

Aus dem Experimental and Clinical Research Center (ECRC),
einer gemeinsamen Kooperation zwischen dem
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin
in der Helmholtz-Gemeinschaft
und der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Verbesserung des Angiotensin II-induzierten kardialen Schadens
durch die kurzkettige Fettsäure Propionat –
einen Metaboliten der Darmmikrobiota**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Hendrik Manfred Rüdiger Bartolomaeus

aus Göttingen

Datum der Promotion: 06.09.2019

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Zusammenfassung	III
Abstract	IV
1. Darstellung des Forschungsstands	V
2. Methoden.....	IX
2.1. Tierversuch.....	IX
2.2. Durchflusszytometrie	XI
2.3. mRNA Expressionsanalyse	XIII
2.4. Histologie	XIV
2.5. Gefäßfunktion.....	XVI
2.6. Statistik.....	XVI
3. Ergebnisse	XVII
3.1. Systemische Inflammation	XVII
3.2. Lokale kardiale Entzündungsreaktion und kardiale Schädigung	XVII
3.3. Abhängigkeit von T _{REG}	XVIII
3.4. Effekte auf den Blutdruck	XVIII
3.5. Elektrisches Remodeling	XVIII
4. Weiterführende wissenschaftliche Fragestellungen	XIX
Literaturverzeichnis.....	XXI
Eidesstattliche Versicherung	XXVIII
Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation.....	XXVIII
Auszug aus der Journal Summary List.....	XXX
Short-Chain Fatty Acid Propionate Protects From Hypertensive Cardiovascular Damage	1407
Supplemental Material to Short-Chain Fatty Acid Propionate Protects From Hypertensive Cardiovascular Damage	1
Lebenslauf	XXXI
Publikationsliste	XXXIII
Danksagung	XXXIV

Zusammenfassung

Hintergrund: Darmbakterien produzieren eine Vielzahl von Metaboliten, die durch den Wirt resorbiert werden und Auswirkungen auf dessen Physiologie haben. Kurzkettige Fettsäuren (engl. *short-chain fatty acids*, SCFA) wie z. B. Propionat (C3) sind Metabolite, die durch bakterielle Fermentierung aus nicht verdaulichen Polysacchariden (sogenannte Ballaststoffe oder Fasern) produziert werden. C3 ist durch seine Wirkung auf T-Zellen, insbesondere auf anti-inflammatorisch wirkende regulatorische T-Zellen (T_{REG}), gekennzeichnet. Die essentielle Hypertonie (HTN) und der damit assoziierte kardiale Organschaden sind durch eine pro-inflammatorische Auslenkung der T-Zell-Homöostase charakterisiert. Experimentelle Strategien, welche die Funktion von T_{REG} verbessern, vermindern bekanntermaßen den durch die HTN verursachten Endorganschaden. Die zugrundeliegende Hypothese ist somit, dass die SCFA C3 den hypertensiven kardialen Schaden positiv beeinflussen kann.

Methodik: Zur Induktion der HTN in 12 Wochen alten männlichen NMRI Mäusen erfolgte die Implantation einer subkutanen osmotischen Minipumpe, die über 14 Tage 1,44mg/kg/d Angiotensin (Ang) II freisetzt. Um die intestinale bakterielle Produktion von SCFA zu supprimieren, erhielten die Mäuse ein faserarmes Futter. Um die Effekte von C3 spezifisch zu untersuchen, wurden die Tiere entweder mit Natriumpropionat oder Natriumchlorid als Kontrolle im Trinkwasser behandelt. Die Inflammation wurde mittels Durchflusszytometrie, die kardiale Schädigung, mittels Echokardiographie, Immunfluoreszenz, Genexpressionsanalyse und *in vivo* elektrophysiologischer Untersuchung quantifiziert. Eine Blutdruckmessung erfolgte kontinuierlich mittels Telemetrie. T_{REG} wurden durch anti-CD25 Antikörper (PC61) in mit Ang II infundierten C3-behandelten Mäusen depletiert, um den Wirkmechanismus von C3 aufzuklären.

Ergebnisse: Die Behandlung mit C3 führte zu einem signifikant verbesserten Überleben nach 14 Tagen. C3 reduzierte sowohl die systemische inflammatorische Antwort auf Ang II, als auch die kardiale Hypertrophie und Fibrose. Begleitend kam es zu einer Reduktion der ins kardiale Gewebe infiltrierenden T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen und Makrophagen. Die Behandlung mit C3 bewirkte zudem einen reduzierten Anteil an Typ17-T-Helferzellen (T_H17) in Herz und Milz. Dies führte zu einer reduzierten Anfälligkeit für ventrikuläre Tachyarrhythmien in C3-behandelten Mäusen. Die Verbesserung des kardialen Schadens und der Inflammation waren in T_{REG}-depletierten Mäusen abgeschwächt. C3 führte außerdem unabhängig von der Wirkung auf T_{REG} zu einer verzögert eintretenden, moderaten Reduktion des Blutdruckes.

Schlussfolgerung: Die Daten unterstreichen die Bedeutung von aus unverdaulichen Polysacchariden gewonnenen bakteriellen Metaboliten für die kardiale Gesundheit. Die Wirkung dieser Metabolite auf T_{REG} spielt beim kardioprotektiven Effekt von C3 eine zentrale Rolle. Die orale Gabe von C3 sowie die Förderung der intestinalen Produktion von C3 könnten eine vielversprechende Option in der Behandlung der hypertensiven Herzkrankheit darstellen.

Abstract

Background: Gut microbiota release a plethora of metabolites into the host and thereby affect the host physiology. Short-chain fatty acids (SCFA) such as propionate (C3) are metabolites produced from otherwise indigestible polysaccharides (so-called fiber) by bacterial fermentation in the intestine. C3 has been shown to influence immune cells, especially anti-inflammatory regulatory T cells (T_{REG}). Essential hypertension (HTN) is characterized by a pro-inflammatory T cell response which promotes the damage to important organs such as the heart. Experimental approaches promoting T_{REG} function have been shown to ameliorate hypertensive end-organ damage. We hypothesized that the SCFA C3 attenuates hypertensive cardiac damage.

Methods: To induce hypertension in 12-week-old male NMRI mice, Angiotensin (Ang) II (1,44mg/kg/d) was infused subcutaneously for 14 days using osmotic minipumps. Mice were fed a fiber-depleted diet to suppress intestinal bacterial SCFA production. To specifically examine the effect of C3, mice were either administered sodium propionate or sodium chloride as control in drinking water. The inflammatory response was analyzed by flow cytometry. Cardiac organ damage was assessed using echocardiography, *in vivo* electrophysiology, and immunofluorescence. Blood pressure was measured by radiotelemetry. To assess the mode of action of C3, T_{REG} were depleted in Ang II-infused C3-treated mice using an anti-CD25 antibody (PC61).

Results: C3 treatment significantly improved survival along with a reduced inflammatory response to Ang II and ameliorated cardiac hypertrophy and fibrosis. Fewer T helper cells, cytotoxic T cells and macrophages infiltrated the hearts of C3-treated mice. C3 reduced the amount of T-helper type 17 (T_H17) cells in hearts and spleens. This led to a reduced susceptibility to cardiac ventricular tachyarrhythmias. Improvement of cardiac damage and inflammation by C3 was abrogated in T_{REG} -depleted mice. C3 had a moderate blood pressure-lowering effect confined to the second week of Ang II infusion, which was preserved in T_{REG} -depleted mice.

Conclusion: Our data highlight the importance of fiber-derived gut bacterial metabolites for cardiac health. T_{REG} are central to the cardioprotective effect of C3 in hypertension. Treatment with C3 and/or augmentation of intestinal C3 production may prove of benefit in the treatment of hypertensive heart disease.

1. Darstellung des Forschungsstands

Experimentelle und auch klinische Studien deuten darauf hin, dass die essentielle arterielle Hypertonie (HTN) und assoziierte Organschäden pathophysiologische Charakteristika mit inflammatorischen Erkrankungen teilen^{1, 2}. Folglich führt eine immunsuppressive Behandlung mit Dexamethason oder Mycophenolat-Mofetil (MMF) von Ratten mit einer Angiotensin (Ang) II-induzierten HTN zu reduzierter renaler Schädigung³. Dexamethason zeigt dabei keinen, MMF nur einen geringen Einfluss auf die Höhe des Blutdrucks³. In dem gleichen Modell führt auch die Inhibition des pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktors *nuclear factor, kappa-light-chain-enhancer* of activated B cells (NFκB) dazu, dass die HTN-bedingten Schäden an Niere und Herz reduziert werden⁴. Diese immunsuppressiven Ansätze belegten erstmalig das Potenzial anti-inflammatorischer Therapien auf die HTN und die daraus folgende Organschädigung. Allerdings birgt eine langfristige, breite Immunsuppression das Risiko schwerer Nebenwirkungen. Die spezifische Beeinflussung von involvierten Immunzelltypen ist jedoch eine vielversprechende therapeutische Option. Die Frage, welche Immunzelltypen beteiligt sind, wurde durch Versuche in *Recombination activating gene 1* (RAG-1) Knockout-Mäusen weiter aufgeklärt⁵. In diesem Mausmodell, das keine T- und B-Zellen besitzt, sind Ang II-induzierte HTN und vaskuläre Schädigung verringert⁵. Der Transfer von T-Zellen – im Gegensatz zu B-Zellen – führt zur Wiederherstellung der schädigenden Wirkung von Ang II⁵.

T-Zellen sind Teil des adaptiven Immunsystems⁶. Die größte Population innerhalb der T-Zellen wird von den CD4⁺ T-Helferzellen gebildet⁷. T-Helferzellen können in verschiedenen Differenzierungen auftreten^{8, 9}. Unter dem Einfluss eines bestimmten Zytokinmilieus differenzieren naive T-Helferzellen (T_N) in Effektor-T-Helferzellen^{8, 9}. Diese werden je nach Profil der sezernierten Zytokine und exprimierten Transkriptionsfaktoren unterschiedlich bezeichnet⁸⁻¹⁰. Typ17-T-Helferzellen (T_H17) sind definiert durch die Produktion von Interleukin (IL)-17A und durch die Expression des Transkriptionsfaktors *RAR-related orphan receptor* (ROR)γ^{11, 12}. Neben ihrer physiologischen Rolle in der Abwehr von Bakterien und Pilzen spielen T_H17 Zellen eine zentrale Rolle in verschiedenen Autoimmunerkrankungen¹¹. IL-17A Knockout-Mäuse fallen durch niedrigeren Blutdruck, reduzierte vaskuläre Dysfunktion, eine geringere Entzündung der Aorta sowie eine reduzierte Schädigung der Niere nach Infusion von Ang II auf^{13, 14}. Typ1-T-Helferzellen (T_H1) sind ein weiterer Subtyp der T-Helferzellen, der auch an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen beteiligt ist¹⁵. T_H1 Zellen exprimieren den Transkriptionsfaktoren *T-box transcription factor* (T-bet) und sezernieren unter anderem Interferon (IFN)-γ⁸. Interessanterweise zeigen auch Mäuse, in denen die Antwort auf T_H1 Zytokine eingeschränkt ist (IFN-γ-Rezeptor Knockout-Mäuse), eine reduzierte kardiale Schädigung nach Infusion mit Ang II¹⁶.

