



FAKULTÄT FÜR  
NATURWISSENSCHAFTEN

Der Einfluss von kurzkettigen Fettsäuren als metabolische Abbauprodukte des  
humanen Darmmikrobioms im Kontext neurologischer Erkrankungen

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften der Otto-von-Guericke-Universität  
Magdeburg

von M.Sc. Alexander Wilhelm Bernhard Duscha

geb. am 12.01.1987 in Dortmund

Gutachter: Prof. Dr. med. Aiden Haghikia

Prof. Dr. med. Christian Geis

eingereicht am: 25.09.2024

verteidigt am: 27.05.2025

## Inhalt

|   |    |
|---|----|
| <b>Präambel</b> .....   | 4  |
| <b>1. Einleitung</b> .....  | 5  |
| 1.1. Multiple Sklerose .....  | 5  |
| 1.2. Pathologie und Therapien der MS .....  | 6  |
| 1.3. Das Darm-Mikrobiom als potentieller Einflussfaktor autoimmuner<br>Erkrankungen ..... | 8  |
| 1.4. Kurzkettige Fettsäuren und ihre immunmodulatorische Bedeutung .....                  | 9  |
| 1.5. Zielsetzung .....  | 11 |
| <b>2. Material und Methoden</b> .....   | 12 |
| 2.1. Material .....   | 12 |
| 2.1.1. Laborgeräte (nach (Duscha et al., 2020)) .....                                     | 12 |
| 2.1.2. Verbrauchsmaterialien .....  | 13 |
| 2.1.3. Software .....   | 14 |
| 2.1.4. Chemikalien, Peptide und rekombinante Proteine .....                               | 15 |
| 2.1.5. Kommerzielle Kits und Assays .....   | 18 |
| 2.1.6. Antikörper .....   | 18 |
| 2.2. Methoden .....   | 20 |
| 2.2.1. Studiendesign und Studienteilnehmer .....  | 20 |
| 2.2.2. Archivierung von Serumproben .....   | 24 |
| 2.2.3. Isolation von PBMCs aus Vollblut über Dichtegradientenzentrifugation ....          | 25 |
| 2.2.4. Quantifizierung von SCFA in Serum und Liquor .....                                 | 26 |
| 2.2.5. Quantifizierung von kurzkettigen Fettsäuren in Stuhlproben .....                   | 28 |
| 2.2.6. Immunphänotypisierung .....  | 29 |
| 2.2.7. Suppressionsassay .....  | 30 |
| 2.2.8. <i>In vitro</i> Untersuchungen von PA Effekten auf PBMCs und Treg .....            | 31 |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 2.2.9.    | Bestimmung sezernierter Zytokine aus Zellkulturüberständen.....  | 31        |
| 2.2.10.   | Analyse mitochondrialer Funktion von Treg.....   | 32        |
| 2.2.11.   | Untersuchung der Mitochondrien-Morphologie bei Treg .....  | 32        |
| 2.2.12.   | Statistische Auswertung .....  | 33        |
| <b>3.</b> | <b>Ergebnisse</b> .....  | <b>34</b> |
| 3.1.      | Quantifizierung von lokalen und systemischen Konzentrationen von SCFA in MS Patienten und gesunden Kontrollen..... | 34        |
| 3.2.      | Supplementierung von PA – Dosistitration bei gesunden Kontrollen.....  | 37        |
| 3.3.      | Der Effekt von PA Supplementierung auf das periphere Immunsystem im Kontext von MS .....                           | 37        |
| 3.4.      | Der Effekt von PA Supplementierung auf andere autoimmunvermittelte Erkrankungen am Beispiel von RA .....           | 41        |
| 3.5.      | Funktionale Untersuchung von Treg im Kontext der PA Supplementierung ..  | 42        |
| 3.6.      | Untersuchung des Verhältnisses zwischen Anzahl und funktionaler Kapazität von Treg .....                           | 45        |
| 3.7.      | Langzeit-Beobachtung von klinischen Parametern bei PA Supplementierung .....                                       | 49        |
| 3.8.      | Validierung von PA Konzentrationen im Liquor von MS Patienten .....  | 54        |
| 3.9.      | Untersuchung der suppressiven Kapazität bei <i>in vitro</i> Stimulation von Treg mit PA .....                      | 55        |
| 3.10.     | Der Einfluss des Schlüsselzytokins IL10 als Mediator einer erhöhten suppressiven Kapazität von Treg .....          | 57        |
| 3.11.     | Einfluss von PA auf mitochondriale Atmung und mitochondriale Morphologie bei Treg.....                             | 59        |
| <b>4.</b> | <b>Diskussion</b> .....  | <b>64</b> |
| 4.1.      | Das Darm-Mikrobiom und seine metabolischen Abbauprodukte als modulierende Faktoren bei MS .....                    | 65        |
| 4.2.      | Einordnung der immunmodulatorischen Wirkung von PA sowie potentielle Mechanismen .....                             | 67        |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 4.3.      | Beurteilung des Einflusses von PA Supplementierung auf klinische Parameter als möglicher Schlüssel zu Neuroregeneration ..... | 69        |
| 4.4.      | Abschlussbetrachtung und Ausblick .....   | 71        |
| <b>5.</b> | <b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....  | <b>73</b> |
| <b>6.</b> | <b>Literaturverzeichnis</b> .....   | <b>75</b> |
| <b>7.</b> | <b>Ehrenerklärung</b> .....   | <b>83</b> |

## Präambel

Ergebnisse und Daten in dieser Arbeit wurden bereits in folgender Veröffentlichung publiziert:

**Duscha, A.**, Gisevius, B., Hirschberg, S., Yissachar, N., Stangl, G. I., Eilers, E., Bader, V., Haase, S., Kaisler, J., David, C., Schneider, R., Troisi, R., Zent, D., Hegelmaier, T., Dokalis, N., Gerstein, S., Del Mare-Roumani, S., Amidror, S., Staszewski, O., Poschmann, G., Stuhler, K., Hirche, F., Balogh, A., Kempa, S., Trager, P., Zaiss, M. M., Holm, J. B., Massa, M. G., Nielsen, H. B., Faissner, A., Lukas, C., Gatermann, S. G., Scholz, M., Przuntek, H., Prinz, M., Forslund, S. K., Winklhofer, K. F., Muller, D. N., Linker, R. A., Gold, R. & Haghikia, A. **2020**. Propionic Acid Shapes the Multiple Sclerosis Disease Course by an Immunomodulatory Mechanism. *Cell*, 180, 1067-1080, doi: 10.1016/j.cell.2020.02.035.

Textpassagen wurden in den Abschnitten 2.1, 2.2.4, 2.2.5, 2.2.10 und 2.2.11 teilweise übersetzt und genutzt und sind entsprechend gekennzeichnet. Abbildungen in Abschnitt 3. und 4. sind, wenn aus der Publikation verwendet, bearbeitet und entsprechend gekennzeichnet.

# 1. Einleitung

## 1.1. Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist die häufigste nicht-traumatische, chronische, neurodegenerative Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) in industrialisierten Ländern. Die Zahl der Erkrankten wird weltweit auf 2,8 Millionen Menschen geschätzt, davon ca. 250.000 an MS erkrankte Personen in Deutschland (Deutsche Multiple Sklerose Gesellschaft, DMSG; <https://www.dmsg.de/multiple-sklerose/was-ist-ms>; abgerufen am 24.06.2024). Die Ausprägung der MS ist sehr variabel und wird klassischer Weise in drei Verlaufsformen unterteilt: die schubförmige Verlaufsform (relapsing-remitting MS, RRMS), die sekundär progrediente Verlaufsform (secondary progressive MS, SPMS) und die primär progrediente MS (primary progressive MS, PPMS). Ca. 80% aller diagnostizierten MS Fälle können als RRMS klassifiziert werden. Diese tritt im Rahmen der Erstdiagnose meist mit sensorischen Ausfällen, Schwäche der Extremitäten einseitiger Sehnerventzündung, Doppelbildern oder Gangschwierigkeiten auf. Diese haben hierbei schubförmigen Charakter, da die Symptome meist über wenige Tage auftreten, sich stabilisieren und nachfolgend entweder spontan oder aufgrund von Behandlung mit Kortikosteroiden binnen weniger Wochen wieder abklingen (Noseworthy et al., 2000). Ungefähr 20 % der Patienten mit RRMS transitieren im Median nach ca. 15 Jahren zur SPMS, bei der keine Schubereignisse mehr auftreten und bei der die klinische Präsentation mit einer konstanten Verschlechterung der Symptome einhergeht. Ca. 20% aller diagnostizierten MS-Fälle sind aufgrund initialer, konstanter Verschlechterung ohne Auftreten von Schubereignissen der PPMS-Form zuzuordnen (Scalfari et al., 2010, Goldenberg, 2012, McGinley et al., 2021). Insgesamt weist die MS eine geschlechtsspezifische Verteilung auf. Hierbei kommt es zu einer erhöhten Inzidenz bei Frauen im Verhältnis von 2:1 (Compston and Coles, 2008).

Die Ätiopathogenese der MS ist aktuell nicht vollständig untersucht bzw. aufgeklärt und wird im weitesten Sinne als multifaktoriell eingestuft. Ein erster Nachweis des genetischen Einflusses gelang bereits Mitte der 90er Jahre in einer großangelegten Befragungsstudie von Halbgeschwistern mit bzw. ohne MS in Kanada (Sadovnick et al., 1996). Die erste Genomweite Assoziationsstudie (genome wide association study; GWAS) wurde mit über 12.000 Individuen durchgeführt. Hierzu zählten unter anderem über 1500 Elternpaare mit jeweils einem an MS leidendem Kind, ca. 2500 MS Patienten und mehrere gesunde Vergleichskohorten. Die erste GWAS konnte die Identifikation von 110 Einzelbasenpaar-

Polymorphismen (SNP, single nucleotide polymorphism) liefern (Hafler et al., 2007). Diese Zahl ist bis heute auf ca. 200 mit MS assoziierte SNPs angewachsen (Shirai and Yamauchi, 2022). Neben epigenetischen bzw. genetischen Faktoren (Akkad et al., 2015, Andlauer et al., 2016) spielen zudem ebenfalls exogene und endogene Umweltfaktoren eine wichtige Rolle. Diese haben über die Entwicklung der westlichen Industrie-Nationen, gerade im Bereich Lifestyle und Ernährung, in den letzten 20 Jahren stark an Bedeutung gewonnen (Ascherio and Munger, 2007). Hierzu zählen unter anderem Vitamin D Mangel (Munger et al., 2004), eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (Haahr et al., 1995, Haahr et al., 2004) und Nikotin Missbrauch (Riise et al., 2003, Friend et al., 2006). Zudem zeigen auch bestimmte, über- bzw. unterdosierte Ernährungskomponenten wie z.B. eine erhöhte Salzzufuhr einen Einfluss auf die MS auf. Eine hierzu durchgeführte Studie konnte sowohl im experimentellen Tiermodell der MS (experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis, EAE), als auch *in vitro* zeigen, dass eine erhöhte Konzentration von Natriumchlorid (NaCl) die Differenzierungsrate naiver Th(elfer) Zellen zu Th17 Zellen erhöhte, welche gleichsam im Kontext der Modell-Erkrankung einen schwereren Verlauf der EAE induzierten. Bezogen auf die Pathogenität der Th17 Zellen in der EAE, konnten die Autoren ebenfalls eine erhöhte Sekretionsrate von Tumor-Nekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) feststellen, was die Rolle von einfachen Ernährungsfaktoren bei Entstehung und Verlauf von autoimmunen, neurologischen Erkrankungen deutlich unterstreicht (Kleinewietfeld et al., 2013).

## 1.2. Pathologie und Therapien der MS

Die MS zeichnet sich charakteristischer Weise durch wiederkehrende, chronische Autoimmunangriffe gegen das weiße Hirngewebe aus, welche unter anderem durch das Versagen zentraler und/oder peripherer Toleranzmechanismen wie z.B. der fehlerhaften Thymusselektion autoreaktiver T Zellen entstehen können (Handel et al., 2018). Diese Autoimmunreaktion führt typischerweise zur Zerstörung der Myelinscheide von Nervenfasern im ZNS. Die Zerstörung von Myelin an Axonen innerhalb des ZNS durch aktivierte, autoreaktive T Zellen erfolgt in zwei aufeinander folgenden Stufen. Zunächst werden Myelin-spezifische T Zellen von antigenpräsentierenden Zellen (antigen-presenting cells; APCs) in der Peripherie aktiviert. Hierdurch wird die Expression von spezifischen Oberflächenmolekülen wie z.B. VCAM 1 (vascular cell adhesion molecule 1) erhöht, welche die Abwanderung aus den Lymphknoten erleichtern. In der Peripherie tragen entsprechend abgewanderte, autoreaktive Zellen zu einer Erhöhung der Permeabilität des Blut-Hirn-Schranken-Endothels bei, z.B. durch eine erhöhte Sekretion von proinflammatorischen Molekülen wie u.a. TNF $\alpha$  (Wekerle et al., 1991). Dies führt zur Lockerung der sog. „tight-junctions“, Verbindungen

zwischen zerebralen Endothelzellen am Übergang zwischen ZNS und Peripherie, was, abgesehen von autoimmunen Reaktionen, ebenfalls im Kontext von Infektionen auftreten kann (Minagar and Alexander, 2003). Hierdurch wird die Passage der T Zellen über die Blut-Hirn-Schranke erleichtert und eine erhöhte Migration in das ZNS ermöglicht.

Im ZNS werden die autoimmunen, aktivierten T Zellen durch Präsentation des Myelin-Antigens durch APCs stimuliert, was eine aktive Proliferation zur Folge hat. Dabei werden proinflammatorische Moleküle wie TNF $\alpha$ , Interferon (IFN) $\gamma$ , Interleukin (IL) 2 und 17 sezerniert, welche die autoimmune Antwort von inflammatorischen Zellen wie Makrophagen, Monozyten oder zytotoxischen T Zellen induzieren, welche im weiteren Verlauf nun das körpereigene Nervengewebe abbauen. Darüber hinaus können dendritische Zellen durch Präsentation von Myelin-Peptiden die Proliferation von spezifischen Th17 Zellen stimulieren und damit die autoimmune Reaktion weiter verstärken. (Hellings et al., 2002, Goverman, 2009, McFarland and Martin, 2007).

Die Autoimmunkomponente geht mit einer Zunahme von proinflammatorischen, autoreaktiven T Zellen, wie beispielsweise Th17 und Th1, sowie einer verminderten Anzahl und beeinträchtigten Funktion von regulatorischen T Zellen (Treg) einher (Kleinewietfeld and Hafler, 2014). Dieses Ungleichgewicht zwischen autoreaktiven und regulatorischen Elementen führt zu wiederkehrenden Entzündungen im Gewebe und vermittelt teilweise die fortschreitende Neurodegeneration und anschließende neurologische Defizite bei MS Patienten. Wenn eine MS Erkrankung unbehandelt bleibt, kann dies aufgrund einer frühzeitig auftretenden Neurodegeneration zu schwerwiegenden Beeinträchtigungen führen (z.B. Lähmungen oder kognitive Defizite) (Haghikia et al., 2013, Wiendl et al., 2021).

Im Zuge der letzten 30 Jahre sind zahlreiche Medikamente vor allem für die Behandlung der schubförmigen Verlaufsform der MS in verschiedenen klinischen Studien getestet und von offizieller Seite für die klinische Verwendung zugelassen worden. Die Wirkmechanismen liegen hierbei hauptsächlich in der Immunmodulation bzw. der Immunsuppression, um die frühe Autoimmunkomponente durch z.B. autoreaktive T Zellen oder APCs zu unterdrücken (Haghikia et al., 2013).

Ein Beispiel ist unter anderem Fingolimod, das erste oral einnehmbare Medikament, welches nach Phosphorylierung an mehrere der auf vielen Immunzelltypen vorhandenen Sphingosin-1-phosphat-Rezeptoren binden kann (Brinkmann et al., 2002). Diese sind für Immunzellen essentiell um nach der Reifung aus sekundären, lymphatischen Organen in das

Blut zu migrieren. Vor allem die Form des Sphingosin-1-phosphat Rezeptors 1 ist hierbei auf der Zelloberfläche von ausgereiften T und B Zellen zu finden. Dieser wird durch Bindung mit Fingolimod internalisiert und abgebaut. Hierdurch können Immunzellen innerhalb der Lymphknoten nicht mehr über die Endothelmembran migrieren und verbleiben in den lymphatischen Geweben (Matloubian et al., 2004). Dies verhindert ebenfalls im Kontext der MS die Migration über die Blut-Hirn-Schranke und in das ZNS. In klinischen Studien bei RRMS konnte gezeigt werden, dass Fingolimod in der Lage ist, unter anderem das Risiko der Krankheitsprogression signifikant zu senken (Kappos et al., 2010). Die Weiterentwicklung von Fingolimod, sog. Siponimod, ein Agonist spezifisch für die Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren 1 und 5 konnte acht Jahre später sogar Wirkung auf die Progression bei SPMS Patienten zeigen (Kappos et al., 2018).

### 1.3. Das Darm-Mikrobiom als potentieller Einflussfaktor autoimmuner Erkrankungen

Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass die zunehmende Anzahl von MS Fällen weltweit, sowie eine Zunahme anderer Autoimmunerkrankungen teilweise auf Umweltveränderungen zurückzuführen ist. Hierbei spielt insbesondere die Ernährung eine wichtige Rolle, da es durch diese zu einer veränderten Darm-Mikrobiom-Zusammensetzung kommen kann (Berer et al., 2017). Das humane Darm-Mikrobiom beinhaltet in seiner Gesamtheit mehrere Milliarden differenzierte, kommensale, symbiotische und pathogene Mikroorganismen. Es macht beim Menschen ca. 1 bis 3 % des Körpergewichts aus. Es können nur wenige der Mikroorganismen außerhalb des Wirtskörpers kultiviert werden, jedoch ist es durch die fortschrittliche Technologie des *Next Generation Sequencing* mittlerweile möglich, die mikrobielle Besiedlung aus Stuhlproben zu charakterisieren und im erkrankungsspezifischen Kontext genauer zu analysieren (Cotillard et al., 2013). Das humane Darm-Mikrobiom besteht vornehmlich aus den Stämmen *Bacteroidetes* und *Firmicutes* aus der Domäne der Bakterien, während gleichsam ebenfalls *Archaea* und Hefen zu geringen Anteilen den menschlichen Darm besiedeln (Turnbaugh et al., 2007, Ley et al., 2008, Lozupone et al., 2012, Yatsunenko et al., 2012).

Innerhalb des Darms verarbeitet die bakterielle Population unverdauliche Bestandteile von Nahrungsmitteln durch spezifisch-bakterielle Enzyme und optimiert damit die Aufnahme von Nährstoffquellen (Flint et al., 2012, Bäckhed et al., 2005). Hierbei produzieren Darmbakterien eine Vielzahl von bioaktiven Verbindungen, die für die Gesundheit und

Krankheit des Wirts entscheidend sind (Conlon and Bird, 2014). Diese Symbiose bietet entscheidende evolutionäre Vorteile bei Eukaryoten, nicht nur aufgrund der verbesserten Fermentation von Nahrungsmitteln, sondern auch aufgrund der direkten Interaktion zwischen dem Mikrobiom und dem angeborenen und adaptiven Immunsystem über das Darmepithel.

Das Darm-Mikrobiom und Immunzellen interagieren zwischen Schichten der Darmepithelmembran, die als Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe (gut-associated lymphatic tissue; GALT) bezeichnet wird. Die Wirkung von Ernährung auf das GALT kann über mehrere unterschiedliche Wege erfolgen: einerseits können Ernährungsbestandteile direkt mit Zellen des entsprechenden Gewebes interagieren; andererseits können metabolische Abbauprodukte, welche bei der Degradierung der aufgenommenen Nahrung durch Bakterien entstehen, mit dem GALT interagieren (Macia et al., 2012).

Das Darm-Mikrobiom ist vor allem notwendig für die Etablierung und Regulation der Immun-Toleranz (Honda and Littman, 2016). Regulatorische Immun-Komponenten, wie Treg, gewährleisten eine ausreichende Immun-Toleranz gegenüber einerseits endogenen Komponenten, andererseits auch spezifisch gegenüber dem pathogenen Teil des Darm-Mikrobioms (Sakaguchi et al., 2008). Das Immunsystem beeinflusst das Mikrobiom direkt und vice versa. Es liegt daher nahe, dass Autoimmunerkrankungen mit einem gestörten Mikrobiom assoziiert sind. Beispielsweise wurden in aktuellen Studien bei Patienten mit MS signifikante Veränderungen im Darm-Mikrobiom im Vergleich zu gesunden Kontrollen entdeckt (Chen et al., 2016). Bei MS Patienten waren bestimmte bakterielle Phyla, die an der Induktion von intestinalen Treg beteiligt sein sollen, im Vergleich zu gesunden Kontrollen deutlich verringert (Miyake et al., 2015).

#### 1.4. Kurzkettige Fettsäuren und ihre immunmodulatorische Bedeutung

Die klassischen Hauptnahrungsbestandteile der menschlichen Ernährung setzen sich aus Kohlenhydraten, Proteinen und Fetten zusammen. Die Hauptabbauprodukte durch bakterielle Degradierung aus vor allem ballaststoffreicher Nahrung stellen die sog. kurzkettigen Fettsäuren (short-chain fatty acids SCFA), namentlich Ethansäure (Acetic Acid, AA), Butansäure (Butyric Acid, BA) und Propionsäure (Propionic Acid, PA) (Salminen et al., 1998), sowie Mikronährstoffe wie Vitamine und Spurenelemente (Fernandez and Collins, 1987) und sekundäre Gallensäuren dar (Ajouz et al., 2014). Einmal systemisch verfügbar, haben diese Metaboliten einen entscheidenden Einfluss auf verschiedene physiologische Prozesse des menschlichen Körpers. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass der Verzehr großer Mengen an Ballaststoffen das Risiko für koronare Herzkrankheiten reduziert (Liu et al., 1999). Die Autoren einer ähnlichen Studie vermuten, dass es im Rahmen von interventionellen

Ernährungsveränderungen zu einer Reduktion des Gesamtcholesterin- sowie LDL-Cholesterinspiegels kommen könnte (Harris and Kris-Etherton, 2010), was einen positiven Einfluss auf das Risiko für kardiovaskuläre Pathogenesen haben könnte. Weiterhin scheinen erhöhte Mengen an faserreichen Vollkornbestandteilen der täglichen Ernährung mit einer Minderung des Risikos für Typ-II-Diabetes in Verbindung zu stehen (Montonen et al., 2003). Es wird vermutet, dass der Mechanismus zur Besserung der Symptomatik eine Senkung des Nüchtern-Blutzuckers sowie des glykolisierten Hämoglobins durch Ernährungsumstellung sein könnte (Post et al., 2012).

SCFA haben viele verschiedene Funktionen, hauptsächlich durch eine direkte Regulation bzw. Modulation des Immunsystems (Conlon and Bird, 2014). In mehreren Studien wurde gezeigt, dass SCFA die Immunantwort direkt regulieren/ modulieren können und damit ein entzündungshemmendes Milieu begünstigen. BA und PA haben zum Beispiel die Fähigkeit, bei Neutrophilen die Apoptose zu induzieren (Aoyama et al., 2010). In einem Tiermodell der Kolitis konnte zudem durch Zugabe von mikrobiell generiertem BA eine erhöhte Induktion der extrathymischen Differenzierung von Treg nachgewiesen werden (Arpaia et al., 2013). Gleichsam wurde ebenfalls bei BA Administration eine Verbesserung des experimentellen Krankheitsverlaufes der Kolitis aufgrund einer erhöhten Induktion der Differenzierung von kolonischen Treg gezeigt (Furusawa et al., 2013). BA konnte ebenfalls immunmodulatorisch auf intestinale Makrophagen wirken, indem es die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen durch Histondeacetylasen-(HDAC)-Inhibition reduzierte (Chang et al., 2014). Weiterführende Studien zu PA konnten neben einer Verbesserung der Blut-Hirn-Schranken Integrität (Hoyles et al., 2018), ebenfalls eine klinische Verbesserung im Rahmen eines Case-Reports für akute motor-sensorische axonale Neuropathie, eine seltene Form des Guillain-Barré-Syndroms mit schwerem, klinischen Verlauf, zeigen (Yoon et al., 2018). Außerdem zeigte eine umfassende Studie zu Atherosklerose, dass der Einsatz von PA im Kontext von Gefäßerkrankungen unter anderem durch die Reduktion des intestinalen Low Density Lipoproteins (LDL) und dem Einfluss auf Darm-assoziierte Immunzellen, ein therapeutisches Potential aufweist (Haghikia et al., 2022).

SCFA sind zusätzlich wichtige Mediatoren metabolischer Prozesse. In einer Studie zur fäkalen Mikrobiomtransplantation wurden bei der Transplantation des Darm-Mikrobioms von schlanken Spendern auf Patienten mit metabolischem Syndrom eine erhöhte Insulinsensitivität und erhöhte Mengen an BA produzierenden Bakterien detektiert (Vrieze et al., 2012). Zusätzlich können sowohl PA als auch BA das Körpergewicht und die damit verbundene Glukose-Homöostase positiv modulieren, indem sie die intestinale Glukoneogenese, also

einen Stoffwechselweg zur Synthese von Glukose aus Nicht-Kohlehydraten, aktivieren können (De Vadder et al., 2014).

Epidemiologische Studien haben schon vor langer Zeit eine Beteiligung von übermäßiger Fettaufnahme und Fettleibigkeit an der Ätiologie der MS nahegelegt (Swank et al., 1952). Dennoch wurden die direkten Auswirkungen von SCFA auf die zelluläre Immunantwort und die Pathologie des ZNS im Kontext der MS erst kürzlich untersucht (Endo et al., 2015). Im Tiermodell der MS konnte gezeigt werden, dass die Zufütterung von PA eine signifikante Zunahme der GALT-assoziierten Treg induzieren konnte. Zudem konnte gleichsam der Krankheitsverlauf des Modells durch PA abgemildert werden, was mit einer histologisch nachgewiesenen Reduktion der Demyelinisierung, sowie einer Abnahme des axonalen Schadens im ZNS einherging (Haghikia et al., 2015).

## 1.5. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des immunmodulatorischen Potentials von SCFA und deren Auswirkung im Kontext der MS. Hierzu sollen in mehreren Schritten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- A. Gibt es grundlegende Unterschiede in der Bioverfügbarkeit von SCFA im Vergleich zwischen gesunden Kontrollen und MS Patienten?
- B. Wie beeinflusst die Supplementierung von eventuell verringerten SCFA den Immunphänotyp und die Funktion spezifischer Immunzellen in gesunden Kontrollen und MS Patienten?
- C. Kann eine SCFA Supplementierung einen Einfluss auf klinische Parameter der MS haben?
- D. Über welche potentiellen Mechanismen können SCFA einen spezifischen Einfluss auf die klinische Ausprägung der MS, das Immunsystem oder das Darm-Mikrobiom haben?

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Laborgeräte (nach (Duscha et al., 2020))

|  |                                     |
|--|-------------------------------------|
| BD FACS Canto II™                              | BD Biosciences, Heidelberg          |
| LSM880 gekoppelt mit Elyra PS.1                | Zeiss, Oberkochen                   |
| API 2000                                       | Applied Biosystems, USA             |
| MACS® Mini Separator                           | Miltenyii Biotec, Bergisch Gladbach |
| MACS® Quadro Separator                         | Miltenyii Biotec, Bergisch Gladbach |
| MACS® Multi Stand                              | Miltenyii Biotec, Bergisch Gladbach |
| Poroshell HPH-C18 (2,1x150 mm, 4µm)            | Agilent Technologies, USA           |
| Safe 2020 Biologische Sicherheitswerkbank Kl.2 | Thermo Fisher Scientific, USA       |
| Gewebe-Homogenisator CK28 – 2ml                | Bertin Instruments, Frankreich      |
| HPLC Agilent 1100                              | Agilent Technologies, USA           |
| DB-FFAP (60 x 0,53 mm)                         | Agilent Technologies, USA           |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| GC-2010-FID                            | Shimadzu, Japan           |
| Seahorse Bioscience XF96 Flux Analyzer | Agilent Technologies, USA |

### 2.1.2. Verbrauchsmaterialien

|  |                                     |
|--|-------------------------------------|
| BD Cytometer Setup & Tracking Beads Kit (use with BD FACSDiva™ software v 6.x) | BD Biosciences, Heidelberg          |
| BD FACS Clean™   | BD Biosciences, Heidelberg          |
| BD FACS Flow™  | BD Biosciences, Heidelberg          |
| BD FACS Rinse™   | BD Biosciences, Heidelberg          |
| BD FACS Shutdown Solution™   | BD Biosciences, Heidelberg          |
| Gibco™ DPBS -/- (ohne Calcium und Magnesium) steril                            | Thermo Fisher Scientific, USA       |
| Gibco™ RPMI 1640 Glutamax  | Thermo Fisher Scientific, USA       |
| MACS® LD Columns   | Miltenyii Biotec, Bergisch Gladbach |
| MACS® MS Columns   | Miltenyii Biotec, Bergisch Gladbach |

|   |                              |
|---|------------------------------|
| 96 well Rundboden Zellkultur Platte, steril, einzeln verpackt | Sarstedt, Nümbrecht          |
| 7,5 ml EDTA Kabavetten  | Kabe Labortechnik, Nümbrecht |
| 7,5 ml Serum Koagulations-Gel Röhrchen                        | Kabe Labortechnik, Nümbrecht |
| 15 ml Stuhlröhre mit Spatel                                   | Kabe Labortechnik, Nümbrecht |
| Fötales Kälberserum (fetal calf serum, FCS)                   | Sigma-Aldrich, USA           |

Alle weiteren hier nicht aufgeführten Geräte und Verbrauchsmaterialien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, entsprechen den gängigen Laborstandards bzw. sind im entsprechenden Methodenteil genannt (falls Experimente in Kooperation durchgeführt wurden).

