



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie  
und Toxikologie der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. Markus Schwaninger

---

# **Die Bedeutung von Telmisartan spezifischen Mikrobiomveränderungen für die Gewichtsreduktionseffekte vom Medikament**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der Sektion Medizin –

Vorgelegt von  
**Marco, Lorenzo Freschi**  
aus Würselen  
Lübeck 2025

1. Berichterstatter\*in: Prof. Dr. rer. nat. Walter Raasch  
Ko-Betreuer\*in: Prof. Dr. med. Karl-Friedrich Klotz  
2. Berichterstatter\*in: Prof. Dr. med. Jürgen Büning  
Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2025  
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 30.10.2025  
-Promotionskommission der Sektion Medizin-

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	5
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>8</b>
1.1 <i>Adipositas</i> .....	8
1.2 <i>Mikrobiom</i> .....	9
1.2.1 <i>Zusammensetzung</i> .....	9
1.2.2 <i>Variabilität, Einflussfaktoren und pathologische Veränderungen</i> .....	11
1.2.3 <i>Short chain fatty acids, SCFAs</i> .....	14
1.2.4 <i>Therapeutische Ansätze</i> .....	15
1.3 <i>RAS und Angiotensin Rezeptor Blocker</i> .....	16
1.3.1 <i>Das RAS und seine metabolischen Effekte</i> .....	16
1.3.2 <i>Wirkmechanismus</i> .....	17
1.3.3 <i>Telmisartan und das Mikrobiom</i> .....	19
1.4 <i>Fragestellung</i> .....	21
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>22</b>
2.1 <i>Tiere</i> .....	22
2.2 <i>Versuchsablauf</i> .....	22
2.3 <i>Applikationen</i> .....	24
2.3.1 <i>Orale Applikation</i> .....	24
2.3.2 <i>Intraperitoneale Applikation</i> .....	25
2.4 <i>Lösungen</i> .....	25
2.4.1 <i>Insulinlösung</i> .....	25
2.4.2 <i>Avertinlösung</i> .....	25
2.4.3 <i>Perfusionslösung</i> .....	25
2.4.4 <i>Formaldehyd</i> .....	26
2.5 <i>Fecal Microbiota Transfer (FMT)</i> .....	26
2.6 <i>Stuhlproben</i> .....	27
2.7 <i>Funktionstest</i> .....	28
2.7.1 <i>Indirekte Kalorimetrie</i> .....	28
2.7.2 <i>Messung der Körperzusammensetzung</i> .....	29
2.7.3 <i>Insulintoleranztest</i> .....	29
2.8 <i>Tötung und Organentnahme</i> .....	30
2.9 <i>Mikrobiom Analyse</i> .....	30
2.9.1 <i>DNA-Extraktion</i> .....	30
2.9.2 <i>PCR</i> .....	31
2.9.3 <i>Bibliothek Vorbereitung und Sequenzierung</i> .....	31
2.10 <i>Statistische und analytische Methoden</i> .....	34
2.10.1 <i>Prozessierung und Analyse der DNA-Sequenzierung</i> .....	34
2.10.2 <i>Statistische Auswertung</i> .....	35
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
3.1 <i>Körpergewicht und Körperzusammensetzung</i> .....	37
3.2 <i>Kalorimetrie</i> .....	39
3.2.1 <i>Energieverbrauch</i> .....	39
3.2.2 <i>Bewegungsaktivität</i> .....	39
3.2.3 <i>Fress- und Trinkverhalten</i> .....	40

3.3	<i>Insulintoleranztest</i> .....	42
3.4	<i>Mikrobiom</i> .....	43
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>53</b>
4.1	<i>Körpergewicht und Körperzusammensetzung</i> .....	53
4.2	<i>Aktivität, Energieverbrauch, Fress- und Trinkverhalten</i> .....	56
4.3	<i>Insulintoleranz</i> .....	57
4.4	<i>Mikrobiom</i> .....	59
4.5	<i>Methodik</i> .....	66
4.6	<i>Limitierungen</i> .....	67
4.7	<i>Fazit</i> .....	68
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>69</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>Anhänge</b> .....	<b>78</b>
	<i>Material und Geräte Liste</i> .....	78
<b>8</b>	<b>Danksagungen</b> .....	<b>80</b>

## Abkürzungsverzeichnis

- $\Delta$  Delta, Differenz
- $\text{\textcircled{R}}$  Registrierte Marke
- % Prozent
- $^{\circ}\text{C}$  Grad Celsius
- Abb. Abbildung
- ACE Angiotensin converting enzyme
- ACE II Angiotensin Converting Enzym 2
- ACTH Adrenocorticotropin
- AG Arbeitsgruppe
- Ang1-7 Angiotensin (1-7)
- AngI Angiotensin I
- AngII Angiotensin II
- ARB Angiotensin Rezeptor Blocker
- AT<sub>1</sub>R Angiotensin Rezeptor Subtyp I
- AUC Area under the curve, Oberfläche unter der Kurve
- BMI Body Mass Index
- Bp Basenpare
- ca. circa
- CED Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
- Cl<sup>-</sup> Chlor Anion
- CRC Kolorektal Karzinom
- CRH Corticotropin-releasing hormone
- d Day, Tage
- DMT2 Diabetes Mellitus Typ II
- DNA Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
- F/B Ratio Firmicutes to Bacteroides Ratio
- Fäzes<sub>HDF+Tel</sub> Fäzes von Tieren mit HFD Ernährung und Tel Behandlung

- Fäzes<sub>HDF+Veh</sub> Fäzes von Tiere mit HFD Ernährung und Veh Behandlung
- FMT Fecal microbiota transfer
- G Beschleunigungsgröße der Zentrifuge
- h Hour, Stunde
- H<sub>2</sub>S Schwefelwasserstoff
- HDL High density Lipoprotein
- HFD High fat diet
- HPA Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden
- IE Einheiten
- ITT Insulintoleranztest
- IVC Individuell ventilierte Käfige
- Kcal Kilokalorien
- Kg Kilogramm
- KG Körpergewicht
- kJ Kilojoules
- LIED Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie
- Log Logarithmus
- m Meter
- ml Milliliter
- mM milli Molar
- ms Millisekunde
- MW Mittelwert
- NES Nuclear export signals
- NIH National Institute of Health
- nM nano Molar
- NMDA N-Methyl-D-Aspartat
- OTU Operative Taxonomic Unit
- PCA Principal component analysis
- PCR Polymerase Chane Reaction

- pH Potential des Wasserstoffs
- pM pico Molar
- PPAR $\gamma$  Peroxisom Proliferator aktivierte Rezeptor  $\gamma$
- RAS Renin Angiotensin System
- rpm Revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
- SCFAs Short chain fatty acids, kurzkettige Fettsäuren
- SD Standard Abweichung
- TAE-Puffer TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
- Tel Telmisartan
- U Units
- V Volt
- Veh Vehikel
- W Woche
- ZNS Zentrales Nervensystem
- $\mu\text{g}$  Mikrogramm
- $\mu\text{l}$  Mikroliter
- $\mu\text{L}$  Mikroliter

# 1 Einleitung

## 1.1 Adipositas

Weltweit steigt die Inzidenz von Übergewicht und Adipositas stetig<sup>1</sup>. Das Phänomen ist nicht nur auf Industriestaaten begrenzt, sondern auch in Entwicklungsländern sehr präsent<sup>2</sup>. Definitionsgemäß liegt Übergewicht dann vor, wenn der Body Mass Index (BMI), das Verhältnis aus dem Körpergewicht in Kilogramm und dem Quadrat der Körpergröße in Metern ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ), einen Wert von  $25 \text{ kg}/\text{m}^2$  überschreitet. Ab einem Wert von über  $30 \text{ kg}/\text{m}^2$  spricht man von Adipositas, diese wird in Fünfer-Schritten in Grade unterteilt, bis zu einer maximalen Ausprägung von Adipositas permagna (Grad III) bei einem BMI von über  $40 \text{ kg}/\text{m}^2$ <sup>3</sup>. Der BMI ist ein sehr einfach zu berechnender Wert; dies ist wahrscheinlich der Grund für den häufigen Einsatz als Kriterium in Studien oder klinischen Scores und Klassifikationen. In der Einfachheit liegen aber auch die eventuellen Schwächen des Wertes, insbesondere wird die Körperzusammensetzung hinsichtlich magerer Masse und Körperfettanteil sowie die Körperfettverteilung nicht berücksichtigt. Der BMI ist jedoch, trotz Vereinfachung mancher Sachverhalte, weiterhin ein guter prädiktiver Wert für den Gesundheitszustand<sup>4</sup>.

