNF}\alpha$ im Medium auf den Anteil früh-apoptotischer und lebender HAEC.....	82
<b>Tabelle 7</b> Einfluss von Propionat bei Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ (1ng/ml) im Medium auf den Anteil früh-apoptotischer und lebender HAEC.....	83

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
ABS	Sekundär gnotobiotische Mäuse nach Behandlung mit Antibiotika-Cocktail für mind. 4 Wochen, mit Sterilitätsnachweis
AF647	Alexa Fluor 647
APC	Allophycocyanin
ApoB 100-Protein	Apolipoprotein B 100-Protein
ApoE <sup>-/-</sup>	Apolipoprotein E-Knockout
BV711	Brilliant Violet 711
CD	Kontrolldiät
CD4	Cluster of differentiation 4
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
Cholin-D	Cholinreiche Diät (mit 1,3 % Cholin)
c-Kit	Tyrosinkinase KIT
CRP	C-reaktives Protein
FFAR	Free fatty acid receptor
FI	Fluoreszenzintensität
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FMO	Fluorescence-minus-one
FMO3	Flavinmonoxidase 3
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
GPR109A	G-protein-coupled receptor 109A
HAEC	humane aortale Endothelzellen
HFD	High-Fat-Diät (Diät mit hohem Fettanteil)
HSC	Hematopoetic Stem Cells
HSZ	Hämatopoetische Stammzellen
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN $\gamma$	Interferon Gamma
IL1	Interleukin 1
LDL	Low-density lipoprotein
Ly6C	Lymphocyte antigen 6 C

MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MCT	Medium-chain triglycerides, mittelkettige Triglyceride
MDP	Monocyte-Dendritic Progenitor Cell
MHC2	Major Histocompatibility Complex 2
MLN	Mesenteric Lymph Nodes- Mesenteriallymphknoten
mTOR-S6K	Mechanistic target of Rapamycin- ribosomal protein S6 kinase
NF $\kappa$ B	Nuclear Factor kappa B
NLRP3 Inflammosome	- NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3 Inflammosome
NO	Stickstoffmonoxid
Nr4a1	Nuclear receptor subfamily 4 group A member 1
OlfR78	Olfactory Receptor 78
oxLDL	Oxidiertes Low Density Lipoprotein
PA	Propionat
PE	Phycoerythrin
PerCp/Cy.5.5	Peridinin chlorophyll/ cyanine 5.5
PFA	Paraformaldehyd
PGI2	Prostaglandin I2
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
Sca-1	Stammzellen-Antigen-1
SCFA	Short-chain fatty acids, kurzkettige Fettsäuren (Acetat, Propionat, Butyrat)
SMCT1	Sodium-coupled monocarboxylate transporter 1
SPF	Specific-pathogen free
TGF- $\beta$	Tumor Growth Factor-beta
THP1	Tamm-Horsfall Protein 1
Th-Zellen	T-Helferzellen
TMAO	Trimethylaminoxid
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
Tregs	Regulatorische T-Zellen
VCAM	Vascular cell adhesion molecule

# Abstrakt - Deutsch

## Einleitung

Seit wenigen Jahren zeigt eine steigende Anzahl wissenschaftlicher Studien einen bedeutenden Einfluss des Darmmikrobioms und seiner Metabolite auf die Entwicklung und Progression von kardiovaskulären Erkrankungen. Cholin- oder Betainreiche Diät wird durch das Darmmikrobiom sowie die Leber in den Metaboliten Trimethylamino-N-oxid (TMAO) umgewandelt, welcher in hohen Serum-Konzentrationen mit erhöhtem Risiko kardiovaskulärer Ereignisse assoziiert ist.

Dagegen werden kurzkettigen Fettsäuren wie Propionat, die durch bakterielle Fermentierung aus faserreicher Diät generiert werden, immunmodulatorische Eigenschaften zugeschrieben.

## Zielsetzung

In dieser Arbeit werden die Einflüsse von TMAO und Propionat auf endotheliale Zellphysiologie sowie Differenzierung von murinen Monozytensubpopulationen und T-Zellen bei intaktem oder depletiertem Darmmikrobiom in der Maus untersucht.

## Methodik

Es wurden „spezifisch pathogenfreie“ (SPF)- oder sekundär gnotobiotische Mäuse mit Kontroll- oder cholinreicher Diät behandelt und Monozytensubpopulationen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. *In-vitro* wurde die Monozytenadhäsion von Tamm-Horsfall Protein 1 (THP1) -Monozyten an humanen aortalen Endothelzellen (HAEC) bei Behandlung der Monozyten mit TMAO mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Weiterhin wurden SPF- oder sekundär gnotobiotische Wildtyp- oder ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse auf High-Fat-Diet (HFD) mit Propionat behandelt und Monozytensubpopulationen als auch verschiedene T-Zellpopulationen (Th1, Th17 sowie Tregs) in Blut, Milz, Leber, mesenteriale Lymphknoten (MLN) und Knochenmark mittels Durchflusszytometrie bestimmt. *In-vitro* wurden die Monozytenadhäsion an Endothelzellen sowie Apoptose- und Expressionsverhalten von Adhäsionsmolekülen von HAEC unter Behandlung mit verschiedenen inflammatorischen Stimuli (1 oder 10 ng TNF $\alpha$ /ml Medium) bei Vorbehandlung mit Propionat mittels Durchflusszytometrie untersucht.

## **Ergebnisse**

Cholin bewirkte als Trimethylamin-haltige Vorläufersubstanz des TMAOs eine Verschiebung von anti-inflammatorischen zu pro-inflammatorischen Monozyten im Mausmodell im Blut ebenso wie im Knochenmark. Dieser Effekt war in Mäusen mit depletiertem Darmmikrobiom supprimiert.

Cholinreiche Diät bewirkte keine signifikante Änderung der Anteile von Hämatopoetischen Stammzellen sowie Monozytenprogenitorzellen. Ebenso veränderte sich die Monozytenadhäsion unter TMAO nicht signifikant.

Eine Behandlung mit Propionat im Mausmodell zeigte einen signifikanten Anstieg der regulatorischen T-Zellen in den mesenterialen Lymphknoten in SPF-Mäusen ohne signifikante Effekte in den weiteren Organen. Das Verhältnis von pro- zu anti-inflammatorischen Monozyten als auch die Anteile von Th1- sowie Th17-Zellen veränderten sich nicht signifikant. Weiterhin zeigte Propionat keinen signifikanten Einfluss auf Monozytenadhäsion und Apoptose von HAEC.

## **Schlussfolgerung**

Cholinreiche Diät bewirkt einen erhöhten Anteil pro-inflammatorischer Monozyten im Blut, was zu einem erhöhten Risiko von kardiovaskulären Ereignissen im Menschen beitragen kann. Propionat bewirkt im hypercholesterinämischen Mausmodell eine intestinale Erhöhung des Anteils von regulatorischen T-Zellen, was sich günstig auf Lipidstoffwechsel und somit atheroprotektiv auswirken kann. Das Darmmikrobiom und seine Metabolite erweisen sich als wichtiger Ansatzpunkt zur Risikomodulation für kardiovaskuläre Ereignisse, welcher für therapeutische und präventive Strategien genutzt werden könnten.

## Abstract – English

### Introduction

Growing evidence suggests a significant role of the gut microbiome and its metabolites for the development and progression of cardiovascular disease. A choline- or betaine-rich diet is metabolised by the gut microbiome and the liver into the compound trimethylamine-*N*-oxide (TMAO) which at high serum concentrations is associated with elevated risk of cardiovascular events in humans.

Additionally, short-chain fatty acids (SCFA) like propionate generated upon bacterial fermentation of fiber rich diet have been suggested to have immunomodulatory properties with beneficial effects on cardiovascular health.

### Goals

This work examines the impact of TMAO and propionate on distinct aspects of endothelial cell physiology and homeostasis of murine monocyte and T cell subpopulations in wildtype or atherosclerotic prone ApoE<sup>-/-</sup>-mice with intact or depleted gut microbiome.

### Methods

In mouse experiments “specific pathogen-free” (SPF)- or secondary gnotobiotic wildtype mice were fed with control or choline-rich diet and monocyte subpopulations were analysed by flow cytometry. *In vitro*, monocyte adhesion of Tamm-Horsfall Protein 1 (THP1)-monocytes on human aortic endothelial cells (HAEC) of TMAO-treated monocytes was examined by flow cytometry.

Furthermore, SPF- or secondary gnotobiotic wildtype- or ApoE<sup>-/-</sup>-mice on high-fat-diet (HFD) were treated with propionate and monocyte subpopulations and different T cell populations (Th1, Th17 and Tregs) in blood, spleen, liver, mesenteric lymph nodes (MLN) and bone marrow were determined by flow cytometry.

*In vitro*, monocyte adhesion on endothelial cells and apoptosis as well as expression of adhesion molecules by HAEC upon stimulation with different inflammatory stimuli (1 or 10 ng TNF $\alpha$ /ml medium) were examined by flow cytometry.

### Results

Choline-rich diet triggered a shift of anti- to pro-inflammatory monocytes in blood and in bone marrow, which was prevented in mice with depleted gut microbiome. There was no

significant effect in the ratios of hematopoietic stem cells or monocyte progenitor cells. Furthermore, TMAO did not induce any significant change in monocyte adhesion. Propionate induced a significant increase of Tregs in MLN in SPF-mice, but not in other organs. The ratio of pro- to anti-inflammatory monocytes and the concentration of Th1 and Th17 cells did not change significantly. Furthermore, propionate did not have a significant effect on monocyte adhesion or apoptosis in HAEC.

## **Conclusion**

Choline-rich diet induces a shift towards pro-inflammatory monocytes which may contribute to increased cardiovascular risk in humans with elevated serum concentration of TMAO. Propionate has systemic immunomodulatory effects with potential atheroprotective properties, although it did not show direct anti-inflammatory and anti-apoptotic effects on endothelial cells *in-vitro*.

The gut microbiome and its metabolites may represent a novel target to prevent and treat atherosclerotic cardiovascular disease.

# 1. Einleitung

Seit einigen Jahren wird in der biomedizinischen Forschung ein stärkerer Fokus auf das Darmmikrobiom als Bindeglied zwischen Ernährung und Metabolismus gesetzt, und es konnten Assoziationen zwischen einem veränderten Darmmikrobiom und dem Auftreten von bekannten Risikofaktoren für Atherosklerose wie Adipositas, Diabetes und arterieller Hypertonie festgestellt werden [1-3]. So konnten erste Wirkmechanismen verschiedener Metaboliten des Darmmikrobioms, die zur Ausbildung von Diabetes [4] und arterieller Hypertonie [5, 6] beitragen, identifiziert werden.

In dieser Arbeit wird der Einfluss zweier Metabolite des Darmmikrobioms, TMAO und Propionat, auf die endotheliale Inflammation und Apoptose in Zellkulturexperimenten sowie auf den Immunphänotyp in Mausversuchen untersucht. Die untersuchten Zellen beeinflussen maßgebend die Initiierung und Progression von Atherosklerose.

In der folgenden Einleitung wird zunächst auf aktuelle epidemiologische Kennzahlen sowie Pathogenesemechanismen der Atherosklerose eingegangen. Nachfolgend wird die Rolle der Endothelzellen, Monozyten sowie T-Zellen im Rahmen der Atherogenese und ihre Bedeutung für die Plaquestabilität näher erläutert.

Im Anschluss wird die Zusammensetzung und die Funktion des Darmmikrobioms als auch bekannte system-biologische Eigenschaften der Darmmikrobiom-abhängigen Metaboliten TMAO und Propionat beschrieben. Zuletzt werden die Forschungsfragestellungen der Promotionsarbeit beschrieben.

## 1.1 Atherosklerose

### **Globale und nationale Bedeutung der Atherosklerose**

Die Atherosklerose ist ein systemischer, chronisch-entzündlicher Prozess, der mit seinen Folgekrankheiten wie dem Akutem Koronarsyndrom oder dem ischämischen Hirninfarkt in Deutschland sowie weltweit die häufigste Todesursache darstellt. Das Akute Koronarsyndrom ist nach dem „Global Burden of Disease 2017“ die häufigste Todesursache weltweit, während der Schlaganfall die dritthäufigste Todesursache weltweit ist [7].

Die Krankheitskosten durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen betragen im Jahr 2015 in Deutschland rund 46,4 Milliarden Euro. Laut dem Statistischen Bundesamt Deutschlands (Destatis) entfielen damit rund 13,7 % der gesamten Krankheitskosten in Höhe von

338,2 Milliarden Euro auf diese Krankheitsgruppe [8].

Moderne Therapieoptionen in High-Income-Ländern haben in den vergangenen Jahren eine verringerte Mortalität bewirkt [9].

Derzeit sind eine Reihe von sowohl modifizierbaren als auch nicht-modifizierbaren Risikofaktoren für das Entstehen und die Progression der Atherosklerose bekannt. Die wichtigsten Risikofaktoren sind chronischer Nikotinkonsum, Adipositas, erhöhte LDL-Cholesterinwerte im Blut, Diabetes mellitus sowie Bluthochdruck [9].

Laut den „European Cardiovascular Disease Statistics 2017“ ist die Diät der wichtigste Verhaltensrisikofaktor, während erhöhter Blutdruck den wichtigsten medizinischen Risikofaktor darstellt [10].

Verschiedene Risikofaktoren konnten in den letzten Jahren durch Lebensstiländerungen, Medikamente (zum Beispiel Statine, Antidiabetika) sowie chirurgische Interventionen (zum Beispiel bariatrische Chirurgie) in ihrer Ausprägung modifiziert werden und somit die durch den demografischen Wandel zu erwartende zunehmende Entwicklung und Progression von Atherosklerose und ihren Folgeerscheinungen beeinflusst werden [11].

## **Molekulare und zelluläre Mechanismen der Atherogenese**

### **Endotheliale Dysfunktion**

Endothelzellen bilden die innerste Schicht von Blutgefäßen, die sogenannte Intima.

Sie bilden eine dynamische Grenzschicht zum Blut und integrieren als auch transferieren humorale, zelluläre sowie mechanische Stimuli. Im Ruhezustand bewirken Endothelzellen die Synthese wie auch Metabolisierung von Stoffwechselprodukten, die eine vaskuläre Hämostase zur Folge haben [12].

Nach aktueller Lehrmeinung leitet eine gestörte endotheliale Physiologie (Dysfunktion) die Entwicklung der Atherosklerose ein [12]. Diese umfasst eine gestörte Barrierefunktion, eine eingeschränkte Regulation des Gefäßtonus auf Grund einer verringerten Sekretion von Stickstoffmonoxid, eine Reduktion antikoagulatorischer Wirkmechanismen und ebenso eine verstärkte Transmigration von Immunzellen, vorwiegend von Monozyten [13].

### **Akkumulation von Lipoproteinen**

Die durch die endotheliale Dysfunktion gestörte Barrierefunktion des Endothels führt zur Ablagerung von LDL-Partikeln auf Proteoglykanen im subendothelialen Raum [14, 15]. Diese Ablagerung wird durch eine Hochregulation von Scavenger-Rezeptoren auf

eingewanderten Makrophagen weiter verstärkt [16].

Die LDL-Partikel werden durch verschiedene Enzyme und in der Subintima vorhandene freie Sauerstoffradikale oxidiert und bewirken die Bildung von Superoxidanionen, welche zur Aufrechterhaltung der inflammatorischen Prozesse beitragen [17].

### **Einwanderung von Immunzellen**

Im Rahmen der endothelialen Dysfunktion werden bestimmte Transkriptionsfaktoren, wie z.B. der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B, aktiviert. In der Folge wird die Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen hochreguliert, was eine Adhäsion sowie Transmigration von Monozyten, die zu Makrophagen ausdifferenzieren, sowie von verschiedenen T-Zell-Klassen zur Folge hat. Außerdem migrieren in geringerer Anzahl neutrophile Granulozyten, Mastzellen sowie natürliche Killerzellen [18].

### **Bildung von Schaumzellen**

Die mit Scavenger-Rezeptoren sowie Pinozytose vermittelte Aufnahme von oxLDL durch die Makrophagen führt zur Bildung von Schaumzellen. Schaumzellen sind mit oxLDL beladene Makrophagen mit eingeschränkter Migrationsfähigkeit, die in der Intima „gefangen“ sind [16, 19, 20]. Im Laufe der Atherogenese kommt es zum Zelltod der Schaumzellen und damit zur Ausbildung eines Kernareals der Plaque, das aus apoptotischen und nekrotischen Zellen als auch Cholesterinkristallen und Extrazellulärmatrix besteht [21].

### **Plaquebildung**

Durch die Cholesterinkristalle wird u.a. eine Aktivierung des NACHT, LRR und PYD-Domänen-beinhaltenen Protein 3-Inflammasoms (NLRP3) und damit eine Produktion von IL-1 $\beta$  bewirkt [22]. Daraus folgt eine Produktion von IL-6 z.B. durch glatte Muskelzellen in der Media und damit die Einleitung einer systemischen Immunantwort mit Ausschüttung von CRP in der Leber [21].

Weiterhin kommt es über die Ausschüttung von PDGF (platelet derived growth factor) und PAF (platelet adhesion factor) zur Migration sowie Proliferation von glatten Muskelzellen in der Intima. Außerdem wird vermutet, dass glatte Muskelzellen ihren Phänotyp verändern können und dadurch Charakteristika inflammatorischer Makrophagen annehmen [23].

Durch die glatten Muskelzellen wird Kollagen gebildet, welches im Laufe der

Atherogenese die fibröse Kappe der Läsion bildet [12].

## 1.2 Bedeutung der Endothelzellen während der Atherogenese

Endothelzellen unterscheiden sich bedeutend in ihrer Aktivität je nachdem ob sie sich im Ruhe- oder im aktivierten Zustand befinden [13].

### **Endothelzellen im Ruhezustand**

Im Ruhezustand üben Endothelzellen als Grenzschiicht zwischen Blut und Media eine Barrierefunktion aus, die durch enge Zell-Zell-Kontakte mit Tight-Junctions sowie Gap-Junctions gebildet wird. Diese Barrierefunktion ist je nach Gefäßtyp (Arterie, Vene, Kapillare) und Lokalisation unterschiedlich ausgeprägt. In den meisten Gefäßen besteht eine dichte Zellbarriere, die eine Diffusion von Albumin oder größeren Proteinen verhindert. Dennoch ermöglichen Endothelzellen einen vesikulären Transport von bestimmten Proteinen [13].

Endothelzellen sezernieren chemische Faktoren und regulieren damit den vaskulären Tonus, Zelladhäsion als auch Gefäßinflammation und Hämostase [13].

Sie bewirken zudem verschiedene anti-koagulatorische Mechanismen und fördern damit die Aufrechterhaltung des Blutflusses [13].

Unter anderem sezernieren sie Tissue-Factor-Pathway-Inhibitoren, welche den Beginn der Gerinnungskaskade inhibieren. Außerdem exprimieren Endothelzellen Heparansulfat-Proteoglykane sowie Thrombomoduline, die über verschiedene Mechanismen in die Gerinnungskaskade eingreifen und antikoagulatorisch wirken [13]. Zudem wird die Aktivierung von Thrombozyten verhindert [13]. Endothelzellen setzen außerdem Stickstoffmonooxid (NO) und Prostaglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) frei, welche die Thrombozytenaggregation sowie -adhäsion inhibieren [13].

NO ist der wichtigste Mediator einer Vasodilatation und bewirkt je nach Synthese einen Anstieg oder einen Abfall des Tonus der glatten Gefäßmuskelzellen.

Im Ruhezustand binden Endothelzellen keine Leukozyten, da sie bestimmte Interaktionsproteine wie P-Selektinen in Vesikeln entfernen und die Transkription von weiteren Adhäsionsmolekülen wie E-Selektin, VCAM und ICAM supprimiert wird [13].

Eine weitere Eigenschaft von Endothelzellen ist die Fähigkeit zur Neoangiogenese also zur Neubildung von Gefäßen. Die Neoangiogeneserate ist bei Erwachsenen meist schwach ausgeprägt, da die Teilungsrate von Endothelzellen sehr gering ist. Sie findet

vorwiegend bei Wundheilungs- oder Reproduktionsprozessen oder beim Tumorwachstum statt [24].

Bei chronisch-inflammatorischen Prozessen wie der Atherosklerose kann es zu einer Neubildung von Kapillaren kommen, was zum Überleben der Immunzellen im Gewebe notwendig ist und eine Konversion der Extrazellulärmatrix in ein Stroma aus Bindegewebe bewirkt [13].

### **Aktivierte Endothelzellen**

Die Aktivierung von Endothelzellen kann in zwei Typen unterteilt werden, die durch ihre zeitliche Ausprägung unterschieden werden können.

Die Typ-1-Aktivierung ist eine schnelle Antwort auf die Bindung eines Liganden an einen heterotrimeren G-Protein-gekoppelten Rezeptor auf der Oberfläche der Endothelzellen [13].

In der Folge wird eine intrazelluläre Signalkaskade eingeleitet, die über eine Calcium-Ausschüttung sowie die Aktivierung und Inhibierung verschiedener Enzyme eine Ausschüttung von PGI<sub>2</sub> sowie NO, eine Expression von P-Selektin sowie eine Öffnung von Tight-Junctions zwischen den Zellen bewirkt. Dadurch erfolgt eine lokale Vasodilatation, sowie eine vereinfachte Adhäsion von Immunzellen und ein mögliches Einströmen von Plasmaproteinen in die Zwischenzellräume [13].

Eine solche Signalkaskade ist zeitlich auf 10-20 Minuten begrenzt, weil danach die Rezeptoren desensitiviert werden, um eine wiederholte Stimulation zu vermeiden [13].

Bei der Typ-2-Aktivierung erfolgt über eine Bindung der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL1 an spezifische Rezeptoren eine intrazelluläre Signalkaskade, die die Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B bewirkt [13].

In der Folge werden Adhäsionsmoleküle wie ICAM, VCAM und E-Selektin exprimiert und PGI<sub>2</sub> sowie Chemokine über Heparansulfatproteoglykane zirkulierenden Leukozyten präsentiert. Außerdem bewirkt die Bindung von TNF- $\alpha$  und IL1 eine Neuorganisation von Aktin- und Tubulinskeletten der Zellen und durch die folgende Öffnung der Zellzwischenräume eine Einschränkung der endothelialen Barrierefunktion [13].

In Bezug auf die Transmigration von Leukozyten erfolgt zunächst eine Rekrutierung und Migration von neutrophilen Granulozyten durch Synthese und Expression von Zytokinen wie CXCL-8. Nach 6 bis 24h wird dann durch die Expression anderer Zytokine wie CXCL-2 eine Transition von Infiltraten reich an neutrophilen Granulozyten zu Infiltraten reich an

mononukleären Zellen bewirkt. Nach 24h kann die Endothelzellaktivierung auch selbst zur Entzündung beitragen. Durch ein Zusammenspiel von  $\text{TNF-}\alpha$ , IL1 und  $\text{IFN}\gamma$  wird zudem eine verstärkte Apoptose von Endothelzellen bewirkt. In der Folge werden wichtige antikoagulatorische Mechanismen der Endothelzellen supprimiert und das Risiko für Thrombusbildung steigt [13].

Eine Typ-2-Aktivierung von Endothelzellen ist langanhaltend und besteht so lange wie aktivierende Zytokine als Stimulus vorhanden sind [13].

Zu Beginn der Atherogenese kommt es in Arealen mit erhöhten biomechanischen Scherkräften, wie zum Beispiel Gefäßaufzweigungen, zur Typ-2-Aktivierung von Endothelzellen mit Ausbildung einer kuboidalen Morphologie und eingeschränkter Barrierefunktion [12, 25].

Verschiedene inflammatorische Stimuli wie oxLDL und Advanced Glycation Endproducts (AGE), proinflammatorische Zytokine wie  $\text{TNF-}\alpha$ , IL1 und Endotoxin sowie der turbulente Blutfluss bewirken anschließend die Aktivierung des intraendothelialen Transkriptionsfaktors  $\text{NF}\kappa\text{B}$  [26].

In der Folge kommt es zur Produktion und Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1, ICAM-1, von Selektinen und von Toll-Like-Rezeptor 2 sowie zur Sekretion von Chemokinen wie MCP-1 und prothrombotischen Mediatoren wie Tissue-Faktor oder von Willebrand-Faktor durch die Endothelzellen [26, 27].

Durch Superoxidanionen wird von Endothelzellen sezerniertes Stickstoffmonoxid vermehrt inaktiviert und außerdem die Bildung von Stickmonoxid durch endotheliale Stickstoffmonoxidsynthetasen inhibiert. Infolgedessen kommt es zu einer Blutdruckfehlregulation [26].

In dieser Arbeit wird der Einfluss von TMAO und Propionat in einem Zellkulturmodell mit humanen aortalen Endothelzellen (HAEC) untersucht, die entweder im Ruhezustand waren oder eine Typ-2-Aktivierung mittels Stimulation mit  $\text{TNF-}\alpha$  oder oxLDL erfahren haben.

### 1.3 Bedeutung von Immunzellen für Atherogenese und Plaquestabilität

Nachfolgend wird auf die in dieser Arbeit untersuchten Monozyten sowie T-Zellen näher eingegangen und es werden die Charakteristika der verschiedenen Zellsubpopulationen

und ihre bisher bekannte Bedeutung für die Pathogenese der Atherosklerose beschrieben.

### **Monozytenfunktion im Menschen**

Monozyten zirkulieren im Blut, im Knochenmark und in der Milz in Homöostase. Zirkulierende Monozyten haben eine Lebensdauer von ein bis drei Tagen. In Folge von Entzündungsprozessen wandern sie zum Ort der Entzündung und migrieren in lymphatische und nicht-lymphatische Gewebe. In diesen differenzieren Monozyten zu langlebigen Makrophagen oder Dendritischen Zellen aus. Gewebe-Makrophagen phagozytieren andere Zellen und toxische Moleküle und schütten außerdem inflammatorische Zytokine aus. Sie stimulieren andere Zellen, die für Wundheilung zuständig sind. Zusätzlich werden Fragmente der phagozytierten Bestandteile als Antigene den T-Zellen präsentiert und somit die sekundäre Immunantwort eingeleitet [28].

### **Monozyten und ihre Subpopulationen**

Monozyten können sowohl in Mäusen als auch in Menschen in Subpopulationen unterteilt werden, denen unterschiedliche Eigenschaften zugeschrieben werden. Die Unterscheidung erfolgt durch verschiedene Antigenprofile, welche unter anderem durch durchflusszytometrische Messung analysiert werden können. Präklinische Studien zu Einflussfaktoren auf Monozyten-Subpopulationen finden meist im Mausmodell statt, weswegen im Folgenden sowohl humane als auch murine Subpopulationen von Monozyten erklärt werden.

### **Murine Subpopulationen der Monozyten**

In Mäusen gibt es Monozyten mit hoher Expression des Ly6C-Oberflächenmarkers (Ly6C-high-Monozyten) und solche mit niedriger Expression des Ly6C-Oberflächenmarkers (Ly6C-low-Monozyten). Ly6C-high-Monozyten sind inflammatorische Monozyten, die sich bei lokalen Infektionen in Geweben ansammeln, in Makrophagen oder Dendritische Zellen ausdifferenzieren, proinflammatorische Zytokine und reaktive Sauerstoffradikale produzieren, Effektor-T-Zell Proliferation stimulieren sowie Reparaturmechanismen im Gewebe vermitteln. Ly6C-low-Monozyten „patrouillieren“ im Blut entlang der Oberflächen von kleinen Gefäßen und detektieren Gewebeschäden durch sterbende oder infizierte Zellen und bewirken ihre Beseitigung [29-31].

## **Humane Subpopulationen der Monozyten**

In Menschen können Monozyten durch die Oberflächenmarker CD14 und CD16 in Subgruppen unterteilt werden. Es gibt klassische CD14<sup>++</sup> (stark positive) und CD16<sup>-</sup> (negative), intermediäre CD14<sup>++</sup> (stark positive) und CD16<sup>+</sup> (positive) sowie nicht-klassische CD14<sup>+</sup> (schwach positive) und CD16<sup>+</sup> (positive) Monozyten. Klassische Monozyten werden als Korrelate zu murinen inflammatorischen Ly6C-high-Monozyten und nicht-klassische als Korrelate zu murinen Ly6C-low-Monozyten gesehen. Intermediäre humane Monozyten haben phänotypische und funktionelle Eigenschaften von klassischen und nicht-klassischen Monozyten, was sowohl pro-inflammatorische als auch immunmodulierende Mechanismen umfasst. Hauptsächlich sind sie zusammen mit klassischen Monozyten mit Atherosklerose assoziiert [29].

## **Monozyten – Bedeutung und Wirkweise bei der Atherogenese**

Ein Charakteristikum der Pathogenese der Atherosklerose ist das Einwandern von inflammatorischen Monozyten in die Intima. Die Monozyten werden durch Macrophage-Colony-stimulating-Faktor (MCS-F), der durch aktivierte Endothelzellen produziert wird, stimuliert und differenzieren in Makrophagen aus [17, 29].

Die Makrophagen exprimieren Scavenger-Rezeptoren, über die sie anschließend oxLDL phagozytieren und damit schrittweise zu Schaumzellen werden. Die Phagozytose von oxLDL aktiviert die Makrophagen, wodurch eine Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren stattfindet, die weitere T-Zellen und Monozyten anlockt. Außerdem präsentieren Makrophagen sowie Dendritische Zellen Antigene des phagozytierten oxLDLs und bewirken so die Aktivierung von eingewanderten T-Zellen. Im Verlauf kommt es zu einer Akkumulation der Schaumzellen und Bildung von „Fatty Streaks“, einer Vorstufe der atherosklerotischen Plaques. In späteren Stadien der Atherogenese bilden die Fatty Streaks den Kern („Core“) der atherosklerotischen Plaques und haben Einfluss auf die Plaquestabilität [17, 29].

## **Makrophagen – Bedeutung für Plaquestabilität**

Die Plaquestabilität kann durch die Eigenschaften der in der Plaque vorhandenen Makrophagen beeinflusst werden. So schütten inflammatorische Makrophagen Matrixmetalloproteasen aus, die eine Verdünnung der fibrinösen Kappe der Plaques auslösen. Außerdem bewirken sie eine verstärkte Zellnekrose in Plaques. Anti-inflammatorische („resolving“) Makrophagen können Plaque-stabilisierend wirken, indem

sie Kollagen sowie Proteine und Lipide für die Gewebereparatur sekretieren und eine Efferozytose initiieren, was die Reinigung des Gewebes von apoptotischen Zellen beschreibt. Eine hohe Konzentration von LDL-Cholesterin im Blut fördert das Vorhandensein von inflammatorischen Makrophagen in Plaques, wohingegen eine niedrige Konzentration von LDL-Cholesterin mit einer erhöhten Anzahl von anti-inflammatorischen Makrophagen assoziiert ist [32].

### **Monozyten – Hämatopoese**

Monozyten entstehen in Knochenmark und Milz aus hämatopoetischen Stammzellen. Der Bildungsprozess umfasst mehrere Vorläuferzellstadien, sogenannte Progenitorzellen. Zunächst werden aus Hämatopoetischen Stammzellen Lymphoide und Myeloide Progenitorzellen gebildet („LP“ und „MP“). Aus den Myeloiden Progenitorzellen werden unter anderem gemeinsame Monozyten, Makrophagen und Dendritische-Vorläuferzellen (Monocytic-Dendritic Progenitor Cells, „MDPs“). Diese entwickeln sich dann im Knochenmark weiter zu Monozyten, in Mäusen vorwiegend des Ly6C-high-Typs [33].

Zusätzlich zu den Monozyten-assoziierten lokalen Mechanismen der Atherogenese gibt es einen Einfluss der Gesamtanzahl von zirkulierenden Monozyten im Organismus, insbesondere der Konzentration von inflammatorischen Monozyten. Eine erhöhte Konzentration von inflammatorischen Monozyten korreliert mit einem erhöhten Risiko für Atherosklerose [32]. Die Mechanismen, die zur Generierung von inflammatorischen Monozyten aus hämatopoetischen Stammzellen führen, sind noch nicht vollständig verstanden, sodass weitere Untersuchungen erforderlich sind.

Zur durchflusszytometrischen Bestimmung von Hämatopoetischen Stammzellen sowie Progenitorzellen werden ausdifferenzierte Zellen mittels eines Lineage-Antikörper-Cocktails ausgeschlossen, indem nur Lineage-negative Zellen selektiert werden. Von diesen sind Hämatopoetische Stammzellen durch eine positive Expression von c-Kit und Sca-1 identifizierbar. MDPs sind c-KIT-positiv, Sca1-negativ sowie CD115- und CD135-positiv [33].

### **Monozyten - Einflussfaktoren auf Hämatopoese**

Es ist beschrieben worden, dass Hypercholesterinämie durch Expansion von Hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark eine Monozytose, vor allem von Ly6C-high-Monozyten, bewirkt [34]. Außerdem konnte eine Aktivierung des sympathischen

Nervensystems, zum Beispiel nach vorangegangenem Myokardinfarkt, mit einer erhöhten Konzentration von Ly6C-high-Monozyten assoziiert werden. Als Ursache dafür wurde eine erhöhte Ausschüttung von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark in die Milz und damit verstärkte extramedulläre Generierung von Ly6C-high-Monozyten hergeleitet [32].

In dieser Arbeit wird der Einfluss von Propionat auf die Balance von pro-inflammatorischen Ly6C-high-Monozyten zu anti-inflammatorischen Ly6C-low-Monozyten untersucht, die, wie beschrieben, eine bedeutende Rolle in der Ausbildung von atherosklerotischen Plaques sowie der Plaquestabilität innehaben. Die Untersuchungen der Monozytensubpopulationen erfolgten in verschiedenen Organen in einem hypercholesterinämischen Mausversuch. Ebenfalls wurden die gemeinsamen Monozyten, Makrophagen und Dendritische-Vorläuferzellen sowie die hämatopoetischen Stammzellen bestimmt.

### **Die Funktion von T-Zellen im Gesunden und bei der Atherogenese**

T-Zellen bilden zusammen mit B-Zellen das adaptive Immunsystem des Menschen.

T-Zellen erkennen präsentierte Antigene und lösen eine spezifische Immunantwort aus. Sie aktivieren B-Zellen und schütten pro- sowie antiinflammatorische Zytokine aus (CD4-positive T-Helferzellen), töten gezielt Zellen (CD8-positive zytotoxische T-Zellen), regulieren und supprimieren Inflammationsprozesse (FoxP3-positive regulatorische T-Zellen) und bilden ein immunologisches Gedächtnis aus (Memory-T-Zellen) [35].

Es konnte festgestellt werden, dass T-Zellen eine substanzielle Zellpopulation in atherosklerotischen Plaques darstellen [21]. Sie sind mit einer geschätzten Makrophagen/T-Zell-Ratio von 4:1 bis 10:1 in atherosklerotischen Läsionen im Menschen nicht so häufig vorhanden wie Makrophagen [17].

Während der Atherogenese werden von Makrophagen in der Intima Chemokine sekretiert, welche eine Rekrutierung von T-Zellen aus der Zirkulation zum Ort der Endothelläsion bewirken [17].

T-Helferzellen sind die wichtigste Population der in atherosklerotischen Plaques vorhandenen T-Zellen und können auf Peptidantigene vorwiegend vom ApoB100-Protein des LDLs reagieren, die von Antigenpräsentierenden Zellen über MHC2 präsentiert werden [21].

ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit einer SCID („Severe Combined Immunodeficiency“), das heißt ohne T-

und B-Zellen zeigten eine verringerte Läsionslast. Dagegen bewirkte der Transfer von LDL-spezifische T-Helferzellen in diesen Mäusen eine deutlich verstärkte Atherogenese [21].

Zytotoxische T-Zellen sind vor allem in frühen Stadien der Läsionsentwicklung vorhanden. Ihnen wird jedoch nur wenig Bedeutung in der Atherogenese zugeschrieben und ihr Vorkommen nimmt in reiferen Plaques ab. Es spielen vor allem Th1-, Th17- und regulatorische T-Zellen eine Rolle, welche im Folgenden näher beschrieben werden [21].

### **Die Bedeutung von Effektor-Th1-Zellen**

Th1-Zellen sekretieren das Zytokin  $\text{IFN}\gamma$ , welches Monozytentransmigration fördert, Makrophagen aktiviert und die Bildung von Schaumzellen moduliert. Außerdem fördert  $\text{IFN}\gamma$  zusammen mit IL-12 die Differenzierung von T-Zellen und stimuliert die Antigenpräsentation durch Immunzellen über eine Hochregulierung von MHC2-Molekülen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es die Proliferation von glatten Muskelzellen sowie Expression von Aktin inhibiert. Durch diese Wirkmechanismen erhöht  $\text{IFN}\gamma$  das Risiko für eine Plaqueruptur. Th1-Zellen stellen somit durch die Ausschüttung von  $\text{IFN}\gamma$  den bedeutendsten pro-atherogenen Zelltyp der T-Helferzellen dar [21].

### **Die Bedeutung von Effektor-Th17-Zellen**

Th17-Zellen sind in geringerer Anzahl als Th1-Zellen in atherosklerotischen Läsionen vorhanden.

Sie sekretieren das Zytokin IL17A, welches auch durch Mastzellen, B-Zellen, neutrophilen Granulozyten und glatten Muskelzellen sezerniert werden kann [17]. Laut einer Studie von Lim et al. (2014) kann die Ausdifferenzierung von Th17-Zellen durch pro-atherogenetische Bedingungen sowie oxLDL induziert werden [36]. Ein Mangel an IL17A in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen führte in verschiedenen Experimenten zu uneinheitlichen Ergebnissen mit vergrößerter, verringerter oder gleichbleibender Läsionsgröße [21]. Als mögliche Erklärungen für diese Beobachtungen können sich Unterschiede in den Darmmikrobiomen, denen eine wichtige Bedeutung in die Induktion von IL17A zugeschrieben wird, oder eine unterschiedliche Wirkung von IL17A in verschiedenen Krankheitsstadien darstellen [21].

Die Verabreichung von anti-IL17A-Antikörpern oder andere IL17A-Blockademechanismen in Mäusen haben zu einer verringerten atherosklerotischen

Läsionsgröße geführt [21] .