Nach initialer klonaler Expansion der oben genannten Effektor-Zelltypen kommt es unter physiologischen Bedingungen zur Apoptose eines Großteils der Zellen¹⁷. Die verbleibenden differenzierten T-Helferzellen bilden einen Gedächtnis-Phänotyp aus^{17, 18}. Ein Teil der Zellen mit

Gedächtnisphänotyp sind die sogenannten Effektor-Gedächtnis-T-Helferzellen (T_{EM}), die bei erneutem Antigenkontakt sofort Effektor-Funktionen wahrnehmen können¹⁸. Interessanterweise zeigt sich unter rezidivierender Stimulation mit Ang II oder anderen hypertensiven Stimuli (z.B. erhöhte Salzaufnahme) eine Zunahme der T_{EM} in der Niere und im Knochenmark¹⁹. Auch führt die Infusion einer niedrigen Dosis Ang II nach vorangegangener Infusion mit einer hohen Dosis Ang II zu einem stärkeren Blutdruckanstieg als bei alleiniger Gabe der niedrigen Dosis, trotz normotensiven Werten in der Phase zwischen den beiden Behandlungen¹⁹. T_{EM} bilden in hypertensiven Mausmodellen, die wiederholt hypertensiven Substanzen (Ang II oder Salz) ausgesetzt waren, die Hauptquelle von IL-17A und IFN- γ ¹⁹. CD70 spielt eine wichtige Rolle in der Generierung dieser Gedächtnis-T-Zellen²⁰. Folglich führt ein CD70 Knockout zu einer Reduktion der Inflammation und des Blutdrucks nach repetitiven hypertensiven Stimuli¹⁹. T_{EM} zeigen auch im Menschen eine Assoziation mit Folgeerkrankungen der HTN wie Atherosklerose, stabiler Angina pectoris, und dem akuten Myokardinfarkt²¹.

Die geschilderten adaptiven Immunprozesse führen zu der Frage nach einem spezifischen Antigen für T-Helferzellen in der HTN, die bisher noch unzureichend beantwortet werden kann. Durch oxidativen Stress entstehende Proteinaddukte, sogenannte γ -Ketoaldehyde (Isoketale), kommen als Neoantigene in Frage und werden durch dendritische Zellen präsentiert²². Isoketale lösen in verschiedenen murinen Modellen für Bluthochdruck eine adaptive Immunantwort mit Blutdruckanstieg und Schädigung der Vaskulatur aus²². Ein weiteres Protein, das in den Fokus der Suche nach potentiellen Antigenen gerückt ist, ist *heat shock protein 70* (HSP70)²³. HSP70 löst im Rahmen eines Salz-sensitiven HTN im Mausmodell eine klonale T-Helferzelleexpansion aus²³. Durch die Induktion einer Immuntoleranz gegenüber HSP70 können HTN und renale Schädigung verhindert werden²³. Isoketal-modifizierte Proteine oder HSP70 könnten somit potenzielle Antigene der HTN darstellen.

Für die Kontrolle von Inflammation und Autoreaktivität existieren spezialisierte anti-inflammatorische T-Zellen, die Regulatorischen T-Zellen (T_{REG})²⁴. T_{REG} können andere durch ihre Zytokinproduktion und Zell-Zell-Interaktion T-Zellpopulationen supprimieren²⁴. Sie sind charakterisiert durch die Expression des Transkriptionsfaktors *forkhead box P3* (Foxp3) und des Oberflächenmarkers CD25, sowie der Produktion von IL-10²⁴. Eine erhöhte Anzahl an T_{REG} wird zum Beispiel im Rahmen von Autoimmunerkrankungen in entzündeten Geweben gefunden²⁵. Auch nach ischämischer Gewebsschädigungen des Herzens kommt es zu vermehrter Infiltration des Gewebes durch T_{REG} ²⁶. Ein adoptiver Transfer von T_{REG} führt zu einer reduzierten kardialen Schädigung in Ang II-infundierten NMRI Mäusen – ohne dabei den Blutdruck zu beeinflussen²⁷. Diese Verbesserung des kardialen Phänotyps wird begleitet von einer Reduktion der T_{EM} ²⁷. In einem anderen Mausstamm, in C57BL/6 Mäusen, beeinflusst ein adoptiver Transfer von T_{REG} hingegen auch den Blutdruck²⁸. Interessanterweise führt ein adoptiver Transfer von T_{REG} neben der Reduktion pro-inflammatorischer Zytokine auch zu einer Normalisierung der IL-10 Serumspiegel im Vergleich zu unbehandelten Ang II-infundierten

Mäusen²⁸. T_{REG} sind somit ein endogener Mechanismus zur Kontrolle der Inflammation im Rahmen einer HTN und bieten sich als mögliches therapeutisches Ziel für die Behandlung der HTN an.

HTN ist einer der wichtigsten Risikofaktoren für kardiovaskuläre Mortalität weltweit²⁹. In Deutschland lag 2014 bei ca. 30% der Menschen eine HTN vor; nur 57,5% der betroffenen Frauen bzw. 45,5% der Männer waren mittels antihypertensiver Pharmakotherapie suffizient eingestellt³⁰. Zwischen HTN und diversen kardiovaskulären Erkrankungen bestehen starke Assoziationen³¹. Insbesondere die linksventrikuläre Hypertrophie als Folge der HTN ist assoziiert mit einem erhöhten Auftreten von dekompensierter Herzinsuffizienz, Myokardinfarkten und Schlaganfällen³². Die aktuellen Zahlen belegen den Bedarf für neuartige therapeutische Ansätze in der Behandlung der HTN. Die Inflammation im Rahmen der HTN wird mit bisheriger Pharmakotherapie nur unzureichend adressiert und bietet sich somit als innovatives Ziel in der HTN Behandlung an³³.

Die Darmmikrobiota haben einen zentralen Einfluss auf das Immunsystem³⁴. Der größte Anteil des lymphatischen Gewebes im Körper ist an den Darm assoziiert³⁵. Der Begriff Darmmikrobiota bezeichnet die Gesamtheit der Mikroorganismen, die symbiotisch mit Wirt in dessen Gastrointestinaltrakt existieren³⁶. Den Großteil dieser Mikroorganismen bilden Bakterien³⁶. Aktuelle Schätzungen für den Menschen gehen davon aus, dass es allein im Darm die gleiche Anzahl an bakteriellen Zellen wie an humanen Körperzellen gibt³⁷. Es existieren jedoch fast 150-mal mehr bakterielle Gene im Darmmikrobiom als menschliche Gene³⁸. In Studien zu HTN oder Folgeerkrankungen wie Atherosklerose konnte eine veränderte Zusammensetzung der Darmbakterien nachgewiesen werden³⁹⁻⁴². Die funktionellen Konsequenzen einer veränderten Zusammensetzung sind jedoch oft unklar. Aus diesen Informationen ergibt sich die wichtige Frage, wie die Interaktion zwischen der Vielzahl der bakteriellen Organismen und dem Wirt aussehen könnte.

Ein Ansatz, der vor kurzem von unserer Arbeitsgruppe in *Nature* publiziert wurde, war die Untersuchung des Einflusses einer salzreichen Diät (engl. *high-salt diet*, HSD) auf das Darmmikrobiom⁴³. Die erhöhte Aufnahme von Kochsalz (Natriumchlorid, NaCl) mit der Nahrung ist ein epidemiologisch identifizierter Risikofaktor für die HTN und deren Folgeerkrankungen⁴⁴. Diverse Leitlinien empfehlen deshalb die Restriktion der Salzzufuhr für hypertensive Patienten^{33,45}. Wir konnten erstmalig zeigen, dass eine salzreiche Ernährung von Mäusen zu Änderungen in der Zusammensetzung des Darmmikrobioms führt⁴³. Eine durch Methoden des maschinellen Lernens als wichtig identifizierte Veränderung war der Verlust des Vorkommens von *Lactobacillus murinus* durch die HSD⁴³. Dies ging einher mit einem Anstieg des Blutdrucks und einer Zunahme von proinflammatorischen T_H17 Zellen im Darm und in der Milz - ein Effekt, der bereits zuvor beschrieben wurde^{43,46,47}. Eine tägliche probiotische Gabe von *L. murinus* konnte den durch die HSD induzierten Anstieg des Blutdrucks vermindern sowie den Anstieg von T_H17 Zellen verhindern⁴³. Dieser Zusammenhang von Salz, *L. murinus* und T_H17-Zellen ist nicht nur für die Blutdruckregulation relevant. Auch die durch eine HSD aggravierten neurologischen Einschränkungen in einem Mausmodell der Multiplen Sklerose, der experimentellen

autoimmunen Encephalomyelitis (EAE), konnten durch *L. murinus* Behandlung vermindert werden⁴³. Als möglicher Mechanismus für den Einfluss von *L. murinus* auf T_H17 Zellen konnte die Produktion von bakteriellen Tryptophan-Metaboliten (Indole) durch *L. murinus* identifiziert werden⁴³. Durch Bindung an den Arylhydrocarbonrezeptor können Indole Einfluss auf die Differenzierung von T-Zellen nehmen⁴⁸. In einer Pilotstudie an gesunden Männern zeigte sich ein gering Blutdruckanstieg, ein Anstieg der T_H17 im Blut und ein Verlust von *Lactobacillus* Spezies im Darmmikrobiom bei Einnahme von 6g/d NaCl zusätzlich zur normalen Ernährung⁴³. Zusammengefasst zeigen diese Daten erstmals, dass Veränderungen des Mikrobioms in Folge salzreicher Ernährung mit pro-inflammatorischen T_H17-Zellen, Bluthochdruck sowie Neuroinflammation vergesellschaftet sind.

Ein anderer Ansatz zur Untersuchung der Mikrobiom-Wirt-Interaktion in der HTN, der im vorliegenden Projekt verfolgt wurde, ist die Behandlung mit bestimmten bakteriellen Metaboliten, um das Immunsystem und damit den Krankheitsverlauf der HTN positiv zu beeinflussen. Kurzkettige Fettsäuren (engl. *short-chain fatty acids*, SCFA) sind bakterielle Metabolite, die durch Fermentation von unverdaulichen Polysacchariden (sogenannten Ballaststoffen) im Darm entstehen und in messbarer Konzentration im peripheren Blut zirkulieren^{49, 50}. Die Einnahme einer faserreichen Diät (reich an unverdaulichen Polysacchariden) ist in epidemiologischen Studien ein protektiver Faktor für kardiovaskuläre Erkrankungen⁵¹. SCFA beeinflussen unter anderem das Immunsystem des Wirts, insbesondere T-Zellen, dendritische Zellen und neutrophile Granulozyten^{50, 52-54}. Vor allem die SCFA Propionat (C3) kann sowohl *in vitro* als auch bei oraler Gabe *in vivo* zur vermehrten Differenzierung von T_{REG} beitragen⁵⁵⁻⁵⁸. T_{REG} von mit C3 behandelten Mäusen zeigen eine erhöhte suppressive Kapazität, wie sowohl mittels *in vitro* Suppression Assay, als auch durch *in vivo* adoptiven Transfer in unbehandelte Mäuse gezeigt werden konnte^{56, 58}. Auf der anderen Seite beeinflusst C3 aber auch die Differenzierung von Effektor-T-Helferzellen⁵⁷. C3 vermehrt die *in vitro* Differenzierung von murinen naiven T-Helferzellen zu T_H17-Zellen, wobei jedoch gleichzeitig wird ein regulatorischer (IL-10 produzierender) T_H17-Phänotyp induziert wird⁵⁷. Eine Behandlung mit C3 und anderen SCFA erzielt in verschiedenen Erkrankungsmodellen der EAE⁵⁶, der akuten Nierenschädigung⁵⁹, der allergischen Atemwegsschädigung⁶⁰ und der chronisch entzündlichen Darmerkrankung⁵⁴ einen therapeutischen Effekt.

Neben der Wirkung auf das Immunsystem konnte bereits gezeigt werden, dass C3 auch Einfluss auf die Freisetzung von Renin in der Niere und auf die Vasomotorik hat^{61, 62}. Der genaue Wirkmechanismus von SCFA ist aktuell noch umstritten. Zum einen konnte für SCFA ein Einfluss auf epigenetische Regulationsmechanismen über die dosisabhängige Inhibition von Histon-Deacetylasen (HDAC) gezeigt werden⁶³. Andere Studien legen eine Bindung an verschiedene G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPR) nahe. Hierbei scheinen besonders GPR41 (auch *free fatty acid receptor* (FFA)2 genannt) und GPR43 (FFA3) relevant⁵⁰. Im Rahmen der Wirkung auf die Freisetzung von Renin in der Niere wurde zudem eine Affinität zum olfaktorischen Rezeptor (Olfr)78 in der Niere gezeigt⁶².