Ein erhöhtes Körpergewicht wird mit zahlreichen Krankheiten in Verbindung gebracht; diese können in vier große Gruppierungen eingeteilt werden: metabolisch, psychisch, orthopädisch und neoplastisch. Bei der metabolischen Gruppe bezieht man sich auf verschiedene Auswirkungen von Adipositas auf die hormonellen und regulatorischen Achsen des Körpers. Diabetes Mellitus Typ II (DMT2) und Arterieller Hypertonus sind unter den bereits seit Jahrzehnten bekannten Krankheiten, die durch einen erhöhten BMI stark begünstigt werden<sup>5,6</sup>. Verschiedene psychische Krankheiten wie beispielsweise Depressionen<sup>7,8</sup>, Angststörungen<sup>9</sup> und kognitive Dysfunktionen<sup>10,11</sup> werden mit einem stark erhöhten BMI in Verbindung gebracht. In der dritten Gruppe werden die orthopädischen Konsequenzen eines stark erhöhten Körpergewichtes zusammengefasst. Die wahrscheinlich prominentesten Beispiele sind Knie- und

Hüftarthrosen<sup>12,13</sup>. Adipositas steht in Verbindung mit der Entwicklung von verschiedenen Neoplastischen Erkrankungen, hierfür wird unter anderem eine gesteigerte kontinuierliche Inflammationsreaktion verantwortlich gemacht<sup>14</sup>. Nicht von der Hand zu weisen sind also die extremen Auswirkungen von Adipositas auf die Gesundheit. So reduziert sich beispielsweise die Lebenserwartung bei übergewichtigen Nichtrauchern bei Frauen um 3,3 Jahre und bei Männern um 3,1 Jahre<sup>15</sup>. Bei einem BMI von über 30 kg/m<sup>2</sup> beträgt der Verlust 7,1 beziehungsweise 5,8 Jahre<sup>15</sup>.

Ein erhöhtes Körpergewicht kann im Grunde als Ausdruck eines Überschusses der dem Körper zugeführten Energie im Vergleich zu der verbrauchten Energie gesehen werden<sup>16,17</sup>. Komplexer sind jedoch die Ursachen und Mechanismen, die zur Energie-dysbalance führen. Auf den ersten Blick sind offensichtliche Ursachen zu nennen wie beispielsweise eine exzessive Energieaufnahme durch den Konsum stark prozessierter und dadurch oft kalorienreicher Lebensmittel<sup>18,19</sup> und ein reduzierter Energieverbrauch durch mangelnde körperliche Aktivität oder einen sesshaften Lebensstil<sup>20</sup>. Parallel konnte in den letzten Jahrzehnten gezeigt werden wie neben diesen Binsenweisheiten auch weniger offensichtliche Mechanismen eine Rolle in der Energiebalance spielen, unter anderem Schlafrhythmus, endokrine Disruptoren, genetische Faktoren, Medikamente und das Mikrobiom<sup>16,21</sup>. Die hier vorgelegte Dissertationsschrift wird sich insbesondere mit den zwei letzteren auseinandersetzen.

## 1.2 Mikrobiom

### 1.2.1 Zusammensetzung

Das humane Mikrobiom beschreibt die Summe aller Mikroorganismen, die innerhalb des menschlichen Körpers leben; dieses Ökosystem, welches in den letzten Jahren immer genauer erforscht wurde, besteht aus Bakterien, Eukaryonten, Archebakterien und Viren<sup>22</sup>. Besonderes Augenmerk wurde bei dieser Forschung aus zweierlei Gründen auf die Bakterien gelegt: erstens sind die Analyseverfahren etablierter und

standardisierter, zweitens überwiegen diese schlichtweg numerisch, je nach Studie und Vergleichsverfahren um 2 bis 5 dezimale Größenordnungen<sup>22,23</sup>. Die Schätzung der Anzahl an Bakterien im Mikrobiom änderte sich im Laufe der Jahre. Anfangs ging man von einem Wert von  $4 \times 10^{14}$  aus<sup>24</sup>. Neuere Forschungen zeigten einen 10 mal kleineren Wert von  $4 \times 10^{13}$ , was circa ein 1:1 Verhältnis zwischen Bakterien und somatischen Zellen ergeben würde<sup>23</sup>. Die Hauptlokalisationen der Mikroorganismen sind die Haut sowie die Schleimhäute; die höchste gemessene Organismendichte wird im Gastrointestinaltrakt erreicht, insbesondere im Colon, wo die Dichte  $10^{11}$  Bakterien per feuchtes Gramm Darminhalt beträgt<sup>22-24</sup>. In dieser Arbeit wird der Fokus auf das gastrointestinale bakterielle Mikrobiom gelegt. Falls nicht anders erwähnt, bezieht sich der Begriff Mikrobiom ausschließlich auf diesen Teil der mikrobiologischen Flora.

Die genaue Klassifikation der Vielfalt der Bakterien hat sich über die Jahre hinweg als äußerst komplex erwiesen, insbesondere aufgrund der schwierigen, teilweise unmöglichen Anzucht eines Großteiles der Mikroorganismen<sup>25</sup>. Mittels Anzucht unabhängiger, genombasierter Methoden konnte die große Vielfalt des Mikrobioms deutlich besser beleuchtet werden. In einer 2019 publizierten Arbeit konnten mittels Shotgun Analyse 533 bereits durch Anzucht bekannte Arten sowie potentielle bis 1952 nicht anzüchtbare Arten identifiziert werden, wovon nur etwa 60% einer bekannten Gattung zugewiesen werden konnten<sup>26</sup>. Der überwiegende Teil des intestinalen Mikrobioms gliedert sich in sechs Phyla, in absteigender Häufigkeit: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, und Verrucomicrobia<sup>27</sup>. Firmicutes, Bacteroidetes sind die zwei mit Abstand häufigsten Phyla und stellen über 95% der Gesamtheit da<sup>28</sup>. Das Verhältnis dieser beiden Phyla, bekannt als „Firmicutes to Bacteroidetes Ratio“, wird gerne genutzt, um einen Überblick über das Mikrobiom zu schaffen und ein eventuelles Ungleichgewicht der Darmflora, auch als Dysbiosis bezeichnet, aufzudecken<sup>29</sup>. Taxonomisch lassen sich innerhalb der Phyla Klassen, Ordnungen, Familien, Genera und Arten identifizieren. Das Genus Clostridien stellt 95% der Firmicutes dar, während die Genera Prevotella und Bacteroides den Großteil der Bacteroidetes ausmachen<sup>27</sup>. Bislang gibt es keine einfache oder standardisierte

Strategie die taxonomische Vielfalt des Mikrobioms zu beschreiben oder diese zu vergleichen<sup>30</sup>.

### 1.2.2 Variabilität, Einflussfaktoren und pathologische Veränderungen

Das humane Mikrobiom zeichnet sich durch eine enorme interindividuelle Vielfalt aus, dabei spielen viele physiologische sowie pathologische Faktoren eine wichtige Rolle<sup>27</sup>. Die Darmflora wird von Geburt an geformt. Während der Gestation ist der Darm steril, der erste Kontakt und die darauf folgende Kolonisation mit Mikroorganismen findet bei der Geburt statt<sup>31</sup>. Entsprechend prägt die Form der Entbindung auch das Mikrobiom. In Neugeborenen, die mittels Vaginalgeburt auf die Welt gekommen sind, finden sich im Mikrobiom für das Scheidenmilieu typischen Bakterien-Taxa wie *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Atopobium*, oder *Sneathia*; bei Neugeborenen, die mittels Kaiserschnitt entbunden wurden, fehlen diese Bakterien, während typische Hautkeime wie Staphylokokken im Mikrobiom zu finden sind<sup>32</sup>. Die Ernährung in der Säuglingszeit ist ähnlich prägend. Bei einer Muttermilchersatzernährung finden sich im Mikrobiom deutlich mehr *Escherichia coli*, *Clostridium difficile* und *Bacteroides fragilis* im Vergleich zu Kindern, die mit Muttermilch gestillt wurden<sup>33</sup>. Analog dazu spielen auch das Gestationsalter und die postnatale Hospitalisationsdauer eine entscheidende Rolle in der Mikrobiomzusammensetzung<sup>33</sup>. Das kindliche Mikrobiom ist bis zum Alter von etwa 3 Jahren sehr variabel, wo es sich dann stabilisiert, über die folgende Lebensdauer relativ konstant bleibt und als erwachsenes Mikrobiom bezeichnet wird<sup>27</sup>. Die Einflüsse im frühen Kindesalter prägen ein Leben lang das Mikrobiom und sind ein wichtiger Faktor für die langfristige Gesundheit der Darmflora<sup>34,35</sup>.

