

Aus der Klinik für Innere Medizin III mit den Schwerpunkten Kardiologie, Angiologie und
internistische Intensivmedizin

(Direktor: Prof. Dr. med. Norbert Frey)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Intestinales Mikrobiom nach Induktion von Herzinsuffizienz durch TAC-Operation in Mäusen

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Janika Mangels

aus Kirchheimbolanden

Kiel 2020

1. Berichterstatter/in: Priv.-Doz. Dr. med. Mark Lüdde

2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Stefan Schreiber

Tag der mündlichen Prüfung: 09.11.2021

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 13.09.2021

gez.: Prof. Dr. Derk Frank

(Vorsitzende/r der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

I	Abbildungsverzeichnis	III
II	Tabellenverzeichnis	III
III	Abkürzungsverzeichnis	IV
1	Einleitung	1
1.1	Herzinsuffizienz	1
1.2	Humanes intestinales Mikrobiom	3
1.3	Verknüpfungen zwischen Mikrobiom und Herz	4
1.4	Zielsetzung	5
2	Material und Methoden	6
2.1	Material	6
2.1.1	Bezugsquellen	6
2.1.2	Versuchstiere	6
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	7
2.1.4	Kits	8
2.1.5	Primer	8
2.1.6	Laborgeräte	9
2.1.7	IT-Programme und Datenbanken	10
2.2	Methoden	11
2.2.1	TAC-Operation	11
2.2.2	Echokardiographie	12
2.2.3	Proben- und Organentnahme	13
2.2.4	16s rRNA Sequenzierung	13
2.2.5	Analyse der Gensequenzen	17
3	Ergebnisse	21
3.1	Evaluation der TAC-Operation	21
3.2	Betrachtung der einzelnen Behandlungsgruppen hinsichtlich Alpha- und Beta-Diversität	28
3.2.1	Alpha-Diversität	28
3.2.2	Beta-Diversität	30
3.3	Vergleich der einzelnen Behandlungsgruppen hinsichtlich Alpha- und Beta-Diversität zu den unterschiedlichen Zeitpunkten	32
3.4	Abundanz einzelner Bakterien	34
4	Diskussion	37

4.1	Funktionalität einzelner Taxa mit verschiedener Abundanz	37
4.2	Vergleich der Ergebnisse mit anderen Studien	38
4.3	Einfluss bakterieller Metabolite	39
4.4	Limitationen und Störfaktoren	41
4.5	Ausblick.....	42
5	Zusammenfassung	45
6	Anhang	47
7	Literaturverzeichnis	50
8	Danksagung	57
9	Eidesstattliche Erklärung.....	58

I Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1:** *More malignant than Cancer* – Maligner als Krebs
- Abbildung 3.1:** Exemplarische Echokardiographien der Gruppen TAC severe und Sham in Woche 6
- Abbildung 3.2:** Linksventrikuläre Ejektionsfraktion der einzelnen Versuchsgruppen in Woche 4 und Woche 6
- Abbildung 3.3:** Fractional Shortening der einzelnen Versuchsgruppen in Woche 4 und Woche 6
- Abbildung 3.4:** Körpergewicht, Herzgewicht, relatives Herzgewicht, Lungengewicht und relatives Lungengewicht der einzelnen Versuchsgruppen an Tag 42
- Abbildung 3.5:** Alpha-Diversität der einzelnen Versuchsgruppen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten
- Abbildung 3.6:** Beta-Diversität der einzelnen Versuchsgruppen
- Abbildung 3.7:** Hauptkomponentenanalyse der verschiedenen Versuchsgruppen zu bestimmten Zeitpunkten
- Abbildung 3.8:** Heatmap der Versuchsgruppe TAC severe und Sham
- Abbildung 3.9:** Gruppenvergleichende Heatmaps zu Beginn und Ende des Experiments
- Abbildung 4.1:** Intestinales Mikrobiom: Interaktionen im Organismus und mögliche Angriffspunkte

II Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1.1:** NYHA-Klassifikation
- Tabelle 2.1:** Einteilung der Versuchstiere in die einzelnen Versuchsgruppen
- Tabelle 2.2:** Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Angabe der Katalognummer und des Herstellers

Tabelle 2.3:	Verwendete Kits mit Angabe der Katalognummer und des Herstellers
Tabelle 2.4:	Verwendete PCR-Primer
Tabelle 2.5:	Verwendete Laborgeräte mit Angabe der Katalognummer und des Herstellers
Tabelle 2.6:	Verwendete Softwares und Datenbanken mit Quellenangabe
Tabelle 2.7:	Inhaltsstoffe des DNA Stool Mini Kit, Qiagen
Tabelle 2.8:	Verwendete Reagenzien zur Amplifikation mittels PCR
Tabelle 2.9:	Verwendete Reagenzien zur Herstellung des Master Mix für die Polymerase-Kettenreaktion
Tabelle 2.10:	Aufbau der i5 – 27F und i7 – 338R Primer
Tabelle 2.11:	Temperaturzyklus der PCR zur Amplifikation des 16s rRNA Gens
Tabelle 3.1:	Aufteilung der Versuchstiere auf die Untergruppen der TAC-Versuchsgruppe
Tabelle 3.2:	Gemessene Parameter der einzelnen Versuchsgruppen jeweils in Woche 4 und Woche 6
Tabelle 3.3:	Körpergewicht, Herzgewicht, Lungengewicht und Quotient aus Herz- und Körpergewicht der einzelnen Versuchsgruppen
Tabelle 3.4:	ANOVA der einzelnen Versuchsgruppen von Tag 0 zu verschiedenen Endzeitpunkten

III Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Arteria</i> , Arterie
ACE	<i>Angiotensin converting enzyme</i> , Angiotensin konvertierendes Enzym
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> , Varianzanalyse
bp	<i>basepairs</i> , Basenpaare

bpm	<i>beats per minute</i> , Schläge pro Minute
CD14	<i>cluster of differentiation 14</i>
CRT	<i>cardiac resynchronization therapy</i> , kardiale Resynchronisationstherapie
EF	<i>ejection fraction</i> , Ejektionsfraktion
FS	<i>fractional shortening</i> , LV-Verkürzungsfraktion
HF	<i>heart failure</i> , Herzinsuffizienz
HFmrEF	<i>heart failure with mid range ejection fraction</i> , Herzinsuffizienz mit linksventrikulärer Auswurffraktion mittleren Rangs
HFpEF	<i>heart failure with preserved ejection fraction</i> , Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer Auswurffraktion
HFrEF	<i>heart failure with reduced ejection fraction</i> , Herzinsuffizienz mit reduzierter linksventrikulärer Auswurffraktion
HI	Herzinsuffizienz
H-ISDN	Hydralazin und Isorbiddinitrat
HMP	Human Microbiome Project
ICD	implantierbarer Kardioverter-Defibrillator
IL-6	Interleukin 6
LPS	Lipopolysaccharid
LV	linker Ventrikel
NYHA	New York Heart Association
OTU	<i>operational taxonomic unit</i> , taxonomische Einheit
PCOA	<i>principal coordinates analysis</i> , Hauptkomponentenanalyse
RDP	Ribosomal Database Project
SCFA	<i>short chain fatty acids</i> , kurzkettige Fettsäuren
TAC	<i>transverse aortic constriction</i> , aortale Konstriktion

TMA	Trimethylamin
TMAO	Trimethylamin-N-Oxid
TNF- α	Tumornekrosefaktor α

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist viel weniger eine Krankheit als ein klinisches Syndrom. Dieses beruht auf strukturellen beziehungsweise funktionellen kardialen Veränderungen, die zu bestimmten Charakteristika, wie einer reduzierten Pumpfunktion oder erhöhten intrakardialen Drücken, führen (Ponikowski et al. 2016). Zu den resultierenden Symptomen gehören Dyspnoe, Müdigkeit, Ödembildung, Leistungsminderung, Tachykardie und viele mehr. Die Ursachen für eine Herzinsuffizienz sind vielfältig, hierzu zählen beispielsweise myokardiale Veränderungen, die eine systolische oder diastolische Dysfunktion bedingen, Klappenvitien, Herzrhythmusstörungen oder auch Veränderungen des Peri- oder Endokards.

Eine Einteilung der Herzinsuffizienz wird anhand der linksventrikulären Ejektionsfraktion vorgenommen. Somit kann man zwischen der Heart Failure with reduced Ejection Fraction (HFrEF; $EF < 40\%$), Heart Failure with mid range Ejection Fraction (HFmrEF; $EF = 40 - 49\%$) und Heart Failure with preserved Ejection Fraction (HFpEF; $EF \geq 50\%$) unterscheiden. Wichtig ist diese Einteilung vor allem für die erfolgende Behandlung, die sich je nach Herzinsuffizienzklasse voneinander unterscheidet.

In dieser Arbeit wird sich vorrangig auf die HFrEF konzentriert, da diese durch die transaortale Konstriktionsoperation (TAC-OP) induziert und leicht durch eine Messung der linksventrikulären Ejektionsfraktion in der transthorakalen Echokardiographie nachgewiesen werden kann.

Außerdem wird die Herzinsuffizienz anhand der klinischen Symptomatik in die vier Stadien der NYHA-Klassifikation eingeteilt (siehe **Tabelle 1.1**).

Tabelle 1.1: NYHA-Klassifikation (Dolgin 1994)

NYHA-Stadium	Subjektive Beschwerden
I	Herzkrankheit ohne körperliche Limitationen
II	Beschwerden bei mittelschwerer körperlicher Belastung
III	Beschwerden bei leichter körperlicher Belastung
IV	Ruhebeschwerden

Therapeutisch stehen an erster Stelle eine Ursachensuche und die Beseitigung von kausalen Ursachen, wie zum Beispiel Herzklappenvitien zur Verbesserung der kardialen Funktion, sowie

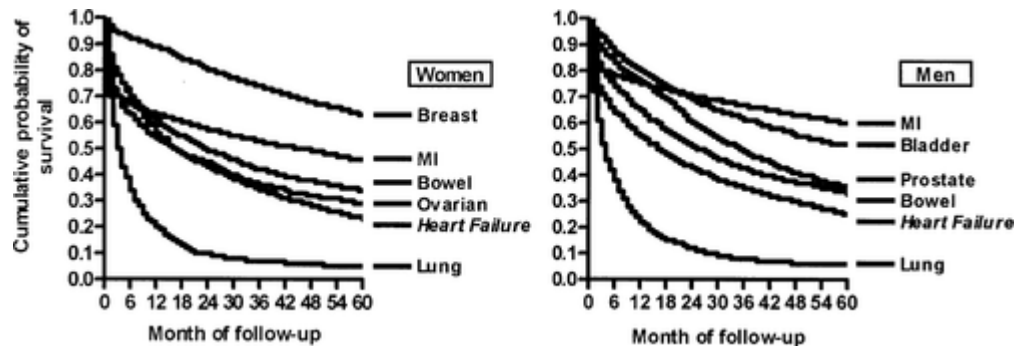
das Verhindern einer Aggravierung durch Einstellung von Risikofaktoren, wie einer Hypertonie. Die pharmakologische Stufentherapie richtet sich vorrangig nach den Stadien der NYHA-Klassifikation und beinhaltet ACE-Hemmer, Angiotensin-Rezeptorblocker, Beta-Blocker, Aldosteronantagonisten (Spironolacton und Eplerenon), Angiotensin-Rezeptor-Neprilysin-Inhibitor (ARNI), Ivabradin, bei Nachweis von Ödemen den rein symptomatischen Einsatz von Diuretika und in besonderen Fällen Digoxin oder H-ISDN. Nichtpharmakologisch ist die Versorgung von Patienten mit symptomatischer HFrEF ($EF \leq 35\%$) mit einem ICD und die kardiale Resynchronisationstherapie (CRT) nennenswert.

Weltweit sind circa 26 Millionen Menschen von einer Herzinsuffizienz betroffen (Ponikowski et al. 2014), was diese Krankheit zu einem Problem globaler Signifikanz mit epidemischen Ausmaßen macht. Durch die deutliche Verbesserung in der Versorgung von Myokardinfarkten und der durch den demografischen Wandel alternden Bevölkerung, hat auch die Prävalenz der Herzinsuffizienz in den letzten Jahrzehnten drastisch zugenommen, sodass eine Prävalenz von 3,4% im Jahr 2017 in Deutschland erreicht wurde (Holstiege et al. 2018), wobei circa zwei Drittel der diagnostizierten Patienten älter als 75 Jahre waren (Christ et al. 2016). Zusätzlich ist die Herzinsuffizienz mittlerweile der häufigste Hospitalisierungsgrund mit 2,1% der Klinikeinweisungen, aber auch 2,9% aller im Krankenhaus verbrachten Tage und 8,8% aller im Krankenhaus Verstorbenen im Jahr 2013 in Deutschland (Christ et al. 2016).

Stewart et al. zeigten 2001 in einer vergleichenden Arbeit des 5-Jahres-Überlebens von Patienten mit Ersteinweisung durch eines der häufigsten Malignome beziehungsweise einer Herzinsuffizienz, dass diese mit Ausnahme des Lungenkarzinoms mit durchschnittlich 25% die geringste Überlebenswahrscheinlichkeit aufweist (siehe **Abbildung 1.1**). Trotz neuer Therapieansätze und Verbesserungen im Bereich der Medikation hat sich die Prognose der Herzinsuffizienz im Vergleich zu den häufigsten Krebsarten nicht verbessert. Eine schottische Studie aus dem Jahr 2017 zeigt, dass das 5-Jahres-Überleben einer HI schlechter ist als das eines Prostata- oder Blasenkarzinoms bei Männern oder eines Mammakarzinoms bei Frauen. Eine im Vergleich zur HI schlechtere Prognose wird bei Bronchialkarzinom, kolorektalem Karzinom und Ovarialkarzinom beschrieben (Mamas et al. 2017). Demnach hat sich die Prognose der HI seit 2001 verbessert, bleibt aber dennoch schwerwiegender als die häufigste Krebsdiagnose beider Geschlechter. Trotzdem wird die Diagnose einer Herzinsuffizienz bei weiten Teilen der Bevölkerung nicht als annähernd so gravierend empfunden wie die Diagnose

„Krebs“, denn der klinische Verlauf und die Mortalität der Herzschwäche sind der Bevölkerung weitgehend unbekannt.

Abbildung 1.1: *„More malignant than Cancer“* – Maligner als Krebs



Quelle: (Stewart et al. 2001). Kumulative Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten nach Ersteinweisung mit Herzinsuffizienz (heart failure), Myokardinfarkt (MI) und den häufigsten Krebsarten (Mammakarzinom, Kolonkarzinom, Ovarialkarzinom, Lungenkarzinom, Prostatakarzinom, Blasenkarzinom) mit einem Follow-up von 60 Monaten.

Links: Frauen. Rechts: Männer.

Trotz einer optimalen pharmakologischen und nicht-pharmakologischen Therapie ist die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit Herzinsuffizienz immer noch unzufriedenstellend und der Leidensdruck durch die Symptome hoch. Somit sind experimentelle und klinische Forschung sowie innovative neue Ideen auf diesem Gebiet dringend nötig, um die Pathophysiologie des Syndroms besser verstehen und neue Therapieansätze entwickeln zu können.

1.2 Humanes intestinales Mikrobiom

Der Begriff Mikrobiom bezieht sich auf einen gesamten Lebensraum mitsamt den dort vorhandenen Mikroorganismen, deren Genome und die sie umgebenden Bedingungen (Marchesi und Ravel 2015). Das humane intestinale Mikrobiom schließt also alle Bakterien, Archaeen, Eukaryonten und Viren, ihre Genome (z.B. Gene) und die Lebensbedingungen im menschlichen Intestinum ein. Wird sich nur auf die Vielfalt an Mikroorganismen in einem bestimmten Milieu bezogen, so betitelt man diese als Mikrobiota (Marchesi und Ravel 2015).

Mit einer Zahl von 10^{12} bis 10^{14} Bakterien, vorrangig Firmicutes und Bacteroidetes, hat das intestinale Mikrobiom mehr Zellen vorzuweisen, als der gesamte menschliche Körper mit circa 10^{11} Zellen (Stallmach und Vehreschild 2016). Trotz seiner Größe und Wichtigkeit für die physiologische Funktion des menschlichen Körpers, seien es seine bei der Verdauung

helfenden, immunologischen oder metabolischen Fähigkeiten, wurde dem Mikrobiom lange Zeit wenig Aufmerksamkeit geschenkt.

Durch den technischen Fortschritt und die Etablierung von Hochdurchsatz-Sequenzierungsmethoden wurde die Charakterisierung, Analyse und demnach Forschung am Mikrobiom an sich jedoch zunehmend einfacher und attraktiver, sodass Publikationen exponentiell anstiegen. Mithilfe des Human Microbiome Project (HMP) wurde die Spannweite eines physiologischen Mikrobioms weitestgehend durch Analyse von über 2000 Proben definiert (Huttenhower et al. 2012), was den Vergleich mit vermutet pathologischen Mikrobiomen ermöglicht.

Erfolgreiche Mikrobiomforschung mit der Konsequenz neuer Therapiemöglichkeiten ist beispielsweise die bereits klinisch etablierte Behandlung von rezidivierenden *Clostridium difficile* Infektionen mit fäkalem Mikrobiomtransfer von Individuen mit physiologischem Mikrobiom (van Nood et al. 2013), wie bereits in der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen (DGVS) zu ‚Gastrointestinalen Infektionen und Morbus Whipple‘ festgehalten ist (Hagel et al. 2015).

1.3 Verknüpfungen zwischen Mikrobiom und Herz

Im Laufe der Zeit hat sich die medizinische Sicht auf die Herzinsuffizienz von einer eindimensionalen Krankheit, die lediglich das Herz betrifft, zum mehrdimensionalen, den gesamten Organismus betreffenden klinischen Syndrom gewandelt (Ponikowski et al. 2016). Patienten mit Herzinsuffizienz weisen erhöhte Spiegel von Entzündungsmediatoren, wie CD14, TNF α und IL-6 (Anker et al. 1997), sowie höhere zirkulierende Mengen an bakteriellen Endotoxinen (z.B. LPS) auf (Peschel et al. 2003), was den Status einer systemischen Inflammation beschreibt.

Durch die geringere Auswurfraction bei einer HFrEF oder HFmrEF leidet die systemische Durchblutung und somit auch die gastrointestinale Versorgung. Aufgrund der Minderdurchblutung kommt es zur intestinalen Ischämie, erhöhter intestinaler Permeabilität, intestinaler Ödembildung und einer höheren bakteriellen Besiedlung in der Mukusschicht (Sandek et al. 2007; Krack et al. 2004; Pasini et al. 2016). Dieser Zustand, der auch als ‚*leaky gut*‘, also zu Deutsch ‚durchlässiger Darm‘, beschrieben wird, legt nahe, dass die Barriere im Intestinum durchlässiger für pathogene Keime und deren Endotoxine werden kann.

Die ‚*gut-hypothesis*‘ (Darm-Hypothese) in der Herzinsuffizienzforschung versucht nun die vorliegende systemische Inflammation mit einer bakteriellen Translokation und einem Übertreten von Endotoxinen oder Mikroorganismen selbst in den Blutkreislauf, welches durch die verminderte Barriereleistung des Darms begünstigt wird, zu erklären.

Die mikrobielle Dysbiose ist bei einer steigenden Anzahl anderer Erkrankungen bereits nachgewiesen oder gerade vielversprechendes Forschungsfeld, beispielsweise bei Atherosklerose (Karlsson et al. 2012; Koren et al. 2011), Übergewicht (Ley et al. 2006; Turnbaugh et al. 2009) oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Zuo und Ng 2018) und ist demnach ein möglicher Faktor in der Pathogenese vieler Erkrankungen.

1.4 Zielsetzung

Zielsetzung der Arbeit ist es, im Mausmodell die Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms bei Tieren mit durch transaortaler konstringierender Operation induzierter Herzinsuffizienz, einer Gruppe von operierten, aber nicht konstringierten und nicht operierten Kontrolltieren zu untersuchen.

Hierbei soll die Hypothese einer Veränderung des Mikrobioms zwischen den Versuchstieren mit induzierter Herzinsuffizienz und den Kontrolltieren validiert werden.