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit ist, dass C3 über die Wirkung auf T_{REG} die durch Ang II gestörte Immunhomöostase positiv beeinflusst und dass in Folge dessen die hypertensive kardiale Schädigung reduziert ist. Um diese Hypothese zu testen, behandelten wir Ang II-infundierte NMRI Mäuse mit C3 im Trinkwasser und analysierten Inflammation und kardiales Remodeling.

2. Methoden

2.1. Tierversuch

Die Experimente wurden unter Einhaltung der deutschen und europäischen Tierschutzgesetze durchgeführt. Alle Experimente wurden durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt (G0280/13). Die Mäuse wurden bei konstantem 12:12 Stunden Tag:Nacht-Zyklus gehalten und hatten jederzeit freien Zugang zu Nahrung und Wasser.

Die Experimente wurden an männlichen NMRI Mäusen durchgeführt. NMRI bezeichnet einen Auszuchtstamm. Die verwendeten Mäuse waren genetisch nicht verändert (Wild-Typ) und wurden von Janvier Labs bezogen. Die experimentelle Hypertonie wurde in 12 Wochen alten Mäusen durch die subkutane Implantation einer osmotischen Minipumpe (Alzet Osmotic Pumps, Durect Corporation, Cupertino, CA, USA, vertrieben durch Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) befüllt mit Angiotensin (Ang) II (Calbiochem, Teil von Merck, Darmstadt, Deutschland) und einer Infusionsrate von 1,44 mg/kg/d hervorgerufen. Die Implantation erfolgte in inhalativer Narkose mit Isofluran (CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland). Um die endogene intestinale Produktion von SCFA zu supprimieren, erhielten die Mäuse eine gereinigte faserarme Diät (S0087-E050, Ssniff, Soest, Deutschland), beginnend zwei Wochen vor Implantation der Minipumpe. Zur Untersuchung der Effekte von C3 erhielt eine Gruppe zusätzlich Natrium-Propionat (NaC3, 200mM, Sigma-Aldrich, Taufenkirchen, Deutschland, Tochtergesellschaft von Merck, Darmstadt, Germany) im Trinkwasser (Leitungswasser). Die Kontrolltiere erhielten Natriumchlorid (NaCl, 200mM, Sigma-Aldrich) im Trinkwasser. Zwei Wochen nach Implantation der Minipumpe wurden die Mäuse in Narkose getötet, um die Inflammation und kardiale Schädigung zu analysieren. Eine Sham-Gruppe wurde zur Kontrolle des Ang II Effekts nur mit NaCl infundiert. Der Versuchsablauf ist schematisch in Abbildung 1 gezeigt.

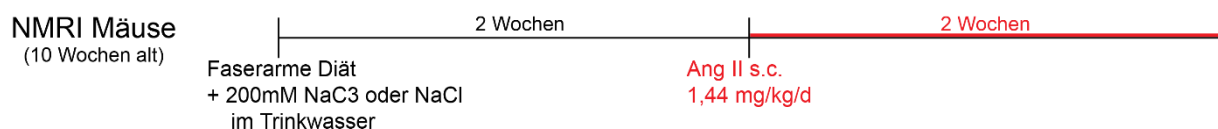


Abbildung 1 Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. 10 Wochen alte NMRI Mäuse wurden mit faserarmer Diät und 200mM Natrium-Propionat (NaC3) oder Natriumchlorid (NaCl) im Trinkwasser zwei Wochen vor und nach s.c. Implantation einer Angiotensin (Ang) II freisetzenden Minipumpe behandelt. Nach zwei Wochen wurden die Mäuse getötet, um Inflammation und kardialen Schaden zu analysieren.

In einer Subgruppe der Tiere wurde eine kontinuierliche Blutdruckmessung mittels implantierbarer radiotelemetrischer Messgeräte (Data Science International (DSI), St. Paul, MN, USA) durchgeführt.

Hierzu wurde in Isoflurannarkose und unter Analgesie der Katheter des Telemetriesender über die linke *Arteria carotis* bis in den Aortenbogen vorgeschoben. Der Sender wurde subkutan über dem Abdomen implantiert. Die Messung ermöglicht die Aufzeichnung von Blutdruck, Herzfrequenz und Aktivitätsdaten alle 5min über den Verlauf des gesamten Experiments. Die Implantation der Telemetriesender erfolgte vor Beginn der faserarmen Diät.

Zur Aufklärung des Mechanismus wurde in einer weiteren Subgruppe der Mäuse die T_{REG} depletiert. Hierfür wählten wir die Depletion mittels anti-CD25-Antikörper (PC61, bereitgestellt durch Th. Hünig, Universität Würzburg)^{26, 64-69}. Den Mäusen wurden einen Tag vor, sowie jeweils zwei und fünf Tage nach Implantation der Minipumpe jeweils 250µg PC61 oder IgG1 Isotyp Kontrolle (InVivoPlus Rat IgG1, Bio X Cell, West Lebanon, NH, USA, vertrieben durch Hölzel Diagnostika, Köln, Deutschland) intraperitoneal (i.p.) injiziert (Abbildung 2). Alle Mäuse in dieser Versuchsreihe erhielten eine faserarme Diät, C3 im Trinkwasser und eine radiotelemetrische Blutdruckmessung.

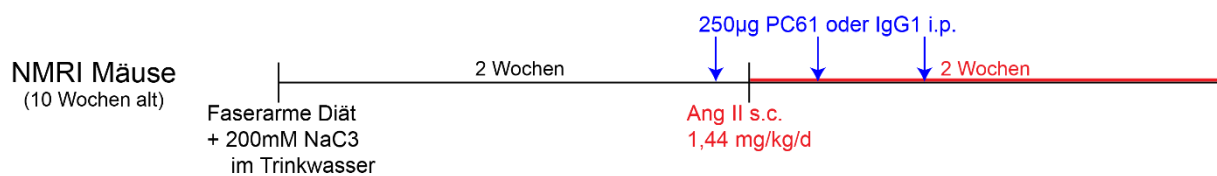


Abbildung 2 Schematische Darstellung des Versuchsablaufs für die T_{REG}-Depletion. Alle Tiere erhielten faserarmes Futter, 200mM Propionat (NaC3) im Trinkwasser und eine Angiotensin (Ang) II freisetzende Minipumpe. Die Depletion der T_{REG} erfolgte durch dreimalige (Tag -1, Tag 2 und Tag 5 vor bzw. nach Implantation der Minipumpe) Injektion von anti-CD25-Antikörpern (PC61). Als Kontrolle ohne T_{REG}-Depletion dienten IgG1 behandelte Tiere.

Die Randomisierung in die unterschiedlichen Behandlungsgruppen der Versuchsreihen erfolgte nach Stratifizierung für das Körpergewicht. Die Mäuse wurden in Käfigen zu je zwei bis drei Tieren gehalten. Eine Ausnahme bestand bei den Tieren für die Radiotelemetrie, die aus technischen Gründen einzeln gehalten werden mussten. Die Haltung erfolgte im Tierhaus des Max-Delbrück-Centrums für molekulare Medizin. Alle an der Analyse beteiligten Personen waren bezüglich der Gruppenzugehörigkeit verblindet. Bei technischem Versagen bei der Messung oder nach positiver statistischer Testung für Ausreißer (beschrieben unter 2.6. Statistische Analyse) wurden entsprechende Messungen von der Auswertung ausgeschlossen.

An Tag 13 des Experiments erfolgte eine Echokardiographie (Ausführung durch die *Animal Phenotyping Platform* des Max-Delbrück Centruns). Die Untersuchung erfolgte wie bei Markó *et al.* 2014⁷⁰ beschrieben. Die Mäuse wurden in Isoflurannarkose mit einem VisualSonics Vevo 2100 System und einem 30 MHz-Schallkopf (MS-400, VisualSonics, Toront, ON, Canada) untersucht. Die linksventrikuläre Hypertrophie wurde in M-Modus Bildern der parasternalen kurzen Achse analysiert.

Die Tötung der Tiere erfolgte zwei Wochen nach Implantation der Ang II Minipumpe. Die Euthanasie erfolgte durch inhalative Narkose mit Isofluran. Nach Punktion des rechten Ventrikels zur Blutentnahme wurde das Herz entnommen. Die Herzspitze wurde sofort in flüssigem Stickstoff für spätere RNA-

Analysen gefroren. Vom verbleibenden Herzen wurden die Atria entfernt und das ventrikuläre Gewebe wurde in -40°C kalten Isopentan (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gefroren und anschließend bei -80°C für spätere Histologie gelagert. Die Milz wurde entfernt und für folgende durchflusszytometrische Analysen in 4°C kalten FACS-Puffer (GGG), bestehend aus *Phosphate Buffered Saline* (PBS, Sigma-Aldrich) mit 0,5% Bovinem Serum Albumin (BSA, Sigma-Aldrich) und 2mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA, Carl Roth) überführt. Aus dem abgenommenen Blut wurde Serum gewonnen. Hierfür wurde das Blut nach 1h bei Raumtemperatur für 20min bei 420g zentrifugiert. Das entstandene Serum wurde sofort bei -80°C gefroren und für spätere Analysen gelagert.

Bei einer Subgruppe der Tiere erfolgte eine kardiale elektrophysiologische Untersuchung (EPU) *in vivo* in Isoflurannarkose an Tag 14. Dazu wurde die rechte *Vena jugularis interna* freipräpariert und ein 2F oktapolarer Stimulationskatheter (*CIBer Mouse*, NuMed, Hopkinton, NY, USA) in den rechten Ventrikel vorgeschoben und fixiert. Durch programmierte elektrische Stimulationen (*EP Tracer electrophysiology lab*, Schwarzer CardioTek, Heilbronn, Deutschland) des rechtsventrikulären Myokards wurde die Suszeptibilität für ventrikuläre Arrhythmien getestet. Diese Tiere wurden von den histologischen und durchflusszytometrischen Analysen ausgeschlossen. Die Untersuchung erfolgte wie bei Markó *et al.* 2014⁷⁰ beschrieben. Die elektrophysiologische Untersuchung wurde von Dr. N. Wilck durchgeführt.

2.2. Durchflusszytometrie

Bei einem Teil der Tiere, die für die durchflusszytometrische Immunzellanalyse im Herzen vorgesehen waren, erfolgte nach erfolgter Tötung in Isoflurannarkose die Entfernung von in Koronarien und Herzhöhlen verbliebenen Blutes durch entsprechende Spülung. Die Milz wurde entnommen und bis zur späteren Analyse in 4°C kalten GGG gelagert. Danach erfolgte die Eröffnung des Thorax und die Blutentnahme. Der rechte Vorhof wurde angeschnitten und das linke Herz wurde mittels Flügelkanüle punktiert und über ein Infusionssystem aus ca. 1,5m Höhe ($\approx 110\text{mmHg}$) mit 100 Tropfen/min ($\approx 5\text{ml}/\text{min}$) mit physiologischer Kochsalzlösung perfundiert. Die Perfusion erfolgte für ca. 7min; danach waren die Organe blutleer und entfärbt. Anschließend wurden die Atria entfernt, sodass nur ventrikuläres Gewebe für die Analyse verwendet wurde.