Der Lebensstil und die Lebensumstände wie Ernährung, Lebensort, körperliche Aktivität oder der BMI können sich auf das erwachsene Mikrobiom auswirken<sup>36</sup>. Eine ballaststoffreiche Ernährung korreliert mit einer erhöhten Präsenz des Genus *Prevotella*, während der Umstieg von einer vegetarischen Ernährung auf eine auf Tierprodukten basierten Ernährung mit einer signifikanten Reduktion vom Genus *Prevotella* einhergeht<sup>37</sup>. Ein Vergleich zwischen dem Mikrobiom von Kindern aus

Burkina Faso und Italien zeigte bei den ersteren einen deutlich erhöhten Anteil an Bacteroidetes und Actinobacteria (57.7% gegen 22.4% und 10.1% gegen 6.7% jeweils) und einen reduzierten Anteil an Firmicutes und Proteobacteria (63.7% gegen 27.3% und 6.7% gegen 0.8% jeweils) und damit eine deutliche Differenz in der „Firmicutes to Bacteroidetes Ratio“<sup>38</sup>. Der Unterschied kann laut Studie auf die deutlich ballaststoffreichere Ernährung in Burkina Faso sowie geographisch bedingte bakterielle Umweltfaktoren zurückgeführt werden<sup>38</sup>. Körperliche Aktivität beeinflusst maßgeblich die metabolische Gesundheit<sup>39</sup>, parallel wirkt sich diese auch auf das Mikrobiom aus wie im Tierversuch<sup>40</sup> und beim Menschen<sup>41</sup> beobachtet werden konnte. Regelmäßige körperliche Aktivität korreliert mit einer erhöhten bakteriellen Diversität sowie vergrößertem Firmicutes-Anteil im Mikrobiom<sup>42</sup>.

Der Zusammenhang zwischen BMI und Mikrobiom ist schwer zu beschreiben, da sich die Ergebnisse je nach Studie deutlich unterscheiden. In einer 10 Studien umfassenden Metaanalyse konnte lediglich eine signifikante aber nach Auffassung der Autoren biologisch wahrscheinlich nicht relevante Diversitätsreduktion bei erhöhten BMI beobachtet werden, während die Unterschiede in der taxonomischen Zusammensetzung sich als nicht signifikant herausstellten<sup>43</sup>. Dieses Ergebnis steht aber in deutlichem Kontrast zu anderen Arbeiten, die eine klare Korrelation zwischen erhöhtem BMI und Diversitätsreduktion des Mikrobioms zeigen konnten<sup>44</sup> sowie eine Anreicherung an Firmicutes bei Adipositas<sup>45</sup>. Wie genau diese Daten zu interpretieren sind, ist schwer zu sagen. Sehr wahrscheinlich besteht ein enger Zusammenhang zwischen Mikrobiom und Adipositas; dieser wird aber durch die große interindividuelle Variabilität sowie durch funktionale Veränderungen im Mikrobiom teilweise maskiert<sup>43</sup>. Ein möglicher Hinweis für diese These sind die Unterschiede in der individuellen Mikrobiomzusammensetzung vor und nach einem signifikanten Gewichtsverlust, obgleich die Beobachtungen je nach Studie variieren und nicht immer miteinander im Einklang stehen<sup>46</sup>.

Mikrobiomveränderungen konnten bei einer Vielzahl von intestinalen sowie extra-intestinalen Krankheiten beobachtet werden. Besonders interessante Beispiele sind chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED), DMT2, metabolisches Syndrom,

Alzheimer, Morbus Parkinsons und Kolorektales Karzinom (CRC)<sup>27</sup>. Bei den CED kann eine deutliche Dysbiose beobachtet werden; einerseits ist die taxonomische Diversität reduziert und parallel dazu sind Proteobakterien wie Enterobacteriaceae, Bilophila und einige Mitglieder der Bacteroidetes vermehrt vertreten<sup>47</sup>. Im Tierversuch konnte beobachtet werden wie eine Veränderung des Mikrobioms der Darmschleimhaut das Entstehen einer symptomatischen CED vorhersagt<sup>48</sup>. Es stellt sich hier die Frage nach der Henne und dem Ei, denn, ob es sich bei der Dysbiose um die Ursache der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen handelt oder ob der Entzündungsprozess das Mikrobiom verändert, konnte noch nicht ausreichend geklärt werden<sup>47</sup>.

Eine positive Korrelation zwischen DMT2 und den Genera Ruminococcus, Fusobacterium und Blautia konnte beobachtet werden, während eine erhöhte Präsenz der Genera Bacteroides und Bifidobacterium als protektiver Faktor gelten<sup>49</sup>. Verschiedene Mechanismen für die Interaktion zwischen Mikrobiom und DMT2 wurden vermutet, insbesondere die Modulation von Entzündungsprozessen, die Veränderung der intestinalen Permeabilität sowie eine direkte Auswirkung auf den Glukosemetabolismus in Leber, Fett- und Muskelgewebe<sup>49-51</sup>. Das Mikrobiom scheint auch eine wichtige Rolle für die Gesundheit des zentralen Nervensystems zu spielen, insbesondere konnte bei Morbus Parkinson im Vergleich zum Gesunden eine erhöhte Diversität im Mikrobiom beobachtet werden<sup>52</sup>. Bei Morbus Alzheimer Patienten konnte hingegen eine Reduktion der Diversität des Mikrobioms beobachtet werden, sowie eine Verbesserung der Symptome nach gezielter Modulation der Darmflora mit Probiotika oder Antibiotika<sup>53</sup>. Mikrobiomveränderungen konnten auch bei CRC Patienten beobachtet werden. Im Vergleich zu gesunden Probanden zeigten CRC Patienten eine Erhöhung der Mikrobiom Diversität, welche maßgeblich durch eine Vermehrung opportunistisch pathogener Arten bedingt ist<sup>27</sup>. Fusobacterium nucleatum und die von dieser Art vermittelte Entzündungsreaktion spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung vom CRC<sup>54</sup>.

Die Vielfalt des Mikrobioms und die damit verbundenen pathologischen Auswirkungen lassen sich nur schwer überblicken und zusammenfassen. Wie an den

oben beschriebenen Beispielen zu sehen, können sowohl eine deutliche Dysbiosis als auch einzelne Arten eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielen<sup>55</sup>.

### 1.2.3 Short chain fatty acids, SCFAs

Das Mikrobiom produziert durch Fermentation des Darminhalts eine große Anzahl an Metaboliten, die mittels enteraler Aufnahme in den Wirtsorganismus gelangen und Effekte auf dessen Metabolismus, das Immunsystem oder die Genexpression in einzelnen Geweben haben können<sup>56</sup>. Die kurzkettigen Fettsäuren (Short chain fatty acids, SCFAs) sind die häufigsten durch Fermentation produzierten Metabolite<sup>56</sup>. Es handelt sich um gesättigte sowie ungesättigte Fettsäuren, die weniger als sechs Kohlenstoffatome in ihrer Kette haben; Ethansäure ( $C_2H_4O_2$ ), Propansäure ( $C_3H_6O_2$ ), Butansäure ( $C_4H_8O_2$ ) stellen über 90% der synthetisierten Fettsäuren da<sup>57</sup>. Die SCFAs haben sehr weitreichende Effekte, welche den Glukose-, Fett- und Cholesterolfstoffwechsel beeinflussen, direkt indem sie als Substrat dienen oder indirekt indem sie entsprechende Rezeptoren und Kaskaden aktivieren<sup>58</sup>. Die Rolle von SCFAs in der Regulation von systolischem und diastolischem Blutdruck sowie der Blutzuckerhomöostase konnte identifiziert werden<sup>59</sup>. Im Rahmen eines in-vitro Versuches mit verschiedenen Mikrobiom typischen Bakterienphyla konnte gezeigt werden, dass die produzierten SCFAs maßgeblich durch die Zusammensetzung der Bakterienpopulationen bestimmt werden<sup>60</sup>. Ethansäure und Propansäure sind die primären Metabolite der Bacteroides während Butansäure hauptsächlich bei der Fermentation der Firmicutes umgesetzt wird<sup>58</sup>. Die Interaktionen zwischen Mikrobiom, den Metaboliten insbesondere SCFAs und dem Organismus sind nicht unilateral, vielmehr beeinflussen sich diese Elemente gegenseitig. Ein gutes Beispiel für diese Bidirektionalität sind die Beobachtungen des intraluminalen pH Werts. Auf der einen Seite war im Vergleich zu pH 6,5 bei einem pH Wert von 5,5 eine Vervierfachung der synthetisierten Menge an Butansäure zu beobachten, was maßgeblich auf die Veränderungen der Mikrobiomzusammensetzung in Abhängigkeit des intraluminalen pHs zurückgeführt wurde<sup>61</sup>. Auf der anderen Seite senkte die Produktion von SCFAs

ihrerseits den pH, was sich wiederum auf das Mikrobiom und die davon abhängige Synthese von Fettsäuren auswirkte<sup>58</sup>. Die Resorption der SCFAs sorgte für eine Bikarbonat Sekretion ins intestinale Lumen, was wiederum das Milieu in eine alkalische Richtung verändert<sup>62</sup>.