### 2.1.3. Software

|  |                             |   |
|--|-----------------------------|---|
| Imaris 9.3.3                           | Bitplane, UK                | <a href="https://imaris.oxinst.com/packages">https://imaris.oxinst.com/packages</a>                                   |
| Graphpad Prism v9.2                    | GraphPad Software Inc., USA | <a href="https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/">https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/</a> |
| BD FACSCanto™ BD FACSCanto II Software | BD Biosciences, Heidelberg  | N/A   |

|                                   |                            |   |
|-----------------------------------|----------------------------|---|
| BD FACSDiva™ FACSDiva software v6 | BD Biosciences, Heidelberg | N/A   |
| Seahorse Wave Desktop Software    | Agilent Technologies, USA  | <a href="https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/cell-analysis-software/data-analysis/wave-desktop-2-6">https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/cell-analysis-software/data-analysis/wave-desktop-2-6</a> |

#### 2.1.4. Chemikalien, Peptide und rekombinante Proteine

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| Natrium-Propionat (60 x 500 mg, verkapselt, 99,8 % Reinstoff) | Flexopharm Brain GmbH, Herne  |
| Dimethylsulfonoxid (DMSO)                                     | Sigma-Aldrich, USA            |
| CellTracker Green CMFDA                                       | Thermo Fisher Scientific, USA |
| MitoTracker Red CMXRos  | Thermo Fisher Scientific, USA |
| Hoechst 33342   | Thermo Fisher Scientific, USA |
| N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid hydrochlorid    | Sigma Aldrich, USA            |
| Glyzinethylesterhydrochlorid                                  | Sigma Aldrich, USA            |

|   |                                     |
|---|-------------------------------------|
| Butansäure- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> Natrium Salz | Sigma Aldrich, USA                  |
| Perchlor Säure  | Sigma Aldrich, USA                  |
| 2-Ethylbutansäure                                     | Sigma Aldrich, USA                  |
| Natrium Propionat- <sup>13</sup> C <sub>3</sub>       | Cambridge Isotope Laboratories, USA |
| Methan Säure  | Merck Milipore, USA                 |
| Ammoniaklösung, 32 %                                  | Merck Milipore, USA                 |
| Phosphorsäure, 85 %                                   | Merck Milipore, USA                 |
| Aqua Dest (A. dest) (ultra steril)                    | VWR, USA                            |
| Natriumhydroxid                                       | VWR, USA                            |
| Kaliumhydroxid  | VWR, USA                            |
| Isopropylalkohol                                      | VWR, USA                            |
| Methanol  | VWR, USA                            |
| Diethylether  | Th. Geyer, Höxter                   |
| Natriumdihydrogenphosphatdihydrat                     | Carl Roth, Karlsruhe                |
| Salzsäure   | Carl Roth, Karlsruhe                |

|  |                            |
|--|----------------------------|
| Ammoniumformiat (Fluka™)   | Honeywell, USA             |
| Crotonsäure  | Sigma Aldrich, USA         |
| eBioscience™ Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set (Invitrogen) | Thermo Scientific, USA     |
| BD FACS™ Lysepuffer 10X Konzentrat   | BD Biosciences, Heidelberg |
| Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare)  | Thermo Scientific, USA     |
| Lymphocyte Growth Medium (LGM)-3   | Lonza, Schweiz             |
| X-VIVO 15, serum-frei  | Biozym, Hessisch Oldendorf |
| SYLGARD™ 184 Silikon Elastomer Kit   | Dow Corning, USA           |
| Seahorse XF Kalibrierungslösung  | Agilent Technologies, USA  |
| Oligomycin   | Sigma-Aldrich, USA         |
| Antimycin A  | Sigma-Aldrich, USA         |
| Rotenon  | Sigma-Aldrich, USA         |
| Poly-D-lysine Hydrobromid  | Sigma-Aldrich, USA         |

Alle weiteren hier nicht aufgeführten, standardisierten Chemikalien wurden in Analyse-Qualität von Avantor, Merck, Carl Roth und anderen Herstellern von Laborchemikalien bezogen.

## 2.1.5. Kommerzielle Kits und Assays

|   |                                     |
|---|-------------------------------------|
| BD Multitest™ 6-Color TBNK  | BD Biosciences, Heidelberg          |
| Human IL-10 DuoSet ELISA  | R&D Systems, USA                    |
| Human IL-17 DuoSet ELISA  | R&D Systems, USA                    |
| Human IFN-gamma DuoSet ELISA  | R&D Systems, USA                    |
| CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>dim/-</sup> Regulatory T Cell Isolation Kit II, human | Miltenyii Biotec, Bergisch Gladbach |
| CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit (Invitrogen)   | Thermo Scientific, USA              |
| Naive CD4 <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit II, human   | Miltenyii Biotec, Bergisch Gladbach |
| 96well Agilent Seahorse XF Cell Culture Microplates   | Agilent Technologies, USA           |
| Agilent Seahorse XF Sensor Cartridge  | Agilent Technologies, USA           |

## 2.1.6. Antikörper

|   |                            |
|---|----------------------------|
| PerCP-Cy™5.5 Maus Anti-Human CD196 (CCR6) Klon 11A9 | BD Biosciences, Heidelberg |
| FITC Maus Anti-Human CD4 Klon RPA-T4                | BD Biosciences, Heidelberg |
| PE Maus Anti-Human CD161 Klon DX12                  | BD Biosciences, Heidelberg |

|  |                            |
|--|----------------------------|
| APC Maus Anti-Human CD183 Klon 1C6/CXCR3   | BD Biosciences, Heidelberg |
| APC Maus Anti-Human IFN- $\gamma$ Klon B27   | BD Biosciences, Heidelberg |
| PE Maus Anti-Human IL-17A Klon SCPL1362  | BD Biosciences, Heidelberg |
| FITC Maus Anti-Human CD4 Monoklonaler Antikörper (Klon RPA-T4), eBioscience™ (Invitrogen)            | Thermo Scientific, USA     |
| APC Maus Anti-Human CD25 Monoklonaler Antikörper (Klon BC96), eBioscience™ (Invitrogen)              | Thermo Scientific, USA     |
| PE Maus Anti-Human FOXP3 Monoklonaler Antikörper (Klon 236A/E7), eBioscience™ (Invitrogen)           | Thermo Scientific, USA     |
| eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 780 (Invitrogen)  | Thermo Scientific, USA     |
| Unkonjugierter Maus Anti-Human CD3 Monoklonaler Antikörper (Klon UCHT1), eBioscience™ (Invitrogen)   | Thermo Scientific, USA     |
| Unkonjugierter Maus Anti-Human CD28 Monoklonaler Antikörper (Klon CD28.2), eBioscience™ (Invitrogen) | Thermo Scientific, USA     |
| Maus Anti-Human IL-10 Monoklonaler Antikörper (Klon JES3-9D7) (Invitrogen)                           | Thermo Scientific, USA     |

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Studiendesign und Studienteilnehmer

Diese Studie wurde nach fachkundiger Prüfung der Ethik Kommissionen der Fakultät für Medizin der Ruhr-Universität Bochum (Reg.Nr. 15-5351, 4493-12, 17-6235) und der Fakultät für Medizin der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (Reg.Nr. 357\_17B) unter genannten Registrierungsnummern genehmigt. Patienten wurden rekrutiert in der Abteilung für Neurologie des St. Josef Hospitals Bochum, Universitätsklinikum der Ruhr-Universität Bochum, der Abteilung für Neurologie und Komplementärmedizin des Evangelischen Krankenhauses (EVK) Hattingen und der Abteilung für Rheumatologie des Universitätsklinikums Erlangen. Alle Studienteilnehmer wurden vor der Teilnahme entsprechend der jeweiligen Patienten- bzw. Probandenaufklärungsbögen vom Studienarzt/Studienleiter aufgeklärt und gewährten ihre Zustimmung per Unterschrift. Es wurden nur MS Patienten eingeschlossen, die eine gesicherte MS Diagnose nach McDonald Kriterien (2017) aufwiesen und bei denen eine Bestimmung der oligoklonalen Banden im Liquor mit positivem Befund durchgeführt wurde.

Gesunde Kontrollpersonen (healthy controls; HC), rheumatoide Arthritis (RA) Patienten und MS Patienten wurden zu Beginn der Studie angewiesen, zweimal täglich eine 500 mg Kapsel Natrium-Propionat (PA; Flexopharm Brain GmbH, Deutschland) mit ausreichender Menge Wasser für 14 Tage kontinuierlich einzunehmen. Eine Verlängerung der Einnahmepériode bis hin zu drei Jahren nach erstmaliger Gabe wurde im Einklang mit der genehmigten Ethik auf freiwilliger Basis der Probanden/Patienten durchgeführt. Patienten mit Erstdiagnose MS und keiner immun-modulatorischen Basistherapie erhielten nach Zustimmung PA initial für 14 Tage ohne weitere Medikation (Therapie-naive, *de novo*). Im Anschluss wurde eine individuelle Basistherapie verordnet. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ergeben sich somit folgende Zeitpunkte: d0 (Basiswert), d14 (14 Tage PA Einnahme), d90 (drei Monate / 90 Tage PA Einnahme bei *de novo* Patienten) sowie longitudinal (PA Einnahme zwischen drei Monaten und drei Jahren bei Patienten mit Basistherapie). MS Patienten erhielten eine neurologische Untersuchung durch einen Neurostatus C zertifizierten Neurologen in der entsprechenden neurologischen Ambulanz des rekrutierenden Zentrums alle drei bis sechs Monate im Studienverlauf. Hierbei wurden potentielle Schübe, neue neurologische Symptome bzw. Krankheitsprogression über die

Expanded Disability Status Scale (EDSS, Abstufung siehe Tabelle 2.2.1.A) sowie etwaige Nebenwirkungen erfasst.

Die durchgeführte Studie war mit einer Effektgröße von 0,28 ausreichend aussagekräftig (Power-Berechnung mit dem primären Endpunkt Treg Zunahme basierend auf zuvor publizierten Daten im Tiermodell (Haghikia et al., 2015)). Unter Annahme eines Standardfehlers von 0,05 ergab sich somit eine statistische Aussagekraft von 85%. Eine Power-Analyse für eine unabhängige Validierungskohorte wurde nachfolgend statistisch mit dem Wilcoxon Signed-Rank-Test durchgeführt. Hierbei ergab sich ein  $n$  von 36 *de-novo*-Patienten mit einer Effektgröße von 0,5 (basierend auf den Daten der initialen MS-Kohorte), einem Standard-Fehler von 0,05 und einer statistischen Aussagekraft von 90 %. Power Analysen wurden mit dem Programm G-Power (Version 3.1.9.7; <https://www.psychologie.hhu.de/arbeitsgruppen/allgemeine-psychologie-und-arbeitspsychologie/gpower>) durchgeführt.

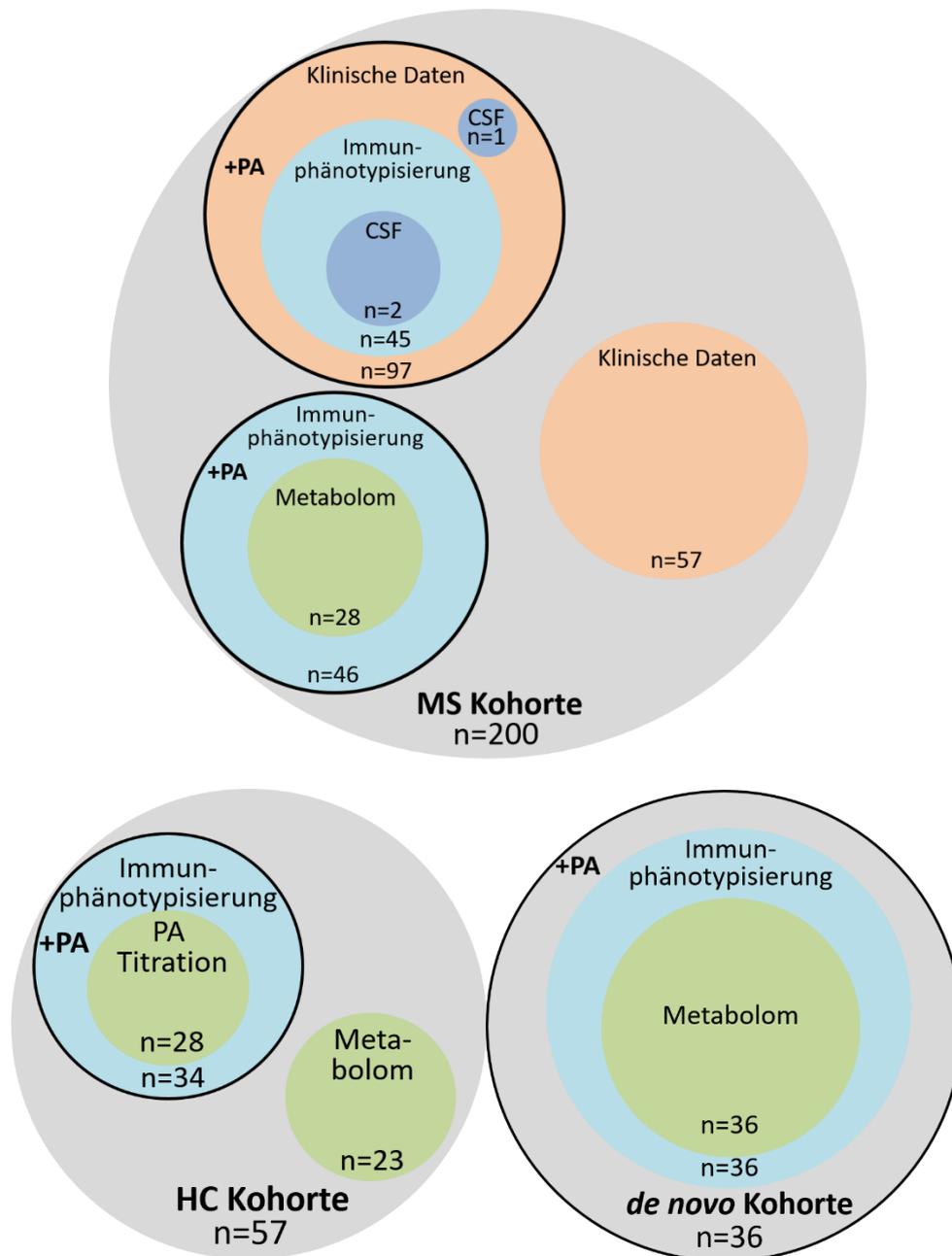
Die klinischen Daten der MS Patienten, bestehend aus EDSS und Schubrate pro Jahr (Anzahl der Schübe / Jahr), wurden für weiterführende, retrospektive Analysen in der Klinik für Neurologie der Ruhr-Universität Bochum im St. Josef-Hospital Bochum erhoben. Eine Zusammenfassung der Kohorten und der individuellen Versuchsgruppen ist in Abbildung 2.2.1.1 dargestellt.

Tabelle 2.2.1.A : Abstufung des EDSS (nach <https://www.msges.at/multiple-sklerose/diagnose/edss-skala-expanded-disability-status-scale/>; abgerufen am 23.11.2022)

| Grad | Beschreibung  |
|------|---|
| 0,0  | normale neurologische Untersuchung  |
| 1,0  | keine Behinderung, minimale Abnormität in einem funktionellen System  |
| 1,5  | keine Behinderung, minimale Abnormität in mehr als einem funktionellen System   |
| 2,0  | minimale Behinderung in einem funktionellen System  |
| 2,5  | minimale Behinderung in zwei funktionellen Systemen   |
| 3,0  | mäßiggrade Behinderung in einem funktionellen System oder leichte Behinderung in drei bis vier funktionellen Systemen bei vollkommener Gehfähigkeit |

|      |  |
|------|--|
| 3,5  | völlig gehfähig, aber mit mäßiger Behinderung in einem funktionellen System (Grad 3) und ein bis zwei funktionellen Systemen Grad 2; oder in zwei funktionelle Systemen Grad 3; oder in fünf funktionellen Systemen Grad 2                                 |
| 4,0  | gehfähig ohne Hilfe und Rast für eine Strecke von 500 Metern. Aktiv während ca. 12 Stunden pro Tag trotz relativ schwerer Behinderung  |
| 4,5  | gehfähig ohne Hilfe und Rast für eine Strecke von 300 Metern, ganztägig arbeitsfähig, gewisse Einschränkung der Aktivität, minimale Unterstützung nötig, relativ schwere Behinderung   |
| 5,0  | gehfähig ohne Hilfe und Rast für eine Strecke von 200 Metern, Behinderung beeinträchtigt tägliche Aktivität wie beispielsweise Fähigkeit zu Vollzeit-Berufstätigkeit ohne besondere Vorkehrungen   |
| 5,5  | gehfähig ohne Hilfe und Rast für eine Strecke von 100 Metern, Behinderung macht normale tägliche Aktivität unmöglich   |
| 6,0  | Bedarf intermittierend oder auf einer Seite konstant, Gehhilfe erforderlich, um eine Strecke von 100 Metern ohne Rast zurückzulegen  |
| 6,5  | konstanter Bedarf von Gehhilfe auf beiden Seiten, um eine Strecke von 20 Metern ohne Rast zurückzulegen  |
| 7,0  | unfähig, selbst mit Hilfe, mehr als eine Strecke von fünf Metern zu gehen, weitgehend auf einen Rollstuhl angewiesen, Rollstuhl kann ohne Hilfe bewegt und transferiert werden   |
| 7,5  | unfähig, mehr als ein paar Schritte zurückzulegen, auf den Rollstuhl angewiesen, Hilfe für Transfer erforderlich, Rollstuhl kann selbst bewegt werden, kann jedoch nicht ganztägig im Rollstuhl verbringen, eventuell motorisierter Rollstuhl erforderlich |
| 8,0  | weitgehend auf Bett oder Rollstuhl angewiesen, Körperpflege weitgehend ohne Hilfe möglich, Arme meist gut zu benützen  |
| 8,5  | weitgehend – auch tagsüber – auf Bett angewiesen, Arme teilweise zu benützen, teilweise Selbstpflege möglich   |
| 9,0  | hilflos auf Bett angewiesen, Essen und verbale Kommunikation möglich   |
| 9,5  | gänzlich hilflos, braucht Unterstützung beim Essen, Schlucken und Kommunizieren  |
| 10,0 | Tod infolge der Erkrankung   |

Die Blut- und Stuhlprobenentnahme erfolgte in der Neurologischen Klinik der Ruhr-Universität Bochum, St. Josef-Hospital Bochum und in der Klinik für Neurologie II im Evangelischen Krankenhaus (EVK) Hattingen. Für Immunphänotypisierung und Suppressions-/Proliferationsassays wurde das in EDTA Kabavetten (Kabe Labortechnik, Nümbrecht) abgenommene Blut sofort nach der Entnahme in das angeschlossene Neuroimmunologische Labor des St. Josef Hospitals verbracht und bearbeitet. Serumproben (abgenommen in Serum Koagulations-Gel Röhrchen, Kabe Labortechnik, Nümbrecht; Bearbeitung siehe Abschnitt 2.2.2) und Stuhlproben (abgenommen in Stuhlröhre mit Spatel, Kabe Labortechnik, Nümbrecht) wurden für spätere Analysen kurz nach Abnahme bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Auch periphere, mononukleäre Zellen aus dem Blut (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) wurden nach Isolation über Dichtegradientenzentrifugation (siehe Abschnitt 2.2.3) lebendig für  $1^{\circ}\text{C}$  pro Minute bis  $-80^{\circ}\text{C}$  in RPMI 1640 + GlutaMax (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, USA) mit 5 % Dimethylsulfonoxid (DMSO, Sigma Aldrich, USA) und 10 % fötalem Kälberserum (fetal calf serum, FCS, Sigma Aldrich, USA) für spätere Experimente eingefroren.



**Abbildung 2.2.1.1:** Schematische Übersicht über die Studienkohorten und entsprechende Einteilung in verschiedene Experimentgruppen; Abbildung modifiziert nach (Duscha et al., 2020).

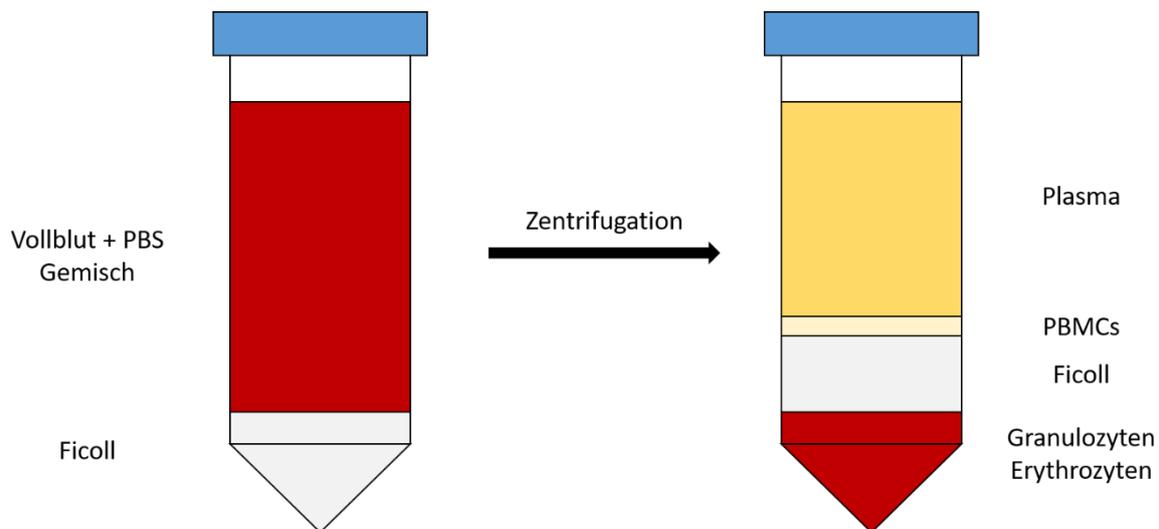
## 2.2.2. Archivierung von Serumproben

Serumproben wurden innerhalb von zwei Stunden nach Blutabnahme im Neuroimmunologischen Labor der Abteilung für Neurologie des St. Josef Hospitals Bochum

weiterbearbeitet. Hierzu wurden gefüllte Serum-Röhrchen entsprechend des individuellen Gewichtes tariert und bei 2000 x g für 15 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Serumüberstand wurde im Anschluss ohne Kontamination durch Sediment- bzw. Zellbestandteile in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße mit Schraubverschluss aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Untersuchung eingefroren.

### 2.2.3. Isolation von PBMCs aus Vollblut über Dichtegradientenzentrifugation

Die Isolation von PBMC erfolgte in einem Zeitrahmen von 2 bis 3 Stunden nach Blutentnahme in 7,5 ml EDTA Kabavetten (Kabe Labortechnik, Deutschland) unter einer sterilen Sicherheitswerkbank. Hierzu wurde zu Beginn 2 Kabavetten Vollblut (15 ml) im Verhältnis 1:2 mit DPBS -/- (Dulbeccos Phosphat Bufferd Saline ohne Calcium und Magnesium, Gibco™, Thermo Scientific, USA) auf 30 ml verdünnt. Anschließend wurde in ein 50 ml Falcon Tube 15 ml Ficoll Paque Plus (GE Healthcare, Thermo Scientific, USA) vorgelegt und 30 ml des Vollblut-PBS Gemisches vorsichtig aufgeschichtet. Im Anschluss wurde das Gemisch bei 800 x g für 30 min bei Raumtemperatur ohne Beschleunigung und Bremse zentrifugiert. Im Zuge der Zentrifugation wurden aufgrund der molekularen Beschaffenheit des Ficolls die einzelnen Zellbestandteile aufgetrennt (siehe Abb. 2.2.3.1). Abschließend wurde die Interphase mit PBMCs zwischen Ficoll und Plasma mit einer 1000 µl Pipette vorsichtig abpipettiert und in ein neues 50 ml Falcon Tube überführt. Die Zellsuspension wurde auf 50 ml mit kaltem DPBS -/- aufgefüllt und bei 500 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 5 ml DPBS -/- resuspendiert und wiederum mit kaltem DPBS -/- auf 50 ml aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 500 x g für 10 min auf 4°C. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Zellpellet in 10 ml kaltem DPBS -/- resuspendiert. Die PBMCs wurden mittels Neubauer Zählkammer gezählt und entsprechend nachfolgender Experimente in Fraktionen aufgeteilt und weiterverwendet und/oder eingefroren (Suppressions Assay, Archivierung, etc.).



**Abbildung 2.2.3.1:** Schematische Darstellung der Dichtegradientenzentrifugation zur Isolation von PBMCs aus EDTA-Vollblut.

#### 2.2.4. Quantifizierung von SCFA in Serum und Liquor

Die Untersuchung von SCFA wurde in Kooperation mit Frau Prof. Dr. Gabriele Stangl und Herrn Dr. Frank Hirche vom Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt. Zuvor archiviertes Probenmaterial wurde verblindet und auf Trockeneis übersendet. Anschließende Messungen wurden von Herrn Dr. Hirche durchgeführt. Die Eigenleistung dieser Arbeit bezieht sich auf die Archivierung des Biomaterials, sowie die anschließende Auswertung der entblindeten Rohdaten. Zur Vollständigkeit ist im Folgenden die in Halle verwendete Methode zur Analyse von SCFA aus Serum bzw. Liquor Proben anhand der publizierten Methode übersetzt und zusammengefasst (Duscha et al., 2020).

Für die Vorbereitung von Serumprobenmaterial wurde eine Modifikation der Methode von McArthur und Sarnaik verwendet (McArthur and Sarnaik, 1982). Pro vermessene Probe wurden initial zur Fällung 200 µl Plasma und 20 µl des internen Standards (IS) Ethylbutyrat (130 mM,) gemischt. Zu 200 µl des Plasma-IS-Gemisches wurden 10 µl 70%iger Perchlorsäure und 20 µl 2 M Salzsäure hinzugefügt und anschließend zur eigentlichen Proteinfällung mit 1 ml eiskaltem Diethylether versetzt. Nach der Phasentrennung wurden 800 µl der organischen Phase mit 7,5 µl 4 M Natriumhydroxid überführt und stark mittels Vortexschüttler vermischt. Die entsprechende Probe wurde unter konstanter Stickstoffbegasung zunächst bei Raumtemperatur und abschließend bei 60°C getrocknet. Zur

Derivatisierung wurden zurückbleibende, feste Bestandteile in 20 µl 2 M Salzsäure rekonstituiert und mit 2-Propanol auf ein Volumen von 400 µl verdünnt. Anschließend wurde die Probe bei 200 x g für 3 min zentrifugiert und nachfolgend über einen Gaschromatographen (GC-2010, Shimadzu, Deutschland) mittels einer DB-FFAP-Kapillarsäule (60 mm x 0,53 mm Innendurchmesser, Agilent Technologies, USA) und Flammenionisationsdetektoreinheit vermessen.

Zur Extraktion von PA aus Liquor wurde ebenfalls die Methode von McArthur und Sarnaik in modifizierter Form genutzt (McArthur and Sarnaik, 1982). Hierzu wurden 50 µl der Liquor-Probe mit 5 µl internem Standard d3-PA (EQ Laboratories, Deutschland; 300 mM in 10 mM NaOH) versetzt und anschließend 5 Minuten bei 8°C inkubiert. Nachfolgend wurden 50 µl der Suspension mit 50 µl 1M Perchlorsäure gemischt und nach Hinzufügen von 1 µl Diethylether für die Extraktion vorbereitet. Hierzu wurde die Probe zu Anfang 1 Minute bei 15 Hz geschüttelt und anschließend bei 200 g für 5 Minuten zentrifugiert. Nachfolgend wurden 800µl der oberen Diethyletherphase abgenommen, mit 10 µl 1M NaOH gemischt und anschließend unter Stickstoffbegasung bei Raumtemperatur verdampft.

Zur Derivatisierung wurde die Methode nach Chan (Chan et al., 2017) in modifizierter Form genutzt. Rückstände der vorherigen Extraktion wurden mit 15 µl 0,45 M Phosphorsäure und 15 µl 1M Phosphatpuffer (pH 6) rekonstituiert. Nach anschließender Zugabe von 10 µl N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-Ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (0,5 M, Sigma Aldrich, Deutschland) und 5 µl Glyzinethylester-Hydrochlorid (1,3 M, Sigma Aldrich, USA) wurde die Lösung 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion des Carbodiimid wurde durch Zugabe von 10 µl Dithiothreitol (DTT, Sigma Aldrich, Deutschland) und 15 µl Kaliumhydrogentartrat (Sigma Aldrich, Deutschland) abgestoppt. Zum Reaktionsgemisch wurden 500µl Diethylether zur Phasentrennung hinzugefügt und wie oben beschrieben zentrifugiert und anschließend unter Stickstoffbegasung bei Raumtemperatur verdampft. Der Reaktionsrückstand wurde anschließend mit einer 1/1 Mischung Methanol (Sigma Aldrich, Deutschland) und A.dest gelöst und weiterführend mittels LC-MS/MS Analyse quantifiziert.

Die LC-MS/MS-Messungen wurden mit einer Agilent 1100 HPLC, ausgerüstet mit einer Poroshell HPH-C18-Säule (150 mm x 2,1 mm, 4 mm; Agilent Technologies, Deutschland), gekoppelt mit einer API 2000 Flüssigchromatographie/Massenspektroskopie Einheit (Applied Biosystems, Deutschland) durchgeführt. Die Elution innerhalb der HPLC erfolgte bei 42 °C mittels eines Gradienten aus Methanol und 10 mM Ammoniumformiat (Sigma Aldrich, Deutschland) (Verhältnis 20/80), Methanol, Wasser und Methansäure (Verhältnis 80/20/0,1)

und Methanol (rein). Das Eluat der Säule wurde im Anschluss mit Methanol, Wasser und Methansäure im Verhältnis 180/20/0,4 angesäuert und massenspektroskopisch untersucht. Die Massenübergänge für PA lagen bei 160,1/114,1 m/z, für den deuterierten Standard bei 163,2/117,2 m/z.

#### 2.2.5. Quantifizierung von kurzkettigen Fettsäuren in Stuhlproben

Die Untersuchung von SCFA im Stuhl wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Dominik Müller, Dr. Stefan Kempa und Dr. Andras Balogh vom Max-Delbrück Zentrum (MDC) für molekulare Medizin Berlin durchgeführt. Entsprechend zu vermessende Stuhlproben wurden verblindet auf Trockeneis transferiert und in der Arbeitsgruppe/Core-Facility für Proteomics/Metabolomics bearbeitet. Die Rohdaten der Messungen wurden für die weiterführende Analyse im Rahmen der Kooperation zur Verfügung gestellt. Die Eigenleistung dieser Arbeit bezieht sich auf die Archivierung des Biomaterials, sowie die anschließende Auswertung der entblindeten Rohdaten. Zur Vollständigkeit ist im Folgenden die in Berlin verwendete Methode zur Analyse von SCFA aus Stuhlproben anhand der publizierten Methode übersetzt und zusammengefasst (Duscha et al., 2020).

SCFA in Stuhlproben wurden nach publiziertem Protokoll von Furusawa et al. (Furusawa et al., 2013) mit Modifikationen aufbereitet und analysiert. Hierzu wurden 10 mg der Stuhlprobe mit 2,8 mm Precellys Keramikugeln (Bertin Technologies, Deutschland) homogenisiert. Es wurde eine Extraktionslösung verwendet, die aus 100 mL 100 mM Crotoninsäure (interner Standard; Sigma Aldrich, Deutschland), 50 mL HCl (Sigma Aldrich, Deutschland) und 200 mL Ether (Sigma Aldrich, Deutschland) bestand. Die Proben wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur bei 1500 Umdrehungen/min auf einem Schüttler homogenisiert und anschließend 10 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. Aus der oberen Ether-Phase wurden 80 mL in neue Glasröhrchen mit 16 mL N-tert-Butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamid (MTBSTFA, Sigma Aldrich, Deutschland) übertragen. Die Proben wurden 20 Minuten bei 80 °C auf einem Schüttler bei 500 Umdrehungen/min inkubiert und danach 24 Stunden bei Raumtemperatur zur Derivatisierung belassen.