Zusätzlich soll untersucht werden, ob sich signifikante Unterschiede in Alpha- und/oder Beta-Diversität in und zwischen den einzelnen Versuchsgruppen zeigen und ob ein einzelnes Bakterium oder eine Gruppe weniger Bakterien identifiziert werden kann, die die veränderte Zusammensetzung des Mikrobioms näher charakterisieren, sofern diese nachgewiesen wurde.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bezugsquellen

Die Bezugsquellen für die Materialien in alphabetischer Reihenfolge waren:

Analytik jena AG, Jena, Deutschland

Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland

Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Illumina Inc., San Diego, USA

Kleinfeld Labortechnik GmbH, Gehrden, Deutschland

Metabion International AG, Planegg/Steinkirchen, Deutschland

Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

Zymo Research Europe GmbH, Freiburg, Deutschland

2.1.2 Versuchstiere

Alle Tierversuche wurden von den Tierschutzbeauftragten der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel am 2. Januar 2018 genehmigt und waren ebenso wie die Haltung und Organentnahme immer im Einklang mit dem derzeit gültigen Tierschutzgesetz (TierSchG).

Die Versuchstiere wurden im Alter von sieben Wochen von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) erworben. Hierbei handelte es sich um C57BL/6J Mäuse. Diese wurden

in Käfigen mit künstlichem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten (12 h / 12 h) und mit pelletiertem Standard Nagetier Futter ernährt.

Nachdem die Tiere eine Woche lang an die Gegebenheiten unseres Labors gewöhnt wurden, startete die Studie mit Mäusen, die nun 8 Wochen alt waren.

Insgesamt wurden in die Studie 39 Versuchstiere einbezogen. Diese wurden auf drei Versuchsgruppen aufgeteilt. An der ersten Gruppe wurde die TAC Operation vollzogen (siehe Kapitel **2.2.1 TAC Operation**), während an der zweiten Gruppe die gleiche Operation mit Ausnahme der aortalen Konstriktion durchgeführt wurde (Sham Operation). Zusätzlich gab es eine Kontrollgruppe von Versuchstieren, die keiner Operation unterzogen wurden. **Tabelle 2.1** zeigt die Aufteilung der insgesamt 39 Tiere auf die drei verschiedenen Versuchsgruppen.

Tabelle 2.1: Einteilung der Versuchstiere in die einzelnen Versuchsgruppen

Prozedur	TAC Operation	Sham Operation	Kontrollgruppe
Anzahl der Versuchstiere	17	10	12

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2.2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Angabe der Katalognummer und des Herstellers

Chemikalie / Reagenz (Katalognummer)	Hersteller
Biozym LE Agarose (Nr. 840004)	Biozym Scientific
Buffer AE (Nr. 19077)	Qiagen
Buffer AL (Nr. 19075)	Qiagen
Buffer ASL (Nr. 19082)	Qiagen
Buffer AW1 (Nr. 19081)	Qiagen
Buffer AW2 (Nr. 19072)	Qiagen
Microbial Community DNA Standard (Nr. D6306)	ZymoBIOMICS
dNTP Set (dATP, dTTP, dGTP, dCTP; Nr. R0182)	Thermo Fisher Scientific
Power Bead Tubes, Garnet 0,70 mm (Nr. 13123-50)	Qiagen
InhibitEx Tabletten	Qiagen
Phusion Hot Start II DNA Polymerase (Nr. F559L)	Thermo Fisher Scientific
Rotiphorese 10x TAE-Puffer (Nr. T845.2)	Carl Roth

RT-PCR Grade Water (Nr. AM9935)	Thermo Fisher Scientific
SequelPrep Normalization Binding Buffer	Thermo Fisher Scientific
SequelPrep Normalization Elution Buffer	Thermo Fisher Scientific
SequelPrep Normalization Wash Buffer	Thermo Fisher Scientific
SYBR Safe DNA Gel Stain (Nr. S33102)	Thermo Fisher Scientific
5x Phusion HF Buffer (Nr. F518L)	Thermo Fisher Scientific

2.1.4 Kits

Tabelle 2.3: Verwendete Kits mit Angabe der Katalognummer und des Herstellers

Kit (Katalognummer)	Hersteller
QIAamp Stool Mini Kit (Nr. 51504)	Qiagen
SequalPrep Normalization Plate Kit (Nr. A10510-01)	Thermo Fisher Scientific
MiSeq Reagent Kit V3 (Nr. MS-102-3003)	Illumina

2.1.5 Primer

Für die Polymerase-Kettenreaktion wurden verschiedene Forward- und Reverse-Primer verwendet, die von der Firma Metabion erworben wurden.

Tabelle 2.4: Verwendete PCR-Primer

Primer Name	DNA-Sequenz 5' – 3'	
i5 – 27F	AAT GAT ACG GCG ACC GAG ATC TAC AC (MID) TA TGG TAA TTG TAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG	
	Barcodes	
	Primer Name	MID-Barcode
	27F-MID-1	A ACC GCA T
	27F-MID-2	A AGG CCT T
	27F-MID-3	A GAG TGT G
	27F-MID-4	C ACA AGT C
	27F-MID-5	C GTT CCT A
	27F-MID-6	G CTT GGA T
	27F-MID-7	G TCA ACA C
	27F-MID-8	G TCA CTG A
	27F-MID-9	T CTC GTC A
	27F-MID-10	T TGG TAC G
	27F-MID-11	C GTT GGA T

	27F-MID-12	C GTT AAG C
	27F-MID-13	A CAG CTC A
	27F-MID-14	G ACA AGT G
	27F-MID-15	G CAT TAG C
	27F-MID-16	T GTG GAC T
i7 – 338R	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT (MID) A GTC AGT CAG CCT GCT GCC TCC CGT AGG AGT	
	Barcodes	
	Primer Name	MID-Barcode
	338R-MID-A	AAC CGG AA
	338R-MID-B	AGA GTG AC
	338R-MID-C	CAA CTG GT
	338R-MID-D	CGT TCG TT
	338R-MID-E	CTG TTC AC
	338R-MID-F	GCT TGC AA
	338R-MID-G	GTC AAC TG
	338R-MID-H	TCC TCA TG
	338R-MID-I	TCG ACT AG
	338R-MID-J	TTG CAA GC
	338R-MID-K	ACA CCT CT
	338R-MID-L	ATC GTA GC
	338R-MID-M	CTC TTG AC
	338R-MID-N	CCT ACC AT
	338R-MID-O	CTG AAG TC
	338R-MID-P	ACG ATC GT
	338R-MID-Q	ATA TGG CC
	338R-MID-R	TTC GAT GG
	338R-MID-S	TAC GTA CG
	338R-MID-T	GAT CAC GT
	338R-MID-U	GTG ACA GA
	338R-MID-V	TGA GTG TC
	338R-MID-W	GAG AAG AG
	338R-MID-X	TCT GGA CA

2.1.6 Laborgeräte

Tabelle 2.5: Verwendete Laborgeräte mit Angabe der Katalognummer und des Herstellers

Laborgerät (Katalognummer)	Hersteller
SpeedMill PLUS (Nr. 845-00007-2)	Analytik Jena
Centrifuge 5424 R (Nr. 5404000010)	Eppendorf

Hochleistungs-Vortex-Schüttler (Nr. 444-7130)	VWR
Thermoblock-Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik
Thermomixer comfort (Nr. 5355000.011)	Eppendorf
QIAcube (Nr. 9002840)	Qiagen
Research plus Pipetten, 3 Größen (Nr. 3123000020/47/63)	Eppendorf
Biosphere Filter Tips Pipettenspitzen (Nr. 70.760.212/70.762.211)	Sarstedt
Mikroreaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf
GeneAmp PCR System 9700 (Nr. N8050200)	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific
96 PCR Plate (Nr. 72.1979.102)	Sarstedt
MiSeq® System (Nr. SY-410-1003)	Illumina
Sub Cell GT System (Nr. 170-4401)	Bio-Rad Laboratories

2.1.7 IT-Programme und Datenbanken

Tabelle 2.6: Verwendete Softwares und Datenbanken mit Quellenangabe

Software / Datenbank	Quelle
FastTree	http://microbesonline.org/fasttree/
Flash v.1.2.11	http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/
Mothur v.1.36.0	http://mothur.org/
MS Office	Microsoft (Redmond, USA)
Mvabund Package v.3.11.5 für R	http://cran.r-project.org/web/packages/mvabund/
R	http://www.r-project.org/
RDP Classifier	http://rdp.cme.msu.edu/
Ribosomal Database Project (RDP)	http://rdp.cme.msu.edu/
Uchime	http://drive5.com/uchime/
Usearch v.7	http://drive5.com/usearch/
Vegan Package v.2.3 für R	http://cran.r-project.org/web/packages/vegan

2.2 Methoden

Alle beschriebenen Tierversuche wurden am 02. Januar 2018 vom Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung sowie von den Tierschutzbeauftragten der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel genehmigt (s. Tierversuchsantrag im Anhang).

2.2.1 TAC-Operation

Die TAC-Operation (Transverse Aortic Constriction) ist eine Methode, mit der die Aorta der behandelten Maus verengt wurde, sodass sich die Nachlast des Herzens nach dem Durchführen der Prozedur deutlich erhöhte. Nachfolgend kam es zur Druckbelastung mit anschließender konzentrischer Hypertrophie und Linksherzinsuffizienz.

Die Konstriktion der Aorta erfolgte im Bereich des Aortenbogens zwischen dem Truncus brachiocephalicus und der A. carotis communis sinistra.

Initial erhielt die Maus eine Analgesie mit 0,1mg/kg Buprenorphin subkutan (130 µl in eine 20 g Maus, als Injektionsvolumen). Darauf folgend wurde das Tier mit 3% (v/v) Isofluran in einer Kammer narkotisiert. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte ebenfalls mit Isofluran (2-3% v/v). Durch die Operation am eröffneten Thorax wurde eine Intubation mit einem flexiblen Tubus nötig. Die Beatmung erfolgte mit einem Tidalvolumen von 200 µl und einer Atemfrequenz von 120-130 Zügen/Minute.

Während der gesamten Prozedur (operativ und postoperativ) wurde die Temperatur des Tieres durch fortlaufende rektale Kontrolle mit automatischer Feedbackregulation überwacht. Die Operation erfolgte auf einem beheizbaren Operationstisch.

Der linke Hemithorax der Maus wurde mit einem Rasierer enthaart und im Bereich der Rippen wurde eine Lokalanästhesie mit Lidocain (5 mg/ml) subkutan appliziert (30 µl/25 g Maus). Anschließend wurde der Hemithorax mit einem in Polividon-Jod getränkten Wattestäbchen desinfiziert.

Es folgte ein zirka 0,5 cm breiter, transversaler Hautschnitt im Bereich des zweiten Intercostalraums. Der Thorax wurde mit einer stumpfen Pinzette auf der linken Seite des Sternums im zweiten Intercostalraum eröffnet. Anschließend wurde unter einem Operationsmikroskop der Aortenbogen mit zwei anatomischen Pinzetten freipräpariert und mobilisiert. Der Aortenbogen wurde nun mit einem 6-0 Prolene-Faden (Ethicon) angeschlungen und auf ihm eine 26G-Nadel platziert. Es folgte eine Ligatur um die 26G-Nadel

und den Aortenbogen, worauf die Nadel entfernt wurde und der Durchmesser des Aortenbogens danach zirka 26G betragen sollte.

Da die Muskulatur mit einer Pinzette stumpf präpariert wurde, ist hier keine Naht nötig, da eine ausreichende Adaptation gewährleistet war. Die Hautnaht wurde mit 5-0 Vicryl rapid (Ethicon) vollzogen.

Insgesamt betrug die Zeitdauer der Operation eines Tiers in etwa 15 Minuten.

Bei der Scheinoperation der ‚Sham-Mäuse‘ wurden alle Schritte wie oben beschrieben durchgeführt, mit Ausnahme der Konstriktion der Aorta.

Die postoperative Analgesie wurde mit Buprenorphin im Trinkwasser (5 ml Temgesic® [Buprenorphin 0,3 mg/ml] in 150 ml Trinkwasser) für zwei Tage durchgeführt. Um eine ungestörte Genesung sicherzustellen, wurden die Mäuse während der Aufwachphase isoliert im Käfig gehalten.

2.2.2 Echokardiographie

Die transthorakale Echokardiographie wurde zur Evaluierung des Erfolgs der TAC-Operation an Tag 14 und 28 nach der Operation an Versuchstieren der Gruppen ‚TAC‘ und ‚Sham‘ durchgeführt.

Hierzu wurde das Visualsonics Vevo 3100 Ultraschallgerät verwendet und die Herzfrequenz der Maus konstant bei 400-500 bpm gehalten.

Die Versuchstiere erhielten eine Anästhesie mit Isofluran (2-3% v/v), wurden zum Wärmemanagement auf einer beheizten Platte platziert und die Herzfrequenz und Temperatur wurden während der Echokardiographie durchgehend kontrolliert und aufgezeichnet.

Im B-Mode in der parasternal langen Achse wurden nun das Cardiac Output (CO), das Schlagvolumen (SV), das enddiastolische sowie das endsystolische Volumen (EDV / ESV) bestimmt. Im M-Mode wurden zusätzlich die linksventrikuläre anteriore und posteriore Wand (LVAW; LVPW), sowie der linksventrikuläre internale Durchmesser (LVID) jeweils in der Diastole vermessen.

2.2.3 Proben- und Organentnahme

An den Tagen 0, 7, 14, 28 und 42 nach der Operation oder der Schein-Operation wurden Stuhlproben aller Tiere gesammelt, die in Stuhlröhrchen transferiert wurden und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert wurden.

Alle Mäuse wurden an Tag 42 getötet. Ihnen wurden Herz, Lunge, sowie Ileum entnommen. Die Organe wurden gewogen und sofort bei -80°C eingefroren gelagert.

2.2.4 16s rRNA Sequenzierung

2.2.4.1 Extraktion und Aufreinigung der DNA

Die DNA-Extraktion erfolgte mithilfe des DNA Stool Mini Kit und dem automatisierten QIAcube der Firma Qiagen.

Tabelle 2.7: Inhaltsstoffe des DNA Stool Mini Kit, Qiagen

Inhaltsstoffe	Anzahl / Menge
QIAmp Mini Spin Columns	50
Collection tubes	200
InhibitEx Tabletten	50
Buffer ASL	140 ml
Buffer AL	33 ml
Buffer AW1 (Konzentrat)	19 ml
Buffer AW2 (Konzentrat)	13 ml
Buffer AE	15 ml
Selection guide	1

Zunächst wurden die Stuhlproben der Mäuse aus dem -80°C Gefrierschrank entfernt und aufgetaut.

Anschließend wurde eine Spatelspitze, dies entspricht etwa 180-220 mg Stuhl, in ein vorbereitetes Garnet Beat Tube (PowerBead Tubes, Garnet, 0,7 mm) gegeben, welches zuvor mit 1,1 ml ASL Buffer befüllt wurde.

Danach wurden die Röhrchen im SpeedMill plus Shredder (Analytik Jena) für 45 Sekunden bei 40-50 Hz homogenisiert und für 5 Minuten in den auf 95°C vorgeheizten Thermoblock (Kleinfeld Labortechnik) gestellt.

Im Anschluss wurden die Röhrchen bei 15000 rpm 3 Minuten lang zentrifugiert und der Überstand (1000 µl) in ein 2 ml Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf) pipettiert. Zusammen mit dem Überstand wurde eine im DNA Stool Mini Kit enthaltene InhibitEx-Tablette in das Mikroreaktionsgefäß gegeben, die bei der PCR störende, inhibitorische Substanzen entfernen soll.

Die Proben wurden für 2 Minuten auf den Thermomix (Eppendorf) bei 37°C und 750 rpm gegeben und anschließend bei 15000 rpm 2 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand (350 µl) wurde in den vorbereiteten Rotor Adapter pipettiert, der QIAcube mit Pipettenspitzen, Qiagen spin columns, 1,5 ml Mikroreaktionsgefäßen und den benötigten Puffern beladen und ein neues Extraktionsprotokoll gestartet.

Die folgenden Schritte fanden vollautomatisiert innerhalb des QIAcubes statt.

Zunächst wurden in den Proben vorhandene Proteine mit Proteinkinase K und einer Inkubation bei 70°C denaturiert. Danach wurde durch Zugabe verschiedener Puffer (AL, AW1, AW2) und mehrere Zentrifugationsschritte die DNA an die Membran der QIAamp Spin Columns gebunden und alle, die PCR inhibierende und verunreinigende Substanzen ausgewaschen. Schließlich wurde die reine genomische DNA mit Hilfe eines weiteren Puffers (AE) eluiert und konnte für die folgende PCR verwendet werden. Der Ertrag an DNA ist nach der Extraktion und Aufreinigung zirka 15-60 µg, kann aber je nach Beschaffenheit der Probe und Lagerung von 5 bis 100 µg variieren. Bis zur Durchführung der PCR wurde die extrahierte DNA bei -20°C gelagert.

2.2.4.2 Amplifikation des bakteriellen 16s rRNA Gens mittels Polymerase-Kettenreaktion

Tabelle 2.8: Verwendete Reagenzien zur Amplifikation mittels PCR

Reagenzien	1 x Reaktion
Master Mix	7,5 µl
DNA-Vorlage	1 µl
Primer i5 – 27F (2 µM)	2 µl
Primer i7 – 338R (2 µM)	2 µl

Tabelle 2.9: Verwendete Reagenzien zur Herstellung des Master Mix für die Polymerase-Kettenreaktion

Reagenzien	1x 96 well plate	1x Reaktion
H2O	460 µl	4,6 µl
5x buffer	250 µl	2,5 µl
dNTP Mix 10mM	25 µl	0,25 µl
Taq-Polymerase	15 µl	0,15 µl

Es wurde nun die V1- und V2-Region des bakteriellen 16s rRNA-Gens der extrahierten und aufgereinigten DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Hierzu wurden die in **Tabellen 2.8** und **2.9** aufgeführten Reagenzien, sowie die in **Tabelle 2.4** dargestellten Primer verwendet. Jede DNA-Probe erhielt ein spezifisches Primerpaar der i5 – 27F (forward) und i7 – 338R (reverse) Primer. Der einzelne Primer setzt sich jeweils aus einem Start-Primer für die Sequenzierung (Illumina-Primer), einem individuellen Barcode (MID, je nach Probe unterschiedlich), einem Primer Pad, welches intramolekuläre Basenpaarungen während der PCR verhindern soll, sowie einem Primer Linker, das ein Verbindungsstück zu dem genspezifischen forward- beziehungsweise reverse-Primer (27F/338R) darstellt. Für den i5 – 27F Primer sind 16 (1 – 16) und für den i7 – 338R Primer sind 24 verschiedene (A – X) Barcodesequenzen verfügbar. Insgesamt ergeben sich daraus 384 Kombinationsmöglichkeiten. Im Folgenden ist dieser Aufbau am Beispiel des Primers 27F-MID-1 und 338R-MID-A aufgezeigt.

Tabelle 2.10: Aufbau der i5 – 27F und i7 – 338R Primer

27F-MID-1	5' AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACA ACC GCA TTA TGG TAA TTG TAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG 3'
338R-MID-A	5' CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT ACC CGG AAA GTC AGT CAG CCT GCT GCC TCC CGT AGG AGT 3'

Illumina-Primer; Barcode-Sequenz; Primer Pad; Primer Linker; 27F/338R-Primer

Während der PCR wurde der folgende Temperaturzyklus durchlaufen.

Tabelle 2.11: Temperaturzyklus der PCR zur Amplifikation des 16s rRNA Gens

Temperatur in °C	Dauer	
98	30 Sek	} 30 Zyklen
98	9 Sek	
50	60 Sek	
72	90 Sek	
72	10 Min	
12	∞	

Es erfolgte jeweils eine Negativ- und eine Positivkontrolle, wobei die Positivkontrolle mit ZymoBIOMICS Microbial Community DNA Standard (Zymo research) durchgeführt wurde.