Die SCFA spielen auch eine wichtige Rolle in der Energiehomöostase des Körpers. Verschiedene Wirkmechanismen wurden beobachtet, als Beispiel seien hier die Erhöhung der anorektischen Hormone Glucagon-like-peptide 1 und Peptide YY<sup>63</sup> sowie eine Acetat vermittelte Veränderung des Appetits und damit der Nahrungsaufnahme über die Hypothalamische Achse<sup>64</sup> genannt. Obgleich die Rolle der SCFAs noch nicht komplett verstanden ist, kann man sagen, dass die SCFAs eine sehr wichtige Schnittstelle zwischen dem Mikrobiom und dem Wirtsorganismus darstellen.

#### 1.2.4 Therapeutische Ansätze

Die vielfältigen Effekte des Mikrobioms auf den Organismus sowie die vielen durch Dysbiosis gekennzeichneten Krankheitsbilder bieten ein enormes Potenzial für neue therapeutische Ansätze. Eine bereits etablierte und im klinischen Alltag angewandte Methode ist die Stuhltransplantation oder im Englischen Fecal Microbiota Transfer (FMT). Hierbei wird Fäzes von geeigneten Spendern gesammelt, als Suspension aufbereitet und entweder oral oder rektal verabreicht, mit dem Ziel die Dysbiosis des Empfängers zu korrigieren<sup>65</sup>. Obgleich die Therapieprotokolle in den verschiedenen Studien stark voneinander abweichen, zeigen die Interventionen bei der Behandlung von Clostridium difficile assoziierten pseudomembranösen Colitis, sehr gute Ergebnisse bei minimalen oder nicht vorhandenen Nebenwirkungen<sup>66</sup>.

Die Nutzung der FMT als Therapie für andere Krankheiten liegt zumindest in der Theorie auf der Hand: aktuell steckt jedoch die FMT Behandlung von DMT2 sowie Adipositas noch in den Kinderschuhen<sup>67</sup>. Im Tiermodell konnten bereits signifikante Verbesserungen der Insulinsensitivität sowie Gewichtssenkungen nach FMT von normalgewichtigen Spendern beobachtet werden<sup>68</sup>. Die Ergebnisse in der Gewichtsreduktion aus dem Tiermodell konnten im Menschen in verschiedenen

Arbeiten bislang nicht repliziert werden<sup>69,70</sup>. Vrieze et al. zeigte im humanen Versuch, dass eine Gruppe DMT2 Patienten, die eine FMT von normalgewichtigen gesunden Spendern bekommen hatten, nach sechs Wochen eine signifikant verbesserte Insulinsensitivität hatten, im Vergleich zu DMT2-Patienten, die Eigenstuhlproben als Transplantation erhalten hatten<sup>71</sup>.

Ein entscheidender Faktor in der Therapie ist der Stuhl selbst und dessen spezifische mikrobiologische Zusammensetzung; entsprechend ist die Wahl eines geeigneten Spenders ein zentraler Aspekt<sup>72</sup>. Diese These wird auch durch die Beobachtungen beim Einsatz von FMT in der experimentellen Behandlung von CED gefestigt. Die Empfänger von Proben spezifischer Spender zeigten deutlich höhere Remissionsraten im Vergleich zu der gesamten Behandlungsgruppe; dieser Effekt wurde als Super Donor Phänomen bezeichnet<sup>73</sup>.

In der aktuellen klinischen Praxis wird vermehrt auf gesunde Spender gesetzt, diese werden einem ausgiebigen Screening unterzogen, um das Risiko für die Übertragung von Infektionskrankheiten zu reduzieren<sup>74</sup>. Es fehlen jedoch noch das Wissen und die Methodik, um gezielt Spender auf Basis ihres Mikrobioms auszuwählen, was in der näheren Zukunft ganz neue therapeutische Ansätze ermöglichen könnte<sup>72,75</sup>.

## 1.3 RAS und Angiotensin Rezeptor Blocker

### 1.3.1 Das RAS und seine metabolischen Effekte

Die RAS (Renin-Angiotensin-System) Achse spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation des Blut- und Nierenperusionsdrucks. In seiner einfachsten Form wird in den Juxtaglomerularen Zellen, die sich um die Vas afferent der Glomeruli befinden, Renin freigesetzt; dieses spaltet Angiotensin zur Vorläuferstufe Angiotensin I (AngI), welches dann von der unter anderem in der Plasmamembran von Endothelzellen verankerten Angiotensin Konvertase (ACE) zum aktiven Hormon Angiotensin II (AngII) gespalten wird<sup>76</sup>. Die Renin-Ausschüttung wird aktiviert durch das Senken des

Perfusionsdrucks in den Arteriolen der Niere mittels Verminderung der in der Macula densa gemessenen  $\text{Cl}^-$  Konzentration und durch direkte sympathische Stimulation, während AngII im Sinne eines negativen Feedbacks die Ausschüttung von Renin hemmt<sup>76</sup>. AngII hat eine Vielzahl an verschiedenen Effekten; der grundlegendste ist die Vasokonstriktion durch die Aktivierung des Angiotensin Rezeptor Subtyp I ( $\text{AT}_1\text{R}$ ) erfolgt, welche zur einer Steigerung des systemischen Blutdruckes führt<sup>76</sup>. Die RAS-Achse ist demzufolge ein gutes Ziel für antihypertensive Medikamente. Die wichtigsten Vertreter sind die ACE Hemmer und Angiotensin Rezeptor Blocker (ARB)<sup>77</sup>. In dieser Arbeit wird der Fokus auf letztere gelegt insbesondere auf den ARB Telmisartan (Tel). Die Effekte der RAS-Achse beschränken sich aber nicht nur auf die Regulation des Blutdruckes. Kintscher et al. beobachtete darüber hinaus in Patienten mit metabolischem Syndrom, nach 9-monatiger Irbesartan Therapie, eine Verbesserung metabolischer Parameter wie dem HDL Cholesterin und Triglycerid Werten, dem Nüchternglukosespiegel sowie eine Reduktion des abdominalen Fettgewebes<sup>78</sup>. Diese Ergebnisse konnten im Tiermodell eindeutig bestätigt werden, insbesondere wurde nach ARB-Therapie eine Reduktion des Körpergewichts sowie eine Verbesserung der metabolischen Parameter beobachtet, obgleich sich die Kalorienanzahl der aufgenommenen Nahrung nicht von der der Kontrollgruppe unterschied<sup>79,80</sup>. Die Effekte konnten nur unter ARB-Hochdosis-Therapie beobachtet werden<sup>79</sup>. Im Rahmen jener Arbeiten wurde auch beobachtet, dass die metabolischen Effekte von Tel unabhängig von der Reduktion des systemischen Blutdruckes sind, insbesondere zeigten die Versuchsgruppen, die anstatt von hochdosiertem Tel mit einer äquivalenten Dosis Amlodipin oder einer Kombination aus Amlodipin plus Tel behandelt wurden, keine signifikante Veränderung der metabolischen Parameter<sup>80</sup>.

### 1.3.2 Wirkmechanismus

Verschiedene Wirkmechanismen für den antiadipositas Effekt von Tel konnten identifiziert werden: Leptin<sup>80-82</sup>, ACE2/Angiotensin (1-7)/Mas<sup>83</sup>, einer Interaktion

zwischen dem RAS und der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden Achse<sup>84</sup> sowie Veränderungen im Mikrobiom<sup>85</sup> und der Gastrointestinalen Schleimschicht<sup>86</sup>.

Das erstmals 1994 entdeckte Hormon Leptin spielt unter anderem eine wichtige Rolle in der Regulation der Nahrungsaufnahme, des Körpergewichtes und der Lipolyse<sup>87</sup>. Zuckerratten, welche durch genetische Manipulation eine Leptin Resistenz aufwiesen, sprachen nicht auf die hochdosierte ARB-Therapie an<sup>79</sup> was die Vermutung stützt, das Leptin eine wichtige Rolle für den Wirkmechanismus spielt. In einer späteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich bei einer HFD bedingten Adipositas eine Leptinresistenz bildet; unter hochdosierter Tel-Therapie bleibt das Körpergewicht normal sowie die Leptinsensibilität erhalten trotz hochkalorischer Ernährung<sup>80</sup>. War die Leptinpenetration über die Blut-Hirnschranke bei Adipositas vermindert, konnte man unter einer Tel-Therapie eine normalisierte Leptinpenetration über die Blut Hirn Schranke sowie eine normalisierte Leptinsensibilität beobachten<sup>81,82</sup>. Einen direkten Effekt von ARB auf die Blut-Hirnschranke konnte nicht beobachtet werden, weder in Vitro Zellkulturen noch im in Vivo im Tiermodell<sup>82</sup>. Die erhaltene Leptin Sensibilität sowie die normale Permeabilität von Leptin über die Blut-Hirnschranke, wie sie auch bei normalem Körpergewicht zu beobachten ist, scheinen eher die Konsequenz des antiadipositas Effektes von Tel zu sein als die Ursache für diesen<sup>82</sup>.