Die anschließende LC-MS/MS-Messungen wurden wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben durchgeführt.

### 2.2.6. Immunphäotypisierung

EDTA Vollblut wurde zu entsprechenden Studienzeitpunkten von MS Patienten und HC in mehreren Ansätzen zur durchflußzytometrischen Analyse gefärbt. Hierzu wurden zunächst 50 µl Vollblut in 5 ml FACS Röhrchen vorgelegt und mit 20 µl BD Multitest 6-Color TBNK (aCD3-FITC; aCD16-PE+ aCD56-PE; aCD45-PerCP Cy5.5; aCD4-PE Cy7; aCD19-APC; aCD8-APC Cy7; BD) vermischt und 20 min bei RT inkubiert. Nachfolgend wurden 500 µl BD FACS Lysepuffer hinzugefügt und 7 min bei RT und abgedunkelt inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch mit 2 ml DPBS -/- aufgefüllt und 5 min bei 500 x g auf RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 250 µl DPBS -/- resuspendiert und anschließend über die FACS Canto Software vermessen.

Für die Bestimmung der Th-Zell Subpopulationen Th1 und Th17 wurde 100 µl EDTA Vollblut mit jeweils 5 µl folgender Antikörper gemischt und 30 min bei RT abgedunkelt inkubiert: aCD196 (CCR6)-PerCP Cy5.5 (11A9; BD), aCD4-FITC (RPA-T4; BD), aCD161-PE (DX-12; BD) und aCD183 (CXCR3)-APC (1C6/CXCR3; BD) (Maecker et al., 2012). Nachfolgend wurden 500 µl BD FACS Lysepuffer hinzugefügt und 7 min bei RT und abgedunkelt inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch mit 2 ml DPBS -/- aufgefüllt und 5 min bei 500 x g auf RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 500 µl DPBS -/- resuspendiert und anschließend vermessen.

Zur Treg Analyse wurden 1 Million zuvor isolierte PBMCs (siehe Abschnitt 2.2.3) wie oben beschrieben mit CD4-FITC (RPA-T4, eBioscience) und CD25-APC (BC96, eBioscience) extrazellulär gefärbt. Im Anschluss wurde unter Verwendung des Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience) gemäß Herstellerprotokoll FoxP3 mittels FoxP3-PE (236A/E7, eBioscience) intrazellulär angefärbt. Dies umfasste eine halbstündige Inkubation in Fixierungs/Permeabilisierungspuffer (Kit Bestandteil), zwei Waschschrte mit Waschpuffer (Kit Bestandteil) bei 500 x g für 5 min auf RT, sowie eine 2 stündige Inkubation des intrazellulären Antikörpers. Nach einem weiteren Waschgang (500 x g, RT, 5min) wurde das Zellpellet mit 500 µl DPBS -/- resuspendiert und vermessen.

Die Phäotypisierung wurde an einem BD FACS Canto2 durchgeführt und mit BD FACS DIVA v6 bzw. BD FACS CANTO2-Software analysiert. Die statistische Analyse wurde mit Graphpad Prism v9.2 durchgeführt, wobei für die Intergruppenanalyse der zweiseitige Mann-Whitney-Test und für die intra-individuelle Analyse der zweiseitige gepaarte t-Test angewendet wurde.

### 2.2.7. Suppressionsassay

Für den Ansatz des Suppressionsassays wurden PBMCs aus Vollblut von HC und MS Patienten über Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll Paque PLUS (GE Healthcare) isoliert. Im Anschluss wurden aus bis zu 100 Mio PBMCs Treg über das Magnetic Activated Cell Sorting mit Hilfe des Kits für eine Auftrennung nach CD4, CD25 und CD127dim (CD4+CD25+CD127dim Regulatory T Cell Isolation Kit II, human; Miltenyi Biotec) nach Herstellerprotokoll isoliert.

Initial wurde eine Depletierung von ungewünschten Zellen vorgenommen. Hierzu wurden bis zu 100 Mio PBMCs zuerst mit einem biotinylierten Antikörpercocktail gegen diverse, ungewünschte Oberflächenmarker von Lymphozyten inkubiert (z.B CD19 für B Zellen, CD16-56 für NK Zellen). Danach erfolgte die Inkubation mit anti-Biotin Microbeads mit gekoppelten, magnetischen Molekülen. Anschließend wurde die Lösung über eine ferromagnetische Säule (LD-Säule, Miltenyi Biotec) innerhalb eines starken Magnetfeldes gegeben, um nur CD4<sup>+</sup> und CD127<sup>-</sup> Zellen zu eluieren. Die in der Säule verbliebenen Zellen wurden nachfolgend ausgespült und als Kontrollzellen für den Suppressionsassay verwendet.

Der Durchfluss der ersten Säule wurde des Weiteren mit anti-CD25 Antikörpern inkubiert und im zweiten Schritt der Aufreinigung über eine neue Säule (MS-Säule, Miltenyi Biotec) positiv selektioniert. Die somit CD4<sup>+</sup> und CD25<sup>+</sup> hafteten innerhalb der magnetischen Säule und konnten nach Abschluss des Arbeitsschrittes durch mechanisches Spülen der Säule eluiert werden.

Ausgespülte Zellen der ersten Säule (CD127<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>) wurden am Ende des Verfahrens zusammen mit dem Durchfluss der MS Säule (CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>-</sup>) als Kontrollzellen (PBMC<sup>-</sup>) zusammengeführt. Ca. 2 Millionen PBMC<sup>-</sup> wurden mit dem CellTrace CFSE Kit (Thermo Scientific) gefärbt. Dieses diente zur Untersuchung der Proliferation der gefärbten Zellen in An- und Abwesenheit von Treg. Hierzu wurden die entsprechenden Zellen mit 1 µl / 1 Million Zellen des CFSE Farbstoffs in 2 ml DPBS +/- bei 37°C für 15 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit Zugabe von 5 ml FCS (Sigma) abgestoppt und anschließend bei 500 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in Kulturmedium (X-VIVO 15, Biozym) zu jeweils 50.000 pro 100 µl resuspendiert.

Die Zellen wurden zu jeweils 50.000 Zellen pro Well in Duplikaten in Serum-freiem X-VIVO 15-Medium (Biozym) auf 96-Well-Platten (U-Boden, Sarstedt, Deutschland) ausgesät. Treg sowie ungefärbte PBMC<sup>-</sup> wurden im Verhältnis 1:2 oder 1:1 mit CFSE-gefärbten PBMC<sup>-</sup>

ausgesät. Als Referenz für die autonome Proliferation der CFSE-gefärbten Zellen wurden PBMC<sup>-</sup> separat ausgesät, ohne entsprechend andere Zellen. Die Kultur wurde zur Aktivierung potentiell proinflammatorischer Zellen mit 3 µg / ml aCD3 und 1 µg / ml aCD28 (beides Invitrogen) restimuliert.

Für IL-10-Blockierungsexperimente wurde ein anti-IL-10 Antikörper (Invitrogen) in einer Konzentration von 30 ng/ml zur Kokultur hinzugefügt. Alle Assays wurden 5 Tage lang bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Proliferation wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert, wobei tote Zellen durch Fixable Viability Dye eFluor™ 780 (eBioscience) ausgeschlossen wurden. Überstände der Kultur wurden nach Zentrifugation abgenommen und bei -80°C eingefroren für weiterführende Analysen (siehe Abschnitt 2.2.9). Die statistische Analyse wurde mit Graphpad Prism v9.2 durchgeführt; für die Intergruppenanalyse wurde ein zweiseitiger Mann-Whitney-Test angewendet, für die intra-individuelle Analyse ein zweiseitiger gepaarter t-Test.

#### 2.2.8. *In vitro* Untersuchungen von PA Effekten auf PBMCs und Treg

Archivierte PBMCs sowie archivierte, isolierte Treg von MS Patienten und HC wurden aufgetaut, gezählt und bei einer Zelldichte von 1 Mio. Zellen / ml Medium (X-VIVO 15; Biozym) in 48-Well-Platten ausgesät. Beide Zelltypen wurden mit 10 ng / ml rekombinantem IL2 (Immunotools) stimuliert, um die Zellproliferation zu unterstützen. Treg wurden zusätzlich am ersten Tag der Kultur mit 3 µg / ml aCD3 und 1 µg / ml aCD28 (Invitrogen) restimuliert. Ein halber Medienwechsel wurde jeden zweiten Tag ab Tag zwei der Restimulation mit frischem Medium inklusive besagter Zusätze durchgeführt. Die *in-vitro*-Expansion wurde 6 Tage lang fortgesetzt, bevor eine *in-vitro* Behandlung mit PA-gestartet wurde. Die expandierten PBMC und Treg wurden am 6. Tag der Kultur geerntet, gezählt und anschließend in X-VIVO 15-Medium mit den zuvor genannten Stimuli sowie zusätzlich 150 mM PA oder DPBS -/- (Gibco) als Kontrolle ausgesät. Die *in-vitro*-Behandlung wurde 5 Tage lang durchgeführt, ein halber Medienwechsel erfolgte ab Tag zwei jeden zweiten Tag. Die Zellen wurden anschließend geerntet und für den Suppressionsassay verwendet, wie zuvor beschrieben (siehe Abschnitt 2.2.8).

#### 2.2.9. Bestimmung sezernierter Zytokine aus Zellkulturüberständen

Die Zytokinkonzentrationen für IL-17, IFN $\gamma$  sowie IL-10, wurden in Triplikaten in Suppressionsassay-Überständen mittels Enzym-linked Immunosorbent Assays (ELISA) gemessen. Hierzu wurden ELISA-Duo-Kits (R&D Systems) gemäß dem Herstellerprotokoll

verwendet. Die Ergebnisse wurden auf statistische Signifikanz durch gepaarten t-Test für intra-Gruppen- und beidseitigem Mann-Whitney-Test für interindividuelle Gruppenunterschiede unter Verwendung von Graphpad Prism v9.2 getestet.

#### 2.2.10. Analyse mitochondrialer Funktion von Treg

Archivierte Tregs von *de-novo* MS Patienten wurden aufgetaut und auf vom Hersteller steril mit Poly-D-Lysin vorbeschichtete 96-Well-Agilent-Seahorse-XF-Zellkultur-Mikroplatten mit einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen pro Well in X-VIVO 15 Medium (Biozym) ausgesät und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> für 24 Stunden inkubiert. Die Sensor-Kartuschen wurden über Nacht in einem Inkubator ohne CO<sub>2</sub> bei 37°C mit Seahorse XF Calibrant hydratisiert. Nach 24 Stunden wurde das Zellmedium durch DMEM (Sigma-Aldrich) angereichert mit 2 mM Natriumpyruvat (Sigma-Aldrich), 2mM L-Glutamin (GIBCO, ThermoFisher Scientific) und 10 mM Glukose (Sigma-Aldrich) ausgetauscht. Die Zellen wurden 1 Stunde vor der Messung bei 37°C in einem Inkubator ohne CO<sub>2</sub> inkubiert. Die metabolischen Aktivitäten der Zellen wurden mit einem Seahorse Bioscience XF96 Extracellular Flux Analyzer (Agilent Technologies) gemessen. Das Zell-Mito-Stress-Test-Kit wurde hierbei nach Herstellerangaben verwendet. Kurz zusammengefasst wurden nacheinander im Abstand von 20 min jeweils der ATP-Synthase-Inhibitor Oligomycin (2 mM), FCCP (2 mM) und Antimycin A / Rotenon (1 mM/0,5 mM) sequentiell in die einzelnen Wells zu den ausplattierten Zellen injiziert. Schlüsselparameter der mitochondrialen Funktion (basale Atmung, maximale Atmung) wurden gemäß dem Mito Stress Test-Protokoll berechnet. Für die basale und maximale Atmung wurde ein zweiseitiger Mann-Whitney-Test für den Vergleich zwischen HC und MS genutzt. Eine one-way-ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für multiples Testen wurde für die Verlaufskontrollen nach PA Gabe durchgeführt.

#### 2.2.11. Untersuchung der Mitochondrien-Morphologie bei Treg

Die Untersuchungen zur mitochondrialen Morphologie bei Treg wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Konstanze F. Winklhofer und Dr. Verian Bader in der Abteilung für Molekulare Zellbiologie der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt. Die Graphiken zur mitochondrialen Morphologie wurden von der Abteilung für Molekulare Zellbiologie zur Verfügung gestellt, die Rohdaten der Mitochondrienmorphologie wurden selbstständig ausgewertet. Die Eigenleistung dieser Arbeit bezieht sich auf die Archivierung und Isolation von Treg, sowie auf die anschließende Auswertung der Rohdaten. Zur Vollständigkeit ist im Folgenden die in Bochum verwendete Methode zur Bestimmung der mitochondrialen Morphologie anhand der publizierten Methode übersetzt und zusammengefasst (Duscha et al., 2020).

Archivierte Treg wurden aufgetaut und anschließend zu je 250.000 Zellen pro 100  $\mu$ l in einer 96 well Platte mit X-VIVO 15-Medium für 20 min bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Hierzu wurde jeweils 2,5 mM CellTracker Green, 66 nM MitoTracker Red CMXRos und 1 mg/ml Hoechst 33342 hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen mit X-VIVO 15-Medium und DPBS -/- (Gibco) gewaschen (Zentrifugation bei 500 x g, RT, 5 min) und in 4% PFA in PBS (Gibco, pH 7,4) fixiert. Zur Bildaufnahme wurden die Zellen in DPBS -/- (Gibco, pH 7,4) in eine 35-mm-Glasboden-Mikroschale (m-Dish, Ibidi, Deutschland) überführt. Ca. 15-20 einzelne Treg wurden pro Individuum (HC n = 2; *de-novo* MS n = 3) mit einem Zeiss ELYRA PS.1 - LSM 880 aufgenommen. Hierbei wurden 20 bis 38 Z-Stacks bei einem Intervall von 514 nm durch 405, 488 und 561 nm Laseranregung mit 9,36 ms Pixelverweilzeit erfasst. Für die Bildanalyse wurden die Oberflächen von Zellen, Zellkernen und Mitochondrien mit der Batch-Verarbeitungsfunktion von Imaris 9.3.1 rekonstruiert. Sich hieraus ergebende Daten wurden bezogen auf mitochondriale Oberfläche, mittlere Kugelförmigkeit und zur ellipsoiden Achslänge C (längste Achse) extrahiert und mit dem Vantage-Modul von Imaris 9.3.1 exemplarisch und mit Graphpad Prism v9.2 statistisch dargestellt.

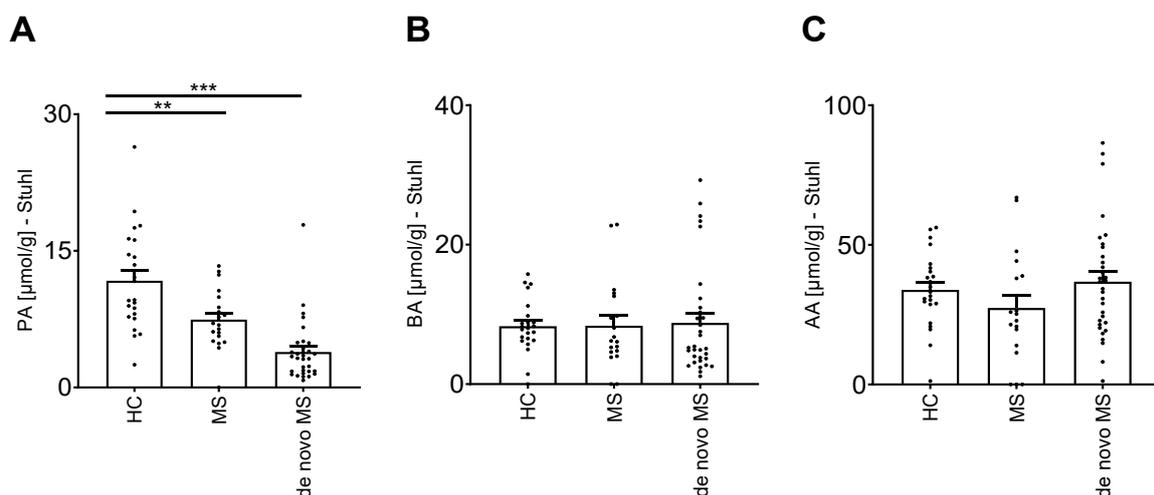
#### 2.2.12. Statistische Auswertung

Rohdaten sowie weiterführende Ergebnisse der Experimente wurden mit Graphpad Prism v9.2 statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt. Die genutzten statistischen Tests sowie n-Zahlen und p-Werte sind in den entsprechenden Beschreibungen der Abbildungen aufgeführt. Gemäß den Standards guter wissenschaftlicher Praxis sind statistisch signifikante p-Werte  $\leq 0,05$  mit einem \* dargestellt. Weiterhin entsprechen p-Werte  $\leq 0,01$  einer Darstellung von \*\* und p-Werte  $\leq 0,001$  einer Darstellung von \*\*\*. Alle Abbildungen stellen, falls in den Beschriftungen nicht anders angegeben, die entsprechenden, individuellen Werte zusammen mit einem Mittelwert und dem mittleren Standardfehler (standard error of the mean, SEM) dar.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Quantifizierung von lokalen und systemischen Konzentrationen von SCFA in MS Patienten und gesunden Kontrollen

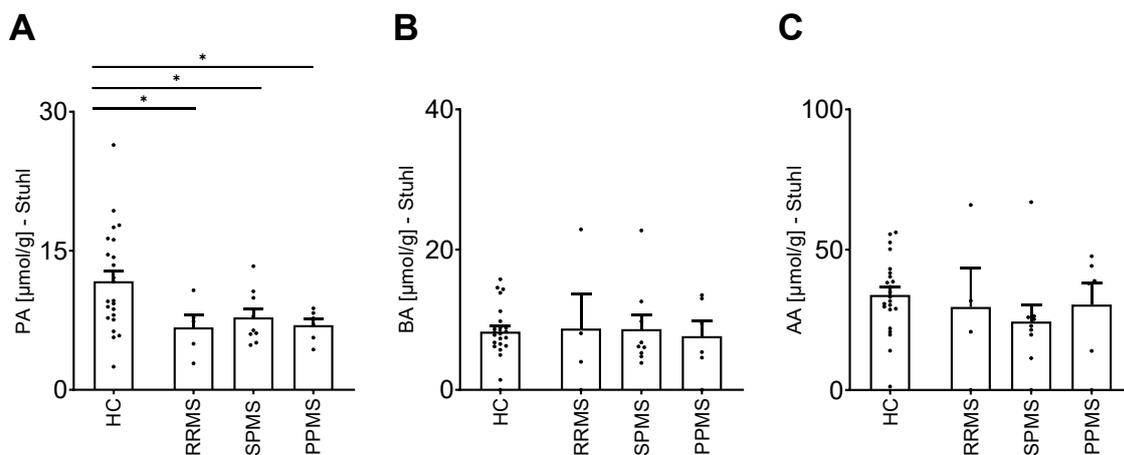
Zu Beginn wurden Stuhlproben von HC (n=23), MS Patienten unter Basistherapie (disease modifying treatment, DMT) (MS, n=20) und von MS Patienten mit Erstdiagnose (*de novo* MS, n=32) mittels Flüssigkeits-Chromatographie gekoppelt mit Massenspektroskopie (LC-MSMS) untersucht. Hierbei lag der Fokus auf SCFA, genauer auf PA, BA und AA.



**Abbildung 3.1.1 A-C:** Flüssigkeits-Chromatographische - Massenspektroskopische Messungen von SCFA in Stuhlproben von HC, MS unter DMT sowie *de novo* MS zeigten eine reduzierte Menge an PA in MS Patienten, deutlich prägnanter in Patienten mit Erstdiagnose (A). Es konnten keine signifikanten Unterschiede für AA (B) sowie BA (C) detektiert werden. Gezeigt sind Einzeldatenwerte in µmol/g Stuhlprobe verknüpft mit Mittelwert und SEM (HC n=19; MS n=20; *de novo* MS n=32); statistische Auswertung über one-way ANOVA ( $p < 0,001$ ) mit Bonferroni Korrektur für multiple Tests; HC vs MS  $p = 0,0045$ ; HC vs *de novo* MS  $p < 0,0001$ ; modifiziert nach (Duscha et al., 2020).

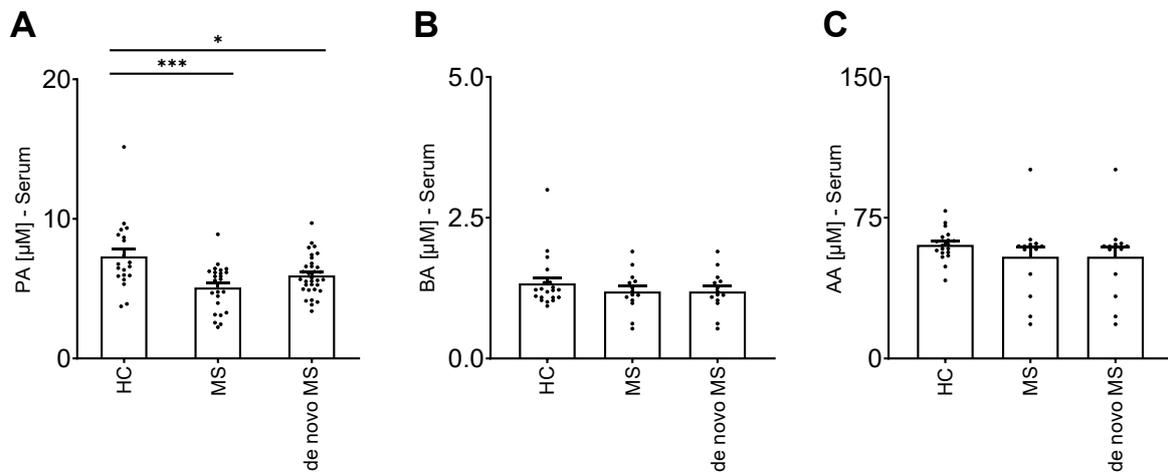
Im Stuhl konnte eine signifikant erniedrigte Konzentration von PA bei MS und *de novo* MS Patienten im Vergleich zu HC nachgewiesen werden. Zusätzlich enthielt Stuhl von Patienten mit Erstdiagnose tendenziell geringere Konzentrationen von PA im Vergleich zu Patienten mit längerer Erkrankungsdauer und DMT. Für BA sowie AA ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Untersuchungsgruppen (Abb. 3.1.1). Um einen

Effekt durch unterschiedliche Verlaufsformen der MS zu untersuchen, wurde die MS Gruppe entsprechend stratifiziert (RRMS (n=5), SPMS (n=9) und PPMS (n=6)). Dies konnte zeigen, dass die Konzentration von PA unabhängig von der Verlaufsform im Vergleich zu HC signifikant erniedrigt ist (Abb. 3.1.2 A). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Verlaufsformen bei Betrachtung der Konzentrationen von BA sowie AA im Stuhl (Abb. 3.1.2 B/C).

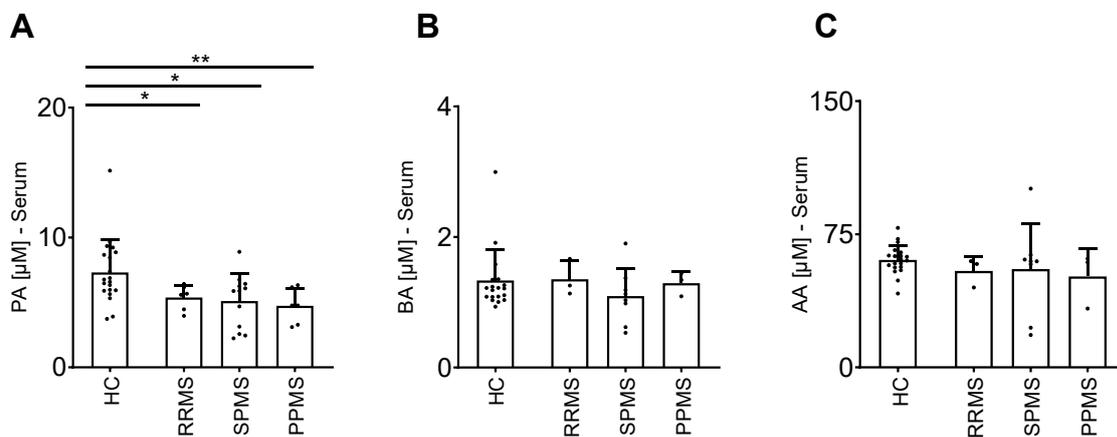


**Abbildung 3.1.2 A-C:** Stratifizierung des MS Patientenkollektives mit DMT nach Verlaufsform zeigte eine deutlich niedrigere Konzentration an PA im Stuhl von MS Patienten aller drei Verlaufsformen; HC vs RRMS  $p=0.0422$ ; HC vs SPMS  $p=0.0461$ ; HC vs PPMS  $p=0.0182$ ; (A). Für BA sowie AA ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (B/C). Gezeigt sind Einzeldatenwerte in  $\mu\text{mol/g}$  Stuhlprobe verknüpft mit Mittelwert und SEM (HC  $n=19$ ; RRMS  $n=5$ ; SPMS  $n=9$ ; PPMS  $n=6$ ); statistische Auswertung über one-way ANOVA ( $p<0,001$ ) mit Bonferroni Korrektur für multiple Tests; modifiziert nach (Duscha et al., 2020).

Nachfolgend wurden Untersuchungen in Bezug auf SCFA im Serum durchgeführt. Hier zeigte sich im Vergleich mit den Ergebnissen der Stuhlanalyse ein ähnliches Bild mit ebenfalls einer signifikant niedrigeren Konzentration von PA im Serum von MS und *de novo* MS Patienten, sowie keinen Unterschieden bei BA und AA (Abb. 3.1.3). Eine Stratifizierung in Verlaufsformen der MS mit DMT Gruppe zeigt ebenfalls eine konsequente erniedrigte Konzentration im Vergleich zu HC (Abb. 3.1.4).



**Abbildung 3.1.3 A-C:** LC-MSMS Analysen von Patientenserum spiegeln ein ähnliches Bild wie Ergebnisse der Stuhlanalysen. (A) MS Patienten mit DMT sowie *de novo* Patienten wiesen eine signifikant niedrigere Konzentration an PA im Serum im Vergleich zu gesunden Kontrollen auf (HC n=19; MS n=24; *de novo* MS n=33; HC vs MS p=0.0006; HC vs *de novo* MS p=0.0389). Es ergaben sich keine Unterschiede bei Betrachtung von BA sowie AA im Serum (B/C). Statistische Auswertung über one-way ANOVA ( $p < 0,001$ ) mit Bonferroni Korrektur für multiple Tests; modifiziert nach (Duscha et al., 2020).

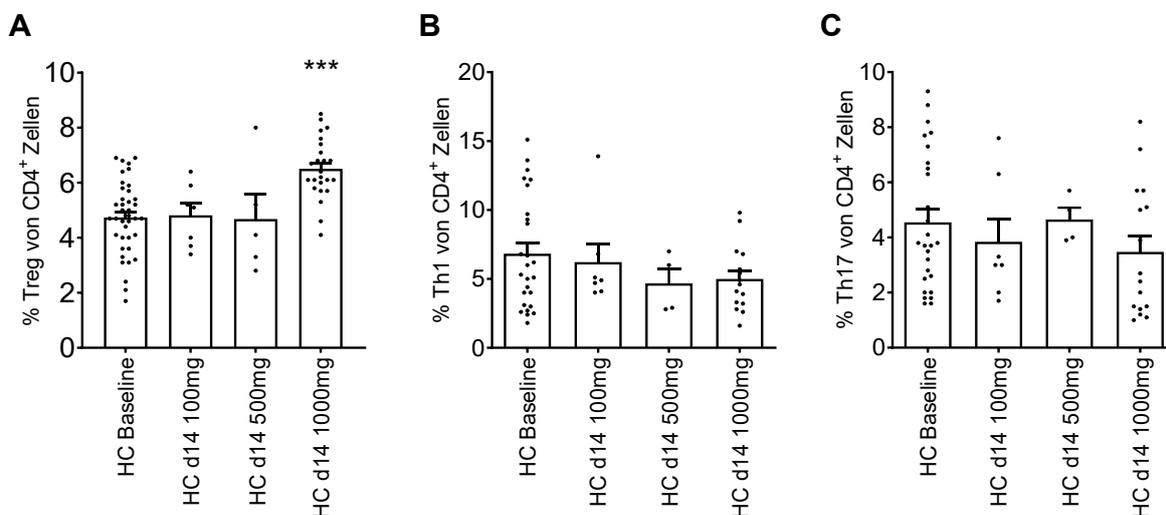


**Abbildung 3.1.4:** Aufteilung der MS Patienten-Daten mit DMT in die verschiedenen Verlaufgruppen zeigte eine deutlich erniedrigte Konzentration an PA im Serum in allen Erkrankungsformen (A). Es ergaben sich keine Unterschiede bei Betrachtung von BA sowie AA Konzentrationen. HC n=19; RRMS n=6; SPMS n=12; PPMS n=6; HC vs RRMS p=0.0372; HC vs SPMS p=0.0148; HC vs PPMS p=0.0084; statistische Auswertung über one-way ANOVA ( $p < 0,001$ ) mit Bonferroni Korrektur für multiple Tests; modifiziert nach (Duscha et al., 2020).

### 3.2. Supplementierung von PA – Dosistitration bei gesunden Kontrollen

Basierend auf den Ergebnissen der metabolischen Untersuchungen und aufgrund eigener Vorarbeiten (Haghikia et al., 2015) wurde eine Supplementierung von PA zuerst bei HC zur Dosistitration durchgeführt. Hierzu wurden für 14 Tage jeweils täglich 100 mg (n = 7), 500 mg (n = 5) oder 1000 mg (n = 24) PA in Form von zwei Kapseln eingenommen. Jeweils zu d0 und zu d14 wurden T-Zell Subtypen, namentlich Treg, Th1 und Th17 aus peripherem Blut mittels Durchflußzytometrie untersucht.

14 tägige Supplementierung von PA zeigte bei einer Dosis von 1000 mg täglich eine signifikante Erhöhung von Treg um ca. 30 % im Vergleich zum Basiswert. Niedrigere Dosierung von PA hatten keinen Einfluss auf periphere Treg (Abb. 3.2.1 A). Ebenfalls wurden Th1 sowie Th17 im Falle der gesunden Probanden nicht von einer PA Supplementierung unterschiedlicher Dosierung beeinflusst (Abb. 3.2.1 B/C). Für nachfolgende Experimente im Rahmen der Studie wurde eine PA Dosis von 1000 mg pro Tag festgelegt.