Die Zielgröße der DNA lag bei zirka 450 bp und die Kontrolle der PCR-Produkte wurde mittels Gelelektrophorese mit 2%-Agarosegel (4g Agarose, 200 ml TAE Puffer (1x) und 4 µl SYBR Safe (Thermo Fisher Scientific); 110V, 60 Minuten, Sub-Cell GT System) durchgeführt.

2.2.4.3 Aufreinigung und Normalisierung der PCR-Produkte

Zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurde das SequelPrep Normalization Plate Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die PCR-Produkte werden in die SequelPrep Normalization Platte pipettiert (96 well-plate Format) und mit dem Binding Puffer gemischt und für eine Stunde in der Platte gebunden. Anschließend wurden mit Hilfe eines Waschpuffers alle, die pure DNA verunreinigende Substanzen (Proteine, kurze Oligonukleotidprimer) ausgewaschen und schließlich die gereinigte DNA mittels Elutionspuffer aus der Platte herausgelöst.

2.2.4.4 Sequenzierung

Mittels des MiSeq Sequenzierers (Illumina) und des dazugehörigen MiSeq Reagent Kit v3 (2 x 300 bp, Illumina) wurden die vorbereiteten und aufgereinigten DNA-Proben nach Herstellerangaben durch das Institut für Klinische Molekularbiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel sequenziert.

Hierzu wurden mehrere Proben, auch Dritter, gleichzeitig in einem Ansatz sequenziert, damit das MiSeq Gerät effizient ausgelastet ist. Die Konzentrationsmessung wurde mit einem Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) und dem passenden Qubit dsDNA BR Assay Kit derselben Firma nach Herstellervorgaben vorgenommen.

2.2.5 Analyse der Gensequenzen

2.2.5.1 Ordnung und Qualitätskontrolle

Zunächst erfolgte die Zuordnung der Sequenzen zu den einzelnen Proben anhand der fehlerfreien Übereinstimmung der Barcode-Sequenzen. Vorwärts- und Rückwärts-Sequenzfragmente wurden mit Hilfe der FLASH Software (Magoč und Salzberg 2011) zusammengeführt. Der erlaubte Overlap hierfür betrug 250 – 300 bp.

Der Q-Score des MiSeq Sequenziergerätes (FastQ Format, Illumina) wurde zur Qualitätskontrolle der Sequenzfragmente verwendet. Ermittelt aus dem Phred Quality Score (Sanger-Sequenzierung) bestimmt der Q-Score die Wahrscheinlichkeit eines falschen Basenauftrufes während der Sequenzierung (Ewing und Green 1998). Unter Verwendung der UCHIME Software wurden alle Sequenzen mit einem Q-Score von unter 30 in weniger als 95% der Nukleotide, dies entspricht einer Wahrscheinlichkeit von 1 : 1.000 eines fälschlichen Basenauftrufes, identifiziert und aussortiert (Edgar et al. 2011).

Ebenfalls wurden mittels der UCHIME Software chimäre Sequenzen entfernt. Diese können entstehen, wenn mehrere Genfragmente unterschiedlicher Herkunft während der Sequenzierung fusionieren und könnten als eigenständige Spezies fehlinterpretiert werden und somit die Diversität in den untersuchten Proben fälschlicherweise beeinflussen (Edgar et al. 2011).

2.2.5.2 Bildung von OTUs, Phylogenetik und taxonomische Zuordnung

Nach der Sortierung und Qualitätskontrolle erfolgte die Bildung von OTUs aus den generierten Sequenzdaten. Verwendet wurden die Software USEARCH und der RDP CLASSIFIER. Bei einer Übereinstimmung von $\geq 97\%$ der Sequenzen wurden diese zu einer OTU zusammengefasst. Alle Abschnitte pro Probe wurden mittels USEARCH als OTU Tabelle abgebildet. Abundanzen der einzelnen OTUs wurden durch 10.000 zufällig ausgewählte Sequenzen aus jeder untersuchten Probe bestimmt.

Zur phylogenetischen Untersuchung wurde zunächst eine multiple Alignierung (MSA) der OTU-Sequenzen mit Hilfe von MUSCLE durchgeführt (Edgar 2004a, 2004b) um Ähnlichkeiten festzustellen. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten wurde mit FASTTREE ein phylogenetischer Baum generiert (Price et al. 2010).

Mittels der Befehle unfrac.weighted, unfrac.unweighted und phylo.diversity des MOTHUR Software Pakets (Schloss et al. 2009) wurden die phylogenetische Diversität sowie die UniFrac Distanzen berechnet (Lozupone und Knight 2005; Faith 1992). Hierzu dienten die vorher erstellten Abundanzen der OTUs und die Verzweigungen des phylogenetischen Baumes.

Zur taxonomischen Zuordnung wurde der RDP CLASSIFIER des Ribosomal Database Project (RDP) und das jüngste 16S rRNA Training Set verwendet (Cole et al. 2014; Wang et al. 2007).

Die Abundanzen der Bakterien wurden aus den oben beschriebenen taxonomischen Informationen ermittelt. Diesbezüglich wurden drei unterschiedliche taxonomische Ränge berücksichtigt: Stamm (*phylum*), Familie (*family*) und Gattung (*genus*). Als ‚unkl._[Familie]‘ wurden Bakterien bezeichnet, die einen Klassifikationsscore von weniger als 0,8 auf Gattungsebene aufwiesen.

2.2.5.3 Statistische Berechnungen

Die statistischen Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Programms R (Team op. 2010). Zusätzlich wurden die Erweiterungen VEGAN PACKAGE (Oksanen et al. 2017) und MVABUND PACKAGE (Wang et al. 2012b) für R verwendet. Das Signifikanzniveau betrug $\alpha = 0,05$.

2.2.5.3.1 *Alpha-Diversität*

Zur Untersuchung der Alpha-Diversität, die die intraindividuelle Diversität der einzelnen Proben beschreibt, wurden der Chao1 Index und Shannon Index mithilfe der Befehle des VEGAN Package in R hierfür verwendet.

Der Chao 1 Index (Chao 1984) schätzt die Diversität verschiedener Proben, indem er die erwarteten OTUs aus den observierten OTUs kalkuliert. Hierbei werden vor allem auch die Spezies im ‚low-abundance‘ Spektrum durch die vorrangige Miteinbeziehung der Spezies, die nur ein oder zwei Mal in der Probe vorkommen (singletons / doubletons), berücksichtigt.

Der Shannon Index (Shannon 1948) beschreibt die (Bio-)Diversität in einer Population. Hierfür wird sowohl die Artenvielfalt als auch die Abundanz der verschiedenen Taxa berücksichtigt. Demnach fungiert er als Maß der *evenness*, also der Gleichverteilung beziehungsweise der Ungleichverteilung in einer Population oder Gemeinschaft von Arten.

Im Anschluss wurden die bestimmten Diversitätsmaße mithilfe von Boxplots dargestellt und durch eine Varianzanalyse (ANOVA; normalverteilte Daten) oder mittels des Wilcoxon signed-rank Test (nicht normalverteilte Daten, ordinale Daten), um Unterschiede zwischen zwei Zeitpunkten darzustellen, auf signifikante Unterschiede getestet (Wilcoxon 1945).

2.2.5.3.2 *Beta-Diversität*

Mittels der Beta-Diversität können die Unterschiede hinsichtlich der Vielfältigkeit zwischen unterschiedlichen Gemeinschaften probenübergreifend, in verschiedenen Lokalisationen oder Habitaten untersucht werden.

Beschrieben werden kann diese Vielfalt entweder mithilfe von phylogenetischen oder nicht-phylogenetischen Abstandswerten.

Phylogenetische Hilfsmittel zur Darstellung sind UniFrac Messungen, die mit MOTHUR berechnet werden. Hierbei werden evolutionsbiologische Bäume der verschiedenen Taxa erstellt und deren Nähe zueinander durch den Vergleich der gemeinsamen und unterschiedlichen Astabschnitte berechnet (unweighted; ungewichtet). Gewichtete (weighted) UniFrac Distanzen werden durch den Miteinbezug der Abundanzen der einzelnen Taxa erreicht. UniFrac Distanzen können Werte zwischen 0 (=identisch) und 1 (=vollkommen unterschiedlich) in der Beschreibung der Diversität annehmen (Stallmach und Vehreschild 2016).

Als nicht-phylogenetische Metrik wurde der Bray-Curtis Index verwendet, der unabhängig vom phylogenetischen Baum die Vielfalt beziehungsweise Ähnlichkeit der unterschiedlichen Gemeinschaften hinsichtlich ihrer Abundanz und dem Auftreten verschiedener Taxa vergleicht. Der Bray-Curtis Index kann ebenfalls Werte zwischen 0 (=identisch) und 1 (=vollkommen unterschiedlich) beinhalten (Bray und Curtis 1957).

Die Unterschiede in der Diversität wurden durch eine Hauptkoordinatenanalyse (Principal Component Analysis, PCOA) graphisch dargestellt. Hierbei wurden zunächst die verschiedenen Zeitpunkte (Tag 0, 7, 14, 28, 42) innerhalb einer Versuchsgruppe miteinander verglichen. Im Anschluss wurden die einzelnen Gruppen zu bestimmten Zeitpunkten analysiert, zum Beispiel Tac severe, Tac mild, Sham und die Kontrollgruppe zum Zeitpunkt Tag 7 in einer Hauptkoordinatenanalyse.

2.2.5.3.3 Abundanz einzelner Taxa

Um Taxa zu identifizieren, die signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen aufwiesen, wurden der Kruskal-Wallis rank sum Test für Unterschiede zwischen allen Gruppen und der Wilcoxon signed-rank Test für Unterschiede zwischen nur zwei Gruppen angewandt.

Beide Tests behandeln die Tendenzen verschiedener Stichproben und prüfen, ob sich diese unterscheiden. Der Kruskal-Wallis rank sum Test wird für unabhängige Stichproben verwendet, wenn aus bestimmten Gründen keine Varianzanalyse durchgeführt werden kann (Kruskal und Wallis 1952). Der Wilcoxon signed-rank Test wird bei zwei abhängigen Stichproben anstatt eines t-Tests verwendet, wenn für diesen nicht alle Voraussetzungen erfüllt sind (Wilcoxon 1945).

Anhand der gewonnenen Ergebnisse wurden Heatmaps erstellt, die die Signifikanz der Unterschiede einzelner Taxa zwischen zwei Versuchsgruppen oder Zeitpunkten farblich darstellen. Hierzu wurde eine Log-Transformation der p-Werte durchgeführt und den Logarithmen der p-Werte unterschiedliche Farben, die für ein bestimmtes Signifikanzlevel stehen, zugeordnet. So entspricht die Farbe Weiß einem p-Wert von 0,05 und je höher das Signifikanzlevel mit entsprechend kleineren p-Werten wird, desto intensiver rot wird das zugeordnete Feld. Die Farbe Blau beschreibt einen p-Wert, der größer als 0,05 ist und somit den nicht mehr signifikanten Vergleich zweier Gruppen oder Zeiträume.

3 Ergebnisse

3.1 Evaluation der TAC-Operation

Während der Studie verstarb eine Maus der TAC Gruppe an Tag 28 und eine Maus der Sham Gruppe an Tag 10.

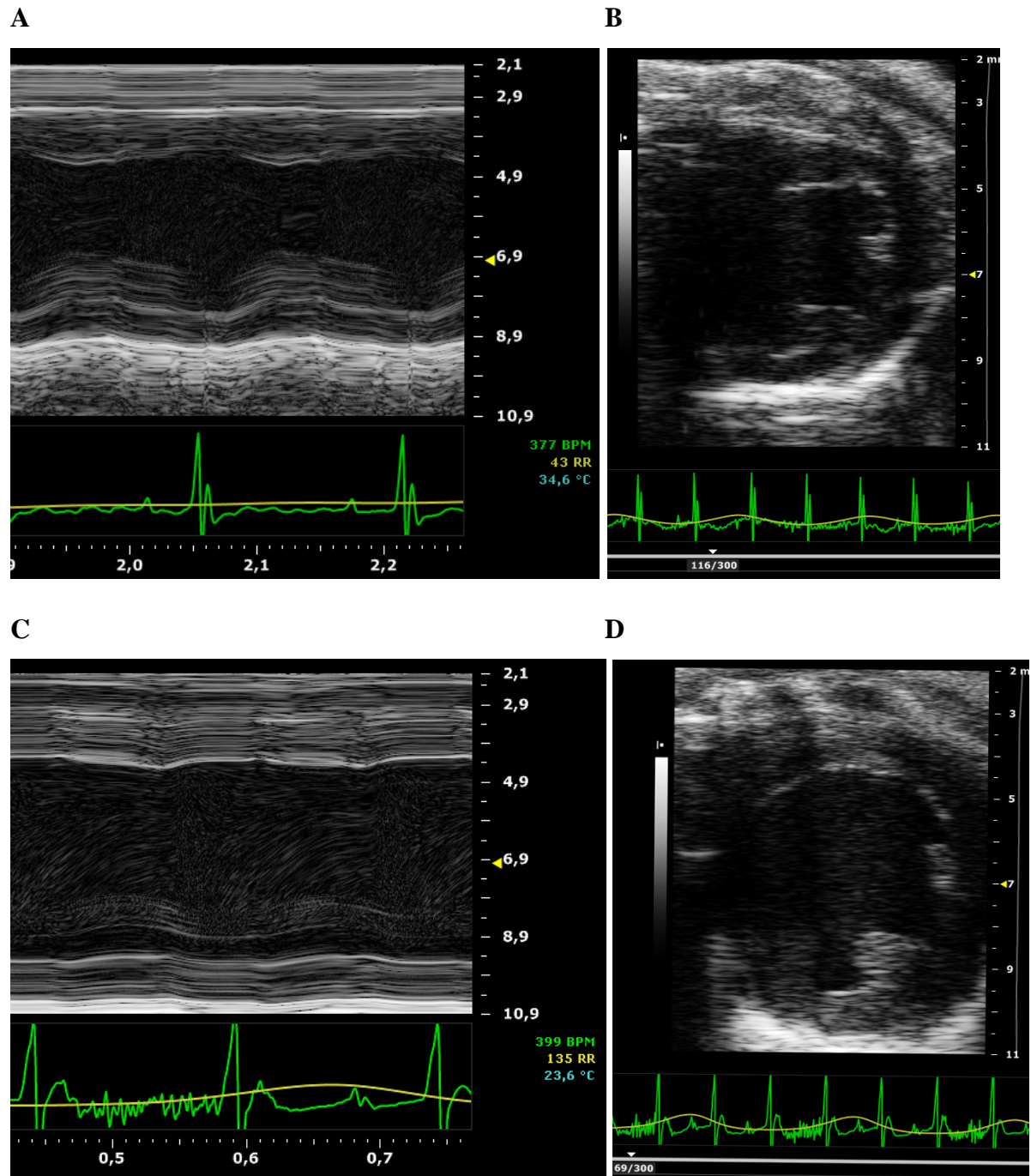
Da nach der Evaluation der Echokardiographien der Mäuse der TAC- und Sham-Gruppe auffiel, dass nicht alle TAC-Versuchstiere eine einheitlich starke Herzinsuffizienz entwickelt hatten, wurde diese Gruppe erneut in zwei Untergruppen, TAC mild und TAC severe, unterteilt. Zur Einteilung wurde die Ejektionsfraktion (EF) des linken Ventrikels, die in den Echokardiographien in Woche 4 und 6 bestimmt wurde, genutzt. Hatte eine Maus eine Ejektionsfraktion von 40% und kleiner, wurde sie der Gruppe TAC severe zugeteilt, die die Tiere mit deutlichem Erfolg der TAC-Operation enthält. Bei Versuchstieren, deren EF größer als 40% war, wurde die TAC-Operation als ‚mild‘ interpretiert und sie wurden der entsprechenden Gruppe zugeordnet.

Die Gruppe der TAC severe enthielt abschließend acht Versuchstiere, die TAC mild Gruppe enthielt neun Tiere. Die nachfolgende Tabelle zeigt die Aufteilung der Tiere der ursprünglichen TAC Gruppe auf die beiden Untergruppen.

Tabelle 3.1: Aufteilung der Versuchstiere auf die Untergruppen der TAC-Versuchsgruppe

TAC severe (EF \leq40%)	TAC mild (EF \geq40%)
Maus 2	Maus 4
Maus 3	Maus 5
Maus 7	Maus 6
Maus 14	Maus 16
Maus 17	Maus 18
Maus 27	Maus 19
Maus 30	Maus 20
Maus 32	Maus 23
	Maus 29

Abbildung 3.1: Exemplarische Echokardiographien der Gruppen TAC severe und Sham in Woche 6



Die Abbildungen zeigen Echokardiographie-Aufnahmen 6 Wochen nach TAC-OP. Dabei sind die oberen Aufnahmen bei einem Sham-Tier gemacht worden, die unteren bei einem Tier der TAC severe Gruppe. **A:** Sham Woche 6, parasternal kurze Achse, M-Mode. **B:** Sham Woche 6, parasternal kurze Achse, B-Mode. **C:** TAC severe Woche 6, parasternal kurze Achse, M-Mode. **D:** TAC severe Woche 6, parasternal kurze Achse, B-Mode.

Bei der Durchführung der Echokardiographien und Aufnahme von exemplarischen Bildern zeigte sich bereits ein großer Unterschied in der linksventrikulären Darstellung und Funktion zwischen den Gruppen TAC severe und Sham (siehe **Abbildung 3.1**). **A** und **C** zeigen jeweils die parasternal kurze Achse des linken Ventrikels im M-Mode zur Messung von Ejektionsfraktion und Fractional Shortening. Deutlich wird die viel geringere Annäherung der LV-Wände in der Echokardiographie der TAC severe Maus (**C**) im Vergleich zum Sham Versuchstier (**A**) und ist somit ein Anhaltspunkt für die linksventrikuläre Funktionsstörung. In **Abbildung 3.1 D** wird die konzentrische Hypertrophie des LV durch die Konstriktion im aortalen Ausflusstrakt durch die TAC-Operation sichtbar. Vergleichbares Bild der Sham Gruppe ist **Teilabbildung B**, welches ebenfalls die parasternal kurze Achse des LV im B-Mode zeigt.

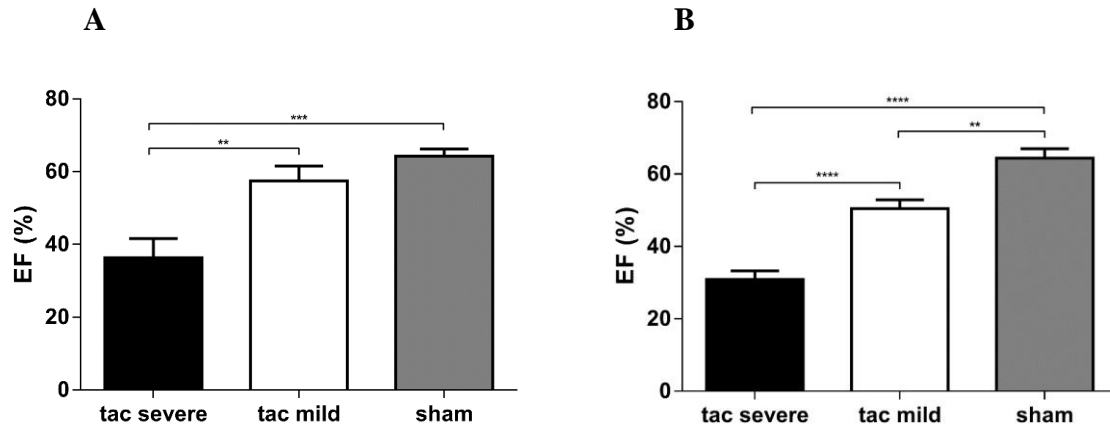
Zur Auswertung der Echokardiographien wurden innerhalb der Gruppen TAC severe, TAC mild und Sham für die Wochen 4 und 6 jeweils die Mittelwerte der gemessenen Parameter (EF; FS; LV Diameter,s; LV Diameter,d; LVAW,d; LVID,d; LVPW,d) und deren Standardfehler bestimmt (siehe **Tabelle 3.2**). Mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse wurde anschließend getestet, ob sich die einzelnen Gruppen hinsichtlich der einzelnen Parameter unterscheiden. Zusätzlich wurde ein Tukey's-Mehrfachvergleichstest durchgeführt, um darzustellen, wie sich die Signifikanzniveaus zwischen den einzelnen Versuchsgruppen verhalten.