Die Verbesserung der metabolischen Parameter sowie die Gewichtsreduktion nach Tel Behandlung konnten auch in AT<sub>1</sub>R Knockout Mäusen beobachtet werden, was die Hypothese stützt, dass der Wirkmechanismus unabhängig vom AT<sub>1</sub>R ist<sup>88</sup>. Zudem existieren Befunde, dass erhöhtes AngII selbst antiadipös wirkt<sup>89,90</sup>. Dies lässt die Frage nach einem alternativen AT<sub>1</sub>R-unabhängigen Mechanismus aufkommen. In der RAS-Achse stellt Angiotensin (1-7) (Ang1-7) einen fundamentalen Gegenspieler zum AngII dar. Dieses Peptid entsteht primär durch die Spaltung von AngII durch Angiotensin Converting Enzym 2 (ACE 2) und wirkt in erster Linie über den G-protein gekoppelten Mas Rezeptor antagonistisch zu AngII<sup>91</sup>. Bei der ARB-induzierten AT<sub>1</sub>R-Blockade wurden im Tierversuch steigende Ang1-7 Plasmaspiegel beobachtet<sup>92</sup>. So gilt es in der Zwischenzeit als etabliert, dass Ang1-7 protektive kardiovaskuläre, metabolische und antiadipöse Effekte besitzt<sup>93,94</sup>. Im Tierversuch wurde der Tel-induzierte

Gewichtsverlust durch die simultane Verabreichung des Mas Rezeptor Antagonisten A779 partial antagonisiert<sup>83</sup>. Diese Befunde legen die Hypothese nahe, dass der antiadipöse Effekt unter Tel zumindest teilweise auf einem ACE II/Ang1-7/Mas Rezeptor Regelkreis basiert<sup>83</sup>.

Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden Achse (HPA-Achse aus dem Englischen hypothalamic-pituitary-adrenal ) ist ein zentraler Regelkreis, welcher unter anderem das Immunsystem, die Gestation, sowie Stressreaktionen beeinflusst<sup>95</sup>. Die Achse besteht aus einem komplexen Regelkreis aus positiven und negativen Feedback-Mechanismen, welche über die Freisetzung von Corticotropin-releasing hormone (CRH) aus dem Hypothalamus die Ausschüttung von Adrenocorticotropin (ACTH) in der Hypophyse stimuliert, was wiederum die Freisetzung von Corticosteroiden in der Nebennierenrinde fördert<sup>95</sup>. Zwischen der HPA-Achse und dem RAS bestehen verschiedene Interaktionen, beispielsweise zeigt sich eine Verbesserung von Stress assoziierten Krankheitsbildern wie Angststörungen bei ARB-Therapie<sup>96</sup>. Der vermutete Wirkmechanismus basiert auf der Modulation von AT<sub>1</sub>R im ZNS, insbesondere in Schlüsselregionen der HPA-Achse<sup>96</sup>. Die HPA-Achse spielt wiederum eine entscheidende Rolle bei der Regulation der aufgenommenen Nahrung, insbesondere werden bei einer vermehrten HPA-Achsen Aktivierung kalorienreiche, fetthaltige Lebensmittel bevorzugt<sup>97</sup>. Der Einfluss von Stress und einer Tel-Behandlung auf das Fressverhalten wurde experimentell von Gustaityte et al. untersucht. Hier zeigte sich wiederum ein ausgeprägter Effekt von Tel auf das Körpergewicht, jedoch nur ein marginaler Effekt auf die HPA-Achse nach Stressexposition, was vermuten lässt, dass die Regulation der HPA-Achse nur eine untergeordnete Rolle für die ARB-induzierte Gewichtsreduktion spielt<sup>84</sup>.

### 1.3.3 Telmisartan und das Mikrobiom

Im Rahmen der Arbeit von Beckmann et al., wurde die Interaktion von Mikrobiom, Tel und einer hochkalorischen Diät analysiert<sup>85</sup>. Zwei Versuchsgruppen hatten freien Zugang zu hochkalorischer Nahrung. Eine davon wurde täglich mit einer hochdosierten

Gabe von Tel behandelt, während die andere Gruppe Vehikel (Veh) erhielt. Parallel erhielt eine dritte Gruppe an Tieren die exakt gleiche Nahrungsmenge wie die Tel behandelten Tiere („perfeed“ Gruppe). Eine Kontrollgruppe erhielt Normdiät. Sowohl die perfeed Tiere als auch die Normdiät Kontrollen wurden mit Veh behandelt.

Die hochkalorisch gefütterten, Tel behandelten Tiere ebenso wie die perfeed-Kontrollen blieben normalgewichtig. Während die Ratten mit freiem Zugang zur hochkalorischen Kost eine Adipositas entwickelten<sup>85</sup>.

Primärziel der Beckmann Arbeit war die Analyse des Mikrobioms. Deutliche Unterschiede in der Alpha- und Beta-Diversität zeigten sich jeweils zwischen den Zeitpunkten vor und nach der medikamentösen Intervention innerhalb einer Versuchsgruppe und zwischen den Versuchsgruppen nach Intervention. Die Tel behandelten Tiere unterschieden sich deutlich in der taxonomischen Analyse sowohl von den adipösen Veh Kontrollen, der normalgewichtigen „perfeed“ als auch von den schlanken Normdiät Kontrollen. Im weiterführenden Random forest classifier und Netzwerkanalysen konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass die Tel behandelten Tiere eine spezifische, klar identifizierbare Signatur des Mikrobioms aufwiesen<sup>85</sup>. In anderen Worten eine Tel Behandlung führte zu einem spezifischen Mikrobiom, welches unabhängig von der Art der Nahrung und des Körpergewichts ist. Eine deutliche Assoziation zwischen der Zusammensetzung des Mikrobioms und der gastrointestinalen Schleimschicht konnte in verschiedenen Versuchen gezeigt werden<sup>98</sup>. In einer weiteren Arbeit unserer Forschungsgruppe konnte beobachtet werden wie eine hochkalorische Ernährung zu einer Reduktion der Dicke der gastrointestinalen Schleimschicht führte<sup>86</sup>. Kontraintuitiv wird unter Tel Therapie eine noch stärkere Reduktion der Schleimschicht beobachtet, die Rolle dieses Effekt für die antiadipöse Wirkung des Medikaments ist jedoch noch nicht komplett verstanden<sup>86</sup>.

## 1.4 Fragestellung

Das zentrale Ziel dieser Arbeit ist es, die Tel induzierte Mikrobiom-Signatur durch einen alternativen methodischen Ansatz zu bestätigen. Als Alternativ-Methode wählten wir den fekalen Mikrobiomtransfer (FMT). Auf diese Weise sollten die Bedingungen aus der Beckmann Studie<sup>85</sup>, d.h. hochkalorisch gefütterte Tiere mit einem Tel spezifischen Mikrobiom, repliziert werden, ohne dass die Tiere selbst mit Tel behandelt wurden. Auf diese Weise konnte untersucht werden, ob (und wenn ja wie) Tel das Mikrobiom verändert und dadurch die Gewichtsentwicklung beeinflusst. Parallel wurde in der Kontrollgruppe, nach dem gleichen Prinzip, das Mikrobiom von HFD Tieren welche mit Veh behandelt wurden repliziert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tiere

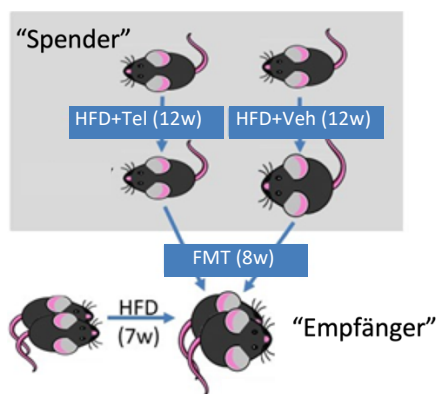
Die Tierexperimente wurden nach den NIH-Rechtlinien für den Umgang mit Labortieren durchgeführt. Die Versuche wurden durch das Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein genehmigt (Versuchsnummer: 86-9/18).

Für die Experimente wurden 24 männliche C57/Bl6 N Mäuse von Züchter Charles River verwendet. Die Tiere waren bei der Lieferung 6 Wochen alt und hatten ein Körpergewicht von 22,0 g (SD = 1,1 g). Zwei Wochen vor Versuchsbeginn wurden die Tiere in die Tierhaltung eingeschleust, um eine Adaptation an die Haltungsbedingungen zu gewährleisten. Die Mäuse wurden zu viert in individuell ventilierten Käfigen (IVC) mit einer Fläche von 500 cm<sup>2</sup> gehalten. Alle Tiere wurden für die gesamte Dauer des Versuches in klimatisierten Räumlichkeiten (offene Tierhaltung) untergebracht. Der Aufenthaltsraum sowie die Räume in denen einzelne Versuche durchgeführt wurden, unterlagen den gleichen Bedingungen; eine konstante Temperatur von circa 21°C, einer Luftfeuchtigkeit von 40-60% und einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus. Die Hellphase war von 6 bis 18 Uhr und die Dunkelphase von 18 bis 6 Uhr festgelegt.