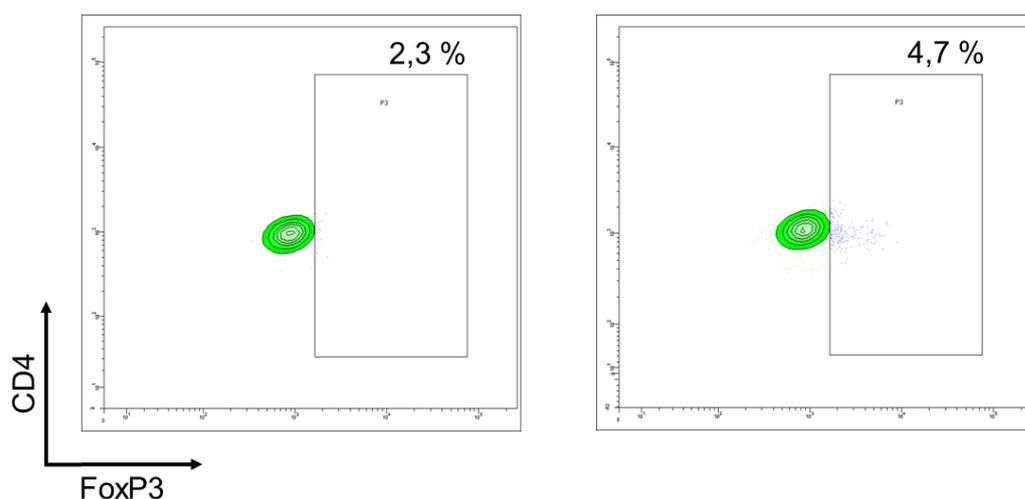
**Abbildung 3.2.1:** Dosistitration von PA bei Betrachtung der relevanten mit MS assoziierten T Zell Subpopulationen Treg, Th1 und Th17. Bei einer Dosis von 100 mg pro Tag zeigte sich eine deutliche Zunahme der Treg. Th1 sowie Th17 wurden bei HC nicht von PA Supplementierung beeinflusst. (HC; 100 mg, n = 7; 500 mg, n = 5; 1,000 mg, n = 24; jede Gruppe wurde entsprechend gegen die Baseline mittels Mann-Whitney Test auf Signifikanz überprüft; HC Baseline vs HC d14 1000 mg;  $p < 0,0001$ ), modifiziert nach Duscha et al. 2020.

### 3.3. Der Effekt von PA Supplementierung auf das periphere Immunsystem im Kontext von MS

Für eine Untersuchung des Effektes von 1000 mg PA pro Tag auf das periphere Immunsystem bei MS Patienten wurden insgesamt 91 MS Patienten mit DMT (RRMS n = 45;

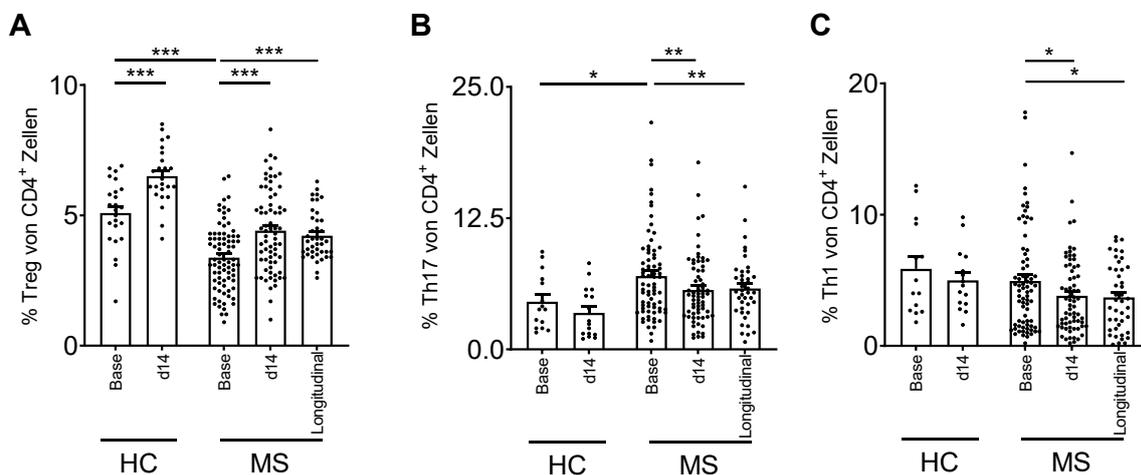
SPMS n = 36; PPMS n = 10), 36 *de novo* MS Patienten sowie 24 HC rekrutiert, welche für 14 Tage PA zur Supplementierung erhielten. Optional konnte die PA Supplementierung nach Ablauf der 14 Tage fortgesetzt werden. Dieses Angebot nahmen 40 MS Patienten mit DMT sowie 14 der *de novo* Patienten an. Weiterführende Blutabnahmen erfolgten longitudinal nach 90 Tagen.

Zur Beurteilung des Effektes von PA auf den Immunphänotyp wurden Treg, Th1, Th17 sowie ein globales Immunzellpanel bestehend aus T Zellen (CD3), Thelfer Zellen (CD4), cytotoxischen T Zellen (CD8), B Zellen (CD19) und NK Zellen (CD16/56) mittels Durchflußzytometrie zu den oben genannten Zeitpunkten gemessen. Initial zeigte sich entsprechend bekannter Literatur (Kleinewietfeld and Hafler, 2014) eine geringere Menge an Treg im peripheren Blut von MS Patienten im Vergleich zu HC. Nach 14 Tagen Supplementierung zeigte sich für Treg ein signifikanter Anstieg in HC um ca. 30 %. Treg in MS Patienten waren ebenfalls nach 14 Tagen signifikant erhöht um ca. 30 %, was einem Basiswert Niveau von HC entsprach. Dieser Effekt persistierte ebenfalls bei longitudinaler Betrachtung (Beispielhafter FACS Plot Abb. 3.3.1 und Abb. 3.3.2 A).



**Abbildung 3.3.1:** Beispielhafter Plot der durchflußzytometrischen Bestimmung von Treg über CD4 und FoxP3 (Daten eines MS Patienten; links zur Baseline, rechts nach 14 Tagen PA Supplementation; modifiziert nach Duscha et al. 2020).

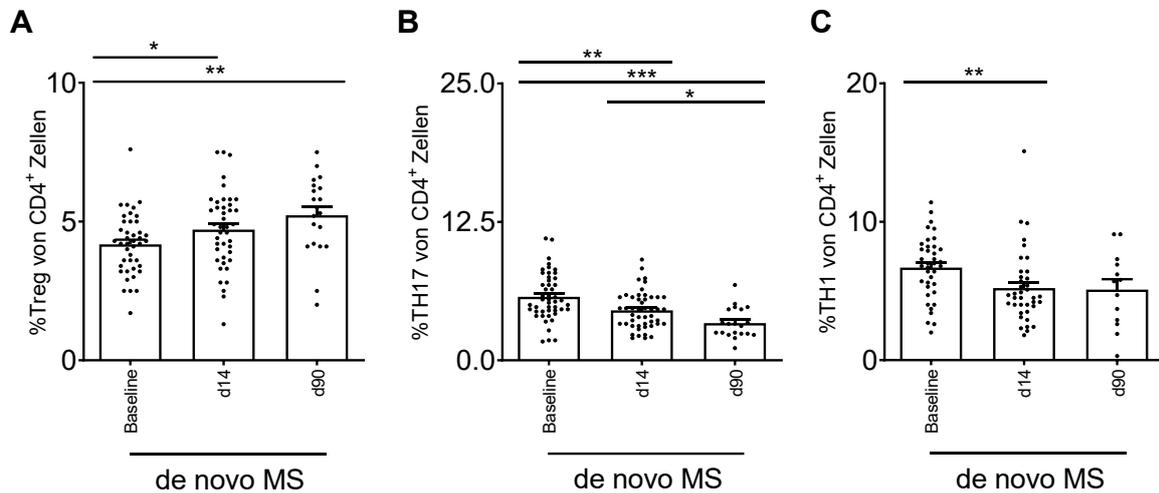
Th17 waren im Vergleich der Baseline zwischen HC und MS signifikant erhöht bei MS Patienten. Nach 14 tägiger PA Supplementierung ergaben sich bei HC keine Änderungen. Bei MS Patienten jedoch sank der Anteil von Th17 um ca. 35 %. Dieser Effekt konnte ebenfalls longitudinal nachgewiesen werden (Abb.3.3.2 B). Th1 wies keine Unterschiede zwischen HC und MS zur Baseline auf. Während bei HC ebenfalls keine Veränderungen durch PA Supplementierung in Bezug auf Th1 nachgewiesen werden konnten, sanken Th1 bei MS Patienten signifikant um 27 % nach 14 Tagen sowie nach longitudinaler Einnahme (Abb. 3.3.2 C).



**Abbildung 3.3.2:** Durchflußzytometrische Analyse der T Zell Subpopulationen im peripheren Blut zeigte einen signifikant positiven Effekt auf Treg sowohl bei HC, als auch bei MS Patienten (A). Während Th1 und Th17 nach 14-tägiger Einnahme bei HC keinen Effekt zeigten, stellte sich bei MS Patienten eine signifikante Reduktion beider Populationen ein (B/C). HC n = 24; MS, n = 91 für Baseline und d14; n = 40 longitudinal. Intergruppenanalyse mit Mann-Whitney Test; Intragruppenanalyse mit gepaartem t-Test. A: HC Baseline vs HC d14 / MS Baseline vs MS d14 / HC Baseline vs MS Baseline p < 0.0001; MS d14 vs MS longitudinal, p = 0.0009; B: HC Baseline vs MS Baseline, p = 0.0192; MS Baseline vs MS d14, p = 0.0018; MS Baseline vs MS longitudinal, p = 0.0015. C: MS Baseline vs MS d14, p = 0.0163; MS Baseline vs MS longitudinal, p = 0.0331, modifiziert nach Duscha et al. 2020.

Nachfolgend wurde die *de novo* Kohorte ebenfalls auf die drei T Zell Subpopulationen hin untersucht. Für Treg konnte der in der MS mit DMT Kohorte gezeigte Effekt repliziert werden. Hier stiegen Treg nach Supplementierung von PA für 14 Tage um ca. 25 % an, was sich nach 90 Tagen ebenfalls zeigen ließ (Abb. 3.3.3 A). Die Anzahl an Th17 nahm im Studienverlauf signifikant im Vergleich zum Basiswert ab, prominenter nach 90 Tagen Supplementierung (Abb. 3.3.3 B). Th1 Zellen nahmen im Zeitraum von 14 Tagen

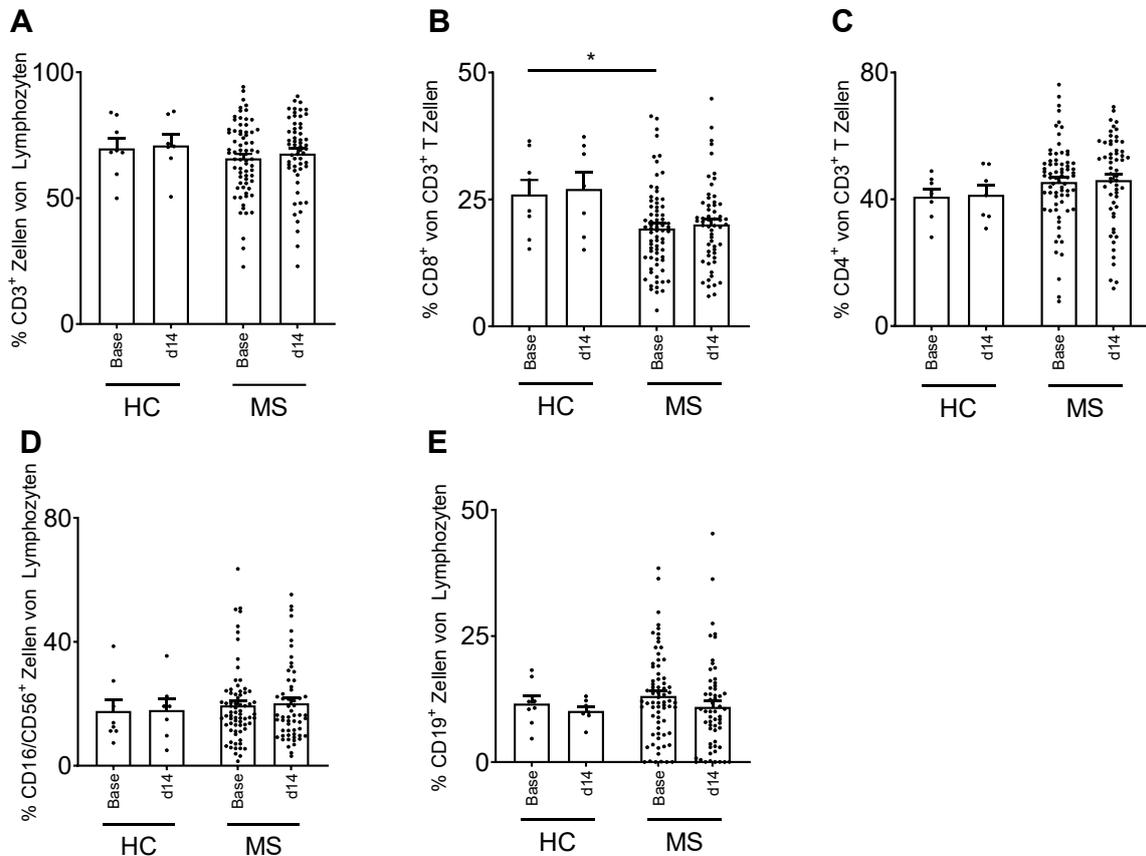
Supplementierung von PA signifikant um ca. 22 % ab, wobei longitudinal keine Unterschiede erkennbar waren (Abb. 3.3.3 C).



**Abbildung 3.3.3:** T Zell Subpopulationen wurden in der *de novo* Kohorte durchflußzytometrisch untersucht. Der Anstieg an Treg (A) sowie eine Abnahme von Th17 (B) und Th1 (C) konnten wie in der MS mit DMT Kohorte repliziert werden. Baseline und d14, n = 38; d90, n = 14; gepaarter t Test; A: Baseline vs d14, p = 0.0429; Baseline vs d90, p = 0.0002; B: Baseline vs d14, p = 0.0038; Baseline vs d90, p < 0.0001; d14 vs d90, p = 0.0122; C: Baseline vs d14, p = 0.002, modifiziert nach Duscha et al. 2020.

Abschließend wurde das globale Immunzellpanel mit der MS unter DMT Kohorte und HC durchgeführt. Hierbei ergaben sich nur ein signifikanter Unterschied zwischen der Baseline bei HC und der Baseline MS bei cytotoxischen (CD8) T Zellen. Es ergaben sich keine weiteren Unterschiede in den anderen Immunzellpopulationen (Abb. 3.3.4).

Zusammenfassend zeigte PA Supplementation für 14 Tage und ebenfalls longitudinal sowohl bei MS Patienten mit DMT, als auch bei Patienten mit Erstdiagnose einen robusten Effekt auf die Thelfer Zellpopulationen im peripheren Blut, mit besonderem Fokus auf einen Anstieg von Treg und einer Verminderung von Th17. Eine initial bestehende Dysbalance zwischen Treg und Th17 konnte durch 14 tägige PA Supplementation teilweise beeinflusst werden.

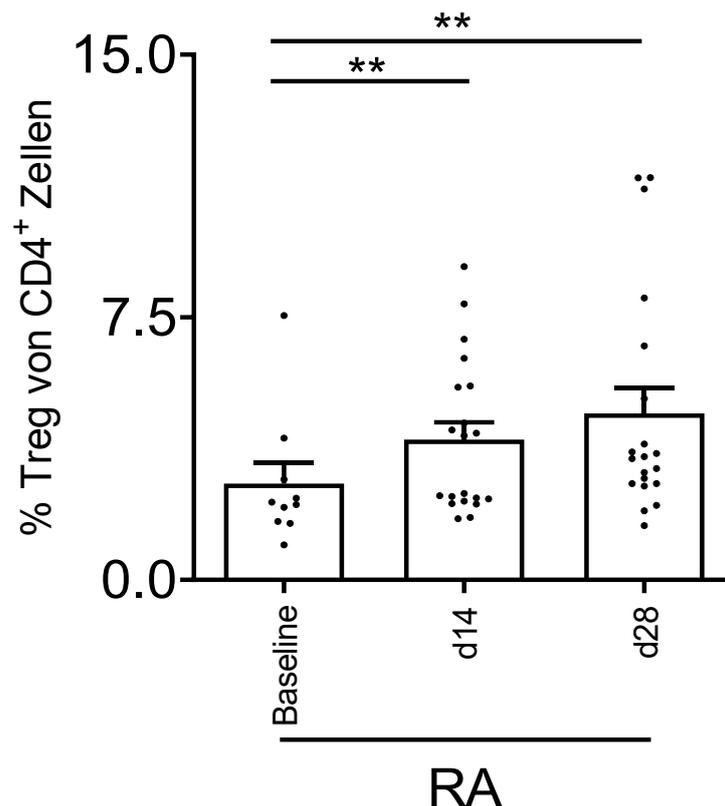


**Abbildung 3.3.4:** Globale Immunphänotypisierung zeigte keine Unterschiede in peripheren CD3+ T Zellen (A), Thelper Zellen (CD4+; C), NK Zellen (CD16/56; D) sowie in B Zellen (CD19; E) nach 14 Tagen PA Supplementierung. CD8+ cytotoxische T Zellen zeigten signifikant geringere Mengen in MS Patienten zur Baseline im Vergleich zu HC. Mann-Whitney Test; HC n = 8; MS n = 71; CD8 HC Baseline vs MS Baseline p = 0.0398; modifiziert nach Duscha et al. 2020.

### 3.4. Der Effekt von PA Supplementierung auf andere autoimmunvermittelte Erkrankungen am Beispiel von RA

Zur Validierung der Ergebnisse der Immunphänotypisierung bei MS Patienten wurde eine weitere Kohorte einer anderen Autoimmunerkrankung, namentlich RA von insgesamt 20 Patienten in der Klinik für Rheumatologie am Universitätsklinikum Erlangen von Patrick Träger und Mario Zaiss rekrutiert und immunologisch phenotypisiert. Hierbei wurde PA für 28 Tage mit 1000 mg pro Tag supplementiert. 10 Patienten wurde Blut zur Baseline abgenommen, bei 10 Patienten konnte kein Blut zur Baseline erhalten werden. Verlaufsuntersuchungen erfolgten bei allen 20 Patienten an d14 und d28. Durchflußzytometrisch wurden Treg aus peripherem Blut bestimmt.

Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass ebenfalls bei RA Patienten Treg nach 14 Tagen PA Supplementierung um ca. 45 % anstiegen. Dieser Effekt persistierte auch nach 28 Tagen der PA Einnahme. Zusammengefasst wirkt PA ebenfalls immun-modulatorisch in einer anderen Autoimmunerkrankung, wie am Beispiel der RA gezeigt.

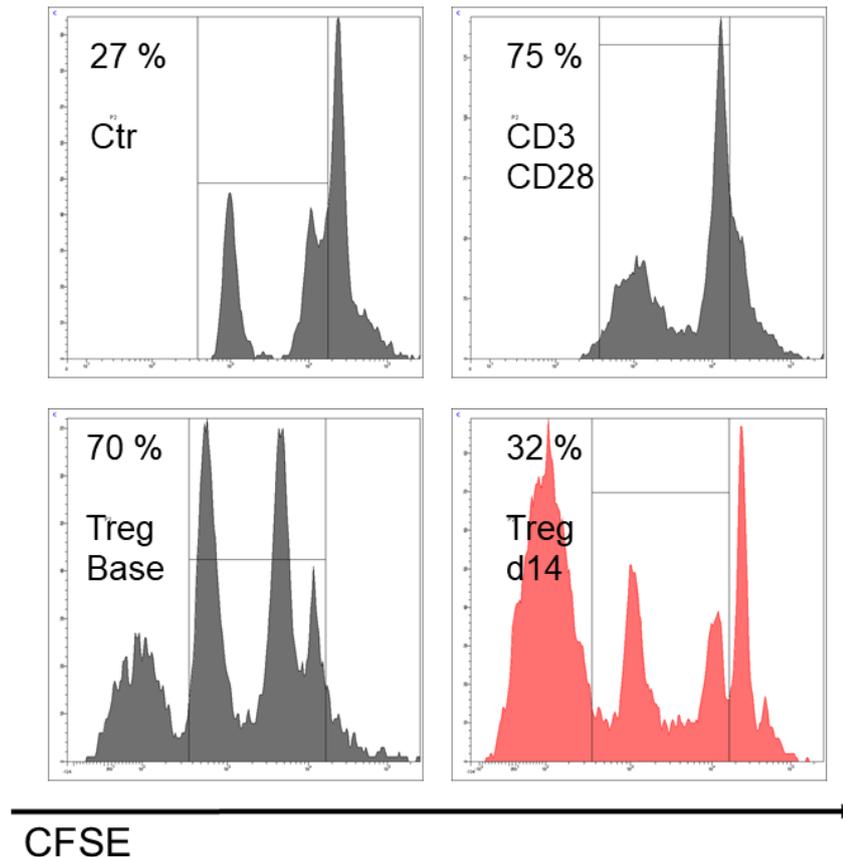


**Abbildung 3.4.1:** PA Supplementation bei RA Patienten zeigte einen signifikanten Anstieg von Treg im peripheren Blut nach 14 und 28 Tagen der Einnahme (Baseline n = 10, d14/d28 n = 20; Mann-Whitney Test; Baseline vs d14 p = 0.002; Baseline vs d28 p = 0.0019), modifiziert nach Duscha et al. 2020.

### 3.5. Funktionale Untersuchung von Treg im Kontext der PA Supplementierung

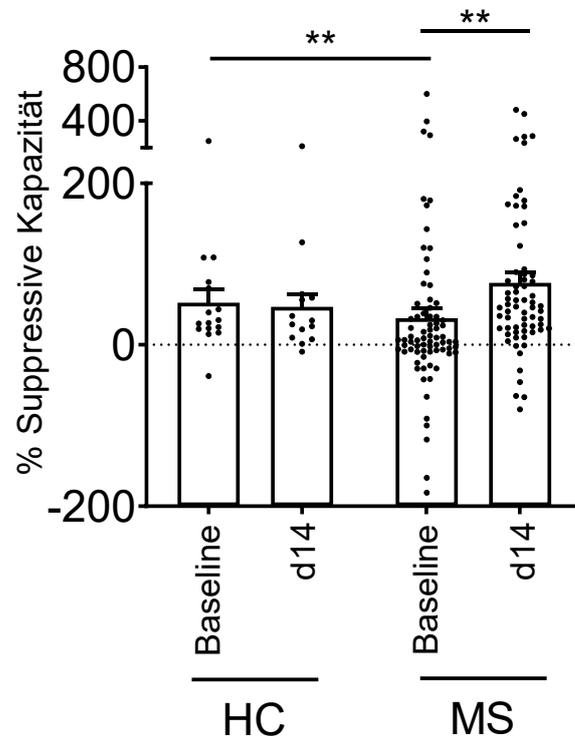
Um die Verschiebung der Treg / Th17 Dysbalance hinsichtlich des Immunphänotyps hin zu einem Gleichgewicht beider Zelltypen durch PA Supplementierung auf funktionaler Eben zu untersuchen, wurden im Zuge der Phänotypisierung ebenfalls Suppressionsassays durchgeführt. Diese gaben Aufschluss über die sog. Suppressive Kapazität von Treg, also die Fähigkeit von Treg, Proliferation bzw. immunologische Funktion von anderen potentiell pathologischen Zelltypen zu supprimieren (beispielhaft gezeigt in Abb. 3.5.1). Hierzu wurden

Assays von HC (n = 16) und MS Patienten unter DMT (n = 74) zur Baseline und nach 14 Tagen PA Supplementation untersucht. Zudem wurden gleichsame Experimente mit *de novo* Patienten zu den Zeitpunkten Baseline, d 14 und d90 durchgeführt (Baseline/d14 n = 38; d90 n = 14).



**Abbildung 3.5.1:** Exemplarische Histogramme des Suppressionsassays für die Proliferation von PBMCs in Anwesenheit oder Abwesenheit von Treg. Die oberen Grafiken zeigen unstimulierte und stimulierte (CD3/CD28) PBMCs. Die unteren Grafiken zeigen gefärbte PBMCs in Kokultur mit ungefärbten Treg Zellen am Tag 0 (70% Proliferation, linke Grafik) und am Tag 14 nach PA Supplementation (32% Proliferation, rot, rechte Grafik). Die Prozentsätze geben die Proliferation von gefärbten PBMCs an Tag 4 der Kokultur an.

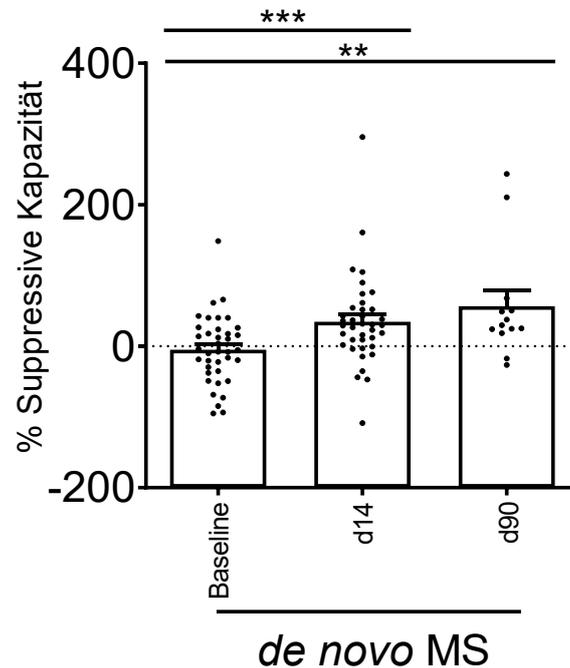
Zum Basiswert konnte eine signifikant niedrigere suppressive Kapazität der Treg von MS Patienten im Vergleich zu HC beobachtet werden, was sich mit Ergebnissen aus der Literatur deckte (Viglietta et al., 2004). Nach 14 Tagen PA Supplementation gab es keine Unterschiede bei HC; die suppressive Kapazität der Tregs von MS Patienten stieg jedoch im Rahmen der Einnahme signifikant auf das Niveau der gesunden Kontrollen an (Abb. 3.5.2).



**Abbildung 3.5.2:** Untersuchung der Funktion von Treg über Messung der suppressiven Kapazität zeigt eine initial reduzierte Funktion von Treg bei MS Patienten. Nach 14-tägiger PA Einnahme steigt die suppressive Funktion signifikant auf das Niveau von HC an. HC, n = 16; MS, n = 74; Intergruppenanalyse, Mann-Whitney Test; Intragruppenanalyse, gepaarter t Test; HC Baseline vs MS Baseline, p = 0.0083; MS Baseline vs MS d14, p = 0.0048; modifiziert nach Duscha et al. 2020.

Bei Betrachtung der suppressiven Kapazität der Treg von MS Patienten mit Erstdiagnose zeigt sich ein ähnliches Bild. Hier steigt die suppressive Kapazität signifikant von Baseline zu d14 um 35 % an und steigt nach 90 Tagen Supplementierung auf 50 % Unterschied zur Baseline (Abb. 3.5.3).

Zusammengefasst lässt sich eine gesteigerte suppressive Kapazität und somit zelluläre Funktion von Treg bei MS Patienten mit DMT und Erstdiagnose bei PA Einnahme von 14 bis 90 Tagen beobachten.

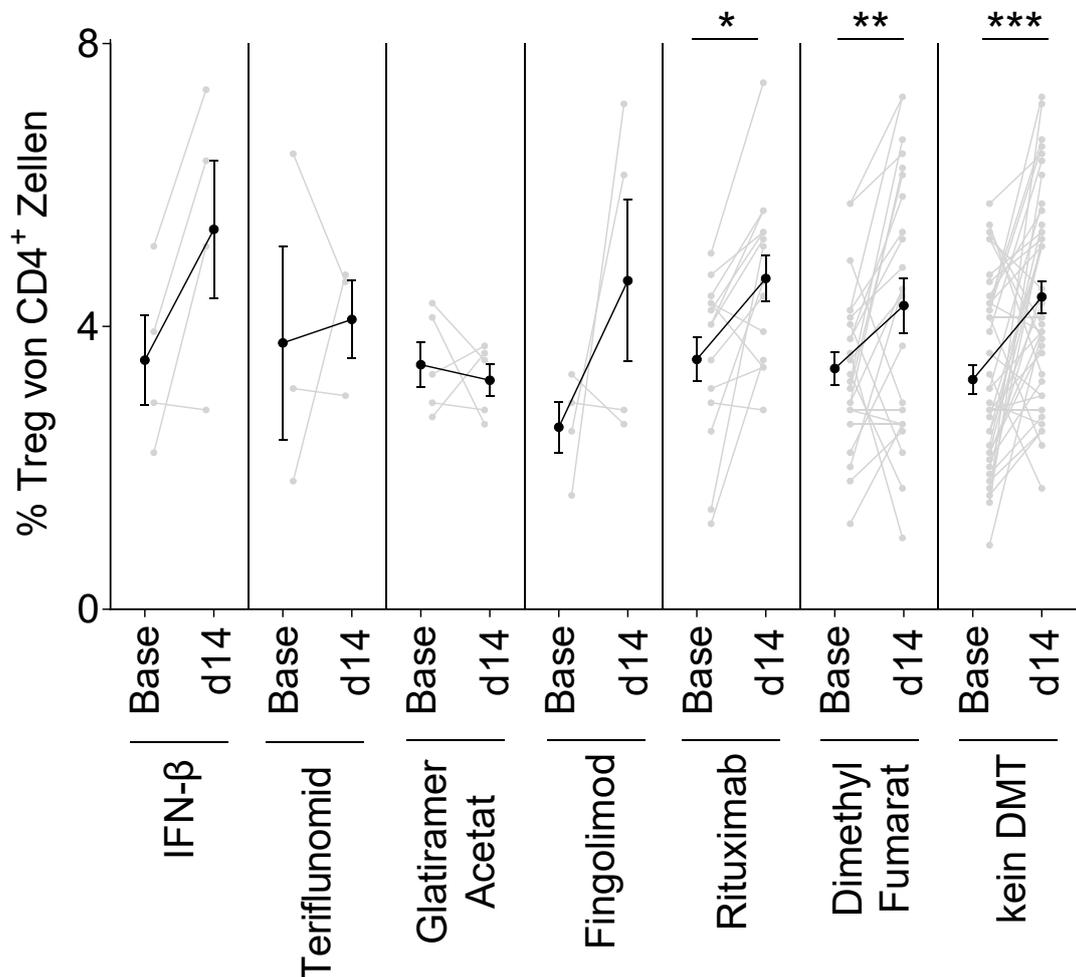


**Abbildung 3.5.3:** Treg von *de novo* Patienten zeigten eine erhöhte suppressive Kapazität nach 14 bis 90 Tagen PA Einnahme. Baseline / d14, n = 38; d90, n = 14; gepaarter t Test; Baseline vs d14, p = 0.0009; Baseline vs d90, p = 0.0021; modifiziert nach Duscha et al. 2020.