In Patienten mit Akutem Koronarsyndrom konnten erhöhte Plasmakonzentrationen von Th17-Zellen und IL17A festgestellt werden. Dabei hatten Patienten mit niedrigen Serumspiegeln von IL17A ein erhöhtes Risiko für weitere kardiovaskuläre Ereignisse. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass IL17A die Kollagenproduktion steigert, weshalb angenommen wird, dass IL17A die Plaquestabilität unterstützt. Zusammenfassend lässt sich Th17-Zellen einerseits eine die atherosklerotische Läsion fördernde Rolle andererseits aber auch eine die Plaquestabilität unterstützende Rolle zuschreiben [21].

### Die Bedeutung von regulatorischen T-Zellen

Eine weitere Zellpopulation in atherosklerotischen Plaques sind regulatorische T-Zellen. Regulatorische T-Zellen können autoreaktive T-Effektorzellen in ihrer Aktivität supprimieren und somit die fortschreitende Atherogenese modulieren [21].

In Mausversuchen konnte gezeigt werden, dass eine Depletion von regulatorischen T-Zellen in Mäusen mit hypercholesterinämischer Diät einer Verstärkung der Atherosklerose bewirkt. Dagegen hat eine Vergrößerung der Population von regulatorischen T-Zellen eine Regression der Atherosklerose sowie eine Erhöhung der Plaquestabilität bewirkt [21].

Die Wirkung von regulatorischen T-Zellen wird laut verschiedenen Studien über die Zytokine IL-10 sowie TGF- $\beta$  vermittelt [21].

TGF- $\beta$  bewirkt eine Stimulation der Kollagenproduktion und damit einen Plaquestabilisierenden Effekt [21].

TH1-Zellen	Th17-Zellen	Reg-T-Zellen
IFN $\gamma$ -Sekretion →Erhöhte Plaquivulnerabilität →Erhöhte Apoptoserate von Endothelzellen	IL17-Sekretion →Erhöhte Plaquestabilität →Größere Läsionen	IL10- sowie TGF $\beta$ -Sekretion →Erhöhte Plaquestabilität →Supprimierung von T-Effektor- Zellen

**Tabelle 1 Übersicht der Zytokinsekretion sowie der wichtigsten Wirkeffekte ausgewählter T-Zellen**

## **Einfluss von Hypercholesterinämie auf T-Zell-Phänotyp und – Differenzierung**

In ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen, einem häufig verwendeten Mausmodell zur Untersuchung von Atherosklerose, welches durch eine frühzeitige Entwicklung von Atherosklerose charakterisiert ist, zeigte sich ein verringerter Anteil an regulatorischen T-Zellen und die regulatorischen T-Zellen waren in ihrer regulierenden Funktion weniger potent [37].

Weiterhin ergaben Studien, dass sich der Phänotyp von T-Zellen in Abhängigkeit der Umgebungsbedingungen verändern kann.

So konnte gezeigt werden, dass regulatorische T-Zellen auf inflammatorische Mediatoren reagieren und phänotypische Eigenschaften von T-Effektorzellen übernehmen können. Eine Progression von atherosklerotischen Plaques führt zu einem Abfall des Anteils von regulatorischen T-Zellen, was auf einen Phänotyp-Switch zurückzuführen sein könnte. In einer Studie mit ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen mit HFD konnte eine Akkumulation von inflammatorischen regulatorischen T-Zellen in atherosklerotischen Plaques festgestellt werden, die IFN $\gamma$  produzierten und deren immunsuppressive Funktionen eingeschränkt waren [32].

Des Weiteren können auch T-Effektorzellen ihren Phänotyp verändern. So konnte gezeigt werden, dass protektive Th17-Zellen, die IL-17 sowie IL-10 produzieren durch inflammatorische Mediatoren wie IL-1 und IL-6 in pathogene Effektorzellen, die IL-17, IL-22 sowie IFN $\gamma$  produzieren, umgewandelt werden können [32].

Die Leber stellt ein wichtiges Organ für die Ausbildung der peripheren T-Zell-Toleranz dar. Es konnte festgestellt werden, dass Hypercholesterinämie in Mäusen sowohl die Anzahl von intrahepatischen regulatorischen T-Zellen als auch die Expression des antiinflammatorischen Zytokins TGF- $\beta$  erhöht. Zusätzlich trägt Hypercholesterinämie bei Vorhandensein von LDL-Rezeptoren zur Differenzierung von Th1- und Th17-Zellen bei. Insgesamt überwiegt bei Hypercholesterinämie die Differenzierung der regulatorischen T-Zellen gegenüber der Differenzierung der T-Effektorzellen [32].

Weiterhin argumentieren Tabas et al. (2017), dass die proinflammatorischen Effekte der Hypercholesterinämie auf Makrophagen und Dendritische Zellen die suppressive Funktion von regulatorischen T-Zellen übertreffen, oder dass die regulatorischen T-Zellen in der atherosklerotischen Läsion durch das proinflammatorische Milieu einen Th1-Zellen-ähnlichen Phänotypen annehmen [32].

## **Die Bedeutung der Balance von regulatorischen T-Zellen und Effektor-T-Zellen für Plaquestabilität**

Zusammenfassend ist die Balance von Effektor-T-Zellen wie vorwiegend Th1- und Th17-Zellen sowie von regulatorischen T-Zellen essenziell für die Progression von atherosklerotischen Läsionen sowie die Plaquestabilität.

Ein Überwiegen von Effektor-T-Zellen oder regulatorischen T-Zellen mit Effektor-Phänotyp hat eine Progression der Atherosklerose zur Folge, wohingegen ein Überwiegen von regulatorischen T-Zellen die Progression der Atherosklerose verlangsamen sowie die Plaquestabilität erhöhen kann [32].

In dieser Arbeit wird der Einfluss von Propionat auf die Balance von regulatorischen T-Zellen und Effektor-T-Zellen als wichtiger Faktor für Progression von Atherosklerose und Plaquestabilität in verschiedenen Organen in einem hypercholesterinämischen Mausversuch untersucht.

### **1.4 Darmmikrobiom und Bedeutung seiner Metabolite für die Atherogenese**

Im Folgenden wird eine Übersicht über den aktuellen Kenntnisstand zu Grundlagen und Bedeutung des Darmmikrobioms gegeben. Im Anschluss erfolgt eine Zusammenfassung bekannter Stoffwechselwege und Wirkmechanismen von TMAO und SCFA, bei denen der Schwerpunkt auf Propionat gelegt wird.

#### **Aufbau und Funktion des Darmmikrobioms**

Das Darmmikrobiom besteht aus mehr als 100 Billionen Bakterien, von denen 90 % den beiden Bakterienphylae *Firmikutes* und *Bacteroides* zuzuordnen sind. Des Weiteren sind *Aktinobakterien*, *Cyanobakterien*, *Proteobakterien* und *Verrumikrobien* vorhanden [38]. Der Dickdarm bildet mit einer Bakteriendichte von  $\sim 10^{12}$  Keimen pro ml den mit Bakterien am dichtesten besiedelten Bereich des menschlichen Körpers [39].

Die Diversität des Darmmikrobioms ist auf Speziesebene sehr groß. Es konnten pro Fäzesprobe durch die Verwendung von Hochdurchsatztechnologien wie der 16S rRNA-Sequenzierung oder der Metagenomanalyse 100-200 dominante Spezies gefunden werden. Insgesamt wurden mehr als 1000 Spezies entdeckt [39].

Die untersuchten hochkomplexen Darmmikrobiome können mit verschiedenen Variablen beschrieben werden, um die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Individuen zu

gewährleisten. Die alpha-Diversität beschreibt die Diversität eines gegebenen Mikrobioms mit Hilfe der Anzahl der Spezies und ihren Anteilen am Gesamtmikrobiom. Die beta-Diversität beschreibt die Unterschiedlichkeit der Mikrobiota zwischen verschiedenen Proben (verschiedene Personen und Zeitpunkte) [39].

Für die gesunde Interaktion zwischen Darmmikrobiom und Wirtsorganismus ist eine hohe alpha-Diversität sowie Existenz grundlegender bakterieller Funktionen entscheidend [39]. Das Darmmikrobiom stellt in gesunden Individuen einen wichtigen Regulator für die intestinale Homöostase dar. Es kann durch verschiedene Lebensstil- sowie Umweltfaktoren modifiziert werden, wie die vom Menschen durchgeführten Hygienemaßnahmen, Antibiotika-Therapien oder den Ernährungsstil. Eine „Western Diet“ mit geringem Faseranteil und großem Fett- und Zuckeranteil ist mit einer Dysbalance des Darmmikrobioms assoziiert, die zu chronischer Inflammation und metabolischer Dysfunktion führen kann [40].

Beispiele für das Vorhandensein einer mikrobiellen Dysbalance sind chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa), wobei noch unklar ist, ob die Dysbalance eine Ursache oder Folge der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ist [40].

Studien an Menschen und im Tiermodell haben Assoziationen zwischen der Zusammensetzung des Darmmikrobioms und der Ausbildung von Adipositas sowie Diabetes und in Folge Atherosklerose gezeigt [40].

Die Diät ist ein wichtiger Modulator der Zusammensetzung und Diversität des Darmmikrobioms.

Es konnte gezeigt werden, dass die Einnahme einer besonders faserreichen oder faserarmen Diät über 10 Tage bereits nach ein bis zwei Tagen eine Verschiebung in der Zusammensetzung und Funktion des Darmmikrobioms bewirkt [41].

Dennoch sind langfristige Ernährungsgewohnheiten entscheidend, da sich die grundlegenden Eigenschaften und die Klassifikation des Darmmikrobioms durch kurzfristige Diätänderungen nicht verändern lassen [41].

Weiterhin wirken Diätänderungen individuell unterschiedlich, was auf das Vorkommen bestimmter Bakterientaxa in den jeweiligen Individuen zurückgeführt wird. So wurde in einer Studie mit 14 adipösen Männern bei einer Mehrheit der Probanden bei einer Diät mit resistenter Stärke ein Wachstum der *Ruminokokkus bromii*-Taxa beobachtet. Das in wenigen Probanden ausbleibende Wachstum wurde durch das fehlende Vorkommen der

*Ruminokoccus bromii*-Taxa vor Beginn der spezifischen Diät erklärt [41].

Mäuse mit depletiertem Darmmikrobiom entwickeln bei einer Diät mit hohem Sukrose- und Fettanteil keine Adipositas. Dagegen bewirkt der Transfer des Darmmikrobioms von Mäusen auf HFD in gnotobiotischen Mäusen die Ausprägung eines adipösen Phänotyps [41].

Bei reduziertem oder fehlendem Sukrose-Anteil in der Diät bilden gnotobiotische Mäuse dennoch Adipositas aus. Außerdem hat der Sättigungsgrad des Fetts in der Diät Einfluss auf die Zusammensetzung des Darmmikrobioms und damit auf die Entwicklung eines adipösen Phänotyps. Es konnte gezeigt werden, dass eine Diät mit ungesättigten Fetten vor der Entwicklung von Adipositas in Mäusen schützt [41].

Zusammenfassend zeigt sich in Mausversuchen mit HFD die Notwendigkeit eines intakten Darmmikrobioms für die Ausbildung einer Adipositas [41].

### **Der Metabolit cholinreicher Nahrung TMAO**

In einer Metabolom-Studie von Wang et al. im Jahr 2011 konnten Trimethylamin-*N*-oxid (TMAO), Cholin und Betain als Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen identifiziert werden [42]. In der Folge konnte festgestellt werden, dass phosphatidylcholinreiche Nahrung wie rotes Fleisch sowie Milchprodukte zunächst in Cholin und dann durch das Darmmikrobiom in Trimethylamin (TMA) umgewandelt wird. Das TMA wird in der Leber von hepatischen Flavinmonooxygenasen (FMO) in TMAO umgewandelt und in die Blutzirkulation abgegeben.

Weiterhin zeigte sich, dass das in rotem Fleisch reichlich vorhandene L-Carnitin ähnlich wie Cholin vom Darmmikrobiom in TMA umgewandelt wird [43].

Wang et al. stellten die Notwendigkeit des Darmmikrobioms für die Umwandlung von Cholin und L-Carnitin in TMA fest, indem sie gnotobiotische Mausmodelle verwendeten. Diesen fehlte die Fähigkeit zur Umwandlung von Cholin und L-Carnitin in TMA [42].

Die Konzentration von TMAO im menschlichen Plasma beträgt etwa 3 µMol/l in gesunden Probanden sowie bis zu 40 µMol/l in Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. TMAO wird vorwiegend über die Niere ausgeschieden [44]. In klinischen Studien wurden eine erhöhte Serum-Konzentration von TMAO als unabhängiger Risikofaktor für erhöhte kardiovaskuläre Morbidität festgestellt [44]. In verschiedenen *in-vitro* und *in-vivo* Studien wurden Mechanismen entdeckt, über die TMAO einen Beitrag zur Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen liefern kann [44].

Eine Studie mit Mäusen aus dem Jahr 2015 hat gezeigt, dass die Läsionsgröße der

atherosklerotischen Plaques in der Aorta positiv mit dem Plasmaspiegel von TMAO korreliert ist, aber invers mit Cholin korreliert. Bei Behandlung der Mäuse mit Antibiotika wurden eine Reduktion der Anzahl von Makrophagen sowie der Schaumzellbildung beobachtet. Allerdings hatten verschiedene Konzentrationen von TMAO in vitro keinen Effekt auf die Anzahl an Makrophagen sowie Schaumzellbildung [45].

Ein möglicher Wirkmechanismus von TMAO ist die Darmmikrobiom-abhängige Inhibition des reversen Cholesterintransports. Der genaue Mechanismus ist allerdings noch unklar [45].

Das Geschlecht wird als weiterer wichtiger Faktor für die Bedeutung von TMAO als Risikofaktor für Atherosklerose gesehen. Das weibliche Geschlecht zeigte sowohl bei Menschen als auch Mäusen eine erhöhte Expression von FMO3 und somit eine verstärkte Generierung von TMAO in der Leber [45].

TMAO konnte in Mausversuchen eine Thrombozytenhyperreaktivität und in der Folge ein erhöhtes Risiko für thrombotische Ereignisse bewirken [46].

Zhu et al. (2016) beschreiben eine durch TMAO verstärkte Calciumausschüttung in Thrombozyten und in der Folge verstärkte Aktivierung von Thrombozyten. Sie beobachteten in einem Thrombose-Mausmodell verstärkte Thrombusbildung bei einer Behandlung mit TMAO [46].

### **Kurzkettige Fettsäuren als Fermentationsprodukte faserreicher Nahrung**

Eine faserreiche Diät, die zum Beispiel Ballaststoffe oder unverdauliche Stärke enthält, kann im Intestinum tenue des Menschen nicht absorbiert werden, wird allerdings im proximalen Kolon durch das Darmmikrobiom zu kurzkettigen Fettsäuren (Short Chain Fatty Acids, kurz SCFA) fermentiert [47]. Als kurzkettige Fettsäuren werden Fettsäuren mit 2 bis 6 Kohlenstoffatomen beschrieben. Wichtige kurzkettige Fettsäuren sind Acetat (C2), Propionat (C3) und Butyrat (C4).

Acetat und Propionat werden vorwiegend von Spezies der *Bakteroidetes* produziert, wohingegen Butyrat durch *Firmikutes* generiert wird [40].

Die Konzentration von SCFA ist im proximalen Teil des Kolons am höchsten, da dort die Bildung stattfindet und ein Großteil der SCFA durch Kolonepithelzellen absorbiert wird. Nur etwa 5% der SCFA werden mit dem Fäzes ausgeschieden [48]. Die Daten zur Konzentration von SCFA im Menschen sind meist nur von Patienten mit Operationen im Darmbereich oder aus Fäzes-Proben gewonnen, da im proximalen Kolon bei gesunden Menschen eine Probenentnahme unmöglich ist.

Laut aktueller Studienlage erfolgt die Wirkung von SCFA vorwiegend über zwei Mechanismen, einerseits durch Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auf verschiedenen Zelloberflächen sowie andererseits durch eine Inhibition der Histondeacetylierung (HDAC-Inhibition).

SCFA können über die Rezeptoren FFAR2 (=GPR43), FFAR3 (=GPR41), GPR109A sowie OlfR78 an Darmepithelzellen sowie andere Zellarten binden und werden über Transportproteine der MCT-Familie oder SMCT1 in die Epithelzellen aufgenommen. Durch einen Konzentrationsgradienten zwischen Epithelzellen und Blut diffundieren die SCFA in die Blutzirkulation. Butyrat ist durch  $\beta$ -Oxidation die wichtigste Energiequelle der Darmepithelzellen [49, 50].

Kurzkettige Fettsäuren sind außerdem eine wichtige Energiequelle des gesamten Organismus mit einem durchschnittlichen Anteil von etwa 5-10% an der Gesamtenergie [51].

Acetat bildet den größten Anteil an den kurzkettigen Fettsäuren, wohingegen Butyrat den kleinsten Anteil bildet [47].

Die Konzentration von SCFA ist in der Portalvene am höchsten und nimmt nach Verstoffwechslung in der Leber stark ab. Dennoch sind geringe Konzentrationen aller SCFA in der Blutzirkulation nachweisbar [47].

### **Propionat**

Propionat ist die zweithäufigste SCFA im proximalen Kolon und wird wie die anderen SCFA zu 90% von Darmepithelzellen absorbiert. Es wird in großen Teilen in der Leber metabolisiert und ist deshalb in der Blutzirkulation in geringeren Konzentrationen vorhanden als Acetat [47].

Die systemische Konzentration von Propionat beträgt etwa 5  $\mu$ M, wogegen die Konzentration in der Portalvene etwa mit 88  $\mu$ M angegeben wird [47].

Es existieren 3 Reaktionswege für die Bildung von Propionat durch Fermentation von Kohlenhydraten. Der Succinat-Reaktionsweg beschreibt die Konversion von Succinat über Methylmalonyl-CoA nach Propionat. Beim Acrylat-Reaktionsweg wird Propionat aus Laktat über das Zwischenprodukt Acrylat gebildet. Außerdem kann Propionat beim Propanediol-Reaktionsweg aus Desoxyhexose-Zuckern gebildet werden [52].

Die Mechanismen, wie genau SCFA zelluläre Prozesse beeinflussen sind noch nicht vollständig verstanden. Es konnten mittlerweile zwei Mechanismen identifiziert werden; Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, sogenannte Freie Fettsäuren-

Rezeptoren, sowie HDAC-Inhibition [50, 53].

### **Bindung an Free Fatty Acid Rezeptoren oder OlfR78**

Propionat kann an die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren FFAR2 und FFAR3 binden und dadurch intrazelluläre Signalkaskaden bewirken. FFAR2 wird vorwiegend durch Propionat und Acetat aktiviert und befindet sich auf der Oberfläche von Darmepithelzellen, verschiedenen Leukozyten im Kolon und im Dünndarm (einschließlich regulatorischer T-Zellen), Adipozyten, Skelett-, Herz- und Milzzellen [52].

Die mittlere effektive Konzentration der FFAR2 beträgt 250-500  $\mu\text{M}$  für Propionat und Acetat. Die geschätzte Konzentration der beiden kurzkettigen Fettsäuren ist mit 10 bis 100 mM im Kolon deutlich höher, aber es wird von einem SCFA-Gradienten ausgegangen, der durch die Mukusschicht im Kolon generiert wird. Aus diesem Grund gehen Koh et al. (2017) von einem biorelevanten Intervall der Konzentrationen der SCFAs aus, um den FFAR2 zu aktivieren [52].

Laut Verbeke et al. bewirkt Propionat eine Reduktion der Lipogenese sowie eine Inhibierung der Cholesterinsynthese. Dies wird durch eine Bindung von Propionat an FFAR2 in Lipozyten erklärt [54].

Es konnte gezeigt werden, dass FFAR2-KO-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen einen adipösen Phänotyp entwickeln. Dieser Effekt konnte durch die Behandlung beider Gruppen mit Antibiotika aufgehoben werden, was die Bedeutung des Darmmikrobioms für die Generierung von SCFA und der daraus folgenden Wirkmechanismen demonstrierte [52, 54].

Der FFAR3 wird von allen SCFA aktiviert, wobei Propionat den stärksten Aktivator darstellt. Die mittlere effektive Konzentration für Propionat beträgt 12-274  $\mu\text{M}$ . Der FFAR3 befindet sich auf der Oberfläche von Darmepithelzellen, Leukozyten, Adipozyten, Milz-, Knochenmark- und Pankreaszellen sowie auf Zellen in Lymphknoten, des periportalen afferenten Systems sowie des peripheren und enterischen Nervensystems [52].

Es konnte gezeigt werden, dass die Produktion des Sättigungshormons Peptid YY FFAR3-abhängig abläuft [52].

In einer Studie am Menschen führte die einmalige Verabreichung von Inulin-Propionatester, welches vom Darmmikrobiom zu Propionat verstoffwechselt werden kann, zu einem erhöhten postprandialen Spiegel von Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1) und Peptid YY (PYY) und zu einer reduzierten Kalorienaufnahme. Eine Langzeit-Verabreichung von Inulin-Propionatester hatte eine signifikante Reduktion der

Gewichtszunahme zur Folge [52, 55].

Es konnte gezeigt werden, dass Propionat eine reduzierte Motilität des Kolons bewirkt, aber die sekretorische Aktivität sowie die Anzahl von Neuronen, die auf Vasoaktives Intestinales Peptid reagieren, erhöht [52]. Zudem bewirkte Propionat durch Bindung auf FFAR3 auf Zellen des peripheren Nervensystems eine Sympathikusaktivierung durch eine Freisetzung von Noradrenalin. Dies führte zu einem erhöhten Energieverbrauch und einer erhöhten Herzfrequenz [52].

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine faserreiche Diät und eine erhöhte Produktion von Propionat einen protektiven Effekt gegen allergische Lungenerkrankungen wie Asthma haben. Propionat induzierte über FFAR3 die Hämatopoese Dendritischer Zellen, die in das Lungengewebe migrierten und bewirkte eine reduzierte Th2-Effektorfunktion [56].

In einer Studie von Pluznick et al. (2014) konnte ein weiterer G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der Olfactory Rezeptor 78 (OlfR78), als Bindestelle von Propionat identifiziert werden. OlfR78 befindet sich auf Nierenzellen sowie glatten Muskelzellen der Gefäße. Die mittlere effektive Konzentration von OlfR78 liegt bei 920  $\mu\text{M}$  für Propionat und somit höher als bei FFAR2 und FFAR3 [57, 58].

In Mausversuchen konnte eine verstärkte Reninfreisetzung der Nierenzellen durch Aktivierung der OlfR78 und somit eine Blutdrucksenkung in einem Intervall von Stunden bis Tagen festgestellt werden. Zudem wurde bei intravenöser Verabreichung von Propionat eine kurzfristige Blutdrucksenkung beobachtet, die auf eine Modulation des vaskulären Tonus durch ein Zusammenspiel der Wirkung von Propionat über OlfR78 sowie FFAR3 erklärt wird. Weitere Studien sind hier notwendig, um die Lokalisationen und Wirkmechanismen der FFAR2 und 3 zusammen mit OlfR78 zu erklären [57, 58].

### **HDAC-Inhibition**

Im Mausversuch konnte gezeigt werden, dass sowohl eine orale als auch eine rektale Verabreichung von Propionat eine extrathymische De-novo-Synthese von regulatorischen T-Zellen bewirkt [59].

Dies wird auf eine HDAC-Inhibition durch Propionat zurückgeführt. Die Histon-Acetylierung ist ein wichtiger Prozess, der für die Aktivität der Gentranskription entscheidend ist. So wird im Acetylierungsstatus durch Konformationsänderungen der Chromatinstrukturen die Erreichbarkeit der Transkriptionsmaschinerie erhöht, wohingegen eine Deacetylierung das Gegenteil bewirkt.

HDAC-Inhibitoren werden für Krebstherapien benutzt und zeigen anti-inflammatorische und immunsuppressive Eigenschaften. Die verstärkte De-novo-Synthese von regulatorischen T-Zellen durch Behandlung mit Propionat wird durch eine Acetylierung im FoxP3-Lokus erklärt, was in einer verstärkten FoxP3-Induktion resultierte [52, 59].

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Propionat und Butyrat Substrate der intestinalen Glukoneogenese sind [52]. Propionat stellt zudem ein Substrat der hepatischen Glukoneogenese dar [52].

Die im Darmepithel generierte Glukose kann in der Portalvene von peripheren Nervenzellen über FFAR2 registriert werden und es wird durch eine Signalkaskade zwischen Darm und Hirn eine erhöhte Insulinsensitivität sowie Glukosetoleranz erzeugt [52, 54, 60].

Wirkmechanismus	Mittlere effektive Konzentration	Wichtigste Wirkeffekte
Bindung FFAR2	250-500µM	- Reduktion der Lipogenese - Inhibition der Cholesterin-Synthese
Bindung FFAR3	12-274µM	- Erhöhte Produktion des Sättigungshormons Peptid YY - Sympathikusaktivierung - Reduzierte Th2-Funktion
Bindung Olf78	920µM	- Verstärkte Reninfreisetzung
HDAC-Inhibition		- Verstärkte de-Novo-Synthese von regulatorischen T-Zellen

**Tabelle 2 Zusammenfassung bekannter Wirkmechanismen und Wirkeffekte durch Propionat**

### 1.5 Fragestellungen dieser Arbeit

In dieser Arbeit werden die Einflüsse der beiden Metaboliten des Darmmikrobioms, TMAO und Propionat, auf die endotheliale Physiologie in Zellkulturexperimenten sowie auf den Immunphänotyp (Verteilung von Monozyten- und T-Zellpopulationen) in

Mausversuchen untersucht.

Die drei genannten Zellarten sind, wie in der Einleitung ausführlich beschrieben, wichtige Faktoren der Atherogenese, und Veränderungen ihrer Funktionalität sowie Anzahl und Verteilung im Organismus können eine pro- oder anti-atherogene Wirkung haben.

### **Fragestellungen zum Einfluss von TMAO**

Zum Metabolit TMAO wurden zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit bereits einige Studien, die den Einfluss von TMAO auf die Endothelzellfunktion untersucht haben, veröffentlicht. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Schwerpunkt auf die Untersuchung der Wirkung von TMAO auf Monozytendifferenzierung und Monozyten-Endothelzellinteraktion gelegt.

Es sollte der Einfluss von TMAO auf Monozyten- sowie Monozytenprogenitorzell-Populationen in vivo (Mausmodell mit SPF- und gnotobiotischen Mäusen) und in vitro (Zellkultur HAEC, THP1-Monozyten) untersucht werden, wobei folgende Fragen beantwortet werden sollten:

1. Bewirkt eine cholinreiche Diät bei Mäusen über eine erhöhte Produktion und Zirkulation von TMAO eine Verschiebung zu pro-inflammatorischen Monozyten in Blut und im Knochenmark?
2. Kann dieser Effekt durch eine Depletion des Darmmikrobioms der Mäuse supprimiert werden?
3. Bewirkt eine cholinreiche Diät bei Mäusen einen veränderten Anteil von Hämatopoetischen Zellen sowie Monozytenprogenitorzellen im Knochenmark und kann dieser Effekt durch eine Depletion des Darmmikrobioms supprimiert werden?
4. Bewirkt eine TMAO-Behandlung von Monozyten eine stärkere Monozytenadhäsion an Endothelzellen bei inflammatorischen Experimentalbedingungen (Stimulation mit TNF- $\alpha$ )?

### **Fragestellungen zum Einfluss von Propionat**

Der Metabolit Propionat wurde in bisherigen Studien meist im Zusammenhang mit den beiden anderen SCFA, Butyrat und Acetat, untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von Propionat auf Monozyten-, Monozytenprogenitorzell-Populationen und T-Zellen (Tregs, Th1 und Th17) in einem hypercholesterinämischen Mausmodell sowie auf Endothelzellen und Monozyten in vitro

(Zellkultur HAEC, THP1-Monozyten) untersucht. Für die in vivo-Experimente wurden Proben aus Vollblut, MLN, Milz, Knochenmark und Leber analysiert, um die verschiedenen für die Wirkung von Propionat bedeutsamen Kompartimente zu berücksichtigen.

Folgende Fragen sollten in dieser Arbeit beantwortet werden:

1. Bewirkt Propionat bei Mäusen unter HFD eine Verschiebung von pro-inflammatorischen Ly6C-high-Monozyten zu protektiven Ly6C-low-Monozyten sowie einen verringerten Anteil von Monozyten an allen Leukozyten im Blut und in den mesenterialen Lymphknoten?
2. Verursacht Propionat eine Verschiebung von pro-inflammatorischen zu protektiven Monozyten durch eine veränderte Produktion von Monozyten im Knochenmark (Monozyten Knochenmark, Monozytenprogenitorzell-Populationen)?
3. Verursacht Propionat bei Mäusen unter HFD eine Verschiebung von inflammatorischen Th1-und Th17-Zellen zu Tregs?
4. Kann Propionat bei HAEC unter inflammatorischen Experimentalbedingungen (Stimulation mit TNF- $\alpha$ ) eine Reduktion der Expression von Adhäsionsmolekülen (VCAM, ICAM) bewirken?
5. Führt Propionat bei HAEC zu einer verringerten Monozytenadhäsion bei inflammatorischen Experimentalbedingungen (Stimulation mit TNF- $\alpha$ )
6. Führt Propionat bei HAEC unter inflammatorischen Experimentalbedingungen (Stimulation mit TNF- $\alpha$ ) zu einem reduzierten Anteil von apoptotischen HAEC?

## 2. Materialien und Methodik

### 2.1 Materialien

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Fetale Bovine Serum (FBS)	Hybone Thermo-Scientific
Penicillin/Streptomycin	Hybone Thermo-Scientific
Trypsin-EDTA	Thermofisher
Trypanblau	Biochrome
Calciumpropionat	Sigma
Trimethylaminoxid (TMAO)	Sigma
DNase 1	SERVA
Ionomycin Calcium Salz	Sigma
Monensin	Invitrogen Thermo Fisher
PMA	Sigma
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH
TNF- $\alpha$	Sino Biological Inc.
EDTA	Carl Roth GmbH
MilliQ-Wasser	Merckmillipore

<b>Lösungen</b>	<b>Hersteller</b>
Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (PBS) - modified wo Calcium, chloride and magnesium	Sigma
Annexin-Binding Buffer	Biolegend
Percoll	GE Healthcare
Erythrozyten-Lysis-Buffer	1:10 Verdünnung mit Aqua dest. von 10x Erythrozytenlysis-Buffer (aus 8,26g Ammoniumchlorid, 1,19g Natriumbicarbonat und 200 $\mu$ l of EDTA [0.5M, pH8], aufgefüllt mit Aqua dest. auf 100ml und auf einen pH-Wert von 7,3

	adjustiert sowie sterilfiltriert)
Fixierlösung	PBS mit 1% PFA
Stopplösung	PBS mit 10% FBS
Flow Cytometry Staining Buffer	Thermofisher
Permeabilization Buffer (Permbuffer)	Thermofisher
Fix/Perm-Lösung	Thermofisher

<b>Zellkulturmedien</b>	<b>Zusammensetzung und Hersteller</b>
Kulturmedium für HAEC	Endothelial Growth Medium 2 (Lonza oder Promocell) Mit Supplements (hEGF -2,5, HC-100, VEGF-0,25, hbFGF-5, R3-IGF-1, Hep-11.25, AA-500) sowie 10% FBS
Starvation-Medium für HAEC	EBM2 ohne Phenolrot (Lonza) ohne Supplements mit 0,5 % FBS
Kulturmedium für THP1-Monozyten	RPMI high Glucose (Lonza) Ohne Supplements mit 10% FBS und Antibiotikum (1% Pen. / Strep.)
Isolationsmedium für Zellen im Mausversuch	RPMI mit Glutamin, 5 % FBS

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Sterifilter 0,2 µm	Kisker Biotech
70 µm Cell Strainer	MACS Miltenyi Biotech

<b>Geräte und Software</b>	<b>Hersteller</b>
Fluoreszenzmikroskop	Keyence
Attune Nxt Sequencing Flow Cytometer	Thermofisher
Phasenkontrastmikroskop	Motic AE 2000
Kaluza Analysis 1.5A	Beckman Coulter

<b>Versuchsdiäten für Mausversuche</b>	<b>Zusammensetzung, Hersteller und Produktnummer</b>
CD (Gammabestrahlt und somit steril)	11 kJ% Fett, 23kJ% Protein, 66kJ% Kohlenhydrate, Sniff, E15000-047
HFD (Gammabestrahlt und somit steril)	60 kJ% Fett, 20 kJ% Protein, 20kJ% Kohlenhydrate, Sniff, E15741-347
Cholinreiche Diät (Gammabestrahlt und somit steril)	CD + 13000 mg/kg Cholin, Sniff, S8090-E710

<b>Antikörper für Durchflusszytometrie</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-human AnnexinV AF647	Biologend
Anti-human Sytox Blue Dead Cell Stain	Thermofisher
Anti-human VCAM (CD106) FITC	BD Pharmingen
Anti-human ICAM (CD54) PE	BD Pharmingen
CFSE Cell Trace	Molecular Probes Invitrogen
Anti-mouse Ly6C (Gr1) PerCp/Cy.5.5	Biologend
Anti-mouse CD11b BV711	Biologend
Anti-mouse CD115 AF488	Biologend
Anti-mouse CD117 (c-Kit) APC	Biologend
Anti-mouse Ly-6A/E (Sca-1) APC/Cy7	Biologend
Anti-mouse CD135 (Flk-2, Flt3, Ly-72) PE	Biologend
Anti-mouse Lineage-Cocktail (Lin-1) Pacific Blue	Biologend
Anti-mouse IFN $\gamma$ APC	BD Pharmingen
Anti-mouse IL17A PE	BD Pharmingen
Anti-mouse CD4 FITC	eBioscience
Anti-mouse CD25 APC	Invitrogen
Anti-mouse FoxP3 PE	eBioscience
Anti-mouse FC-Blocker CD16/32	eBioscience

## 2.2 Zellkultur

### 2.2.1 Verwendete Zelllinien

Für die Zellkultur-Experimente wurden humane aortale Endothelzellen (HAEC) sowie humane Monozyten der Zelllinie THP1 verwendet.

### 2.2.2 Kultivierung und Passagierung von HAEC

#### **Spender-Charakteristika der HAEC und Nährmedium**

Die HAEC stammten von zwei Spendern (Spender 1: 20 Jahre, Hispanic, männlich, BMI 21,4, keine Vorerkrankungen; Spender 2: 21 Jahre, Kaukasier, männlich, BMI 26,8, keine Vorerkrankungen; beide von Cell Systems). Die Zellen wurden von der Medizinisch-technischen Assistentin bis zur 5. Passage hochgezogen und in den Passagen 7 bis 9 für die Experimente verwendet. Die HAEC wurden in Endothel Cell Growth Medium (Lonza oder Promocell) mit 10% FBS mit den mediumspezifischen Supplements (hEGF, HC, VEGF, hbFGF, R3-IGF, Hep., AA-500) kultiviert. Das EGM2-Medium wird im Anschluss als Vollmedium bezeichnet.

#### **Mediumwechsel**

Alle zwei bis drei Tage fand ein Mediumwechsel statt.

Dazu wurde das alte Medium aspiriert, die Zellen mit 10ml warmen PBS gewaschen, und im Anschluss erwärmtes Vollmedium hinzugefügt.

#### **Passagierung der HAEC**

Nach Erreichen einer 70-80 %igen Konfluenz erfolgte die Passagierung der Zellen. Dazu wurde das Medium aspiriert und die Zellen mit 10 ml warmen PBS gewaschen. Anschließend wurde das PBS aspiriert und 3 ml Trypsin-EDTA hinzugefügt. Die Zellen wurden für 2-3 Minuten inkubiert und bei im Mikroskop sichtbarer Abrundung und Ablösung von der Zellkulturflasche unmittelbar darauf mit 7 ml Vollmedium inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension für 7 Minuten bei 300g bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand wurde aspiriert. Daraufhin wurde das Zellpellet in 4ml Vollmedium resuspendiert und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt.

## **Zellzählung**

Die Zellsuspension wurde durch mehrmaliges hoch- und runter pipettieren gut vermischt und es wurden 20 µl Zellsuspension in eine 96 Well-Plate aufgetragen. Im Anschluss wurden 20 µl Trypan-Blau hinzugefügt und das Gemisch in die Zwischenebene zwischen Neubauer-Kammer und Objektträger gegeben. Im Anschluss wurden Zellen, die kein Trypan-Blau aufgenommen hatten und somit vital waren, nach Standardprotokoll gezählt und es wurde die Gesamtzellzahl unter Berücksichtigung der erfolgten Verdünnungsschritte berechnet.

## **Starvation**

Um eine Synchronisation der Zellaktivität vor Beginn eines Experiments zu erreichen und den Einfluss von bestimmten Wachstumsfaktoren zu vermeiden wurde ein Starvation-Medium verwendet, das aus EBM2 mit 0,5 % FBS aber ohne Phenolrot (Lonza) und ohne mediumspezifische Supplements zusammengesetzt wurde.

### 2.2.3 Kultivierung und Passagierung von THP1-Monozyten

Außerdem wurde die humane Monozyten-Zelllinie THP1 kultiviert. Diese wurde bei einer Zelldichte bis maximal  $7 \times 10^5$  Zellen/ml Medium inkubiert, um eine Differenzierung in adhärenzte Makrophagen zu verhindern. Als Kulturmedium wurde RPMI mit hohem Glucose- und FBS-Anteil verwendet (RPMI 10% FBS (Lonza) mit 1% Penicillin / Streptomycin).

Da die THP1-Monozyten eine schnell wachsende Suspensionszelllinie sind, wurden bei Erreichen einer zu hohen Zelldichte Teile der Zellsuspension verworfen und die übrige Zellsuspension mit frischem Medium verdünnt.

### 2.2.4 Calciumpropionat im Medium

Für die Versuche mit Propionat wurden Zellmedien mit Konzentrationen von 150 µM oder 300 µM Calciumpropionat (nachfolgend als Propionat bezeichnet) verwendet. In Vorstudien wurde gezeigt, dass eine Konzentration von 150 µM Einfluss auf die Polarisierung von regulatorischen T-Zellen hat [61]. Dies entspricht einem Konzentrationsbereich von Propionat, der die mittleren effektiven Konzentrationen der FFAR einschließt [52].