### 2.2 Versuchsablauf

Der Versuch war in zwei Phasen mit jeweiliger Dauer von 7 bzw. 8 Wochen gegliedert. Zu Beginn des Versuches wurden die Tiere zufällig einer von zwei Versuchsgruppen a 12 Individuen zugeordnet. Eine gegenseitige Beeinflussung der Darmflora zusammenlebender Tiere ist bekannt<sup>99</sup>, entsprechend befanden sich in jedem Käfig nur Tiere einer gleichen Versuchsgruppe, um mögliche, ungewollte Interaktionen zu verhindern. Über die ganze Dauer des Versuches hatten die Tiere freien Zugang zu Futter und Trinkwasser. Mit Versuchsstart erhielten die Versuchsgruppen eine hochkalorische fetthaltige Diät (High Fat Diet, HFD). Die Nahrung (60% KJ Fat Lard) von der SSMIFF

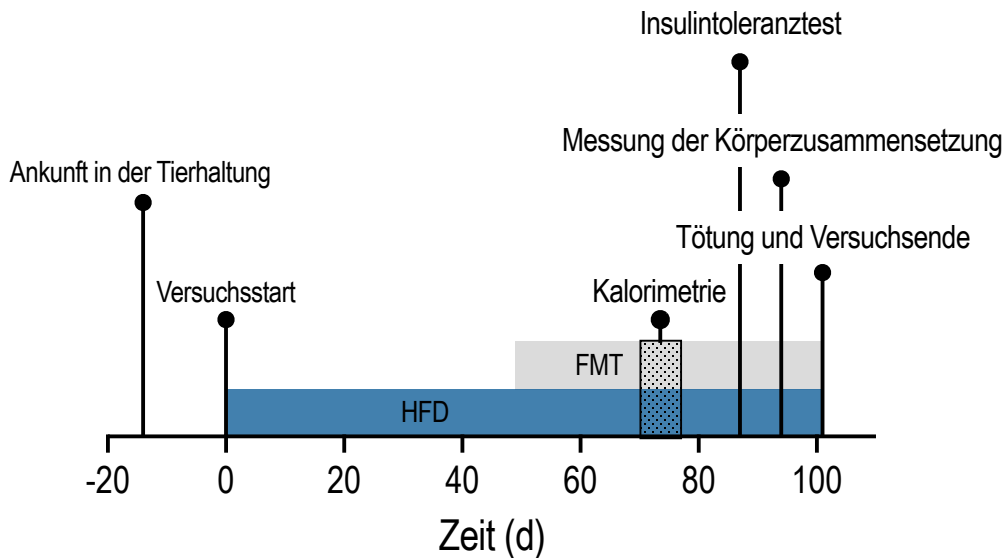
Spezialdiäten GmbH hat einen Nährwert von 25 kJ/g (60% Fett, 20% Protein und 20% Kohlenhydrate). Die Versuchstiere wurden während des gesamten Zeitraums des Experiments dreimal pro Woche gewogen (Montag, Mittwoch und Freitag). In den ersten sieben Wochen des Versuchs stand die Ernährungsumstellung der Versuchsgruppen im Vordergrund mit dem Ziel bei den Tieren eine deutliche Adipositas zu induzieren. In den darauffolgenden acht Wochen wurde der Einfluss von einem Tel spezifischen Mikrobiom auf das Körpergewicht und den Metabolismus von übergewichtigen Tieren untersucht. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde ein FMT durchgeführt, um das Mikrobiom gezielt zu verändern (genaueres dazu im Abschnitt 2.5 Fecal Microbiota Transfer). Für diese Prozedur wurden Stuhlproben von zwei verschiedenen Versuchsgruppen aus einer vorherigen Studie als Spender verwendet (Abb. 1). In dieser Arbeit wurden die Versuchstiere mit einer HFD gefüttert und wurden mit  $5 \mu\text{l/g}_{\text{KG}}$  einer 10% Suspension aus Gummi Arabicum (Veh) oder mit  $8\text{mg/Kg}_{\text{KG}}$  Tel behandelt<sup>100</sup>.



**Abbildung 1** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. In Grau sind die Spendertiere und das Therapieregime aus der Huber et al. Studie<sup>100</sup> aufgeführt, d.h. diese Mäuse erhielten HFD und wurden entweder mit Tel oder Veh behandelt. In Weiß sind die Empfängermäuse dargestellt, die vor FMT, 7 Wochen lang mit HFD gefüttert wurden.

Nach FMT wurden die Tiere verschiedenen funktionellen Tests unterzogen, und zwar einer indirekten Kalorimetrie, einer Messung der Körperzusammensetzung und einem Insulintoleranztest (ITT).

Am Ende der achten Wochen wurden die Tiere getötet und die Organe entnommen. Im Laufe des Versuches und im Rahmen der Tötung wurden Stuhlproben gesammelt, um das gastrointestinale Mikrobiom zu analysieren (siehe 2.6 Stuhlproben).



**Abbildung 2** Zeitlicher Ablauf des Versuches in Tagen. Der blaue Balken stellt die Dauer der HFD Fütterung da, der graue Balken die Dauer der FMT Intervention; markiert ist auch die Dauer und der Zeitpunkt der Kalorimetrie.

## 2.3 Applikationen

### 2.3.1 Orale Applikation

Die orale Applikation, wurde mittels einer starren und stumpfen Sonde, die über den Mund in den Oesophagus vorgeschoben wurde, durchgeführt. Die Tiere wurden für diese Operation in einer Hand komplett fixiert. Über die eingeführte Sonde wurde mittels einer 1ml Insulinspritze (Braun) ein festes, vom Körpergewicht unabhängigen Volumen von 150  $\mu$ l intragastral verabreicht für den FMT (genauerer dazu im Abschnitt 2.5 Fecal Microbiota Transfer).

### 2.3.2 Intraperitoneale Applikation

Die Tiere wurden für diese Applikation in einer Hand fixiert, der Kopf wurde nach unten und der Unterbauch nach oben gedreht. Die Bauchdecke wurde im unteren rechten Quadranten mit einer 30G x 12 mm Nadel (Braun) punktiert. Die zu verabreichende Substanz wurde mittels einer Insulinspritze (Braun) verabreicht. Diese Methode wurde für die Applikation von Insulin bei dem ITT sowie von Avertin bei der Betäubung im Rahmen der Tötung benutzt.

## 2.4 Lösungen

### 2.4.1 Insulinlösung

Für die Durchführung des ITT wurde das rekombinante Normalinsulin (Insuman Rapid 40 IE/ml, Sanofi) benutzt. Das Insulin wurde auf die Zielkonzentration von 0,08 IE/ml mit 0,9% NaCl Lösung (Braun) verdünnt. Die Lösung wurde bis kurz vor der Applikation permanent bei 4°C gelagert.

### 2.4.2 Avertinlösung

Die Analgosedierung im Rahmen der Tötung wurde mittels des Betäubungsmittels Tribromoethanol (Avertin, Sigma) durchgeführt. Das 97% Avertin wurde 1:2 mit 2-Methyl-2-Butanol zu einer Stock Lösung verdünnt, diese wurde dann direkt vor der Nutzung 1:40 mit 0,9% NaCl Lösung (Braun) verdünnt. Um die Oxidation und die damit verbundene Entstehung von toxischen Stoffen zu verhindern, wurde die Lösung stets gekühlt und lichtgeschützt aufbewahrt. Die Narkose wurde mit 20µl/g<sub>KG</sub> der hergestellten Verdünnung dosiert.

### 2.4.3 Perfusionslösung

Während der Tötung wurden die Versuchstiere mit einer circa 4°C warmen Lösung perfundiert, um alles Blut aus dem Kreislauf zu spülen. Um Mikrothromben in den

Gewebe zu verhindern, wurde zur Perfusion eine 1:2500 Lösung aus Heparin-Natrium (Ratiopharm) und Ringer Lösung (Berlin-Chemie) verwendet.

#### 2.4.4 Formaldehyd

Für die Fixierung eines Teils der entnommenen Organe wurde eine 5% Formaldehyd-Lösung (Carl Roth) benutzt.

### 2.5 Fecal Microbiota Transfer (FMT)

Ziel der Studie war es, über einen alternativen Weg den Effekt von Tel auf das Mikrobiom zu untersuchen; hierzu wurde ein Fecal Microbiota Transfer (FMT) genutzt. Das Grundprinzip der Methode ist es, lebende Bakterien aus dem Stuhl eines Spenders in den Gastrointestinaltrakt eines Empfängers umzusiedeln. Auf diese Weise soll das Mikrobiom des Empfängers so verändert werden, dass es dem des Spenders entspricht.

Die Spenderstuhlproben wurden bei einer vorherigen Studie gewonnen<sup>100</sup>. Hierbei handelte es sich um HFD gefütterte Tiere, die entweder mit Veh oder Tel behandelt wurden (siehe Abschnitt 2.2 Versuchsablauf). Die Proben wurden ca. eine Stunde nach Ausscheidung eingesammelt und direkt danach bei -80°C eingefroren.