### 3.6. Untersuchung des Verhältnisses zwischen Anzahl und funktionaler Kapazität von Treg

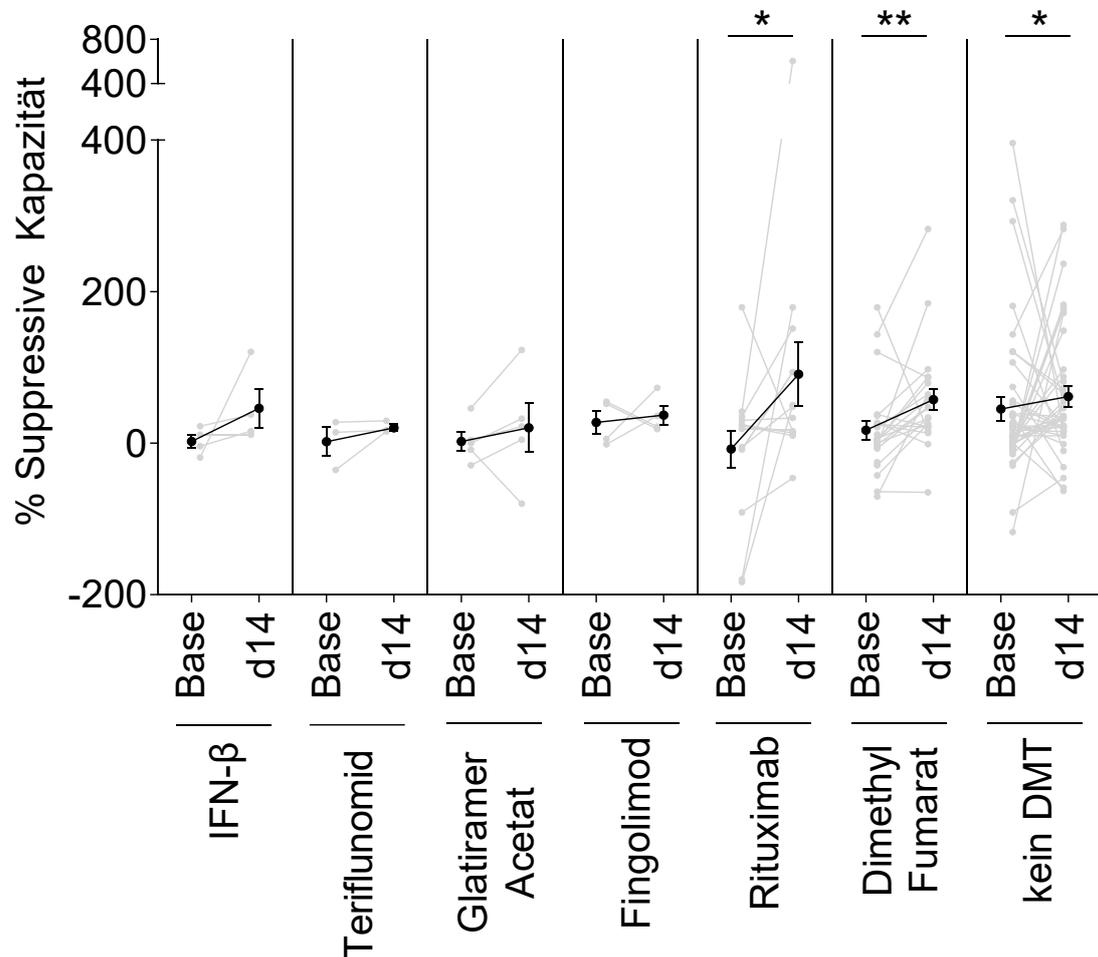
Um zu untersuchen, ob die gesteigerte suppressive Kapazität sowie die erhöhte Anzahl von Treg im peripheren Blut von der individuellen Basistherapie der MS Patienten unter DMT abhängig ist, wurden Daten für prozentualen Treg Anteil sowie suppressive Kapazität entsprechend der Basistherapie zu den Zeitpunkten Baseline und d14 stratifiziert (Treg Abb. 3.6.1; Suppressive Kapazität Abb. 3.6.2).

Bei Stratifizierung von Treg nach individueller Basistherapie ließ sich zeigen, dass Treg unter sämtlichen Therapieformen bis auf Glatiramer Acetat einen tendenziellen bzw. signifikanten Anstieg aufwiesen. Die stärksten Effekte konnten bei dem B Zell depletierenden Therapeutikum Rituximab und der Behandlung mit Dimethyl Fumarat beobachtet werden. Ebenfalls zeigte die Gruppe ohne DMT einen signifikanten Anstieg von Treg (Abb. 3.6.1).



**Abbildung 3.6.1:** Stratifizierung von Treg zur Baseline und 14 Tage nach PA Supplementierung in MS Patienten unter DMT zeigt einen starken Effekt bei Rituximab, Dimethyl Fumarat und ohne DMT; Mann-Whitney test; Interferon beta (IFN-β) n = 4; Teriflunomid n = 4; Glatiramer Acetat n = 8; Fingolimod n = 5; Rituximab n = 14; Dimethyl Fumarat n = 21; ohne DMT n = 35; Rituximab d0 vs d14 p = 0.0264; Dimethyl Fumarat d0 vs d14 p = 0.0048; kein DMT p = 0.0009; modifiziert nach Duscha et al. 2020.

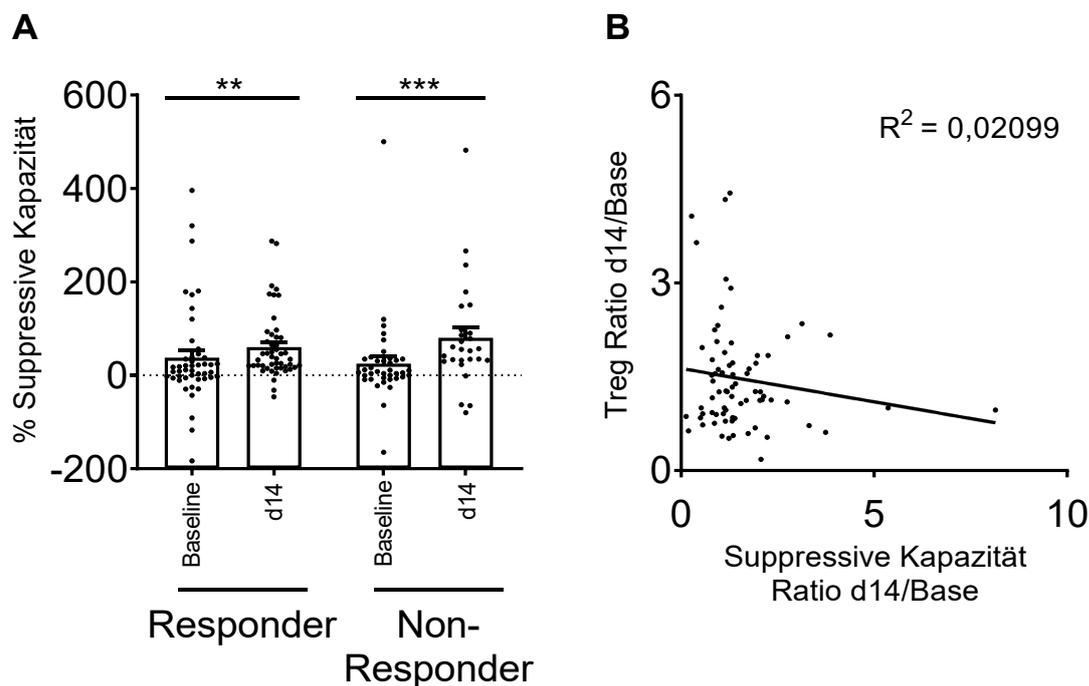
Bei Aufteilung der Daten zu suppressiver Kapazität in die unterschiedlichen Therapieformen zeigte sich ein ähnliches Muster. Jedoch konnte hier nach 14 tägiger PA Behandlung in allen Gruppen ein zumindest tendenzieller Effekt beobachtet werden, welcher wiederum für Rituximab, Dimethyl Fumarat und ohne DMT als signifikant bewertet werden kann (Abb 3.6.2). Nicht signifikante Ergebnisse in den Gruppen Interferon beta, Teriflunomid, Glatiramer Acetat sowie Fingolimod könnten auf im Vergleich zu geringe n Zahlen zurück zu führen sein.



**Abbildung 3.6.2:** Stratifizierung der suppressiven Kapazität zur Baseline und nach 14-tägiger Einnahme von PA von MS Patienten unter DMT zeigten eine signifikante Erhöhung bei Therapie mit Rituximab, Dimethyl Fumarat sowie ohne DMT. Interferon beta (IFN-β) n = 4; Teriflunomid n = 3; Glatiramer Acetat n = 4; Fingolimod n = 4; Rituximab n = 10; Dimethyl Fumarat n = 18; ohne DMT n = 31; Rituximab d0 vs d14 p = 0.0484; Dimethyl Fumarat d0 vs d14 p = 0.0028; ohne DMT d0 vs d14 p = 0.0447; modifiziert nach Duscha et al. 2020.

Nach Überprüfung der individuellen Basistherapie als möglicher Einflussfaktor auf den immunmodulierenden Effekt von PA, sollte überprüft werden ob die erhöhte suppressive Kapazität *in vivo* durch die erhöhte Anzahl an Treg im peripheren Blut vermittelt wird. Hierzu wurden MS Patienten basierend auf dem Anstieg bzw. der Abnahme/Stabilität der Treg Population nach 14 Tagen PA Einnahme in Responder (Treg Ratio d14/Baseline >1) und Non-Responder (Treg Ratio d14/Baseline <1) aufgeteilt. Anschließend wurde die suppressive Kapazität in beiden Gruppen zur Baseline und nach 14 Tagen PA Supplementation verglichen. Weiterhin wurden entsprechende Ratios von Treg (d14/Baseline) und suppressiver Kapazität (d14/Baseline) individuell korreliert (Abb 3.6.3).

Hierbei ergab sich sowohl bei Respondern als auch bei Non-Respondern ein signifikanter Anstieg der suppressiven Kapazität nach 14 tägiger Einnahme von PA. Dies zeigt deutlich eine Unabhängigkeit des Anstiegs der suppressiven Kapazität von der Anzahl peripherer Treg bei PA Supplementierung (Abb. 3.6.3 A). Diese Ergebnisse werden ebenfalls unterstützt durch eine fehlende Korrelation zwischen der Änderung der Anzahl von Treg und der entsprechenden Änderung der suppressiven Kapazität (Abb. 3.6.3 B).



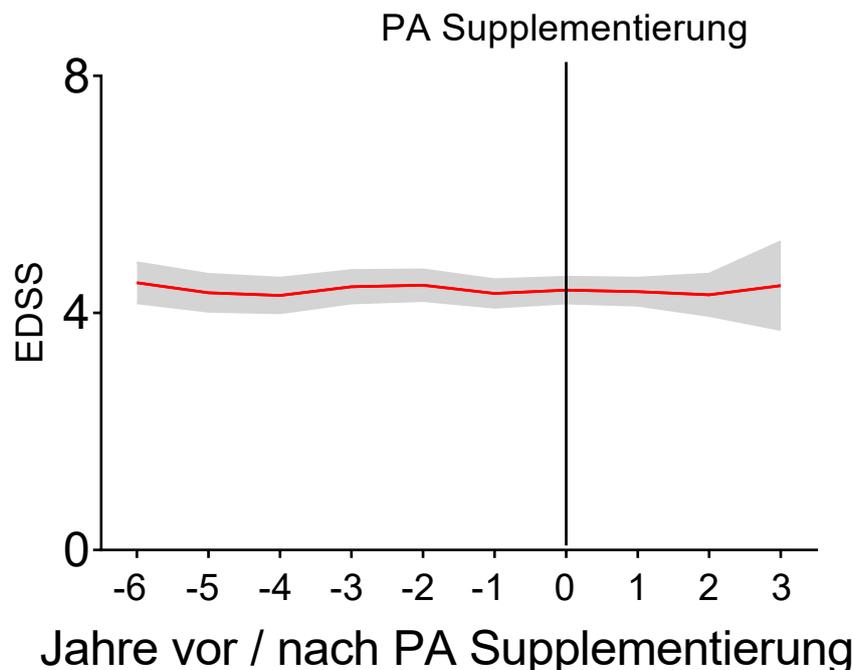
**Abbildung 3.6.3:** (A) Im Vergleich von Treg Respondern und Non-Respondern in Bezug auf suppressive Kapazität nach 14-tägiger PA Einnahme zeigen sich in beiden Gruppen signifikante Anstiege der suppressiven Kapazität von Treg; gepaarter t Test für Intragruppenanalyse, Mann-Whitney Test für Intergruppenanalyse; (Responder n = 42; Non-Responder n = 32; R Baseline vs R d14 p = 0.0053; NR Baseline vs nR d14 p = 0.0008). (B) Eine lineare Regressionsanalyse von Treg sowie suppressiver Kapazität, jeweils als Ratio aus d14/Baseline, zeigt keine Korrelation zwischen beiden Variablen (n = 74; p = 0.2214; R2 = 0.0209); modifiziert nach Duscha et al. 2020.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der Analyse des Verhältnisses zwischen Anzahl von peripheren Treg und suppressiver Kapazität im Kontext von PA Supplementierung, dass eine gesteigerte Treg Funktion nicht von der Anzahl an Zellen im peripheren Blut und nicht von der individuellen Basistherapie abhängig ist. Somit konnte ein robuster Effekt von PA auf suppressive Kapazität und somit direkt auf die Funktion von Treg im Kontext der MS nachgewiesen werden.

### 3.7. Langzeit-Beobachtung von klinischen Parametern bei PA Supplementierung

Zur Beurteilung ob die experimentell erfassten Ergebnisse ebenfalls eine klinische Ausprägung im Kontext der PA Supplementierung aufweisen, wurden retrospektiv klinische Daten von insgesamt 97 MS Patienten der PA Kohorte erfasst. Hierzu zählten einerseits der EDSS, andererseits die individuelle Schubrate der Patienten.

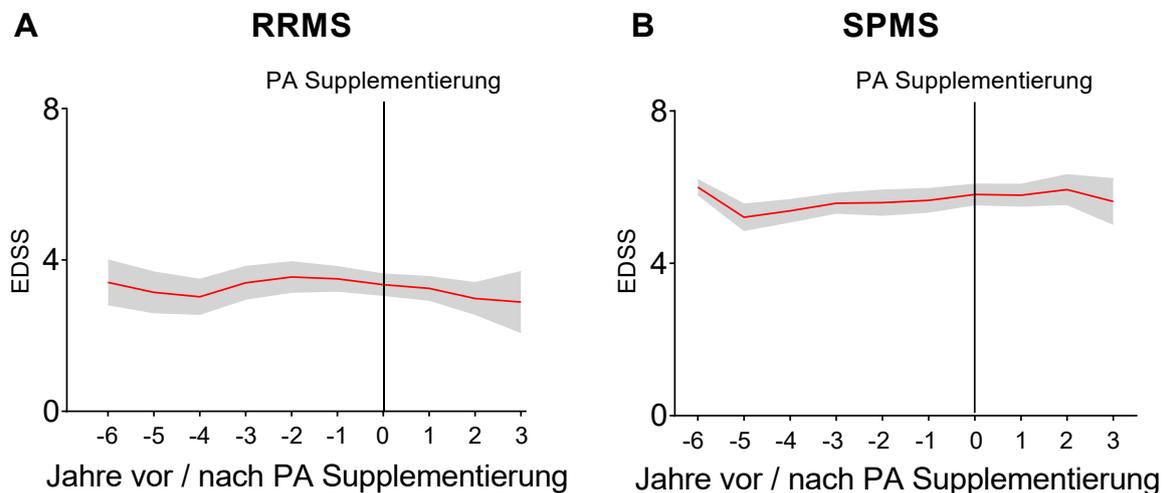
Zu Beginn wurde der mittlere EDSS der gesamten Kohorte von sechs Jahren vor bis drei Jahren nach PA Supplementation erfasst und graphisch aufgetragen (Abb. 3.7.1) wobei keine Unterschiede bzw. Tendenzen zu einer Ab- oder Zunahme festgestellt werden konnten.



**Abbildung 3.7.1:** Graphische Darstellung des mittleren EDSS Verlaufes von sechs Jahren vor PA bis hin zu drei Jahren nach Beginn der PA Supplementation. Dargestellt ist der Mittelwerte des EDSS pro Jahr (rote Linie) mit Standardfehler (graue Fläche); n = 97.

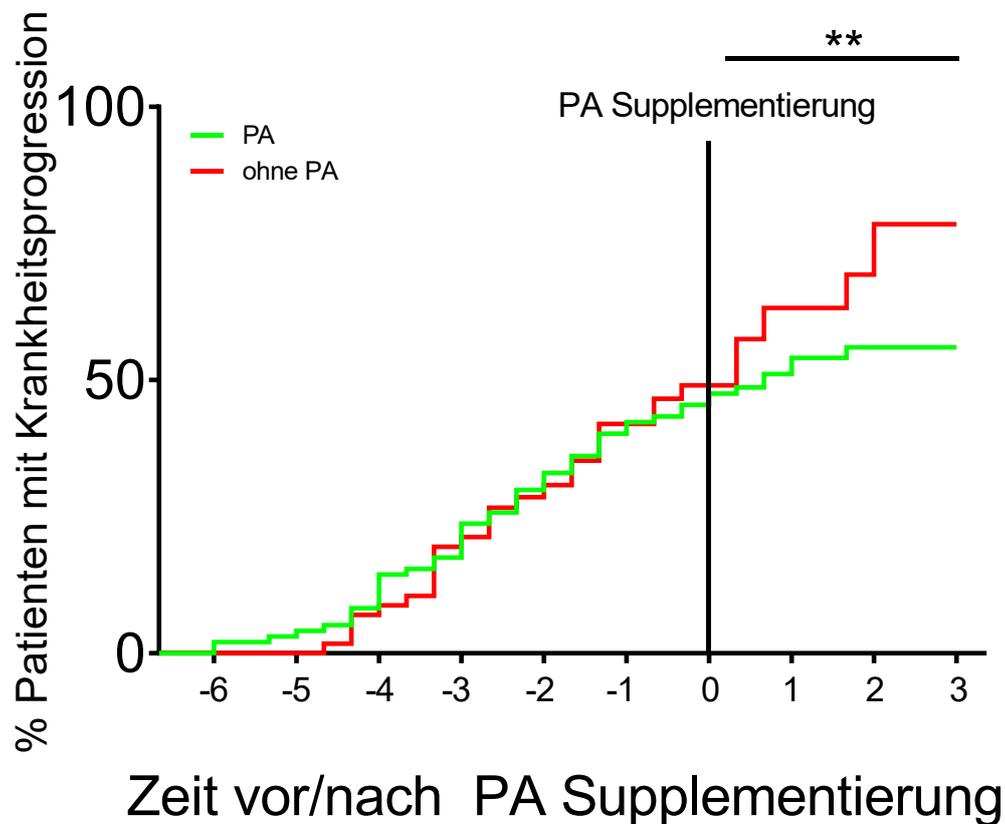
Eine Unterscheidung zwischen den beiden häufigsten Verlaufsformen (RRMS und SPMS) konnte im Vergleich zur Untersuchung der gesamten Kohorte hingegen eine leichte Senkung des mittleren EDSS bei RRMS (Abb. 3.7.2 A) sowie eine Stabilisierung des EDSS bei SPMS (Abb. 3.7.2 B) zeigen. Eine Betrachtung der kleinsten Gruppe mit primär progredienter Verlaufsform (n = 17) konnte aufgrund stark unterschiedlicher EDSS Werte der

inkludierten Patienten sowie einer niedrigen Dokumentationsrate für den EDSS nicht ausgewertet werden (Daten nicht gezeigt).



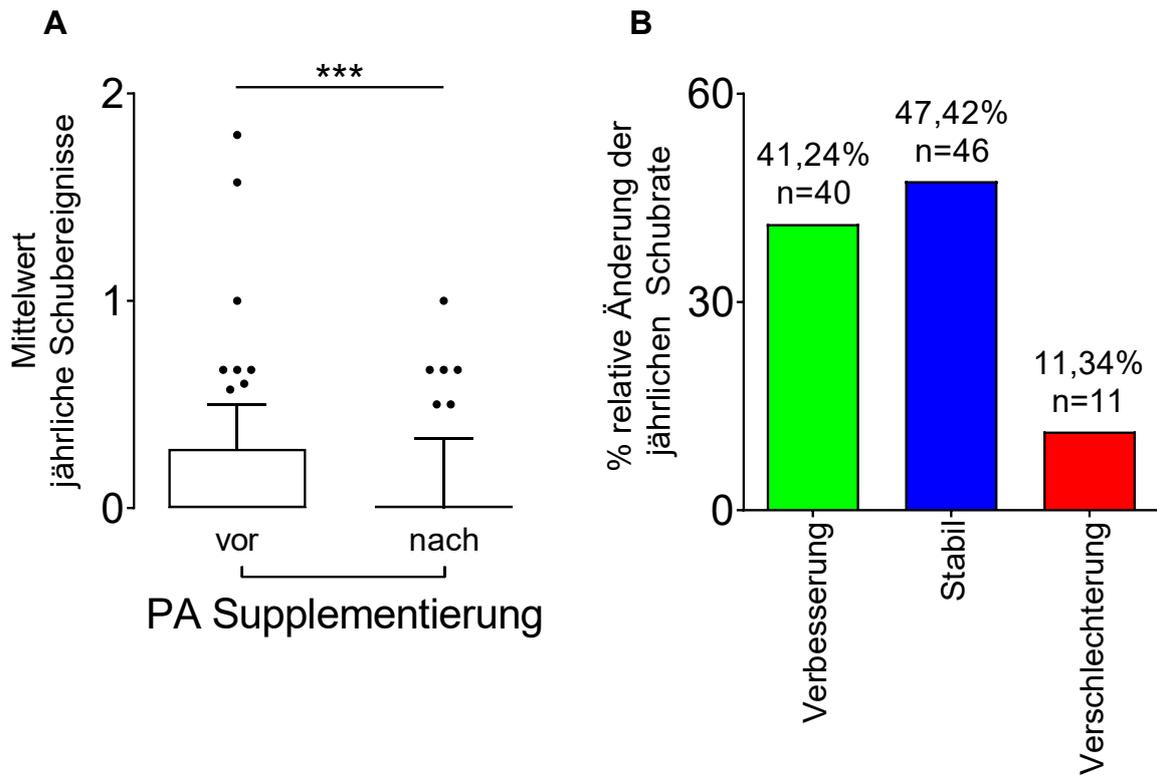
**Abbildung 3.7.2:** Stratifizierung nach Verlaufsform zeigt eine Absenkung des mittleren EDSS bei RRMS (A) sowie eine Stabilisierung des EDSS Verlaufes bei SPMS (B). Dargestellt ist der Mittelwerte des EDSS pro Jahr (rote Linie) mit Standardfehler (graue Fläche); RRMS n = 49; SPMS n = 31; Abb. A modifiziert nach Duscha et al. 2020.

Zur genaueren Bewertung des klinischen Effektes von longitudinaler PA Supplementierung wurde das Risiko der Krankheitsprogression anhand einer Analyse nach Kaplan Maier mit 0 = gleicher/verbessertes EDSS im Vergleich zum Vorjahr sowie des Exklusionsfaktors 1 = Verschlechterung des EDSS im Vergleich zum Vorjahr mit 97 Patienten mit PA Supplementierung und 57 Alters und Geschlechts angepassten MS Patienten ohne PA Supplementierung durchgeführt. Hierbei wurden dieselben Zeitintervalle wie in der oben beschriebenen EDSS Auswertung genutzt. Beide Kurven wurden mittels log-Rank Test für den Zeitraum vor und nach PA Supplementation statistisch untersucht. Hierbei ergab sich ein signifikanter Unterschied nach PA Supplementierung (Zeitpunkt 0) zwischen beiden Gruppen, wobei das Risiko zur Krankheitsprogression in der PA behandelten Gruppe signifikant reduziert wurde (Abb3.7.3).

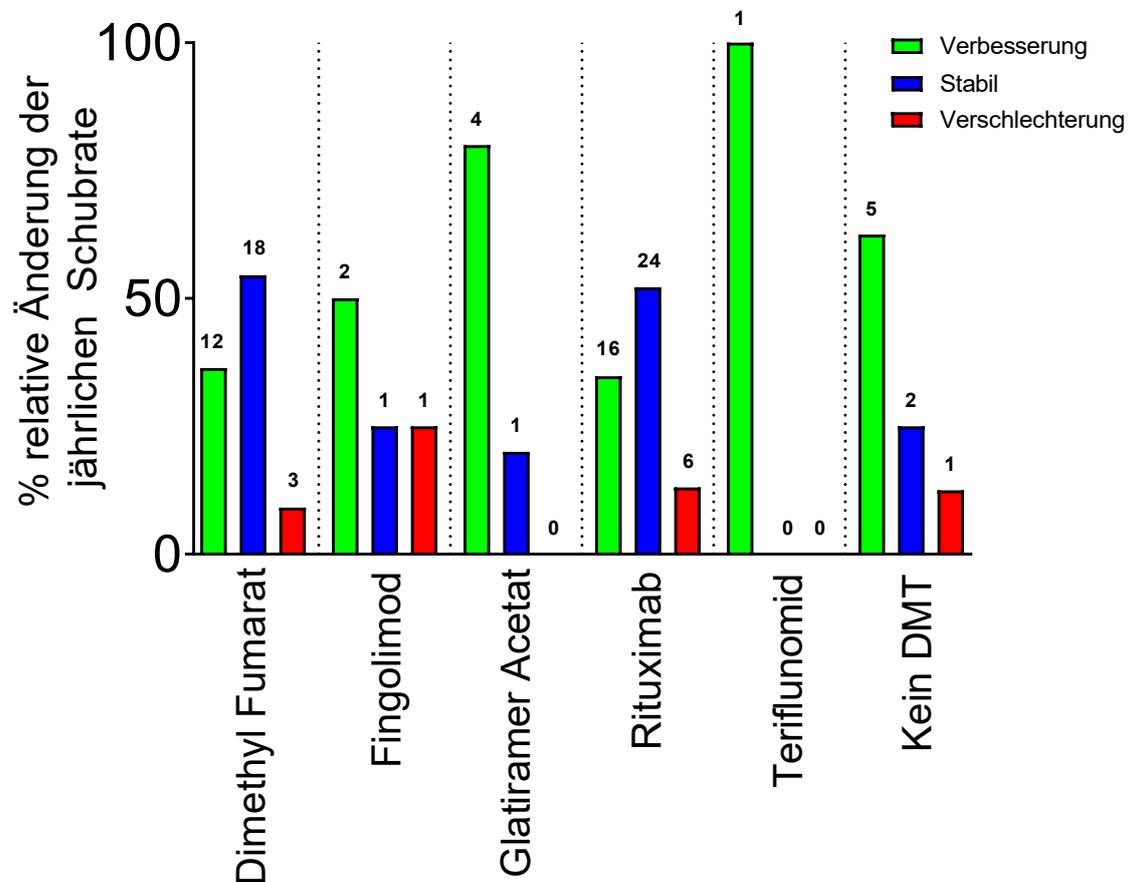


**Abbildung 3.7.3:** Kaplan-Meier Analyse für MS Patienten von sechs Jahren vor bis zu drei Jahren nach PA Supplementierung zeigt eine signifikant niedrigere Krankheitsprogression in der PA Gruppe (grüne Linie) im Vergleich zu Alters und Geschlechts angepassten MS Patienten (rote Linie) (log rank Test,  $p = 0.0027$ ; MS+PA,  $n = 97$ ; MS ohne PA,  $n = 57$ ).

Zur Untersuchung des Einflusses von PA Supplementierung auf die jährliche Schubrate, wurden entsprechende Daten von 97 MS Patienten retrospektiv aufgenommen und vor sowie nach PA Supplementation ausgewertet (Abb 3.7.4). Eine Supplementierung mit PA reduziert hierbei die mittlere, jährliche Schubrate signifikant um 30 %. Bei Betrachtung der prozentualen Veränderung der jährlichen Schubrate (Abb 3.7.4 B) konnte weiterhin gezeigt werden, dass von 97 MS Patienten ca. 10 Patienten unter PA Supplementation eine Verschlechterung der Schubrate verzeichneten. 47,42 % blieben stabil und 41,24 % verbesserten sich über den Behandlungszeitraum. Bei einer Stratifizierung der relativen Änderung der jährlichen Schubrate in Bezug auf einzelne Basistherapien konnte gezeigt werden, dass keine individuelle Therapieform einen gegenteiligen Einfluss hat. Alle unterschiedlichen Basistherapien zeigen ebenfalls hauptsächlich eine Stabilisierung bzw. Verbesserung der relativen Änderung der jährlichen Schubrate (Abb 3.7.5).



**Abbildung 3.7.4:** Statistische Auswertung der jährlichen Schubrate vor und nach PA Supplementierung zeigt eine signifikante Reduktion nach Beginn der Behandlung (A) ( $p = 0.0002$ , Mann-Whitney test,  $n = 97$ ). Eine Stratifizierung der relativen Änderung der jährlichen Schubrate zeigt, dass nur 11,34 % der Patienten unter PA Supplementierung eine Verschlechterung aufzeigen.  $n = 97$ ; modifiziert nach Duscha et al. 2020.



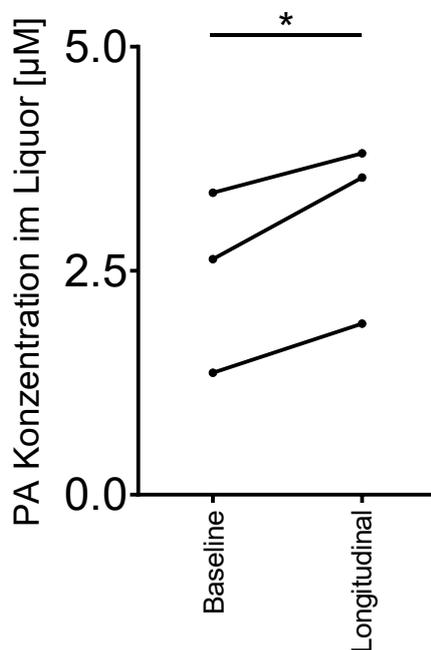
**Abbildung 3.7.5:** Stratifizierung der relativen Änderung der jährlichen Schubrate in die unterschiedlichen Basistherapien nach PA Supplementation (MS gesamt n = 97, einzelne Zahlen über den Balken entsprechen der n Zahl inkludierter Individuen), modifiziert nach Duscha et al. 2020.