Zur Generierung einer Stocklösung mit 100 mM Propionat wurden 931,1 mg Propionat

mit einem Magnetrührer für 30 Minuten in 50 ml MilliQ-Wasser aufgelöst. Die entstehende Lösung wurde im Anschluss sterilfiltriert (Sterifilter 0,2 µm). Zusätzlich wurde MilliQ-Wasser (ultrafiltriertes Wasser, Millipore) als Kontrollmedium ebenfalls sterilfiltriert. Im Anschluss wurde durch Verdünnung mit sterilem MilliQ-Wasser weitere Stocklösungen mit 15mM oder 30 mM Propionat erstellt. Für Anwendung in Zellkultur-Experimenten wurden je 10 µl pro ml Medium verwendet, um eine Konzentration von 150 µM oder 300 µM Propionat im Medium zu generieren.

### 2.2.5 TMAO im Medium

Für die *in-vitro* Versuche mit TMAO wurde eine Konzentration von 200 µM TMAO im Medium verwendet. Diese Konzentration basiert auf anderen Studien, in denen TMAO in Zellkulturversuchen verwendet wurde [43, 62].

Zur Erzeugung einer 1 molaren TMAO-Lösung wurde 1g TMAO in 13,314 ml sterilem MilliQ-Wasser aufgelöst. Durch Verdünnung mit sterilem MilliQ-Wasser wurde eine Stocklösung mit 20mM TMAO erstellt. Für Anwendung in Zellkultur-Experimenten wurden je 10 µl pro ml Medium verwendet, um eine Konzentration von 200 µM im Medium zu generieren.

## 2.3 Mausversuche

### 2.3.1 Haltungsbedingungen und rechtlicher Rahmen

Die Versuchstiere (*Mus musculus*, C57BL/6J Charles River oder ApoE<sup>-/-</sup> BL6 Charles River) wurden unter SPF-Bedingungen mit einem 12h-Tag-12h-Nacht-Rhythmus bei einer kontinuierlichen Temperatur von 20°C und unbegrenztem Zugang zu Nahrung und Wasser im Tierstall des Instituts für Mikrobiologie gehalten. Die Versuche fanden im Einklang mit den gesetzlichen Vorgaben und entsprechend dem vom Landesamt für Gesundheit Berlin (LaGeSo) genehmigten Tierversuch G0295/16 statt.

Alle Mäuse waren weiblich, da bei weiblichen Mäusen weniger Konflikte bei gemeinsamer Käfighaltung entstehen. Es wurden maximal fünf Mäuse pro Käfig gehalten, wobei Mäuse in einem Käfig immer derselben Versuchsgruppe angehörten. Die Mäuse wurden alle 12 Stunden von Tierpflegern auf Auffälligkeiten (z.B. Regungslosigkeit, struppiges Fell, Verletzungen) geprüft und wöchentlich in einen neuen Käfig mit frischem Futter sowie Trinkwasser umgesetzt.

Für die durchgeführten Tierversuche wurden gnotobiotische Tiermodelle nach der

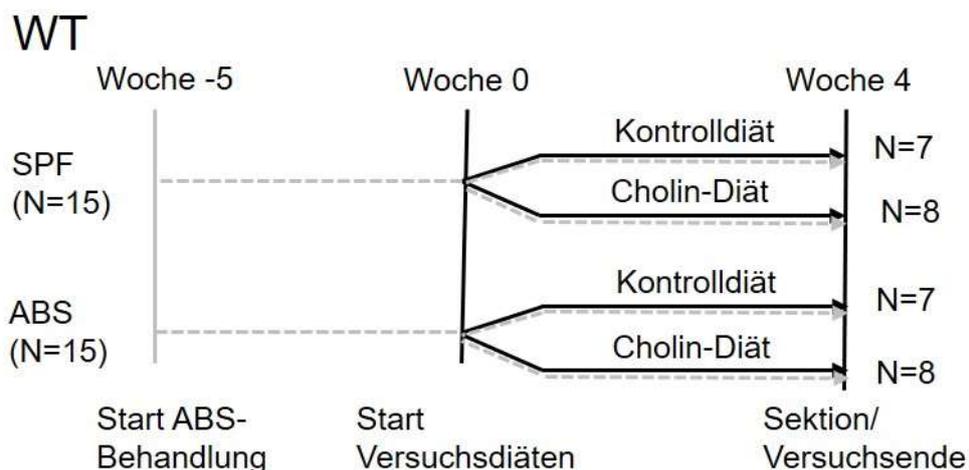
Methode von Heimesaat et al. (2006) generiert. Dafür wurden die Mäuse sechs Wochen mit einem Antibiotika-Cocktail im Trinkwasser behandelt. Dieser bestand aus Ampicillin (1g/L), Vancomycin (500mg/L), Ciprofloxacin (200mg/L), Imipenem (250mg/L) und Streptomycin (1g/L). Ab der 2. Woche wurde wöchentlich eine Sterilitätskontrolle mittels Stuhlprobe und anschließender Kultivierung dieser in einem Multinährmedium (Thiobouillon) durchgeführt. Bei einem negativen Wachstumsnachweis in der 4. Woche wurden die Mäuse als sekundär gnotobiotisch deklariert [63].

Alle sekundär gnotobiotischen Mäuse im Tierversuch wurden von zwei Mitarbeitern betreut, von denen immer einer steril gearbeitet hat (sterile Handschuhe).

### 2.3.2 Behandlungsgruppen der verschiedenen Mausversuche

#### **Wildtyp-Mäuse mit Cholin-Behandlung (Untersuchung des Einflusses von TMAO)**

Es wurden vier experimentelle Gruppen festgelegt. Aus der Hälfte der Mäuse wurde nach dem Protokoll von Heimesaat et al. (2006) sekundär gnotobiotische Mäuse generiert [63]. Sowohl sekundär gnotobiotische Mäuse als auch SPF-Mäuse mit unbehandeltem Darmmikrobiom wurden in die Gruppen Kontrolldiät (0,092% Cholin-Anteil) sowie cholinreiche Diät (1,3% Cholin-Anteil) eingeteilt. Die Mäuse waren bei Versuchsbeginn 16 Wochen alt. Alle Mäuse erhielten die oben genannten Diäten ad libitum für 4 Wochen. Es wurde zu Beginn und am Ende des Versuchs das Gewicht gemessen (**Abbildung 1**).

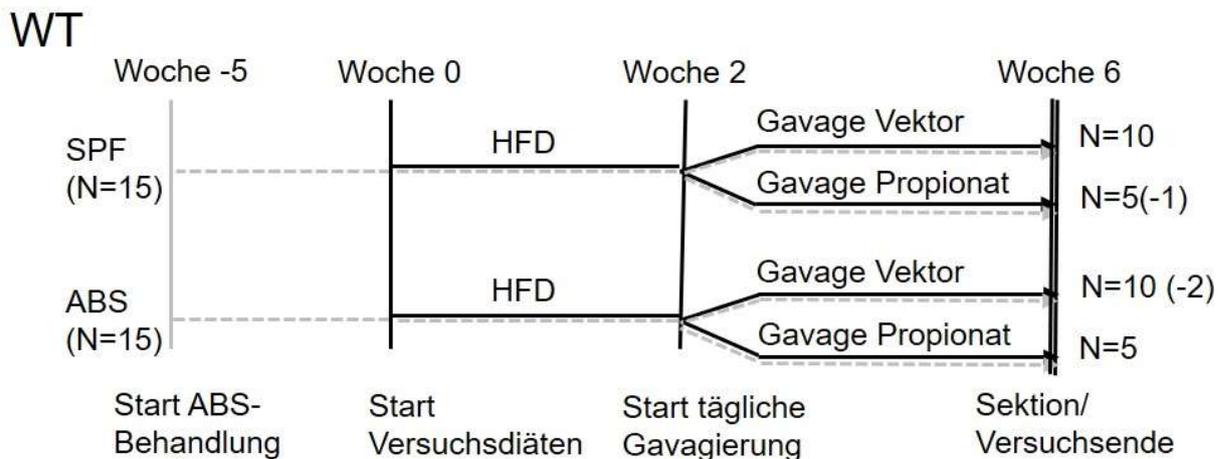


**Abbildung 1 Darstellung des Versuchsaufbaus für den Mausversuch mit cholinreicher Diät.** Von 30 Wildtyp-Mäusen wurden 15 Mäuse sekundär gnotobiotisch durch Behandlung mit einem Antibiotika-Cocktail über fünf Wochen. Im Anschluss erfolgte die Unterteilung in Kontroll- und cholinreiche Diät über vier Wochen bis zur Sektion. **WT:** Wildtyp, **SPF:** Standard Pathogen Free, **ABS:** sekundär gnotobiotisch

## Wildtyp-Mäuse mit Propionat-Behandlung

Es wurden vier experimentelle Gruppen festgelegt. Aus der Hälfte der Mäuse wurde nach dem Protokoll von Heimesaat et al. (2006) sekundär gnotobiotische Mäuse generiert [63]. Sowohl sekundär gnotobiotische als auch SPF-Mäuse mit unbehandeltem Darmmikrobiom wurden in die Gruppen HFD und HFD mit Propionat-Behandlung eingeteilt.

Die Mäuse waren bei Versuchsbeginn 16 Wochen alt. Alle Mäuse erhielten für sechs Wochen die oben genannten Diäten ad libitum und es wurde täglich das Gewicht gemessen. Ab der 3. Woche wurden die Mäuse für vier Wochen täglich morgens gavagiert. Dazu wurde mit einer Gavagesonde über den Ösophagus je Maus 0,2 ml Flüssigkeit injiziert (steriles MilliQ-Wasser als Kontrolllösung oder 150 mMolare sterile Propionat-Lösung). Im Anschluss an jede Gavagierung wurden die Mäuse auf auffälliges Verhalten überprüft und es erfolgte bei Erfüllen der Abbruchkriterien ein sofortiges Ende der Versuchsdurchführung mit der jeweiligen Maus (siehe **Abbildung 2**).



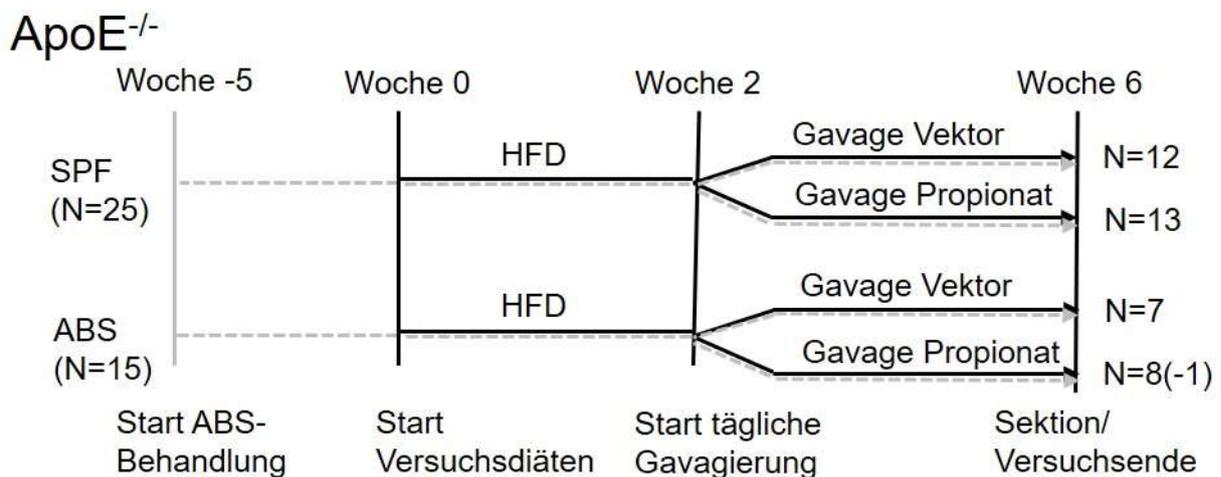
**Abbildung 2 Darstellung des Versuchsaufbaus für den Mausversuch mit Propionat bei Wildtyp-Mäusen.** Von 30 Wildtyp-Mäusen wurden 15 Mäuse sekundär gnotobiotisch durch Behandlung mit einem Antibiotika-Cocktail über fünf Wochen. Im Anschluss erfolgte eine 6-wöchige Diät mit erhöhtem Fettanteil (**HFD**). Nach zwei Wochen erfolgte bis zum Versuchsende eine tägliche orale Gavage mit Propionat- oder Vektorlösung. **WT**: Wildtyp, **SPF**: Standard Pathogen Free, **ABS**: sekundär gnotobiotisch, **HFD**: High-Fat-Diet, **Propionat**: Propionatlösung (steril in MilliQ-Wasser); In Klammern auf der rechten Seite ist die Anzahl der vor Versuchsende gestorbenen Mäuse dargestellt.

## ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Propionat-Behandlung

Es wurden vier experimentelle Gruppen festgelegt. Mit der Hälfte der Mäuse wurden nach

dem Protokoll von Heimesaat et al. (2006) sekundär gnotobiotische Mäuse generiert [63]. Sowohl sekundär gnotobiotische als auch SPF-Mäuse mit unbehandeltem Darmmikrobiom wurden in die Gruppen HFD und HFD mit Propionat-Behandlung eingeteilt.

Die Mäuse waren bei Versuchsbeginn 12-16 Wochen alt. Alle Mäuse erhielten für sechs Wochen die oben genannten Diäten ad libitum und es wurde täglich das Gewicht gemessen. Ab der 3. Woche wurden die Mäuse für vier Wochen täglich morgens gavagiert. Dazu wurde mit einer Gavagesonde über den Ösophagus je Maus 0,2 ml Flüssigkeit injiziert (steriles MilliQ-Wasser als Kontrolllösung oder 150 mMolare sterile Propionat-Lösung). Im Anschluss an jede Gavagierung wurden die Mäuse auf auffälliges Verhalten überprüft und es erfolgte bei Erfüllen der Abbruchkriterien ein sofortiges Ende der Versuchsdurchführung mit der jeweiligen Maus (siehe **Abbildung 3**).



**Abbildung 3 Darstellung des Versuchsaufbaus für den Mausversuch mit Propionat bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Von 40 ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden 15 Mäuse sekundär gnotobiotisch durch Behandlung mit einem Antibiotika-Cocktail über fünf Wochen. Im Anschluss erfolgte eine 6-wöchige Diät mit erhöhtem Fettanteil (**HFD**). Nach zwei Wochen erfolgte bis zum Versuchsende eine tägliche orale Gavage mit Propionat- oder Vektorlösung. **WT**: Wildtyp, **SPF**: Standard Pathogen Free, **ABS**: sekundär gnotobiotisch, **HFD**: High-Fat-Diet, **Propionat**: Propionatlösung (steril in MilliQ-Wasser); In Klammern auf der rechten Seite ist die Anzahl der vor Versuchsende gestorbenen Mäuse dargestellt.

### 2.3.3 Mausektion und Probengewinnung

Am Versuchsende wurden die Mäuse durch CO<sub>2</sub>-Vergasung geopfert. Es wurde durch perithorakale Herzpunktion 0,5 – 0,7 ml Vollblut gewonnen, welches in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäßen mit 10 µl EDTA (0,5 M) aufgefangen wurde und direkt für die

durchflusszytometrischen Versuche weiterverwendet wurde.

Im Anschluss an die Herzpunktion, wurden zunächst die mesenterialen Lymphknoten als 2-3- knotiges Bündeln am Zäkum identifiziert und entnommen. Danach wurde zunächst die Leber und dann die Milz entfernt. Für die Zellisolation für durchflusszytometrische Analysen wurde die Hälfte von Leber und Milz verwendet, die andere Hälfte wurde für andere Versuche benutzt.

Die Isolation des Knochenmarks durch Präparation der Tibiae erfolgte nach Abschluss der Organentnahme.

### 2.3.4 Murine Zellisolation

#### **Isolation von Knochenmarkszellen**

Für die Isolation der Knochenmarkszellen wurden die Tibiae der Mäuse freipräpariert. Diese wurden unter Verwendung einer 30g Nadel mit Spritze mit je 2ml RPMI (5% FBS) durchspült und die Suspension anschließend mit einem 70µm Zellfilter (Smart Strainer) gefiltert, sodass insgesamt 4 ml Knochenmarkszellsuspension generiert wurde. Die Suspension wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert.

#### **Isolation splenischer Immunzellen**

Die Milzen wurden nach der Sektion bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C in 2ml-Mikroreaktionsgefäßen mit kaltem PBS gelagert. Danach wurde mechanisch mit dem stumpfen Ende einer 5ml-Spritze das Gewebe gelöst und in einem 70 µm Zellfilter mit 10 ml RPMI gefiltert. Die entstehende Zellsuspension wurde im Anschluss bei 60g für 1 Minuten ohne Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert und das Pellet wurde verworfen. Der Überstand wurde daraufhin bei 480g mit Bremse bei Raumtemperatur für 8 Minuten zentrifugiert. Das so generierte Zellpellet wurde mit 2ml 1x Erythrozyten-Lyse-Buffer vermischt und die entstehende Suspension für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde der Lysis Buffer durch Zugabe von 20 ml PBS neutralisiert und die Suspension wurde bei 500g bei Raumtemperatur für 5 Minuten abzentrifugiert.

#### **Isolation hepatischer Immunzellen**

Die Lebern wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C in Falcon-Gefäßen mit eiskaltem PBS gelagert. Danach wurde mechanisch mit dem stumpfen Ende einer 5ml-Spritze das Gewebe gelöst und in einem 70 µm Cell Strainer mit 20 ml RPMI Medium

gefiltert.

Zur Isolation der hepatischen Immunzellen wurde ein leicht abgeändertes Isolationsprotokoll nach Blom et al. (2009) verwendet [64].

Die entstehende Zellsuspension wurde im Anschluss bei 60g für 1 Minuten ohne Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert und das Pellet wurde verworfen. Der Überstand wurde daraufhin bei 480g mit Bremse bei Raumtemperatur für 8 Minuten zentrifugiert.

Daraufhin wurde das Zellpellet in 10 ml 37,5 % Percoll in einem 15ml Falcon suspendiert und für 30 Minuten bei 850g bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert.

Das Pellet wurde in 2ml 1x Erythrozyten-Lyse-Buffer resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde der Lysis Buffer durch Zugabe von 20 ml PBS neutralisiert und die Suspension wurde bei 500g bei Raumtemperatur für 5 Minuten abzentrifugiert.

### **Isolation von Immunzellen aus mesenterialen Lymphknoten**

Die mesenterialen Lymphknoten wurden mechanisch mit dem stumpfen Ende einer 5ml Spritze gelöst und in einem 70 µm Cell Strainer mit 5 ml RPMI Medium gefiltert.

Die entstehende Suspension wurde bei 500g bei Raumtemperatur für 5 Minuten abzentrifugiert.

## **2.4 Durchflusszytometrische Analysen**

### **2.4.1 Das Prinzip der Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ist ein biochemisches Messverfahren, durch das verschiedene Eigenschaften von Zellen und Partikeln abgeleitet werden können. Einzelne Partikel werden in einem Mantelstrom hydrodynamisch fokussiert und fließen einzeln in einer Suspension durch eine Messzelle, die von verschiedenen Lasern bestrahlt wird. In bestimmten Durchflusszytometern wie in dem in dieser Arbeit verwendeten Attune Nxt Flow Cytometer findet außerdem eine akustische Fokussierung statt, mit der eine größere Anzahl an Partikeln schnell analysiert werden kann.

Je nach Struktur, Form und Färbeeigenschaften der Partikel werden unterschiedliche optische Signale emittiert, durch Linsen selektiert und durch Filter und Spiegel weitergeleitet. Im Anschluss werden spezifische Wellenlängen der optischen Signale von Detektoren, in Durchflusszytometern Photomultiplikator-Röhren, gemessen. Es werden für jedes einzelne Partikel quantitative Informationen gewonnen.

Die gemessenen Parameter können in zwei verschiedene Gruppen unterteilt werden.

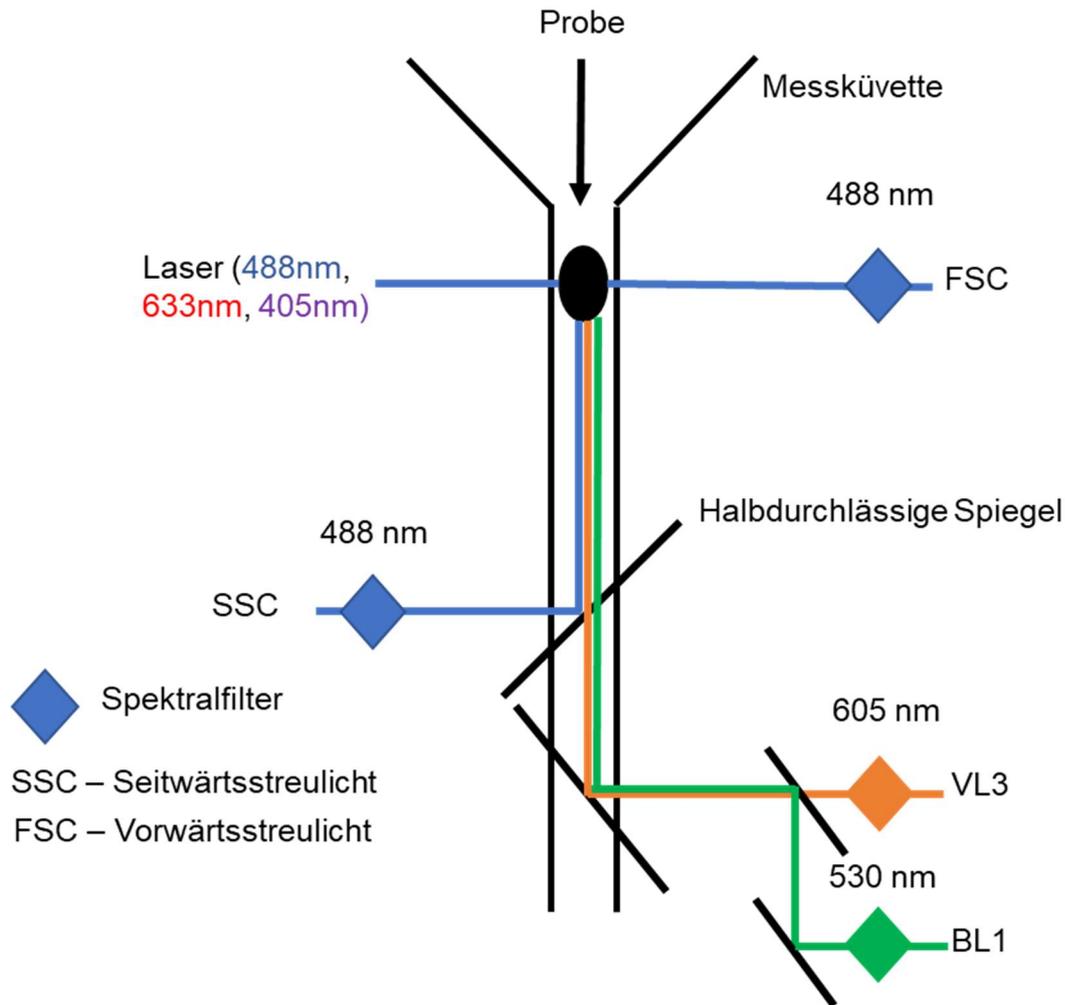
Die Lichtstreuung beschreibt die Größe und die interne Komplexität der Partikel.

Die Vorwärtsstreuung („Forward Scatter“ = FSC) ist ein Parameter für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und korreliert mit dem Volumen der gemessenen Partikel. Die Seitwärtsstreuung („Sideward Scatter“ = SSC) ist ein Parameter für die Beugung des Lichts im rechten Winkel und korreliert mit der internen Komplexität der Partikel. Mit den Parametern FSC und SSC lassen sich Blutzellen bereits zuordnen, da zum Beispiel Granulozyten ein größeres Volumen sowie eine größere interne Komplexität als Lymphozyten besitzen [65, 66].

Zusätzlich zur Lichtstreuung kann durch das Durchflusszytometer die emittierte Fluoreszenzstrahlung gemessen werden.

Da die Autoemission der Zellen meist gering ist, wird eine Bindung von mit Farbstoffmarkierten Antikörper zu Zell- oder Partikelspezifischen Antigenen hergestellt.

Die Farbstoffe werden durch spezifische Wellenlängen des Lichts angeregt und emittieren charakteristische optische Signale. Bei Verwendung mehrerer Laser können mehrere verschiedene Farbstoffe verwendet werden und somit mehr Informationen über die untersuchten Zellen oder Partikel gewonnen werden. Bei der Verwendung mehrerer Farbstoffe in einem Experiment, die ein überlappendes Emissionsspektrum besitzen, muss eine Kompensation durchgeführt werden. Die Kompensation ist eine durch die Computersoftware berechnete Anpassung der Intensitäten der Farbstoffe mit überlappenden Emissionsspektren und ist für die korrekte Analyse eines durchflusszytometrischen Experiments mit mehreren Farbstoffen essenziell [65, 66].



**Abbildung 4 Darstellung des grundlegenden Prinzips der Durchflusszytometrie.** Es erfolgt die Anregung der Probe in einer Messküvette durch verschiedene Laser sowie Messung von Vorwärtsstreulicht (FSC), Seitwärtsstreulicht (SSC) sowie emittiertem Licht spezifischer Wellenlängen in den Fluoreszenzkanälen (Bspw. BL1 oder VL3) modifiziert nach [67].

Die Analyse durchflusszytometrischer Daten erfolgt mittels spezifischer Softwareanwendungen, wobei ein „Gaten“, das heißt eine Selektion der gemessenen Partikel nach Vorwärtsstreuung, Seitwärtsstreuung sowie Intensität der Färbung mit spezifischen Farbstoffen erfolgt.

Im Folgenden werden die Färbemethoden der verschiedenen durchflusszytometrischen Experimente, die durchflusszytometrische Messung sowie die anschließende Analyse der Daten beschrieben.

#### 2.4.2 Messung von Apoptose sowie Adhäsionsmolekülen von HAEC

In diesem Experiment wurde durchflusszytometrisch untersucht, ob Propionat einen Einfluss auf die Anteile lebender und früh-apoptotischer Zellen sowie die Expression von

pro-inflammatorischen Adhäsionsmolekülen (VCAM und ICAM) bei verschiedenen inflammatorischen Bedingungen hat. Zur Differenzierung zwischen lebenden, früh-apoptotischen und spät-apoptotischen/nekrotischen Zellen wurden Antikörperfärbungen mit Sytox und Annexin V durchgeführt. Während der Apoptose von Zellen kommt es zu einer Verschiebung von Phosphatidylserin von der Innenseite der Zellmembran zur Außenseite der Zellmembran. Annexin V bindet an die Bestandteile von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zellmembranen sowie bei nekrotischen Zellen auch an der Innenseite der Zellmembranen und ist somit sowohl bei apoptotischen als auch bei sekundär nekrotischen Zellen positiv. Aus diesem Grund ist die zusätzliche Benutzung eines Nukleinsäureinterkalators wie Sytox in diesem Experiment notwendig, da dieser an freie DNA bindet und somit nur spät-apoptotische sowie nekrotische Zellen positiv färbt.

Es wurden je 60k HAEC der Passagen 7 oder 8 in eine 12-Well-Plate ausgesät und über Nacht konfluent wachsen gelassen. Im Anschluss erfolgte eine Behandlung mit 1ml Starvation-Medium (0,5% FBS) mit Propionat 150  $\mu$ M versus Kontrolllösung (MilliQ-Wasser) für 24h. Nach der 24h-Behandlung mit Propionat erfolgte eine 6h-Behandlung mit 1 oder 10 ng TNF- $\alpha$  pro ml Medium, um die Expression von Adhäsionsmolekülen zu steigern sowie durch endotheliale Aktivierung Apoptose und Nekrose der HAEC auszulösen.

Nach Abschluss der Behandlung erfolgte die Trypsinierung der Zellen. Dafür wurde das Medium aspiriert und einmal mit 300  $\mu$ l PBS gewaschen. Beide Suspensionen wurden in 5ml Durchflusszytometer-Röhrchen gesammelt. Im Anschluss wurden 300  $\mu$ l Trypsin-EDTA hinzugegeben und die Zellen für 2 Minuten inkubiert. Daraufhin wurde das Trypsin mit 300 $\mu$ l Vollmedium neutralisiert und die Zellsuspension in Durchflusszytometer-Röhrchen gesammelt.

Nach dem Abzentrifugieren bei 300g für 7 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Pellet in 100  $\mu$ l Antikörper-Mastermix mit je 1 $\mu$ l Annexin V-AF647, 2 $\mu$ l Sytox-Blue, 2  $\mu$ l VCAM-1-FITC, 2 $\mu$ l ICAM-1-PE sowie 1 $\mu$ l DNase Stocklösung, was eine finale Konzentration von 0,01% DNase bewirkt hat, aufgelöst und für 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 300  $\mu$ l Annexin-Binding-Buffer hinzugegeben und 200  $\mu$ l der gefärbten Zellsuspension durchflusszytometrisch gemessen.

Zum Erstellen der Gating-Strategie wurden Einzelfarbstofffärbungen mit HAEC durchgeführt.

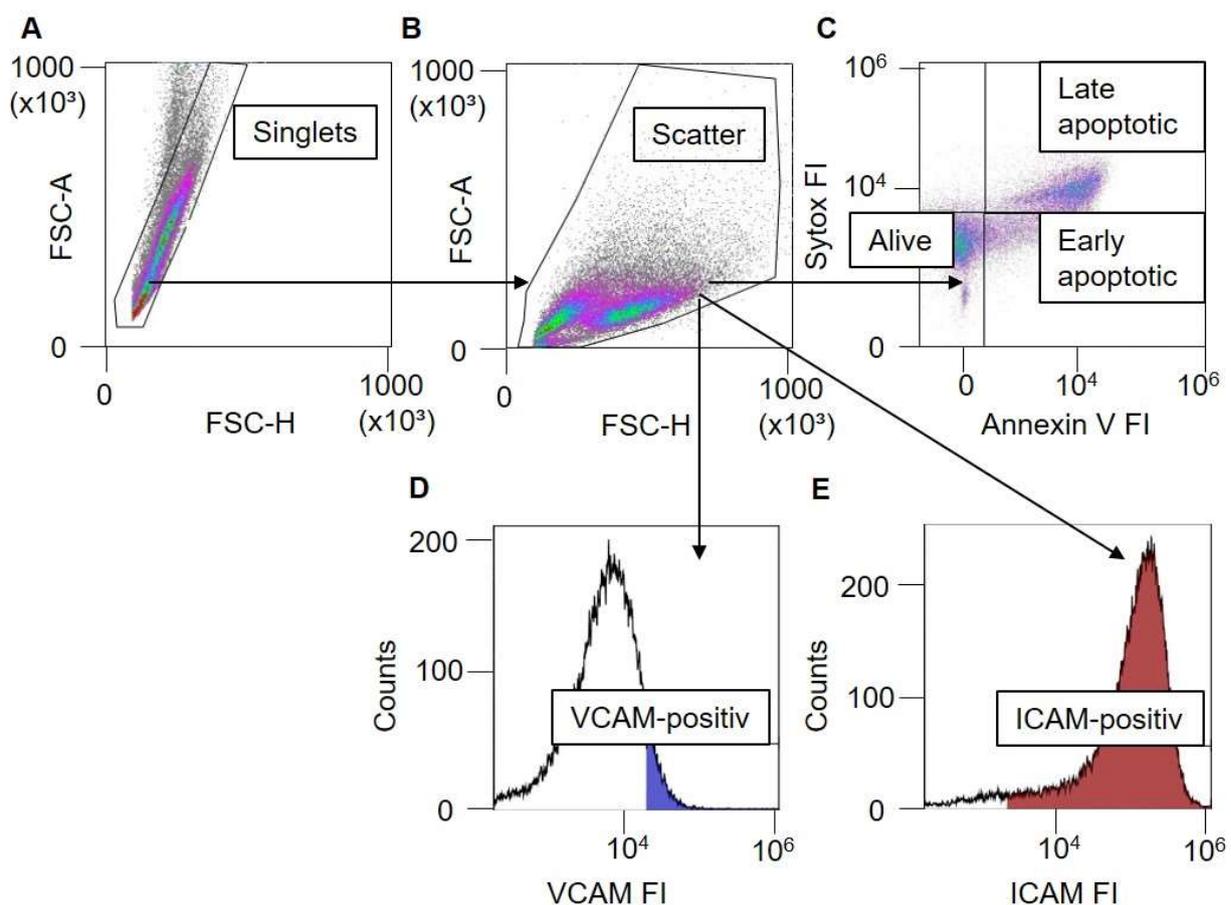
Als Positivkontrollen für Apoptose und Nekrose wurden HAEC für 15 Minuten bei -20°C

inkubiert und im Anschluss mit Einzelfärbungen mit Annexin V sowie Sytox gemessen. Als relative Negativkontrolle für Apoptose und Nekrose der Zellen wurde eine Behandlung mit Propionat versus Kontrolllösung in Vollmedium gewählt.

Im Anschluss konnten Gates für positive Populationen festgelegt werden. Für die Expression von ICAM und VCAM konnte mit ungefärbten Proben die unspezifische Hintergrundexpression der Messkanäle bestimmt werden.

Es erfolgte eine Kompensation durch Messung von Einzelfärbungen sowie einer ungefärbten Probe, um vorhandene Fluoreszenzemissionsüberlappungen zwischen den Fluorochromen herauszurechnen.

Die lebenden, früh- sowie spät-apoptotischen Zellen werden in % aller Zellpartikel angegeben. Die Expression von ICAM und VCAM wird durch den Anteil VCAM- sowie ICAM-positiver Zellen angegeben (siehe Gating-Strategie **Abbildung 5**).



**Abbildung 5 Gating-Strategie zur Analyse von Apoptotischen, Nekrotischen und Lebenden HAEC sowie zur Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM und ICAM.** Alle gemessenen Ereignisse wurden im Forward-Scatter nach Area und Height abgebildet und es werden alle einzelnen Zellen selektiert (Singlets) (A). Es wurden sowohl Zellpartikel als auch intakte Zellen selektiert, da tote Zellen meist veränderte FSC-SSC-Eigenschaften haben (B). Einzelne Zellen wurden in lebende Zellen, früh- und spät-apoptotische Zellen eingeteilt. Die Gates wurden mittels

Positivkontrollen mit schockgefrosteten HAEC gesetzt **(C)**. Dargestellt sind VCAM-positive sowie VCAM-negative HAEC in einem Histogramm. Der VCAM-negative Bereich wurde mittels einer FMO bestimmt **(D)**. Dargestellt sind ICAM-positive sowie ICAM-negative HAEC in einem Histogramm. Der ICAM-negative Bereich wurde mittels einer FMO bestimmt **(E)**.

### 2.4.3 Monozytenadhäsion bei Behandlung der Monozyten mit TMAO

In einer Studie von Seldin et al. (2016) konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit TMAO bei humanen Endothelzellen eine verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM, VCAM) sowie eine verstärkte Leukozytenadhäsion generiert [62]. Um zu untersuchen, ob dieser Effekt auch durch einen Einfluss von TMAO auf Monozyten ausgeht, wurden THP1- Monozyten mit TMAO behandelt und ein Adhäsionsexperiment mit unbehandelten HAEC durchgeführt. Die Methodik basierte dabei auf in der Literatur angegebene Protokolle zur Monozytenadhäsion [68, 69].

Zusammenfassend wurden je 60k HAEC der Passagen 7 oder 8 in eine 12-Well-Plate ausgesät und über Nacht zur Konfluenz wachsen gelassen. Je 300k THP1-Monozyten wurden in einer 6-Well-Plate mit einem Starvation-Medium (RPMI mit 0,5% FBS) mit TMAO (200 µM) oder Kontrolllösung (steriles MilliQ-Wasser) für 24h behandelt. Die HAEC wurden 6h vor Beginn des Adhäsionsexperiments mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$  oder Kontrolllösung in Starvation-Medium inkubiert.

Nach Ende der 24h Behandlung der THP1-Monozyten wurden die Zellen mit dem intrazellulären Farbstoff Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) angefärbt, um bei der durchflusszytometrischen Messung von HAEC differenziert werden zu können.

Dazu wurden die Zellsuspensionen jeder Behandlungsgruppe zunächst abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1ml PBS mit 1 µl CFSE-Färbelösung gelöst und für 20 Minuten bei 37° inkubiert.

Im Anschluss wurde die Färbelösung mit 5ml RPMI mit 10%FBS neutralisiert und für 5 Minuten inkubiert. Nach erneutem Abzentrifugieren wurden die Zellen gezählt und mit Starvation-Medium auf 100k THP1-Monozyten pro ml Medium diluiert.

Je Well wurde im Anschluss 1ml der THP1-Monozyten-Zellsuspension hinzugefügt und die Zellen wurden für 30 Minuten bei 37° zusammen mit den HAEC inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Aspiration des Mediums und eine zweimalige Waschung mit 500 µl Starvation-Medium.

Zuletzt erfolgte die Trypsinierung der Zellen zur Ablösung der HAEC sowie gebundenen Monozyten. Dazu wurde pro Well 200 µl Trypsin-EDTA hinzugefügt und die Zellen für 2

Minuten bei 37° inkubiert. Danach wurden zwei Mal 500 µl Stopplösung (PBS mit 10% FBS) hinzugegeben, die Suspension aspiriert und gesammelt.

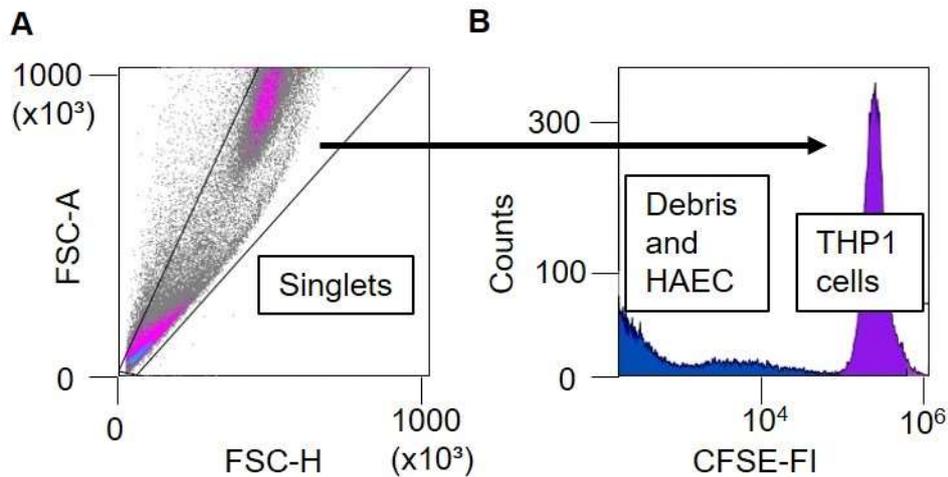
Nach einer Zentrifugation bei 300g für 6 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Pellet in 500 µl FACS-Staining-Medium resuspendiert und sowohl die adhärenen Zellen als auch der Überstand (Aspirierte Zellsuspension vor der Passagierung) durchflusszytometrisch gemessen.