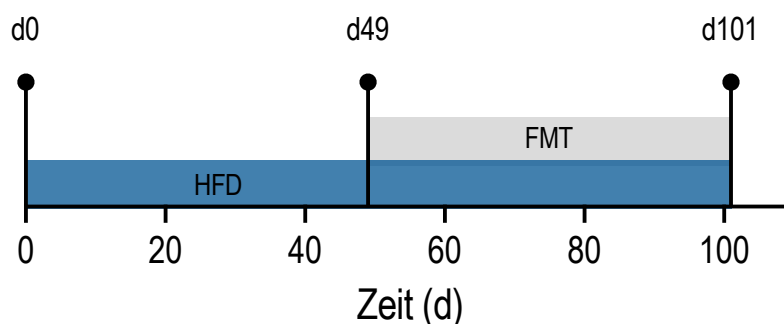
Die eingefrorenen Stuhlproben wurden für den Mikrobiom Transfer nach einem validierten Prozess aufbereitet<sup>101</sup>. Die Stuhlproben wurden dafür 1:20 in einer 50% Glycerol (Carl Roth)/50% PBS Lösung (Carl Roth) mittels des ULTRA-TURRAX T8 (IKA-Werke) homogenisiert. Die so entstandene Suspension wurde durch einen 5µm Spritzenfilter (Minisart, Sartorius) gegossen, um eventuelle Makropartikel abzufiltern. Diese Suspension wurde in 150 µl Portionen in Eppendorf Gefäße aliquotisiert und bei -20°C eingefroren. Die so entstandenen Aliquots wurden kurz vor der Verwendung 1:5 mit der gleichen 50% Glycerol /50%PBS Lösung verdünnt. Das so entstandene 750 µl Volumen dieser Suspension war eine ausreichende Menge für die orale Applikation bei den vier Versuchstieren aus einem gleichen Käfig.

Unabhängig vom Körpergewicht wurden jedem Tier per Applikation 150µl der Suspension an drei Tagen in der Woche, zeitgleich mit dem Wiegen (Montag, Mittwoch, Freitag) verabreicht<sup>101</sup>.

## 2.6 Stuhlproben

Im Laufe des Versuches wurden Stuhlproben gesammelt, um das Mikrobiom zu analysieren. Die Sammlung erfolgte am Versuchsstart (d0), vor dem Beginn der HFD, nach 7 Wochen (d49), vor FMT Beginn und nach weiteren 8 Wochen (d101) bei Versuchsende während der Tötung (Abb. 3). Für die Sammlung der Proben zu den ersten zwei Zeitpunkten wurden die Tiere in einen neuen sauberen Käfig umgesetzt. Anschließend wurden die Stuhlproben aus dem alten Käfig eingesammelt und bei -20°C eingefroren.

Die Versuchstiere hatten davor circa 5 Tage in den Käfigen verbracht. Diese Zeitspanne hat es ermöglicht eine ausreichend große Menge an Material zu gewinnen. Bei Versuchsende, zum Zeitpunkt der Sektion, wurde der Inhalt des abgetrennten Colons mittels einer chirurgischen Pinzette auf ein Stück saubere Aluminiumfolie ausgestrichen. Die so gewonnene Probe wurde dann mittels flüssigen Stickstoffs bei -80° C eingefroren.



**Abbildung 3** Zeitachse der drei Zeitpunkte an denen Stuhlproben gesammelt wurden. Der blaue Balken stellt die Dauer der HFD Fütterung dar, während der graue Balken die Dauer der FMT Intervention darstellt.

## 2.7 Funktionstest

Im Laufe des Versuches wurden die Tiere mehreren Funktionstests unterzogen, um die Auswirkungen des FMT auf den Metabolismus zu untersuchen. Hierbei handelt es sich um eine indirekte Kalorimetrie, einen Insulintoleranz Test und eine Messung der Körperzusammensetzung. Diese drei Methoden wurden bereits in mehreren vorherigen Versuchen in der Arbeitsgruppe erfolgreich angewendet und die Protokolle sind entsprechend etabliert<sup>82,100,102</sup>.

### 2.7.1 Indirekte Kalorimetrie

Um die metabolische Aktivität der Versuchstiere analysieren zu können, wurde die indirekte Kalorimetrie genutzt (Phenomaster System, TSE). Bei dieser Methode wird der Energieverbrauch der Versuchstiere mittels Sauerstoffverbrauchs und der Kohlendioxidproduktion errechnet. Die Reliabilität der Messwerte wird durch die zusätzliche Messung der Stickstoffelimination verbessert. Neben dem Energieverbrauch wurden in diesem Versuch mittels Sensoren die Ess- und Trinkmenge sowie die Lokomotion der Tiere gemessen.

Die Analyse der Gaszusammensetzung in den einzelnen Versuchskäfigen, sowie der anderen Werte erfolgte in 30-minütigen Messzyklen; bei einer Versuchsdauer von circa 72 Stunden ergaben sich für jedes Versuchstier dadurch 144 Messwerte.

Vor der Messung wurden die Tiere über einen Zeitraum von 4 Tagen in Einzelkäfige gesetzt, um vergleichbare Trink- und Futterbedingungen zur Eingewöhnung zu schaffen. Nach dieser Phase wurden die Tiere in die eigentlichen Versuchskäfige des Messgeräts gesetzt. Während des ganzen Messverfahrens wurden alle Interventionen normal weitergeführt, der Zugang zu Futter und Trinkwasser war weiterhin frei. Nach erfolgter Messung wurden die Tiere in die gewohnten Bedingungen (Käfige, Raum, Partnermäuse im Käfig) zurückgesetzt.

## 2.7.2 Messung der Körperzusammensetzung

Die Körperzusammensetzung der Versuchstiere wurde in der 14. Woche mittels Kernspinresonanz gemessen (Minispec BCA analyzer, LF-110, Bruker), 2 Stunden nachdem die Mäuse in den Raum gebracht wurden, um sich an die Umgebung zu gewöhnen. Bei dieser Messung wurde der Anteil an sogenannter „fat mass“ und „lean mass“ und der freien Körperflüssigkeit ermittelt. Für die Messung wurden die Tiere in einem zylindrischen Restraint immobilisiert und mit diesem in den Scanner eingeführt. Um die Genauigkeit der Messungen zu erhöhen, wurden die gewonnenen absoluten Werte stets auf das Körpergewicht der einzelnen Tiere bezogen. Die Tiere wurden deshalb direkt vor der Messung gewogen.

## 2.7.3 Insulintoleranztest

Der Insulintoleranztest (ITT) ist ein standardisiertes Verfahren zur Evaluation der metabolischen Gesundheit des Versuchstiers. Für die Durchführung der Messung wurden die Tiere am frühen Morgen (6 Uhr) in neue, saubere Einzelkäfige umgesetzt ohne Zugang zu Futter, der Zugang zum Trinkwasser war weiterhin frei. Nach circa acht Stunden (14 Uhr) wurde die Messung an den nüchternen Tieren begonnen. Bei diesem Test wurden den Versuchstieren intraperitoneal 1 IE Insulin (2.4.1 Insulinlösung) pro Kg Körpergewicht injiziert. Nach der Injektion wurde der Blutzuckerwert von jedem Tier im 20 Minutentakt gemessen. Für die Messung wurde die Schwanzspitze mit einer chirurgischen Schere angeritzt, um einen Blutstropfen zu gewinnen aus dem der Blutzuckerwert erhoben werden konnte (Einmalmessstreifen Accu Chek Inform II und Blutzuckermessgerät Accu Chek Performa). Der gesamte Test erfolgte über eine Dauer von zwei Stunden, daher ergaben sich sieben Messzeitpunkte: 0, 20, 40, 60, 80, 100 und 120 Minuten. Nach dem Versuch wurden die Tiere zurück zu viert in einen Käfig gesetzt mit freiem Zugang zu Futter und Trinkwasser.

## 2.8 Tötung und Organentnahme

In der 15. Woche des Versuches wurde die Tiere getötet und die Organe zur weiteren Untersuchung entnommen. Die Versuchstiere wurden mit einer intraperitoneal injizierten Narkose (2.4.2 Avertinlösung) betäubt. Nach Sicherstellung der Schmerzfreiheit wurden das Abdomen und der Thorax eröffnet. Der Körperkreislauf wurde mittels einer Punktion mit einer 21 G Butterfly Kanüle (Sarstedt) in den linken Ventrikel mit der gekühlten Spüllösung (2.4.3 Perfusionslösung) perfundiert.