Tabelle 3.2: Gemessene Parameter der einzelnen Versuchsgruppen jeweils in Woche 4 und Woche 6

	TAC severe		TAC mild		Sham	
	Woche 4	Woche 6	Woche 4	Woche 6	Woche 4	Woche 6
LVEF	36,34±5,32	30,91±2,36	57,47±4,12	50,47±2,41	64,31±1,91	64,44±2,61
FS	15,46±1,19	7,69±3,19	20,69±2,01	21,79±2,95	33,70±1,09	31,91±0,64
LV Diameter, s	4,16±0,19	4,35±0,15	3,57±0,25	3,49±0,14	2,96±0,16	2,79±0,29
LV Diameter,d	4,99±0,15	5,05±0,11	4,16±0,17	4,46±0,11	4,47±0,14	4,30±0,30
LVAW,d	1,29±0,31	0,99±0,04	1,03±0,20	0,99±0,11	0,84±0,04	0,85±0,07
LVID,d	4,61±0,21	5,01±0,14	4,40±0,23	4,19±0,11	4,43±0,16	4,06±0,28
LVPW,d	1,17±0,07	1,04±0,06	0,98±0,08	1,04±0,07	0,95±0,05	0,86±0,06

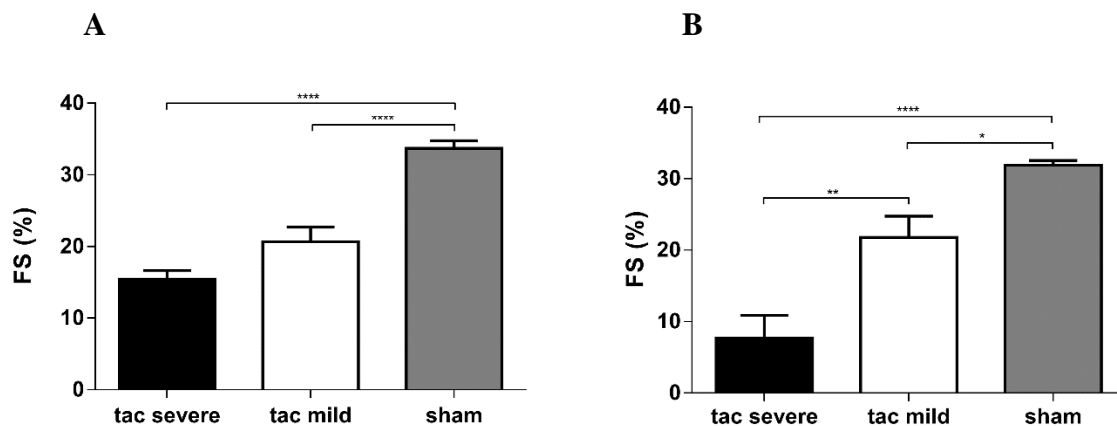
Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler, n=6-9 Mäuse, LVEF=linksventrikuläre Ejektionsfraktion (%), FS=Fractional Shortening (%), LV=linker Ventrikel, s=Systole, d=Diastole, LVAW=left ventricular anterior wall (mm), LVID=left ventricular internal diameter (mm), LVPW=left ventricular posterior wall (mm).

Abbildung 3.2: Linksventrikuläre Ejektionsfraktion der einzelnen Versuchsgruppen in Woche 4 und Woche 6



Die Abbildungen zeigen Mittelwerte der EF mit Standardfehlern. **A:** LVEF der einzelnen Versuchsgruppen in Woche 4. **B:** LVEF der einzelnen Versuchsgruppen in Woche 6.
 : $p \leq 0,01$. *: $p \leq 0,001$. ****: $p \leq 0,0001$.

Abbildung 3.3: Fractional Shortening der einzelnen Versuchsgruppen in Woche 4 und Woche 6



Die Abbildungen zeigen Mittelwerte des FS mit Standardfehlern. **A:** FS der einzelnen Versuchsgruppen in Woche 4. **B:** FS der einzelnen Versuchsgruppen in Woche 6.
 *: $p \leq 0,05$. **: $p \leq 0,01$. ****: $p \leq 0,0001$.

Wie in **Abbildung 3.2** sichtbar wird, sind bereits 4 Wochen nach der TAC-Operation signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der linksventrikulären Ejektionsfraktion aller Gruppen zu erkennen (ANOVA: $p = 0,0001$). Die Gruppe TAC severe unterscheidet sich signifikant sowohl von der Gruppe TAC mild ($p \leq 0,01$) als auch von der Sham-Gruppe ($p \leq 0,001$). Zwei Wochen später, in Woche 6, finden sich nun zusätzlich signifikante Unterschiede

zwischen den Gruppen TAC mild und Sham ($p \leq 0,01$) und die EF der Versuchstiere in der TAC severe Gruppe verschlechtert sich weiterhin auf einen Mittelwert von 30,91%, sodass die Unterschiede zu den restlichen Gruppen hochsignifikant werden ($p \leq 0,0001$).

Abbildung 3.3 zeigt ein ähnliches Bild hinsichtlich des Fractional Shortenings des linken Ventrikels. In den Echokardiographien der vierten Woche zeigen sich bereits hochsignifikante Unterschiede zwischen den Gruppen Sham und TAC severe beziehungsweise TAC mild (jeweils $p \leq 0,0001$). Die Varianzanalyse ergab mit einem p-Wert von $< 0,0001$ ebenfalls bereits signifikante Unterschiede in den Mittelwerten aller Gruppen. In Woche 6 unterscheiden sich nun auch die TAC severe Mäuse deutlich von den TAC mild Versuchstieren ($p \leq 0,01$).

Insgesamt zeigt sich durch die Aufteilung der ursprünglichen TAC Gruppe auf die Untergruppen severe und mild in der Analyse der Operation durch die Echokardiographie, dass bei den Tieren der TAC severe Gruppe eine deutliche Herzinsuffizienz induziert wurde, die milder ausgeprägt auch in der Gruppe TAC mild vorliegt.

Nachdem alle Mäuse an Tag 42 nach der TAC-Operation getötet wurden und die Organe (Herz, Lunge, Ileum) entnommen und gewogen wurden, wurden das Körpergewicht, das Herzgewicht und das Lungengewicht gemessen. Anschließend wurde der Quotient aus Herz- und Körpergewicht sowie aus Lungen- und Körpergewicht ermittelt und die Mittelwerte der bestimmten Parameter (Körpergewicht, Herzgewicht, Lungengewicht, Herzgewicht/Körpergewicht, Lungengewicht/Körpergewicht) sowie deren Standardfehler gebildet (siehe **Tabelle 3.3**). Anschließend wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse und ein Tukey's-Mehrfachvergleichstest durchgeführt, um die Unterschiede hinsichtlich der einzelnen Gewichte und die Signifikanzniveaus zwischen den verschiedenen Gruppen darstellen zu können.

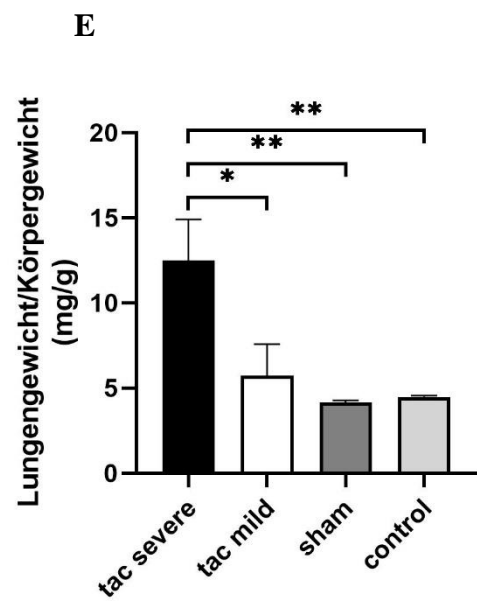
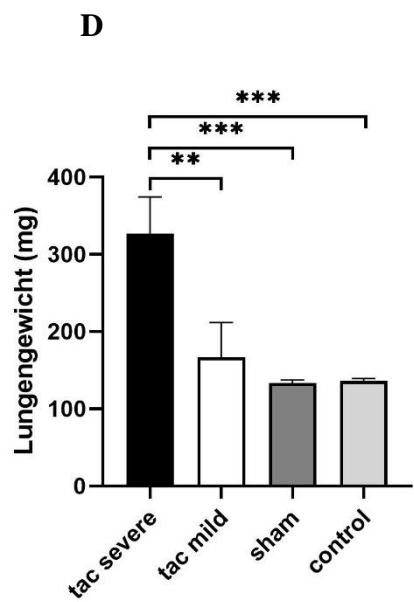
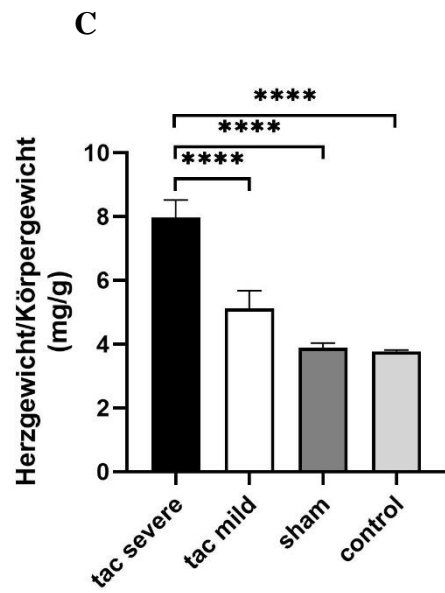
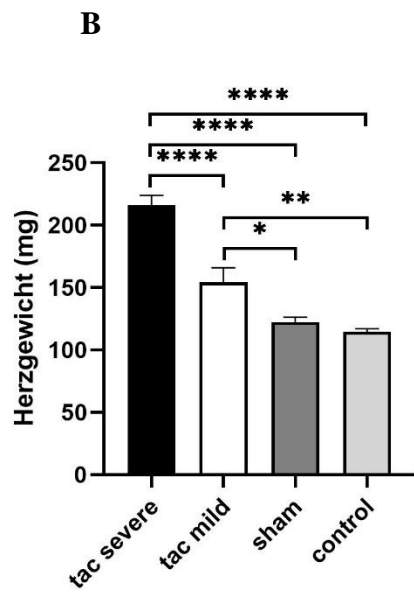
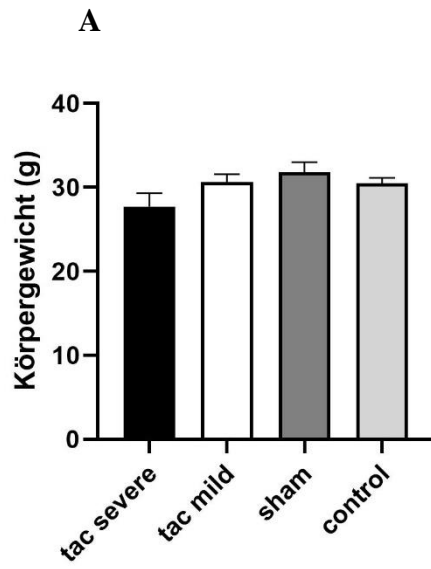
Tabelle 3.3: Körpergewicht, Herzgewicht, Lungengewicht und Quotient aus Herz- und Körpergewicht der einzelnen Versuchsgruppen

	TAC severe	TAC mild	Sham	Control
Körpergewicht	27,71±1,59	30,65±0,92	31,82±1,19	30,53±0,63
Herzgewicht	216,11±7,69	154,23±11,70	122,4±4,00	114,69±2,31
Lungengewicht	326,86±47,37	166,51±45,02	133,06±4,02	136,13±2,93
Herzgewicht/Körpergewicht	7,97±0,55	5,12±0,56	3,88±0,15	3,77±0,04
Lungengewicht/Körpergewicht	12,50±2,40	5,73±1,85	4,16±0,11	4,47±0,09

Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler, n=7-10 Mäuse, Körpergewicht gemessen in Gramm, Herz- und Lungengewicht gemessen in Milligramm, Quotient Herzgewicht/Körpergewicht und Lungengewicht/Körpergewicht gemessen in mg/g.

Zunächst bestätigte sich, dass es keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Körpergewichts zwischen den Versuchsgruppen gab (siehe **Abbildung 3.4 A**). Es zeigte sich, dass die Versuchstiere, die der TAC-Prozedur unterzogen wurden, ein signifikant höheres Herzgewicht aufwiesen (siehe **Abbildung 3.4 B**). Die Tiere der TAC severe Gruppe zeigten zusätzlich ein signifikant höheres relatives Gewicht von Herz zu Körpergewicht auf (siehe **Abbildung 3.4 C**; $p \leq 0,0001$), welches ein Faktor für kardiale Hypertrophie ist und stark mit einem Erfolg der TAC-Operation korreliert. Das Lungengewicht und das relative Gewicht von Lunge zu Körpergewicht der TAC severe Gruppe im Vergleich zu den anderen drei Versuchsgruppen war ebenfalls signifikant erhöht (siehe **Abbildung 3.4 D, E**) und lässt auf eine pulmonale Stauung aufgrund von Rückwärtsversagen durch die erzeugte Herzinsuffizienz schließen (Mohammed et al. 2012). Unter den Mäusen, die der TAC-Operation unterzogen wurden, war also nicht nur hinsichtlich der Echokardiographien eine Diskrepanz zwischen der Gruppe TAC severe und TAC mild zu beobachten, sondern auch bezüglich der Herz- und Lungengewichte. Während die Versuchstiere der TAC mild Gruppe noch signifikant höhere Herzgewichte verglichen mit der Sham Gruppe und Kontrollgruppe zeigten, blieben diese signifikanten Unterschiede bei Betrachtung des Lungengewichts und der relativen Herz- und Lungengewichte aus. Dies befürwortet erneut die nachträgliche Teilung der TAC-Versuchsgruppe in zwei Untergruppen, da sich nur bei den Tieren der TAC severe Gruppe eine ausreichende Herzinsuffizienz etabliert hat.

Abbildung 3.4: Körpergewicht, Herzgewicht, relatives Herzgewicht, Lungengewicht und relatives Lungengewicht der einzelnen Versuchsgruppen an Tag 42



Die Abbildungen zeigen Mittelwerte der unterschiedlichen Gewichte und Quotienten mit Standardfehlern. **A:** Körpergewicht (g). **B:** Herzgewicht (mg). **C:** Quotient aus Herzgewicht und Körpergewicht (mg/g). **D:** Lungengewicht (mg). **E:** Quotient aus Lungengewicht und Körpergewicht (mg/g). *: $p \leq 0,05$. **: $p \leq 0,01$. ***: $p \leq 0,001$. ****: $p \leq 0,0001$.

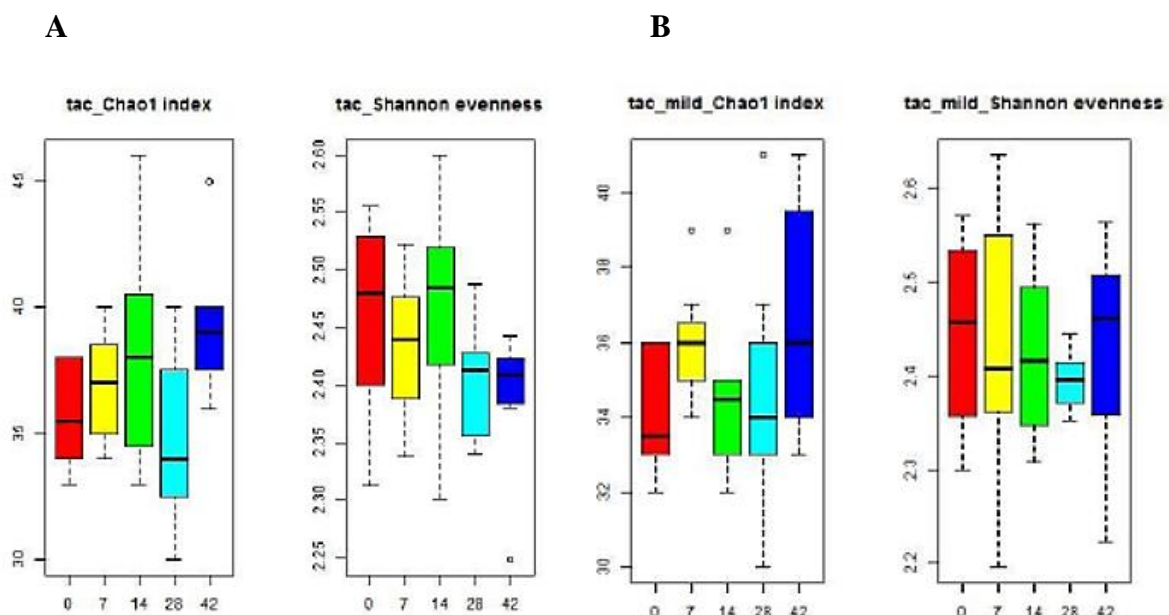
3.2 Betrachtung der einzelnen Behandlungsgruppen hinsichtlich Alpha- und Beta-Diversität

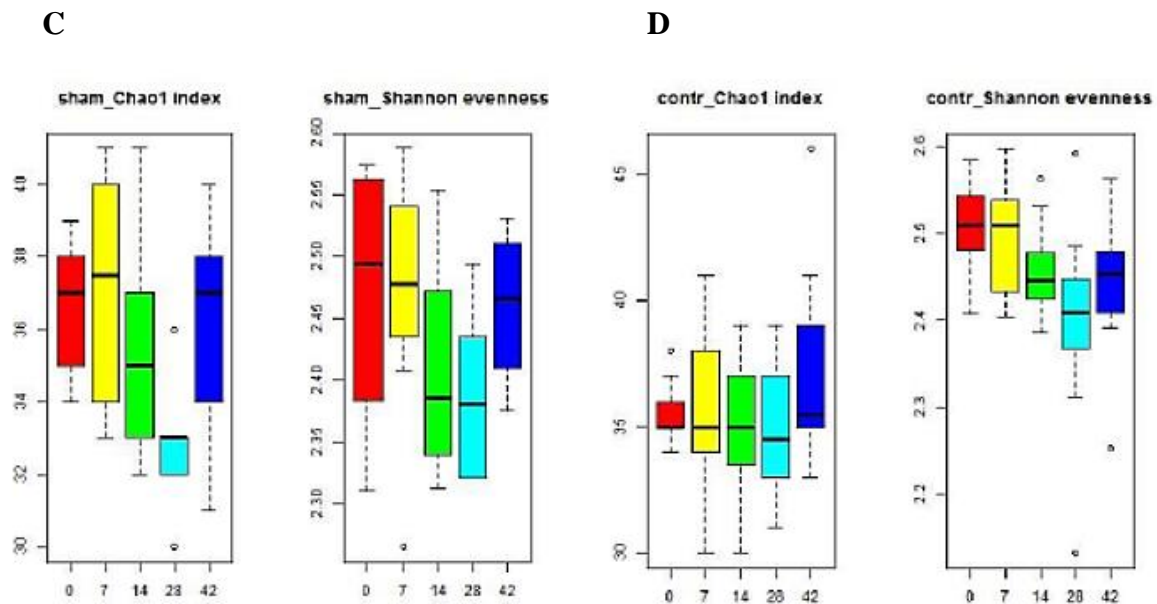
Zunächst wurden alle Gruppen einzeln zu den Zeitpunkten 0, 7, 14, 28 und 42 Tagen hinsichtlich ihrer Alpha- und Beta-Diversität untersucht. Die Alpha-Diversität beschreibt die intraindividuelle Diversität der einzelnen Proben, während die Beta-Diversität probenübergreifend die Unterschiede in der Vielfältigkeit zwischen den verschiedenen Gemeinschaften beschreibt.