Zusammengefasst zeigt eine langfristige Supplementierung mit PA eine Verbesserung des klinischen Verlaufes der MS anhand einer Stabilisierung (SPMS) bzw. Reduktion des mittleren EDSS (RRMS) sowie einem reduzierten Risiko zur Krankheitsprogression. Zudem wurde in Bezug auf die jährliche Schubrate eine signifikante Reduktion nachgewiesen, was insgesamt für einen deutlichen, klinischen Effekt der PA Supplementierung spricht.

### 3.8. Validierung von PA Konzentrationen im Liquor von MS Patienten

Um die bereits identifizierte klinische Relevanz von PA Supplementation weiter zu untersuchen und zu validieren, ob spezifische Effekte in Verbindung mit PA auch möglicherweise direkt im ZNS vermittelt werden können, wurde die Konzentration von PA im Liquor von drei MS Patienten nach  $2,78 \pm 0,24$  Monaten der Supplementation mittels GC-MSMS vermessen. Die initiale Konzentration zum Basiswert liegt hierbei wesentlich unterhalb der systemischen Konzentration im Serum (siehe Abschnitt 3.1.1). Über den Zeitraum der Einnahme erhöhte sich die Konzentration von PA im Liquor signifikant um ca. 20 % (Abb. 3.8.1).

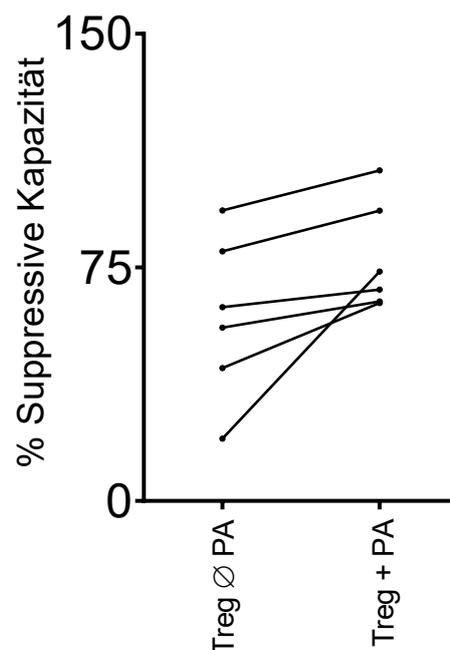
In der Betrachtung dieser Teilergebnisse lässt sich zusammenfassen, das durch Supplementation ebenfalls die Konzentration von PA im Liquor, also direkt im ZNS, ansteigt.



**Abbildung 3.8.1:** PA Supplementation für ca. drei Monate vermittelt einen signifikanten Anstieg der Fettsäure im Liquor bei MS Patienten ( $n = 3$ ;  $p = 0.038$ ; gepaarter t Test), modifiziert nach Duscha et al. 2020.

### 3.9. Untersuchung der suppressiven Kapazität bei *in vitro* Stimulation von Treg mit PA

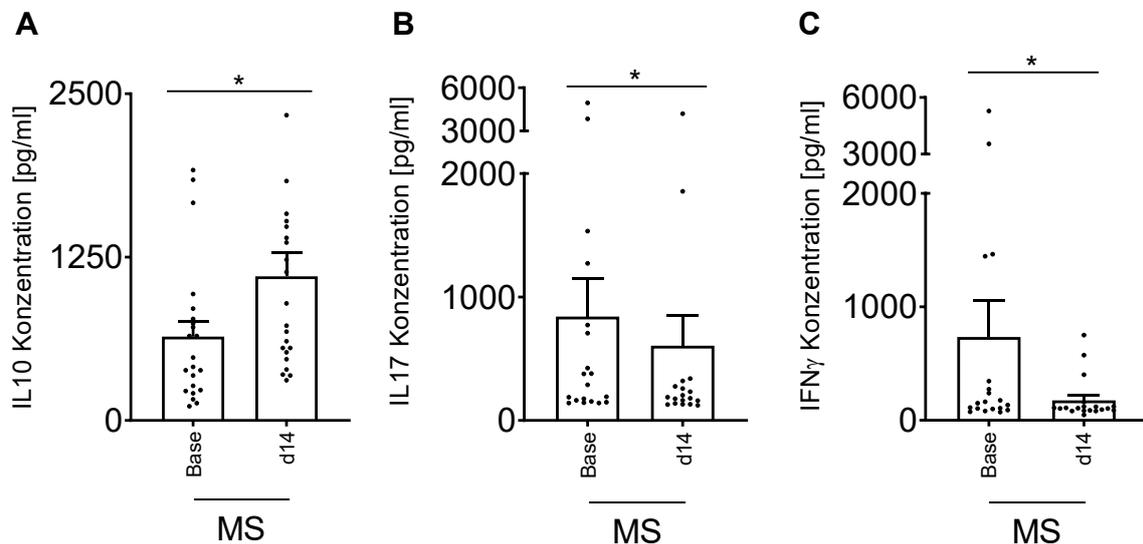
Um direkt zu untersuchen, ob PA *in vitro* eine Erhöhung der suppressiven Funktion von Treg auslösen kann, wurden Treg aus PBMCs von gesunden Kontrollpersonen isoliert und parallel zu den übrigen PBMCs ohne Treg für 5 Tage in Anwesenheit oder Abwesenheit von PA kultiviert. Die im Anschluss geernteten Zellen wurden dann, wie bereits beschrieben, experimentell in einem Suppressionsassay genutzt. Hierbei wurde die Proliferation von PBMCs in Kokultur in Anwesenheit mit bzw. ohne PA-behandelten Treg, wie im Abschnitt 3.5 beschrieben, gemessen. Die PA-Behandlung konnte die suppressive Kapazität von Treg *in vitro* trendmäßig erhöhen (Abb 3.9.1).



**Abbildung 3.9.1:** Die Analyse der suppressiven Kapazität von Treg nach fünftägiger *in vitro* Stimulation mit PA zeigt einen Trend zu einer erhöhten suppressiven Kapazität bei PA behandelten Treg im Vergleich zu der Versuchsgruppe ohne PA ( $p = 0,0648$ ; gepaarter t Test;  $n = 6$ ); modifiziert nach Duscha et al. 2020.

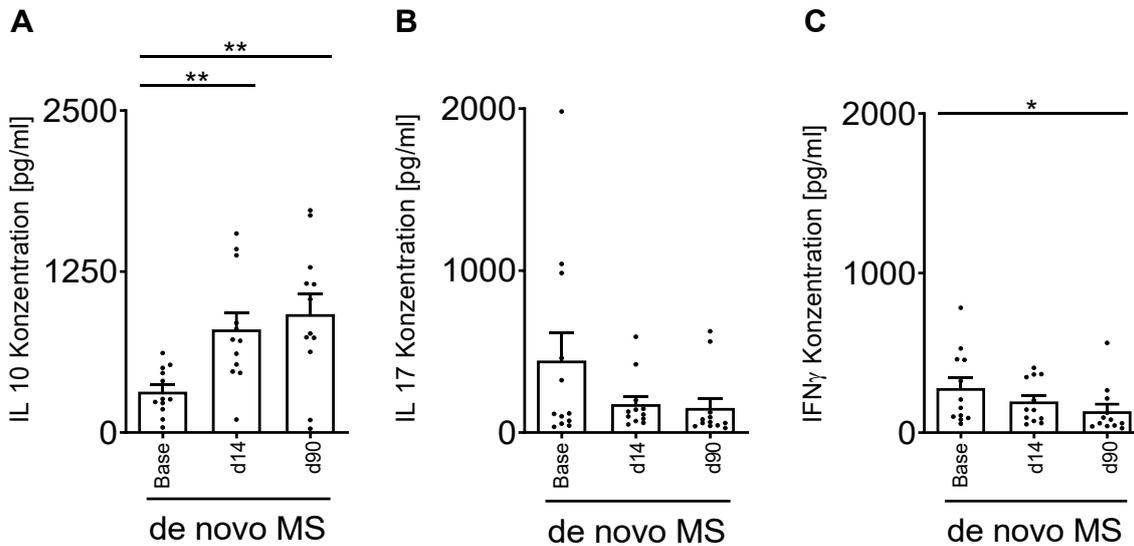
Um den detektierten, direkten *in vitro* Effekt von PA funktional genauer zu untersuchen, wurden Zellkulturüberstände der initialen Suppressionsassays (MS mit DMT und *de novo* MS, siehe Abschnitt 3.5) auf die relevanten Schlüsselzytokine IL10, IL17 und IFN $\gamma$  mittels ELISA untersucht. Die Ergebnisse zeigen einen deutlich signifikanten Anstieg von IL10 im Überstand des Suppressionsassays bei MS Patienten unter DMT nach 14-tägiger Einnahme von PA.

Weiterhin wurde im selben Kokultur-Überstand eine signifikant reduzierte Menge IL17 sowie IFN $\gamma$  detektiert (Abb. 3.9.2).



**Abbildung 3.9.2:** Die Zytokinausschüttung nach viertägiger Kokultur spiegelt die höhere suppressive Kapazität von Treg wieder. Gemessen wurden das antiinflammatorische IL10 sowie die proinflammatorischen Zytokine IL17 und IFN $\gamma$  aus Kokulturüberständen der MS unter DMT Kohorte nach 14 Tagen PA Supplementierung (n = 20 MS; gepaarter t Test; IL10 MS Baseline vs MS d14, p = 0.0156; IL17 MS Baseline vs d14 p = 0.0229; IFN $\gamma$  MS Baseline vs d14 p = 0.0400), modifiziert nach Duscha et al. 2020.

In der *de novo* Kohorte wurden die gleichen Zytokine aus den Suppressionsassay Kulturüberständen zur Baseline, d14 und d90 vermessen. Hier zeigt sich eine deutlich signifikante Zunahme von IL10 über den Untersuchungszeitraum um 90 % im Vergleich zwischen d14 und Baseline. Dieser Effekt durch die *in vivo* Behandlung mit PA persistierte ebenfalls nach 90 Tagen. Unterschiedlich zur MS unter DMT Kohorte konnte keine Änderung signifikante Reduktion von IL17 im Kulturüberstand detektiert werden. IFN $\gamma$  reduzierte sich nur nach 90 Tagen der PA Supplementierung um 43 % (Abb. 3.9.3).



**Abbildung 3.9.3:** Zytokinkonzentrationen im Kulturüberstand der Suppressionsassays der *de novo* MS Kohorte zeigen ebenfalls einen signifikanten Anstieg des antiinflammatorischen Zytokins IL10 (n = 10; IL10: *de novo* MS Baseline vs *de novo* MS d14, p = 0.0014; *de novo* MS Baseline vs *de novo* MS d90, p = 0.0036; IFN $\gamma$  *de novo* MS IFN $\gamma$  Baseline vs d90 p = 0.0386), modifiziert nach Duscha et al. 2020.

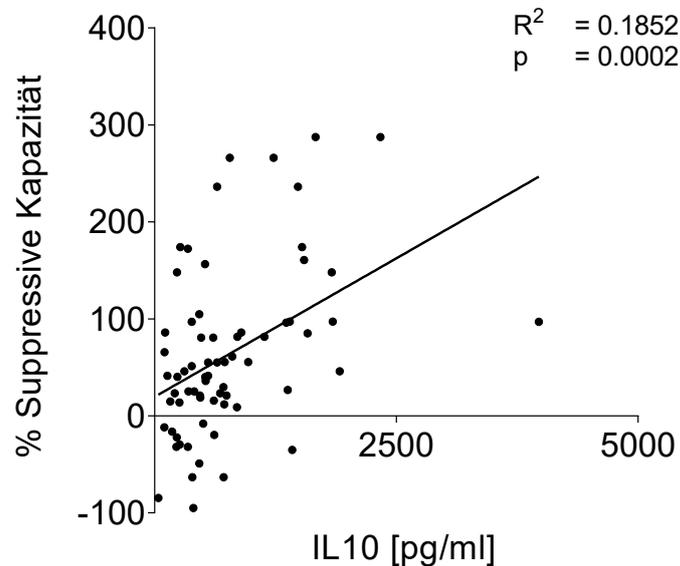
Zusammengefasst zeigte eine *in vitro* PA-Behandlung von Treg einen direkten Einfluss auf die suppressive Kapazität, welche mit einer erhöhten Zytokinausschüttung von IL10 einherging.

### 3.10. Der Einfluss des Schlüsselzytokins IL10 als Mediator einer erhöhten suppressiven Kapazität von Treg

Um den Zusammenhang zwischen suppressiver Kapazität von Treg und IL10 als antiinflammatorisches Zytokin, welches hauptsächlich von Treg sezerniert wird, genauer zu untersuchen, wurde neben einer direkten Korrelation beider Parameter ebenfalls ein Suppressionsassay in Verbindung mit einem IL10 neutralisierenden Antikörper durchgeführt.

Die Korrelation von suppressiver Kapazität und IL10 Konzentration im Kulturüberstand wurde mit Daten der MS unter DMT in Verbindung mit Daten der *de novo* MS Kohorte durchgeführt (n = 68). Hierbei zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen beiden Parametern mit p = 0,0002 und einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,1852$ . Somit konnten ca.

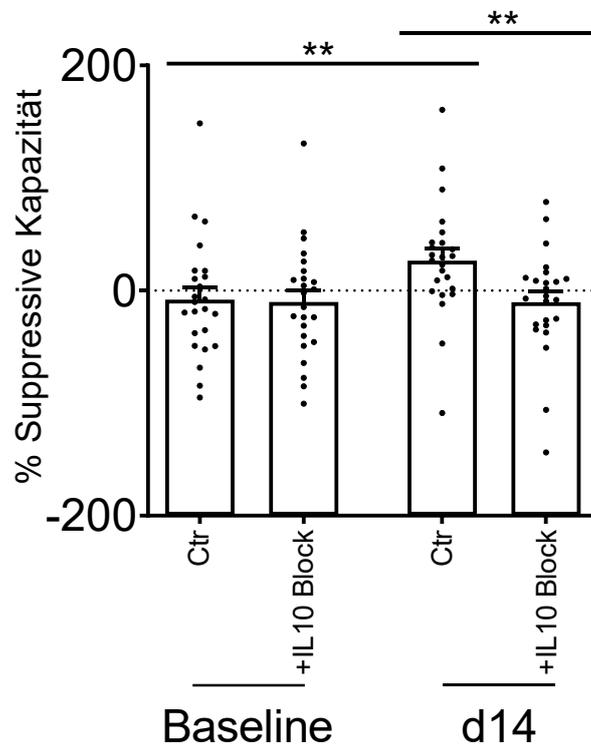
20 % des positiven Effektes von PA Supplementierung auf die suppressive Kapazität von Treg durch eine erhöhte IL10 Konzentration im Kulturüberstand erklärt werden.



**Abbildung 3.10.1:** Korrelation zwischen IL10 Konzentration im Kulturüberstand und suppressiver Kapazität von Treg aus den Suppressionsassays der MS unter DMT und *de novo* MS Kohorte zeigt einen linearen Zusammenhang zwischen beiden Parametern (n = 68; lineare Regressionsanalyse, p = 0,0002,  $R^2$  0,1852), modifiziert nach Duscha et al. 2020.

Um den Zusammenhang zwischen IL10 und Immunzellfunktion genauer zu untersuchen, wurde getestet, ob der durch PA verursachte Anstieg der Treg Suppression der PBMC-Proliferation die Anwesenheit von IL-10 erfordert. Treg von *de novo* MS Patienten wurden zur Baseline und nach 14 Tagen PA Supplementierung isoliert und nachfolgend wie unter Abschnitt 3.5 beschrieben im Suppressionsassay verwendet. Zusätzlich wurde neben der beschriebenen Methodik ein monoklonaler Anti-IL10-Antikörper in der Kokultur von PBMC und Treg verwendet. Während zur Baseline keine Unterschiede detektiert wurden, verhinderte die Depletion von IL10 den Anstieg der suppressiven Kapazität nach 14-tägiger Einnahme von PA (Abbildung 3.10.2).

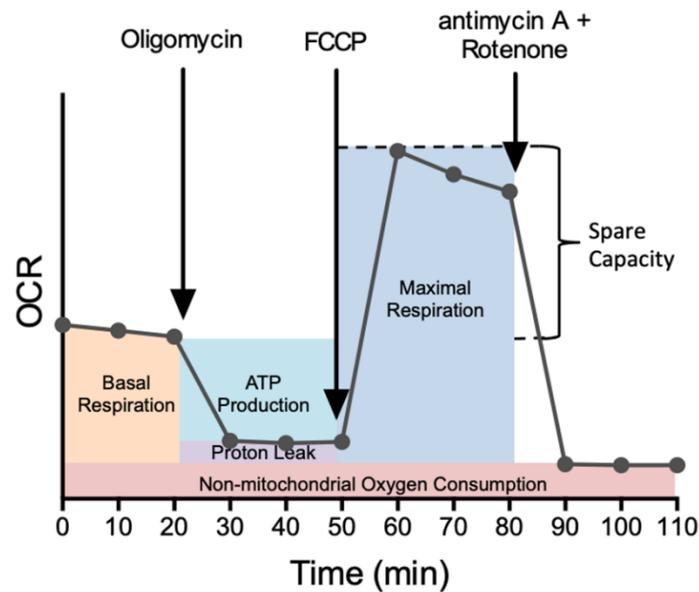
Zusammenfassend bestätigten diese Ergebnisse die Relevanz von IL10 als suppressiver Mediator für die PA-Modulation der Treg Funktion.



**Abbildung 3.10.2:** Suppressionsassay mit Zellen von *de novo* Patienten unter Verwendung eines Anti-IL10-Antikörpers zeigen eine Unterdrückung des Effekts in Bezug auf eine erhöhte Funktion von Treg nach 14 Tagen PA Einnahme (n = 24; Intragruppenanalyse gepaarter t Test; Intergruppenanalyse Mann-Whitney Test; Kontrolle (Ctr) Baseline vs Ctr d14, p = 0.0045; Ctr d14 vs IL-10 Block d14, p = 0.0031); modifiziert nach Duscha et al. 2020.

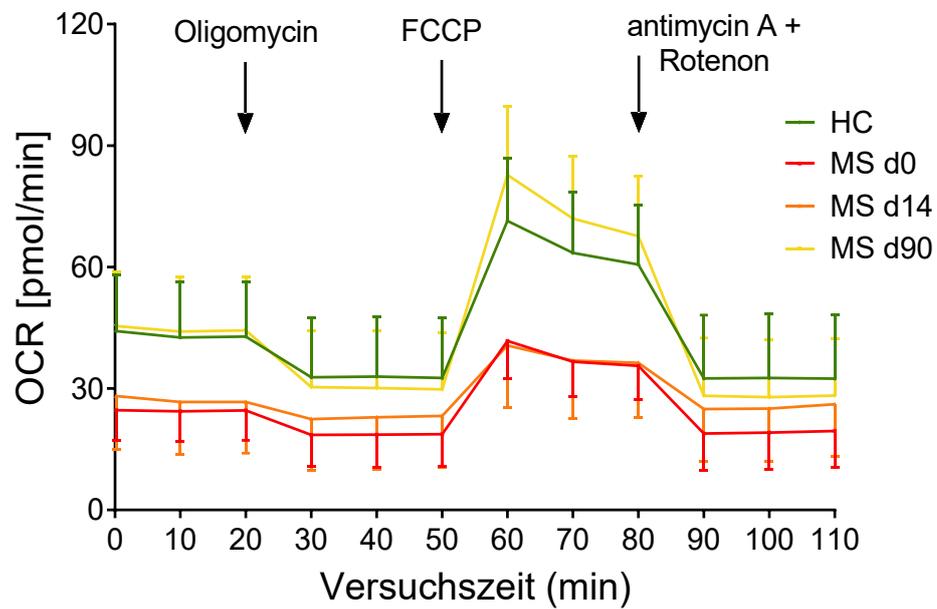
### 3.11. Einfluss von PA auf mitochondriale Atmung und mitochondriale Morphologie bei Treg

Der Zellstoffwechsel spielt eine wichtige Rolle bei der Funktion verschiedener Immunzellen, auch im Kontext der MS (Brunet-Ratnasingham et al., 2019). Um den zugrundeliegenden Mechanismus für den beobachteten Anstieg der suppressiven Kapazität von Treg und der Produktion von IL10 genauer zu untersuchen, wurde die Sauerstoffverbrauchsrate (oxygen consumption rate, OCR) von isolierten Treg von *de novo* MS Patienten vor und nach PA-Supplementierung mittels Seahorse Technologie vermessen (Abb. 3.11.1 als Übersichtsdarstellung der Analyseergebnisse).

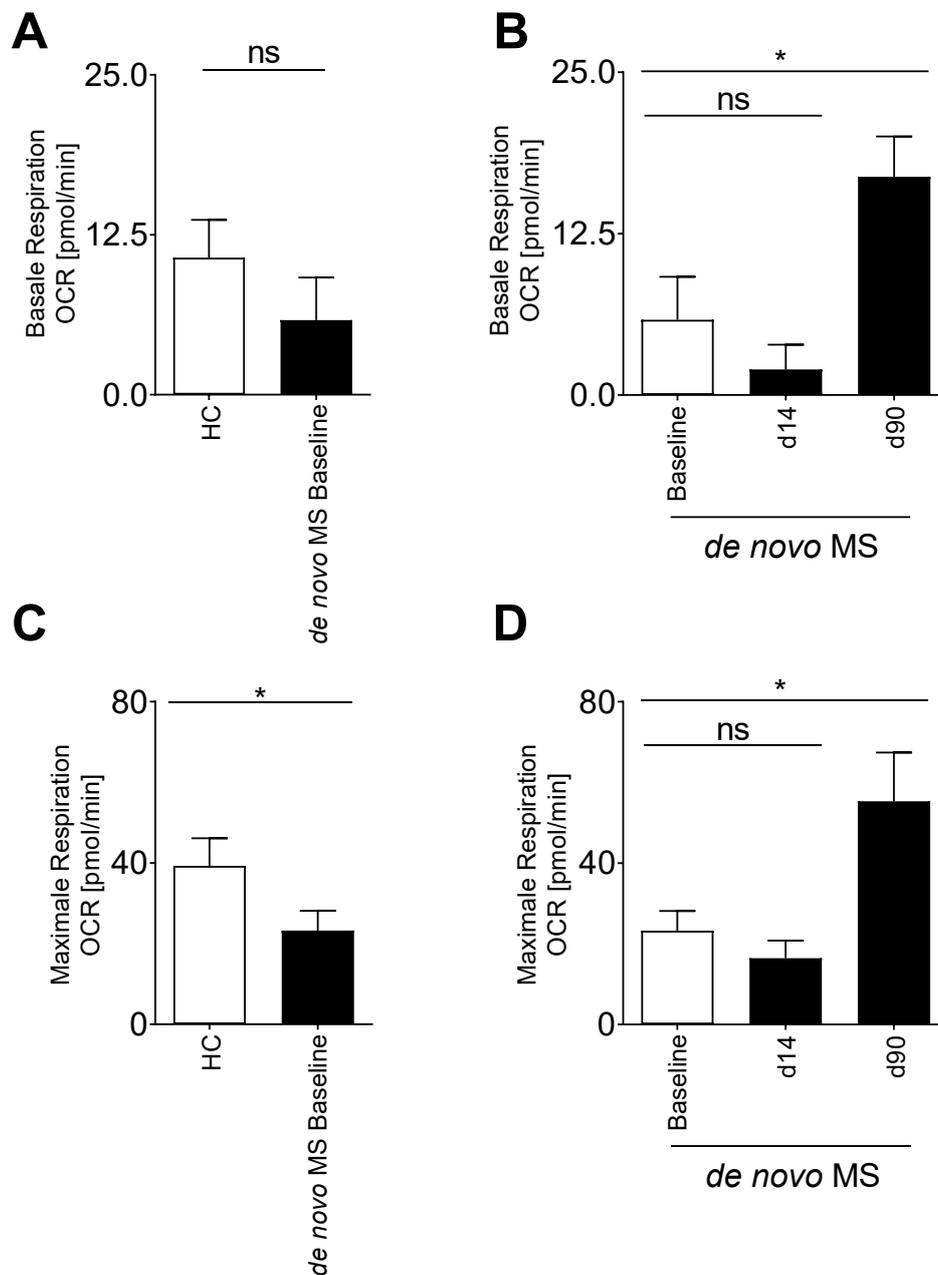


**Abbildung 3.11.1:** Beispielhafte Darstellung einer Auswertung der Seahorse Messung mittels XF Cell Mito Stress Test zur Beurteilung der mitochondrialen Atmung der Zielzellen. Abbildung modifiziert nach <https://www.agilent.com/en/support/cell-analysis/mitochondrial-respiration-xf-cell-mito-stress-test>, abgerufen am 18.06.2022.

Bei MS Patienten zeigte sich im Vergleich zu HCs eine signifikant verminderte OCR zum Basiswert in der maximalen Atmung sowie eine Tendenz zu einer verminderten basalen Atmung. (Abb. 3.11.2). Die longitudinale Supplementation mit PA (Tag 90) erhöhte die OCR der Treg von MS Patienten, welche zu diesem Zeitpunkt einen ähnlichen Gesamtverlauf der OCR-Kurve aufweisen wie HC. Die Basal- und Maximalatmung von MS Patienten nahmen nach 90 Tagen PA-Supplementierung ebenfalls signifikant zu (Abb. 3.11.3).



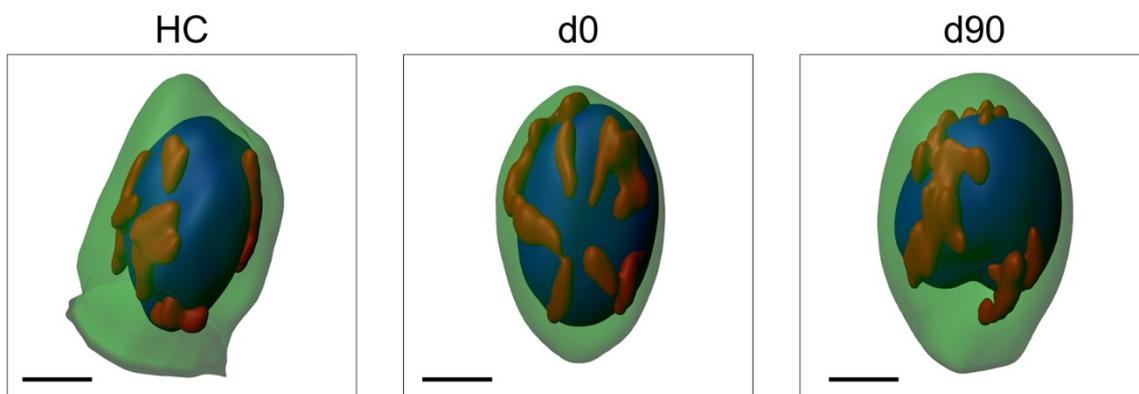
**Abbildung 3.11.2:** Die OCR von Treg von HC wurde mit der OCR von Treg von *de novo* MS Patienten an Tag 0, Tag 14 und Tag 90 der PA Supplementierung verglichen, wobei sich Baseline sowie d14 Werte der MS Patienten von HC unterschieden. Nach 90 Tagen PA Supplementierung nähern sich die Werte der MS Patienten denen von HC an (HCs, n = 9; MS, n = 9).



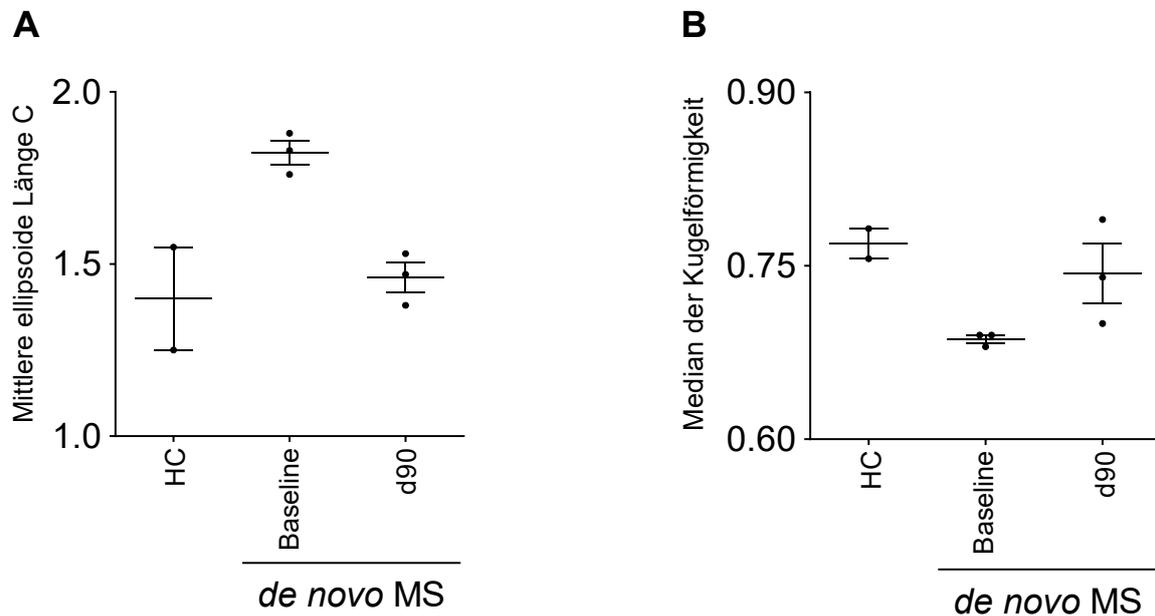
**Abbildung 3.11.3:** Basale sowie auch maximale Atmung von Treg von MS Patienten nach 90 Tagen PA Supplementierung zeigen einen signifikanten Anstieg im Vergleich zum Ausgangswert (Intergruppenanalyse Mann-Whitney Test, Intragruppenanalyse gepaarter t Test; HC, n = 9; *de novo* MS, n = 9; basale Atmung: *de novo* MS Baseline vs d90, p = 0,0363; maximale Atmung: HC vs *de novo* MS Baseline, p = 0,0244; *de novo* MS Baseline vs *de novo* MS d90, p = 0,0429), modifiziert nach Duscha et al. 2020.