Zur Messung der in das kardiale Gewebe infiltrierten Immunzellen wurden die perfundierten Herzen nach einem Protokoll von Miltenyi Biotech GmbH weiter aufgearbeitet. Die Herzen wurden mit einem Skalpell grob zerkleinert und in *C-tubes* (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland) mit 5ml *Hanks' Balanced Salt solution* (HBSS) mit Ca^{2+} und Mg^{2+} (Sigma-Aldrich) mit 600U/ml Kollagenase II (Worthington, Lakewood, NJ, USA) und 60U/ml DNase I (Sigma-Aldrich) überführt. Zunächst erfolgte die weitere mechanische Zerkleinerung durch einen *gentleMACS Dissociator* (Programm *m_heart_01*, Miltenyi) und nachfolgende 30min Inkubation bei 37°C . Während der Inkubation wurden die Proben alle 5min geschüttelt. Anschließend erfolgte ein zweiter mechanischer Aufschluss (Programm *m_heart_02*). Die entstandenen Zellsuspensionen wurden mit GGG gewaschen und über $70\mu\text{m}$ (Greiner

Bio-One, Kremsmünster, Österreich) und 30µm Zellsiebe (Miltenyi) gefiltert, um Einzelzellsuspensionen zu erhalten.

Die entnommenen Milzen wurden direkt für die Durchflusszytometrie aufgearbeitet. Die Milzen wurden durch 70µm Zellsiebe (Greiner Bio-One) gepresst. Das Sieb wurde mit 20ml 4°C kaltem PBS mit 2mM EDTA gespült. Die gewonnene Zellsuspension wurde mit 300g für 6min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Zur Lysierung der Erythrozyten wurden die Zellen in 1ml 37°C warmer Erythrozyten-Lyse (Reinstwasser mit 0,155M NH₄Cl und 10mM NaHCO₃ und 1mM EDTA, alles Sigma-Aldrich) resuspendiert und für 3min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 20ml PBS mit 2mM EDTA gewaschen, durch ein 40µm Zellsieb (Greiner) gefiltert und nach Färbung mit Trypanblau in einer Neubauer-Kammer unter dem Mikroskop gezählt.

Für die durchflusszytometrische Analyse der Zytokinproduktion in Splenozyten wurden die Zellen für 4h mit 50ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA, Sigma-Aldrich) und 750ng/ml Ionomycin (Sigma-Aldrich) in *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640) Medium (Gibco, Teil von Thermo Fisher, Darmstadt, Germany) mit 10% fetalem Kälberserum (FBS, Merck), 100U/ml Penicillin (Sigma-Aldrich) und 100U/ml Streptomycin (Sigma-Aldrich) bei 37°C und 5% CO₂ restimuliert. Anschließend folgte die Inkubation mit zusätzlich 0,75µl/ml BD GolgiStop (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) für 1h. Für durchflusszytometrische Analysen von nicht-restimulierten Zellen erfolgte die direkte Färbung mittels monoklonaler Antikörper.

Tabelle 1 Übersicht der für die durchflusszytometrischen Analysen eingesetzten Antikörper.

Antigen	Klon	Konjugat	Hersteller	Konzentration
CD3ε	17A2	VioBlue	Miltenyi	1:20
CD3ε	17A2	eFluor 660	eBioscience	1:100
CD4	GK1.5	APC Vio770	Miltenyi	1:20
CD4	GK1.5	FITC	BD Pharmingen*	1:100
CD8a	53-6.7	PerCP Cy5.5	eBioscience	1:100
CD25	7D4	VioBright FITC	Miltenyi	1:20
CD44	IM7	FITC	BD Pharmingen	1:100
CD62L	MEL-14	APC	BD Pharmingen	1:100
F4/80	BM8	Pacific Blue	BioLegend**	1:100
Foxp3	FJK-16s	PerCP Cy5.5	eBioscience	1:50
IFN-γ	XMG1.2	PE Cy7	eBioscience	1:50
IL-10	JES5-16E3	Pacific Blue	BioLegend	1:50
IL-17A	eBio17B7	APC	eBioscience	1:50
RORγt	REA278	APC	Miltenyi	1:10
Tbet	REA102	PE	Miltenyi	1:10

*BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland; **San Diego, CA, USA

Zum Ausschluss toter Zellen bei der Durchflusszytometrie erfolgte eine Inkubation mit *Live/Dead Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit for 405 nm excitation* (1:1000 in GGG verdünnt, Thermo Fisher, Darmstadt, Germany) bei 4°C. Die anschließende Färbung von Oberflächenmarkern mit den in Tabelle 1 genannten Antikörpern erfolgte in GGG bei 4°C für 30min. Während der Oberflächenfärbung wurde die Zellen zusätzlich in *FcR blocking reagent* (Miltenyi) inkubiert. Für die Färbung intrazellulärer Marker erfolgte zunächst die Fixierung und Membranpermeabilisierung der Zellen mit dem *Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set* (eBioscience, Teil von Thermo Fisher, Darmstadt, Germany). Die intrazellulären Antigene wurden mit den in Tabelle 1 genannten Antikörper für 30min bei 4°C gefärbt. Für die Arbeit mit den fixierten Zellen wurde der Puffer aus dem oben genannten *Buffer Set* genutzt. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte an einem FACS Canto II (BD Bioscience) mit der BD FACSDiva Software (BD Bioscience). Die gespeicherten Datensätze wurden mit FlowJo v.X.0.7 (FlowJo LLC, TreeStar, Ashland, OR, USA, Teil von BD Bioscience) analysiert.

2.3. mRNA Expressionsanalyse

Zur Isolation der Boten-Ribonukleinsäure (engl. *messenger ribnucleic acid*, mRNA) aus ventrikulärem Gewebe wurden die Herzspitzen in speziellen Aufschluss-Reaktionsgefäßen (Peqlab, Erlangen, Deutschland) mit sechs Keramikkügelchen (Peqlab) überführt. Die Homogenisierung erfolgte in 700µl *Qiazol Lysis Reagent* (Qiagen, Hilden, Deutschland) in einem Precellys 24 Homogenisator (Peqlab). Anschließend erfolgte die Isolation der mRNA mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Protokoll des Herstellers.

Tabelle 2 Sequenzen der für die qPCR eingesetzten Primer und Sonden.

Gen	Richtung	Sequenz (5' - 3')
<i>I8s</i>	vorwärts	ACA TCC AAG GAA GGC AGC AG
	rückwärts	TTT TCG TCA CTA CCT CCC CG
	Sonde	FAM – CGC GCA AAT TAC CCA CTC CCG AC – TAMRA
<i>Ctgf</i>	vorwärts	CAA CCG CAA GAT CGG AGT GT
	rückwärts	CAC CGA CCC ACC GAA GAC
	Sonde	FAM – CAC TGC CAA AGA TGG TGC ACC CTG – TAMRA
<i>Il-10</i>	vorwärts	CAG CCG GGA AGA CAA TAA CTG
	rückwärts	CGC AGC TCT AGG AGC ATG TG
<i>Mhy7</i>	vorwärts	CAA TGC CAG GAT TGA GGA TGA
	rückwärts	CGT GCC TGA AGC TCC TTG AG
<i>Ngal</i>	vorwärts	TGA TCC CTG CCC CAT CTC T
	rückwärts	GGA ACT GAT CGC TCC GGA A
	Sonde	FAM – TCA CTG TCC CCC TGC AGC CAG A – TAMRA
<i>Nppb</i>	vorwärts	GAA AGT CTC CAG AGC AAT TCA
	rückwärts	GGG CCA TTT CCT CCG ACT T

Die Bestimmung der Konzentration und Qualität der isolierten mRNA erfolgte mit einem NanoDrop-1000 Spektrophotometer (Peqlab). Mithilfe des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) erfolgte die reverse Transkription von 2µg RNA in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl. *complementary deoxyribonucleic acid* cDNA) nach Protokoll des Herstellers. Mittels quantitativer *real-time* Polymerasekettenreaktion (qPCR; als TaqMan Assay mit DNA-Sonde oder *SYBR green* Assay) wurde die Expression der Zielgene bestimmt. Alle Primer- und Sondensequenzen sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die Quantifizierung erfolgte durch eine Standardkurve aus gepoolter cDNA und Normalisierung auf *18s* als sogenanntes *Housekeeping* Gen. Die qPCR wurde auf einem Applied Biosystems 7500 Sequence Detector (Applied Biosystems, Thermo Fisher, Darmstadt, Germany) durchgeführt. Alle Primer und Sonden wurden mithilfe von PrimerExpress 3.0 (Applied Biosystems) entworfen und durch BioTeZ (Berlin, Deutschland) synthetisiert.

2.4. Histologie

Vor der Aufarbeitung der Herzen für die histologische Untersuchung wurde das Gewebe über Nacht bei -20°C gelagert. Das Gewebe wurde am Kryomikrotom (CM 3050 S, Leica, Wetzlar, Deutschland) 5µm dünn geschnitten, auf Objektträger aufgebracht und in -20°C kaltem Aceton für 30min fixiert. Für die Einzelfärbungen (CD4, CD8a, Kollagen I, Fibronectin, FSP-1) wurden unspezifische Bindungen für 2h mit PBS mit 10% *normal donkey serum* (NDS, Jackson ImmunoResearch Cambridgeshire, Vereinigtes Königreich, vertrieben durch Dianova, Hamburg, Deutschland) blockiert. Die primären Antikörper wurden in PBS mit 10% NDS verdünnt (siehe Tab. 3) und über Nacht auf den Gewebeschnitten in einer feuchten Kammer (nasser Zellstoff in einer geschlossenen Kammer ca. 15×7×4cm) bei 4°C inkubiert. Die jeweiligen sekundären Antikörper wurden in PBS verdünnt (siehe Tabelle 3) und für 2h bei Raumtemperatur auf den Objektträgern inkubiert. Die Ko-Färbung von N-Cadherin und Connexin-43 wurde mit dem *M.O.M. immunodetection kit* (Vector Laboratories, Peterborough, Vereinigtes Königreich, vertrieben durch Biozol, Eching, Deutschland) durchgeführt. Unspezifische Bindungen wurden durch 1h Inkubation mit PBS mit 10% *normal goat serum* (NGS, Jackson ImmunoResearch), 0,3% Triton-X-100 (Sigma-Aldrich) und 0,2% BSA, gefolgt von 30min Inkubation mit *M.O.M. Mouse Ig Blocking Reagent* (Vector Laboratories) blockiert. Die primären Antikörper wurden in PBS mit 10% NGS, 0,3% Triton-X-100 und 0,2% BSA verdünnt und auf den Objektträgern über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Ein Biotin-konjugierter anti-Maus IgG Antikörper wurde in *M.O.M. diluent* (Vector Laboratories) verdünnt (siehe Tab. 3) und für 1h bei Raumtemperatur auf den Gewebeschnitten inkubiert. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper (siehe Tab. 3) und Streptavidin-konjugiertes Alexa 568 (1:100 Verdünnung, Thermo Fisher) in PBS verdünnt und auf den Objektträgern für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Alle Objektträger wurden mit *Vectashield mounting medium with DAPI* (Vector Laboratories) eingedeckelt. Alle Bilder wurden auf einem Zeiss Axio Imager M2 Mikroskop mit der AxioVision Software aufgenommen (Zeiss, Oberkochen, Deutschland).

Tabelle 3 Liste der primären und sekundären Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbungen.