3.2.1 Alpha-Diversität

Nach der Auswertung der Proben zeigten sich hinsichtlich der Alpha-Diversität, gemessen mit Chao1-Index und Shannon-Evenness, keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen (siehe Boxplots **Abbildung 3.5**).

Abbildung 3.5: Alpha-Diversität der einzelnen Versuchsgruppen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten





Die Abbildungen zeigen Chao1-Index (jeweils links) und Shannon-Evenness (jeweils rechts) zu den Zeitpunkten 0, 7, 14, 28 und 42 Tagen. **A:** TAC severe. **B:** TAC mild. **C:** Sham. **D:** Control.

Allerdings zeigt sich in der Varianzanalyse (siehe **Tabelle 3.4**) eine signifikante Veränderung ($p=0,002$ [TAC severe]) der Bakterienzusammensetzung in der TAC severe Gruppe im Zeitverlauf ($p=0,025$ [0-7 Tage], $p=0,007$ [7-14 Tage], $p=0,02$ [14-28 Tage], $p=0,004$ [28-42 Tage]), die sich hauptsächlich in den ersten sieben Tagen nach der TAC-OP zeigt ($p=0,019$). Dies entspricht einer über jeden Zeitpunkt signifikanten Veränderung der Alpha-Diversität innerhalb der TAC severe Gruppe.

Tabelle 3.4: ANOVA der einzelnen Versuchsgruppen von Tag 0 zu verschiedenen Endzeitpunkten

	0-7 Tage	0-14 Tage	0-28 Tage	0-42 Tage
TAC mild	0,006	0,088	0,184	0,004
TAC severe	0,025	0,007	0,02	0,004
Sham	0,27	0,554	0,029	0,64
Control	0,156	0,042	0,066	0,02

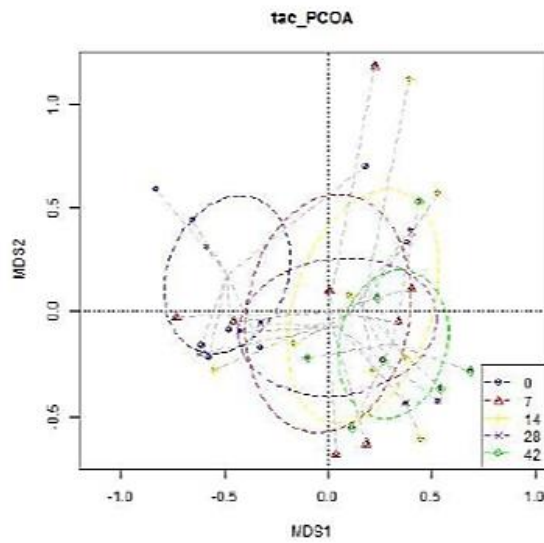
Die Tabelle zeigt Adonis p-Werte aus Mehrfachvergleichen mittels ANOVA.

3.2.2 Beta-Diversität

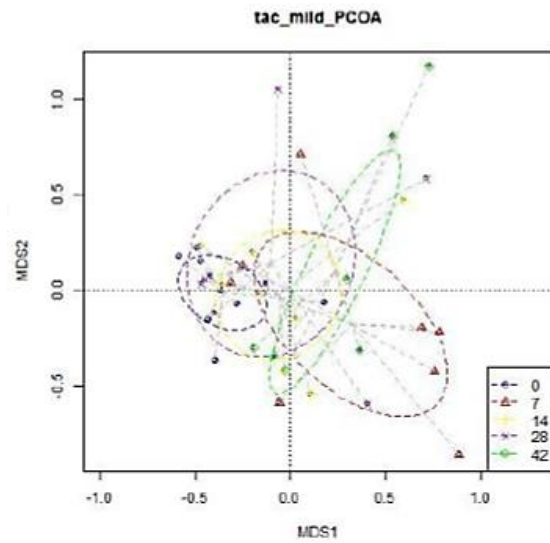
In der Hauptkomponentenanalyse (PCOA, siehe **Abbildung 3.6**) der Gruppen TAC mild (**B**) und TAC severe (**A**) ist im Vergleich zu den Kontrollgruppen Sham und Control ein Trend der Separation über die Zeit zu erkennen. Die Diagramme der TAC Gruppen bieten ein deutlich weitläufigeres, gestreutes Bild im Vergleich zu den Diagrammen der Sham- und Kontrollgruppe (**C** und **D**), in denen die Kreise der einzelnen Zeitpunkte kompakter und näher beisammenbleiben. Im PCOA Diagramm der TAC severe Gruppe zeigt sich, dass sich die Proben der Tage 7 – 42 deutlich von denen des Zeitpunktes 0 unterscheiden. Dies lässt auf eine Veränderung in der Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms über den Zeitpunkt des Experiments schließen.

Abbildung 3.6: Beta-Diversität der einzelnen Versuchsgruppen

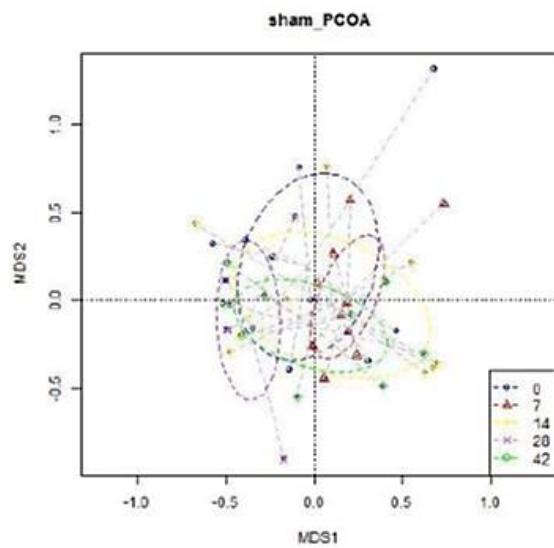
A



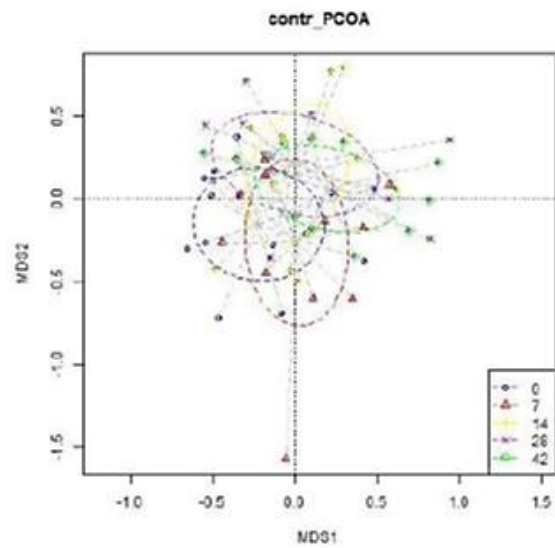
B



C



D



Die Abbildungen zeigen Beta-Diversität in PCOA-Plots. Verschiedenfarbige Kreise stehen für die unterschiedlichen Zeiträume Tag 0, 7, 14, 28, 42. **A:** TAC severe. **B:** TAC mild. **C:** Sham. **D:** Control.

3.3 Vergleich der einzelnen Behandlungsgruppen hinsichtlich Alpha- und Beta-Diversität zu den unterschiedlichen Zeitpunkten

Nachdem die Versuchsgruppen einzeln hinsichtlich ihrer Alpha- und Beta-Diversität betrachtet wurden, wurden in einem zweiten Schritt alle Gruppen zu einem bestimmten Zeitpunkt auf Unterschiede in ihrer Zusammensetzung analysiert (**Abbildung 3.7**).

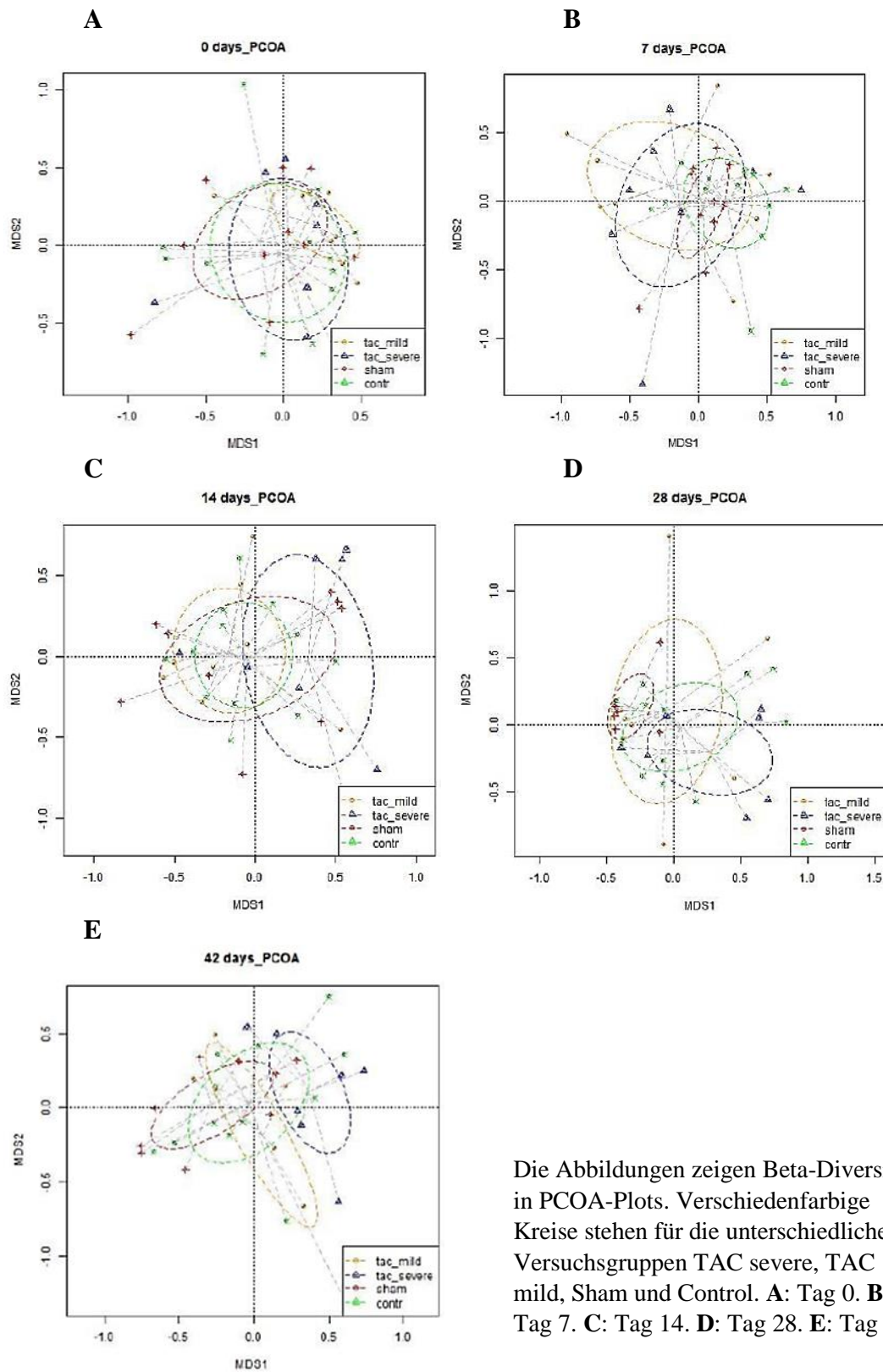
Zum Zeitpunkt Tag 0 (**A**) waren alle Kreise in den PCOA Diagrammen noch sehr nah beisammen, die Bakterienzusammensetzung glich sich hier also noch stark.

An Tag 7 (**B**) konnte man bereits den Start einer Separation der Bakterienzusammensetzungen beider TAC-Gruppen von der Sham- und Kontrollgruppe beobachten. Die Kreise der beiden Versuchsgruppen mit induzierter Herzinsuffizienz beginnen sich hier zu weiten, während die Kreise, die die Bakteriengemeinschaften der Gruppen mit Kontrolleigenschaften (Sham und Kontrollgruppe) darstellen, sehr klein und mit deutlichen Überschneidungen bleiben.

Zwei Wochen nach der TAC-Operation (**C**) hat sich die Bakteriengemeinschaft der Gruppe TAC severe von den drei restlichen Gruppen entfernt, die hier nur noch wenige Unterschiede untereinander aufweisen.

An den Tagen 28 (**D**) und 42 (**E**) zeigte sich ein weniger klares Bild in der Hauptkomponentenanalyse, sodass es zu größeren Überschneidungen zwischen allen vier Gruppen kommt. Trotzdem ist die Versuchsgruppe TAC severe immer diejenige Gruppe, deren Kreis am weitesten von den restlichen Gruppen entfernt ist und mit dem es am wenigsten Überschneidungen gibt.

Abbildung 3.7: Hauptkomponentenanalyse der verschiedenen Versuchsgruppen zu bestimmten Zeitpunkten



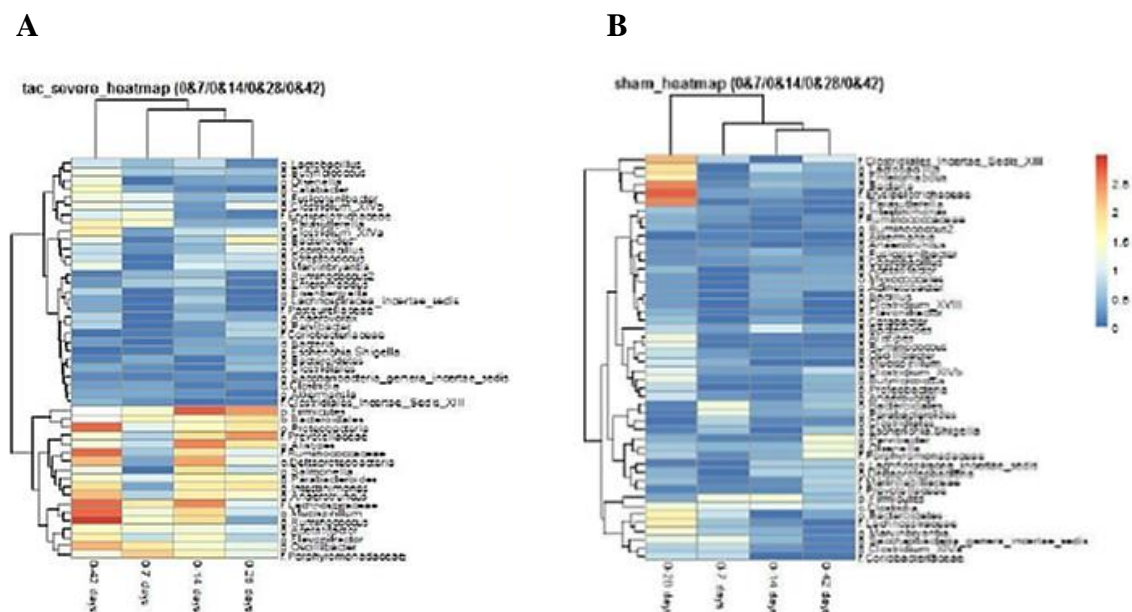
Die Abbildungen zeigen Beta-Diversität in PCOA-Plots. Verschiedenfarbige Kreise stehen für die unterschiedlichen Versuchsgruppen TAC severe, TAC mild, Sham und Control. **A:** Tag 0. **B:** Tag 7. **C:** Tag 14. **D:** Tag 28. **E:** Tag 42.

3.4 Abundanz einzelner Bakterien

Nachdem die einzelnen Versuchsgruppen hinsichtlich ihrer Alpha- und Beta-Diversität untersucht wurden, wurden in einem nächsten Schritt bestimmte Bakterienphyla, -klassen, -ordnungen, -familien und -genus bestimmt, hinsichtlich derer sich die Gruppen untereinander oder bezüglich der verschiedenen Zeitpunkte unterscheiden.

Zur Darstellung der Differenz wurden Heatmaps erstellt, sowohl zum Vergleich der vier Versuchsgruppen als auch der verschiedenen Zeitpunkte innerhalb einer Gruppe.

Abbildung 3.8: Heatmap der Versuchsgruppe TAC severe und Sham



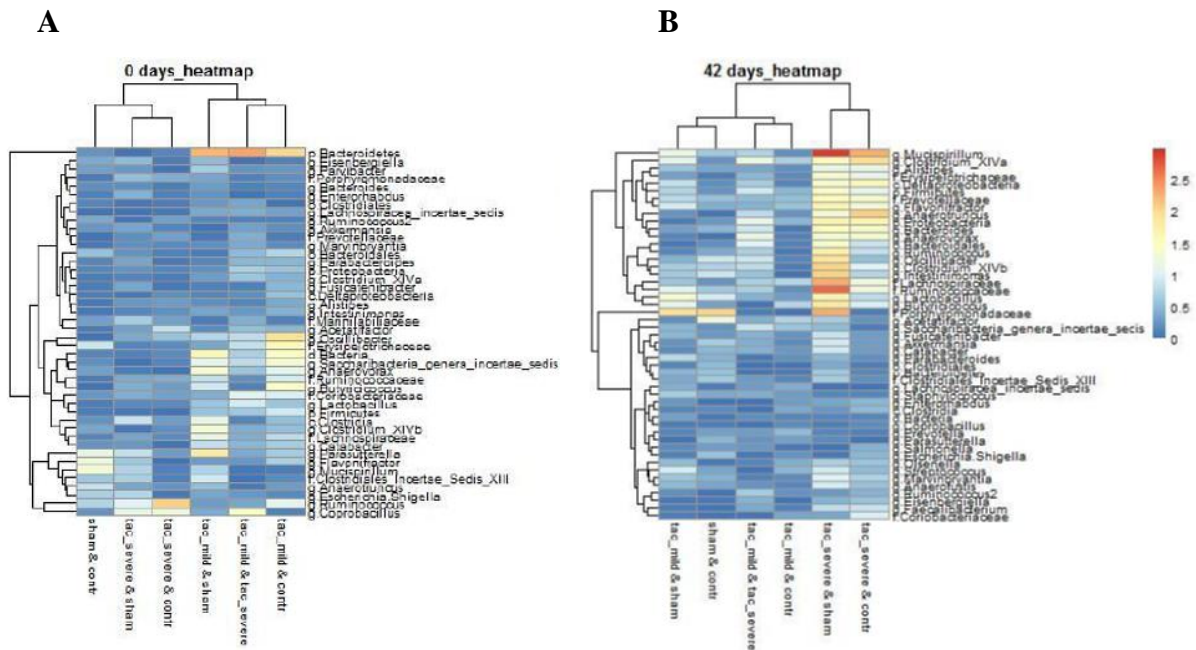
Die Abbildungen zeigen Heatmaps. Verglichen wird jeweils der Zeitpunkt Tag 0 mit den folgenden Zeitpunkten (Tag 7, 14, 28, 42). Die p-Werte wurden logarithmiert, sodass die Legende $-\log_{10}(\text{p-Wert})$ ist. Somit ist ,weiß“ $-\log_{10}(\text{p-Wert}) = 1,3$, was einem p-Wert von 0,05 entspricht.

Je roter, desto signifikanter der Unterschied des Bakteriums zwischen den Zeitpunkten. Blau bedeutet keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zeitpunkten. **A:** TAC severe. **B:** Sham.

Wie in **Abbildung 3.8** veranschaulicht ist, sind in der Gruppe TAC severe (**A**) deutlich mehr Bakterien differentiell reguliert zu den verschiedenen Zeitpunkten im Vergleich zur Sham-Gruppe (**B**). Auch zeigt sich eine Konstanz über die Dauer des Experiments, sodass bereits beim Vergleich von Tag 0 und Tag 7 wenige Unterschiede hinsichtlich der bakteriellen Besiedelung bestehen, diese sich aber bis hin zu Tag 42 ausweiten. Ein ähnlicher Schluss lässt sich bei der Beobachtung der Heatmap der Sham Gruppe nicht ziehen. Die entsprechende Heatmap zeigt zwar einige signifikant unterschiedliche Bakterien beim Vergleich von Tag 0 und 28, die anderen Zeitvergleiche zeigen jedoch fast ausschließlich blaue Balken und demnach

keine Fortführung der Veränderung des intestinalen Mikrobioms zum Beispiel beim Vergleich des Tags 0 und 42.