Um zu testen, ob die Zunahme der mitochondrialen Atmung nach longitudinaler PA-Supplementierung auf eine Zunahme der mitochondrialen Masse zurückzuführen ist, wurde das Volumen und die Anzahl von Mitochondrien pro Treg quantifiziert. Es wurden keine

Unterschiede in den beschriebenen Parametern zwischen Tag 0 und Tag 90 der PA Supplementierung gefunden (Daten nicht gezeigt). Bei genauerer Analyse der mitochondrialen Morphologie wurde ein Trend zu einer veränderten mitochondrialen Morphologie bei MS zur Baseline im Vergleich zu HCs detektiert. MS-Mitochondrien zeigten eine höhere ellipsoide Länge und eine geringere Kugelförmigkeit als Mitochondrien von HC. Nach 3 Monaten PA-Supplementierung bei MS Patienten zeigte die mitochondriale Morphologie von MS einen Trend zu einer mehr sphärischen und weniger ellipsoiden Form im Vergleich zur Baseline (Abb. 3.11.4, Quantifizierung in Abb. 3.11.5). Die mitochondriale Morphologie von Treg an d90 von MS Patienten ähnelte hingegen stark der von HC. Dies deutet darauf hin, dass die Mitochondrien von MS-Treg nicht nur funktional beeinträchtigt sind, sondern auch einen veränderten, morphologischen Phänotyp aufweisen. Dieser konnte durch longitudinale Supplementation mit PA umgekehrt werden kann.



**Abbildung 3.11.4:** Zell-, Kern- und Mitochondrien-Oberflächen (in gleicher Reihenfolge grün, blau sowie braun dargestellt) wurden aus Laser-Scanning-Mikroskopie-Z-Stacks nach Färbung mit CellTracker Green, MitoTracker Red, Chloromethyl-X-rosamine (CMXRos) und Hoechst 33342 durch Imaris 9.3.1 rekonstruiert (n = 2-3 mit jeweils 15-20 Zellen; Skalenbalken entspricht 3  $\mu$ m).



**Abbildung 3.11.5:** Mittlerer ellipsoider Längenwert C (A) sowie Median der Kugelförmigkeit (B) bei gesunden Kontrollen (HC) und *de novo* MS Patienten zur Baseline sowie nach 14 und 90 Tagen PA-Behandlung (HCs, n = 2; MS, n = 3 für jeden Zeitpunkt), modifiziert nach Duscha et al. 2020.

## 4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnten erste, wichtige Hinweise auf den immunologischen aber auch klinisch relevanten Einfluss von PA auf unterschiedliche Facetten der autoimmunen, chronischen MS gesammelt werden. Zunächst wurde ein Mangelzustand von PA in Serum und Stuhl bei MS Patienten nachgewiesen, der im Folgenden in einer Pilot-Studie mit verkapseltem PA supplementiert wurde. Die Ergebnisse weisen auf einen fundierten, immunologischen Effekt der PA Supplementierung bei MS Patienten auf mehreren biologisch relevanten Ebenen hin. Hierzu zählt hauptsächlich eine Regulation der Treg / Th17 Dysbalance und einer Verbesserung der Funktionalität von Treg durch mitochondriale sowie IL10 vermittelte Mechanismen. Neben den immunmodulatorischen Effekten könnte eine orale PA Supplementation auch eine neuroprotektive Wirkung haben, wie durch eine höhere Verfügbarkeit von PA im CSF und verbesserte klinische Parameter gezeigt werden konnte. Zur Validierung eines neuroprotektiven oder sogar neuroregenerativen Effektes von PA sind allerdings weiterführende Untersuchungen erforderlich.

#### 4.1. Das Darm-Mikrobiom und seine metabolischen Abbauprodukte als modulierende Faktoren bei MS

Dank der zunehmende Anzahl an Beweisen für den Zusammenhang zwischen einem veränderten Darm-Mikrobiom und der Pathogenese von chronischen Krankheiten wie der MS, wird es gerade anhand aktueller Literatur deutlich, dass die Dysbiose des Darm-Mikrobioms entscheidend an der Immunpathogenese von MS beteiligt sein könnte (Manfredo Vieira et al., 2018). In dieser Arbeit wurde ein Mangelzustand an PA bei MS Patienten identifiziert, der durch orale Einnahme von PA umkehrbar war. Im Rahmen der Gesamtstudie (Duscha et al., 2020) wurde ebenfalls eine Dysbiose des Darmmikrobioms bei MS Patienten festgestellt, wie sie bereits auch in der Literatur beschrieben wurde (Miyake et al., 2015, Jangi et al., 2016). Hierbei wiesen initiale Beobachtungen bei MS Patienten mehrere interessante Veränderungen gerade im Kontext von SCFA-assoziierten, bakteriellen Spezies bzw. Gattungen auf, auf die im Folgenden eingegangen werden soll.

So wurde z.B. eine Reduktion der Gattung *Butyricimonas* im Stuhl von MS Patienten nachgewiesen (Duscha et al., 2020). Diese produzieren neben PA und AA hauptsächlich BA aus faserreichen Nahrungsbestandteilen und sind u.a. für physiologische SCFA Konzentrationen im Darm verantwortlich (Le Roy et al., 2019). Es liegt der Schluss nahe, dass eine Reduktion der Gattung insgesamt eine Verminderung der SCFA Konzentrationen begünstigen könnte, was sich mit den quantitativen Messdaten dieser Arbeit gut harmonisieren lässt. Allerdings zeigen rezente Studien auch kontraintuitive Daten. So demonstrieren z.B. Wan und Kollegen, dass die Besiedlung im Darm durch *Butyricimonas* positiv mit dem Risiko der Entwicklung von allergischem Asthma korreliert (Wan et al., 2023). Hierauf basierend kann vermutet werden, dass *Butyricimonas* einen eher multivalenten Einfluss im Kontext von immun-vermittelten Erkrankungen hat und seine Relevanz, im Sinne von reduzierten SCFA Konzentrationen, eher sekundär einzustufen ist. Weiterhin wurde eine Reduktion der bakteriellen Familie *Prevotellaceae* identifiziert, welche einen wichtigen Bestandteil der SCFA Produzenten bilden (Poeker et al., 2018, Adamberg and Adamberg, 2024). Diese Ergebnisse wurden durch reduzierte Mengen an PA in Serum und Stuhl bei allen Patienten der Studie widergespiegelt und wurden bereits in kleinen, gut charakterisierten Kohorten von MS Patienten mit definierten gesunden Kontrollen aus dem häuslichen Umfeld ohne genetischen Verwandtschaftsgrad repliziert (Moles et al., 2022).

Der Mangelzustand an PA wurde bei unbehandelten Patienten mit neu diagnostizierter MS noch ausgeprägter detektiert, was darauf hindeutet, dass Veränderungen des Darm-

Mikrobioms den Verlauf und die Progression der MS beeinflussen könnten. Hierbei könnten erfolgreiche Interventionen eine Wiederherstellung der Darm-Homöostase induzieren und somit direkten Einfluss auf den Krankheitsverlauf nehmen. Die aktuelle Datenlage zu der Verfügbarkeit von SCFA in Serum und Stuhl von MS Patienten ist allerdings kontrovers. So berichten Becker et al. von einer signifikant niedrigeren Konzentration von SCFA im Stuhl von MS Patientinnen im Vergleich zu MS Patienten, was in dieser Arbeit nicht zu erkennen war (Becker et al., 2021). Weitere Studien zeigen einen signifikanten Unterschied in der Konzentration bestimmter Aminosäuren wie L-Glutamin und spezifischer Lipid- bzw. Kohlenhydratmetabolite wie z.B. Myo-Inositol, detektieren allerdings keine Unterschiede in der Konzentration von SCFA in MS Patientenserum (Yang et al., 2021). Diese Unterschiede können durch insgesamt niedrige n Zahlen (Becker n = 43; Yang n = 22; Duscha n = 64), unterschiedliche Messmethoden (UHPLC vs. GC MSMS vs. LC MSMS) oder nicht ausreichend definierte Kohorten (Becker nur RRMS, Yang nur RRMS, Duscha RRMS, SPMS, PPMS sowie *de novo* MS) begründet sein.

Interessanterweise unterschied sich die Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms bei MS Patienten nicht nur von HC, wie aus aktueller Literatur bekannt (Jangi et al., 2016), sondern zeigte auch im Rahmen der Gesamtstudie innerhalb der unterschiedlichen Verlaufsformen teils starke Divergenzen (Duscha et al., 2020). Hierbei ist jedoch noch zu bestimmen, ob diese Variationen zwischen den verschiedenen Verlaufsformen kausal sind oder eine Folge der entsprechenden Erkrankung. Hierzu konnte eine aktuelle Studie zeigen, dass das Darm-Mikrobiom bei MS Patienten entsprechend der Krankheitsaktivität variiert. Hierzu wurden in einer prospektiven Studie das Mikrobiom von 148 MS Patienten mit entsprechenden Kontrollen verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Bakterienvielfalt des Mikrobioms von nicht-DMT behandelten MS Fällen negativ mit der Schubrate korrelierte, was den Unterschied im Mikrobiom zwischen den unterschiedlichen Verlaufsformen erklären könnte (Thirion et al., 2023).

Funktionelle Untersuchungen im Rahmen der publizierten Gesamtstudie (Duscha et al., 2020) konnten überraschenderweise zeigen, dass das Mikrobiom von PA-Respondern in einem intestinalen Darm-Organ-Kultursystem funktionale Veränderungen in der Darmwand auslöste (z. B. erhöhte Treg Zell-induzierende Gene; (Yissachar et al., 2017)). Bei Non-Respondern zeigte sich das genaue Gegenteil mit einer erhöhten Induktion von Genen, welche negativ mit Treg Induktion assoziierbar waren. Zwar sind bereits mehrere Studien veröffentlicht worden, die einen Einfluss des Mikrobioms direkt oder indirekt über SCFA auf die Induktion von Treg im murinen Modell zeigen (Arpaia et al., 2013, Cording et al., 2013, Furusawa et al.,

2013), jedoch stellt der nachgewiesene, direkte Effekt über eine transkriptionelle Veränderung im Darmepithel durch humanen Stuhl nach PA Supplementation ein Novum dar. Dies könnte nachfolgend ebenfalls eine Erhöhung Darm-assoziiertes Treg bedeuten, welche ausgehend vom lymphatischen Darmepithel in die Peripherie migrieren. Möglicher Weise könnten diese in die Peripherie migrierten Zellen genau jene sein, welche im Rahmen dieser Arbeit ausgiebig untersucht wurden. Abschließend kann PA als eines der Hauptfermentationsprodukte aus Ballaststoffen durch anaerobe Bakterien im Darm als potentieller Mediator des Einflusses der Darmbakterien auf die darmassoziierte Immunfunktion deklariert werden (Tazoe et al., 2008, Vinolo et al., 2011).

#### 4.2. Einordnung der immunmodulatorischen Wirkung von PA sowie potentielle Mechanismen

In dieser Arbeit wurden die direkten immunologischen und klinischen Veränderungen unter oraler PA Supplementierung in einer translationalen Pilot-Studie untersucht. Die PA Supplementierung führte zu einer positiven Verschiebung des Immunzellgleichgewichts (d. h. einer Abnahme von Th1/Th17 und einer Zunahme von peripheren Treg, welche bei MS in einer Dysbalance stehen (Kleinewietfeld and Hafler, 2014)), sowie der funktionellen Wiederherstellung der suppressiven Funktion von Treg bei MS Patienten. Der Effekt von PA auf Treg und Th1/Th17 wurde in einer unabhängigen Kohorte von therapienaiven Patienten mit neu diagnostizierter MS (*de novo* MS) sowie bei Patienten mit RA ebenfalls nachgewiesen, was eine verminderte Funktion von Treg als ursächlicher Faktor für Autoimmunerkrankungen nahelegt (Ledford, 2017).

Diese Beobachtungen stimmen mit aktuellen Erkenntnissen überein die darauf hinweisen, dass eine verringerte Produktion von SCFA im Darm - ob kausal durch eine veränderte Ernährung und/oder eine verringerte Produktion durch ein dysbiotisches Darm-Mikrobiom verursacht - zu einer Beeinträchtigung der Treg Zellfunktion führen kann. Dies wurde in Tiermodellen verschiedener Erkrankungen bereits nachgewiesen. In den eigenen Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass Supplementierung von PA eine Abmilderung des Krankheitsverlaufes der EAE herbeiführt und mit einer Erhöhung von Treg im Darmepithel einhergeht. Zudem konnte bei PA Gabe histologisch eine reduzierte axonale Schädigung, geringere Demyelinisierung sowie eine abgesenkte Zahl an Immuninfiltraten im ZNS über den Krankheitsverlauf detektiert werden (Haghikia et al., 2015). Weiterhin wurde im Tiermodell der

Colitis eine Abmilderung des Krankheitsverlaufes sowie eine erhöhte Anzahl an Darm-assoziierten Treg bei Gabe von SCFA nachgewiesen (Smith et al., 2013). Zudem gibt es weitere Verbindungen zwischen einer reduzierten Treg Funktion und einer verminderten systemischen bzw. Darm-assoziierten Verfügbarkeit von SCFA bei Typ-1-Diabetes sowie dem Metabolischen Syndrom (Sonnenburg and Bäckhed, 2016). In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung einer verringerten, suppressiv funktionalen Treg Population bei MS Patienten nicht überraschend, zumal diese bereits beschrieben wurde (Viglietta et al., 2004). Eine durch PA Supplementierung erreichte Verbesserung der Funktion dieser spezifischen T Zell Subpopulation im Kontext der MS, zusammen mit einer deutlichen Stabilisierung der Krankheitsprogression und der klinischen Parameter, repräsentiert jedoch eine neuartige, klinisch relevante Anwendung eines Darm-Mikrobiom-Metaboliten wie PA.

Um einen der zugrundeliegenden Mechanismen für den beobachteten Anstieg der suppressiven Kapazität von Treg und der entsprechend erhöhten Sezernierung von IL10 zu ermitteln, wurde die zelluläre Atmung von Treg im Kontext der PA Supplementierung mittels der Agilent Seahorse Technologie untersucht. Hierbei ergab sich eine Verbesserung der basalen wie auch der maximalen, mitochondrialen Respiration nach 90 Tagen PA Supplementierung. Weiterhin wurde eine Dysmorphologie der Mitochondrien bei MS Patienten zur Baseline ermittelt, welche sich nach 90 Tagen PA Einnahme wieder der Morphologie von HC Mitochondrien annähert.

In Verbindung mit einer Transkriptomanalyse von PBMCs von mit PA behandelten MS Patienten konnten in der publizierten Hauptstudie außerhalb dieser Arbeit mehrere Gene als reguliert nachgewiesen werden, die in Verbindung mit mitochondrialer Funktion stehen (Duscha et al., 2020). Dazu gehören unter anderem *CROT*, das für die Carnitin-O-Octanoyltransferase kodiert. Ihre Funktion bei der Transesterifizierung beeinflusst unter anderem den Transport von Acetyl-Coenzym A (CoA) von Peroxisomen zu den Mitochondrien. Acetyl-CoA ist an der  $\beta$ -Oxidation beteiligt, die hauptsächlich für den Abbau von Fettsäuren, aber auch für die Produktion von Acetyl-CoA selbst verwendet wird, das wiederum für die ATP-Produktion im Citratzyklus genutzt wird (Westin et al., 2008). *XPA*, ein weiteres Gen, das nach PA-Aufnahme hoch reguliert wurde, spielt eine wichtige Rolle bei der Mitophagie (Fang et al., 2014). Die Expression von *CMC1* war ebenfalls nach 14-tägiger PA Einnahme signifikant erhöht. *CMC1* ist an der Herstellung des mitochondrialen Atmungskettenkomplexes IV beteiligt und stellt somit einen integralen Bestandteil der Funktionalität der mitochondrialen Atmungskette dar (Bourens and Barrientos, 2017). Aufgrund der Bulk RNAseq Analyse können allerdings keine Zell- bzw. Treg spezifischen Rückschlüsse gezogen werden. Eine

Transkriptomanalyse von isolierten Treg von MS Patienten nach PA Einnahme könnte hier weiteren Aufschluss über spezifisch regulierte, mitochondriale Gene geben, welche über eine Regulation der metabolischen Eigenschaft von Treg ein potentieller Bestandteil des Wirkmechanismus von PA seien könnten. Zusammenfassend scheint eine Supplementierung mit PA einen deutlich transkriptionellen Einfluss auf die metabolische Funktion von Immunzellen, aber auch Treg zu haben. Diese benötigen bei uneingeschränkter Funktion eine ausreichende Kapazität zur oxidativen Phosphorylierung, um entsprechende Energie zur Herstellung von IL10 als Hauptmediator suppressiver Funktion zu erhalten (Chávez and Tse, 2021).

#### 4.3. Beurteilung des Einflusses von PA Supplementierung auf klinische Parameter als möglicher Schlüssel zu Neuroregeneration

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine verbesserte Treg Zellfunktion mit der Reduktion klinischer Symptome bei MS Patienten korreliert. In einem retrospektiven Rahmen wurde eine Verringerung der Schubrate und eine Stabilisierung der Krankheitsprogression während longitudinaler PA Supplementation beobachtet. Weiterhin wurden bei einer kleinen Untergruppe von Patienten aus der in dieser Arbeit erhobenen Kohorte im Rahmen der Gesamtstudie, Gehirn-Scans mittel Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) durchgeführt, um Gewebeschäden im Gehirn objektiver zu bewerten (Duscha et al., 2020). Die Analyse ergab eine Zunahme des Volumens der grauen Substanz im Basalganglienbereich, obwohl keine Veränderungen der Läsionslast beobachtet wurden. Das Fehlen von Veränderungen der Läsionslast ist wahrscheinlich auf eine insgesamt niedrige entzündliche Aktivität in dieser Kohorte von Patienten zurückzuführen, die eine kontinuierliche immunmodulatorische Basistherapie wie z.B. Rituximab erhielten. Es kann vermutet werden, dass PA möglicherweise neuroprotektive Effekte jenseits der Immunmodulation hervorruft. In einer aktuellen Studie wurden neuroprotektive Effekte des Rho-Kinase-Inhibitors Fasudil in Kombination mit PA bei primären, dopaminergen Ratten-Neuronen untersucht. Die Anwendung von Fasudil führte zu signifikant erhöhtem Neuritenwachstum und erhöhtem Zellüberleben von dopaminergen Zellen bei Induktion von oxidativem Stress. Zusätzlich sorgte hier die Anwendung von PA für eine Verbesserung des Zellüberlebens der dopaminergen Zellen bei Induktion von Rotenon-Toxizität und erhöhte das Neuritenwachstum in moderatem Umfang, was einen Anhaltspunkt für direkte, neuroprotektive Effekte darstellen kann (Ostendorf et al., 2020). Eine weitere Studie konnte ebenfalls einen neuroregenerativen Effekt

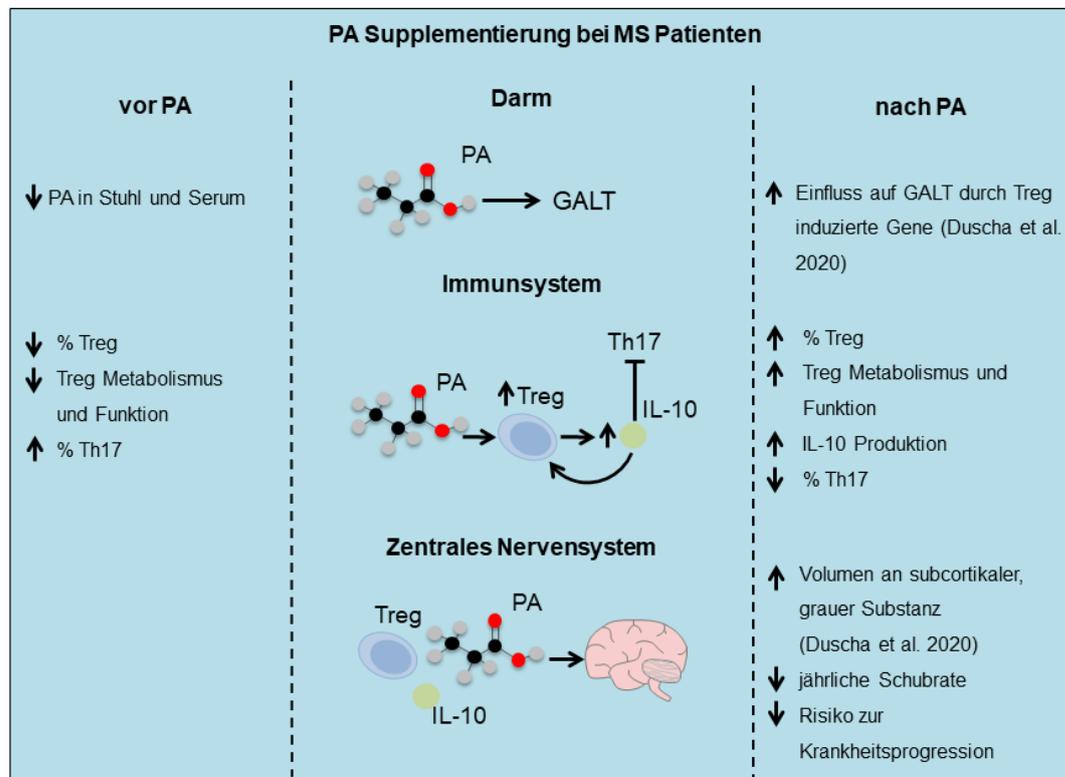
von PA an Spinalganglien im Rattenmodell der chronisch inflammatorischen, demyelinisierenden Polyneuropathie (CIDP), einer autoimmunen Erkrankung des peripheren Nervensystems, nachweisen. Hierzu wurden Spinalganglien unter Verwendung von  $H_2O_2$  oxidativem Stress ausgesetzt, der mittels *in vitro* Behandlung mit PA reduziert werden konnte. Die Autoren konnten somit einen antioxidativen und neuroregenerativen Effekt von PA auf Spinalganglien nachweisen (Grüter et al., 2023). In einer kürzlich publizierten Arbeit konnten wir bereits selbst zeigen, dass PA einen direkten Einfluss auf regenerative Prozesse bei humanen Neuronen aufweist. Hierzu wurden über rückprogrammierte Stammzellen (induced pluripotent stem cells, iPSC) Motoneurone generiert, welche nachfolgend mittels chemischen Stimulus bzw. oxidativem Stress geschädigt wurden. Nach Schädigung konnte gezeigt werden, dass unter Zugabe von PA zur Kultur eine signifikant erhöhte Menge an geschädigten Neuriten nachwuchs. Dieser Effekt wurde bei gleichzeitiger Gabe von PA sowie BA sogar noch verstärkt. Weiterführende Proteom-Analysen bei geschädigten und behandelten Neuronen konnten zudem eine Veränderung von Gesamtmengen an Proteinen feststellen, welche einerseits in Verbindung zum Aufbau von Chromatinstrukturen stehen, und andererseits an zellulären, metabolischen Prozessen beteiligt sind (Gisevius et al., 2024). Trotz vieler Fortschritte im Bereich der Grundlagenforschung bezüglich der Wirkungsweise von PA sind weitere, vor allem humane Studien bzw. humane experimentelle Modelle unerlässlich, um definitive Aussagen zu neuroprotektiven Effekten treffen zu können.

Der zugrundeliegende Mechanismus, der zu einer direkten Neuroprotektion durch PA führt, muss ebenfalls noch weiterführend aufgeklärt werden. In verschiedenen Modellen zur Untersuchung neurodegenerativer Erkrankungen (z.B. Parkinson Erkrankung oder Alzheimer) wird angenommen, dass SCFA-Derivate durch epigenetische Modulation als neuroprotektive und/oder neuromodulierende Stoffe wirken können (Sampson et al., 2016). Hier fungieren SCFA als Histondeacetylase (HDAC)-Inhibitoren (HDACis) durch Hemmung der Klasse 1 und 2 Deacetylasen (Davie, 2003). HDAC selbst entfernen Acetylgruppen von Lysinresten der Chromatinstruktur, was zu einer Transkriptionsrepression führt. Ungleichgewichte in der Protein-Acetylierung werden mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert, weshalb HDAC-Inhibition als potentielles Ziel für gerichtete Manipulation im Kontext von Neurodegeneration und -regeneration angesehen werden. Der genaue zugrundeliegende Mechanismus muss jedoch noch weiterführend untersucht werden (Choudhary et al., 2014). Ein erstes Verständnis für einen potentiellen Wirkmechanismus liefert eine aktuellere Studie, welche zeigen konnte, dass PA einen antioxidativen Effekt auf Spinalganglien und Schwanzzellen im Zellkulturmodell von CIDP hat. Hierbei reguliert PA differentiell die

Expression von HDAC 2 und 8, was nachfolgend zu einer Hyperacetylierung des Histon 3 führt. Diese Hyperacetylierung verstärkte im Anschluss die Expression des wichtigen, antioxidativen Enzyms Katalase, was abschließend zu einer verbesserten Neuroregeneration führte (Grüter et al., 2023). Hierzu konnten wir in unserer aktuellenrezenten Arbeit ebenfalls zeigen, dass durch Inhibition von freien Fettsäure-Rezeptoren (free fatty acid receptors, FFAR), die Histon-Deacetylierung stark vermindert ist in Anwesenheit von PA oder BA. Transkriptionsanalysen im *in vitro* Modell konnten hierbei zeigen, dass PA einen antioxidativen Signalweg aktiviert, während BA die neuronale ATP-Synthese erhöht und somit für eine erhöhte Deacetylierung sorgt (Gisevius et al., 2024).

#### 4.4. Abschlussbetrachtung und Ausblick

Zusammenfassend konnte diese Arbeit mit Ergebnissen von etwa 300 MS Patienten einen systemischen Mangelzustand an PA nachweisen. Eine kontrollierte PA Supplementierung zeigte positive Effekte auf mehrere wichtige Faktoren der MS Pathogenese: auf immunologische (Treg, Th1/17 Dysbalance) sowie klinische Parameter bei MS Patienten (Schubrate und Risiko der Krankheitsprogression) (Abb. 4.4.1). Die Ergebnisse dieser Pilot-Studie zeigen nicht nur, dass die Supplementierung von PA eine sichere und wirkungsvolle Ergänzung zu bereits zugelassenen und anerkannten, immunmodulierenden Medikamenten in der MS Therapie ist, sondern bestätigen auch, dass die Wirkungsweise von PA durch eine Stimulation von Treg erfolgt.



**Abbildung 4.4.1:** Graphische Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit; modifiziert nach Duscha et al. 2020.

Zukünftig können weitere explorative Studien wie eine fäkale Mikrobiomtransplantation bei MS Patienten dabei helfen, genauere Einblicke in die komplexen Wechselbeziehungen zwischen Darm-Mikrobiom, Darmepithel, Immunsystem und Komponenten des ZNS zu erhalten. Diese Arbeit stellt die erste Studie dar, die sowohl klinische Wirkung, als auch potentielle, neuroregenerative Effekte von PA im Kontext einer neuroimmunologischen, autoimmunen Erkrankung zeigt, und das Darm-Metabolom mit der Gehirn-Immunoachse verknüpft. Die in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse bilden eine solide Grundlage für prospektive, klinische Phase-II-Studien zur weiterführenden Untersuchung von PA als Zusatz Behandlung nicht nur bei MS, sondern auch bei anderen Autoimmun- sowie neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. der RA oder der Parkinson Erkrankung.

## 5. Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung    | Bedeutung   |
|--------------|---|
| AA           | acetic acid, Ethansäure   |
| APC          | antigen-presenting cell, antigenpräsentierende Zellen                   |
| BA           | butyric acid, Butansäure  |
| CIDP         | chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie            |
| CoA          | Coenzym-A   |
| CROT         | Carnitin-O-Octanoyltransferase  |
| DMSO         | Dimethylsulfonoxid  |
| DMT          | disease modifying treatment, Basistherapie im Kontext von MS            |
| EAE          | experimentelle, autoimmune Enzephalomyelitis                            |
| EDSS         | expanded disability status scale  |
| EDTA         | Ethyldiamintetraessigsäure  |
| ELISA        | enzym-linked immunosorbent assay  |
| FACS         | fluorescence activated cell sorting, Durchflußzytometrie                |
| FCS          | fetal calf serum, fötales Kälberserum                                   |
| FFAR         | free fatty acids receptors  |
| GALT         | gut-associated lymphatic tissue, Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe |
| GWAS         | genome wide association studies, Genomweite Assoziationsstudien         |
| HC           | healthy controls, gesunde Kontrollpersonen                              |
| HDAC         | Histondeacetylase   |
| HDACis       | Histondeacetylase Inhibitoren   |
| IFN $\gamma$ | Interferon $\gamma$   |
| IL           | Interleukin   |
| iPSC         | induced pluripotent stem cells  |
| IS           | interner Standard   |
| MRT          | Magnet-Resonanz Tomographie   |
| MS           | Multiple Sklerose   |

|              |   |
|--------------|---|
| NaCl         | Natriumchlorid  |
| OCR          | oxygen consumption rate   |
| PA           | propionoc acid, Propionsäure  |
| PBMC         | peripheral blood mononuclear cells                                  |
| PBS          | phosphat buffered saline  |
| PPMS         | primary-progressive MS, primär progrediente Verlaufsform der MS     |
| RA           | rheumatoide Arthritis   |
| RRMS         | relapse-remitting MS, schubförmige Verlaufsform der MS              |
| SCFA         | short-chain fatty acids, kurzkettige Fettsäuren                     |
| SEM          | standard error of the mean  |
| SNP          | single nucleotide polymorphism, Einzelbasenpaar-Polymorphismen      |
| SPMS         | secondary-progressive MS, sekundär progrediente Verlaufsform der MS |
| Th           | Thelfer Zellen  |
| TNF $\alpha$ | Tumor-Nekrosefaktor $\alpha$  |
| Treg         | regulatorische T Zellen   |
| VCAM 1       | vascular cell adhesion molecule 1                                   |
| ZNS          | Zentrales Nervensystem  |

## 6. Literaturverzeichnis

- ADAMBERG, S. & ADAMBERG, K. 2024. Prevotella enterotype associates with diets supporting acidic faecal pH and production of propionic acid by microbiota. *Heliyon*, 10, e31134.
- AJOUZ, H., MUKHERJI, D. & SHAMSEDDINE, A. 2014. Secondary bile acids: an underrecognized cause of colon cancer. *World J Surg Oncol*, 12, 164.
- AKKAD, D. A., BELLENBERG, B., ESSER, S., WEILER, F., EPPLEN, J. T., GOLD, R., LUKAS, C. & HAGHIKIA, A. 2015. Multiple sclerosis risk loci correlate with cervical cord atrophy and may explain the course of disability. *Neurogenetics*, 16, 161-8.
- ANDLAUER, T. F., BUCK, D., ANTONY, G., BAYAS, A., BECHMANN, L., BERTHELE, A., CHAN, A., GASPERI, C., GOLD, R., GRAETZ, C., HAAS, J., HECKER, M., INFANTE-DUARTE, C., KNOP, M., KUMPFEL, T., LIMMROTH, V., LINKER, R. A., LOLEIT, V., LUESSI, F., MEUTH, S. G., MUHLAU, M., NISCHWITZ, S., PAUL, F., PUTZ, M., RUCK, T., SALMEN, A., STANGEL, M., STELLMANN, J. P., STURNER, K. H., TACKENBERG, B., THEN BERGH, F., TUMANI, H., WARNKE, C., WEBER, F., WIENDL, H., WILDEMANN, B., ZETTL, U. K., ZIEMANN, U., ZIPP, F., ARLOTH, J., WEBER, P., RADIVOJKOV-BLAGOJEVIC, M., SCHEINHARDT, M. O., DANKOWSKI, T., BETTECKEN, T., LICHTNER, P., CZAMARA, D., CARRILLO-ROA, T., BINDER, E. B., BERGER, K., BERTRAM, L., FRANKE, A., GIEGER, C., HERMS, S., HOMUTH, G., ISING, M., JOCKEL, K. H., KACPROWSKI, T., KLOIBER, S., LAUDES, M., LIEB, W., LILL, C. M., LUCAE, S., MEITINGER, T., MOEBUS, S., MULLER-NURASYID, M., NOTHEN, M. M., PETERSMANN, A., RAWAL, R., SCHMINKE, U., STRAUCH, K., VOLZKE, H., WALDENBERGER, M., WELLMANN, J., PORCU, E., MULAS, A., PITZALIS, M., SIDORE, C., ZARA, I., CUCCA, F., ZOLEDZIEWSKA, M., ZIEGLER, A., HEMMER, B. & MULLER-MYHSOK, B. 2016. Novel multiple sclerosis susceptibility loci implicated in epigenetic regulation. *Sci Adv*, 2, e1501678.
- AOYAMA, M., KOTANI, J. & USAMI, M. 2010. Butyrate and propionate induced activated or non-activated neutrophil apoptosis via HDAC inhibitor activity but without activating GPR-41/GPR-43 pathways. *Nutrition*, 26, 653-661.
- ARPAIA, N., CAMPBELL, C., FAN, X., DIKIY, S., VAN DER VEEKEN, J., DEROOS, P., LIU, H., CROSS, J. R., PFEFFER, K., COFFER, P. J. & RUDENSKY, A. Y. 2013. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*, 504, 451-5.
- ASCHERIO, A. & MUNGER, K. L. 2007. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Annals of Neurology*, 61, 504-513.
- BÄCKHED, F., LEY, R. E., SONNENBURG, J. L., PETERSON, D. A. & GORDON, J. I. 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307, 1915-20.
- BECKER, A., ABUAZAB, M., SCHWIERTZ, A., WALTER, S., FASSBENDER, K. C., FOUSSE, M. & UNGER, M. M. 2021. Short-chain fatty acids and intestinal inflammation in multiple sclerosis: modulation of female susceptibility by microbial products? *Auto Immun Highlights*, 12, 7.
- BERER, K., GERDES, L. A., CEKANAVICIUTE, E., JIA, X., XIAO, L., XIA, Z., LIU, C., KLOTZ, L., STAUFFER, U., BARANZINI, S. E., KUMPFEL, T., HOHLFELD, R., KRISHNAMOORTHY, G. & WEKERLE, H. 2017. Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, 10719-10724.