#### 2.4.4 Monozytenadhäsion bei Behandlung der HAEC mit Propionat

Es erfolgte außerdem die Untersuchung des Einflusses von Propionat auf die Monozytenadhäsion.

Im Gegensatz zum Experiment mit TMAO erfolgte in diesem Experiment eine Stimulation der HAEC über 24h mit 150 µM Propionat oder Kontrolllösung (steriles MilliQ-Wasser). Sechs Stunden vor Beginn des Adhäsionsexperiments wurde die Hälfte der Gruppen mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$  behandelt, um die Expression von Adhäsionsmolekülen durch eine Aktivierung des Endothels zu stimulieren. Im Anschluss erfolgte die weitere Versuchsdurchführung wie beim Adhäsionsprotokoll mit TMAO.

Zur durchflusszytometrischen Bestimmung von THP1-Monozyten in beiden Adhäsionsexperimenten wurde CFSE als intrazellulärer Farbstoff verwendet. Dadurch konnten HAEC und THP1-Monozyten durch Messung im FITC-Kanal unterschieden werden (siehe **Abbildung 6**). Zur Kontrolle, ob nur THP1-Monozyten gefärbt sind, wurden die Zellen in einem Fluoreszenzmikroskop (Keyence) inspiziert. Morphologisch konnte bestätigt werden, dass nur Monozyten mit CFSE angefärbt worden sind. Die im Durchflusszytometer durch CFSE-Färbung differenzierbaren THP1-Monozyten wurden als Zahlenwert ausgegeben.



**Abbildung 6 Gating-Strategie zur Identifikation von mit CFSE-angefärbten THP1-Zellen im Adhäsionsexperiment.** Alle gemessenen Ereignisse wurden im Forward-Scatter nach Area und Height abgebildet und es werden alle einzelnen Zellen selektiert (Singlets) **(A)**. Mit CFSE angefärbte THP1-Zellen emittieren intensiv im Wellenlängenbereich von FITC-Fluorochromen und konnten somit von HAEC und Zelldetritus unterschieden werden **(B)**.

#### 2.4.5 Färbung und durchflusszytometrische Analysen der murinen Zellen

Das Vollblut wurde direkt nach Entnahme des Blutes durch Herzpunktion mit Antikörpern inkubiert.

Knochenmark-, Leber-, MLN- und Milzzellen wurden erst nach Isolation und Weiterverarbeitung (Erythrozytenlyse bei Leber- und Milzzellen) mit den Antikörpern inkubiert.

#### **Murine Monozyten**

Für die Vollblut-Färbung wurden je 50  $\mu$ l EDTA-Blut mit 50  $\mu$ l FC-Blocker-Staining-Medium für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Anschließend wurde 50  $\mu$ l vom Antikörper-Mastermix hinzugefügt und die Probe wurde für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zuletzt wurden die Proben mit 850  $\mu$ l 1% PFA in PBS fixiert und bei 4°C im Dunkeln bis zur durchflusszytometrischen Messung gelagert.

Für die Knochenmarkszellfärbung wurden 1 Mio. Zellen gezählt und mit 50  $\mu$ l FC-Blocker-Staining-Medium für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Anschließend wurde 50  $\mu$ l vom Antikörper-Mastermix hinzugefügt und die Probe wurde für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zuletzt wurden die Proben mit 850  $\mu$ l 1% PFA in PBS fixiert und bei 4°C im Dunkeln bis zur durchflusszytometrischen Messung

gelagert.

Für die Milzzellfärbung wurden 50 µl Milzzellsuspension 50µl vom Antikörper-Mastermix hinzugefügt und die Probe wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

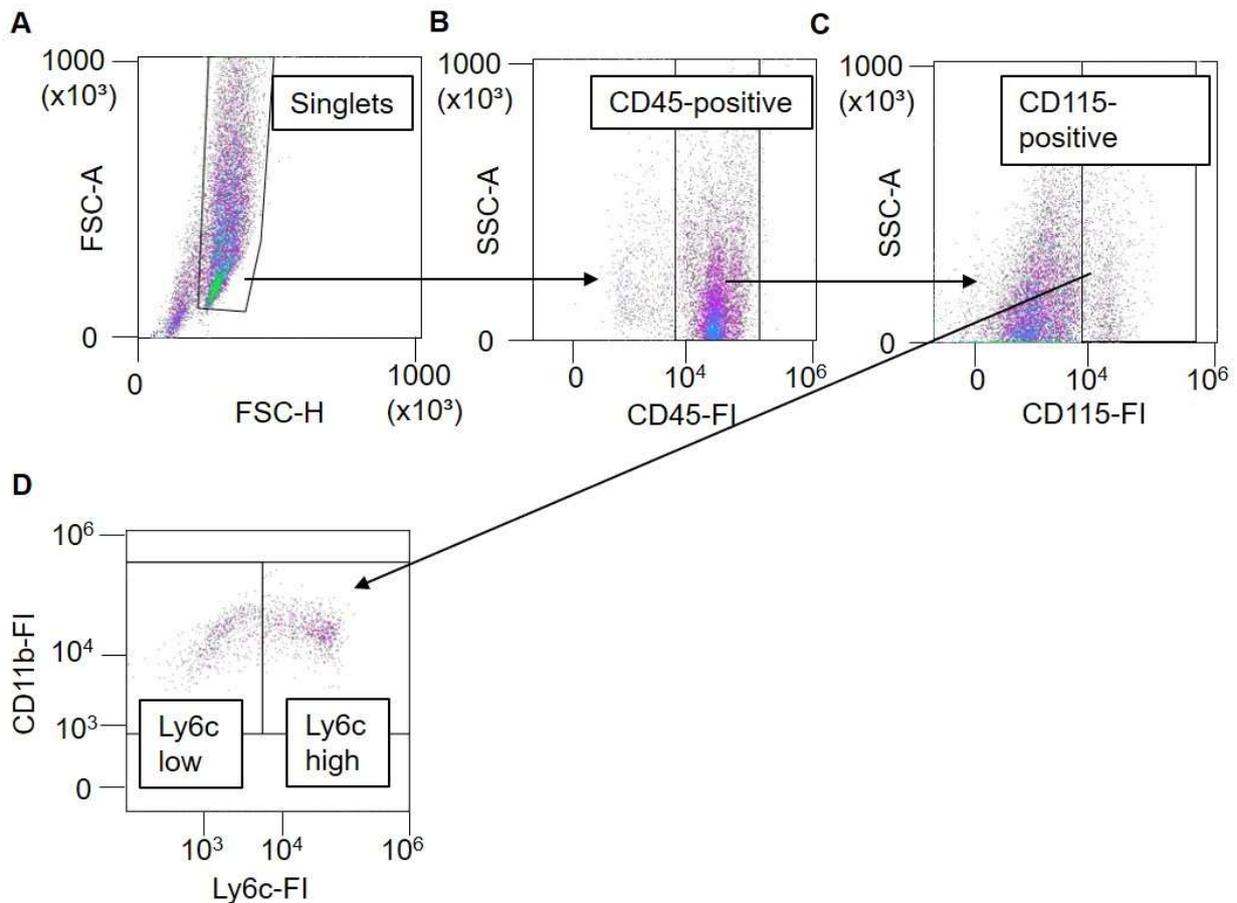
Im Anschluss wurden die Proben mit 900 µl 1% PFA in PBS fixiert und bei 4°C im Dunkeln bis zur durchflusszytometrischen Messung gelagert.

Für die Färbung der Zellen aus den MLN wurden 50 µl MLN-Zellsuspension 50µl vom Antikörper-Mastermix hinzugefügt und die Probe wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben mit 900 µl 1% PFA in PBS fixiert und bei 4°C im Dunkeln bis zur durchflusszytometrischen Messung gelagert.

Die Messung der Proben im Durchflusszytometer erfolgte in weiterer Verdünnung mit PBS, da es sonst zur Bildung von Zellgerinnseln gekommen ist.

Die Gating-Strategie der Monozytensubpopulationen ist in **Abbildung 7** dargestellt.

Zum Gaten der Monozyten wurden zunächst die Leukozyten als CD45-positive Zellen eingegrenzt. Im Anschluss wurden Monozyten als CD115-positive Messpunkte identifiziert. Mit dem Oberflächenantigen Ly6C konnten die Monozyten in Ly6C-high- und Ly6C-low-Monozyten unterschieden werden, wobei die Abgrenzung mittels der Messung von FMOs erfolgte. Für die erfolgten Analysen wurden sowohl die Gesamtanzahl von Ly6C-high- und Ly6C-low-Monozyten pro ml als oder ihr Verhältnis als Ratio dargestellt. Für die Berechnung der Ly6C-high- und Ly6C-low-Monozyten pro ml erfolgte eine Multiplikation der im Durchflusszytometer gemessenen Zellzahl mit dem Faktor 400, da umgerechnet 2,5 µl Vollblut durchflusszytometrisch gemessen wurden. Weiterhin erfolgte in bestimmten Experimenten eine Bestimmung des Anteils von Monozyten an allen Leukozyten mittels Darstellung des Anteils von CD115-positiven Zellen.



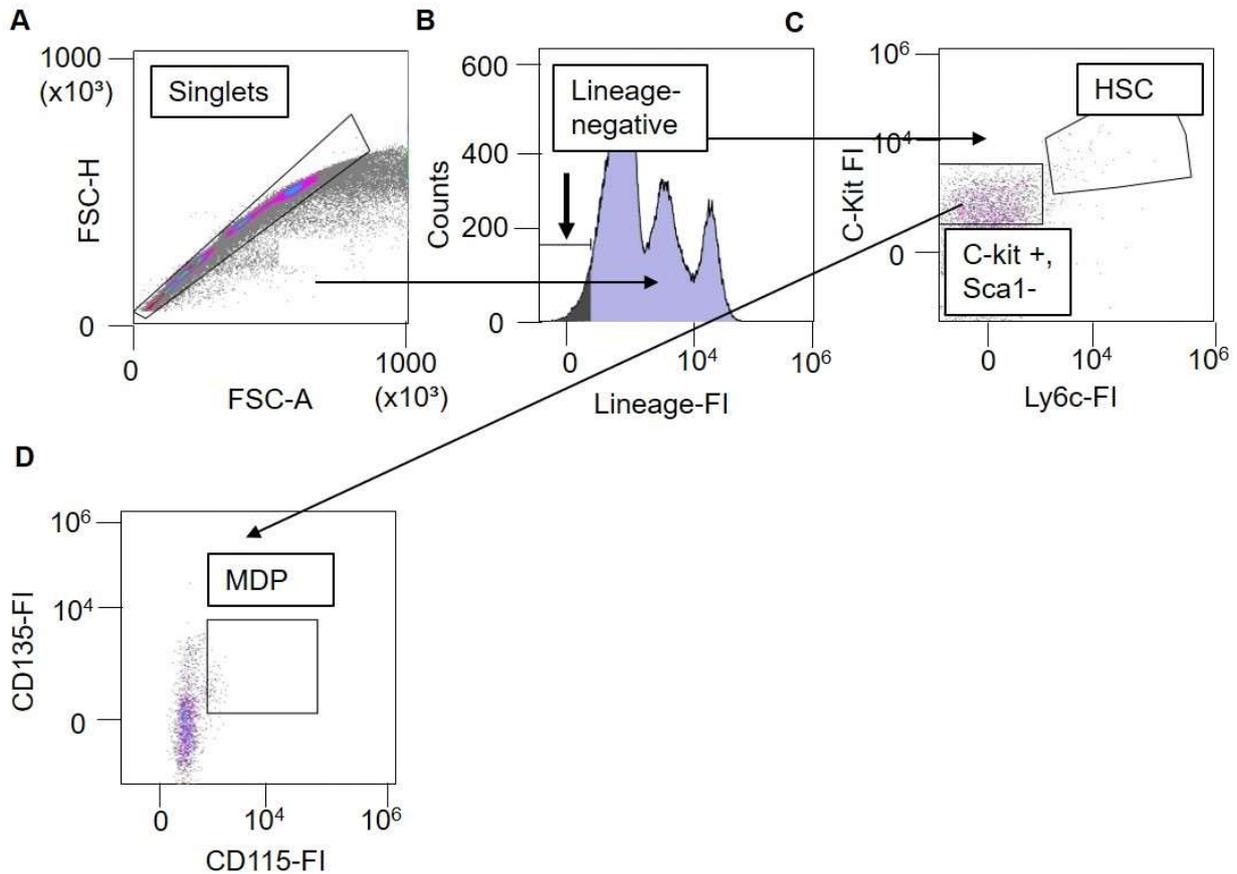
**Abbildung 7 Gating-Strategie zur Identifikation von Monozytensubpopulationen.** Alle gemessenen Ereignisse wurden im Forward-Scatter nach Area und Height abgebildet und alle einzelnen Zellen (Singlets) wurden selektiert (A). Leukozyten (CD45+-Zellen) wurden identifiziert und selektiert (B). Monozyten (CD45+-CD115+-Zellen) wurden identifiziert und selektiert (C). Die selektierten Monozyten sind CD11b-positiv (doppelte Antigenkontrolle). Es werden Ly6C-high und Ly6C-low-Monozyten dargestellt (D).

### Murine Monozytenprogenitorzellen und Hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark

Für die Färbung der Monozyten-Progenitorzellen im Knochenmark wurden 1 Mio. Zellen gezählt und mit 50 µl FC-Blocker-Staining-Medium für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde 50 µl vom Monozytenprogenitorzellen-Antikörper-Mastermix hinzugefügt und die Probe wurde für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zum Schluss wurden die Proben mit 850 µl 1% PFA in PBS fixiert und bei 4°C im Dunkeln bis zur durchflusszytometrischen Messung gelagert.

Zunächst wurde durch das Gaten Lineage-negativer Zellen ausdifferenzierte hämatopoetische Zellen ausgeschlossen, da der Lineage-Antikörper-Cocktail

verschiedene ausdifferenzierte Zellen (T- und B-Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, NK-Zellen, Erythrozyten) positiv färbt. Im Anschluss wurde der prozentuale Anteil von Hämatopoetischen Stammzellen (c-KIT und Sca-1 positive Zellen) sowie Monozytenprogenitorzellen (c-KIT, CD135 und CD115 positive, Sca-1 negative Zellen) an allen Knochenmarkszellen bestimmt (siehe **Abbildung 8**).



**Abbildung 8 Gating-Strategie zur Identifikation von Monozytenprogenitorzellen (MDP) sowie Hämatopoetischen Stammzellen (HSC).** Alle gemessenen Ereignisse wurden im Forward-Scatter nach Area und Height abgebildet und es wurden alle einzelnen Zellen selektiert (Singlets) (A). Ausdifferenzierte hämatopoetische Zellen wurden durch Lineage-Antikörpercocktail (T-Zellen, B-Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, NK-Zellen, Erythrozyten) positiv gefärbt, Lineage-negative Zellen wurden identifiziert (B). Hämatopoetische Stammzellen (HSC) wurden als C-Kit sowie Sca-1-positive Lineage-negative Zellen identifiziert. Lineage-negative Zellen können in c-KIT stark positiv sowie intermediär positiv und Sca-1 negativ unterschieden werden (C). MDPs wurden als FLT3 (CD135) -positive sowie CD115 positive Lineage negative Zellen mit starker C-Kit Expression beschrieben (D).

### T-Helferzellen (Th1 und Th17)

Die intrazelluläre Bestimmung von IL17A- und IFN $\gamma$ -Zytokinausschüttung von CD4-Helfer-T-Zellen erfolgte nach in anderen Studien beschriebener Methodik [61].

Zusammenfassend erfolgte eine Stimulation der Zytokinausschüttung durch T-Zellen

durch eine Inkubation mit PMA und Ionomycin. Der intrazelluläre Vesikeltransport von Zytokinen wurde durch die Zugabe von Monensin inhibiert. Im Anschluss erfolgte eine intrazelluläre Anfärbung von IL17A und IFN $\gamma$ .

Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Messung eines Teils der Zellsuspension wurde eine Zellzahl von etwa 1 Mio. Zellen ermittelt. Das entsprechende Suspensionsvolumen wurde abzentrifugiert und der Überstand dekantiert.

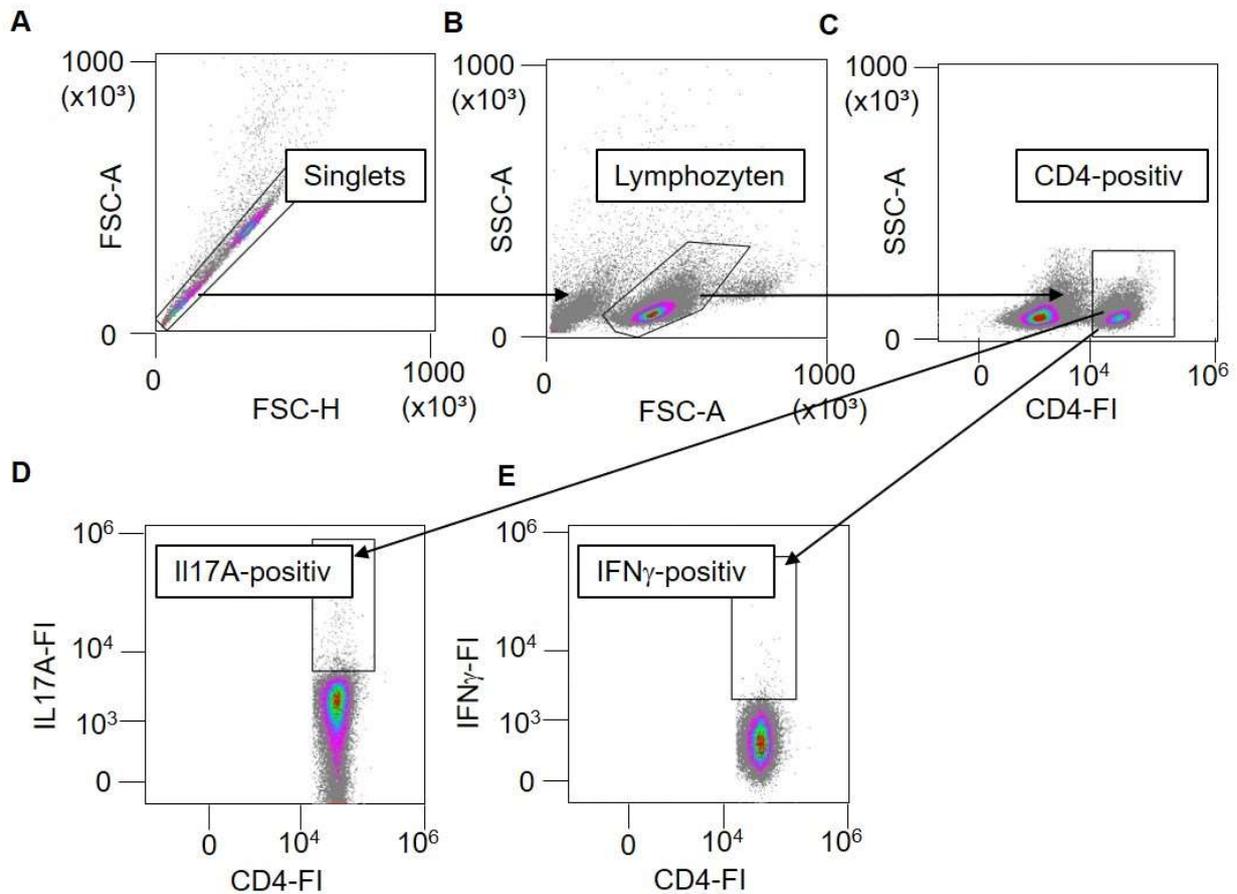
Die Proben wurden in 1 ml RPMI mit 10 % FBS, Glutamat, 1% Penicillin / Streptomycin mit PMA (50ng/ml) und Ionomycin (1 $\mu$ g/ml) für 4h bei 37° und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 30 Minuten wurde 1 $\mu$ l 1000x Monensin-Lösung hinzugegeben.

Nach der Stimulation der Zellen erfolgte die Anfärbung des Oberflächenantigens CD4, der charakteristisch für T-Helferzellen ist.

Dafür wurden die Proben zunächst zwei Mal mit 2 ml kaltem PBS gewaschen und bei 500g bei 4°C C für 5 Minuten abzentrifugiert. Im Anschluss wurde den Proben 1 $\mu$ l CD4 Antikörper in 100  $\mu$ l kaltem PBS zugegeben, sie wurden gevortext und für 30 Minuten im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren und Verwerfen des Überstands wurde 1ml Flow Cytometry Staining Buffer hinzugegeben. Daraufhin wurde erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 500  $\mu$ l Fix/Perm-Lösung aufgelöst und für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurde zwei Mal mit 2 ml Perm Buffer gewaschen und jeweils der Überstand nach dem Abzentrifugieren verworfen. Daraufhin erfolgte die intrazelluläre Färbung mit je 1 $\mu$ l IL17A und IFN $\gamma$  in 100  $\mu$ l Permbuffer für mindestens 1h bei 4°C im Dunkeln. Vor der durchflusszytometrischen Messung erfolgte eine weitere Waschung mit 2 ml Permbuffer, an welcher anschließend das Pellet in 500  $\mu$ l Flow Cytometry Staining Buffer aufgelöst wurde. Es wurden 200  $\mu$ l der gefärbten Zellsuspension durchflusszytometrisch gemessen.

Die Gating-Strategie für die Th17- und Th1-Zellen wird in **Abbildung 9** dargestellt.

Es wurden zunächst die T-Helferzellen mittels Gating der CD4-positiven Lymphozyten selektiert und im Anschluss Th1-Zellen als IFN $\gamma$ -positive- und Th17-Zellen als IL17A-positive Zellen bestimmt. Es wurde der %-Anteil der Th1-und Th17-Zellen an der gesamten Population der T-Helferzellen für die statistische Auswertung verwendet.



**Abbildung 9 Gating-Strategie zur Identifikation IL17A-positiven Th17-Zellen sowie IFN $\gamma$ -positiven Th1-Zellen.** Alle gemessenen Ereignisse wurden im Forward-Scatter nach Area und Height abgebildet und es wurden alle einzelnen Zellen selektiert (Singlets) (A). Durch Gating nach der Area von Sideward Scatter und Forward Scatter wurden die Lymphozyten selektiert (B). CD4-positiv T-Helferzellen werden aus der Lymphozytenpopulation gegatet (C). Th17-Zellen wurden als IL17A-positiv CD4-T-Zellen identifiziert. Th1-Zellen wurden als IFN $\gamma$ -positive CD4-Zellen identifiziert. Die Gates wurden durch Fluoreszenz-Minus-One (FMO)-Kontrollen gesetzt (D).

### Regulatorische T-Zellen (Tregs)

Die Färbung und Identifizierung von murinen regulatorischen T-Zellen wurde mit dem Mouse Regulatory T Cell Staining Kit von Thermofisher durchgeführt.

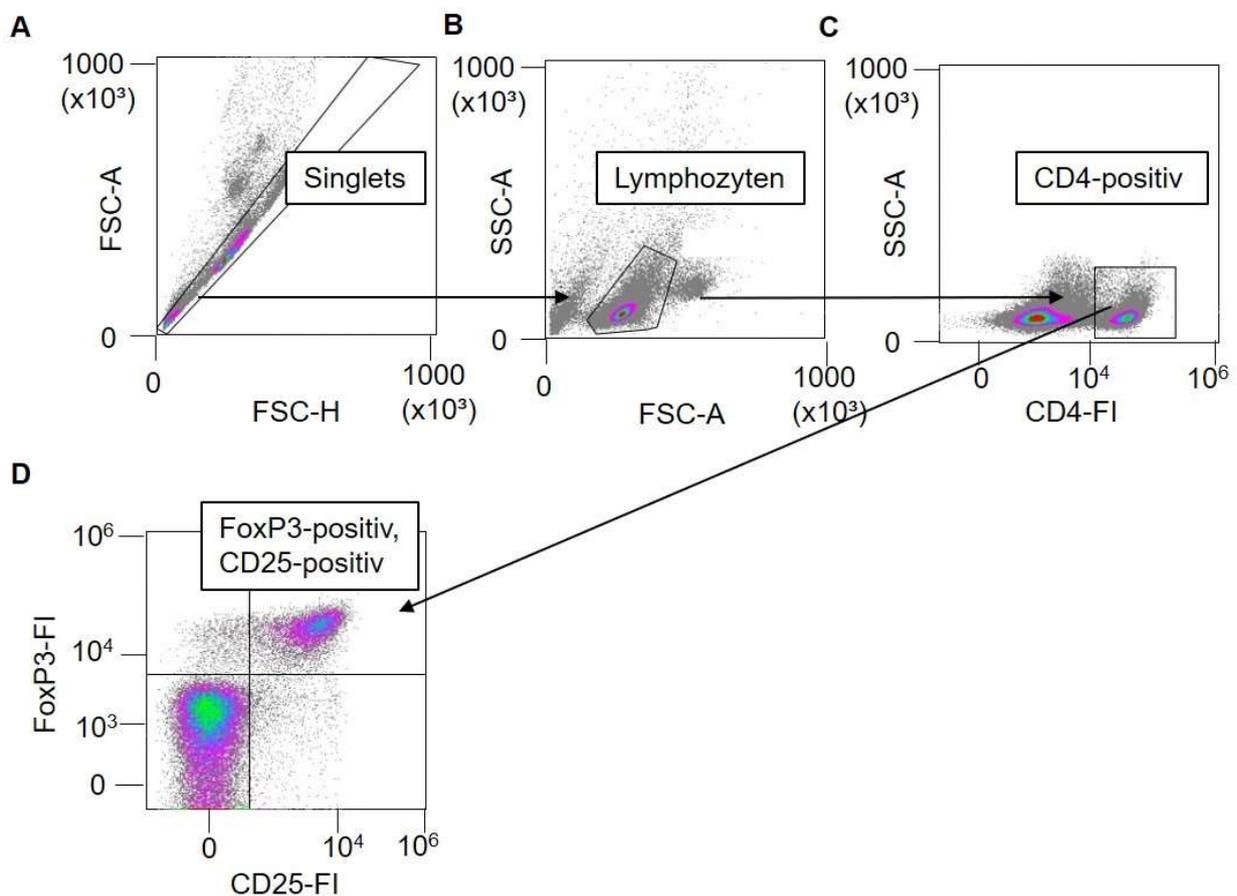
Die Methodik wurde mit geringen Abweichungen aus dem Firmenprotokoll übernommen. Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Messung eines Teils der Zellsuspension wurde eine Zellzahl von etwa 1 Mio. Zellen ermittelt. Das entsprechende Suspensionsvolumen wurde abzentrifugiert und der Überstand dekantiert.

Im Anschluss erfolgte die Färbung der Oberflächenantigene CD4 und CD25. Dafür wurde je 1  $\mu$ l CD4 und CD25 in 100  $\mu$ l PBS zu den Proben gegeben. Diese wurden kräftig gevortext und im Anschluss für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert.

Daraufhin erfolgte eine Waschung mit 1ml Flow Cytometry Staining Buffer und danach eine Inkubation mit 500 µl Fix/Perm-Lösung für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln. Nach weiteren zwei Waschungen mit 2ml Permbuffer erfolgte die intrazelluläre Färbung mit 1µl FoxP3 in 100 µl Permbuffer für mindestens 1h bei 4°C im Dunkeln.

Vor der durchflusszytometrischen Messung erfolgte eine weitere Waschung mit 2 ml Permbuffer, wonach das Pellet in 500 µl Flow Cytometry Staining Buffer aufgelöst wurde. Es wurden 200 µl der gefärbten Zellsuspension durchflusszytometrisch gemessen.

Wie in **Abbildung 10** gezeigt, wurden zunächst die T-Helferzellen mittels Gating der CD4-positiven Lymphozyten selektiert und im Anschluss regulatorische T-Zellen als FoxP3- sowie CD25-positive Zellen bestimmt. Es wurde der %-Anteil von regulatorischen T-Zellen an der gesamten Population der T-Helferzellen für die statistische Auswertung verwendet.



**Abbildung 10 Gating-Strategie zur Identifikation CD25-positiven, FoxP3-positiven Tregs.** Alle gemessenen Ereignisse wurden im Forward-Scatter nach Area und Height abgebildet und es wurden alle einzelnen Zellen selektiert (Singlets) (A). Durch Gating nach der Area von Sideward Scatter und Forward Scatter wurden die Lymphozyten selektiert (B). CD4-positive T-Helferzellen wurden aus der Lymphozytenpopulation gated (C). Regulatorische T-Zellen

wurden als CD25- sowie FoxP3-positive Zellen identifiziert. Die Gates wurden durch Fluoreszenz-Minus-One (FMO)-Kontrollen gesetzt (**D**).

#### 2.4.6 Messung der Daten im Durchflusszytometer

Die Messung der Daten erfolgte mit einem Attune Nxt Flow Cytometer (Thermofisher) bei fixierten Proben innerhalb spätestens zwei Tagen und bei unfixierten Proben am selben Tag.

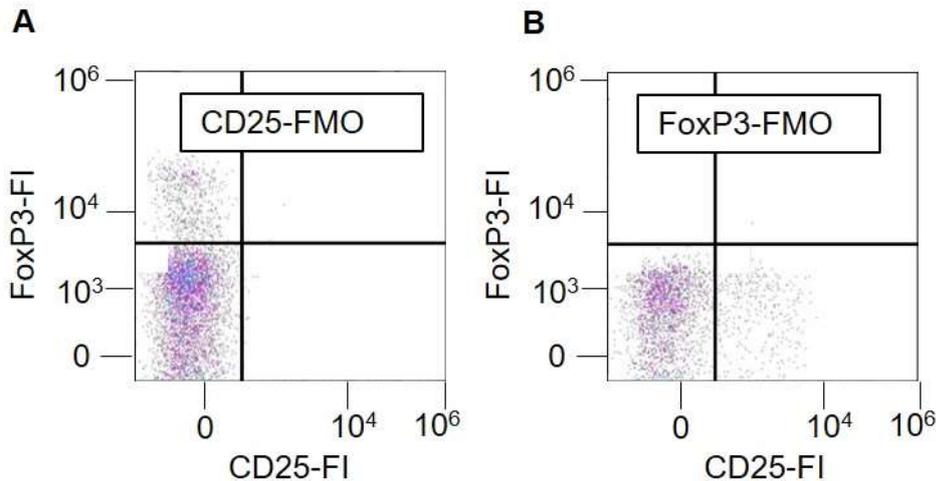
Bei der ersten Messung eines neuen Versuchsaufbaus wurden die Spannungen der Laser für eine hinreichende Diskriminierungsstärke zwischen positiver und negativer Färbung der einzelnen Farbstoffe angepasst.

Zwischen der Messung einzelner Proben erfolgte eine Waschung mit 500 µl PBS. Bei der Messung von Zellsuspensionen verschiedener Organe erfolgte beim Wechsel zwischen den Organen eine Waschung mit 500µl 10% Bleach in Aqua dest. sowie eine Waschung mit 500 µl PBS.

#### 2.4.7 Analyse der durchflusszytometrischen Daten

Die Analyse der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mit der Software Kaluza Analysis 5.0.

Die Gates wurden mit Hilfe von Fluoreszenz-Minus-One (FMOs)-Proben gesetzt und die erstellten Kaluza-Protokolle wurden für alle Proben einer Mausreihe verwendet. Es wurde eine für das jeweilige Versuchspanel angepasste Kompensation angewendet, die im Attune Nxt Flow Cytometer durch das Verwenden von Compensation Beads erstellt wurde und elektronisch auf die Kaluza Software übertragen wurde. In der folgenden Abbildung wird die Verwendung von FMOs beispielhaft am Gating von CD25- sowie FoxP3-positiven Tregs gezeigt (**Abbildung 11**). Für eine FMO wird jeweils ein bestimmter Antikörper für eine Färbung ausgelassen und es lässt sich in der Folge der Negativbereich des jeweiligen Antikörpers bestimmen.



**Abbildung 11 Beispiel für das Erstellen einer Gating-Strategie mittels FMO anhand von CD25- und FoxP3-positiven Tregs.** Mit Hilfe einer CD25-FMO-Probe wurden die CD25-positiven und CD25-negativen Zellen separiert (**A**). Mit Hilfe einer FoxP3-FMO-Probe wurden die FoxP3-positiven und FoxP3-negativen Zellen separiert (**B**).

#### 2.4.8 Ausschluss von Proben

Einzelne Proben wurden für die statistischen Analysen ausgeschlossen, was auf verschiedene experimentelle Unzulänglichkeiten zurückzuführen war. So wurden Proben, bei denen eine Antikörperfärbung ausgelassen wurde oder die eine zu geringe Zellzahl in der durchflusszytometrischen Analyse zeigten, nicht für die statistischen Analysen weiterverwendet. Die genauen Gründe für den Ausschluss einzelner Proben können den Primärdaten entnommen werden.

#### 2.5 Statistik

Für die statistischen Auswertungen wurde das Programm Graphpad Prism V8.0 verwendet.

Zunächst erfolgte ein Grubbs-Test auf Ausreißer und die festgestellten Extremwerte wurden von den weiteren statistischen Auswertungen ausgeschlossen. Im Anschluss wurde eine Prüfung der Normalverteilung mit dem Kolgorov-Smirnov-Test durchgeführt. Bei Normalverteilung der Daten erfolgte bei einer Vergleichsvariable von zwei unabhängigen Experimentalgruppen ein ungepaarter T-Test, bei nicht normalverteilten Daten ein Mann-Whitney-U-Test. Bei Experimenten mit zwei Vergleichsvariablen erfolgte eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni-korrigiertem post-hoc Test. Das Signifikanzniveau lag bei 5% ( $P < 0.05$ ).

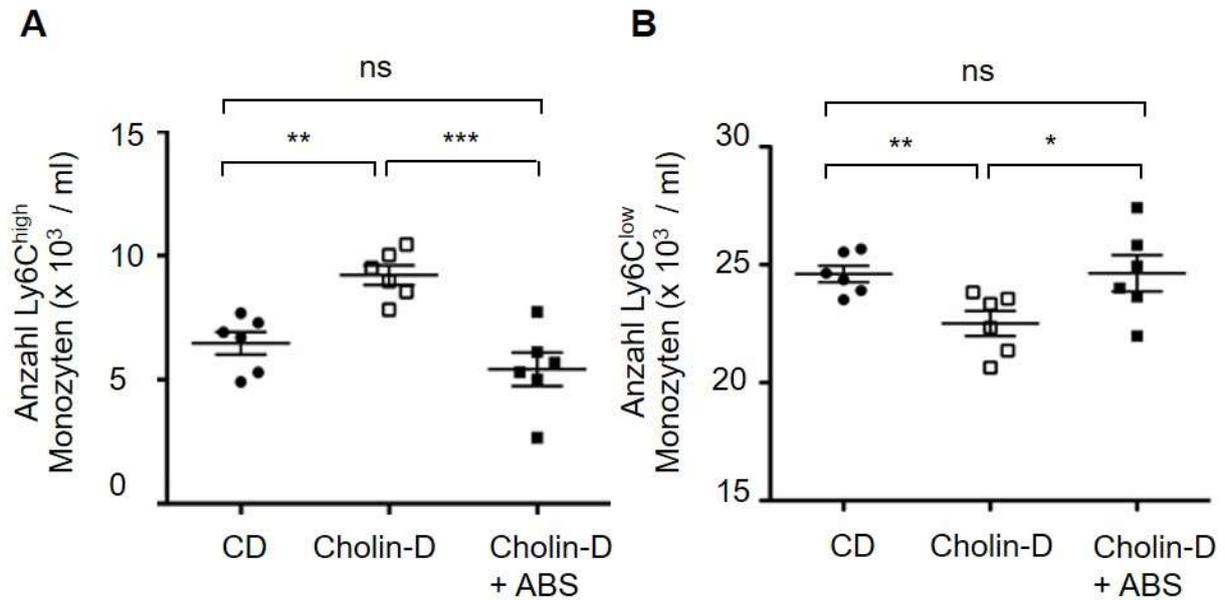
## 3. Ergebnisse

### 3.1 TMAO

In einer klinischen Studie unserer Arbeitsgruppe zeigte sich eine Assoziation des Anteils inflammatorischer Monozyten mit der Serum-Konzentration von TMAO [70]. Auf Basis dieser Beobachtungen wurde entschieden im Rahmen dieser Arbeit den Einfluss einer cholinreichen Diät, die zu vermehrter Produktion von TMAO führt, auf die Anteile von Monozytensubpopulationen in einem Mausmodell zu untersuchen. Dazu wurden zudem sekundär gnotobiotische Mäuse verwendet, um eine Negativkontrolle ohne Darmmikrobiom und folglich ohne Produktion von TMA durch das Darmmikrobiom zu generieren. Die erfolgreiche Verwendung von sekundär gnotobiotischen Mäusen (mit Antibiotika = ABS) als Negativkontrolle für die Untersuchung der Wirkung von TMAO wurde bereits in verschiedenen Studien gezeigt [42].