Abbildung 3.9: Gruppenvergleichende Heatmaps zu Beginn und Ende des Experiments



Die Abbildungen zeigen Heatmaps. Verglichen werden jeweils zwei der vier Versuchsgruppen (TAC severe, TAC mild, Sham, Control) zu einem bestimmten Zeitpunkt. Die p-Werte wurden logarithmiert, sodass die Legende $-\log_{10}(\text{p-Wert})$ ist. Somit ist ,weiß‘ $-\log_{10}(\text{p-Wert}) = 1,3$, was einem p-Wert von 0,05 entspricht. Je roter, desto signifikanter der Unterschied des Bakteriums zwischen den Zeitpunkten. Blau bedeutet keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zeitpunkten. **A:** Tag 0. **B:** Tag 42.

Auch in den gruppenvergleichenden Heatmaps in **Abbildung 3.9** sind zu Beginn des Experiments nur wenige Bakterienabundanzen zu sehen (**A**). An Tag 42 (**B**) sind die signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Bakterien in den Spalten, die die Gruppen TAC severe und Sham beziehungsweise TAC severe und Kontrollgruppen vergleichen, ersichtlich. Diese existieren beim Vergleich der anderen Versuchsgruppen miteinander, nämlich TAC mild mit TAC severe, Sham und Kontrollgruppe und Sham mit Kontrollgruppe (auf **Abbildung 3.9 B** links im Bild), jedoch nur kaum. Dies ist wiederum hinweisend für ein verändertes intestinales Mikrobiom der Tiere in der TAC severe Gruppe. Die Anzahl an Bakterien mit signifikant unterschiedlichen Abundanzen in der TAC severe Gruppe nehmen im Verlauf des Experiments mit einer vermehrten Manifestation der Herzinsuffizienz zu.

Die Veränderung der Zusammensetzung des bakteriellen intestinalen Mikrobioms wurde hauptsächlich durch unterschiedliche Abundanz der Bakterienfamilien Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, der Bakteriengattungen Mucispirillum und Ruminococcus und des Bakterienphylums Proteobacteria bedingt.

Insgesamt lässt sich aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht *das eine* Bakterium identifizieren, dass bei Herzinsuffizienz über- oder unterrepräsentiert ist. Viel mehr erzeugt der chronische Status der Inflammation eine Dysbiosis des intestinalen Mikrobioms, also eine Pathologie-assoziierte Veränderung über mehrere Bakterienfamilien hinweg.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde das intestinale bakterielle Mikrobiom von Mäusen mit induzierter Herzinsuffizienz durch die TAC-Operation mit gesunden scheinoperierten Mäusen und Kontrollmäusen verglichen. Die Evaluation des TAC-Erfolgs wurde mittels transthorakaler Echokardiographie ermittelt und die Untersuchung des intestinalen Mikrobioms erfolgte auf der Basis von nicht-invasiv gewonnenen Stuhlproben an den Tagen 0, 7, 14, 28 und 42 postoperativ.

4.1 Funktionalität einzelner Taxa mit verschiedener Abundanz

Wie in Kapitel 3.4 bereits beschrieben, fielen vor allem die veränderten Abundanzen der Bakterienfamilien Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, der Bakteriengattungen *Mucispirillum* und *Ruminococcus* und des Bakterienphylums *Proteobacteria* bei der Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit auf. Im Folgenden soll nun kurz auf die Funktionalität der verschiedenen Taxa und ihrer eventuellen Zuordnung zu unterschiedlichen pathologischen Zuständen eingegangen werden.

Die Bakterienfamilie der Lachnospiraceae bildet eine wichtige Gruppe unter den butyratbildenden Bakterien des intestinalen Mikrobioms. Diese ist essentiell für die intestinale Barriere und die Verhinderung intestinaler Inflammation, da sie unter anderem die Differenzierung von T-regulatorischen Zellen in der Darmmukosa beeinflusst (Peng et al. 2009; Furusawa et al. 2013). Zusätzlich spielen Lachnospiraceae eine Rolle in der Darmmotilität (Dahiya et al. 2019). Somit ist es wenig verwunderlich, dass bei Patienten mit *Clostridium difficile* Infektion unter anderem eine verminderte Abundanz von Lachnospiraceae nachgewiesen wurde und opportunistische Infektionen begünstigt wurden (Milani et al. 2016).

Ebenfalls vermindert bei *Clostridium difficile* Infektion nachgewiesen wurde die Bakterienfamilie der Ruminococcaceae (Antharam et al. 2013). Zusätzlich wurden verminderte Abundanzen von Ruminococcaceae in einer vergleichenden Mikrobiomanalyse von gesunden und an Herzinsuffizienz leidenden Patienten beschrieben (Luedde et al. 2017).

Widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Gattung *Ruminococcus* liefern mehrere Studien, die das intestinale Mikrobiom von adipösen Patienten untersuchen. So werden sowohl erhöhte als auch verminderte Abundanzen diesbezüglich beschrieben (Maniar et al. 2019). Jedoch konnte eine Assoziation zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Kolitis hergestellt

werden, die durch eine verminderte Expression von *Ruminococcus* im intestinalen Mikrobiom gekennzeichnet waren (Suchodolski 2013).

Die Gattung *Mucispirillum*, genauer *Mucispirillum schaedleri*, ist in der Lage, die Virulenz von nicht-typhoidalen Salmonellen herabzusetzen und somit die Entwicklung einer Kolitis in Mäusen entgegenzuwirken (Herp et al. 2019). Der Gattung wird also eine protektive Rolle im Intestinum zugesprochen.

Das Bakterienphylum der Proteobacteria ist eine heterogene Gruppe, die mit vielen Erkrankungen assoziiert ist und zu der mehrere bekannte humanpathogene Keime gehören (z.B. *Escherichia*, *Bordetella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Helicobacter*). Eine mikrobielle Dysbiosis ist sehr häufig durch vermehrte Abundanzen dieses Phylums charakterisiert (Shin et al. 2015). Solche vermehrte Abundanzen konnten unter anderem in atherosklerotischen Plaques (Koren et al. 2011) und Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nachgewiesen werden (Frank et al. 2007).

4.2 Vergleich der Ergebnisse mit anderen Studien

Auch andere Forschergruppen interessieren sich für das hochaktuelle Thema Zusammenhang des Mikrobioms und der kardiovaskulären Gesundheit, insbesondere der Herzinsuffizienz.

Unsere Gruppe konnte in einer Fall-Kontroll-Studie im Vergleich zwischen hospitalisierten Herzinsuffizienz-Patienten und gesunden Kontrollen eine signifikante Veränderung in Alpha- und Beta-Diversität nachweisen (Luedde et al. 2017). Patienten mit Herzinsuffizienz wiesen eine verringerte Biodiversität auf und die Bakterienfamilien *Coriobacteriaceae*, *Ruminococcaceae* und *Erysipelotrichaceae* waren signifikant vermindert, was auf einen möglichen Zusammenhang der intestinalen Dysbiose und der Pathogenese der Herzinsuffizienz schließen lässt. In der hier vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine deutlich veränderte Abundanz von *Ruminococcaceae* und eine leicht veränderte Abundanz von *Erysipelotrichaceae* beobachtet werden. Jedoch waren die Veränderungen in Alpha- und Beta-Diversität nicht signifikant.

Mayerhofer et al. (2019) untersuchten die Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms bei Herzinsuffizienz unter dem Aspekt der eingenommenen Diät. Hier konnte ebenfalls eine signifikant veränderte Beta-Diversität zwischen HI-Patienten und gesunden Kontrollen festgestellt werden. Herzinsuffiziente Patienten wiesen vor allem eine geringere Biodiversität

und geringeres Verhältnis von Firmicuten zu Bacteroideten (F/B-Ratio) auf, welches besonders gering war bei Patienten, die die klinischen Endpunkte (Tod, Herztransplantation) erreichten (Mayerhofer et al. 2019). Die bakterielle Dysbiose und niedrigere Alpha-Diversität waren laut Mayerhofer et al. (2019) vergesellschaftet mit einer geringen Aufnahme an Ballaststoffen, die zur verminderten Bildung von Butyrat durch das veränderte Mikrobiom und letztlich zur intestinalen Inflammation führte. Im Umkehrschluss folgt also aus einer besonders ballaststoffreichen Diät eine größere intraindividuelle Vielfalt an Bakterien im Magen-Darm-Trakt, die ein gesundes Mikrobiom unter anderem charakterisieren (Neish 2009).

Um weitere Informationen über den Zusammenhang von Pathogenese der Herzinsuffizienz und Dysbiose des intestinalen Mikrobioms zu erhalten, ist es essenziell, dass weitere Studien dieses Thema betreffend durchgeführt werden. Auch die Rolle der Ernährung und der Einfluss von Prä- und Probiotika muss weiter untersucht werden. Ziel könnte die Identifikation von wenigen Markerkeimen sein, die sich im Verlauf der Herzinsuffizienz bestimmen und auf den Fortschritt der Erkrankung schließen lassen, da Patienten oft erst spät mit klinischen Symptomen auffallen.

Deshalb sind Studien, wie die GutHeart Studie von Mayerhofer et al. besonders wichtig. Hier wird multizentral der Einfluss von Probiotika (*Saccharomyces boulardii*) und Antibiotika (Rifaximin) auf die linksventrikuläre Ejektionsfraktion, die Lebensqualität, die funktionale Kapazität und den Status der gastrointestinalen Inflammation und Durchlässigkeit der intestinalen Barriere („leakage“) evaluiert.

So können gegebenenfalls weitere Erkenntnisse zur Manifestation und Variabilität der intestinalen Dysbiose bei Herzinsuffizienz und der Entwicklung von möglichen Biomarkern oder gar Therapiestrategien gewonnen werden.

4.3 Einfluss bakterieller Metabolite

In den letzten Jahren der Mikrobiomforschung sind neben der Identifikation von Bakterienfamilien, -gattungen und -phyla und der Charakterisierung von Dys- und Eubiose vor allem bakterielle Metabolite und deren Einfluss auf den Gesamtorganismus in den Vordergrund gerückt.

Somit wird das Augenmerk viel mehr auf die Gesamtheit der Beziehungen zwischen Ernährung, intestinalem Mikrobiom, dessen Metabolismus und Einfluss auf das Individuum gelenkt. Aufbauend hierauf erhofft man sich tiefgründigere Einblicke in das Zusammenspiel

zwischen Mensch und Mikrobiom und mögliche Ansatzpunkte für Diagnostik und Therapiemethoden.

Ein wichtiges protektives Stoffwechselprodukt sind die kurzkettigen Fettsäuren (*short chain fatty acids*, SCFA), deren Hauptvertreter Acetat, Propionat und Butyrat sind. Verschiedene Bakterienvertreter fermentieren Ballaststoffe im Kolon und produzieren somit die unterschiedlichen SCFA (Morrison und Preston 2016). Diese haben durch G-Proteingekoppelte Signalwege und Inhibition von Histondeacetylasen Einfluss auf Endothelzellen und Leukozyten sowie deren Migration, Ausschüttung von Zytokinen (TNF- α , IL-2, IL-6, IL-10) und Chemokinen (Vinolo et al. 2011). Zusätzlich stärken SCFA die intestinale Barriere durch verstärkten Einbau von Tight-Junctions zwischen Epithelzellen (Wang et al. 2012a). Vor allem Acetat und Propionat zeigten im Mausmodell eine blutdrucksenkende Wirkung (Marques et al. 2017; Bartolomaeus et al. 2019) und aufgrund dessen eine positive Beeinflussung des kardialen Remodelings (Bartolomaeus et al. 2020). Aus diesen Fähigkeiten resultieren die anti-inflammatorischen und protektiven kardiovaskulären Eigenschaften der SCFA, welche das Thema einer ausgewogenen, gesunden und ballaststoffreichen Ernährung in der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen unterstreichen.

Ein weiterer bakterieller Metabolit, der zurzeit Gegenstand weitreichender Diskussion bezüglich der Interaktion zwischen intestinalem Mikrobiom und schlechtem Outcome einer Herzinsuffizienz ist, nennt sich Trimethylamin-N-Oxid (TMAO). TMAO, welches von den Darmbakterien vorrangig nach Konsum tierischer Produkte gebildet wird, wird in Verbindung gebracht mit vermehrtem Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen und erhöhter Mortalität (Tang et al. 2014). Nach dem Verzehr von beispielsweise Milchprodukten, Ei oder Fleisch wird vom intestinalen Mikrobiom aus Cholin, Carnitin und Phosphatidylcholin primär Trimethylamin (TMA) gebildet (siehe **Abbildung 4.1**). Dieses wird in einem zweiten Schritt in der Leber durch das Enzym Flavinmonooxygenase 3 zu TMAO umgesetzt (Bennett et al. 2013; Wang et al. 2015; Koeth et al. 2013). Bevor TMAO renal eliminiert wird (Tang et al. 2015) kann es proinflammatorisch über gesteigerte Leukozytenadhäsion wirken (Seldin et al. 2016), den Cholesterintransport zur Leber und die Ausscheidung von Cholesterin über Gallensäuren vermindern (Koeth et al. 2013), sowie das Risiko für Thrombosen erhöhen (Zhu et al. 2017). Trotzdem ist die Studienlage zu TMAO komplex und es existieren eine Vielzahl an unterschiedlichen und teils auch widersprüchlichen Arbeiten hierzu (Bartolomaeus et al. 2020). Nichtsdestotrotz existieren bereits Versuche, in Mausmodellen eine Reduktion von

TMAO zu erzielen und die daraus folgenden Konsequenzen zu evaluieren und einzuordnen (Wang et al. 2015; Roberts et al. 2018).

Es ist essenziell, dass weiterhin versucht wird, auch die metabolischen Zusammenhänge zwischen intestinalem Mikrobiom und menschlichem Organismus zu verstehen, damit die Mikrobiomforschung in möglichen Diagnose- und Therapiestrategien resultieren kann.

4.4 Limitationen und Störfaktoren

Insgesamt spielen bei der Zusammensetzung und Diversität des humanen Mikrobioms eine große Vielfalt an Einflussfaktoren eine Rolle. Bereits kleine Veränderungen in der Lebensführung eines Individuums, wie Ernährungsgewohnheiten, Stress oder der Kontakt zu anderen Individuen, können das Mikrobiom deutlich verändern. Generell gleicht sich vor allem das Mikrobiom der Haut von zusammenlebenden Individuen stark, sogar auch das von Familienmitgliedern und deren Haustieren (Song et al. 2013).

Auf das intestinale Mikrobiom hat unter anderem die Ernährung einen großen Einfluss. Die Versuchstiere in dieser Studie erhielten eine normale pelletierte Nagetier-Tiernahrung, wie sie für viele weitere Experimente eingesetzt wird. Diese pelletierte Nahrung enthält an die 20% Ballaststoffe, die das Bakterienwachstum in Zökum und Kolon beeinflussen. Einzelne Pellets sind nie genau gleich groß und somit erhalten die Tiere immer unterschiedlich viele Nährstoffe, die sich auf die intestinalen Bakterien der einzelnen Individuen auswirken (Pellizzon 2016). Fraglich ist, ob man diese Art von Diät mit der menschlichen Verhaltensweise und den humanen Ernährungsgewohnheiten gleichsetzen kann, die sich bekanntlich von Tag zu Tag stark unterscheiden. So bleiben laut der Nationalen Verzehrsstudie II des Max Rubner-Instituts 68% der Männer und 75% der Frauen täglich unter dem empfohlenen Richtwert für die Ballaststoffzufuhr (Max Rubner-Institut 2008) und gerade diese hat große Auswirkungen auf das intestinale Mikrobiom.

Zusätzlich wäre eine Abweichung von Maus-Modellen auf andere Versuchstiere mit dem Menschen ähnlicherer Anatomie des Gastrointestinaltrakts denkbar. Hunde erweisen sich als immer geeigneter in Mikrobiomstudien, da die Komposition des Gastrointestinaltraktes dem Menschen mehr ähnelt als der von Mäusen oder gar Zebrafischen. Auch chronische Entzündungszustände, wie sie in der Herzinsuffizienz zu finden sind, präsentieren sich in Hunden vergleichsweise gut (Ericsson 2019). Natürlich treten hier große Limitationen bezüglich der Haltungskosten und ethischen Fragen auf.

Generell ist auch die Anästhesie bei der Durchführung der Echokardiographien an den Versuchsmäusen als kritisch zu bewerten, da die verwendeten Anästhetika die Herzfrequenz und die Kontraktilität des Herzens vermindern (Vatner et al. 2002). Um eine physiologische Beurteilung der Ventrikelfunktion und somit eine Evaluation der induzierten Herzinsuffizienz sicherzustellen, müssten die Tiere folglich wach und unanästhesiert echokardiografiert werden. Dies ist wiederum nur sehr schwer möglich, da die Mäuse dafür arbeitsintensiv konditioniert werden müssten oder während der Echokardiographie extreme Stresssituationen erfahren würden, die Einfluss nehmen auf die Herzfrequenz und den Sympathikotonus der Tiere (Gao et al. 2011). Das in dieser Studie verwendete Anästhetikum Isofluran hat geringere Einflüsse auf die kardiale Funktion, als beispielsweise Ketamin oder Pentobarbital (Gao et al. 2011; Stypmann 2007), sodass sein Einsatz vertretbar ist. Zusätzlich ist festzuhalten, dass Versuchstiere sowohl der TAC-Gruppen als auch der Sham Gruppe eine Isofluran-Narkose während der Echokardiographie erhielten. Kardiodepressive Nebenwirkungen sollten demnach in allen Tieren auftreten und sich im Vergleich und der Auswertung der erhobenen Daten bestenfalls relativieren.

4.5 Ausblick

Sowohl in dieser Arbeit als auch in mehreren anderen Studien konnte eine Veränderung des intestinalen Mikrobioms im Zustand der Herzinsuffizienz aufgezeigt werden. Ob diese das Resultat der Manifestation der Herzinsuffizienz am Herzen mit geringerer Ejektionsfraktion und vermehrtem Rückstau ist oder sich als alleinstehender Risikofaktor entwickelt, ist noch zu beweisen. Immer noch weitestgehend unklar ist der genaue Mechanismus der Einflussnahme der Dysbiosis und die allumfassende Pathogenese der Herzinsuffizienz.

Weiterführend ist die genauere Untersuchung von Abundanzen der einzelnen Bakterien notwendig und ein besseres Verständnis der Funktionalität und Stoffwechselaktivitäten der Bakterien mit veränderter Abundanz wünschenswert. Hierzu könnte anstatt der 16s-rRNA-Sequenzierung eine Sequenzierung des Gesamtgenoms angewandt werden.

Abbildung 4.1 gibt einen Überblick über die Einordnung des intestinalen Mikrobioms im Gesamtorganismus und die Einflussnahme bakterieller Metabolite (TMAO, siehe **4.3 Einfluss bakterieller Metabolite**) auf verschiedene Organe, wie Herz und Nieren. Zusätzlich werden in der Abbildung verschiedene Angriffspunkte zur Modulation des Darmmikrobioms dargestellt (Diät, Pro- und Präbiotika, fäkaler Mikrobiomtransfer, TMA Lyase Inhibitoren).