Antigen	Klon	Konjugat	Hersteller	Konzentration
CD4	H129.19	keins	BD Pharmingen	1:75
CD8a	53-6.7	keins	BD Pharmingen	1:100
Connexin-43	polyklonal	keins	Cell Signaling Technology†	1:500
Kollagen I	polyklonal	keins	Southern Biotech††	1:100
Fibronektin	polyklonal	keins	Abcam†††	1:400
FSP-1	polyklonal	keins	Abcam	1:100
N-Cadherin	3B9	keins	In vitrogen††††	1:100
Ziege IgG	polyklonal	Cy3	Jackson ImmunoResearch	1:300
Maus IgG	polyklonal	Biotin	Vector Laboratories	1:500
Kaninchen IgG	polyklonal	Cy3	Jackson ImmunoResearch	1:400
Kaninchen IgG	polyklonal	Alexa 488	Thermo Fisher	1:1000
Ratte IgG	polyklonal	Cy3	Jackson ImmunoResearch	1:200

†Frankfurt am Main, Deutschland; ††Birmingham, AL, USA, vertrieben durch Biozol, †††Cambridge, Vereinigtes Königreich, ††††Teil von Thermo Fisher

Die Fibronektin Immunfluoreszenz diente der Analyse der interstitiellen kardialen Fibrose. Pro Herz wurden zehn repräsentative Fotos in 400-facher Vergrößerung (*high power fields*, HPF) aufgenommen, in denen die Kardiomyozyten quer angeschnitten waren. Die Cy3-positive Fläche wurde mittels ImageJ Software (*Open Source*) quantifiziert. Hierfür wurde für alle Bilder einzeln ein Schwellenwert für Cy3 Positivität gewählt, der für alle Bilder gemittelt wurde. Anhand des gemittelten Schwellenwertes wurde automatisiert die Cy3-positive Fläche berechnet. Nachfolgend wurde der Mittelwert der Cy3-positiven Fläche pro Herz berechnet. Die perivaskuläre Fibrose wurde anhand der Kollagen I Färbung bestimmt. Hierfür wurden alle größeren Gefäße (Durchmesser mindestens 25µm) eines Herzens (n=3-8 pro Herz) analysiert. Die Dicke der perivaskuläre Fibrose (Cy3-positiver Bereich) wurde an vier repräsentativen Stellen gemessen und auf die Dicke des Gefäßes (Intima und Media) an derselben Stelle normalisiert. Pro Herz wurde der Mittelwert aller Gefäße für dieses Maß gebildet. Die Färbung gegen *fibroblast-specific protein-1* (FSP-1) diente der Analyse der Fibroblastenzahl. Die Zahl Fibroblasten wurde durch den Mittelwert der FSP-1-positiven Zellen aus fünf repräsentativen HPF quantifiziert. Die Anzahl der T-Helferzellen und der zytotoxischen Zellen wurde mittels Immunfluoreszenz für CD4 und CD8a pro Schnitt eines kompletten Herzens ermittelt. Die Analyse der Kolokalisation von N-Cadherin und Connexin-43 erfolgte in ImageJ mithilfe des Plugins JACoP⁷¹. An fünf repräsentativen HPF des jeweiligen Herzens im Bereich von längs angeschnittenen Kardiomyozyten erfolgte die Analyse durch

Ermittlung des *colocalization coefficient*. Die Analyse erfolgte anhand von Schwellenwerten für die Positivität beider Signale, die wie oben beschrieben ermittelt wurden. Je Herz wurde der Mittelwert aus den Analysen der einzelnen HPF gebildet.

2.5. Gefäßfunktion

Um den Einfluss der C3-Behandlung auf die Gefäßfunktion zu analysieren, erfolgte die *ex vivo* Analyse der Gefäßfunktion von isolierten mesenterialen Arterien aus Ang II infundierten, C3 behandelten und unbehandelten NMRI Mäusen mittels Draht-Myographie (*Wire Myography*). Die Messung erfolgte auf einem *DMT Wire Myograph System* (DMT 610 M; Danish Myo Technology, Århus, Dänemark) durch Dr. D. Tsvetkov wie bereits beschrieben⁷². Dabei wurde die endothelabhängige Vasodilatation mit Acetylcholin Dosis-Wirkungs-Kurven überprüft.

In einem separaten experimentellen Ansatz wurde überprüft, ob C3 die Entstehung einer *ex vivo* induzierten endothelialen Dysfunktion verhindern kann. Die Induktion der endothelialen Dysfunktion erfolgte in isolierten Ringen der *Arteria mesenterica superior* von unbehandelten Wild-Typ C57BL/6J Mäusen. Die Ringe wurden für 24h in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Gibco) mit 1% FBS, 100U/ml Penicillin (Sigma-Aldrich) und 100U/ml Streptomycin (Sigma-Aldrich) inkubiert. Zum Auslösen der endothelialen Dysfunktion wurden zusätzlich 10nM murines IL-17A (Miltenyi) und 10nM Ang II (Calbiochem) dem Medium hinzugefügt. Um die Effekte von C3 näher zu untersuchen erfolgte die gleichzeitige Inkubation mit 1mM NaC3 (Sigma-Aldrich) oder 1mM NaCl (Sigma-Aldrich) als Kontrolle. Die Analyse der endothelabhängigen Vasodilatation erfolgte durch Dr. D. Tsvetkov wie oben beschrieben.

2.6. Statistik

Statistische Ausreißer wurden mittels Ausreißertest nach Grubbs identifiziert und von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Normalverteilung wurde mittels Kolmogorow-Smirnow-Test festgestellt. Um zwei Gruppen miteinander vergleichen zu können, wurde bei Normalverteilung ein einseitiger *t*-Test benutzt, bei nicht normalverteilten Daten wurde ein einseitiger Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet. Mehr als zwei Gruppen wurden mittels einfaktorier ANOVA und Tukeys Post-Hoc-Test bei Normalverteilung, und bei nicht normalverteilten Daten mit Kruskal-Wallis Test gefolgt von Dunns Post-Hoc-Test verglichen. Die für die erste und zweite Woche der Ang II-Infusion getrennt berechnete *area under the curve* (AUC) der Blutdruckkurven sowie die Daten zur Gefäßrelaxation wurden mittels zweifaktorieller ANOVA mit Messwiederholungen verglichen. Bei der Auswertung der AUC der Blutdrücke folgte ein Post-Hoc-Test nach Sidak. Die Überlebensanalyse wurde mittels Kaplan-Meier Kurven visualisiert und statistisch mit einem einseitigen Log-Rank-Test verglichen. Alle statistischen Analysen und Darstellungen wurden mit GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) durchgeführt.

Die statistische Analyse der Blutdruckkurven erfolgte anhand eines linearen gemischten Modells mit R (Version 3.1.1 R Foundation) und wurde vom Statistiker Dr. A. Krannich durchgeführt.

3. Ergebnisse

Die Gabe von C3 im Trinkwasser zeigte keinerlei Einfluss auf das Körpergewicht im Vergleich zu unbehandelten mit Ang II infundierten Mäusen. Im Serum der mit C3 behandelten Mäuse zeigten sich signifikant erhöhte Level an C3.

3.1. Systemische Inflammation

Die relevanten Immunzellpopulationen wurden in der Milz (als ein systemisch relevantes lymphatisches Organ) mittels Durchflusszytometrie analysiert. Nach Infusion mit Ang II war ein deutlicher pro-inflammatorischer Einfluss auf die Immunhomöostase der Mäuse zu erkennen. Insgesamt zeigte sich unter dem Einfluss von Ang II eine Verschiebung in T_N und T_{EM} der Milz. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme von T_{EM} und eine Reduktion von T_N . Die Behandlung mit C3 verhinderte die Verschiebung im Gleichgewicht von T_N und T_{EM} . Die Analyse der restimulierten Splenozyten zeigte einen signifikanten Anstieg sowohl der pro-inflammatorischen T_H17 Zellen als auch der anti-inflammatorischen T_{REG} unter der Wirkung von Ang II. Die Behandlung mit C3 sorgte für die Normalisierung beider Zellpopulationen auf das Niveau der Sham-Gruppe. Diese Ergebnisse konnten anhand der Färbungen von Transkriptionsfaktoren und Oberflächenmarkern ($ROR\gamma^+ T_H17$ und $Foxp3^+ CD25^+ T_{REG}$) in nicht-restimulierten Splenozyten bestätigt werden.

3.2. Lokale kardiale Entzündungsreaktion und kardiale Schädigung

Einer der auffälligsten Effekte der Ang II Infusion bei gleichzeitiger Ernährung mit faserarmem Futter war die unerwartet hohe Mortalität von etwas mehr als 20%. Diese war signifikant in den mit C3 behandelten Tieren auf ca. 10% reduziert.

Die in das Herz infiltrierten Immunzellen wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Anzahl der T-Helferzellen, zytotoxischen T-Zellen und Makrophagen waren signifikant erhöht durch die Ang II Infusion. In der mit C3 behandelten Gruppe zeigte sich eine signifikante Reduktion dieser Immunzellen. Die genauere Analyse der verschiedenen T-Helferzellpopulationen zeigte, dass insbesondere die T_H17 -Zellen unter dem Einfluss von Ang II anstiegen. Die Behandlung mit C3 führte auch hier zu einer signifikanten Reduktion. Für T_{REG} konnten nur nicht-signifikante Trends in Richtung einer Erhöhung in den mit Ang II infundierten Gruppen gezeigt werden. Die kardiale Expression von IL-10 mRNA stieg signifikant in den unbehandelten Ang II infundierten Tieren an. Dieser Anstieg wurde durch die Behandlung mit C3 verhindert. Insgesamt zeigte sich in der Analyse der lokalen kardialen Inflammation in Bezug auf die T-Helferzellen ein vergleichbares Bild wie in der Milz.

Die Echokardiographie und der bei der Tötung gemessene Hypertrophie-Index zeigten eine signifikante Hypertrophie der Herzen durch Ang II. Durch die Behandlung mit C3 war die kardiale Hypertrophie signifikant reduziert. Zur Bestätigung des antihypertrophen Effekts von C3 wurde die Genexpression klassischer Hypertrophie-Gene auf mRNA-Ebene analysiert. Sowohl *brain natriuretic peptide (Nppb)*, als auch *myosin heavy chain beta (Mhy-7)* belegten die antihypertrophen Effekte von C3. Auch die durch Ang II hervorgerufene kardiale interstitielle und perivaskuläre Fibrose war durch C3 signifikant reduziert. Dieses Ergebnis konnte durch Analyse der Fibroblastenzahl im Herzen bestätigt werden. Die Genexpression von zwei Markern der kardialen Fibrose, Neutrophilengelatinase-assoziierte Lipocalin (*Ngal*) und *connective tissue growth factor (Ctgf)*, bestätigten die histologischen Analysen der Fibrose.

3.3. Abhängigkeit von T_{REG}

Wie einleitend erwähnt, verbessert C3 die suppressive Kapazität und Differenzierung von T_{REG}⁵⁸. Um den Wirkmechanismus von C3 auf den durch Ang II induzierten Herzschaden über T_{REG} zu überprüfen, wurden T_{REG} in mit C3 gefütterten und Ang II infundierten Mäusen depletiert. Die Depletion von T_{REG} verhinderte die anti-inflammatorischen und antifibrotischen Effekte von C3. Der antihypertrophe Effekt von C3 war jedoch nur teilweise aufgehoben.

3.4. Effekte auf den Blutdruck

Die Behandlung mit C3 im Trinkwasser sorgte für einen signifikant niedrigeren Blutdruck gegen Ende des Experiments. Die Analyse der *area under the curve* (AUC), die getrennt für die erste und zweite Woche der Ang II Infusion vorgenommen wurde, zeigte, dass der antihypertensive Effekt erst in der zweiten Woche statistisch signifikant war. Des Weiteren war die endotheliale Dysfunktion von isolierten mesenterialen Gefäßringen unter C3 signifikant gebessert. Die T_{REG} Depletion hatte keinen Einfluss auf die C3 induzierte Blutdrucksenkung. Eine *in vitro* induzierte endotheliale Dysfunktion durch 24h Inkubation von mesenterialen Gefäßringen mit IL-17A und Ang II zeigte sich von einer Ko-Inkubation mit C3 nicht beeinflusst. Zusammenfassend scheint der antihypertensive Effekt von C3 multifaktorieller Genese zu sein: C3 führt zu einer moderaten Blutdrucksenkung, die mit einer verbesserten endothelialen Funktion einhergeht. T_{REG} scheinen für die Blutdrucksenkung weniger relevant zu sein.