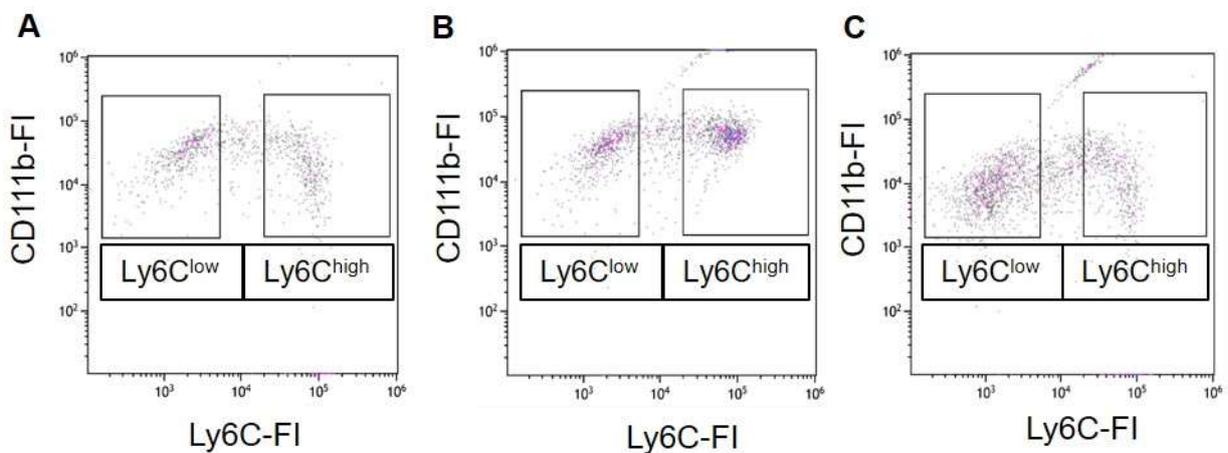
#### 3.1.1 Einfluss von TMAO auf Monozytensubpopulationen im Blut

Wildtyp-Mäuse mit intaktem Darmmikrobiom sowie sekundär gnotobiotische Wildtyp-Mäuse (ABS) wurden für vier Wochen mit Kontroll- (CD) oder cholinreicher Diät (Cholin-D) gefüttert. Wie in **Abbildung 12** ersichtlich konnte im Blut ein Anstieg der pro-inflammatorischen Ly6C-high-Monozyten in Mäusen mit cholinreicher Diät (Cholin-D, 1,3%) im Vergleich zur Kontrolldiät (CD) beobachtet werden („Cholin-D“ vs. „CD“: „ $9,2 \pm 0,5 \times 10^3$  pro ml, N=6“ vs. „ $6,5 \pm 0,5 \times 10^3$  pro ml, N=6“;  $p=0,001$ ). Demgegenüber zeigte sich in sekundär gnotobiotischen Mäusen mit cholinreicher Diät (ABS) dieser Anstieg supprimiert („Cholin-D ABS“ vs. „Cholin-D“: „ $5,4 \pm 0,7 \times 10^3$  pro ml, N=6“ vs. „ $9,2 \pm 0,5 \times 10^3$  pro ml, N=6“;  $p < 0,001$ ). Im Gegensatz zu den pro-inflammatorischen Ly6C-high-Monozyten zeigte sich bei anti-inflammatorischen Ly6C-low-Monozyten ein Abfall bei Mäusen mit cholinreicher Diät („Cholin-D“ vs. „CD“: „ $15,0 \pm 1,1 \times 10^3$  pro ml, N=6“ vs. „ $19,2 \pm 0,7 \times 10^3$  pro ml, N=6“;  $p=0,008$ ). Dieser Abfall zeigte sich in sekundär gnotobiotischen Mäusen mit cholinreicher Diät nicht („Cholin-D ABS“: „ $19,3 \pm 1,5 \times 10^3$  pro ml, N=6“;  $p=0,046$  versus „Cholin-D“) [70].



**Abbildung 12 Einfluss von cholinreicher Diät auf die Anzahl von Ly6C-high- und Ly6C-low-Monozyten im Blut.** Es wird die Anzahl der Ly6C-high-Monozyten (**A**) sowie Ly6C-low-Monozyten im Blut (**B**) von Wildtyp-Mäusen mit Kontroll- (**CD**) oder cholinreicher Diät (**Cholin-D**) oder sekundär gnotobiotischen Wildtyp-Mäusen (**ABS**) mit cholinreicher Diät (**Cholin-D**) gezeigt. Dargestellt werden Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Versuchsgruppen. Die statistische Auswertung erfolgte bei normalverteilten Daten mit einem ungepaarten T-Test.

Beispielhaft sind in **Abbildung 13** die Verteilungen der Monozytensubpopulationen bei Kontrolldiät, cholinreicher Diät sowie cholinreicher Diät bei sekundär gnotobiotischen Mäusen abgebildet. Es ist eine Verschiebung zu pro-inflammatorischen Ly6C-high-Monozyten bei cholinreicher Diät zu erkennen, die bei sekundär gnotobiotischen Mäusen nicht stattfindet.



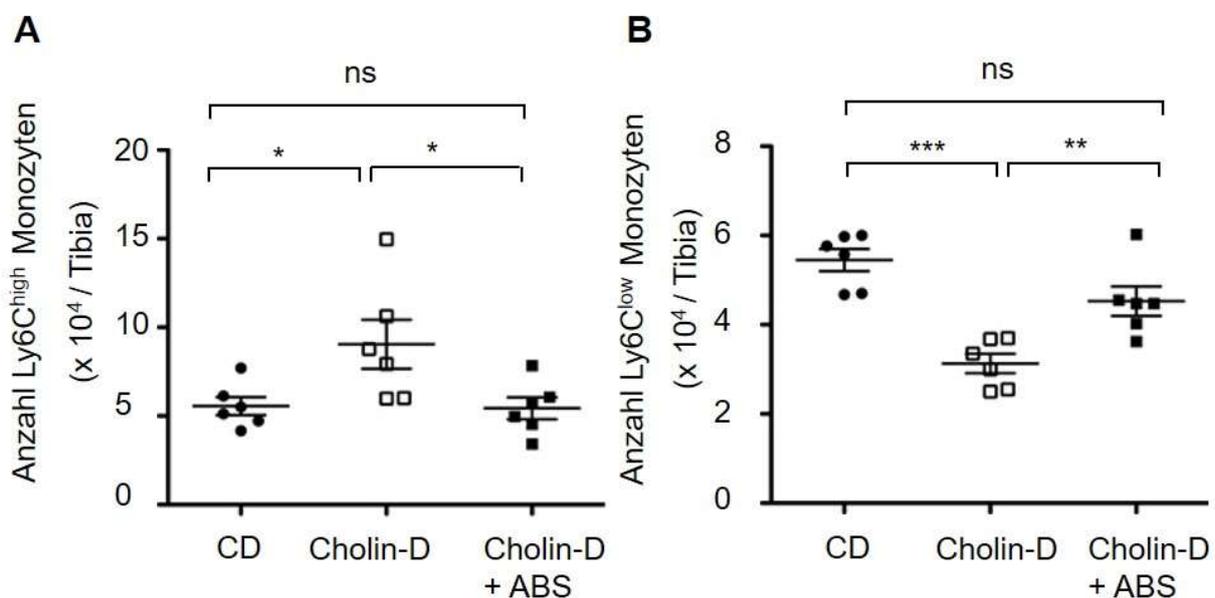
**Abbildung 13 Darstellung exemplarischer Gates von Ly6C-low- und Ly6C-high-Monozyten**

**im Blut.** SPF-Mäuse mit Kontrolldiät (**A**), cholinreicher Diät (**B**) und sekundär gnotobiotischen Mäuse (ABS) mit cholinreicher Diät (**C**).

### 3.1.2 Einfluss von TMAO auf Monozytensubpopulationen im Knochenmark

Um zu untersuchen, ob die Verschiebung von Monozytensubpopulationen bereits bei der Bildung von Monozyten im Knochenmark stattfindet, wurden Monozytensubpopulationen im Knochenmark analysiert. Es zeigte sich wie im Blut eine erhöhte Anzahl von pro-inflammatorischen Ly6C-high-Monozyten in Mäusen mit cholinreicher Diät im Vergleich zur Kontrolldiät („Cholin-D“ vs. „CD“:  $9,1 \pm 1,4 \times 10^4$  pro Tibia, N=6“ vs.  $5,6 \pm 0,5 \times 10^4$  pro Tibia, N=6“;  $p=0,040$ ), wobei dieser Anstieg in sekundär gnotobiotischen Mäusen nicht nachweisbar war („Cholin-D ABS“ vs. „Cholin-D“:  $5,4 \pm 0,6 \times 10^4$  pro Tibia, N=6“ vs.  $9,1 \pm 1,4 \times 10^4$  pro Tibia, N=6“;  $p=0,038$ ) (**Abbildung 14 (A)**).

Dazu kongruent ließ sich eine erniedrigte Anzahl von anti-inflammatorischen Ly6C-low-Monozyten in Mäusen mit cholinreicher Diät nachweisen („Cholin-D“ vs. „CD“:  $3,1 \pm 0,2 \times 10^3$  pro Tibia, N=6“ vs.  $5,5 \pm 0,2 \times 10^3$  pro Tibia, N=6“;  $p<0,001$ ). Dieser Effekt zeigte sich nicht in sekundär gnotobiotischen Mäusen („Cholin-D ABS“ vs. „Cholin-D“:  $4,5 \pm 0,3 \times 10^3$  pro Tibia, N=6“ vs.  $3,1 \pm 0,2 \times 10^3$  pro Tibia, N=6“;  $p=0,006$ ) (**Abbildung 14 (B)**) [70].



**Abbildung 14 Einfluss von cholinreicher Diät auf die Anzahl von Ly6C-high- und Ly6C-low-Monozyten im Knochenmark.** Es wird die Anzahl der Ly6C-high-Monozyten (**A**) sowie Ly6C-low-Monozyten im Knochenmark (**B**) von Wildtyp-Mäusen mit Kontroll- (**CD**) oder cholinreicher Diät (**Cholin-D**) oder sekundär gnotobiotischen Wildtyp-Mäusen (**ABS**) mit cholinreicher Diät (**Cholin-D**) gezeigt. Dargestellt werden Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen

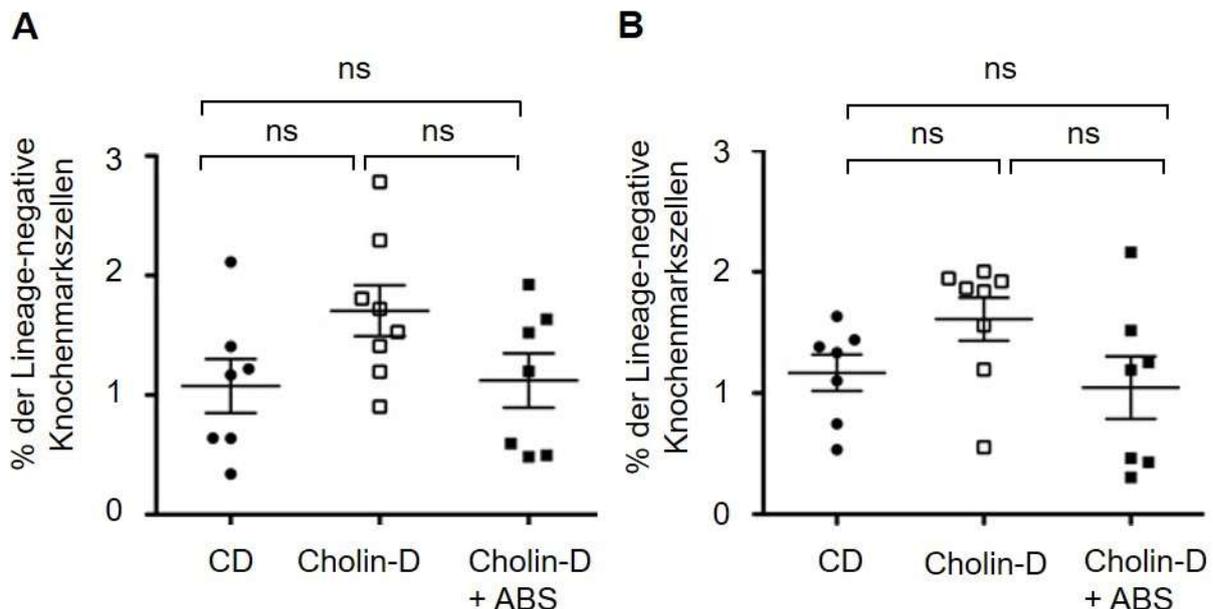
Versuchsgruppen. Die statistische Auswertung erfolgte bei normalverteilten Daten mit einem ungepaarten T-Test.

### 3.1.3 Einfluss von TMAO auf Hämatopoetische Stammzellen und Monozytenprogenitorzellen im Knochenmark

Zur weiteren Analyse eines möglichen Effektes von TMAO auf die Bildung von Monozyten im Knochenmark wurden die Anteile von Hämatopoetischen Stammzellen sowie Monozytenprogenitorzellen untersucht.

Es konnte ein nicht-signifikanter Trend zu einem erhöhten Anteil hämatopoetischer Stammzellen sowie Monozytenprogenitorzellen bei Behandlung der Mäuse mit cholinreicher Diät verzeichnet werden (Hämatopoetische Stammzellen: „Cholin-D“ vs. „CD“: „ $1,7 \pm 0,2\%$  der Lineage-neg. Zellen,  $N=8$ “ vs. „ $1,1 \pm 0,2\%$  der Lineage-neg. Zellen,  $N=7$ “;  $p=0,063$ ; MDPs: „Cholin-D“ vs. „CD“: „ $1,6 \pm 0,1\%$  der Lineage-neg. Zellen,  $N=8$ “ vs. „ $1,2 \pm 0,2\%$  der Lineage-neg. Zellen,  $N=7$ “;  $p=0,084$ ).

Bei sekundär gnotobiotischen Mäusen zeigte sich dieser Trend nicht (Hämatopoetische Stammzellen: „Cholin-D“ vs. „Cholin-D ABS“: „ $1,7 \pm 0,2\%$  der Lineage-neg. Zellen,  $N=8$ “ vs. „ $1,1 \pm 0,2\%$  der Lineage-neg. Zellen,  $N=7$ “;  $p=0,083$ ; MDPs: „Cholin-D“ vs. „Cholin-D ABS“: „ $1,6 \pm 0,1\%$  der Lineage-neg. Zellen,  $N=8$ “ vs. „ $1,1 \pm 0,3\%$  der Lineage-neg. Zellen,  $N=7$ “;  $p=0,089$ ).



**Abbildung 15 Einfluss von cholinreicher Diät auf den Anteil von hämatopoetischen Stammzellen sowie Monozytenvorläuferzellen an Lineage-negativen Knochenmarkszellen.** Es wird der Anteil von Hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) (A) sowie von gemeinsamen

Makrophagen-, Monozyten- sowie Dendritischerprogenitorzellen (MDP) (**B**) von allen Lineage-negativen Zellen im Knochenmark von Wildtyp-Mäusen mit Kontroll- (**CD**) oder cholinreicher Diät (**Cholin-D**) oder sekundär gnotobiotischen Wildtyp-Mäusen (**ABS**) mit cholinreicher Diät (**Cholin-D**) gezeigt. Dargestellt werden Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Versuchsgruppen. Die statistische Auswertung erfolgte bei normalverteilten Daten bei den Daten der HSZ mit einem ungepaarten T-Test und bei nicht-normalverteilten Daten bei den MDP mit einem Mann-Whitney-U-Test.

### 3.1.4 Einfluss von TMAO auf Monozytenadhäsion

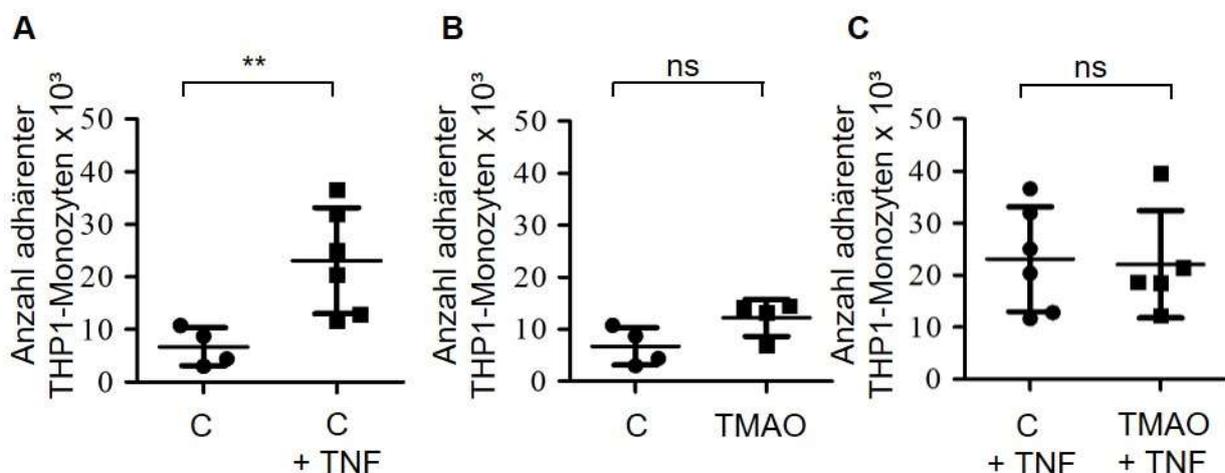
In dieser Arbeit wurde ebenfalls der Einfluss einer Vorbehandlung von Monozyten mit TMAO in einem Adhäsionsexperiment untersucht.

Dafür wurden sowohl unbehandelte als auch für einen Zeitraum von sechs Stunden mit 10 ng TNF- $\alpha$  pro ml Medium stimulierte HAEC verwendet.

Wie in **Abbildung 16 (A)** ersichtlich, zeigte sich, dass die Stimulation der HAEC mit TNF- $\alpha$  eine signifikante Erhöhung der Anzahl adhärenter Monozyten bewirkte („C“ vs. „TNF“: „ $6,7 \pm 3,6 \times 10^3$  adhärenter Monozyten, N=4“ vs. „ $23,1 \pm 10,1 \times 10^3$  adhärenter Monozyten, N=6“; p=0,009).

Bei unstimulierten HAEC war ein nicht-signifikanter Trend zu einer verstärkten Monozytenadhäsion bei mit TMAO-vorbehandelten Monozyten zu verzeichnen („C“ vs. „TMAO“: „ $6,7 \pm 3,6 \times 10^3$  adhärenter Monozyten, N=4“ vs. „ $12,2 \pm 3,5 \times 10^3$  adhärenter Monozyten, N=4“; p=0,114) (**Abbildung 16 (B)**).

Bei mit TNF- $\alpha$  stimulierten HAEC konnte kein signifikanter Unterschied bei einer Behandlung der Monozyten mit einer Konzentration von 200 $\mu$ M TMAO im Medium festgestellt werden (**Abbildung 16 (C)**).



**Abbildung 16 Einfluss von TMAO auf die Monozytenadhäsion an HAEC unter inflammatorischen Bedingungen.** Eine Stimulation der HAEC mit TNF- $\alpha$  (TNF: 10 ng/ml TNF $\alpha$ )

bewirkte einen signifikanten Anstieg der Anzahl adhärenter Monozyten im Kontrollmedium (**C**: Kontrollmedium) (**A**), wobei eine Behandlung der Monozyten mit TMAO (**TMAO**: 200µM TMAO in Kontrollmedium) sowohl bei unbehandelten HAEC (**B**) als auch bei stimulierten HAEC (**C**) keinen signifikanten Unterschied der Anzahl adhärenter Monozyten zeigte. Es wurden in jeder Versuchsgruppe mindestens vier Versuche durchgeführt. Dargestellt werden Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Versuchsgruppen. Die statistische Auswertung erfolgte bei normalverteilten Daten mit einem ungepaarten T-Test.

## 3.2 Propionat

Zur Untersuchung des Einflusses von Propionat auf Endothelzellfunktion sowie Verteilung von Immunzellen wurden sowohl Zellkulturexperimente als auch Mausversuche durchgeführt.

### 3.2.1 Einfluss von Propionat auf Monozytensubpopulationen im Blut

Um die Fragestellung, ob Propionat eine Verschiebung zu protektiven Ly6C-low-Monozyten sowie eine Verringerung des Anteils von Monozyten an allen Leukozyten bewirkt, wurden Monozytensubpopulationen im Blut bestimmt.

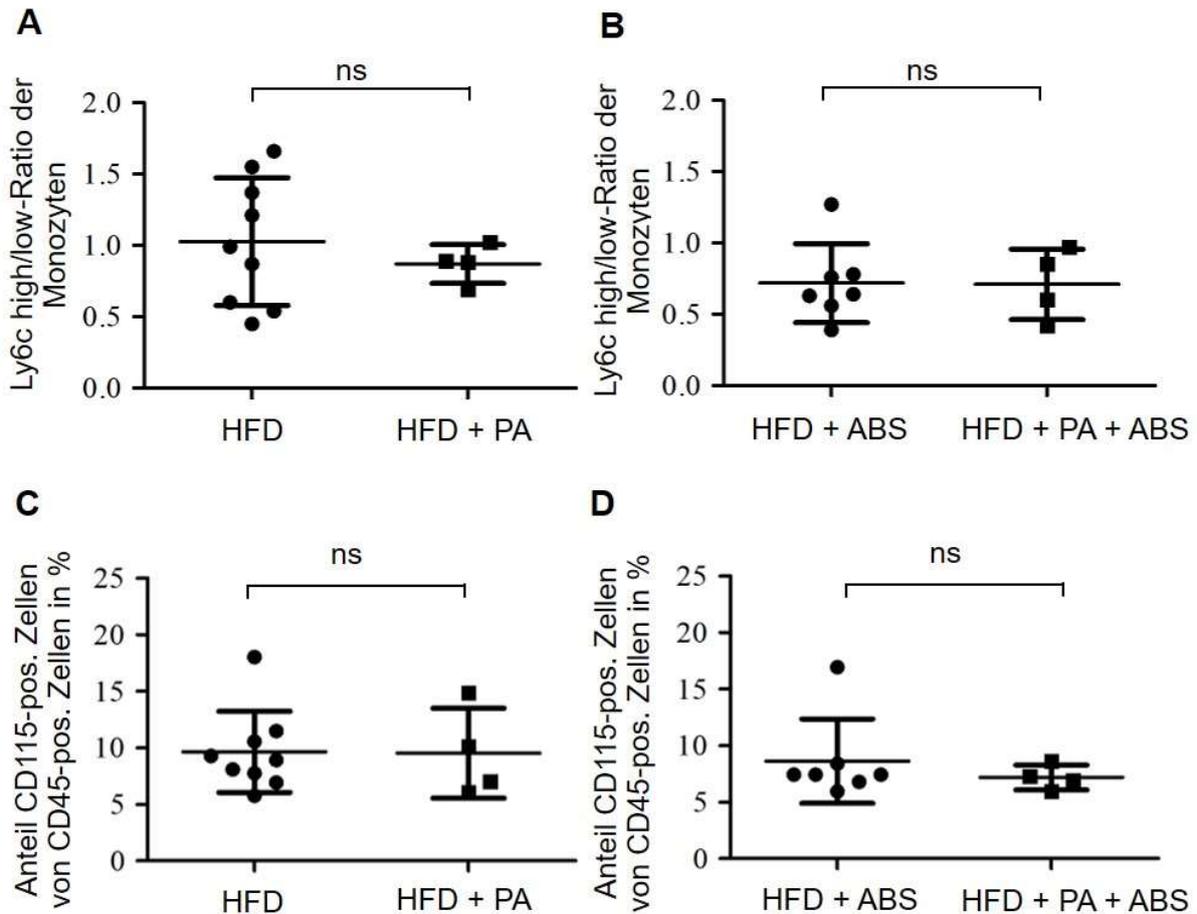
Die Ergebnisse der Analysen der Monozyten werden als Verhältnisse der Ly6C-high zu Ly6C-low-Monozyten dargestellt. Die Ly6C-high- sowie die Ly6C-low-Monozyten bilden zusammen die Gesamtheit aller untersuchten Monozyten in den durchgeführten Experimenten (Siehe Methodenteil). Ly6C-high-Monozyten gelten als pro-inflammatorische Monozyten und Ly6C-low-Monozyten als „patrouillierende“ anti-inflammatorische Monozyten. Somit bedeutet eine hohe Ly6C-high/low-Ratio ein Überwiegen der pro-inflammatorischen Monozyten.

Weiterhin wurde der Anteil der Monozyten an allen Leukozyten als Anteil CD115-positiver Zellen von allen CD45-positiven Zellen bestimmt.

### **Monozyten im Blut in Wildtyp-Mäusen**

Wildtyp-Mäuse mit intaktem Darmmikrobiom sowie sekundär gnotobiotische Wildtyp-Mäuse (ABS) wurden für sechs Wochen mit HFD gefüttert sowie für vier Wochen täglich mit 0,2 ml Propionat (PA, 150mM in MilliQ-Wasser) oder Kontrolllösung (MilliQ-Wasser) gavagiert.

Es konnten sowohl bei der Ly6C-high/low-Ratio als auch beim Anteil der Monozyten im Blut keine signifikanten Unterschiede bei einer Behandlung mit Propionat nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 17**).



**Abbildung 17 Einfluss von Propionat auf die Ly6C-high/low-Ratio sowie den Anteil der Monozyten im Blut in Wildtyp-Mäusen.** Durchflusszytometrisch wurde das Verhältnis von Ly6C-high- zu Ly6C-low-Monozyten (**A,B**) sowie der Anteil von Monozyten an den Leukozyten (**C,D**) im Blut bestimmt. Die Anzahl der für die Analysen verwendeten Datensätze variierte zwischen vier und neun. Dargestellt werden Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Versuchsgruppen. Die statistische Auswertung erfolgte bei nicht-normalverteilten Daten mit einem Mann-Whitney-U-Test.

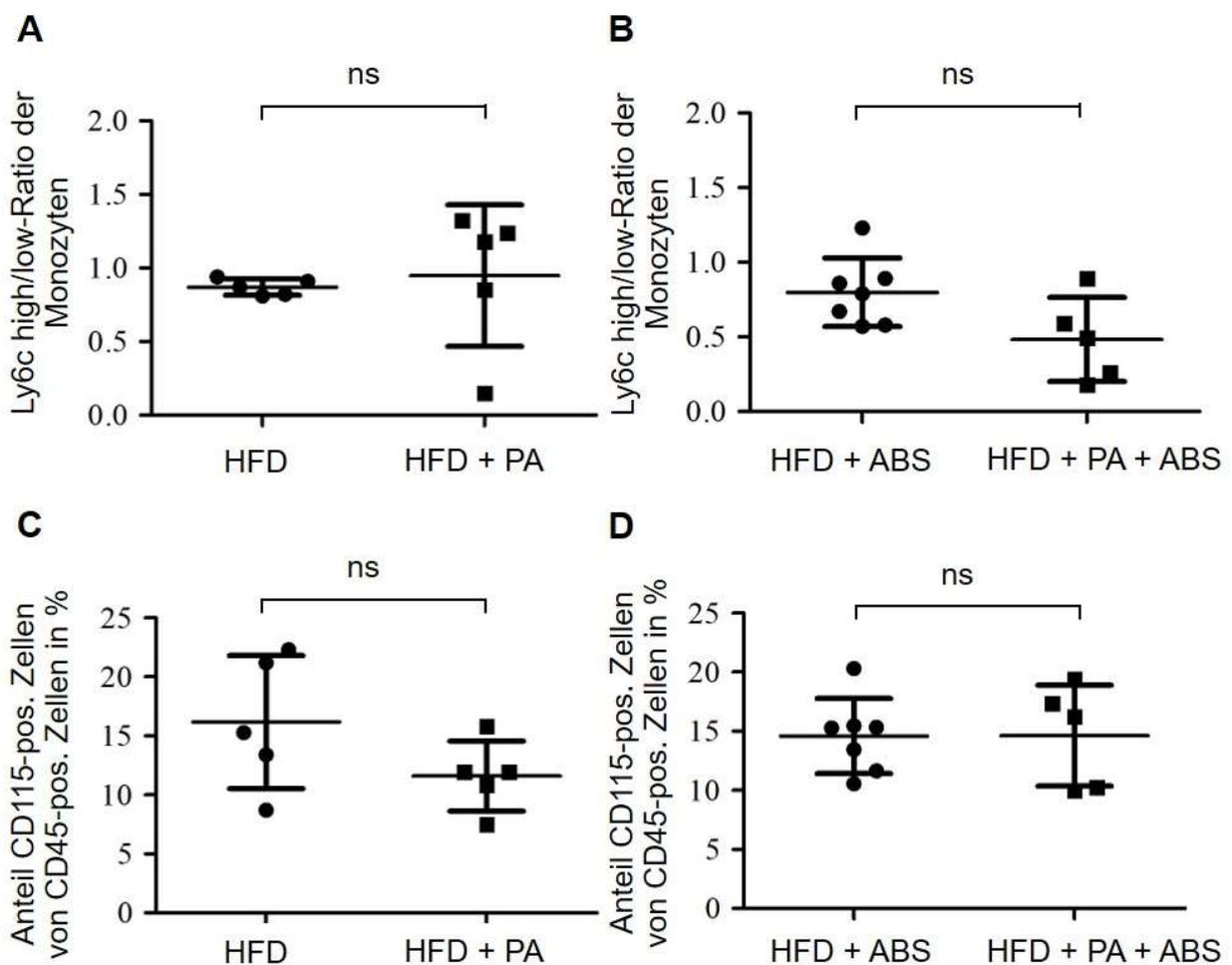
Bei Wildtyp-Mäusen ist die Entwicklung eines atherosklerotischen Phänotyps trotz einer 6-wöchigen HFD unwahrscheinlich, weshalb in der Folge weitere Analysen der Monozyten und T-Zellen mit ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen durchgeführt wurden. Diese stellen ein etabliertes Atherosklerose-Mausmodell dar und entwickeln bereits nach wenigen Wochen atherosklerotische Plaques [71].

### Monozyten im Blut in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen

Mit gleichem Versuchsaufbau wurden ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse mit intaktem Darmmikrobiom sowie sekundär gnotobiotische ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse (ABS) für sechs Wochen mit HFD gefüttert sowie

für vier Wochen täglich mit 0,2 ml Propionat (PA, 150mM in MilliQ-Wasser) oder Kontrolllösung (MilliQ-Wasser) gavagiert.

Im Blut zeigte sich bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen kein signifikanter Unterschied der Ly6C-high/low-Ratio bei Behandlung mit Propionat. Dagegen konnte bei sekundär gnotobiotischen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen ein nicht signifikanter Trend zu einer verringerten Ly6C-high/low-Ratio nachgewiesen werden. Bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte ein nicht-signifikanter Trend zu einem verringerten Anteil an CD115-positiven Monozyten beobachtet werden. Dieser war bei sekundär gnotobiotischen Mäusen nicht nachweisbar.

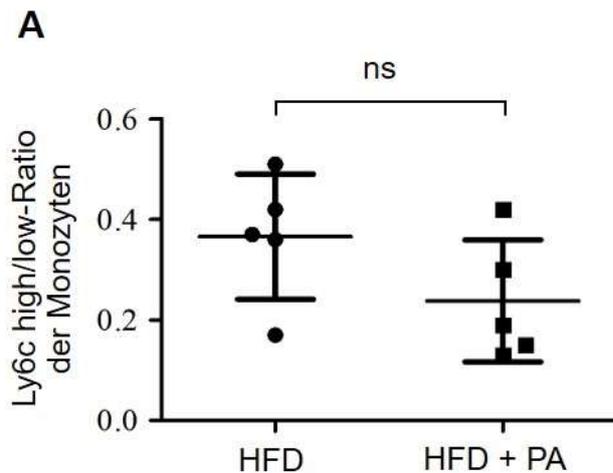


**Abbildung 18 Einfluss von Propionat auf die Ly6C-high/low-Ratio sowie den Anteil der Monozyten im Blut in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Durchflusszytometrisch wurde das Verhältnis von Ly6C-high- zu Ly6C-low-Monozyten (A,B) sowie der Anteil von Monozyten an den Leukozyten (C,D) im Blut bestimmt. Die Anzahl der für die Analysen verwendeten Datensätze variierte zwischen vier und sieben. Dargestellt werden Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Versuchsgruppen. Die statistische Auswertung erfolgte bei normalverteilten Daten mit einem ungepaarten T-Test.

### 3.2.2 Einfluss von Propionat auf Monozytensubpopulationen in MLN

Die lokale Aufnahme und Wirkung von Propionat finden im Ileum und im Zäkum statt [47]. In diesem Bereich werden für die Immunität des Darms, aber auch für systemische Immunreaktionen spezifische Immunzellen gebildet.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Verhältnis von Ly6C-high zu Ly6C-low-Monozyten in MLN bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen unter HFD mit Behandlung mit Propionat (**Abbildung 19**).



**Abbildung 19 Einfluss von Propionat auf die Ly6C-high/low-Ratio der Monozyten in MLN.** Durchflusszytometrisch wurde das Verhältnis von Ly6C-high- zu Ly6C-low-Monozyten (**A**) in den mesenterialen Lymphknoten bestimmt. Es wurden je Versuchsgruppe fünf Datensätze für die Analysen verwendet. Dargestellt werden Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Versuchsgruppen. Die statistische Auswertung erfolgte bei normalverteilten Daten mit einem ungepaarten T-Test.

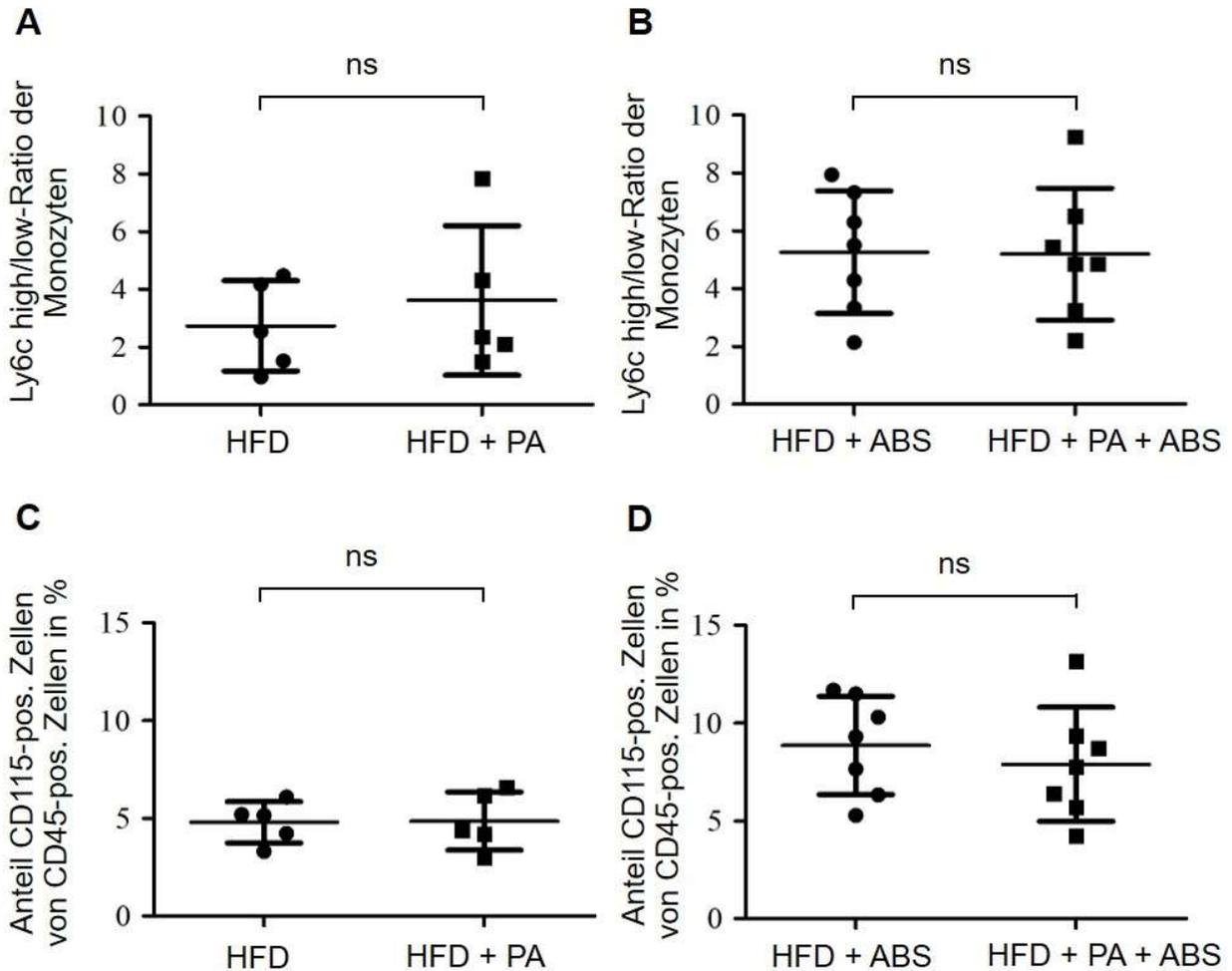
### 3.2.3 Einfluss von Propionat auf Monozytensubpopulationen im Knochenmark

Monozyten werden vorwiegend im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen sowie gemeinsamen Monozyten und Dendritischen Vorläuferzellen gebildet. Es entstehen zunächst Ly6C-high-Monozyten, die dann teilweise zu Ly6C-low-Monozyten ausdifferenzieren. Es wurde untersucht, ob eine Behandlung mit Propionat einen Einfluss auf das Verhältnis sowie die Anzahl von Monozyten-Subpopulationen im Knochenmark hat.

Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede der Ly6C-high/low-Ratio sowohl bei SPF- als auch bei gnotobiotischen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen auf HFD. (**Abbildung 20**)

Zudem zeigten sich sowohl in SPF- als auch in gnotobiotischen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen auf HFD

unter Behandlung mit Propionat keine signifikanten Unterschiede im Anteil CD115-positiver Monozyten. (**Abbildung 20**)

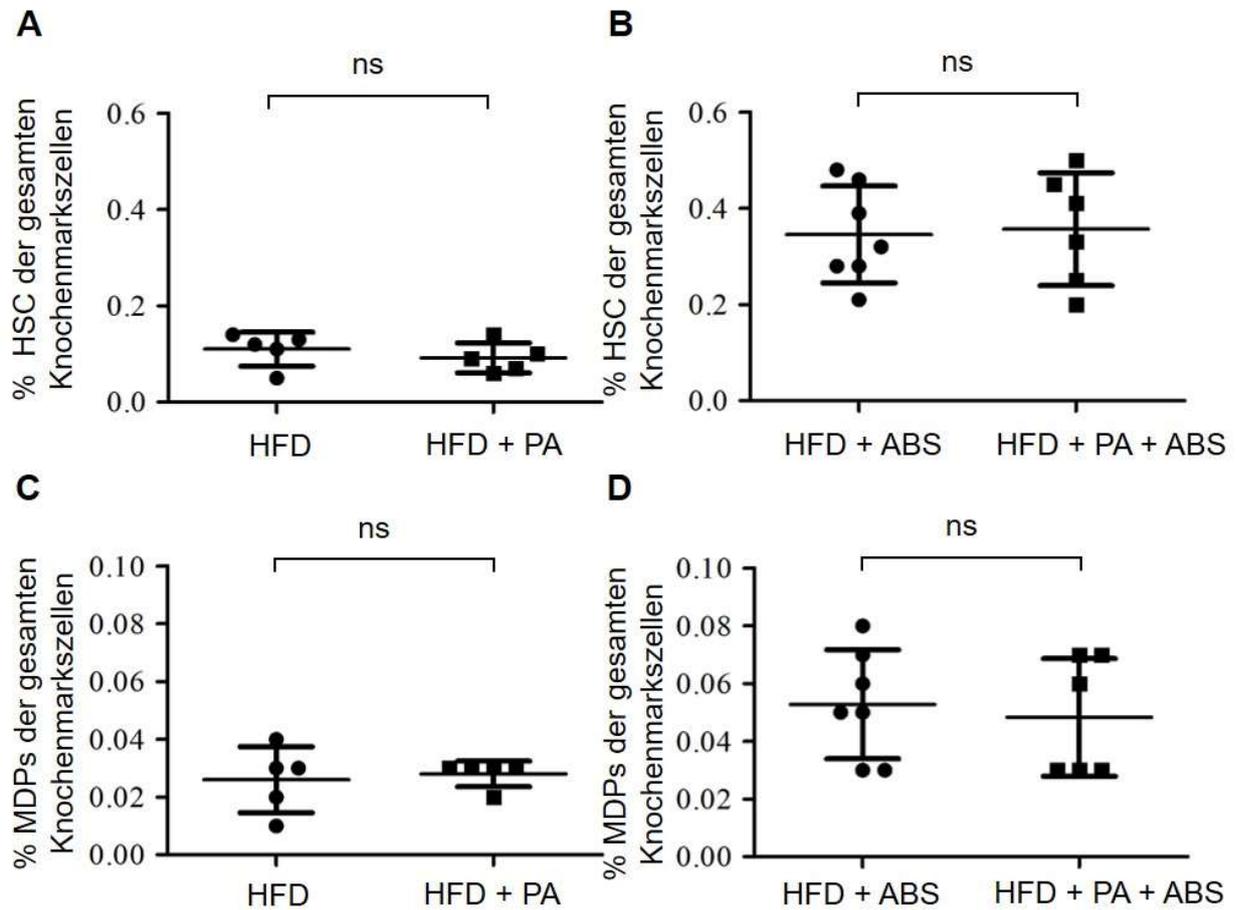


**Abbildung 20 Einfluss von Propionat auf die Ly6C-high/low-Ratio sowie den Anteil der Monozyten im Knochenmark.** Durchflusszytometrisch wurde das Verhältnis von Ly6C-high- zu Ly6C-low-Monozyten (**A,B**) sowie der Anteil von Monozyten an den Leukozyten (**C,D**) im Knochenmark bestimmt. Die Anzahl der für die Analysen verwendeten Datensätze variierte zwischen fünf und sieben. Dargestellt werden Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Versuchsgruppen. Die statistische Auswertung erfolgte bei normalverteilten Daten mit einem ungepaarten T-Test.

### 3.2.4 Einfluss von Propionat auf Monozytenprogenitorzellen und Hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark

Weiterhin wurde untersucht, ob eine Behandlung mit Propionat eine Veränderung der Anteile von Hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) sowie von gemeinsamen Makrophagen-, Monozyten- sowie Dendritischer Progenitorzellen (MDP) im Knochenmark bewirkt. Es wurden die Anteile der jeweiligen Zellpopulation von allen

Knochenmarkszellen bestimmt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei Behandlung mit Propionat sowohl bei HSZ als auch bei MDP. Weiterhin konnten keine signifikanten Unterschiede bei Behandlung mit Propionat sowohl bei HSZ als auch bei MDP bei sekundär gnotobiotischen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen festgestellt werden (**Abbildung 21**).



**Abbildung 21 Einfluss von Propionat auf den Anteil von hämatopoetischen Stammzellen sowie Monozytenvorläuferzellen an Lineage-negativen Knochenmarkszellen.** Durchflusszytometrisch wurde der Anteil von Hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) (**A,B**) sowie von gemeinsamen Makrophagen-, Monozyten- sowie Dendritischerprogenitorzellen (MDP) (**C,D**) von allen Zellen im Knochenmark bestimmt. Die Anzahl der für die Analysen verwendeten Datensätze variierte zwischen fünf und sieben. Dargestellt werden Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Versuchsgruppen. Die statistische Auswertung erfolgte bei normalverteilten Daten bei den HSZ mit einem ungepaarten T-Test und bei nicht-normalverteilten Daten bei den MDP mit einem Mann-Whitney-U-Test.

### 3.2.5 Einfluss von Propionat auf T-Zell-Populationen

In weiteren durchflusszytometrischen Analysen wurde der Einfluss von Propionat auf die Verhältnisse von T-Zell-Subpopulationen, welchen zusätzlich zu den Monozyten eine wichtige Rolle in der Plaquebildung und Variation der Plaquestabilität zugeschrieben wird,

untersucht [32]. Dafür wurden die Anteile von regulatorischen T-Zellen sowie Th1- und Th17-Zellen an der gesamten T-Helferzellpopulation gemessen, um die Fragestellung zu beantworten, ob Propionat ein verändertes Verhältnis zwischen pro-inflammatorischen T-Effektorzellen und immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen bewirkt.

Die Untersuchungen erfolgten im Blut, in der Milz, in den mesenterialen Lymphknoten sowie in der Leber.

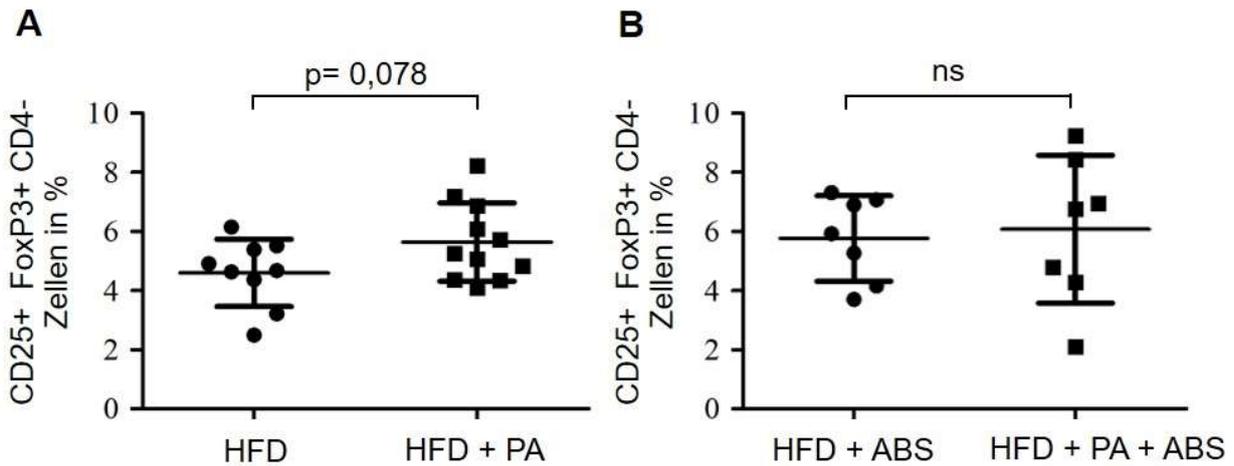
Die Wahl der untersuchten Organe erfolgte um systemische, lokale sowie mögliche indirekte Effekte von Propionat zu überprüfen.

Da Propionat zunächst im Dünndarm aufgenommen und danach in der Leber verstoffwechselt wird und in diesen Kompartimenten die höchste Konzentration im Metabolismus vorweist, wurden Messungen in mesenterialen Lymphknoten und Leber durchgeführt.

Die Messungen von T-Zellen im Blut erfolgten, um systemische Auswirkungen von Propionat zu ermitteln. Zuletzt wurden die Analysen der T-Zellen ebenso in der Milz durchgeführt, da in dieser ein Großteil der Differenzierung und Vermehrung von T-Zellen stattfindet.

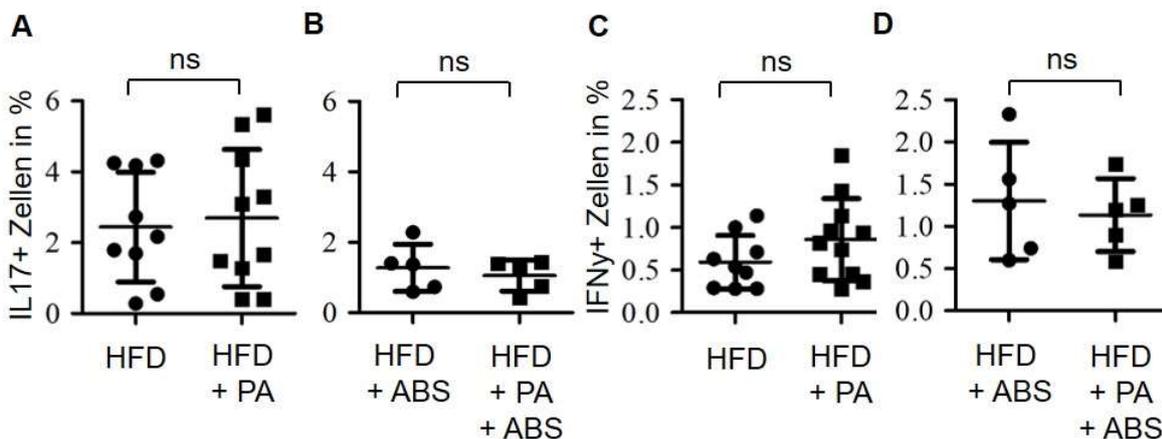
### **Im Blut**

In SPF-ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte ein nicht-signifikanter Trend zu einem erhöhten Anteil von Tregs bei Behandlung mit Propionat („HFD " vs. „HFD + PA ": „4,6±0,4% Anteil CD25+, FoxP3+ Tregs, N=9" vs. „5,6±0,4% Anteil CD25+, FoxP3+ Tregs, N=11"; p=0,078) festgestellt werden. Dieser Trend zeigte sich bei sekundär gnotobiotischen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht (**Abbildung 22**).



**Abbildung 22 Einfluss von Propionat auf den Anteil von CD25-positiven, FoxP3-positiven Tregs im Blut.** Durchflusszytometrisch wurde der Anteil von regulatorischen T-Zellen an allen T-Helferzellen sowohl bei Mäusen mit intaktem (A) als auch depliertem Darmmikrobiom (B) im Blut bestimmt. Dargestellt werden Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Versuchsgruppen. Die Anzahl der für die Analysen verwendeten Datensätze variierte zwischen sieben und elf. Die statistische Auswertung erfolgte bei normalverteilten Daten mit einem ungepaarten T-Test.

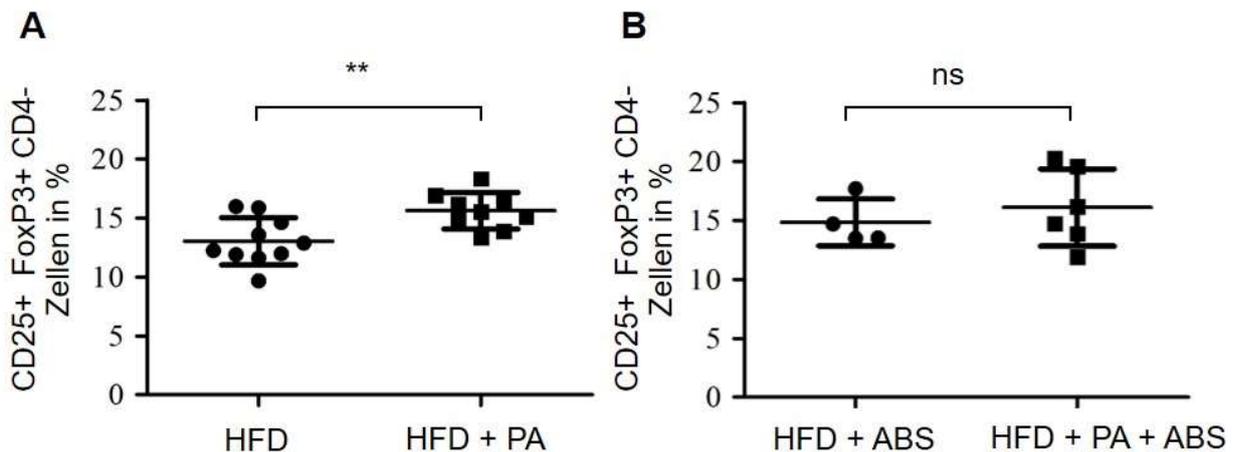
Propionat bewirkte wie in **Abbildung 23** dargestellt sowohl bei SPF- als auch bei gnotobiotischen Mäusen keine signifikanten Unterschiede des Anteils von Th1- und Th17-Zellen.



**Abbildung 23 Einfluss von Propionat auf den Anteil von IL17A-positiven Th17-Zellen sowie IFN $\gamma$ -positiven Th1-Zellen im Blut.** Durchflusszytometrisch wurde der Anteil von Th1- (IFN $\gamma$ -positiven) und Th17- (IL17A-positiven) Zellen an allen T-Helferzellen sowohl bei Mäusen mit intaktem (A, C) als auch depliertem Darmmikrobiom (B, D) bestimmt. Die Anzahl der für die Analysen verwendeten Datensätze variierte zwischen fünf und elf. Dargestellt werden Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Versuchsgruppen. Die statistische Auswertung erfolgte bei normalverteilten Daten mit einem ungepaarten T-Test.

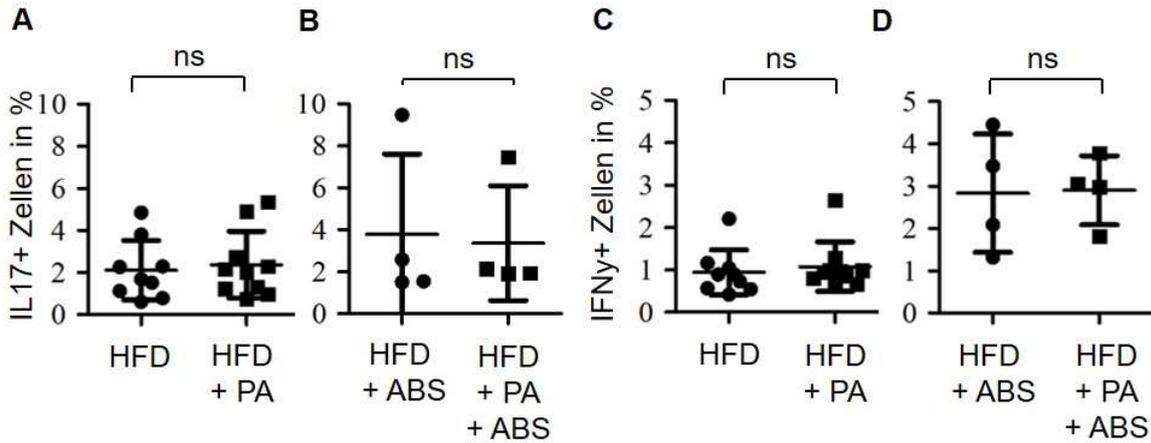
## In MLN

Wie in **Abbildung 24** dargestellt, konnte eine signifikante Erhöhung des Anteils von Tregs bei SPF-ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen bei Behandlung mit Propionat beobachtet werden („HFD " vs. „HFD + PA": „13,5±0,8% Anteil CD25+, FoxP3+ Tregs, N=11" vs. „15,6±0,5% Anteil CD25+, FoxP3+ Tregs, N=9"; p=0,045). In sekundär gnotobiotischen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen (ABS) zeigte sich keine signifikante Erhöhung des Anteils von Tregs.



**Abbildung 24 Einfluss von Propionat auf den Anteil von CD25-positiven, FoxP3-positiven Tregs in MLN.** Durchflusszytometrisch wurde der Anteil von regulatorischen T-Zellen an allen T-Helferzellen sowohl bei Mäusen mit intaktem (**A**) als auch depletiertem Darmmikrobiom (**B**) in den mesenterialen Lymphknoten bestimmt. Die Anzahl der für die Analysen verwendeten Datensätze variierte zwischen vier und zehn. Dargestellt werden Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Versuchsgruppen. Die statistische Auswertung erfolgte bei normalverteilten Daten mit einem ungepaarten T-Test.

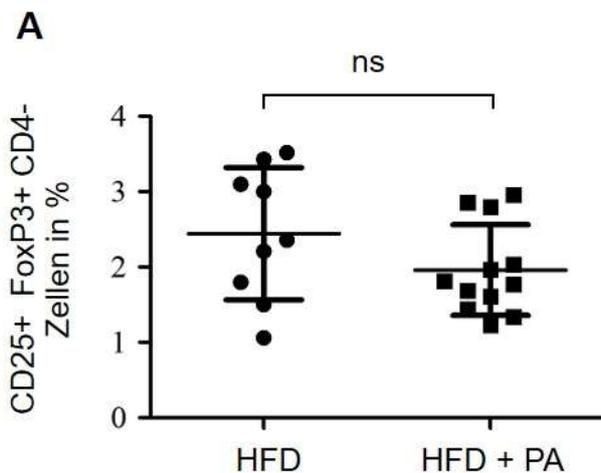
Bei SPF- als auch bei gnotobiotischen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen konnten keine signifikanten Unterschiede des Anteils von Th1-Zellen sowie Th17-Zellen in MLN durch eine Behandlung mit Propionat nachgewiesen werden. (**Abbildung 25**)



**Abbildung 25 Einfluss von Propionat auf den Anteil von IL17A-positiven Th17-Zellen sowie IFN $\gamma$ -positiven Th1-Zellen in MLN.** Durchflusszytometrisch wurde der Anteil von Th1- (IFN $\gamma$ -positiven) und Th17- (IL17A-positiven) Zellen an allen T-Helferzellen sowohl bei Mäusen mit intaktem (A, C) als auch depletiertem Darmmikrobiom (B, D) bestimmt. Die Anzahl der für die Analysen verwendeten Datensätze variierte zwischen vier und neun. Dargestellt werden Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Versuchsgruppen. Die statistische Auswertung erfolgte bei normalverteilten Daten der IFN $\gamma$ -positiven Th1-Zellen bei sekundär gnotobiotischen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen mit einem ungepaarten T-Test und bei nicht-normalverteilten Daten bei den restlichen Versuchsgruppen mit einem Mann-Whitney-U-Test.

### In der Leber

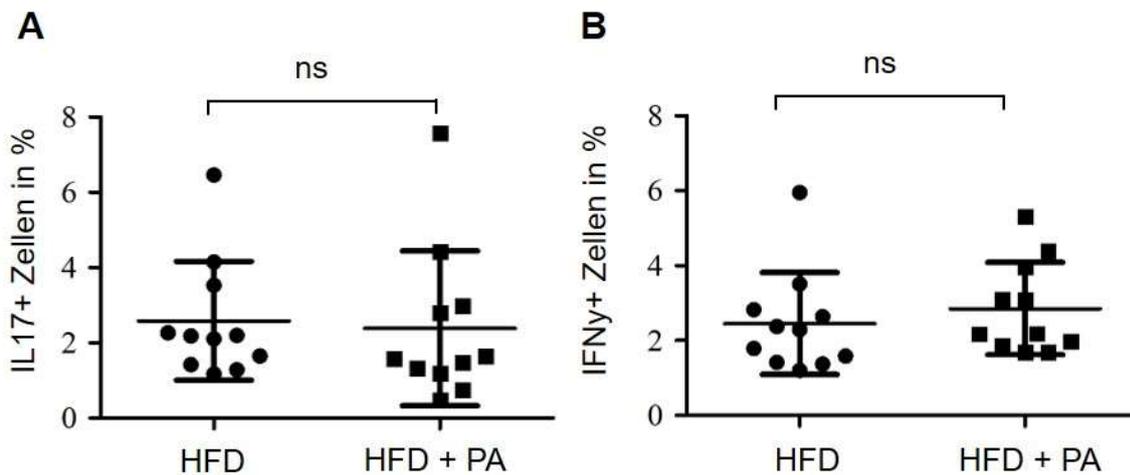
Bei SPF-ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigte sich kein signifikanter Unterschied des Anteils von Tregs bei Behandlung mit Propionat.



**Abbildung 26 Einfluss von Propionat auf den Anteil von CD25-positiven, FoxP3-positiven Tregs in der Leber.** Durchflusszytometrisch wurde der Anteil von regulatorischen T-Zellen an allen T-Helferzellen bei Mäusen mit intaktem (A) Darmmikrobiom in der Leber bestimmt. Dargestellt werden Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Versuchsgruppen. Die

Anzahl der für die Analysen verwendeten Datensätze variierte zwischen neun und zwölf. Die statistische Auswertung erfolgte bei normalverteilten Daten mit einem ungepaarten T-Test.

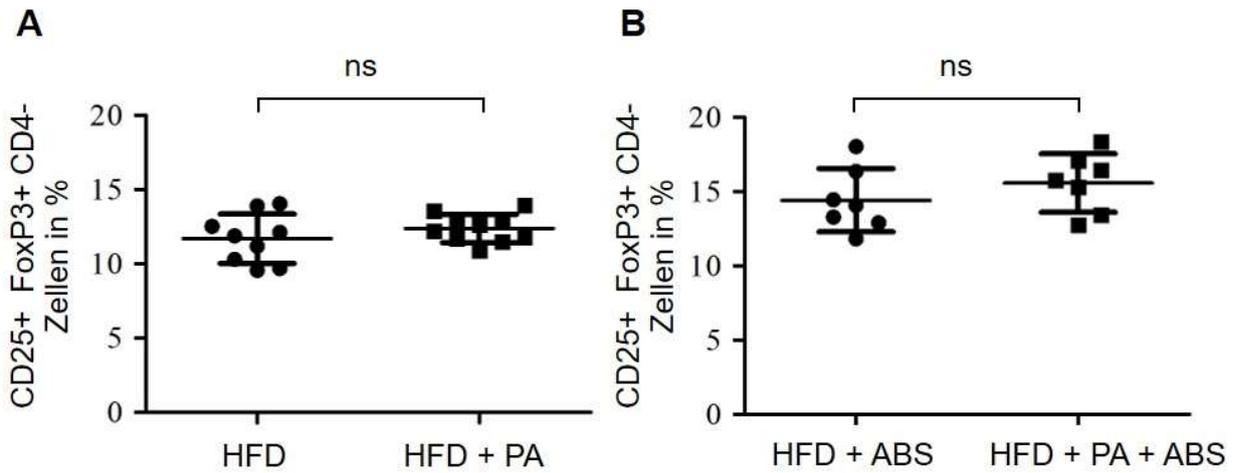
Weiterhin waren wie in **Abbildung 27** ersichtlich keine signifikanten Unterschiede des Anteils von Th1-Zellen und Th17-Zellen bei SPF-ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen zu verzeichnen.



**Abbildung 27 Einfluss von Propionat auf den Anteil von IL17A-positiven Th17-Zellen sowie IFN $\gamma$ -positiven Th1-Zellen in der Leber.** Durchflusszytometrisch wurde der Anteil von Th1- (IFN $\gamma$ -positiven) (**A**) und Th17-(IL17A-positiven) (**B**) Zellen an allen T-Helferzellen bestimmt. Die Anzahl der für die Analysen verwendeten Datensätze betrug bei beiden Versuchsgruppen elf. Dargestellt werden Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Versuchsgruppen. Die statistische Auswertung erfolgte bei nicht-normalverteilten Daten mit einem Mann-Whitney-U-Test.

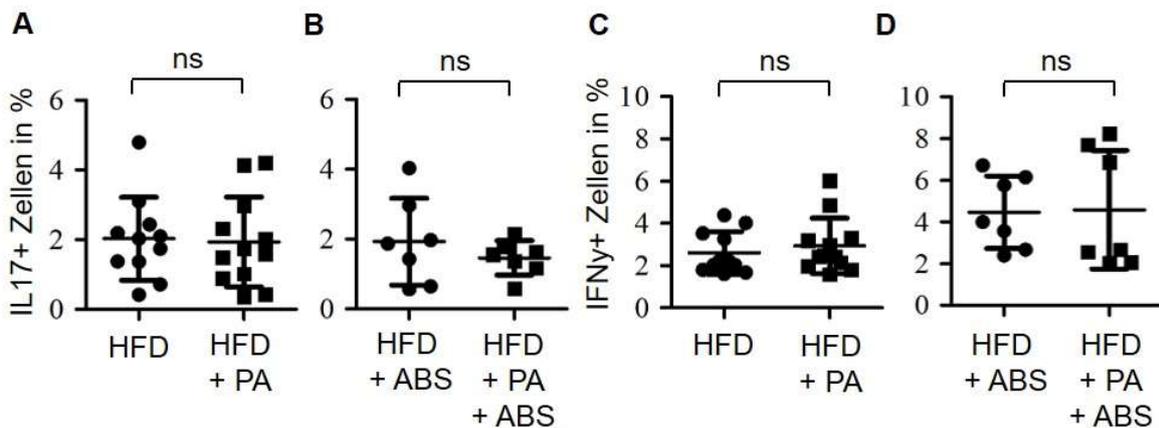
### In der Milz

Es zeigten sich sowohl bei den SPF-ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen als auch bei den sekundär gnotobiotischen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen keine Unterschiede des Anteils von Tregs.



**Abbildung 28 Einfluss von Propionat auf den Anteil von CD25-positiven, FoxP3-positiven Tregs in der Milz.** Durchflusszytometrisch wurde der Anteil von regulatorischen T-Zellen an allen T-Helferzellen sowohl bei Mäusen mit intaktem (A) als auch depletiertem Darmmikrobiom (B) in der Milz bestimmt. Die Anzahl der für die Analysen verwendeten Datensätze variierte zwischen sieben und zehn. Dargestellt werden Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Versuchsgruppen. Die statistische Auswertung erfolgte bei normalverteilten Daten mit einem ungepaarten T-Test.

Weiterhin konnten sowohl bei SPF- als auch bei sekundär gnotobiotischen ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen keine signifikanten Unterschiede des Anteils von Th1- und Th17-Zellen festgestellt werden.



**Abbildung 29 Einfluss von Propionat auf den Anteil von IL17A-positiven Th17-Zellen sowie IFN $\gamma$ -positiven Th1-Zellen in der Milz.** Durchflusszytometrisch wurde der Anteil von Th1- (IFN $\gamma$ -positiven) und Th17- (IL17A-positiven) Zellen an allen T-Helferzellen sowohl bei Mäusen mit intaktem (A, C) als auch depletiertem Darmmikrobiom (B, D) bestimmt. Die Anzahl der für die Analysen verwendeten Datensätze variierte zwischen sieben und zwölf. Dargestellt werden Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Versuchsgruppen. Die statistische Auswertung erfolgte bei normalverteilten Daten mit einem ungepaarten T-Test. Die Daten zu

IFN $\gamma$ -positiven Th1-Zellen bei sekundär gnotobiotischen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen waren nicht-normalverteilt, weshalb ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt wurde.

### 3.2.6 Einfluss von Propionat auf die Expression von ICAM und VCAM durch HAEC

Es konnte eine signifikante Steigerung der Expression von ICAM und VCAM unter Stimulation mit TNF- $\alpha$  im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden (siehe **Tabelle 3**), wobei sich der Anteil von ICAM-positiven Zellen bei einer Stimulation mit 1 ng pro ml TNF- $\alpha$  bereits fast gesättigt zeigte (94,7 $\pm$ 5,7%).

	VCAM-positive Zellen	ICAM-positive Zellen
VM + C	0,6 $\pm$ 0,1% (N=4)	36,5 $\pm$ 2,0% (N=4)
Starv + C + TNF1	29,6 $\pm$ 19,1% (N=11)	94,7 $\pm$ 5,7% (N=11)
Starv + C + TNF10	71,7 $\pm$ 10,1% (N=10)	99,4 $\pm$ 0,4% (N=10)
<b>Signifikanzwert</b>	<b>P&lt;0,0001</b>	<b>p&lt;0,0001</b>

**Tabelle 3 Einfluss verschiedener Konzentrationen von TNF $\alpha$  im Medium auf den Anteil VCAM- und ICAM-positiver HAEC.** VM: Vollmedium, Starv: Starvation Medium, C: ohne Vorbehandlung, TNF1: 1ng TNF- $\alpha$  pro ml Medium, TNF 10: 10ng TNF- $\alpha$  pro ml Medium. Dargestellt werden Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Versuchsgruppen. Die statistische Auswertung erfolgte durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Anwendung der Bonferoni-Korrektur.

Es bestand die Hypothese, dass eine Vorbehandlung mit Propionat bei Stimulation der HAEC eine Hochregulation von VCAM und ICAM supprimieren würde.

Es zeigte sich dagegen kein signifikanter Zusammenhang zwischen einer Vorbehandlung der HAEC mit Propionat und der Expression von VCAM (**Tabelle 4**) und ICAM (**Tabelle 5**) in der zweifaktoriellen Varianzanalyse.

VCAM-positive Zellen			
VM + C	0,6 $\pm$ 0,1% (N=4)	VM + PA	0,5 $\pm$ 0,1% (N=4)
Starv + C + TNF1	29,6 $\pm$ 19,1% (N=11)	Starv + PA + TNF1	27,5 $\pm$ 20,6% (N=11)
Starv + C + TNF10	71,7 $\pm$ 10,1% (N=10)	Starv + PA + TNF10	65,4 $\pm$ 13,5% (N=10)
<b>Signifikanzwert</b>		<b>p=0,558</b>	

**Tabelle 4 Einfluss von Propionat bei verschiedenen Konzentrationen von TNF $\alpha$  im Medium auf den Anteil VCAM- positiver HAEC.** VM: Vollmedium, Starv: Starvation Medium, C: ohne Vorbehandlung, PA: 150  $\mu$ M Propionat, TNF1: 1ng TNF- $\alpha$  pro ml Medium, TNF 10: 10ng TNF- $\alpha$

pro ml Medium. Dargestellt werden Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Versuchsgruppen. Die statistische Auswertung erfolgte durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Anwendung der Bonferoni-Korrektur.

ICAM-positive Zellen			
VM + C	36,5±2,0% (N=4)	VM + PA	32,6±3,8% (N=4)
Starv + C + TNF1	94,7±5,7% (N=11)	Starv + PA + TNF1	93,7±6,4% (N=11)
Starv + C + TNF10	99,4±0,4% (N=10)	Starv + PA + TNF10	99,3±0,5% (N=10)
<b>Signifikanzwert</b>		<b>p=0,209</b>	

**Tabelle 5 Einfluss von Propionat bei verschiedenen Konzentrationen von TNF $\alpha$  im Medium auf den Anteil VCAM- positiver HAEC.** VM: Vollmedium, Starv: Starvation Medium, C: ohne Vorbehandlung, PA: Behandlung über 24h mit 150  $\mu$ M Propionat, TNF1: Stimulation für 6h mit 1ng TNF- $\alpha$  pro ml Medium, TNF 10: Stimulation für 6h mit 10ng TNF- $\alpha$  pro ml Medium. Dargestellt werden Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Versuchsgruppen. Die statistische Auswertung erfolgte durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Anwendung der Bonferoni-Korrektur.

### 3.2.7 Einfluss von Propionat auf den Apoptoseanteil von HAEC

Im gleichen Experiment erfolgte die durchflusszytometrische Analyse von früh-apoptotischen und lebenden HAEC mit und ohne Vorbehandlung mit Propionat und unter Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von TNF- $\alpha$ .

Eine Stimulation mit 1 oder 10 ng TNF- $\alpha$  pro ml Medium bewirkte eine signifikante Erhöhung der Anzahl früh-apoptotischer HAEC sowie eine signifikante Erniedrigung lebender HAEC im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Stimulation (**Tabelle 6**).

	VM + C	Starv + C + TNF1	Starv + C + TNF10
früh-apoptotische HAEC	11,6±3,3% (N=4)	24,7±7,2% (N=10)	23,0±7,4% (N=11)
<b>Signifikanzwert</b>		<b>p&lt;0,050</b>	<b>p=0,0004</b>
lebende HAEC	83,7±4,4% (N=4)	60,4±10,7% (N=10)	60,9±11,7% (N=11)
<b>Signifikanzwert</b>		<b>p&lt;0,0001</b>	<b>p&lt;0,0001</b>

**Tabelle 6 Einfluss verschiedener Konzentrationen von TNF $\alpha$  im Medium auf den Anteil früh-apoptotischer und lebender HAEC.** VM: Vollmedium, Starv: Starvation Medium, C: ohne Vorbehandlung, PA: Behandlung über 24h mit 150  $\mu$ M Propionat, TNF1: Stimulation für 6h mit 1ng TNF- $\alpha$  pro ml Medium, TNF 10: Stimulation für 6h mit 10ng TNF- $\alpha$  pro ml Medium. Dargestellt werden Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Versuchsgruppen. Die statistische Auswertung erfolgte durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Anwendung der Bonferoni-

Korrektur.

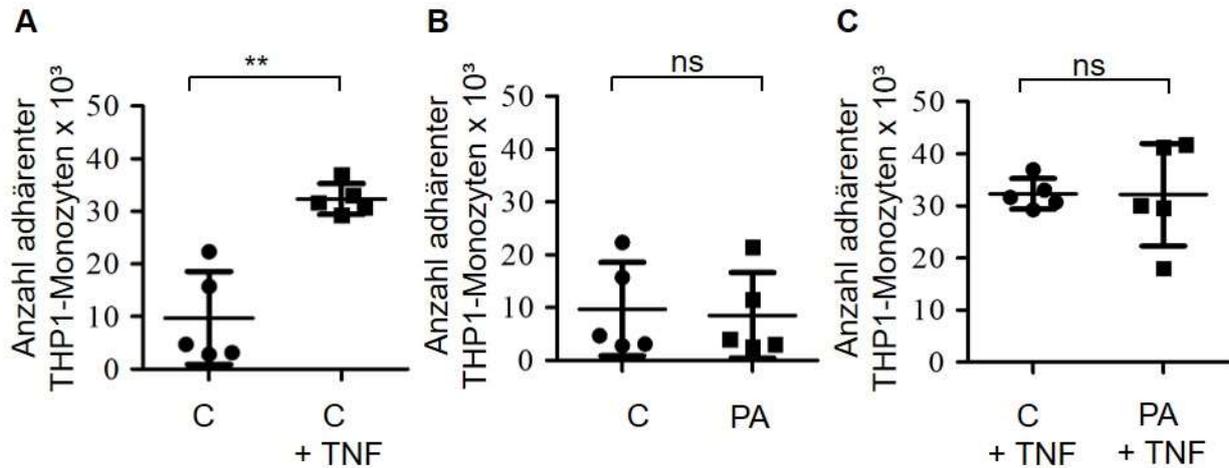
Die Vorbehandlung mit Propionat hatte keinen signifikanten Effekt auf die durch TNF- $\alpha$  induzierten Änderungen der Anzahl früh-apoptotischer HAEC bzw. lebender HAEC (siehe **Tabelle 7**).

	Starv + C + TNF1	Starv + PA + TNF1
früh-apoptotische HAEC	24,7 $\pm$ 7,2% (N=10)	20,9 $\pm$ 5,2% (N=10)
<b>Signifikanzwert</b>		<b>p=0,290</b>
lebende HAEC	60,4 $\pm$ 10,7% (N=10)	64,8 $\pm$ 6,2% (N=10)
<b>Signifikanzwert</b>		<b>p=0,363</b>

**Tabelle 7 Einfluss von Propionat bei Stimulation mit TNF $\alpha$  (1ng/ml) im Medium auf den Anteil früh-apoptotischer und lebender HAEC.** VM: Vollmedium, Starv: Starvation Medium, C: ohne Vorbehandlung, PA: Behandlung über 24h mit 150  $\mu$ M Propionat, TNF1: Stimulation für 6h mit 1ng TNF- $\alpha$  pro ml Medium. Dargestellt werden Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Versuchsgruppen. Die statistische Auswertung erfolgte durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Anwendung der Bonferoni-Korrektur.

### 3.2.8 Einfluss von Propionat auf Monozytenadhäsion

In einem Zellkultur-Experiment wurde untersucht, ob die Behandlung von HAEC mit 150 $\mu$ M Propionat über 24 Stunden eine verstärkte Adhäsion der Monozyten bewirkt. Dafür wurden sowohl unbehandelte als auch für sechs Stunden mit 10 ng TNF- $\alpha$  pro ml Medium vorbehandelte HAEC verwendet. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit TNF- $\alpha$  eine signifikante Erhöhung der Anzahl adhärenter Monozyten bewirkte („C“ vs. „C + TNF“: „9,7 $\pm$ 8,8x10<sup>3</sup> adhärente Monozyten, N=5“ vs. „32,3 $\pm$ 2,9x10<sup>3</sup> adhärente Monozyten, N=5“; p=0,008). Diese Beobachtung bestätigte eine suffiziente Wirksamkeit der Behandlung mit TNF- $\alpha$ , da die Stimulation mit TNF- $\alpha$  eine Aktivierung der HAEC und in der Folge durch verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen eine Steigerung der Leukozytenadhäsion bewirkte. Eine Behandlung der HAEC mit 150  $\mu$ M Propionat über 24h bewirkte sowohl bei unstimulierten als auch bei mit TNF- $\alpha$  stimulierten HAEC keinen signifikanten Unterschied der Anzahl adhärenter Monozyten (siehe **Abbildung 30**).



**Abbildung 30 Einfluss von Propionat auf die Monozytenadhäsion an HAEC unter inflammatorischen Bedingungen.** Eine Stimulation der HAEC mit TNF- $\alpha$  (TNF: 10 ng/ml TNF $\alpha$ ) bewirkte einen signifikanten Anstieg der Anzahl adhärenter Monozyten im Kontrollmedium (C: Kontrollmedium) (A), wobei eine Behandlung der HAEC mit Propionat (PA: 150  $\mu$ M Propionat im Kontrollmedium) sowohl bei unbehandelten HAEC (B) als auch bei stimulierten HAEC (C) keinen signifikanten Unterschied der Anzahl adhärenter Monozyten zeigte. Dargestellt werden Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Versuchsgruppen. Die statistische Auswertung erfolgte bei normalverteilten Daten mit einem ungepaarten T-Test.

## 4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der beiden Metabolite des Darmmikrobioms, TMAO und Propionat, auf die Funktion und den Phänotyp von Endothelzellen sowie Monozyten- und T-Zellpopulationen im Kontext der Atherosklerose untersucht.