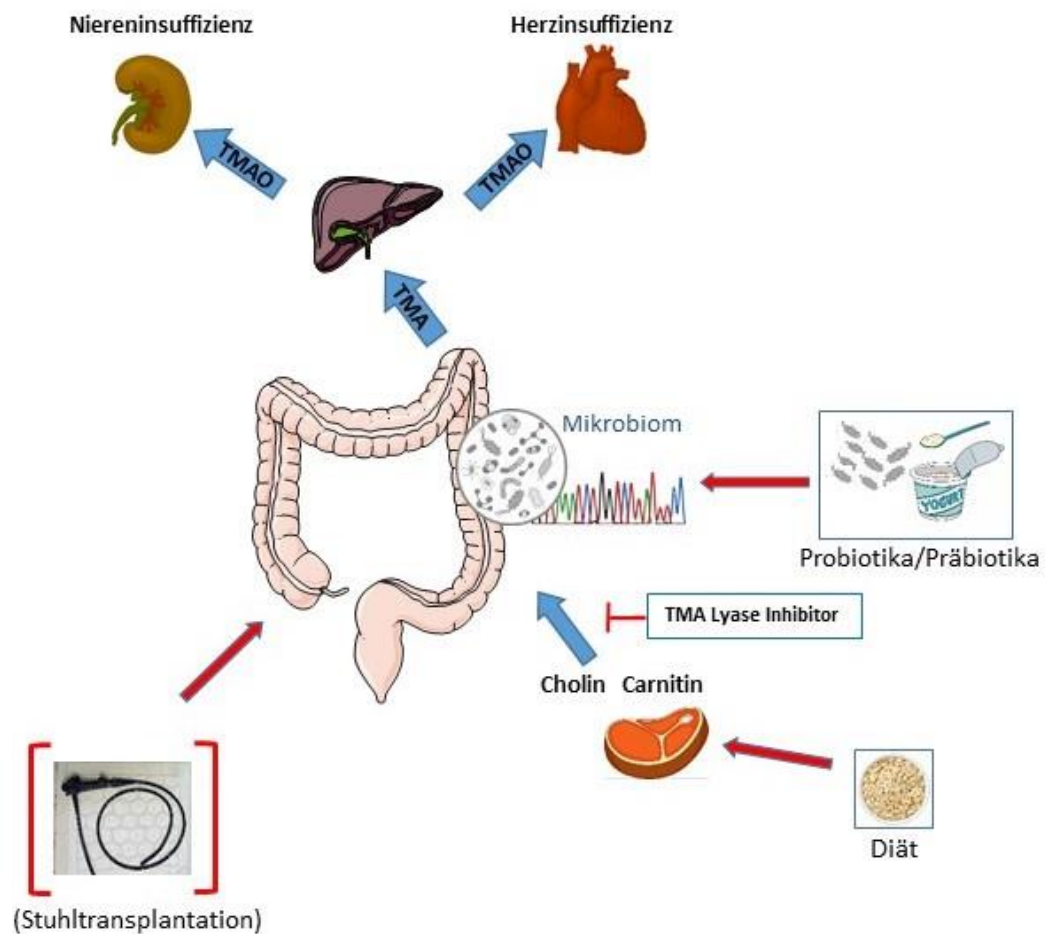
Möglich wäre die Einhaltung einer bestimmten Diät, um die Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms zu beeinflussen und somit auch die Produktion bakterieller Metabolite. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Fehler im Einhalten einer mediterranen Diät, welche protektiv hinsichtlich kardiovaskulärer Erkrankungen wirkt (Martínez-González et al. 2019), zu einem Anstieg des Metabolits TMAO im Urin führen (Filippis et al. 2016).

Ein weiterer Ansatzpunkt könnte der Einsatz von Probiotika und Präbiotika sein. Probiotika enthalten verschiedene lebensfähige Mikroorganismen während Präbiotika Lebensmittelbestandteile enthalten, die die Aktivität und das Wachstum bestimmter Bakterienstämme gezielt beeinflussen können. Da bereits bekannt ist, dass einzelne Darmbakterien positive Einflüsse auf den inflammatorischen Zustand des Intestinums erzielen können (beispielsweise Butyrat-bildende Bakterien, Mayerhofer et al. 2019), liegt der Versuch nahe, jene Bakterien gezielt durch Prä-/Probiotika zu fördern, wie es in Studien zu Diabetes mellitus bereits erfolgreich beschrieben wurde (Fangmann et al. 2018).

Die Durchführung eines fäkalen Mikrobiomtransfers, auch Stuhltransplantation genannt, wie schon für therapieresistente *Clostridium difficile* Infektionen klinisch etabliert (van Nood et al. 2013; Hagel et al. 2015), wäre auch hinsichtlich der Herzinsuffizienz denkbar. Hiermit könnten herzinsuffiziente Patienten das intestinale Mikrobiom von gesunden Individuen erhalten und von der neuen eubiotischen Zusammensetzung des Mikrobioms profitieren.

In Kapitel 4.3 wurde bereits auf den Einfluss bakterieller Metabolite, wie zum Beispiel TMAO eingegangen. Da TMAO in Zusammenhang mit vermehrtem Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen und erhöhter Mortalität gebracht wird (Tang et al. 2014), sowie eine proinflammatorische Wirkung besitzt (Seldin et al. 2016), wird versucht durch TMA Lyase Inhibitoren die Konzentration von TMAO in Individuen zu senken (Tang et al. 2019), um ein besseres Outcome zu erreichen. Es ist diesbezüglich jedoch noch weitere Forschung vonnöten, da viele Zusammenhänge im TMAO-Stoffwechsel noch nicht ausreichend verstanden sind und kontrovers diskutiert werden.

Abbildung 4.1: Intestinales Mikrobiom: Interaktionen im Organismus und mögliche Angriffspunkte



Die Abbildung zeigt die Interaktionen des intestinalen Mikrobioms im Gesamtorganismus. Vor allem nach dem Verzehr von Fleisch und anderen tierischen Produkten kommt es durch bestimmte Spezies von Darmbakterien zur Bildung von TMA, welches in der Leber zu TMAO verstoffwechselt wird. Dieser Metabolit hat Einfluss auf die Funktionalität sowohl von Herz als auch von Niere (vgl. **4.3 Einfluss bakterieller Metabolite**). Zusätzlich werden mögliche Angriffspunkte (Diät, Stuhltransplantation, Probiotika, Präbiotika, TMA Lyase Inhibitoren) zur Modulation des intestinalen Mikrobioms dargestellt.

Die vorliegende Arbeit unterstreicht die Charakteristik der Herzinsuffizienz als multidimensionales inflammatorisches Syndrom. Zusätzliche Erforschung aller Modalitäten dieses Syndroms sind für eine mögliche Verbesserung des klinischen Outcomes durch optimierte Behandlung nötig.

5 Zusammenfassung

Die Herzinsuffizienz ist ein Syndrom von weltweiter Signifikanz, das epidemische Ausmaße annimmt. Sie ist der häufigste Hospitalisierungsgrund in Deutschland und Behandlung sowie Prognose lassen immer noch zu wünschen übrig. Mehrere Studien weisen intestinale Dysbiosen in Bezug auf verschiedene Krankheiten, so auch im Zustand der Herzinsuffizienz nach. Fragestellung der vorliegenden Arbeit war, ob sich durch die Induktion einer Herzinsuffizienz das intestinale Mikrobiom verändert und wenn ja, wie.

Hierzu wurden Mäuse in verschiedene Gruppen eingeteilt, um an einem Teil eine aortale Konstriktionsoperation (TAC), an einem anderen Teil eine Scheinoperation durchzuführen und den Rest der Versuchstiere als Kontrollgruppe zu belassen. Es wurden Stuhlproben der Tiere an Tag 0, 7, 14, 28 und 42 gesammelt und zur Evaluation der kardialen Funktion nach 4 und 6 Wochen eine Echokardiographie der operierten Mäuse durchgeführt. An Tag 42 des Experiments wurde alle Mäuse getötet und ihnen Herz, Lunge sowie Ileum entnommen.

Die Sequenzierung der Stuhlproben erfolgte mittels der 16s-rRNA-Sequenzierungsmethode der variablen Regionen V1 und V2 des 16s-rRNA-Gens.

Im Folgenden wurden die Mikrobiota der herzinsuffizienten Versuchstiere, die wiederum je nach linksventrikulärer Auswurfraction in zwei Untergruppen aufgeteilt wurden (TAC mild und TAC severe), und die der scheinoperierten sowie Kontrolltiere verglichen.

Eine signifikante Veränderung der Alpha- und Beta-Diversität konnte nicht nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich in der Varianzanalyse eine signifikante Veränderung ($p=0,002$ [TAC severe]) der Bakterienzusammensetzung in der TAC severe Gruppe im Zeitverlauf, welche sich hauptsächlich in den ersten sieben Tagen nach der TAC-Operation manifestiert ($p=0,019$). Dies entspricht einer über jeden Zeitpunkt signifikanten Veränderung der Alpha-Diversität innerhalb der TAC severe Gruppe. Die vergleichenden Hauptkomponentenanalysen der einzelnen Versuchsgruppen zeigen einen Trend der Separation der TAC Gruppen von den beiden Gruppen mit Kontrollfunktion, sowie eine breitere Streuung.

Es wurden vor allem veränderte Abundanzen der Bakterienfamilien Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, der Bakteriengattungen Mucispirillum und Ruminococcus und des Bakterienphylums Proteobacteria im Vergleich der herzinsuffizienten mit den gesunden Tieren beobachtet. Diese Taxa werden teilweise auch durch andere Studien im Zusammenhang mit der Herzinsuffizienz (Ruminococcaceae) aber auch anderen Erkrankungen, wie beispielsweise


chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Clostridium difficile Infektionen, Atherosklerose und Salmonellen-Kolitis beschrieben.

Schlussfolgernd konnte im Mausmodell eine Veränderung des intestinalen Mikrobioms nach Induktion von Herzinsuffizienz aufgezeigt werden. Eine bakterielle Dysbiose könnte Einfluss haben auf die Pathogenese und den Verlauf einer Herzinsuffizienz, wenngleich diesbezüglich noch weitere Forschung vonnöten ist.

6 Anhang

Tierversuchsantrag

Schleswig-Holstein
Der achte Norden

SH 

Schleswig-Holstein
Ministerium für Energiewende,
Landwirtschaft, Umwelt, Natur
und Digitalisierung

Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt,
Natur und Digitalisierung | Postfach 71 51 | 24171 Kiel

Frau Dr. Martina Spehlmann
Klinik für Innere Medizin III
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Arnold-Heller-Straße 3, Haus 6
24105 Kiel

Ihr Zeichen:
Ihre Nachricht vom: 01.10.2017
Mein Zeichen: V 241 - 60965/2017(129-10/17)
Meine Nachricht vom: /

Dr. Michaela Sekulla
Michaela.Sekulla@melund.landsh.de
+49 431 988-4948
+49-431-988-6-154948

nachrichtlich:
Herrn Prof. Dr. Gerhard Schultheiß
Tierschutzbeauftragter der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Olshausenstraße 40
24098 Kiel

2. Januar 2018

**Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren
sowie Kostenentscheidung**

Sehr geehrte Frau Dr. Spehlmann,

gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom
18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), zuletzt geändert durch Gesetz vom 28. Juli 2014
(BGBl. I S. 1308), erhalten Sie die folgende Genehmigung zum Versuchsvorhaben

*„Diagnostische und funktionelle Analyse des intestinalen Mikrobioms
in der Herzinsuffizienz“.*

1. Genehmigt wird das gesamte Vorhaben.

2. Es dürfen bis zu 730 Mäuse verwendet werden.

3. Leiterin des Versuchsvorhabens:
Dr. Martina Spehlmann

Dienstgebäude: Mercatorstraße 3, 5, 7, 24106 Kiel | Adolf-Wiesphal-Str. 4, 24143 Kiel | Telefon 0431 988-0 | Telefax 0431 988-7239 |
poststelle@melund.landsh.de | De-Mail: poststelle@melund.landsh.de-mail.de | www.melund.schleswig-holstein.de | E-Mail-Adressen:
Kein Zugang für elektronisch verschlüsselte Dokumente. In der Mercatorstraße 3 steht eine Ladestelle für E-Fahrzeuge (22kw) zur
Verfügung.

4. Stellvertreter:
PD Dr. Mark Lüdde
5. Wechselt die Leiterin des Versuchsvorhabens oder ihr Stellvertreter, so ist diese Änderung unverzüglich anzuzeigen; die Genehmigung gilt weiter, wenn sie nicht innerhalb eines Monats widerrufen wird.
6. Ort der Durchführung: ZTH UKSH Kiel.
7. Das Versuchsvorhaben ist gem. § 35 Tierschutz-Versuchstierverordnung rückblickend zu bewerten.
Dazu ist ein Bericht (ggf. mit Unterlagen) unter Berücksichtigung des § 35 Abs. 2 TierSchVersV bis zum 31. Juli 2021 vorzulegen. Dieser muss u.a. auch auf die Schäden eingehen, die bei den verwendeten Tieren verursacht wurden.
8. Die im Antrag gemachten Angaben sind im übrigen Bestandteil dieser Genehmigung.

Die Genehmigung ist mit folgenden Nebenbestimmungen verbunden:

9. Die Genehmigung ist bis zum 31. 01. 2021 befristet.

Zur Genehmigung ergeht folgende Kostenentscheidung:

10. Es werden keine Kosten erhoben.

Begründung:

A. Zur Hauptsache:

Die Voraussetzungen für die Genehmigung nach § 8 Abs. 1 TierSchG sind erfüllt. Insbesondere wurde hinreichend dargelegt, dass das Vorhaben unerlässlich und die ethische Vertretbarkeit gegeben ist, die Einhaltung der gesetzlichen Vorschriften insbesondere nach dem Tierschutzgesetz und der Tierschutz-Versuchstierverordnung erwartet werden kann und durch die/den Tierschutzbeauftragte/n mit sichergestellt wird.

B. Zu den Nebenbestimmungen:

Vom beantragten Zeitraum wurde nicht abgewichen.

C. Zur Kostenentscheidung:

Ihre Einrichtung ist gem. § 8 Abs. 1 Nr. 6 Verwaltungskostengesetz des Landes Schleswig-Holstein analog als Anstalt des öffentlichen Rechts, die gemeinnützigen Zwecken dient, von Verwaltungsgebühren befreit, da die der Kostenentscheidung zugrunde liegende Angelegenheit nicht einen steuerpflichtigen wirtschaftlichen Geschäftsbetrieb betrifft.

Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Klage bei dem Schleswig-Holsteinischen Verwaltungsgericht, Brockdorff-Rantzau-Straße 13, 24837 Schleswig, schriftlich, in elektronischer Form oder zur Niederschrift der/des Urkundsbeamtin/Urkundsbeamten der Geschäftsstelle erhoben werden.

Hinweis:

Bei der Verwendung der elektronischen Form sind besondere Voraussetzungen zu beachten (vgl. Landesverordnung über den elektronischen Rechtsverkehr mit den Gerichten und Staatsanwaltschaften vom 12.12.2006 (GVOB. 2006, 361) in der z. Zt. geltenden Fassung. Hiernach wird die elektronische Form insbesondere durch eine qualifiziert signierte Datei gewährt, die nach den Maßgaben der genannten Landesverordnung übermittelt wird. Weitere Informationen zum elektronischen Rechtsverkehr mit den Gerichten und Staatsanwaltschaften sind auf der Internetseite www.justizpoststelle.schleswig-holstein.de abrufbar.

Mit freundlichen Grüßen



Dr. Michael Sekulla

7 Literaturverzeichnis

- Anker, Stefan D.; Egerer, Karl R.; Volk, Hans-Dieter; Kox, Wolfgang J.; Poole-Wilson, Philip A.; Coats, Andrew J.S. (1997): Elevated soluble CD14 receptors and altered cytokines in chronic heart failure. In: *The American Journal of Cardiology* 79 (10), S. 1426–1430. DOI: 10.1016/S0002-9149(97)00159-8.
- Antharam, Vijay C.; Li, Eric C.; Ishmael, Arif; Sharma, Anuj; Mai, Volker; Rand, Kenneth H.; Wang, Gary P. (2013): Intestinal dysbiosis and depletion of butyrogenic bacteria in *Clostridium difficile* infection and nosocomial diarrhea. In: *Journal of clinical microbiology* 51 (9), S. 2884–2892. DOI: 10.1128/JCM.00845-13.
- Bartolomaeus, Hendrik; Balogh, András; Yakoub, Mina; Homann, Susanne; Markó, Lajos; Höges, Sascha et al. (2019): Short-Chain Fatty Acid Propionate Protects From Hypertensive Cardiovascular Damage. In: *Circulation* 139 (11), S. 1407–1421. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.036652.
- Bartolomaeus, Hendrik; McParland, Victoria; Wilck, Nicola (2020): Darm-Herz-Achse : Wie Darmbakterien kardiovaskuläre Erkrankungen beeinflussen. In: *Herz* 45 (2), S. 134–141. DOI: 10.1007/s00059-020-04897-0.
- Bennett, Brian J.; Aguiar Vallim, Thomas Q. de; Wang, Zeneng; Shih, Diana M.; Meng, Yonghong; Gregory, Jill et al. (2013): Trimethylamine-N-oxide, a metabolite associated with atherosclerosis, exhibits complex genetic and dietary regulation. In: *Cell metabolism* 17 (1), S. 49–60. DOI: 10.1016/j.cmet.2012.12.011.
- Bray, J. Roger; Curtis, J. T. (1957): An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. In: *Ecological Monographs* 27 (4), S. 325–349. DOI: 10.2307/1942268.
- Chao, Anne (1984): Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. In: *Scandinavian Journal of Statistics* (Vol. 11, No. 4).
- Christ, Michael; Störk, Stefan; Dörr, Marcus; Heppner, Hans J.; Müller, Christian; Wachter, Rolf; Riemer, Uwe (2016): Heart failure epidemiology 2000-2013: insights from the German Federal Health Monitoring System. In: *European Journal of Heart Failure* 18 (8), S. 1009–1018. DOI: 10.1002/ejhf.567.
- Cole, James R.; Wang, Qiong; Fish, Jordan A.; Chai, Benli; McGarrell, Donna M.; Sun, Yanni et al. (2014): Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. In: *Nucleic acids research* 42 (Database issue), D633-42. DOI: 10.1093/nar/gkt1244.
- Dahiya, Dinesh Kumar; Renuka; Dangi, Arun Kumar; Shandilya, Umesh K.; Puniya, Anil Kumar; Shukla, Pratyosh (2019): New-Generation Probiotics. In: *Microbiome and Metabolome in Diagnosis, Therapy, and other Strategic Applications*: Elsevier, S. 417–424.
- Dolgin, Martin (1994): Nomenclature and criteria for diagnosis of diseases of the heart and great vessels. 9th ed. Boston, New York: Little Brown (A Little Brown handbook).
- Edgar, Robert C. (2004a): MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. In: *BMC bioinformatics* 5, S. 113. DOI: 10.1186/1471-2105-5-113.

- Edgar, Robert C. (2004b): MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. In: *Nucleic acids research* 32 (5), S. 1792–1797. DOI: 10.1093/nar/gkh340.
- Edgar, Robert C.; Haas, Brian J.; Clemente, Jose C.; Quince, Christopher; Knight, Rob (2011): UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 27 (16), S. 2194–2200. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr381.
- Ericsson, Aaron C. (2019): The use of non-rodent model species in microbiota studies. In: *Laboratory animals* 53 (3), S. 259–270. DOI: 10.1177/0023677219834593.
- Ewing, Brent; Green, Phil (1998): Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. In: *Genome Res.* 8 (3), S. 186–194. DOI: 10.1101/gr.8.3.186.
- Faith, Daniel P. (1992): Conservation evaluation and phylogenetic diversity. In: *Biological Conservation* 61 (1), S. 1–10. DOI: 10.1016/0006-3207(92)91201-3.
- Fangmann, Daniela; Theismann, Eva-Maria; Türk, Kathrin; Schulte, Dominik M.; Relling, Isabelle; Hartmann, Katharina et al. (2018): Targeted Microbiome Intervention by Microencapsulated Delayed-Release Niacin Beneficially Affects Insulin Sensitivity in Humans. In: *Diabetes care* 41 (3), S. 398–405. DOI: 10.2337/dc17-1967.
- Filippis, Francesca de; Pellegrini, Nicoletta; Vannini, Lucia; Jeffery, Ian B.; La Stora, Antonietta; Laghi, Luca et al. (2016): High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. In: *Gut* 65 (11), S. 1812–1821. DOI: 10.1136/gutjnl-2015-309957.
- Frank, Daniel N.; St Amand, Allison L.; Feldman, Robert A.; Boedeker, Edgar C.; Harpaz, Noam; Pace, Norman R. (2007): Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (34), S. 13780–13785. DOI: 10.1073/pnas.0706625104.
- Furusawa, Yukihiro; Obata, Yuuki; Fukuda, Shinji; Endo, Takaho A.; Nakato, Gaku; Takahashi, Daisuke et al. (2013): Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. In: *Nature* 504 (7480), S. 446–450. DOI: 10.1038/nature12721.
- Gao, Shumin; Ho, David; Vatner, Dorothy E.; Vatner, Stephen F. (2011): Echocardiography in Mice. In: *Current protocols in mouse biology* 1, S. 71–83. DOI: 10.1002/9780470942390.mo100130.
- Hagel, S.; Eppler, H-J; Feurle, G. E.; Kern, W. V.; Lynen Jansen, P.; Malfertheiner, P. et al. (2015): S2k-Leitlinie Gastrointestinale Infektionen und Morbus Whipple. In: *Zeitschrift für Gastroenterologie* 53 (5), S. 418–459. DOI: 10.1055/s-0034-1399337.
- Herp, Simone; Brugiroux, Sandrine; Garzetti, Debora; Ring, Diana; Jochum, Lara M.; Beutler, Markus et al. (2019): Mucispirillum schaedleri Antagonizes Salmonella Virulence to Protect Mice against Colitis. In: *Cell Host & Microbe* 25 (5), 681-694.e8. DOI: 10.1016/j.chom.2019.03.004.
- Holstiege, Jakob; Manas K. Akmatov; Steffen, Annika; Bätzing, Jörg (2018): Prävalenz der Herzinsuffizienz – bundesweite Trends, regionale Variationen und häufige Komorbiditäten.