3.5. Elektrisches Remodeling

Um herauszufinden, ob die Verbesserung der Inflammation und kardialen Schädigung durch C3 auch zu einem funktionell verbesserten Phänotyp *in vivo* führt, erfolgte eine elektrophysiologische Untersuchung der Mäuse. Das Auftreten ventrikuläre Arrhythmien in Patienten mit hypertensiver Herzerkrankung ist bekanntermaßen prognosebestimmend⁷³. Bei mit C3 behandelten Mäusen konnte seltener als bei unbehandelten Mäusen ventrikuläre Tachyarrhythmien ausgelöst werden. In den meisten Fällen konnte in mit C3 behandelten Mäusen keine Arrhythmien ausgelöst werden. Diese Beobachtung wird durch die Immunfluoreszenz-Analyse des kardialen Nexus Proteins Connexin-43 (Cx43) gestützt. Die Verlagerung von Cx43 aus dem Bereich der Glanzstreifen heraus an die Seiten der Kardiomyozyten

(Lateralisierung der Cx43 Expression) wurde bereits in Patienten mit kardialer Hypertrophie beobachtet⁷⁴. Anhand der Kolo-kalisation von N-Cadherin konnte eine Verminderung der pathologische Lateralisierung von Cx43 durch die C3 Behandlung gezeigt werden.

4. Weiterführende wissenschaftliche Fragestellungen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Metabolit der Darmmikrobiota, die SCFA C3, den durch Ang II induzierten hypertensiven Endorganschaden reduziert. Die Wirkung von C3 war hauptsächlich über T_{REG} vermittelt. C3 beeinflusste die T-Helferzell-Homöostase und reduzierte dadurch die kardiale Hypertrophie, Fibrose und das elektrische Remodeling. Des Weiteren zeigte C3 antihypertensive Eigenschaften, möglicherweise durch den direkten Einfluss auf Gefäße und weniger durch den Einfluss auf T_{REG} bedingt.

Eine weiterhin noch unzureichend geklärte Fragestellung ist die nach dem molekularem Wirkmechanismus von C3. Auf Ebene der Immunzellen wurden sowohl die Bindung an die Rezeptoren GPR41 und GPR43 als auch epigenetische Regulationen über die Inhibition von HDAC vorgeschlagen^{57, 58}. Für die direkte Wirkung auf Gefäße gibt es Hinweise auf die Abhängigkeit sowohl von oben genannten GPR als auch von Olfr78^{61, 62}. Somit steht hier noch die Frage aus, welcher Mechanismus ist in unserem Modell für HTN für die positive Wirkung auf T_{REG} verantwortlich ist und welcher Mechanismus zu dem davon unabhängigen antihypertensiven Effekt führt.

Das tierexperimentell gewonnene Wissen über die Rolle der Inflammation in kardiovaskulären Erkrankungen fand erstmals in der CANTOS Studie eine translationale Anwendung⁷⁵. Die Behandlung mit dem IL-1 β -Antagonisten Canakinumab erreichte sowohl den primären Endpunkt, eine Reduktion von hoch sensitivem C-reaktives Protein (hsCRP), als auch sekundäre Endpunkte wie die Reduzierung der Mortalität⁷⁵. Diese erste Phase-III-Studie zeigt den Bedarf an neuen Therapien, welche die Reduktion der Inflammation im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen als Ziel haben. C3 und verschiedene Salze des C3 sind nach EU-Richtlinien als Nahrungsergänzungsmittel überprüft und zugelassen⁷⁶. C3 stellt somit eine ideale Substanz für eine schnelle Translation in den Menschen dar. Die ersten wissenschaftlichen Fragestellungen, die hierfür geklärt werden müssten, sollten sich mit der Dosisfindung und damit verbunden mit dem Einfluss auf den Immunphänotyp und den Blutdruck von gesunden und hypertensiven Menschen beschäftigen.

Neben der direkten Gabe von C3 könnten Methoden, die zu einer erhöhten Produktion von SCFA wie C3 durch die Darmmikrobiota führen, vielversprechend sein. Die Modulation des Darmmikrobioms kann durch Gabe von lebenden Bakterien (Probiotika) oder durch Zusätze, die das Wachstum und die Funktion von Bakterien unterstützen (Präbiotika) erfolgen⁷⁷. Verschiedenste Bakterien haben die genetische Ausstattung SCFA zu produzieren⁷⁸. In Familien wie *Bifidobacteriaceae*, *Lachnospiraceae*, and *Ruminococcaceae* gibt es verschiedene Spezies, die SCFA produzieren können⁷⁸. Besonders

Bifidobacteriaceae Spezies finden sich häufig in kommerziell erhältlichen Probiotika⁷⁹. Inwieweit diese erhältlichen Probiotika zu einer Erhöhung der SCFA und besonders C3 Produktion beitragen ist aber noch unzureichend geklärt. Gerade für die Produktion von SCFA bietet sich aber auch die Gabe von unverdaulichen Faserstoffen wie Inulin und Pektin an, die bekannte Substrate für die bakterielle Fermentation zu SCFA sind⁸⁰. Auch Inulin findet bereits als Nahrungsergänzungsmittel breite Anwendung. Analog zur direkten Gabe besteht auch hier vor der Translation in den Menschen der Bedarf nach Studien zur Dosisfindung und zum Einfluss auf Blutdruck und Immunphänotyp.

Prinzipiell liefern die Ergebnisse dieser Arbeit eine innovative Begründung für die einleitend erwähnte Assoziation zwischen faserreicher Ernährung und der Protektion vor kardiovaskulären Erkrankungen⁵¹. Neben den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnten auch Marques *et al.*⁸¹ den protektiven Effekt von Acetat, einer anderen SCFA, auf den hypertensiven Organschaden zeigen. In uninephrektomierten und mit *11-Deoxycorticosterone acetate* (DOCA) behandelten führten eine faserreiche Ernährung und die Behandlung mit Acetat zur Reduktion der kardialen und renalen hypertensiven Schäden⁸¹. Die vorliegende Arbeit kann dieses Wissen um die Ergebnisse zur T-Zell-Homöostase erweitern. Insgesamt unterstützen beide Arbeiten die im Rahmen von Leitlinien empfohlene Lebensstiländerung vor Beginn einer medikamentösen antihypertensiven Therapie³³. Eine Ernährungsumstellung mit Erhöhung des Faseranteils und damit Erhöhung der Produktion von SCFA sollte auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse als therapeutischer Ansatz weiter untersucht werden.

Literaturverzeichnis

1. Norlander AE, Madhur MS, Harrison DG. The immunology of hypertension. *The Journal of experimental medicine*. 2018;215:21-33
2. Luft FC. Angiotensin, inflammation, hypertension, and cardiovascular disease. *Current hypertension reports*. 2001;3:61-67
3. Muller DN, Shagdarsuren E, Park JK, Dechend R, Mervaala E, Hampich F, Fiebeler A, Ju X, Finckenberg P, Theuer J, Viedt C, Kreuzer J, Heidecke H, Haller H, Zenke M, Luft FC. Immunosuppressive treatment protects against angiotensin ii-induced renal damage. *The American journal of pathology*. 2002;161:1679-1693
4. Muller DN, Dechend R, Mervaala EM, Park JK, Schmidt F, Fiebeler A, Theuer J, Breu V, Ganten D, Haller H, Luft FC. Nf-kappab inhibition ameliorates angiotensin ii-induced inflammatory damage in rats. *Hypertension*. 2000;35:193-201
5. Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, Dikalov S, Goronzy J, Weyand C, Harrison DG. Role of the t cell in the genesis of angiotensin ii induced hypertension and vascular dysfunction. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204:2449-2460
6. Chaplin DD. Overview of the immune response. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125:S3-23
7. Germain RN. T-cell development and the cd4-cd8 lineage decision. *Nature reviews. Immunology*. 2002;2:309-322
8. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector cd4 t cell populations (*). *Annual review of immunology*. 2010;28:445-489
9. Ivanova EA, Orekhov AN. T helper lymphocyte subsets and plasticity in autoimmunity and cancer: An overview. *BioMed research international*. 2015;2015:327470
10. Eyerich S, Zielinski CE. Defining th-cell subsets in a classical and tissue-specific manner: Examples from the skin. *European journal of immunology*. 2014;44:3475-3483
11. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper t cells. *The New England journal of medicine*. 2009;361:888-898
12. Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor rorgammata directs the differentiation program of proinflammatory il-17+ t helper cells. *Cell*. 2006;126:1121-1133
13. Madhur MS, Lob HE, McCann LA, Iwakura Y, Blinder Y, Guzik TJ, Harrison DG. Interleukin 17 promotes angiotensin ii-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension*. 2010;55:500-507
14. Norlander AE, Saleh MA, Kamat NV, Ko B, Gnecco J, Zhu L, Dale BL, Iwakura Y, Hoover RS, McDonough AA, Madhur MS. Interleukin-17a regulates renal sodium transporters and renal injury in angiotensin ii-induced hypertension. *Hypertension*. 2016;68:167-174

15. Dardalhon V, Korn T, Kuchroo VK, Anderson AC. Role of th1 and th17 cells in organ-specific autoimmunity. *Journal of autoimmunity*. 2008;31:252-256
16. Marko L, Kvakana H, Park JK, Qadri F, Spallek B, Binger KJ, Bowman EP, Kleinewietfeld M, Fokuhl V, Dechend R, Muller DN. Interferon-gamma signaling inhibition ameliorates angiotensin ii-induced cardiac damage. *Hypertension*. 2012;60:1430-1436
17. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory t cell subsets: Function, generation, and maintenance. *Annual review of immunology*. 2004;22:745-763
18. Pepper M, Jenkins MK. Origins of cd4(+) effector and central memory t cells. *Nature immunology*. 2011;12:467-471
19. Itani HA, Xiao L, Saleh MA, Wu J, Pilkinton MA, Dale BL, Barbaro NR, Foss JD, Kirabo A, Montaniel KR, Norlander AE, Chen W, Sato R, Navar LG, Mallal SA, Madhur MS, Bernstein KE, Harrison DG. Cd70 exacerbates blood pressure elevation and renal damage in response to repeated hypertensive stimuli. *Circulation research*. 2016;118:1233-1243
20. Denoed J, Moser M. Role of cd27/cd70 pathway of activation in immunity and tolerance. *Journal of leukocyte biology*. 2011;89:195-203
21. Ammirati E, Cianflone D, Vecchio V, Banfi M, Vermi AC, De Metrio M, Grigore L, Pellegatta F, Pirillo A, Garlaschelli K, Manfredi AA, Catapano AL, Maseri A, Palini AG, Norata GD. Effector memory t cells are associated with atherosclerosis in humans and animal models. *Journal of the American Heart Association*. 2012;1:27-41
22. Kirabo A, Fontana V, de Faria AP, Loperena R, Galindo CL, Wu J, Bikineyeva AT, Dikalov S, Xiao L, Chen W, Saleh MA, Trott DW, Itani HA, Vinh A, Amarnath V, Amarnath K, Guzik TJ, Bernstein KE, Shen XZ, Shyr Y, Chen SC, Mernaugh RL, Laffer CL, Eljovich F, Davies SS, Moreno H, Madhur MS, Roberts J, 2nd, Harrison DG. Dc isoketal-modified proteins activate t cells and promote hypertension. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124:4642-4656
23. Pons H, Ferrebuz A, Quiroz Y, Romero-Vasquez F, Parra G, Johnson RJ, Rodriguez-Iturbe B. Immune reactivity to heat shock protein 70 expressed in the kidney is cause of salt-sensitive hypertension. *American journal of physiology. Renal physiology*. 2013;304:F289-299
24. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory t cells: Mechanisms of differentiation and function. *Annual review of immunology*. 2012;30:531-564
25. Burzyn D, Benoist C, Mathis D. Regulatory t cells in nonlymphoid tissues. *Nature immunology*. 2013;14:1007-1013
26. Weirather J, Hofmann UD, Beyersdorf N, Ramos GC, Vogel B, Frey A, Ertl G, Kerkau T, Frantz S. Foxp3+ cd4+ t cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation. *Circulation research*. 2014;115:55-67