### 4.1 Diskussion der Experimente mit TMAO

Seit wenigen Jahren steht durch Fortschritte der wissenschaftlichen Untersuchungsmethoden das Darmmikrobiom als Bindeglied zwischen Ernährung und Metabolismus verstärkt im Fokus von Forschungsvorhaben zu chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie Multiple Sklerose, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen oder Atherosklerose. Zusätzlich zu den bekannten klassischen Risikofaktoren für Atherosklerose wie arterielle Hypertonie, Dyslipidämie, Nikotinkonsum, Adipositas und Diabetes mellitus konnten mit großen Metabolom-Studien Metabolite des Darmmikrobioms identifiziert werden, die neue Therapie- sowie Präventionsansätze ermöglichen könnten.

Erhöhte Serumspiegel des Metabolits TMAO wurden in einer großen Metabolom-Studie aus dem Jahr 2011 von Wang et al als unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse identifiziert [42]. In der Folge konnten die Reaktionswege zur Bildung von TMAO aus cholin- und carnitinreicher Diät durch das Darmmikrobiom nachgewiesen werden. In klinischen Beobachtungsstudien konnte eine Assoziation von erhöhten TMAO-Spiegeln im Serum mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit des Auftretens von kardiovaskulären Ereignissen gezeigt werden [72, 73]. Die genauen Mechanismen, die dem TMAO-assoziierten erhöhten kardiovaskulären Risiko zugrunde liegen, sind allerdings nicht vollständig verstanden.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss einer cholinreichen Nahrung, die eine verstärkte Bildung von TMAO bewirkt [42], auf die Funktion und Verteilung von Monozyten untersucht.

#### **TMAO und Monozyten**

Inflammatorische Monozyten spielen eine wichtige Rolle für die Plauegenese sowie -progression und beeinflussen die Plauestabilität und somit das Risiko kardiovaskulärer Ereignisse als Folge einer Atherosklerose.

In Studien konnte festgestellt werden, dass der Phänotyp von inflammatorischen Ly6C-high-Monozyten in Mäusen am ehesten mit intermediären CD14<sup>++</sup>-, CD16<sup>+</sup>-Monozyten im Menschen übereinstimmt [74].

Diese Monozyten sezernieren bei Aktivierung hohe Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ . Eine erhöhte Konzentration im Serum wurde in Studien als unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse, chronische Niereninsuffizienz sowie periphere arterielle Verschlusskrankheit identifiziert [46, 70, 75, 76].

In einer klinischen Studie unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass bei Patienten nach einem Schlaganfall der Serumspiegel von TMAO ein unabhängiger Risikofaktor für erneute kardiovaskuläre Ereignisse ist. Außerdem wurde in der Studie beobachtet, dass der Anteil von intermediären Monozyten mit TMAO-Serumspiegeln korreliert [70].

Auf Basis dieser beobachteten Assoziation stellten wir die Hypothese auf, dass TMAO eine Verschiebung von anti- zu pro-inflammatorischen Monozyten bewirkt und diese Verschiebung ein Faktor für das erhöhte Risiko für erneute kardiovaskuläre Ereignisse ist.

Um die Hypothese in einem Organismus mit intaktem Immunsystem zu untersuchen, wurde ein Mausversuch mit cholinreicher Diät durchgeführt.

In einer Studie von Wang et al. (2011) konnte gezeigt werden, dass eine cholinreiche Diät in Mäusen eine erhöhte Konzentration von TMA und in der Folge nach Verstoffwechslung in der Leber eine erhöhte Konzentration von TMAO in der Blutzirkulation bewirkt [42].

### **Eine cholinreiche Diät bewirkt eine Verschiebung zu pro-inflammatorischen Monozyten im Blut**

Das Verhältnis von pro- zu anti-inflammatorischen Monozyten wurde untersucht, und es konnte eine Verschiebung zu pro-inflammatorischen Ly6C-high-Monozyten bei SPF-Mäusen mit cholinreicher Diät festgestellt werden. Pro-inflammatorische Ly6C-high-Monozyten in Mäusen spielen eine wichtige Rolle in der Initiierung und Progression der Atherosklerose [32].

Der erhöhte Anteil an pro-inflammatorischen Monozyten kann demnach ein Mechanismus sein, der dem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse bei erhöhtem TMAO-Serumspiegeln zugrunde liegt. So migrieren laut Ley et al. inflammatorische Monozyten während der Atherogenese nach subendothelial und differenzieren zu

inflammatorischen Makrophagen und Tip-Dendritische Zellen. Tip-Dendritische Zellen sind aus Monozyten differenzierte Zellen, die TNF- $\alpha$  und induzierbare NO-Synthase produzieren sowie Antigene präsentieren können [77].

Die Mechanismen durch die TMAO eine Verschiebung von anti- zu pro-inflammatorischen Monozyten bewirkt sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht abschließend geklärt.

Zu den molekularen Mechanismen, die die Differenzierung von Monozyten in Ly6C-high oder Ly6C-low Monozyten steuern, zählt der orphan nuclear receptor Signalweg, insbesondere der Nr4a1-Signalweg [78].

Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um eine mögliche Interaktion von TMAO mit diesem Signalweg zu erforschen.

Weiterhin konnten Wu et al. in einem Mausmodell zur Graft-versus-Host-Disease (GVHD) durch Behandlung mit TMAO eine Polarisierung zu M1-Makrophagen, das heißt einen erhöhten Anteil von pro-inflammatorischen Makrophagen, beobachten. Als induzierender Mechanismus wurde eine durch die Behandlung mit TMAO generierte Translokation von NF $\kappa$ B und Aktivierung des NLRP3-Inflamosoms nachgewiesen, was einen möglichen molekularen Wirkmechanismus von TMAO darstellt [79].

Für die Generierung von TMA und in der Folge TMAO stellt das Darmmikrobiom einen essenziell notwendigen Bestandteil dar. Somit wurde in dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass bei sekundär gnotobiotischen Mäusen eine cholinreiche Diät keine Verschiebung der Monozytensubpopulationen bewirkt, da kein TMA durch das Darmmikrobiom produziert werden kann.

In den Experimenten zeigte sich, dass bei sekundär gnotobiotischen Mäusen die beobachtete Verschiebung zu pro-inflammatorischen Monozyten unterdrückt wird, was die aufgestellte Hypothese bestätigt. Diese Beobachtung passt zu der von Wang et al (2011) gemachten Beobachtung, dass die Generierung von TMA Darmmikrobiom-abhängig ist und somit ohne Darmmikrobiom kein TMA generiert werden kann [42].

### **Eine cholinreiche Diät bewirkt eine Verschiebung zu pro-inflammatorischen Monozyten im Knochenmark**

Murine sowie humane Monozyten werden im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen sowie gemeinsamen Vorläuferzellen von Monozyten und Dendritischen Zellen gebildet.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass in Mäusen im Knochenmark vorwiegend

pro-inflammatorische Ly6C-high-Monozyten gebildet werden, und diese vorwiegend im Blut zu Ly6C-low-Monozyten mit anti-inflammatorischem Phänotyp ausdifferenzieren [80].

Die im Blut beobachtete Verschiebung zu pro-inflammatorischen Ly6C-high-Monozyten konnte auch im Knochenmark beobachtet werden und die Verschiebung konnte ebenso bei sekundär gnotobiotischen Mäusen unterdrückt werden.

Es lässt sich spekulieren, dass die in der Studie von Wu et al. beobachtete Aktivierung von NF $\kappa$ B und des NLRP3-Inflamosoms ebenfalls einen Einfluss auf die Generierung von pro-inflammatorischen Ly6C-high-Monozyten im Knochenmark hat [79]. So beschreiben Bottero et al. eine Korrelation der PMA-induzierten Ausdifferenzierung von Monozytenprogenitorzellen in Makrophagen mit der Aktivität von NF $\kappa$ B [81].

Schlussfolgernd sprechen die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse dafür, dass die im Blut beobachtete Verschiebung zu pro-inflammatorischen Ly6C-high-Monozyten durch eine verstärkte Ausschüttung aus dem Knochenmark generiert wurde.

### **Der Ursprung erhöhter pro-inflammatorischer Monozyten durch eine cholinreiche Diät bleibt unklar**

Es fand sich ein nicht-signifikanter Trend zu erhöhten Anteilen von hämatopoetischen Stammzellen sowie Monozytenprogenitorzellen bei cholinreicher Diät, der bei sekundär gnotobiotischen Mäusen nicht vorhanden war. Dies deutet darauf hin, dass TMAO möglicherweise im Knochenmark wirkt, wobei der genaue Wirkmechanismus unklar bleibt.

In unserer Studie untersuchten wir die Anteile von Monozytensubpopulationen nach vier Wochen cholinreicher Diät und somit nur an einem Zeitpunkt. Es bleibt Gegenstand weiterer Forschung wie sich TMAO bei einer längeren Exposition auf das Verhältnis von pro- zu anti-inflammatorischen Monozyten auswirkt.

In dieser Arbeit wurde zudem untersucht, ob TMAO auch in vitro die Funktionalität von Monozyten beeinflusst und eine verstärkte Monozytenadhäsion bewirkt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Monozytenadhäsion. Im Gegensatz dazu wurde in einer Studie von Ma et al. eine verstärkte Monozytenadhäsion nach Behandlung mit TMAO beobachtet, wobei diese auf eine endotheliale Hochregulation von Adhäsionsmolekülen zurückgeführt wurde. Im Unterschied zu den Experimenten in dieser Arbeit stimulierten Ma et al. Endothelzellen mit TMAO und benutzten unbehandelte THP1-Monozyten. Zusammenfassend lässt sich unter Berücksichtigung der Ergebnisse

von Ma et al. schlussfolgern, dass TMAO eine verstärkte Monozytenadhäsion bewirkt, diese aber nicht durch den Einfluss auf Monozyten, sondern durch den Einfluss auf Endothelzellen erzeugt wird [82].

**Zusammenfassend** stellen die in dieser Arbeit erhobenen Daten einen wichtigen Teilaspekt einer möglichen pro-atherosklerotischen Wirkung von TMAO heraus. Die durch TMAO verursachte Verschiebung von anti- zu proinflammatorischen Monozyten in Mäusen steht im Einklang mit Ergebnissen von klinischen Studien, die einen erhöhten Anteil von pro-inflammatorischen Monozyten in Menschen mit erhöhter Serumkonzentration von TMAO festgestellt haben. Weitere präklinische Untersuchungen zur Aufklärung der genauen Wirkmechanismen von TMAO auf Monozytendifferenzierung sind notwendig, um mögliche therapeutische Ansatzpunkte zu identifizieren. Zudem sind die Ergebnisse von klinischen Studien, die therapeutische Ansätze zur Senkung der Serumkonzentration von TMAO testen, abzuwarten und die beobachteten Folgen für den Immunphänotyp sowie das kardiovaskuläre Risiko der Probanden genauestens zu evaluieren.

## 4.2 Diskussion der Experimente mit Propionat

Epidemiologische Studien zeigen ein verringertes Risiko von Atherosklerose sowie weiterer entzündlicher Krankheiten durch den Konsum einer faserreichen Diät [83, 84]. In der Folge wurden Analysen durchgeführt, um die beobachteten Assoziationen mechanistisch zu erklären. Es konnte festgestellt werden, dass eine faserreiche Diät durch bestimmte Bakterien des Darmmikrobioms in verschiedene kurzkettige Fettsäuren (SCFA) prozessiert wird, und diese sowohl lokal in die Darmepithelzellen als auch in die systemische Zirkulation aufgenommen werden.

Ein Großteil der SCFA wird in der Leber verstoffwechselt, aber es wird dennoch eine ausreichend hohe systemische Konzentration generiert, die eine systemische Wirkung erzielen kann [47]. Eine dieser SCFA ist das Propionat, dem immunmodulierende Eigenschaften zugeschrieben werden, was sich insbesondere bei Autoimmunerkrankungen protektiv auswirkt [61, 85, 86]. In dieser Arbeit wurde der modulierende Effekt von Propionat auf Immunzellen, die bei im Rahmen der Atherogenese eine Rolle spielen im hypercholesterinämischen Mausmodell der

Atherosklerose untersucht.

### **Bewirkt Propionat eine Verschiebung zu antiinflammatorischen Monozyten?**

Wie bei der Untersuchung des Einflusses einer cholinreichen Diät und damit TMAO auf das Verhältnis von pro- zu anti-inflammatorischen Monozyten wurde in dieser Arbeit der Einfluss einer Behandlung mit Propionat unter verschiedenen experimentellen Bedingungen untersucht.

Es wurde die Fragestellung untersucht, ob Propionat das Verhältnis von pro- zu anti-inflammatorischen Monozyten verschiebt sowie den Anteil an Monozyten senkt und somit einen protektiven Effekt zur Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen besitzt.

Eine Wirkung von Propionat auf Monozyten könnte sich durch Bindung an FFAR2 und FFAR3, die auf Leukozyten exprimiert werden oder durch eine Inhibition der Histon-Deacetylierung erklären lassen [50]. Weiterhin wurde in dieser Arbeit die Fragestellung untersucht, ob Propionat bereits bei der Bildung von Monozyten im Knochenmark einen Effekt hat. In noch unveröffentlichten Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Propionat in Mäusen den LDL-Cholesterinspiegel im Blut signifikant senkt. Dies könnte einen weiteren indirekten Mechanismus darstellen, über den Propionat den Anteil von Monozyten beeinflusst.

### **Im Blut**

Im Blut zeigte sich bei Wildtyp-Mäusen sowohl mit intaktem als auch mit depletiertem Darmmikrobiom kein signifikanter Effekt einer Behandlung mit Propionat auf das Verhältnis von pro- zu antiinflammatorischen Monozyten. Auch bei hypercholesterinämischen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen mit intaktem Darmmikrobiom zeigte sich durch die Behandlung mit Propionat kein signifikanter Effekt auf die Monozytensubpopulationen. Dagegen bewirkte Propionat bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen mit depletiertem Darmmikrobiom einen deutlichen, allerdings nicht-signifikanten Trend, zu einem verringerten Ly6C-high/low-Monozyten-Verhältnis. Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass bei intaktem Darmmikrobiom ein direkter oder indirekter Effekt von Propionat auf den Anteil von Monozyten sowie das Verhältnis von pro- zu anti-inflammatorischen Monozyten im Blut unwahrscheinlich ist. Bei intaktem Darmmikrobiom sowie Einnahme einer HFD werden durch das Darmmikrobiom diverse Metabolite produziert, die sowohl protektiven als auch pro-inflammatorischen Einfluss auf die Atherogenese haben können. In sekundär gnotobiotischen Mäusen fällt der Einfluss des

Darmmikrobioms weg und es wird somit nur die direkte Wirkung des Metabolits Propionat untersucht. Folglich lässt sich über die von uns gemachte Beobachtung spekulieren, dass das Propionat möglicherweise unter erhöhten pro-atherogenen Bedingungen (hypercholesterinämische ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse) eine Verschiebung von pro- zu anti-inflammatorischen Monozyten bewirkt und dieser Effekt möglicherweise bei intaktem Darmmikrobiom durch andere Darmmikrobiom-abhängige Metabolite verhindert wird. Ein möglicher molekularer Wirkmechanismus könnte, wie in der Studie von Al-Lahham et al. Beschrieben, die Aktivierung von PPAR $\alpha$  und damit eine Inhibition von NF $\kappa$ B sein [87].

### **Im Knochenmark und in den mesenterialen Lymphknoten**

In einer Studie von Trompette et al. (2018) zeigte sich bei faserreicher Diät in einem Influenza A-Mausmodell eine signifikante Zunahme der Anzahl von protektiven Ly6C-low-Monozyten mit einem gleichzeitigen nicht-signifikanten Anstieg der Ly6C-high-Monozyten sowohl im Knochenmark als auch in der Lunge. Trompette et al. führten diesen Effekt auf eine signifikante Zunahme von Monozytenprogenitorzellen (MDPs) im Knochenmark durch die Einnahme der faserreichen Diät zurück [88].

In einer weiteren Studie von Trompette et al. (2014) in einem Asthma-Mausmodell konnte eine spezifisch durch Behandlung mit Propionat ausgelöste Zunahme von MDPs im Knochenmark festgestellt werden [56].

In meiner Arbeit wurde erstmals bei Wildtyp-Mäusen und in einem Atherosklerose-Mausmodell untersucht, wie sich Propionat auf Monozytensubpopulationen und Monozytenprogenitorzellen im Knochenmark sowie Monozytensubpopulationen in den mesenterialen Lymphknoten auswirkt.

Im Knochenmark zeigten sich sowohl bei SPF- als auch bei sekundär gnotobiotischen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen keine signifikanten Unterschiede beim Verhältnis von pro- zu anti-inflammatorischen Monozyten sowie beim Anteil von Monozyten an allen Leukozyten. Zudem zeigten sich keine signifikanten Unterschiede beim Anteil von Hämatopoetischen Stammzellen sowie MDPs.

Es lässt sich spekulieren, dass der Effekt von Propionat auf Monozytensubpopulationen sowie Progenitorzellen im Knochenmark vom Vorhandensein eines starken inflammatorischen Stimulus abhängig ist, der in den Studien von Trompette et al. durch das Influenza A-Mausmodell vorhanden war.

In den mesenterialen Lymphknoten der sekundär gnotobiotischen Mäusen zeigte sich ähnlich wie im Blut ein nicht-signifikanter Trend zu einer Verschiebung von pro- zu anti-

inflammatorischen Monozyten. Dies lässt sich möglicherweise durch eine periphere, im Blut oder in den mesenterialen Lymphknoten erfolgende Ausdifferenzierung von pro-inflammatorischen Ly6C-high-Monozyten in protektive Ly6C-low-Monozyten erklären, die durch Propionat verstärkt wird.

Der Mechanismus der Ausdifferenzierung von Ly6C-high-Monozyten zu Ly6C-low-Monozyten ist noch nicht vollständig erforscht. Gegenwärtig wird angenommen, dass Ly6C-mid-Monozyten einen inflammatorischen Zwischentyp und eine Vorstufe von Ly6C-low-Monozyten darstellen und die Ausdifferenzierung im Blut stattfindet. Laut Yang et al. (2014) stellen Ly6C-high-Monozyten am ehesten die obligatorischen Vorläuferzellen für Ly6C-low-Monozyten dar [80].

In künftigen Arbeiten müssten die Mechanismen, die zu einer Konversion von Ly6C-high zu Ly6C-low-Monozyten führen, weiter untersucht werden, um zu überprüfen, ob SCFA einen Einfluss auf den Differenzierungsprozess haben. Die Analyse von Monozyten und Makrophagen in von Atherosklerose betroffenem Gewebe wie der Aorta stellt ein weiteres Forschungsziel dar.

**Zusammenfassend** zeigen die in dieser Arbeit erhobenen Daten keinen eindeutigen Einfluss von Propionat auf murine Monozytensubpopulationen und Monozytenprogenitorzellen.

In einer Studie von Chang et al. (2014) konnte durch eine Behandlung mit Butyrat eine verringerte Sekretion von inflammatorischen Zytokinen wie IL6 und IL12 durch Makrophagen basierend auf einer HDAC-Inhibition und mit Ausschluss einer Wirkung über FFAR2 und FFAR3 nachgewiesen werden [89].

Eine Studie von Ang et al. (2016) beschreibt eine unterschiedliche Wirkung von FFAR auf Monozyten in Mäusen und in Menschen. Bei murinen Monozyten wurde kein signifikanter Einfluss einer Aktivierung von FFAR durch Acetat nachgewiesen wohingegen sich bei humanen Monozyten FFAR-abhängig eine verringerte Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine zeigte [90].

Diese Ergebnisse weisen auf mögliche Spezies-Unterschiede zwischen Mäusen und Menschen hin und verdeutlichen die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen des Einflusses von SCFA an humanen Monozyten.

### **Verändert Propionat die Balance von Treg zu Th1- und Th17-Zellen?**

Zusätzlich zu im Blut zirkulierenden Monozyten sowie in atherosklerotischen Läsionen

vorhandenen Makrophagen spielen T-Zellen eine wichtige Rolle in der Entstehung und Progression von Atherosklerose.

So spielt laut Tabas und Lichtman (2017) eine Dysbalance des Verhältnisses von protektiven Tregs zu inflammatorischen Th1-Zellen sowie Th17-Zellen eine entscheidende Rolle für das Fortschreiten von Atherosklerose, wobei die Bedeutung von Th17-Zellen noch kontrovers ist [32].

In dieser Arbeit wurden die Anteile von T-Zellen im Blut, in der Milz, in der Leber und in den mesenterialen Lymphknoten bei ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen bestimmt.

### **Im Blut**

Im Blut zeigte sich bei SPF-ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen ein nicht-signifikanter Trend eines erhöhten Anteils von Tregs. Bei sekundär gnotobiotischen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigte sich dieser Trend nicht. Eine Erklärung für diese Beobachtung kann die höhere Varianz der Daten sowie eine generell erhöhte Konzentration von Tregs in sekundär gnotobiotischen Mäusen sein. Die genaue Bedeutung des Darmmikrobioms für die Generierung von Tregs ist noch nicht abschließend geklärt, aber es lässt sich spekulieren, dass bei sekundär gnotobiotischen Mäusen durch das Fehlen des Darmmikrobioms und seiner Metabolite die extrathymische Generation von Tregs verändert ist.

Sekundär gnotobiotische ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten in unseren Versuchen zudem deutlich erhöhte LDL-Cholesterinspiegel im Vergleich zu SPF-ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen.

In einer klinischen Studie von Chambers et al (2019), bei der über 42 Tage die Supplementierung eines Inulinpropionatesters durchgeführt wurde, zeigte sich ein nicht-signifikanter Trend zu einer erhöhten Anzahl an Tregs. Weiterhin konnten verringerten Serum-Konzentrationen des pro-inflammatorischen Zytokins IL-8 festgestellt werden [91].

In einer Studie von Duscha et al. (2020) erhielten MS-Patienten 500mg Natriumpropionat zwei Mal täglich zusätzlich zu ihrer bestehenden Immuntherapie. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Anteils regulatorischer T-Zellen, der ebenso von einer erhöhten suppressiven Funktionalität der regulatorischen T-Zellen als auch von einer andauernden Wirkung über einen Beobachtungszeitraum von 90 Tagen geprägt war. Zudem zeigte sich eine signifikante Abnahme des Anteils von Th1- sowie Th17-Zellen, der ebenso noch nach einem Zeitraum von 90 Tagen zu beobachten war [86].

In meiner Arbeit wurden die Anteile von Th1- und Th17-Zellen im Blut untersucht. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede sowohl bei SPF- als auch bei sekundär

gnotobiotischen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen.

### **In MLN**

Tregs können im Thymus oder extrathymisch generiert werden. Die extrathymische Generation von Tregs findet vorwiegend in Lymphknoten statt [92]. Arpaia et al (2013) konnten zeigen, dass die kurzkettigen Fettsäuren Butyrat und Propionat eine verstärkte extrathymische Generation von Tregs bewirken. Als zugrundeliegender Mechanismus wird eine HDAC-Inhibition durch die SCFA beschrieben [59]. Park et al. (2015) fanden ebenso eine verstärkte Generation von Tregs durch HDAC-Inhibition und verstärkte Aktivierung des mTOR-S6K-Signalweges, die sie als unabhängig von einer Aktivierung von FFAR2 und FFAR3 auf T-Zellen klassifizierten.

Sie beschrieben zudem eine verstärkte Ausdifferenzierung von naiven T-Zellen in Th1- und Th17-Zellen unter polarisierenden Experimentalbedingungen bei Behandlung mit Acetat oder Propionat [93]. In einer weiteren Studie von Haghikia et al. (2016) zeigte sich eine verstärkte Polarisation von CD4-Zellen zu Tregs bei Behandlung mit Propionat, wohingegen eine verringerte Differenzierung in Th17-Zellen beobachtet wurde [61].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in den mesenterialen Lymphknoten bei SPF-ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen eine signifikante Erhöhung der Konzentration von Tregs und ein nicht-signifikanter Trend bei sekundär gnotobiotischen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen nachgewiesen werden. Zudem konnten keine signifikanten Unterschiede des Anteils von Th1- und Th17-Zellen in SPF- sowie sekundär gnotobiotischen ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen festgestellt werden.

Die Ergebnisse meiner Arbeit stehen somit im Einklang mit vorherigen Studien, die eine verstärkte extrathymische Generation von Tregs gezeigt haben.

In Studien wurde gezeigt, dass erhöhte Anteile von Tregs in Mäusen die Regression von Atherosklerose fördert sowie die Plaquestabilität erhöht [21]. Dennoch bleibt die Bedeutung einer erhöhten Konzentration von Tregs im Menschen für das Risiko der Entwicklung und Progression einer Atherosklerose noch unklar. Es gibt keine klinischen Studien, die erhöhte Treg-Konzentrationen als protektiven Faktor für ein verringertes Auftreten von Atherosklerose identifiziert haben.

### **In der Leber**

Laut Tabas et al. (2017) stellt die Leber vor dem Hintergrund der zentralen Rolle im Cholesterin- und Lipoproteinstoffwechsel ein wichtiges Gewebe für die Induktion peripherer T-Zell-Toleranz dar. So konnte festgestellt werden, dass Hypercholesterinämie

die Anzahl an Tregs in der Leber sowie die Ausschüttung von TGF- $\beta$ , einem von Tregs ausgeschüttetem immunsuppressivem Zytokin, erhöht [32].

Zudem stellt die Leber zusammen mit dem Darm das Organ dar, in dem die höchste Propionat-Konzentration im Körper messbar ist [47].

In unseren Experimenten zeigte sich ein nicht-signifikanter Trend zu erniedrigten Tregs in der Leber bei Behandlung mit Propionat, was im Gegensatz zu den Ergebnissen unserer Analysen in anderen Organen steht. Ein möglicher Erklärungsansatz ist ein indirekter Effekt durch Modulation des Cholesterinstoffwechsels bei Behandlung mit Propionat. In noch nicht veröffentlichten Daten unserer Arbeitsgruppe zeigte Propionat im Mausversuch eine signifikante Senkung der Serumkonzentration von Gesamtcholesterin und LDL-Cholesterin. Demnach lässt sich der Trend zur erniedrigten Konzentration von Tregs in der Leber möglicherweise auf den erniedrigten Cholesterinspiegel zurückführen.

Weiterhin bewirkte eine Behandlung mit Propionat keine signifikanten Unterschiede der Konzentration von Th1- und Th17-Zellen in der Leber.

### **In der Milz**

In der Milz konnten durch eine Behandlung mit Propionat sowohl bei Tregs als auch bei Th1- und Th17-Zellen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

In einer Studie von Bartolomäus et al. (2019) wurde der Einfluss von Propionat in einem Hypertonie-Mausmodell mit einmaliger Infusion von Angiotensin 2 untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikant erhöhte Konzentration von Th17-Zellen sowie Tregs in der Milz ohne Vorbehandlung mit Propionat. Die Autoren vermuteten dabei eine Aktivierung von T-Effektorzellen durch den hypertensiven Stimulus, die bei einer Vorbehandlung über zwei Wochen mit Propionat supprimiert werden konnte [6].

**Zusammenfassend** zeigen die in dieser Arbeit gewonnenen Daten einen fördernden Einfluss von Propionat auf die extrathymische Generation von Tregs im hypercholesterinämischen Mausmodell und sind im Einklang mit den publizierten Ergebnissen von anderen experimentellen Krankheitsmodellen. Ein gegensätzlicher Trend zu verringerten Tregs in der Leber lässt sich am ehesten über indirekte Effekte durch einen Einfluss von Propionat auf den Cholesterinstoffwechsel erklären.

Eine erhöhte Treg-Konzentration ist in Mausversuchen mit einem Rückgang von Atherosklerose assoziiert, wobei die klinische Relevanz von erhöhten Treg-

Konzentrationen noch untersucht werden muss.

Die Konzentrationen von Th1- und Th17-Zellen waren durch Propionat in allen untersuchten Organen nicht signifikant verändert. Dies lässt einen pro-inflammatorischen Effekt von Propionat durch Expansion von T-Effektorzellen unwahrscheinlich erscheinen. Außerdem wurde in einer Studie von Trompette et al. (2014) der Einfluss von Propionat auf die Aktivierung von Th2-Zellen durch Dendritische Zellen untersucht und eine verringerte Aktivierung von Th2-Zellen in einem Allergie-Mausmodell nachgewiesen [56].

### **Verringert Propionat die endotheliale Inflammation und Apoptose?**

In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem der Einfluss von Propionat auf die Monozytenadhäsion sowie die Apoptoserate von Endothelzellen untersucht. Für die Untersuchungen wurde eine Propionat-Konzentration von 300µM gewählt, um den Bereich der mittleren effektiven Konzentration der FFAR2 und FFAR3 sowie OlfR78 abzudecken sowie die Konzentration von Propionat möglichst nah an der physiologischen Serumkonzentration zu halten.

Durch die Stimulation von Endothelzellen mit TNF- $\alpha$  wurde ein inflammatorisches Modell etabliert, das einen inflammatorischen Phänotypen der Endothelzellen generieren sollte. Ein solches Modell wurde bereits in vielen Studien zur Untersuchung einer Endothelzellaktivierung als Korrelat eines inflammatorischen Prozesses unter der Verwendung unterschiedlicher inflammatorischer Stimuli (TNF- $\alpha$  oder LPS) unterschiedlicher Konzentrationen (zum Beispiel TNF- $\alpha$  1ng/ml oder 10 ng/ml) verwendet [68, 69].

Nach einer 24h-Behandlung mit TNF- $\alpha$  zeigte sich ein signifikant zunehmender Anteil von VCAM- und ICAM-positiven Zellen, wobei bei einer Konzentration von 1ng TNF- $\alpha$  pro ml Medium die HAEC schon annähernd mit ICAM gesättigt waren. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede bei inflammatorischen Bedingungen durch eine Vorbehandlung der HAEC mit Propionat.

In einem Folgeexperiment untersuchten wir, ob bei Behandlung mit Propionat unter inflammatorischen Bedingungen eine verminderte Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen zu beobachten ist. Dazu wurden HAEC über 24h mit 150µM Propionat inkubiert und im Anschluss für 6h mit 10ng TNF- $\alpha$  pro ml Medium stimuliert. Es zeigte sich, dass eine Stimulation mit TNF- $\alpha$  eine signifikant erhöhte Adhäsion von Monozyten bewirkt. Allerdings konnten wir keine signifikanten Unterschiede bei Vorbehandlung mit

Propionat feststellen. Diese Beobachtung könnte auf die vermutlich maximal geringen quantitativen Effekte der verwendeten niedrigen Konzentration von Propionat auf die Expression der Adhäsionsmoleküle zurückzuführen sein.

In der Studie von Zapolska-Downar et al. (2009) wurde die Monozytenadhäsion mit PMBC getestet und es zeigte sich ein signifikanter Abfall der Monozytenadhäsion auf ein Niveau, dass der Monozytenadhäsion von unstimulierten Endothelzellen entsprach. Die Vorbehandlung wurde in den Experimenten von Zapolska-Downar allerdings mit einer Propionat-Konzentration von 10mM durchgeführt [68]. Die Bedingungen der Experimente dieser Studie sind allerdings diskutabel, da eine Propionat-Konzentration von 10 mM im Blut unphysiologisch ist, und es fragwürdig ist, ob durch eine orale Substitution von Propionat solch hohe Serumspiegel erreicht werden können.

Zusammenfassend bleibt ein möglicher Effekt von Propionat auf eine Monozytenadhäsion nicht abschließend beurteilbar. Es lässt sich diskutieren, ob die Verwendung unterschiedliche Monozyten einen Einfluss auf den Effekt von Propionat hat, da in meiner Arbeit THP1-Monozyten verwendet wurden, wohingegen bei Zapolska-Downar et al. mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) benutzt wurden.

Weiterhin wurde der Einfluss von Propionat auf den Anteil von lebenden sowie früh- und spät-apoptotischen Endothelzellen bei verschiedenen inflammatorischen Bedingungen untersucht. Es sollte bestimmt werden, ob Propionat bei inaktivierten HAEC sowie bei aktivierten HAEC durch inflammatorische Stimuli wie TNF- $\alpha$  eine Reduktion von früh-apoptotischen Zellen sowie eine Steigerung von lebenden Zellen bewirkt.

Laut Pober et al. (2007) verlieren apoptotische Endothelzellen ihre antikoagulatorischen Eigenschaften und bilden stattdessen pro-koagulatorische Charakteristika aus. In der Folge kommt es zur Exozytose von Mikropartikeln mit Phosphatidylserin sowie zur Freilegung von subendotheliale Kollagen, was die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten fördert [13].

Durch eine Aktivierung der Endothelzellen durch TNF- $\alpha$  zeigte sich in den durchgeführten Experimenten eine signifikante Abnahme von lebenden HAEC sowie eine signifikante Zunahme von früh-apoptotischen HAEC. Bei den mit Propionat vorbehandelten HAEC war die beobachtete Zunahme von früh-apoptotischen HAEC nicht signifikant. Propionat bewirkte unter inflammatorischen Bedingungen keine signifikante Erhöhung lebender HAEC sowie keine Änderung früh-apoptotischer HAEC.

**Zusammenfassend** zeigte Propionat in dieser Arbeit keinen signifikanten Einfluss auf endotheliale Monozytenadhäsion oder Apoptose.

### 4.3 Methodendiskussion

Im folgenden Abschnitt erfolgt eine Diskussion der in dieser Arbeit verwendeten Versuchsmethoden und Darstellung möglicher Limitationen.

## **Mausversuche**

### **Verwendete Mäuse**

Initial wurden für die Untersuchung der Monozyten Wildtyp-Mäuse verwendet. Diese zeigten durch eine HFD im Gruppenmittel zwar eine Gewichtszunahme, aber keine Zeichen von Atherosklerose in histologischen Färbungen der Aortenwurzeln.

Da die Wirkung von Propionat unter atherogenen Bedingungen untersucht werden sollte, verwendeten wir für die weiteren Experimente mit Propionat ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse.

Weiterhin wurden nur weibliche Mäuse für die Mausversuche verwendet, wofür sich auf Grund des bei weiblichen Mäusen selteneren Auftretens von Konflikten bei der Käfighaltung entschieden wurde. Bei männlichen Mäusen besteht die Möglichkeit, dass auf Grund von geschlechtsspezifischen Charakteristika andere Effekte durch TMAO und Propionat zu beobachten sind. Eine Untersuchung beider Geschlechter hätte eine deutlich höhere Anzahl an Versuchsmäusen bedeutet, wovon wir im Sinne des 3R Prinzips Abstand genommen haben.

### **Versuchsdurchführung**

Die Mäuse hatten ad-libitum-Zugang zu Futter und Wasser. Somit ließ sich keine Bilanzierung der Nahrungs- sowie Wasserzufuhr für einzelne Mäuse erstellen.

Weiterhin zeigte sich in unseren Experimenten, dass nicht alle Mäuse auf HFD eine Gewichtszunahme zeigten und es somit zumindest hinsichtlich der Variable Gewicht auch Non-Responder gab. Bei diesen Mäusen kann ein möglicher Effekt von Propionat auf durch HFD generierte Veränderungen schwächer ausgeprägt sein.

Die tägliche orale Gavagierung erfolgte, um eine möglichst vergleichbare und feste Dosierung von Propionat während des Versuchs zu erreichen. Die orale Gavagierung stellt allerdings einen Stressor für die Mäuse da und kann Verletzungen des oberen GI-Trakts verursachen. Aus diesem Grund wurden die Mäuse jeweils nach der Gavagierung

genau auf eine Verletzungs- oder Erstickungssymptomatik beobachtet und täglich das Gewicht protokolliert.

Auch die Kontrollgruppe erhielt tägliche Gavagierungen mit einer Vektorlösung, um möglichst ähnliche Bedingungen zu schaffen.

Ein Teil der Versuchstiere hat zudem eine mehrwöchige Breitbandantibiose im Trinkwasser zur Generierung von sekundär gnotobiotischen Mäusen erhalten und wurde anschließend unter streng sterilen Bedingungen gehalten (steriles Futter, autoklavierte Käfige, steriles Arbeiten beim Gavagieren).

Sekundär gnotobiotische Mäuse entwickelten eine Appendizitis-ähnliche Kolitis mit Megaappendix. Die systemischen Folgen dieser bei sekundär gnotobiotischen Mäusen bekannten Entwicklung sind noch unklar.

Die ARRIVE Richtlinien vom National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research für die Umsetzung der Mausversuche wurden beachtet [94].

### **Durchflusszytometrische Messungen und Analysen**

Die durchflusszytometrischen Proben wurden alle am selben Tag verarbeitet, gefärbt und fixiert und innerhalb von maximal 2 Tagen gemessen. Bei der Probenverarbeitung musste ein Standortwechsel erfolgen, was zu einem Zeitverlust von etwa 30 Minuten führte. Der Transport wurde lichtgeschützt und auf Eis durchgeführt.

Durch Fehlfärbungen oder fehlerhafte Waschungen kam es bei der Analyse zum Ausschluss einzelner Proben, die eine zu geringe Zellzahl zeigten. Die durchflusszytometrische Auswertung der Mausversuche mit ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen erfolgte einfach verblindet, wobei der Autor dieser Arbeit die Gruppenzuordnung der einzelnen Mäuse erst nach der Zellisolation, Färbung und durchflusszytometrischen Analyse und Auswertung erfahren hat.

### **Zellkulturversuche**

#### **Endothelzellen**

Für die Zellkulturversuche wurden humane aortale Endothelzellen von zwei Spendern verwendet. Bei dieser Arbeit ähnlichen Versuchsprotokollen werden häufig humane Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC) verwendet, die aus der Nabelschnur von Neugeborenen gewonnen werden. Ein Vorteil der HUVEC ist, dass diese nicht durch

Umwelteinflüsse nach der Geburt beeinflusst worden sind. HAEC sind dagegen den Umwelteinflüssen, die der Donor erlebt hat, ausgesetzt und ihre Eigenschaften können dementsprechend zwischen Spendern variieren. Unsere Arbeitsgruppe hat sich für die Verwendung von HAEC entschieden, da diese Endothelzellen der Aorta und damit einer Arterie darstellen.

HAEC können bis zur 9. Passage kultiviert werden und wurden in dieser Arbeit ab der 7. Passage für Experimente verwendet. Unterschiede zwischen den Spendern der HAEC sowie die Verwendung verschiedener Passagen von HAEC können einen Einfluss auf die Ergebnisse der Zellkulturexperimente mit HAEC ausgeübt haben.

### **Propionat-Konzentration in Zellkultur**

Wie im vorangehenden Diskussionsteil ausführlich beschrieben, können bei verschiedenen verwendeten Konzentrationen von Propionat unterschiedlich starke Effekte beobachtet werden, wobei eine hohe Konzentration von Propionat stärkere Effekte bewirkt.