- Huttenhower, Curtis; Gevers, Dirk; Knight, Rob; Abubucker, Sahar; Badger, Jonathan H.; Chinwalla, Asif T. et al. (2012): Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. In: *Nature* 486 (7402), S. 207–214. DOI: 10.1038/nature11234.
- Karlsson, Fredrik H.; Fåk, Frida; Nookaew, Intawat; Tremaroli, Valentina; Fagerberg, Björn; Petranovic, Dina et al. (2012): Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. In: *Nat Commun* 3 (1), S. 1915. DOI: 10.1038/ncomms2266.
- Koeth, Robert A.; Wang, Zeneng; Levison, Bruce S.; Buffa, Jennifer A.; Org, Elin; Sheehy, Brendan T. et al. (2013): Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. In: *Nature medicine* 19 (5), S. 576–585. DOI: 10.1038/nm.3145.
- Koren, Omry; Spor, Aymé; Felin, Jenny; Fåk, Frida; Stombaugh, Jesse; Tremaroli, Valentina et al. (2011): Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 Suppl 1, S. 4592–4598. DOI: 10.1073/pnas.1011383107.
- Krack, Andreas; Richartz, Barbara M.; Gastmann, Anja; Greim, Kasia; Lotze, Ulrich; Anker, Stefan D.; Figulla, Hans R. (2004): Studies on intragastric PCO₂ at rest and during exercise as a marker of intestinal perfusion in patients with chronic heart failure. In: *European Journal of Heart Failure* 6 (4), S. 403–407. DOI: 10.1016/j.ejheart.2004.03.002.
- Kruskal, William H.; Wallis, W. Allen (1952): Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis(2). In: *Journal of the American Statistical Association* (Vol. 47, No. 260), S. 583–621. Online verfügbar unter <http://www.jstor.org/stable/2280779>, zuletzt geprüft am 09.02.2020.
- Ley, Ruth E.; Turnbaugh, Peter J.; Klein, Samuel; Gordon, Jeffrey I. (2006): Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. In: *Nature* 444 (7122), S. 1022–1023. DOI: 10.1038/4441022a.
- Lozupone, Catherine; Knight, Rob (2005): UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. In: *Applied and environmental microbiology* 71 (12), S. 8228–8235. DOI: 10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005.
- Luedde, Mark; Winkler, Thorben; Heinsen, Femke-Anouska; Rühlemann, Malte C.; Spehlmann, Martina E.; Bajrovic, Amer et al. (2017): Heart failure is associated with depletion of core intestinal microbiota. In: *ESC heart failure* 4 (3), S. 282–290. DOI: 10.1002/ehf2.12155.
- Magoč, Tanja; Salzberg, Steven L. (2011): FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 27 (21), S. 2957–2963. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr507.
- Mamas, Mamas A.; Sperrin, Matthew; Watson, Margaret C.; Coutts, Alasdair; Wilde, Katie; Burton, Christopher et al. (2017): Do patients have worse outcomes in heart failure than in cancer? A primary care-based cohort study with 10-year follow-up in Scotland. In: *European Journal of Heart Failure* 19 (9), S. 1095–1104. DOI: 10.1002/ehf.822.
- Maniar, Kunal; Singh, Vandana; Kumar, Deepak; Moideen, Amal; Bhattacharyya, Rajasri; Banerjee, Dibyajyoti (2019): Chapter 42 - Metformin: A Candidate Drug to Control the

Epidemic of Diabetes and Obesity by Way of Gut Microbiome Modification. In: Joel Faintuch und Salamao Faintuch (Hg.): *Microbiome and Metabolome in Diagnosis, Therapy, and Other Strategic Applications*. San Diego: Elsevier Science & Technology, S. 401–408. Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128152492000427>, zuletzt geprüft am 09.02.2020.

Marchesi, Julian R.; Ravel, Jacques (2015): The vocabulary of microbiome research: a proposal. In: *Microbiome* 3, S. 31. DOI: 10.1186/s40168-015-0094-5.

Marques, Francine Z.; Nelson, Erin; Chu, Po-Yin; Horlock, Duncan; Fiedler, April; Ziemann, Mark et al. (2017): High-Fiber Diet and Acetate Supplementation Change the Gut Microbiota and Prevent the Development of Hypertension and Heart Failure in Hypertensive Mice. In: *Circulation* 135 (10), S. 964–977. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024545.

Martínez-González, Miguel A.; Gea, Alfredo; Ruiz-Canela, Miguel (2019): The Mediterranean Diet and Cardiovascular Health. In: *Circ Res* 124 (5), S. 779–798. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313348.

Max Rubner-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel (2008): Ergebnisbericht Teil 2 Nationale Verzehrsstudie II.

Mayerhofer, C.; Kummel, M.; Holm, K.; Broch, K.; Awoyemi, A.; Vestad, B. et al.: Gut microbiota composition and interactions with diet: dysbiosis in heart failure is partly related to lower fiber intake 2019.

Milani, Christian; Ticinesi, Andrea; Gerritsen, Jacqueline; Nouvenne, Antonio; Lugli, Gabriele Andrea; Mancabelli, Leonardo et al. (2016): Gut microbiota composition and *Clostridium difficile* infection in hospitalized elderly individuals: a metagenomic study. In: *Scientific reports* 6, S. 25945. DOI: 10.1038/srep25945.

Mohammed, Selma F.; Storlie, Jimmy R.; Oehler, Elise A.; Bowen, Lorna A.; Korinek, Josef; Lam, Carolyn S. P. et al. (2012): Variable phenotype in murine transverse aortic constriction. In: *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 21 (3), S. 188–198. DOI: 10.1016/j.carpath.2011.05.002.

Morrison, Douglas J.; Preston, Tom (2016): Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. In: *Gut microbes* 7 (3), S. 189–200. DOI: 10.1080/19490976.2015.1134082.

Neish, Andrew S. (2009): Microbes in gastrointestinal health and disease. In: *Gastroenterology* 136 (1), S. 65–80. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.10.080.

Oksanen, Jari; Blanchet, F. Guillaume; Friendly, Michael; Kindt, Roeland; Legendre, Pierre; McGlinn, Dan et al. (2017): Package 'vegan': Community Ecology Package. Version 2.4-2.

Pasini, Evasio; Aquilani, Roberto; Testa, Cristian; Baiardi, Paola; Angioletti, Stefania; Boschi, Federica et al. (2016): Pathogenic Gut Flora in Patients With Chronic Heart Failure. In: *JACC. Heart failure* 4 (3), S. 220–227. DOI: 10.1016/j.jchf.2015.10.009.

Pellizzon, Michael (2016): Choice of laboratory animal diet influences intestinal health. In: *Lab Animal* 45 (6), S. 238–239. DOI: 10.1038/labani.1014.

- Peng, Luying; Li, Zhong-Rong; Green, Robert S.; Holzman, Ian R.; Lin, Jing (2009): Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. In: *The Journal of nutrition* 139 (9), S. 1619–1625. DOI: 10.3945/jn.109.104638.
- Peschel, Thomas; Schönauer, Martin; Thiele, Holger; Anker, Stefan D.; Schuler, Gerhard; Niebauer, Josef (2003): Invasive assessment of bacterial endotoxin and inflammatory cytokines in patients with acute heart failure. In: *European Journal of Heart Failure* 5 (5), S. 609–614. DOI: 10.1016/s1388-9842(03)00104-1.
- Ponikowski, Piotr; Anker, Stefan D.; AlHabib, Khalid F.; Cowie, Martin R.; Force, Thomas L.; Hu, Shengshou et al. (2014): Heart failure: preventing disease and death worldwide. In: *ESC heart failure* 1 (1), S. 4–25. DOI: 10.1002/ehf2.12005.
- Ponikowski, Piotr; Voors, Adriaan A.; Anker, Stefan D.; Bueno, Héctor; Cleland, John G. F.; Coats, Andrew J. S. et al. (2016): 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. In: *European heart journal* 37 (27), S. 2129–2200. DOI: 10.1093/eurheartj/ehw128.
- Price, Morgan N.; Dehal, Paramvir S.; Arkin, Adam P. (2010): FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. DOI: 10.1371/journal.pone.0009490.t001.
- Roberts, Adam B.; Gu, Xiaodong; Buffa, Jennifer A.; Hurd, Alex G.; Wang, Zeneng; Zhu, Weifei et al. (2018): Development of a gut microbe-targeted nonlethal therapeutic to inhibit thrombosis potential. In: *Nature medicine* 24 (9), S. 1407–1417. DOI: 10.1038/s41591-018-0128-1.
- Sandek, Anja; Bauditz, Juergen; Swidsinski, Alexander; Buhner, Sabine; Weber-Eibel, Jutta; Haehling, Stephan von et al. (2007): Altered intestinal function in patients with chronic heart failure. In: *Journal of the American College of Cardiology* 50 (16), S. 1561–1569. DOI: 10.1016/j.jacc.2007.07.016.
- Schloss, Patrick D.; Westcott, Sarah L.; Ryabin, Thomas; Hall, Justine R.; Hartmann, Martin; Hollister, Emily B. et al. (2009): Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. In: *Applied and environmental microbiology* 75 (23), S. 7537–7541. DOI: 10.1128/AEM.01541-09.
- Seldin, Marcus M.; Meng, Yonghong; Qi, Hongxiu; Zhu, Weifei; Wang, Zeneng; Hazen, Stanley L. et al. (2016): Trimethylamine N-Oxide Promotes Vascular Inflammation Through Signaling of Mitogen-Activated Protein Kinase and Nuclear Factor- κ B. In: *Journal of the American Heart Association* 5 (2). DOI: 10.1161/JAHA.115.002767.
- Shannon, C. E. (1948): A Mathematical Theory of Communication. In: *Bell System Technical Journal* 27 (3), S. 379–423. DOI: 10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x.
- Shin, Na-Ri; Whon, Tae Woong; Bae, Jin-Woo (2015): Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. In: *Trends in biotechnology* 33 (9), S. 496–503. DOI: 10.1016/j.tibtech.2015.06.011.

Song, Se Jin; Lauber, Christian; Costello, Elizabeth K.; Lozupone, Catherine A.; Humphrey, Gregory; Berg-Lyons, Donna et al. (2013): Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. In: *eLife* 2, e00458. DOI: 10.7554/eLife.00458.

Stallmach, Andreas; Vehreschild, Maria J.G.T. (2016): Mikrobiom. Wissensstand und Perspektiven. Berlin/Boston: De Gruyter.

Stewart, Simon; MacIntyre, Kate; Hole, David J.; Capewell, Simon; McMurray, John J.V. (2001): More ‘malignant’ than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. In: *European Journal of Heart Failure* 3 (3), S. 315–322. DOI: 10.1016/S1388-9842(00)00141-0.

Stypmann, Jörg (2007): Doppler ultrasound in mice. In: *Echocardiography (Mount Kisco, N.Y.)* 24 (1), S. 97–112. DOI: 10.1111/j.1540-8175.2006.00358.x.

Suchodolski, Jan S. (2013): Chapter 2 - Gastrointestinal Microbiota. In: Michael J. Day und Robert J. Washabau (Hg.): *Canine & feline gastroenterology*. St. Louis, Mo: Elsevier Saunders, S. 32–41. Online verfügbar unter <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978141603661600002X>.

Tang, W. H. Wilson; Li, Daniel Y.; Hazen, Stanley L. (2019): Dietary metabolism, the gut microbiome, and heart failure. In: *Nature reviews. Cardiology* 16 (3), S. 137–154. DOI: 10.1038/s41569-018-0108-7.

Tang, W. H. Wilson; Wang, Zeneng; Fan, Yiyang; Levison, Bruce; Hazen, Jennie E.; Donahue, Lillian M. et al. (2014): Prognostic value of elevated levels of intestinal microbe-generated metabolite trimethylamine-N-oxide in patients with heart failure: refining the gut hypothesis. In: *Journal of the American College of Cardiology* 64 (18), S. 1908–1914. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.02.617.

Tang, W. H. Wilson; Wang, Zeneng; Kennedy, David J.; Wu, Yuping; Buffa, Jennifer A.; Agatsuma-Boyle, Brendan et al. (2015): Gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide (TMAO) pathway contributes to both development of renal insufficiency and mortality risk in chronic kidney disease. In: *Circ Res* 116 (3), S. 448–455. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305360.

Team, R. D. C. (op. 2010): R. A language and environment for statistical computing : reference index. [Vienna]: R Foundation for Statistical Computing.

Turnbaugh, Peter J.; Hamady, Micah; Yatsunenkov, Tanya; Cantarel, Brandi L.; Duncan, Alexis; Ley, Ruth E. et al. (2009): A core gut microbiome in obese and lean twins. In: *Nature* 457 (7228), S. 480–484. DOI: 10.1038/nature07540.

van Nood, Els; Vrieze, Anne; Nieuwdorp, Max; Fuentes, Susana; Zoetendal, Erwin G.; Vos, Willem M. de et al. (2013): Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. In: *The New England journal of medicine* 368 (5), S. 407–415. DOI: 10.1056/NEJMoa1205037.

Vatner, Stephen F.; Takagi, Gen; Asai, Kuniya; Shannon, Richard P. (2002): Cardiovascular Physiology in Mice: Conscious Measurements and Effects of Anesthesia. In: Brian D. Hoit und Richard A. Walsh (Hg.): *Cardiovascular Physiology in the Genetically Engineered*

Mouse, Bd. 238. Second edition. Boston, MA: Springer US (Developments in Cardiovascular Medicine, 238), S. 257–275.

Vinolo, Marco A. R.; Rodrigues, Hosana G.; Nachbar, Renato T.; Curi, Rui (2011): Regulation of inflammation by short chain fatty acids. In: *Nutrients* 3 (10), S. 858–876. DOI: 10.3390/nu3100858.

Wang, Hong-Bo; Wang, Peng-Yuan; Wang, Xin; Wan, Yuan-Lian; Liu, Yu-Cun (2012a): Butyrate enhances intestinal epithelial barrier function via up-regulation of tight junction protein Claudin-1 transcription. In: *Digestive diseases and sciences* 57 (12), S. 3126–3135. DOI: 10.1007/s10620-012-2259-4.

Wang, Qiong; Garrity, George M.; Tiedje, James M.; Cole, James R. (2007): Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. In: *Applied and environmental microbiology* 73 (16), S. 5261–5267. DOI: 10.1128/AEM.00062-07.

Wang, Y.; Naumann U.; Wright, S. T.; Warton, D. I. (2012b): mvabund-anRpackage for model-based analysis of multivariate abundance data. In: *Methods in Ecology and Evolution* (3), S. 471–474.

Wang, Zeneng; Roberts, Adam B.; Buffa, Jennifer A.; Levison, Bruce S.; Zhu, Weifei; Org, Elin et al. (2015): Non-lethal Inhibition of Gut Microbial Trimethylamine Production for the Treatment of Atherosclerosis. In: *Cell* 163 (7), S. 1585–1595. DOI: 10.1016/j.cell.2015.11.055.

Wilcoxon, Frank (1945): Individual Comparisons by Ranking Methods. In: *Biometrics Bulletin* 1 (6), S. 80. DOI: 10.2307/3001968.

Zhu, Weifei; Wang, Zeneng; Tang, W. H. Wilson; Hazen, Stanley L. (2017): Gut Microbe-Generated Trimethylamine N-Oxide From Dietary Choline Is Prothrombotic in Subjects. In: *Circulation* 135 (17), S. 1671–1673. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025338.

Zuo, Tao; Ng, Siew C. (2018): The Gut Microbiota in the Pathogenesis and Therapeutics of Inflammatory Bowel Disease. In: *Frontiers in microbiology* 9, S. 2247. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02247.

8 Danksagung

Im Zuge des Abfassens meiner Dissertation habe ich dankend die Hilfe unterschiedlicher Personen angenommen. Im Folgenden möchte ich diesen nun den nötigen Dank entgegenbringen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Norbert Frey für die Möglichkeit, meine Dissertation in der Klinik für Innere Medizin III des UKSH Campus Kiel schreiben zu dürfen und für seine wertvolle Unterstützung.

Besonderer Dank gilt PD Dr. med. Mark Lüdde, dessen stetige Betreuung und guter Rat immer eine große Hilfe waren, der stets hochmotiviert hinter mir stand und ohne den das Anfertigen dieser Dissertation niemals möglich gewesen wäre.

Ich danke Nesrin Schmiedel für das Durchführen der TAC-Operation und der Echokardiographien und für ihren Rat, ihre Bemühungen und ihre bedeutende Hilfe.

Bei Corinna Bang und ihrem Team des Instituts für Klinische Molekularbiologie (IKMB) bedanke ich mich für die Aufarbeitung, Sequenzierung und Auswertung der Proben sowie für die anschaulichen Erklärungen und die Anleitung im Labor.

Ich danke dem Förderkreis der Dresdner Herz-Kreislauf-Tage für das Doktorandenstipendium, welches mir 2018 zuteilwurde und dessen Finanzierung mir erheblich geholfen hat.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, die immer geduldig meine Entwürfe korrekturlesen und mich stets unterstützten.

9 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Janika Mangels, dass ich die Dissertation mit dem Titel

Intestinales Mikrobiom nach Induktion von Herzinsuffizienz durch TAC-Operation in Mäusen

eigenständig angefertigt habe.

Bei der Anfertigung wurden folgende Hilfen Dritter entgegengenommen:

1. Die TAC-Operation der Mäuse wurde von Nesrin Schmiedel, Klinik für Innere Medizin III, Labor für molekulare Kardiologie, UKSH Kiel durchgeführt.
2. Die Echokardiographie der Mäuse wurde von Nesrin Schmiedel, Klinik für Innere Medizin III, Labor für molekulare Kardiologie, UKSH Kiel vorgenommen.
3. Die 16s rRNA Sequenzierung der bereits bearbeiteten DNA-Proben wurde von den Mitarbeitern des Sequenzierungslabors des Instituts für Klinische Molekularbiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt.
4. Die statistische Analyse der Sequenzierungsdaten erfolgte durch Herrn Malte Rühlemann (und Mitarbeiter), Institut für Klinische Molekularbiologie Kiel.

Ich habe keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und/oder Beraterdiensten bei der Anfertigung dieser Dissertation in Anspruch genommen.

Es hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar entgeltliche Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dieser Arbeit stehen.

Die vorliegende Dissertation wurde bisher nicht zwecks Beurteilung einer anderen Prüfung oder Promotion eingereicht. Es wurde kein vorheriger Promotionsantrag an einer anderen Fakultät gestellt.

Die Dissertation wurde von mir an folgendem Institut angefertigt:

Klinik für Innere Medizin III mit den Schwerpunkten Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel.

Ich versichere, dass ich die vorstehenden Angaben nach bestem Wissen und Gewissen vollständig und der Wahrheit entsprechend gemacht habe.

Kiel, im Juli 2020

Janika Mangels