27. Kvakani H, Kleinewietfeld M, Qadri F, Park JK, Fischer R, Schwarz I, Rahn HP, Plehm R, Wellner M, Elitok S, Gratz P, Dechend R, Luft FC, Muller DN. Regulatory t cells ameliorate angiotensin ii-induced cardiac damage. *Circulation*. 2009;119:2904-2912
28. Barhoumi T, Kasal DA, Li MW, Shbat L, Laurant P, Neves MF, Paradis P, Schiffrin EL. T regulatory lymphocytes prevent angiotensin ii-induced hypertension and vascular injury. *Hypertension*. 2011;57:469-476
29. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R, Prospective Studies C. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: A meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*. 2002;360:1903-1913
30. Diederichs C, Neuhauser H. Regional variations in hypertension prevalence and management in germany: Results from the german health interview and examination survey (degs1). *Journal of hypertension*. 2014;32:1405-1413; discussion 1414
31. Rapsomaniki E, Timmis A, George J, Pujades-Rodriguez M, Shah AD, Denaxas S, White IR, Caulfield MJ, Deanfield JE, Smeeth L, Williams B, Hingorani A, Hemingway H. Blood pressure and incidence of twelve cardiovascular diseases: Lifetime risks, healthy life-years lost, and age-specific associations in 1.25 million people. *Lancet*. 2014;383:1899-1911
32. Tsao CW, Gona PN, Salton CJ, Chuang ML, Levy D, Manning WJ, O'Donnell CJ. Left ventricular structure and risk of cardiovascular events: A framingham heart study cardiac magnetic resonance study. *Journal of the American Heart Association*. 2015;4:e002188
33. Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, Clement DL, Coca A, de Simone G, Dominiczak A, Kahan T, Mahfoud F, Redon J, Ruilope L, Zanchetti A, Kerins M, Kjeldsen SE, Kreutz R, Laurent S, Lip GYH, McManus R, Narkiewicz K, Ruschitzka F, Schmieder RE, Shlyakhto E, Tsioufis C, Aboyans V, Desormais I, Group ESCSD. 2018 esc/esh guidelines for the management of arterial hypertension. *European heart journal*. 2018;39:3021-3104
34. Honda K, Littman DR. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature*. 2016;535:75-84
35. Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau MC, Roberfroid M, Rowland I. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *The British journal of nutrition*. 1998;80 Suppl 1:S147-171
36. Shreiner AB, Kao JY, Young VB. The gut microbiome in health and in disease. *Current opinion in gastroenterology*. 2015;31:69-75
37. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS biology*. 2016;14:e1002533
38. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier

- E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Dore J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Meta HITC, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464:59-65
39. Karlsson FH, Fak F, Nookaew I, Tremaroli V, Fagerberg B, Petranovic D, Backhed F, Nielsen J. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nature communications*. 2012;3:1245
40. Jie Z, Xia H, Zhong SL, Feng Q, Li S, Liang S, Zhong H, Liu Z, Gao Y, Zhao H, Zhang D, Su Z, Fang Z, Lan Z, Li J, Xiao L, Li J, Li R, Li X, Li F, Ren H, Huang Y, Peng Y, Li G, Wen B, Dong B, Chen JY, Geng QS, Zhang ZW, Yang H, Wang J, Wang J, Zhang X, Madsen L, Brix S, Ning G, Xu X, Liu X, Hou Y, Jia H, He K, Kristiansen K. The gut microbiome in atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature communications*. 2017;8:845
41. Li J, Zhao F, Wang Y, Chen J, Tao J, Tian G, Wu S, Liu W, Cui Q, Geng B, Zhang W, Weldon R, Auguste K, Yang L, Liu X, Chen L, Yang X, Zhu B, Cai J. Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension. *Microbiome*. 2017;5:14
42. Yang T, Santisteban MM, Rodriguez V, Li E, Ahmari N, Carvajal JM, Zadeh M, Gong M, Qi Y, Zubcevic J, Sahay B, Pepine CJ, Raizada MK, Mohamadzadeh M. Gut dysbiosis is linked to hypertension. *Hypertension*. 2015;65:1331-1340
43. Wilck N, Matus MG, Kearney SM, Olesen SW, Forslund K, Bartolomeaus H, Haase S, Mahler A, Balogh A, Marko L, Vvedenskaya O, Kleiner FH, Tsvetkov D, Klug L, Costea PI, Sunagawa S, Maier L, Rakova N, Schatz V, Neubert P, Fratzer C, Krannich A, Gollasch M, Grohme DA, Corte-Real BF, Gerlach RG, Basic M, Typas A, Wu C, Titze JM, Jantsch J, Boschmann M, Dechend R, Kleinewietfeld M, Kempa S, Bork P, Linker RA, Alm EJ, Muller DN. Salt-responsive gut commensal modulates th17 axis and disease. *Nature*. 2017;551:585-589
44. O'Donnell M, Mente A, Rangarajan S, McQueen MJ, Wang X, Liu L, Yan H, Lee SF, Mony P, Devanath A, Rosengren A, Lopez-Jaramillo P, Diaz R, Avezum A, Lanas F, Yusuf K, Iqbal R, Ilow R, Mohammadifard N, Gulec S, Yusufali AH, Kruger L, Yusuf R, Chifamba J, Kabali C, Dagenais G, Lear SA, Teo K, Yusuf S, Investigators P. Urinary sodium and potassium excretion, mortality, and cardiovascular events. *The New England journal of medicine*. 2014;371:612-623
45. Weber MA, Schiffrin EL, White WB, Mann S, Lindholm LH, Kenerson JG, Flack JM, Carter BL, Materson BJ, Ram CV, Cohen DL, Cadet JC, Jean-Charles RR, Taler S, Kountz D, Townsend R, Chalmers J, Ramirez AJ, Bakris GL, Wang J, Schutte AE, Bisognano JD, Touyz RM, Sica D, Harrap SB. Clinical practice guidelines for the management of hypertension in the community a statement by the american society of hypertension and the international society of hypertension. *Journal of hypertension*. 2014;32:3-15

46. Kleinewietfeld M, Manzel A, Titze J, Kvakana H, Yosef N, Linker RA, Muller DN, Hafler DA. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic th17 cells. *Nature*. 2013;496:518-522
47. Wu C, Yosef N, Thalhamer T, Zhu C, Xiao S, Kishi Y, Regev A, Kuchroo VK. Induction of pathogenic th17 cells by inducible salt-sensing kinase sgk1. *Nature*. 2013;496:513-517
48. Gutierrez-Vazquez C, Quintana FJ. Regulation of the immune response by the aryl hydrocarbon receptor. *Immunity*. 2018;48:19-33
49. 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;28:1221-1227
50. 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;165:1332-1345
51. Threapleton DE, Greenwood DC, Evans CE, Cleghorn CL, Nykjaer C, Woodhead C, Cade JE, Gale CP, Burley VJ. Dietary fibre intake and risk of cardiovascular disease: Systematic review and meta-analysis. *Bmj*. 2013;347:f6879
52. Chang PV, Hao L, Offermanns S, Medzhitov R. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111:2247-2252
53. Nastasi C, Candela M, Bonefeld CM, Geisler C, Hansen M, Krejsgaard T, Biagi E, Andersen MH, Brigidi P, Odum N, Litman T, Woetmann A. The effect of short-chain fatty acids on human monocyte-derived dendritic cells. *Scientific reports*. 2015;5:16148
54. Tong LC, Wang Y, Wang ZB, Liu WY, Sun S, Li L, Su DF, Zhang LC. Propionate ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis by improving intestinal barrier function and reducing inflammation and oxidative stress. *Frontiers in pharmacology*. 2016;7:253
55. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veecken J, deRoos P, Liu H, Cross JR, Pfeffer K, Coffey PJ, Rudensky AY. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory t-cell generation. *Nature*. 2013;504:451-455
56. 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*. 2015;43:817-829
57. 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 immunology*. 2015;8:80-93
58. 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;341:569-573

59. Andrade-Oliveira V, Amano MT, Correa-Costa M, Castoldi A, Felizardo RJ, de Almeida DC, Bassi EJ, Moraes-Vieira PM, Hiyane MI, Rodas AC, Peron JP, Aguiar CF, Reis MA, Ribeiro WR, Valduga CJ, Curi R, Vinolo MA, Ferreira CM, Camara NO. Gut bacteria products prevent aki induced by ischemia-reperfusion. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2015;26:1877-1888
60. 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. *Nature medicine*. 2014;20:159-166
61. Natarajan N, Hori D, Flavahan S, Stepan J, Flavahan NA, Berkowitz DE, Pluznick JL. Microbial short chain fatty acid metabolites lower blood pressure via endothelial g protein-coupled receptor 41. *Physiological genomics*. 2016;48:826-834
62. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110:4410-4415
63. Antos CL, McKinsey TA, Dreitz M, Hollingsworth LM, Zhang CL, Schreiber K, Rindt H, Gorczynski RJ, Olson EN. Dose-dependent blockade to cardiomyocyte hypertrophy by histone deacetylase inhibitors. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278:28930-28937
64. Hirohashi T, Chase CM, DellaPelle P, Sebastian D, Farkesh E, Colvin RB, Russell PS, Alessandrini A, Madsen JC. Depletion of t regulatory cells promotes natural killer cell-mediated cardiac allograft vasculopathy. *Transplantation*. 2014;98:828-834
65. Jun C, Ke W, Qingshu L, Ping L, Jun D, Jie L, Bo C, Su M. Protective effect of cd4(+)/cd25(high)/cd127(low) regulatory t cells in renal ischemia-reperfusion injury. *Cellular immunology*. 2014;289:106-111
66. Liang S, Wang W, Gou X. MicroRNA 26a modulates regulatory t cells expansion and attenuates renal ischemia-reperfusion injury. *Molecular immunology*. 2015;65:321-327
67. Meng X, Yang J, Zhang K, An G, Kong J, Jiang F, Zhang Y, Zhang C. Regulatory t cells prevent angiotensin ii-induced abdominal aortic aneurysm in apolipoprotein e knockout mice. *Hypertension*. 2014;64:875-882
68. Moore-Connors JM, Fraser R, Halperin SA, Wang J. Cd4(+)/cd25(+)/foxp3(+) regulatory t cells promote th17 responses and genital tract inflammation upon intracellular chlamydia muridarum infection. *Journal of immunology*. 2013;191:3430-3439
69. Urbanellis P, Shyu W, Khattar R, Wang J, Zakharova A, He W, Sadozai H, Amir AZ, Shalev I, Phillips MJ, Adeyi O, Ross H, Grant D, Levy GA, Chruscinski A. The regulatory t cell effector molecule fibrinogen-like protein 2 is necessary for the development of rapamycin-induced tolerance to fully mhc-mismatched murine cardiac allografts. *Immunology*. 2015;144:91-106