- BOURENS, M. & BARRIENTOS, A. 2017. A CMC1-knockout reveals translation-independent control of human mitochondrial complex IV biogenesis. *EMBO reports*, 18, 477-494.
- BRINKMANN, V., DAVIS, M. D., HEISE, C. E., ALBERT, R., COTTENS, S., HOF, R., BRUNS, C., PRIESCHL, E., BAUMRUKER, T., HIESTAND, P., FOSTER, C. A., ZOLLINGER, M. & LYNCH, K. R. 2002. The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem*, 277, 21453-7.
- BRUNET-RATNASINGHAM, E., DUBÉ, M. & KAUFMANN, D. E. 2019. Targeting Mitochondria to Revive Dysfunctional Regulatory T Cells. *Trends in Molecular Medicine*, 25, 1-3.
- CHAN, J. C. Y., KIOH, D. Y. Q., YAP, G. C., LEE, B. W. & CHAN, E. C. Y. 2017. A novel LCMSMS method for quantitative measurement of short-chain fatty acids in human stool derivatized with 12C- and 13C-labelled aniline. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 138, 43-53.
- CHANG, P. V., HAO, L., OFFERMANN, S. & MEDZHITOV, R. 2014. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 2247-52.
- CHÁVEZ, M. D. & TSE, H. M. 2021. Targeting Mitochondrial-Derived Reactive Oxygen Species in T Cell-Mediated Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*, 12.
- CHEN, J., CHIA, N., KALARI, K. R., YAO, J. Z., NOVOTNA, M., PAZ SOLDAN, M. M., LUCKEY, D. H., MARIETTA, E. V., JERALDO, P. R., CHEN, X., WEINSHENKER, B. G., RODRIGUEZ, M., KANTARCI, O. H., NELSON, H., MURRAY, J. A. & MANGALAM, A. K. 2016. Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Sci Rep*, 6, 28484.
- CHOUDHARY, C., WEINERT, B. T., NISHIDA, Y., VERDIN, E. & MANN, M. 2014. The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 536-50.
- COMPSTON, A. & COLES, A. 2008. Multiple sclerosis. *Lancet*, 372, 1502-17.
- CONLON, M. A. & BIRD, A. R. 2014. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients*, 7, 17-44.
- CORDING, S., FLEISSNER, D., HEIMESAAT, M. M., BERESWILL, S., LODDENKEMPER, C., UEMATSU, S., AKIRA, S., HAMANN, A. & HUEHN, J. 2013. Commensal microbiota drive proliferation of conventional and Foxp3(+) regulatory CD4(+) T cells in mesenteric lymph nodes and Peyer's patches. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*, 3, 1-10.
- COTILLARD, A., KENNEDY, S. P., KONG, L. C., PRIFTI, E., PONS, N., LE CHATELIER, E., ALMEIDA, M., QUINQUIS, B., LEVENEZ, F., GALLERON, N., GOUGIS, S., RIZKALLA, S., BATTO, J. M., RENAULT, P., CONSORTIUM, A. N. R. M., DORE, J., ZUCKER, J. D., CLEMENT, K. & EHRlich, S. D. 2013. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature*, 500, 585-8.
- DAVIE, J. R. 2003. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. *J Nutr*, 133, 2485S-2493S.
- DE VADDER, F., KOVATCHEVA-DATCHARY, P., GONCALVES, D., VINERA, J., ZITOUN, C., DUCHAMPT, A., BACKHED, F. & MITHIEUX, G. 2014. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell*, 156, 84-96.
- DUSCHA, A., GISEVIUS, B., HIRSCHBERG, S., YISSACHAR, N., STANGL, G. I., EILERS, E., BADER, V., HAASE, S., KAISLER, J., DAVID, C., SCHNEIDER, R., TROISI, R., ZENT, D., HEGELMAIER, T., DOKALIS, N., GERSTEIN, S., DEL MARE-ROUMANI, S., AMIDROR, S., STASZEWSKI, O., POSCHMANN, G., STÜHLER, K., HIRCHE, F.,

- BALOGH, A., KEMPA, S., TRÄGER, P., ZAISS, M. M., HOLM, J. B., MASSA, M. G., NIELSEN, H. B., FAISSNER, A., LUKAS, C., GATERMANN, S. G., SCHOLZ, M., PRZUNTEK, H., PRINZ, M., FORSLUND, S. K., WINKLHOFFER, K. F., MÜLLER, D. N., LINKER, R. A., GOLD, R. & HAGHIKIA, A. 2020. Propionic Acid Shapes the Multiple Sclerosis Disease Course by an Immunomodulatory Mechanism. *Cell*, 180, 1067-1080.e16.
- ENDO, Y., ASOU, H. K., MATSUGAE, N., HIRAHARA, K., SHINODA, K., TUMES, D. J., TOKUYAMA, H., YOKOTE, K. & NAKAYAMA, T. 2015. Obesity Drives Th17 Cell Differentiation by Inducing the Lipid Metabolic Kinase, ACC1. *Cell Rep*, 12, 1042-55.
- FANG, EVANDRO F., SCHEIBYE-KNUDSEN, M., BRACE, LEAR E., KASSAHUN, H., SENGUPTA, T., NILSEN, H., MITCHELL, JAMES R., CROTEAU, DEBORAH L. & BOHR, VILHELM A. 2014. Defective Mitophagy in XPA via PARP-1 Hyperactivation and NAD<sup>+</sup>/SIRT1 Reduction. *Cell*, 157, 882-896.
- FERNANDEZ, F. & COLLINS, M. D. 1987. Vitamin K composition of anaerobic gut bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 41, 175-180.
- FLINT, H. J., SCOTT, K. P., DUNCAN, S. H., LOUIS, P. & FORANO, E. 2012. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes*, 3, 289-306.
- FRIEND, K. B., MERNOFF, S. T., BLOCK, P. & REEVE, G. 2006. Smoking rates and smoking cessation among individuals with multiple sclerosis. *Disabil Rehabil*, 28, 1135-41.
- FURUSAWA, Y., OBATA, Y., FUKUDA, S., ENDO, T. A., NAKATO, G., TAKAHASHI, D., NAKANISHI, Y., UETAKE, C., KATO, K., KATO, T., TAKAHASHI, M., FUKUDA, N. N., MURAKAMI, S., MIYAUCHI, E., HINO, S., ATARASHI, K., ONAWA, S., FUJIMURA, Y., LOCKETT, T., CLARKE, J. M., TOPPING, D. L., TOMITA, M., HORI, S., OHARA, O., MORITA, T., KOSEKI, H., KIKUCHI, J., HONDA, K., HASE, K. & OHNO, H. 2013. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, 504, 446-50.
- GISEVIUS, B., DUSCHA, A., POSCHMANN, G., STUHLER, K., MOTTE, J., FISSE, A. L., AUGUSTYNIAK, S., REHM, A., RENK, P., BOSE, C., HUBERT, D., PETERS, K., JAGST, M., GOMER, A., TODT, D., BADER, V., TOKIC, M., HIRSCHBERG, S., KROGIAS, C., TRAMPE, N., COUTOURIER, C., WINNESBERG, C., STEINMANN, E., WINKLHOFFER, K., GOLD, R. & HAGHIKIA, A. 2024. Propionic acid promotes neurite recovery in damaged multiple sclerosis neurons. *Brain Commun*, 6, fcae182.
- GOLDENBERG, M. M. 2012. Multiple sclerosis review. *P t*, 37, 175-84.
- GOVERMAN, J. 2009. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol*, 9, 393-407.
- GRÜTER, T., MOHAMAD, N., RILKE, N., BLUSCH, A., SGODZAI, M., DEMIR, S., PEDREITURRIA, X., LEMHOEFER, K., GISEVIUS, B., HAGHIKIA, A., FISSE, A. L., MOTTE, J., GOLD, R. & PITAROKOILI, K. 2023. Propionate exerts neuroprotective and neuroregenerative effects in the peripheral nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120, e2216941120.
- HAAHR, S., KOCH-HENRIKSEN, N., MOLLER-LARSEN, A., ERIKSEN, L. S. & ANDERSEN, H. M. 1995. Increased risk of multiple sclerosis after late Epstein-Barr virus infection: a historical prospective study. *Mult Scler*, 1, 73-7.
- HAAHR, S., PLESNER, A. M., VESTERGAARD, B. F. & HOLLSBERG, P. 2004. A role of late Epstein-Barr virus infection in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*, 109, 270-5.
- HAFNER, D. A., COMPSTON, A., SAWCER, S., LANDER, E. S., DALY, M. J., DE JAGER, P. L., DE BAKKER, P. I., GABRIEL, S. B., MIREL, D. B., IVINSON, A. J., PERICAK-

- VANCE, M. A., GREGORY, S. G., RIOUX, J. D., MCCAULEY, J. L., HAINES, J. L., BARCELLOS, L. F., CREE, B., OKSENBURG, J. R. & HAUSER, S. L. 2007. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med*, 357, 851-62.
- HAGHIKIA, A., HOHLFELD, R., GOLD, R. & FUGGER, L. 2013. Therapies for multiple sclerosis: translational achievements and outstanding needs. *Trends Mol Med*, 19, 309-19.
- HAGHIKIA, A., JORG, S., DUSCHA, A., BERG, J., MANZEL, A., WASCHBISCH, A., HAMMER, A., LEE, D. H., MAY, C., WILCK, N., BALOGH, A., OSTERMANN, A. I., SCHEBB, N. H., AKKAD, D. A., GROHME, D. A., KLEINWIETFIELD, M., KEMPA, S., THONE, J., DEMIR, S., MULLER, D. N., GOLD, R. & LINKER, R. A. 2015. Dietary Fatty Acids Directly Impact Central Nervous System Autoimmunity via the Small Intestine. *Immunity*, 43, 817-29.
- HAGHIKIA, A., ZIMMERMANN, F., SCHUMANN, P., JASINA, A., ROESSLER, J., SCHMIDT, D., HEINZE, P., KAISLER, J., NAGESWARAN, V., AIGNER, A., CEGLAREK, U., CINEUS, R., HEGAZY, A. N., VAN DER VORST, E. P. C., DORING, Y., STRAUCH, C. M., NEMET, I., TREMAROLI, V., DWIBEDI, C., KRANKEL, N., LEISTNER, D. M., HEIMESAAT, M. M., BERESWILL, S., RAUCH, G., SEELAND, U., SOEHNLEIN, O., MULLER, D. N., GOLD, R., BACKHED, F., HAZEN, S. L., HAGHIKIA, A. & LANDMESSER, U. 2022. Propionate attenuates atherosclerosis by immune-dependent regulation of intestinal cholesterol metabolism. *Eur Heart J*, 43, 518-533.
- HANDEL, A. E., IRANI, S. R. & HOLLÄNDER, G. A. 2018. The role of thymic tolerance in CNS autoimmune disease. *Nature Reviews Neurology*, 14, 723-734.
- HARRIS, K. A. & KRIS-ETHERTON, P. M. 2010. Effects of Whole Grains on Coronary Heart Disease Risk. *Current Atherosclerosis Reports*, 12, 368-376.
- HELLINGS, N., RAUS, J. & STINISSEN, P. 2002. Insights into the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Immunol Res*, 25, 27-51.
- HONDA, K. & LITTMAN, D. R. 2016. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature*, 535, 75-84.
- HOYLES, L., SNELLING, T., UMLAI, U. K., NICHOLSON, J. K., CARDING, S. R., GLEN, R. C. & MCARTHUR, S. 2018. Microbiome-host systems interactions: protective effects of propionate upon the blood-brain barrier. *Microbiome*, 6, 55.
- JANGI, S., GANDHI, R., COX, L. M., LI, N., VON GLEHN, F., YAN, R., PATEL, B., MAZZOLA, M. A., LIU, S., GLANZ, B. L., COOK, S., TANKOU, S., STUART, F., MELO, K., NEJAD, P., SMITH, K., TOPCUOLU, B. D., HOLDEN, J., KIVISAKK, P., CHITNIS, T., DE JAGER, P. L., QUINTANA, F. J., GERBER, G. K., BRY, L. & WEINER, H. L. 2016. Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nat Commun*, 7, 12015.
- KAPPOS, L., BAR-OR, A., CREE, B. A. C., FOX, R. J., GIOVANNONI, G., GOLD, R., VERMERSCH, P., ARNOLD, D. L., ARNOULD, S., SCHERZ, T., WOLF, C., WALLSTROM, E., DAHLKE, F. & INVESTIGATORS, E. C. 2018. Siponimod versus placebo in secondary progressive multiple sclerosis (EXPAND): a double-blind, randomised, phase 3 study. *Lancet*, 391, 1263-1273.
- KAPPOS, L., RADUE, E. W., O'CONNOR, P., POLMAN, C., HOHLFELD, R., CALABRESI, P., SELMAJ, K., AGOROPOULOU, C., LEYK, M., ZHANG-AUBERSON, L. & BURTIN, P. 2010. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 362, 387-401.

- KLEINewIETFELD, M. & HAFLEr, D. A. 2014. Regulatory T cells in autoimmune neuroinflammation. *Immunol Rev*, 259, 231-44.
- KLEINewIETFELD, M., MANZEL, A., TITZE, J., KVAKAN, H., YOSEF, N., LINKER, R. A., MULLER, D. N. & HAFLEr, D. A. 2013. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature*, 496, 518-22.
- LE ROY, T., VAN DER SMISSEN, P., PAQUOT, A., DELZENNE, N., MUCCIOLI, G. G., COLLET, J. F. & CANI, P. D. 2019. *Butyricimonas faecalis* sp. nov., isolated from human faeces and emended description of the genus *Butyricimonas*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 69, 833-838.
- LEDFOrD, H. 2017. Drug companies flock to supercharge T-cells in fight against autoimmune disease. *Nature*.
- LEY, R. E., HAMADY, M., LOZUPONE, C., TURNBAUGH, P. J., RAMEY, R. R., BIRCHER, J. S., SCHLEGEL, M. L., TUCKER, T. A., SCHRENZEL, M. D., KNIGHT, R. & GORDON, J. I. 2008. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 320, 1647-51.
- LIU, S., STAMPFER, M. J., HU, F. B., GIOVANNUCCI, E., RIMM, E., MANSON, J. E., HENNEKENS, C. H. & WILLETT, W. C. 1999. Whole-grain consumption and risk of coronary heart disease: results from the Nurses' Health Study. *Am J Clin Nutr*, 70, 412-9.
- LOZUPONE, C. A., STOMBAUGH, J. I., GORDON, J. I., JANSSON, J. K. & KNIGHT, R. 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 489, 220-30.
- MACIA, L., THORBURN, A. N., BINGE, L. C., MARINO, E., ROGERS, K. E., MASLOWSKI, K. M., VIEIRA, A. T., KRANICH, J. & MACKAY, C. R. 2012. Microbial influences on epithelial integrity and immune function as a basis for inflammatory diseases. *Immunol Rev*, 245, 164-76.
- MAECKER, H. T., MCCOY, J. P. & NUSSENBLATT, R. 2012. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol*, 12, 191-200.
- MANFREDO VIEIRA, S., HILTENSPErGER, M., KUMAR, V., ZEGARRA-RUIZ, D., DEHNER, C., KHAN, N., COSTA, F. R. C., TINIAKOU, E., GREILING, T., RUFF, W., BARBIERI, A., KRIEGEL, C., MEHTA, S. S., KNIGHT, J. R., JAIN, D., GOODMAN, A. L. & KRIEGEL, M. A. 2018. Translocation of a gut pathobiont drives autoimmunity in mice and humans. *Science*, 359, 1156-1161.
- MATLOUBIAN, M., LO, C. G., CINAMON, G., LESNESKI, M. J., XU, Y., BRINKMANN, V., ALLENDE, M. L., PROIA, R. L. & CYSTER, J. G. 2004. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*, 427, 355-60.
- MCArTHUR, B. & SARNAIK, A. P. 1982. Quantification of short-chain fatty acids in plasma. *Clin Chem*, 28, 1983-4.
- MCFARLAND, H. F. & MARTIN, R. 2007. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol*, 8, 913-9.
- MCGINLEY, M. P., GOLDSCHMIDT, C. H. & RAE-GRANT, A. D. 2021. Diagnosis and Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *JAMA*, 325, 765-779.
- MINAGAR, A. & ALEXANDER, J. S. 2003. Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 9, 540-549.
- MIYAKE, S., KIM, S., SUDA, W., OSHIMA, K., NAKAMURA, M., MATSUOKA, T., CHIHARA, N., TOMITA, A., SATO, W., KIM, S.-W., MORITA, H., HATTORI, M., YAMAMURA, T.

- & WILSON, B. A. 2015. Dysbiosis in the Gut Microbiota of Patients with Multiple Sclerosis, with a Striking Depletion of Species Belonging to Clostridia XIVa and IV Clusters. *PLOS ONE*, 10, e0137429.
- MOLES, L., DELGADO, S., GOROSTIDI-AICUA, M., SEPÚLVEDA, L., ALBERRO, A., IPARRAGUIRRE, L., SUÁREZ, J. A., ROMARATE, L., ARRUTI, M., MUÑOZ-CULLA, M., CASTILLO-TRIVIÑO, T. & OTAEGUI, D. 2022. Microbial dysbiosis and lack of SCFA production in a Spanish cohort of patients with multiple sclerosis. *Front Immunol*, 13, 960761.
- MONTONEN, J., KNEKT, P., JARVINEN, R., AROMAA, A. & REUNANEN, A. 2003. Whole-grain and fiber intake and the incidence of type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr*, 77, 622-9.
- MUNGER, K. L., ZHANG, S. M., O'REILLY, E., HERNAN, M. A., OLEK, M. J., WILLETT, W. C. & ASCHERIO, A. 2004. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology*, 62, 60-5.
- NOSEWORTHY, J. H., LUCCHINETTI, C., RODRIGUEZ, M. & WEINSHENKER, B. G. 2000. Multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 343, 938-52.
- OSTENDORF, F., METZDORF, J., GOLD, R., HAGHIKIA, A. & TONGES, L. 2020. Propionic Acid and Fasudil as Treatment Against Rotenone Toxicity in an In Vitro Model of Parkinson's Disease. *Molecules*, 25.
- POEKER, S. A., GEIRNAERT, A., BERCHTOLD, L., GREPPI, A., KRYCH, L., STEINERT, R. E., DE WOUTERS, T. & LACROIX, C. 2018. Understanding the prebiotic potential of different dietary fibers using an in vitro continuous adult fermentation model (PolyFermS). *Sci Rep*, 8, 4318.
- POST, R. E., MAINOUS, A. G., 3RD, KING, D. E. & SIMPSON, K. N. 2012. Dietary fiber for the treatment of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *J Am Board Fam Med*, 25, 16-23.
- RIISE, T., NORTVEDT, M. W. & ASCHERIO, A. 2003. Smoking is a risk factor for multiple sclerosis. *Neurology*, 61, 1122-U8.
- SADOVNICK, A. D., EBERS, G. C., DYMENT, D. A. & RISCH, N. J. 1996. Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group. *Lancet*, 347, 1728-30.
- SAKAGUCHI, S., YAMAGUCHI, T., NOMURA, T. & ONO, M. 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 133, 775-87.
- SALMINEN, S., BOULEY, C., BOUTRON-ROUAULT, M. C., CUMMINGS, J. H., FRANCK, A., GIBSON, G. R., ISOLAURI, E., MOREAU, M. C., ROBERFROID, M. & ROWLAND, I. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr*, 80 Suppl 1, S147-71.
- SAMPSON, T. R., DEBELIUS, J. W., THRON, T., JANSSEN, S., SHASTRI, G. G., ILHAN, Z. E., CHALLIS, C., SCHRETTTER, C. E., ROCHA, S., GRADINARU, V., CHESSELET, M.-F., KESHAVARZIAN, A., SHANNON, K. M., KRAJMALNIK-BROWN, R., WITTUNG-STAFSHED, P., KNIGHT, R. & MAZMANIAN, S. K. 2016. Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell*, 167, 1469-1480.e12.
- SCALFARI, A., NEUHAUS, A., DEGENHARDT, A., RICE, G. P., MURARO, P. A., DAUMER, M. & EBERS, G. C. 2010. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 10: relapses and long-term disability. *Brain*, 133, 1914-29.

- SHIRAI, R. & YAMAUCHI, J. 2022. New Insights into Risk Genes and Their Candidates in Multiple Sclerosis. *Neurol Int*, 15, 24-39.
- SMITH, P. M., HOWITT, M. R., PANIKOV, N., MICHAUD, M., GALLINI, C. A., BOHLOOLY-Y, M., GLICKMAN, J. N. & GARRETT, W. S. 2013. The Microbial Metabolites, Short-Chain Fatty Acids, Regulate Colonic Treg Cell Homeostasis. *Science*, 341, 569–573.
- SONNENBURG, J. L. & BÄCKHED, F. 2016. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature*, 535, 56–64.
- SWANK, R. L., LERSTAD, O., STRØM, A. & BACKER, J. 1952. Multiple sclerosis in rural Norway its geographic and occupational incidence in relation to nutrition. *The New England journal of medicine*, 246, 722-728.
- TAZOE, H., OTOMO, Y., KAJI, I., TANAKA, R., KARAKI, S. I. & KUWAHARA, A. 2008. Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. *J Physiol Pharmacol*, 59 Suppl 2, 251-62.
- THIRION, F., SELLEBJERG, F., FAN, Y., LYU, L., HANSEN, T. H., PONS, N., LEVENEZ, F., QUINQUIS, B., STANKEVIC, E., SØNDERGAARD, H. B., DANTOFT, T. M., POULSEN, C. S., FORSLUND, S. K., VESTERGAARD, H., HANSEN, T., BRIX, S., OTURAI, A., SØRENSEN, P. S., EHRlich, S. D. & PEDERSEN, O. 2023. The gut microbiota in multiple sclerosis varies with disease activity. *Genome Med*, 15, 1.
- TURNBAUGH, P. J., LEY, R. E., HAMADY, M., FRASER-LIGGETT, C. M., KNIGHT, R. & GORDON, J. I. 2007. The human microbiome project. *Nature*, 449, 804-10.
- VIGLIETTA, V., BAECHEER-ALLAN, C., WEINER, H. L. & HAFLE, D. A. 2004. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med*, 199, 971-9.
- VINOLO, M. A., RODRIGUES, H. G., NACHBAR, R. T. & CURI, R. 2011. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients*, 3, 858-76.
- VRIEZE, A., VAN NOOD, E., HOLLEMAN, F., SALOJARVI, J., KOOTTE, R. S., BARTELSMAN, J. F., DALLINGA-THIE, G. M., ACKERMANS, M. T., SERLIE, M. J., OOZEER, R., DERRIEN, M., DRUESNE, A., VAN HYLCKAMA VLIEG, J. E., BLOKS, V. W., GROEN, A. K., HEILIG, H. G., ZOETENDAL, E. G., STROES, E. S., DE VOS, W. M., HOEKSTRA, J. B. & NIEUWDORP, M. 2012. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*, 143, 913-6 e7.
- WAN, W., QIU, Y., HUANG, X., REN, Y., PENG, A. & YANG, C. 2023. Causal relationship between Butyricimonas and allergic asthma: a two-sample Mendelian randomization study. *Front Microbiol*, 14, 1190765.
- WEKERLE, H., ENGELHARDT, B., RISAU, W. & MEYERMANN, R. 1991. Interaction of T lymphocytes with cerebral endothelial cells in vitro. *Brain Pathol*, 1, 107-14.
- WESTIN, M. A. K., HUNT, M. C. & ALEXSON, S. E. H. 2008. Short- and medium-chain carnitine acyltransferases and acyl-CoA thioesterases in mouse provide complementary systems for transport of  $\beta$ -oxidation products out of peroxisomes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 982-990.
- WIENDL, H., GOLD, R., BERGER, T., DERFUSS, T., LINKER, R., MÄURER, M., AKTAS, O., BAUM, K., BERGHOF, M., BITTNER, S., CHAN, A., CZAPLINSKI, A., DEISENHAMMER, F., DI PAULI, F., DU PASQUIER, R., ENZINGER, C., FERTL, E., GASS, A., GEHRING, K., GOBBI, C., GOEBELS, N., GUGER, M., HAGHIKIA, A., HARTUNG, H. P., HEIDENREICH, F., HOFFMANN, O., KALLMANN, B., KLEINSCHNITZ, C., KLOTZ, L., LEUSSINK, V. I., LEUTMEZER, F., LIMMROTH, V.,

- LÜNEMANN, J. D., LUTTEROTTI, A., MEUTH, S. G., MEYDING-LAMADÉ, U., PLATTEN, M., RIECKMANN, P., SCHMIDT, S., TUMANI, H., WEBER, F., WEBER, M. S., ZETTL, U. K., ZIEMSEN, T. & ZIPP, F. 2021. Multiple Sclerosis Therapy Consensus Group (MSTCG): position statement on disease-modifying therapies for multiple sclerosis (white paper). *Ther Adv Neurol Disord*, 14, 17562864211039648.
- YANG, F., WU, S. C., LING, Z. X., CHAO, S., ZHANG, L. J., YAN, X. M., HE, L., YU, L. M. & ZHAO, L. Y. 2021. Altered Plasma Metabolic Profiles in Chinese Patients With Multiple Sclerosis. *Front Immunol*, 12, 792711.
- YATSUNENKO, T., REY, F. E., MANARY, M. J., TREHAN, I., DOMINGUEZ-BELLO, M. G., CONTRERAS, M., MAGRIS, M., HIDALGO, G., BALDASSANO, R. N., ANOKHIN, A. P., HEATH, A. C., WARNER, B., REEDER, J., KUCZYNSKI, J., CAPORASO, J. G., LOZUPONE, C. A., LAUBER, C., CLEMENTE, J. C., KNIGHTS, D., KNIGHT, R. & GORDON, J. I. 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486, 222-7.
- YISSACHAR, N., ZHOU, Y., UNG, L., LAI, N. Y., MOHAN, J. F., EHRLICHER, A., WEITZ, D. A., KASPER, D. L., CHIU, I. M., MATHIS, D. & BENOIST, C. 2017. An Intestinal Organ Culture System Uncovers a Role for the Nervous System in Microbe-Immune Crosstalk. *Cell*, 168, 1135-1148 e12.
- YOON, M. S., PITAROKOILI, K., STURM, D., HAGHIKIA, A., GOLD, R. & FISSE, A. L. 2018. Treatment of an acute motor and sensory axonal neuropathy with propionate in a 33-year-old male. *Ther Adv Neurol Disord*, 11, 1756286418809580.

## 7. Ehrenerklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; verwendete fremde und eigene Quellen sind als solche kenntlich gemacht. Ich habe insbesondere nicht wissentlich:

- Ergebnisse erfunden oder widersprüchlich Ergebnisse verschwiegen,
- statistische Verfahren absichtlich missbraucht, um Daten in ungerechtfertigter Weise zu interpretieren,
- fremde Ergebnisse oder Veröffentlichungen plagiiert,
- fremde Forschungsergebnisse verzerrt wiedergegeben.

Mir ist bekannt, dass Verstöße gegen das Urheberrecht Unterlassungs- und Schadensersatzansprüche des Urhebers sowie eine strafrechtliche Ahndung durch die Strafverfolgungsbehörden begründen kann.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die Arbeit ggf. mit Mitteln der elektronischen Datenverarbeitung auf Plagiate überprüft werden kann.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form als Dissertation eingereicht und ist als Ganzes auch noch nicht veröffentlicht.

Magdeburg, den 25.09.2024

Alexander Duscha