Dennoch bleibt die Untersuchung einer hohen Konzentration von 10 mM Propionat, wie in einigen Publikationen beschrieben [68, 69] fragwürdig, da eine solch hohe Konzentration nicht physiologisch ist. Aus diesem Grund wurde sich in dieser Arbeit für die Verwendung einer physiologischen Konzentration von Propionat mit 150  $\mu$ M oder 300  $\mu$ M entschieden.

## **4.4 Therapeutische Relevanz der Ergebnisse im translationalen Kontext**

### **TMAO**

In Annahme einer überwiegend pathologischen Wirkung von TMAO im Organismus gibt es verschiedene Ansätze die TMAO-Konzentration im Serum zu erniedrigen.

Zunächst kommen Änderungen des Lebensstils in Betracht, welche einen verringerten Konsum von cholin- oder carnitinreichen Nahrungsmitteln und folglich eine geringere Produktion von TMA durch das Darmmikrobiom umfassen. Weiterhin könnte regelmäßige Bewegung, die in Mausversuchen eine Normalisierung der TMAO-Spiegel bewirkt hat, protektiv wirken [95].

Die Reduktion der Generierung von TMA durch Bakterien ist ein weiterer Ansatz. Für die Generierung von TMA stellt das Darmmikrobiom einen entscheidenden Faktor dar. Es konnte eine Abhängigkeit der Generierung von TMA vom Aufbau bzw. Veränderungen

des Darmmikrobioms festgestellt werden. So wurden hohe TMAO-Spiegel positiv mit *Prevotella*, *Peptokokkæ* sowie *Clostridien* und negativ mit *Fäkalibakterium prausnitzii* assoziiert. Bakterien des Genus *Bakteroides* können kein TMAO produzieren. Bei einem Teil der untersuchten Probanden fehlte dem Darmmikrobiom eine Spezies, die TMA generieren kann und somit war die Serumkonzentration von TMAO bei dieser Population auch bei cholinreicher Diät nicht erhöht [96]. Insofern würde eine Modulation des Darmmikrobioms durch Probiotika oder zielgerichtete Antibiotika einen möglichen therapeutischen Ansatz darstellen. Damit könnte ein Darmmikrobiom mit reduzierter Produktion von TMA erzeugt werden.

Mit den gegenwärtigen medikamentösen Therapieformen ist eine solche spezifische Modulation des Darmmikrobioms noch nicht möglich, und gerade eine Antibiotikatherapie besitzt durch die meist niedrige spezifische Wirkung hohes Nebenwirkungspotenzial [95]. Die Inhibition der bakteriellen TMA-Produktion durch sogenannte „Suicide Substrate Inhibitoren“ des Enzyms TMA-Lyase zum Beispiel 3,3-Dimethyl-1-butanol (DMB) stellt einen weiteren Therapieansatz dar. DMB ist ein strukturelles Analogon von Cholin und bewirkt eine Herunterregulierung der TMA-Produktion durch das Darmmikrobiom sowie in Mäusen auf cholin- sowie carnitinreicher Diät eine verringerte TMAO-Konzentration [97].

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass DMB eine verringerte Ausbildung von Schaumzellen sowie atherosklerotischen Läsionen in ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen bei ohne Beeinflussung des Cholesterinstoffwechsels zeigt [95, 97].

Ein weiterer therapeutischer Ansatz zielt auf die Umwandlung von TMA in TMAO durch die hepatische Flavinmonooxygenase 3. Die Umwandlung kann durch Gabe von Insulin oder spezifischen Antisense-Oligonukleotiden inhibiert werden, was allerdings als mögliche Nebenwirkungen eine hepatische Entzündungsreaktion sowie fischartigen Mundgeruch hat [95].

## **Propionat**

Kurzkettige Fettsäuren und insbesondere Propionat könnten über verschiedene Mechanismen einen therapeutisch positiven Effekt auf verschiedene Krankheiten ausüben.

So gibt es, wie in dieser Arbeit gezeigt, Hinweise, dass Propionat einen Einfluss auf die Differenzierung von Immunzellen hat und antiinflammatorische Tregs fördert. Dadurch kann die Krankheitsaktivität von chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie

Atherosklerose, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen oder Multiple Sklerose gehemmt werden.

So zeigten sich in einer Studie von Duscha et al. bei oraler Supplementation von Propionat bei MS-Patienten signifikant erhöhte Anteile von Tregs bei gleichzeitig erniedrigten Anteilen von Th1- und Th17-Zellen und im Verlauf eine verringerte Krankheitsaktivität der MS [86].

Weiterhin konnten in einer noch unveröffentlichten Studie unserer Arbeitsgruppe ein LDL-Cholesterin senkender Effekt durch Propionat sowie weitere Regulationsmechanismen im Cholesterinstoffwechsel nachgewiesen werden. Dies könnte über die Reduktion sekundär pro-inflammatorischer Effekte von LDL-Cholesterin ebenso einen anti-atherogenen Effekt ausüben.

Der Effekt von Propionat auf den Glucosestoffwechsel ist in der wissenschaftlichen Literatur noch umstritten. So zeigte eine Studie von Zhao et al. eine Reduktion des HbA1c-Wertes bei faserreicher Diät mit erhöhter Produktion von SCFA, welcher teilweise durch eine erhöhte Produktion von GLP-1 generiert wurde [98]. Dagegen beobachteten Tirosh et al. in einem Mausmodell die Aktivierung des sympathischen Nervensystems durch Propionat und damit einhergehend die Ausschüttung von Glucagon und FABP4, welche als Folge eine erhöhte Insulinresistenz und Hyperglykämie bewirkte [99].

Weiterhin wurde in verschiedenen Studien ein positiver Effekt von Propionat auf den Blutdruck festgestellt. So wiesen Pluznick et al. eine Aktivierung des Olfactory Rezeptors 78 durch Propionat nach, wodurch es zu einer verstärkten Reninfreisetzung der Nierenzellen kam und eine Blutdrucksenkung in einem Intervall von Stunden bis Tagen beobachtet werden konnte [58]. In einer weiteren Studie von Bartolomäus et al. konnte ein moderater Blutdruck-senkender Effekt durch eine Vorbehandlung mit Propionat über zwei Wochen in einem Angiotensin 2-Mausmodell festgestellt werden, welcher abhängig vom Einfluss von Propionat auf die Bildung und Funktionalität von Tregs war [6]

Mögliche therapeutische Interventionen mit einer Nutzung der positiven Wirkeffekte von Propionat sind eine Veränderung der Ernährung mit einem erhöhten Anteil faserreicher Kost, eine Modifikation des Darmmikrobioms mit Selektion SCFA-produzierender Bakterien oder eine direkte orale Substitution von SCFA, dabei insbesondere von Propionat.

Wie von Sonnenburg und Bäckhed beschrieben, bewirkt ein erhöhter Anteil faserreicher Kost die Veränderung des individuellen Darmmikrobioms und kann bei Einhaltung dieser

Ernährung zu einem erhöhten Anteil von SCFA im Blut beitragen [41]. Dabei lässt sich spekulieren, dass die diätetisch erreichbare Erhöhung der SCFA-Spiegel im Blut nur moderat ist und sich ein protektiver Effekt nur bei Langzeiteinnahme einer faserreichen Kost einstellt. Allerdings sind keine Studien zur Überprüfung des kausalen Zusammenhangs von über einen langen Zeitraum erhöhten SCFA-Spiegeln und einer Reduktion von entzündlichen Erkrankungen bekannt.

Analog zum therapeutischen Ansatz bei TMAO bestände ebenfalls die Möglichkeit mittels Antibiotikatherapie spezifisch SCFA-produzierende Bakterien zu selektieren und das restliche Darmmikrobiom zu eradizieren. Dieser Ansatz lässt sich praktisch auf Grund des Fehlens solch spezifischer Antibiotika aktuell nicht umsetzen und birgt ein hohes Nebenwirkungspotenzial.

Eine dritte Möglichkeit der therapeutischen Intervention stellt die orale Substitution von Propionat dar, wie es in der Studie von Duscha et al. durchgeführt wurde. Daten zur dadurch möglichen Erhöhung der Konzentration von SCFA im Serum liegen nicht vor. Es lässt sich allerdings vermuten, dass die Konzentration durch eine orale Substitution höher liegt als bei rein diätetischer Modifikation und somit auch Wirkeffekte von Propionat verstärkt sind.

Zusammenfassend bieten eine Ernährungsanpassung mit erhöhtem Anteil faserreicher Kost und eine direkte orale Substitution von SCFA, insbesondere von Propionat, therapeutische Ansätze für verschiedene Erkrankungen.

#### 4.5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden mit TMAO und Propionat zwei Metabolite untersucht, die einen Schwerpunkt der gegenwärtigen Forschung zum Einfluss des Darmmikrobioms als Bindeglied zwischen Ernährung und systemischen Erkrankungen darstellen. TMAO wurde durch Wang et al. (2011) als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen identifiziert und seitdem werden verschiedene Forschungsarbeiten durchgeführt, um die molekularen Wirkmechanismen aufzudecken sowie mögliche therapeutische Ansätze zu entwickeln [42].

In meiner Arbeit konnte ich zum ersten Mal einen Einfluss des TMAOs auf die Differenzierung von Monozytensubpopulationen zeigen. Der genau Wirkmechanismus der zu den in meiner Arbeit beobachteten Effekten führt, bleibt Gegenstand zukünftiger Forschungsvorhaben, wobei gegenwärtig nach einem molekularen Rezeptor für TMAO

gesucht wird.

Weiterhin wurde der Einfluss von Propionat als SCFA auf Immunzellen und Endothelzellen untersucht, und eine verstärkte Generation von Tregs im hypercholesterinämischen Mausmodell mit möglichen atheroprotektiven Effekten festgestellt. Eine Supplementierung von Propionat könnte einen therapeutischen Ansatz zur Prävention von atherosklerotischen Erkrankungen darstellen, sodass die Ergebnisse dieser Arbeit die Grundlage für eine klinische Prüfung des atheroprotektiven Potentials von Propionat bilden.

## Literaturverzeichnis

1. Schwartz A, Taras D, Schafer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, Hardt PD. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity* (Silver Spring). 2010;18(1):190-5.
2. Musso G, Gambino R, Cassader M. Obesity, diabetes, and gut microbiota: the hygiene hypothesis expanded? *Diabetes Care*. 2010;33(10):2277-84.
3. Oyama JI, Node K. Gut microbiota and hypertension. *Hypertens Res*. 2019;42(5):741-3.
4. 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.
5. Ge X, Zheng L, Zhuang R, Yu P, Xu Z, Liu G, Xi X, Zhou X, Fan H. The Gut Microbial Metabolite Trimethylamine N-Oxide and Hypertension Risk: A Systematic Review and Dose-Response Meta-analysis. *Adv Nutr*. 2020;11(1):66-76.
6. Bartolomeus H, Balogh A, Yakoub M, Homann S, Marko L, Hoges S, Tsvetkov D, Krannich A, Wundersitz S, Avery EG, Haase N, Kraker K, Hering L, Maase M, Kusche-Vihrog K, Grandoch M, Fielitz J, Kempa S, Gollasch M, Zhumadilov Z, Kozhakhmetov S, Kushugulova A, Eckardt KU, Dechend R, Rump LC, Forslund SK, Muller DN, Stegbauer J, Wilck N. Short-Chain Fatty Acid Propionate Protects From Hypertensive Cardiovascular Damage. *Circulation*. 2019;139(11):1407-21.
7. Collaborators GBDCoD. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;392(10159):1736-88.
8. Destatis Statistisches Bundesamt Deutschland. Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachen die höchsten Kosten (Pressemitteilung Nr. 347 vom 29. September 2017) [press release]. 2017.(Accessed 17.03.2020 at [https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2017/09/PD17\\_347\\_236.html](https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2017/09/PD17_347_236.html)).
9. Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ Res*. 2016;118(4):535-46.
10. Timmis A, Townsend N, Gale C, Grobbee R, Maniadakis N, Flather M, Wilkins E, Wright L, Vos R, Bax J, Blum M, Pinto F, Vardas P, Group ESCSD. European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2017. *Eur Heart J*. 2018;39(7):508-79.
11. Deutsche Herzstiftung e.V. . Presstext DGK 02/2019. Deutscher Herzbericht 2018. [press release]. 2018.(Accessed 17.03.2020 at <https://www.herzstiftung.de/pdf/presse/Herzbericht-2018-dgk-pm.pdf>).
12. Tabas I, Garcia-Cardena G, Owens GK. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J Cell Biol*. 2015;209(1):13-22.
13. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(10):803-15.
14. Skalen K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hulten LM, Wiklund O, Innerarity TL, Boren J. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*. 2002;417(6890):750-4.
15. Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15(5):551-61.
16. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(1):333-7.
17. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat*

Immunol. 2011;12(3):204-12.

18. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*. 1986;6(2):131-8.
19. Kunjathoor VV, Febbraio M, Podrez EA, Moore KJ, Andersson L, Koehn S, Rhee JS, Silverstein R, Hoff HF, Freeman MW. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem*. 2002;277(51):49982-8.
20. Buono C, Anzinger JJ, Amar M, Kruth HS. Fluorescent pegylated nanoparticles demonstrate fluid-phase pinocytosis by macrophages in mouse atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 2009;119(5):1373-81.
21. Gistera A, Hansson GK. The immunology of atherosclerosis. *Nat Rev Nephrol*. 2017;13(6):368-80.
22. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nunez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, Latz E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. 2010;464(7293):1357-61.
23. Feil S, Fehrenbacher B, Lukowski R, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Schaller M, Feil R. Transdifferentiation of vascular smooth muscle cells to macrophage-like cells during atherogenesis. *Circ Res*. 2014;115(7):662-7.
24. Michiels C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol*. 2003;196(3):430-43.
25. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*. 2011;17(11):1410-22.
26. Gimbrone MA, Jr., Garcia-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):620-36.
27. Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*. 1991;251(4995):788-91.
28. Lüllmann-Rauch R, Asan E. Taschenlehrbuch Histologie. 4., vollständig überarbeitete Auflage ed. Stuttgart ; New York: Georg Thieme Verlag; 2012: 290-291.
29. Woollard KJ, Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol*. 2010;7(2):77-86.
30. 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.
31. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003;19(1):71-82.
32. Tabas I, Lichtman AH. Monocyte-Macrophages and T Cells in Atherosclerosis. *Immunity*. 2017;47(4):621-34.
33. Hettlinger J, Richards DM, Hansson J, Barra MM, Joschko AC, Krijgsveld J, Feuerer M. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat Immunol*. 2013;14(8):821-30.
34. Swirski FK, Libby P, Aikawa E, Alcaide P, Luscinskas FW, Weissleder R, Pittet MJ. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest*. 2007;117(1):195-205.
35. Murphy KM, Weaver C, Janeway C, Seidler L. Janeway Immunologie 9.Auflage ed: Springer Spektrum; 2018: 443-445.
36. Lim H, Kim YU, Sun H, Lee JH, Reynolds JM, Hanabuchi S, Wu H, Teng BB, Chung Y. Proatherogenic conditions promote autoimmune T helper 17 cell responses in vivo. *Immunity*. 2014;40(1):153-65.
37. Mor A, Planer D, Luboshits G, Afek A, Metzger S, Chajek-Shaul T, Keren G, George

- J. Role of naturally occurring CD4+ CD25+ regulatory T cells in experimental atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(4):893-900.
38. Jonsson AL, Backhed F. Role of gut microbiota in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2017;14(2):79-87.
39. Haller D, Hörmannspurger G. *Darmgesundheit und Mikrobiota : ein Überblick über die Bedeutung der Darmbakterien für die Gesundheit.* Wiesbaden: Springer Spektrum; 2015: 13-16.
40. Parada Venegas D, De la Fuente MK, Landskron G, Gonzalez MJ, Quera R, Dijkstra G, Harmsen HJM, Faber KN, Hermoso MA. Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Front Immunol.* 2019;10:277.
41. Sonnenburg JL, Backhed F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature.* 2016;535(7610):56-64.
42. 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.
43. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, Britt EB, Fu X, Wu Y, Li L, Smith JD, DiDonato JA, Chen J, Li H, Wu GD, Lewis JD, Warriar M, Brown JM, Krauss RM, Tang WH, Bushman FD, Lusis AJ, Hazen SL. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med.* 2013;19(5):576-85.
44. Ufnal M, Zadlo A, Ostaszewski R. TMAO: A small molecule of great expectations. *Nutrition.* 2015;31(11-12):1317-23.
45. Janeiro MH, Ramirez MJ, Milagro FI, Martinez JA, Solas M. Implication of Trimethylamine N-Oxide (TMAO) in Disease: Potential Biomarker or New Therapeutic Target. *Nutrients.* 2018;10(10).
46. Zhu W, Gregory JC, Org E, Buffa JA, Gupta N, Wang Z, Li L, Fu X, Wu Y, Mehrabian M, Sartor RB, McIntyre TM, Silverstein RL, Tang WHW, DiDonato JA, Brown JM, Lusis AJ, Hazen SL. Gut Microbial Metabolite TMAO Enhances Platelet Hyperreactivity and Thrombosis Risk. *Cell.* 2016;165(1):111-24.
47. Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut.* 1987;28(10):1221-7.
48. Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev.* 2001;81(3):1031-64.
49. Greenberg NA, Gassull MA, Meier R. Short-chain fatty acids: ready for prime time? *Nutr Clin Pract.* 2006;21(6):639-40; author reply 40.
50. Ohira H, Tsutsui W, Fujioka Y. Are Short Chain Fatty Acids in Gut Microbiota Defensive Players for Inflammation and Atherosclerosis? *J Atheroscler Thromb.* 2017;24(7):660-72.
51. McNeil NI. The contribution of the large intestine to energy supplies in man. *Am J Clin Nutr.* 1984;39(2):338-42.
52. Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Backhed F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell.* 2016;165(6):1332-45.
53. Waldecker M, Kautenburger T, Daumann H, Busch C, Schrenk D. Inhibition of histone-deacetylase activity by short-chain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon. *J Nutr Biochem.* 2008;19(9):587-93.
54. Verbeke KA, Boobis AR, Chiodini A, Edwards CA, Franck A, Kleerebezem M,

- Nauta A, Raes J, van Tol EA, Tuohy KM. Towards microbial fermentation metabolites as markers for health benefits of prebiotics. *Nutr Res Rev.* 2015;28(1):42-66.
55. Chambers ES, Viardot A, Psichas A, Morrison DJ, Murphy KG, Zac-Varghese SE, MacDougall K, Preston T, Tedford C, Finlayson GS, Blundell JE, Bell JD, Thomas EL, Mt-Isa S, Ashby D, Gibson GR, Kolida S, Dhillon WS, Bloom SR, Morley W, Clegg S, Frost G. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut.* 2015;64(11):1744-54.
56. Trompette A, Gollwitzer ES, Yadava K, Sichelstiel AK, Sprenger N, Ngom-Bru C, Blanchard C, Junt T, Nicod LP, Harris NL, Marsland BJ. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat Med.* 2014;20(2):159-66.
57. Pluznick J. A novel SCFA receptor, the microbiota, and blood pressure regulation. *Gut Microbes.* 2014;5(2):202-7.
58. Pluznick JL, Protzko RJ, Gevorgyan H, Peterlin Z, Sipos A, Han J, Brunet I, Wan LX, Rey F, Wang T, Firestein SJ, Yanagisawa M, Gordon JI, Eichmann A, Peti-Peterdi J, Caplan MJ. Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(11):4410-5.
59. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veeken J, deRoos P, Liu H, Cross JR, Pfeffer K, Coffey PJ, Rudenski AY. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature.* 2013;504(7480):451-5.
60. De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Goncalves D, Vinera J, Zitoun C, Duchamp A, Backhed F, Mithieux G. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell.* 2014;156(1-2):84-96.
61. 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.
62. Seldin MM, Meng Y, Qi H, Zhu W, Wang Z, Hazen SL, Lusis AJ, Shih DM. Trimethylamine N-Oxide Promotes Vascular Inflammation Through Signaling of Mitogen-Activated Protein Kinase and Nuclear Factor-kappaB. *J Am Heart Assoc.* 2016;5(2).
63. Heimesaat MM, Bereswill S, Fischer A, Fuchs D, Struck D, Niebergall J, Jahn HK, Dunay IR, Moller A, Gescher DM, Schumann RR, Gobel UB, Liesenfeld O. Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 2006;177(12):8785-95.
64. Blom KG, Qazi MR, Matos JB, Nelson BD, DePierre JW, Abedi-Valugerdi M. Isolation of murine intrahepatic immune cells employing a modified procedure for mechanical disruption and functional characterization of the B, T and natural killer T cells obtained. *Clin Exp Immunol.* 2009;155(2):320-9.
65. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, Akdis M, Andra I, Annunziato F, Bacher P, Barnaba V, Battistini L, Bauer WM, Baumgart S, Becher B, Beisker W, Berek C, Blanco A, Borsellino G, Boulais PE, Brinkman RR, Buscher M, Busch DH, Bushnell TP, Cao X, Cavani A, Chattopadhyay PK, Cheng Q, Chow S, Clerici M, Cooke A, Cosma A, Cosmi L, Cumano A, Dang VD, Davies D, De Biasi S, Del Zotto G, Della Bella S, Dellabona P, Deniz G, Dessing M, Diefenbach A, Di Santo J, Dieli F, Dolf A, Donnemeyer VS, Dorner T, Ehrhardt GRA, Endl E, Engel P, Engelhardt B, Esser C, Everts B, Dreher A, Falk CS, Fehniger TA, Filby A, Fillatreau S, Follo M, Forster I, Foster J, Foulds GA, Frenette PS, Galbraith D, Garbi N, Garcia-Godoy MD, Geginat J, Ghoreschi K, Gibellini L, Goettlinger C, Goodyear CS, Gori A, Grogan J, Gross M, Grutzkau A, Grummitt D, Hahn J, Hammer

Q, Hauser AE, Haviland DL, Hedley D, Herrera G, Herrmann M, Hiepe F, Holland T, Hombrink P, Houston JP, Hoyer BF, Huang B, Hunter CA, Iannone A, Jack HM, Javega B, Jonjic S, Juelke K, Jung S, Kaiser T, Kalina T, Keller B, Khan S, Kienhofer D, Kroneis T, Kunkel D, Kurts C, Kvistborg P, Lannigan J, Lantz O, Larbi A, LeibundGut-Landmann S, Leipold MD, Levings MK, Litwin V, Liu Y, Lohoff M, Lombardi G, Lopez L, Lovett-Racke A, Lubberts E, Ludewig B, Lugli E, Maecker HT, Martrus G, Matarese G, Maueroeder C, McGrath M, McInnes I, Mei HE, Melchers F, Melzer S, Mielenz D, Mills K, Mirrer D, Mjosberg J, Moore J, Moran B, Moretta A, Moretta L, Mosmann TR, Muller S, Muller W, Munz C, Multhoff G, Munoz LE, Murphy KM, Nakayama T, Nasi M, Neudorfl C, Nolan J, Nourshargh S, O'Connor JE, Ouyang W, Oxenius A, Palankar R, Panse I, Peterson P, Peth C, Petriz J, Philips D, Pickl W, Piconese S, Pinti M, Pockley AG, Podolska MJ, Pucillo C, Quataert SA, Radstake T, Rajwa B, Rebhahn JA, Recktenwald D, Remmerswaal EBM, Rezvani K, Rico LG, Robinson JP, Romagnani C, Rubartelli A, Ruckert B, Ruland J, Sakaguchi S, Sala-de-Oyanguren F, Samstag Y, Sanderson S, Sawitzki B, Scheffold A, Schiemann M, Schildberg F, Schimisky E, Schmid SA, Schmitt S, Schober K, Schuler T, Schulz AR, Schumacher T, Scotta C, Shankey TV, Shemer A, Simon AK, Spidlen J, Stall AM, Stark R, Stehle C, Stein M, Steinmetz T, Stockinger H, Takahama Y, Tarnok A, Tian Z, Toldi G, Tornack J, Traggiai E, Trotter J, Ulrich H, van der Braber M, van Lier RAW, Veldhoen M, Vento-Asturias S, Vieira P, Voehringer D, Volk HD, von Volkman K, Waisman A, Walker R, Ward MD, Warnatz K, Warth S, Watson JV, Watzl C, Wegener L, Wiedemann A, Wienands J, Willimsky G, Wing J, Wurst P, Yu L, Yue A, Zhang Q, Zhao Y, Ziegler S, Zimmermann J. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur J Immunol.* 2017;47(10):1584-797.

66. Erotocritou P, Arya M, Shukla SN, Patel HRH. Flow Cytometry. In: Patel HRH, Arya M, Shergill IS, editors. *Basic Science Techniques in Clinical Practice*. London: Springer London; 2007: 38-47.

67. Fabian K. Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers, hier mit einem Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm und vier Fluoreszenzkanälen [Internet]. [cited 22 April 2020]. Available from:

<https://de.wikipedia.org/wiki/Durchflusszytometrie#/media/File:Duchflusszytometer.png>.

68. Zapolska-Downar D, Naruszewicz M. Propionate reduces the cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression by inhibiting nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) activation. *J Physiol Pharmacol.* 2009;60(2):123-31.

69. Li M, van Esch B, Henricks PAJ, Garssen J, Folkerts G. Time and Concentration Dependent Effects of Short Chain Fatty Acids on Lipopolysaccharide- or Tumor Necrosis Factor alpha-Induced Endothelial Activation. *Front Pharmacol.* 2018;9:233.

70. Haghikia A, Li XS, Liman TG, Bledau N, Schmidt D, Zimmermann F, Krankel N, Widera C, Sonnenschein K, Haghikia A, Weissenborn K, Fraccarollo D, Heimesaat MM, Bauersachs J, Wang Z, Zhu W, Bavendiek U, Hazen SL, Endres M, Landmesser U. Gut Microbiota-Dependent Trimethylamine N-Oxide Predicts Risk of Cardiovascular Events in Patients With Stroke and Is Related to Proinflammatory Monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38(9):2225-35.

71. Jawien J. The role of an experimental model of atherosclerosis: apoE-knockout mice in developing new drugs against atherogenesis. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(13):2435-9.

72. Schiattarella GG, Sannino A, Toscano E, Giugliano G, Gargiulo G, Franzone A, Trimarco B, Esposito G, Perrino C. Gut microbe-generated metabolite trimethylamine-N-oxide as cardiovascular risk biomarker: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Eur Heart J.* 2017;38(39):2948-56.

73. Heianza Y, Ma W, Manson JE, Rexrode KM, Qi L. Gut Microbiota Metabolites and

Risk of Major Adverse Cardiovascular Disease Events and Death: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. *J Am Heart Assoc.* 2017;6(7).

74. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, Puel A, Biswas SK, Moshous D, Picard C, Jais JP, D'Cruz D, Casanova JL, Trouillet C, Geissmann F. Human CD14<sup>dim</sup> monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity.* 2010;33(3):375-86.

75. Tang WH, Wang Z, Kennedy DJ, Wu Y, Buffa JA, Agatista-Boyle B, Li XS, Levison BS, Hazen SL. Gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide (TMAO) pathway contributes to both development of renal insufficiency and mortality risk in chronic kidney disease. *Circ Res.* 2015;116(3):448-55.

76. Roncal C, Martinez-Aguilar E, Orbe J, Ravassa S, Fernandez-Montero A, Saenz-Pipaon G, Ugarte A, Estella-Hermoso de Mendoza A, Rodriguez JA, Fernandez-Alonso S, Fernandez-Alonso L, Oyarzabal J, Paramo JA. Trimethylamine-N-Oxide (TMAO) Predicts Cardiovascular Mortality in Peripheral Artery Disease. *Sci Rep.* 2019;9(1):15580.

77. Ley K, Miller YI, Hedrick CC. Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(7):1506-16.

78. Hanna RN, Carlin LM, Hubbeling HG, Nackiewicz D, Green AM, Punt JA, Geissmann F, Hedrick CC. The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C<sup>+</sup> monocytes. *Nat Immunol.* 2011;12(8):778-85.

79. Wu K, Yuan Y, Yu H, Dai X, Wang S, Sun Z, Wang F, Fei H, Lin Q, Jiang H, Chen T. The gut microbial metabolite trimethylamine N-oxide aggravates GVHD by inducing M1 macrophage polarization in mice. *Blood.* 2020;136(4):501-15.

80. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang XF, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res.* 2014;2(1):1.

81. Bottero V, Withoff S, Verma IM. NF-kappaB and the regulation of hematopoiesis. *Cell Death Differ.* 2006;13(5):785-97.

82. Ma G, Pan B, Chen Y, Guo C, Zhao M, Zheng L, Chen B. Trimethylamine N-oxide in atherogenesis: impairing endothelial self-repair capacity and enhancing monocyte adhesion. *Biosci Rep.* 2017;37(2).

83. Esposito K, Giugliano D. Diet and inflammation: a link to metabolic and cardiovascular diseases. *Eur Heart J.* 2006;27(1):15-20.

84. Anderson JW, Baird P, Davis RH, Jr., Ferreri S, Knudtson M, Koraym A, Waters V, Williams CL. Health benefits of dietary fiber. *Nutr Rev.* 2009;67(4):188-205.

85. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly YM, Glickman JN, Garrett WS. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science.* 2013;341(6145):569-73.

86. Duscha A, Gisevius B, Hirschberg S, Yissachar N, Stangl GI, Eilers E, Bader V, Haase S, Kaisler J, David C, Schneider R, Troisi R, Zent D, Hegelmaier T, Dokalis N, Gerstein S, Del Mare-Roumani S, Amidror S, Staszewski O, Poschmann G, Stuhler K, Hirche F, Balogh A, Kempa S, Trager P, Zaiss MM, Holm JB, Massa MG, Nielsen HB, Faissner A, Lukas C, Gatermann SG, Scholz M, Przuntek H, Prinz M, Forslund SK, Winklhofer KF, Muller DN, Linker RA, Gold R, Haghighi A. Propionic Acid Shapes the Multiple Sclerosis Disease Course by an Immunomodulatory Mechanism. *Cell.* 2020;180(6):1067-80 e16.

87. Al-Lahham SH, Peppelenbosch MP, Roelofsen H, Vonk RJ, Venema K. Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1801(11):1175-83.

88. Trompette A, Gollwitzer ES, Pattaroni C, Lopez-Mejia IC, Riva E, Pernot J, Ubags N, Fajas L, Nicod LP, Marsland BJ. Dietary Fiber Confers Protection against Flu by

- Shaping Ly6c(-) Patrolling Monocyte Hematopoiesis and CD8(+) T Cell Metabolism. *Immunity*. 2018;48(5):992-1005 e8.
89. Chang PV, Hao L, Offermanns S, Medzhitov R. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(6):2247-52.
90. Ang Z, Er JZ, Tan NS, Lu J, Liou YC, Grosse J, Ding JL. Human and mouse monocytes display distinct signalling and cytokine profiles upon stimulation with FFAR2/FFAR3 short-chain fatty acid receptor agonists. *Sci Rep*. 2016;6:34145.
91. Chambers ES, Byrne CS, Morrison DJ, Murphy KG, Preston T, Tedford C, Garcia-Perez I, Fountana S, Serrano-Contreras JI, Holmes E, Reynolds CJ, Roberts JF, Boyton RJ, Altmann DM, McDonald JAK, Marchesi JR, Akbar AN, Riddell NE, Wallis GA, Frost GS. Dietary supplementation with inulin-propionate ester or inulin improves insulin sensitivity in adults with overweight and obesity with distinct effects on the gut microbiota, plasma metabolome and systemic inflammatory responses: a randomised cross-over trial. *Gut*. 2019;68(8):1430-8.
92. Daniel C, von Boehmer H. Extrathymic generation of regulatory T cells--chances and challenges for prevention of autoimmune disease. *Adv Immunol*. 2011;112:177-213.
93. Park J, Kim M, Kang SG, Jannasch AH, Cooper B, Patterson J, Kim CH. Short-chain fatty acids induce both effector and regulatory T cells by suppression of histone deacetylases and regulation of the mTOR-S6K pathway. *Mucosal Immunol*. 2015;8(1):80-93.
94. Kilkenney C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2010;8(6):e1000412.
95. Nam HS. Gut Microbiota and Ischemic Stroke: The Role of Trimethylamine N-Oxide. *J Stroke*. 2019;21(2):151-9.
96. Yamashita T. Intestinal Immunity and Gut Microbiota in Atherogenesis. *J Atheroscler Thromb*. 2017;24(2):110-9.
97. Wang Z, Roberts AB, Buffa JA, Levison BS, Zhu W, Org E, Gu X, Huang Y, Zamanian-Daryoush M, Culley MK, DiDonato AJ, Fu X, Hazen JE, Krajcik D, DiDonato JA, Luscis AJ, Hazen SL. Non-lethal inhibition of Gut Microbial Trimethylamine Production for the Treatment of Atherosclerosis. *Cell*. 2015;163(7):1585-95.
98. Zhao L, Zhang F, Ding X, Wu G, Lam YY, Wang X, Fu H, Xue X, Lu C, Ma J, Yu L, Xu C, Ren Z, Xu Y, Xu S, Shen H, Zhu X, Shi Y, Shen Q, Dong W, Liu R, Ling Y, Zeng Y, Wang X, Zhang Q, Wang J, Wang L, Wu Y, Zeng B, Wei H, Zhang M, Peng Y, Zhang C. Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes. *Science*. 2018;359(6380):1151-6.
99. Tirosh A, Calay ES, Tuncman G, Claiborn KC, Inouye KE, Eguchi K, Alcalá M, Rathaus M, Hollander KS, Ron I, Livne R, Heianza Y, Qi L, Shai I, Garg R, Hotamisligil GS. The short-chain fatty acid propionate increases glucagon and FABP4 production, impairing insulin action in mice and humans. *Sci Transl Med*. 2019;11(489).

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, David Schmidt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **„Der Einfluss von Darmmikrobiom-abhängigen Metaboliten auf Endothelzellphysiologie und Immunzellendifferenzierung“**, **„Influence of gut microbiome-dependant metabolites on endothelial cell physiology and immune cell differentiation“** selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

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

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

Datum

Unterschrift

## Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

David Schmidt hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

**Publikation 1:** Haghikia A, Li XS, Liman TG, Bledau N, **Schmidt D**, Zimmermann F, Krankel N, Widera C, Sonnenschein K, Haghikia A, Weissenborn K, Fraccarollo D, Heimesaat MM, Bauersachs J, Wang Z, Zhu W, Bavendiek U, Hazen SL, Endres M, Landmesser U. Gut Microbiota-Dependent Trimethylamine N-Oxide Predicts Risk of Cardiovascular Events in Patients With Stroke and Is Related to Proinflammatory Monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38(9):2225-35.

Beitrag im Einzelnen:

David Schmidt hat an der Durchführung der Mausversuche mitgewirkt, die durchflusszytometrischen Messungen und anschließenden Analysen der murinen Monozyten durchgeführt. Aus den Ergebnissen ist Figure 6 des Artikels entstanden.

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## Curriculum vitae

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



## Publikationsliste

### Journal-Artikel mit Peer-review-Verfahren

**Publikation 1:** Haghikia A, Li XS, Liman TG, Bledau N, **Schmidt D**, Zimmermann F, Krankel N, Widera C, Sonnenschein K, Haghikia A, Weissenborn K, Fraccarollo D, Heimesaat MM, Bauersachs J, Wang Z, Zhu W, Bavendiek U, Hazen SL, Endres M, Landmesser U. Gut Microbiota-Dependent Trimethylamine N-Oxide Predicts Risk of Cardiovascular Events in Patients With Stroke and Is Related to Proinflammatory Monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38(9):2225-35.

**Publikation 2:** Gast M, Rauch BH, Haghikia A, Nakagawa S, Haas J, Stroux A, **Schmidt D**, Schumann P, Weiss S, Jensen L, Kratzer A, Kraenkel N, Muller C, Bornigen D, Hirose T, Blankenberg S, Escher F, Kuhl AA, Kuss AW, Meder B, Landmesser U, Zeller T, Poller W. Long noncoding RNA NEAT1 modulates immune cell functions and is suppressed in early onset myocardial infarction patients. *Cardiovasc Res.* 2019;115(13):1886-906.

**Publikation 3:** Zimmermann F, Roessler J, **Schmidt D**, Jasina A, Schumann P, Gast M, Poller W, Leistner D, Giral H, Krankel N, Kratzer A, Schuchardt S, Heimesaat MM, Landmesser U, Haghikia A. Impact of the Gut Microbiota on Atorvastatin Mediated Effects on Blood Lipids. *J Clin Med.* 2020;9(5).

## Danksagung

Als Erstes möchte ich mich besonders bei PD Dr. med. Arash Haghikia, meinem Betreuer, für die Bereitstellung des Themas sowie für die intensive fachliche und persönliche Betreuung bedanken. Die regelmäßigen fachlichen Dialoge sowie auch Ermutigungen trugen enorm zur Erstellung dieser Dissertation bei.

Weiterhin gilt mein Dank auch Professor Dr. Ulf Landmesser für die Möglichkeit meine Dissertation in der Kardiologie des Benjamin-Franklin-Krankenhauses und in seinem Forschungslabor absolvieren zu können und seine regelmäßigen Rückmeldungen und Anregungen zu weiteren notwendigen Experimenten.

Des Weiteren gilt ein großes Dankeschön meinem Team von Mitdoktoranden in der Arbeitsgruppe Haghikia für die intensive Zusammenarbeit und die regelmäßige Unterstützung und Rat bei aufkommenden Fragen.

Friederike Zimmermann, danke für deine ruhige strukturierte Art!

Paul Schumann, danke für die Hilfe bei den langen Messabenden und die gemeinsamen Stunden am Auswerten der durchflusszytometrischen Daten!

Johann Rössler und Andrzej Jasina, danke für das gemeinsame Durchführen und Abschließen der Mausexperimenten mit den vielen verschiedenen organisatorischen Feinheiten, die es zu beachten galt.

Außerdem möchte ich Nicolle und dem Team der Arbeitsgruppe Landmesser für alle Ratschläge und die gute Einarbeitung danken, dabei insbesondere Minoo, die mir die Grundlagen des Umgangs mit Zellkulturen beigebracht hat.

Ein weiterer Dank gilt meinen Eltern sowie meiner Freundin Janine Nadler, für die fortwährende Unterstützung während der Erstellung der Dissertation sowie das Korrekturlesen.