70. Marko L, Henke N, Park JK, Spallek B, Qadri F, Balogh A, Apel IJ, Oravec-Wilson KI, Choi M, Przybyl L, Binger KJ, Haase N, Wilck N, Heuser A, Fokuhl V, Ruland J, Lucas PC, McAllister-Lucas LM, Luft FC, Dechend R, Muller DN. Bcl10 mediates angiotensin ii-induced cardiac damage and electrical remodeling. *Hypertension*. 2014;64:1032-1039
71. Bolte S, Cordelieres FP. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of microscopy*. 2006;224:213-232
72. Tsvetkov D, Tano JY, Kassmann M, Wang N, Schubert R, Gollasch M. The role of dpo-1 and xe991-sensitive potassium channels in perivascular adipose tissue-mediated regulation of vascular tone. *Front Physiol*. 2016;7:335
73. McLenachan JM, Henderson E, Morris KI, Dargie HJ. Ventricular arrhythmias in patients with hypertensive left ventricular hypertrophy. *The New England journal of medicine*. 1987;317:787-792
74. Kostin S, Dammer S, Hein S, Klovekorn WP, Bauer EP, Schaper J. Connexin 43 expression and distribution in compensated and decompensated cardiac hypertrophy in patients with aortic stenosis. *Cardiovascular research*. 2004;62:426-436
75. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, Fonseca F, Nicolau J, Koenig W, Anker SD, Kastelein JJP, Cornel JH, Pais P, Pella D, Genest J, Cifkova R, Lorenzatti A, Forster T, Kobalava Z, Vida-Simiti L, Flather M, Shimokawa H, Ogawa H, Dellborg M, Rossi PRF, Troquay RPT, Libby P, Glynn RJ, Group CT. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *The New England journal of medicine*. 2017;377:1119-1131
76. Scientific opinion on the re-evaluation of propionic acid (e 280), sodium propionate (e 281), calcium propionate (e 282) and potassium propionate (e 283) as food additives. *EFSA Journal*. 2014;12:3779
77. Pandey KR, Naik SR, Vakil BV. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of food science and technology*. 2015;52:7577-7587
78. Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental microbiology*. 2017;19:29-41
79. George Kerry R, Patra JK, Gouda S, Park Y, Shin HS, Das G. Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of food and drug analysis*. 2018;26:927-939
80. Poulsen M, Jensen BB, Engberg RM. The effect of pectin, corn and wheat starch, inulin and ph on in vitro production of methane, short chain fatty acids and on the microbial community composition in rumen fluid. *Anaerobe*. 2012;18:83-90
81. Marques FZ, Nelson E, Chu PY, Horlock D, Fiedler A, Ziemann M, Tan JK, Kuruppu S, Rajapakse NW, El-Osta A, Mackay CR, Kaye DM. High-fiber diet and acetate supplementation change the gut microbiota and prevent the development of hypertension and heart failure in hypertensive mice. *Circulation*. 2017;135:964-977

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Hendrik Bartolomaeus, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Verbesserung des Angiotensin II-induzierten kardialen Schadens durch die kurzkettige Fettsäure Propionat – einen Metaboliten der Darmmikrobiota“ 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 beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben ist. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation 1: H. Bartolomaeus, A. Balogh, M. Yakoub, Susanne Homann, L. Markó , S. Höges, D. Tsvetkov, A. Krannich, S. Wundersitz, N. Haase, K. Kräker, L. Hering, M. Maase, K. Kusche-Vihrog, M. Grandoch, J. Fielitz, S. Kempa, M. Gollasch, Z. Zhumadilov, S. Kozhakhmetov, A. Kushugulova, K. U. Eckardt, R. Dechend, L. C. Rump, S. K. Forslund, D. N. Müller, J. Stegbauer, N. Wilck, The short-chain fatty acid propionate protects from hypertensive cardiovascular damage, Circulation, 2018

Beitrag im Einzelnen:

- Planung der Experimente in WT Tieren (Fig. 1, 4-7, S1A-E, S3, S5 und S6E, F) zusammen mit Dr. N. Wilck und Prof. Dr. D. N. Müller.

- Präparation, Wiegen und Fixierung der WT Organe zusammen mit Dr. N. Wilck.
- Durchführung der Durchflusszytometrie an den WT Milzen und Herzen zusammen mit Dr. A. Balogh und Dr. N. Wilck.
- Durchführung der Durchflusszytometrie an isolierten ApoE^{-/-} Splenozyten.
- Auswertung der entstandenen durchflusszytometrischen Daten (Fig. 1C-E, 2C-D, 4A-F, 5A-C, S1C-E, S1G-H, S3C, S5B-F).
- Durchführung und Auswertung der Immunfluoreszenz der WT Herzen (Fig. 4K-M, 5D-E, 5G-I, 7C, S3A-B).
- Durchführung und Auswertung der RNA-Analyse in WT Herzen (Fig. 4I-J, S3D-F).
- Arbeit am *in vitro* Modell der endothelialen Dysfunktion (Fig. S6D) zusammen Dr. N. Wilck. Die Messungen erfolgten durch Dr. D. Tsvetkov.
- Auswertung der Propionat-Messung (Fig. S1A).
- Statistische Analyse aller Daten außer Fig. 6A, 6C, S4, S6E-F und Tab. S1.
- Schreiben des Manuskripts zusammen mit Dr. N. Wilck, Prof. D. N. Müller und PD Dr. J. Stegbauer.
- Federführende Rolle während des Revisionsprozesses.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2017** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"CARDIAC and CARDIOVASCULAR SYSTEMS"** Selected
 Category Scheme: WoS

Gesamtanzahl: 128 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	EUROPEAN HEART JOURNAL	56,054	23.425	0.146810
2	CIRCULATION	167,719	18.880	0.223630
3	JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY	99,084	16.834	0.213550
4	CIRCULATION RESEARCH	52,753	15.211	0.082820
5	Nature Reviews Cardiology	5,228	15.162	0.018210
6	EUROPEAN JOURNAL OF HEART FAILURE	11,113	10.683	0.027560
7	JACC-Cardiovascular Imaging	8,104	10.247	0.026360
8	JAMA Cardiology	1,650	10.133	0.008630
9	JACC-Cardiovascular Interventions	10,268	9.881	0.037290
10	European Heart Journal- Cardiovascular Imaging	4,630	8.336	0.020640
11	JACC-Heart Failure	2,827	8.202	0.016950
12	JOURNAL OF HEART AND LUNG TRANSPLANTATION	11,129	7.955	0.028970
13	JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF ECHOCARDIOGRAPHY	10,612	6.827	0.017380
14	PROGRESS IN CARDIOVASCULAR DISEASES	3,733	6.754	0.008030
15	Circulation- Cardiovascular Interventions	4,902	6.504	0.019620
16	CARDIOVASCULAR RESEARCH	22,195	6.290	0.027350
17	Circulation- Cardiovascular Imaging	5,438	6.221	0.020160
18	BASIC RESEARCH IN CARDIOLOGY	4,199	5.723	0.007870
19	Circulation-Heart Failure	6,064	5.684	0.024050
20	Circulation- Cardiovascular Genetics	3,394	5.664	0.011400
21	JOURNAL OF CARDIOVASCULAR MAGNETIC RESONANCE	4,918	5.457	0.013530
22	HEART	17,545	5.420	0.034110
23	JOURNAL OF MOLECULAR AND CELLULAR CARDIOLOGY	14,186	5.296	0.025030

Short-Chain Fatty Acid Propionate Protects From Hypertensive Cardiovascular Damage

<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036652>

Supplemental Material to Short-Chain Fatty Acid Propionate Protects From Hypertensive Cardiovascular Damage

<https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036652>

Lebenslauf

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

Publikationsliste

N. Wilck, M. G. Matus, S. M. Kearney, S. W. Olesen, K. Forslund, **H. Bartolomaeus**, S. Haase, A. Mahler, A. Balogh, L. Marko, O. Vvedenskaya, F. H. Kleiner, D. Tsvetkov, L. Klug, P. I. Costea, S. Sunagawa, L. Maier, N. Rakova, V. Schatz, P. Neubert, C. Fratzer, A. Krannich, M. Gollasch, D. A. Grohme, B. F. Corte-Real, R. G. Gerlach, M. Basic, A. Typas, C. Wu, J. M. Titze, J. Jantsch, M. Boschmann, R. Dechend, M. Kleinewietfeld, S. Kempa, P. Bork, R. A. Linker, E. J. Alm, D. N. Müller (2017). Salt-responsive gut commensal modulates T_H17 axis and disease. **Nature** 551, 585–589. doi: 10.1038/nature24628.

N. Wilck, L. Marko, A. Balogh, K. Kraker, F. Herse F, **H. Bartolomaeus**, I. A. Szijarto, M. Gollasch, N. Reichhart, O. Strauss, A. Heuser, D. Brockschnieder, A. Kretschmer, R. Lesche, F. Sohler, J. P. Stasch, P. Sandner, F. C. Luft, D. N. Muller, R. Dechend, N. Haase. (2018). Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase stimulation improves experimental heart failure with persevered ejection fraction. **JCI Insight** 3(4). doi: 10.1172/jci.insight.96006.

H. Bartolomaeus, A. Balogh, M. Yakoub, Susanne Homann, L. Markó , S. Höges, D. Tsvetkov, A. Krannich, S. Wundersitz, N. Haase, K. Kräker, L. Hering, M. Maase, K. Kusche-Vihrog, M. Grandoch, J. Fielitz, S. Kempa, M. Gollasch, Z. Zhumadilov, S. Kozhakhmetov, A. Kushugulova, K. U. Eckardt, R. Dechend, L. C. Rump, S. K. Forslund, D. N. Müller, J. Stegbauer, N. Wilck. (2018). Short-chain fatty acid propionate protects from hypertensive cardiovascular damage. **Circulation** 2019; 139:1407–1421. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036652.

H. Bartolomaeus, L. Markó, N. Wilck, F. C. Luft FC, S. K. Forslund, D. N. Müller. (2019). Precarious symbiosis between host and microbiome in cardiovascular health. **Hypertension** 2019; 73:926–935. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.11786

N. Wilck, A. Balogh, L. Markó, **H. Bartolomaeus**, D. N. Müller. (2019). The role of sodium in modulating immune cell function. *Nature Reviews Nephrology*. 2019; Jun 25. doi: 10.1038/s41581-019-0167-y

L. Markó, J.-K. Park, N. Henke, S. Rong, A. Balogh, S. Klamer, **H. Bartolomaeus**, N. Wilck, J. Ruland, S. K. Forslund, F. C. Luft, R. Dechend, D. N. Müller. (2019). B-cell lymphoma/leukemia 10 (Bcl10) and angiotensin II-induced kidney injury. **Cardiovascular Research** 2019;0. doi: 10.1093/cvr/cvz169.

Danksagung

Bei Dominik Müller möchte ich mich für die Überlassung des Themas, für das in mich gesetzte Vertrauen und für die wissenschaftliche Anregungen bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Nicola Wilck für die Zusammenarbeit der letzten Jahre bedanken; ich freue mich auf die anstehenden gemeinsamen Projekte.

Auch András Balogh gilt mein Dank für die Einführung in die Durchflusszytometrie (das „*Cantoing*“) und für die Hilfe bei der Etablierung neuer Methoden.

Mein Dank gilt dem gesamten Team der Arbeitsgruppe Müller / Dechend für die Anleitung und Hilfe im Labor, für die Atmosphäre und den Umgang miteinander. Ich habe die Zeit im Studium und werde die Zeit bei euch sehr genießen. Insbesondere möchte ich Gabi N'diaye und Ilona Kramer für die Unterstützung bei den Versuchen danken. Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Lajos Markó, Ralf Dechend, Florian Herse, Sabine Bartel, Nadine Haase und Jana Czychi.

Ich möchte allen früheren und aktuellen Mitdoktoranden für die Diskussionen und den Ideenaustausch über die verschiedenen Projekte danken. Insbesondere möchte ich Sabrina Geisberger, Matthias Gebhardt, Kristin Kräker und Ellen Avery danken. Nach Matze möchte ich euch als Zweiter das Zitat „Es ist vollbracht“ (Johannes 19,30) widmen

Allen Koautoren der Publikation und allen, die am Propionat-Projekt mitgearbeitet haben, möchte ich hiermit noch einmal danken.

Und zu guter Letzt: Meiner Familie und besonders meinen Eltern möchte ich an dieser Stelle für die Unterstützung im Studium und während der Promotion danken.