Nach dieser Operation wurden Gehirn, Pit, Pankreas, Niere, Nebenniere, Leber, Dünndarm, Dickdarm, viszerale Fettgewebe, ependymales Fettgewebe, braunes Fettgewebe und eine Stuhlprobe aus dem Colon entnommen. Alle Proben bis auf das Gehirn wurden mittels flüssigen Stickstoffs bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Das Gehirn wurde auf Trockeneis, bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Niere, Nebenniere, Leber, Dünndarm, Dickdarm, viszerale Fettgewebe, ependymales Fettgewebe, braunes Fettgewebe wurden jeweils als doppelte Proben entnommen. Die Hälfte, die nicht eingefroren wurde, wurde in einer Formaldehydlösung konserviert (2.4.4).

## 2.9 Mikrobiom Analyse

Die Stuhlproben wurden qualitativ sowie quantitativ hinsichtlich der bakteriellen Flora analysiert. Dieser Prozess basiert auf der Extraktion, Vervielfältigung mittels Polymerase Chain Reaction (PCR) und Sequenzierung der DNA. Dieser Prozess wurde in Kooperation mit PD. Dr. Misa Hirose (Institut für experimentelle Dermatologie, LIED) durchgeführt.

### 2.9.1 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion aus den Stuhlproben erfolgte mittels der Nutzung des Qiagen PowerSoil Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). Die Zellen wurden dafür chemisch sowie mechanisch lysiert.

Um eine gute Repräsentativität zu gewährleisten, wurden aus jeder Stuhlprobe circa 250 mg an Material aus verschiedenem Kötel zusammengemischt. Die Probe wurde mit 60 µl Lösung C1 sowie 20µl Proteinase K aus dem Kit für 2 Stunden bei 50°C und 800 rpm inkubiert. Diese Suspension wurde mit 250µl Lösung C2, 200µl Lösung C3 und 1200µl Lösung C4 versetzt und 45 Sekunden lang bei 5000 rpm homogenisiert mittels eines SpeedMill (Analytik Jena). Die so realisierte Suspension wurde strikt nach den Herstellerangaben des Extraktionskits, für die Analyse weiterverarbeitet.

### 2.9.2 PCR

Zur weiteren Analyse der extrahierten DNA wurden, mittels PCR (Polymerase Chain Reaction), die hypervariablen V3 und V4 Regionen des 16S rRNA Genes vervielfältigt. Die ausgesuchten Regionen sind hoch repräsentativ für das Mikrobiom und ermöglichte eine klare Differenzierung der verschiedenen bakteriellen Phyla<sup>103</sup>. Es wurde eine Reihe an spezifischen vorwärts und rückwärts Primern genutzt mit heterogenen Zwischensequenzen und gekoppelten MiSeq Adaptern (341F-806R) benutzt. Zur Durchführung der PCR wurden dann 1 µl der DNA-Probe mit jeweils 4 µl vorwärts und rückwärts Primern (gesamt 8 µl) genutzt. Den drei Komponenten wurde 10,25 µl PCR Wasser, 5µl 5×Phusion HP-Puffer, 0,5 µl dNTPs 10 mM und 0,25 µl Phusion Hot Start DNA-Polymerase 2 U/µL (Thermo Fisher Scientific) hinzugefügt.

Die PCR wurde mit einer 30-sekündigen Denaturierung bei 98°C begonnen. Es folgten 28 Zyklen nach dem Programm: 98°C 9 s lang, 55°C 30 s lang und 72°C 45 s lang. Am Schluss folgte eine Extension bei 72°C über 10 Minuten; die Endprodukte konnten dann bei 12°C stabil bis zur weiteren Verarbeitung gelagert werden.

### 2.9.3 Bibliothek Vorbereitung und Sequenzierung

Eine erste grobe Quantifizierung des vervielfältigten Materials wurde mittels Agarose Gelelektrophorese durchgeführt. Als Gel-Matrix diente ein 1,5% Agarosegel bestehend aus 200ml 1xTAE Puffer + 3g Agarose.

Jeweils 5 µl des PCR-Produktes jeder Probelösung wurden zusammen mit 1 µl des Farbstoffes 6x loading dye (DNA Gel Loading Dye (6x), Thermo Scientific TM) erst 5 Minuten lang bei einer Spannung von 120 V und dann 70 Minuten lang bei einer Spannung von 110 V durch die Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Quantifizierung erfolgte anhand eines Vergleiches der Intensität der 650 Bp Banden mit den Referenzbanden mittels der Nutzung des Quantum ST4 System (Vilber, Eberhardzell, Deutschland) mit einer Belichtungszeit von 320 ms. Als Referenzbande diente eine Probe bestehend aus 1 µl Marker (80ng, 500 Bp lange DNA), 4 µl Wasser und 1 µl des bereits bei den anderen Proben verwendeten Farbstoffes. Dank dieser Voreinschätzung konnten die PCR-Produkte mit ähnlicher Molarität in Untergruppen sortiert werden. Die einzelnen Banden wurden dann ausgeschnitten und mit 450µl Bindungspuffer 10 Minuten bei 60°C und 1000 rpm inkubiert. 150µl Isopropanol wurden hinzugefügt und das Ganze wurde mit dem Vortex durchmischt. Bis zu 800µl wurden in einer Zentrifugensäule (Thermo Scientific TM) 1 Minute lang bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde dann verworfen und der Inhalt der Säule wurde nach dem Zusatz von 100µl Bindungspuffer 1 Minute lang bei 13000 rpm zentrifugiert. Dem Produkt wurden 700µl Waschpuffer zugefügt und dieser wurde dann 1 Minute lang bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Inhalt der Säule wurde 2 Minute lang bei 13000 rpm zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Die Säule wurde dann in einen autoklavierten 1,5ml Eppi Tube umgefüllt und mit 40µl Elutionspuffer (Thermo Scientific TM) 3 Minuten inkubiert und dann 1 Minute lang bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde nun entfernt und die so extrahierte DNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis aufbewahrt. Von jeder Probe wurden 40µl des gewonnenen Materials zusammen mit jeweils 70µl AgencourtAMPure (Beckman Coulter) in eine 96 Feld Mikrotitterplatte (PCR Plate half skirt flat, Sarstedt) überführt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Mikrotitterplatte für 2 Minuten auf eine Magnetplatte gesetzt. Nach diesem Bereinigungsprozess konnte der klare Überstand abpipettiert und verworfen werden. Die Sedimente wurde jeweils mit 200µl 75% Ethanol versetzt, für 30 Sekunden inkubiert und dann wieder für 2 Minuten auf eine Magnetplatte gesetzt. Der Überstand wurde verworfen und der letzte Schritt

ein zweites Mal wiederholt. Nach 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde jede Probe mit 20µl der C6 Lösung (Qiagen Powersoil kit) versetzt, 2 Minuten inkubiert und dann für 2 Minuten auf eine Magnetplatte gesetzt. Die so entstandenen Lösungen wurden in autoklavierte Röhrchen umgefüllt.

Eine Quantifizierung der Konzentration der jeweiligen Proben wurde mittels des NEBNext Library Quant Kit für Illumina (New England BioLabs) strikt nach Herstellerangabe durchgeführt. Die PCR wurde dabei mit einem 1-minütigen Denaturierungszyklus a 95°C und 35 Zyklen, 95°C für 15 Sekunden und 63°C für 45 Sekunden, durchgeführt. Die Konzentrationen wurden mittels des NEB qPCR Webtool (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/qPCRGen>) und für eine Länge von 650bp korrigiert mit der folgenden Formel berechnet.

$$\text{Korrigierte Konzentration} = \frac{\text{Errechnete Konzentration} \times 399}{\text{Länge in bp}}$$

Dank der so ermittelten Konzentration wurden alle Proben auf eine finale Konzentration von 4nmol mit destilliertem Wasser verdünnt und zur Miseq Library zusammengemischt. 5µl dieser Lösung wurden mit 5µl einer 1:5 mit Wasser verdünnter Stock 1.0 N NaOH Lösung (Illumina) denaturiert. Nach einer Vortex Vermischung wurde das Ganze bei 280G für 1 Minute zentrifugiert und bei Raumtemperatur 5 Minuten inkubiert. 10µl Denaturierte DNA-Lösung wurden mit 99l Hybridisierungspuffer HT1 (Illumina) versetzt und somit auf eine Konzentration von 20 pM verdünnt. Diese Lösung wurde weiter auf eine Zielkonzentration von 12,5 pM sowie Zielvolumen von 600µl mit HT1 verdünnt.

Parallel dazu wurde eine Kontrolllösung vorbereitet: 2µl einer 10nM PhiX Library wurde mit 3µl Tris-HCl Lösung pH 8,5 auf eine Konzentration von 4nM verdünnt. Die Lösung wurde dann denaturiert und auf eine Zielkonzentration von 12,5 pM verdünnt wie schon die Proben mit der gleichen, bereits beschriebenen Prozedur. 60 µl der 12,5pM Kontrolllösung wurden mit 540µl der oben aus den Proben vorbereiteten 12,5pM Miseq Library gemischt.

Die so gewonnene finale Library wurde mit MiSeq System (Illumina) nach Herstellerangaben mittels next generation sequencing sequenziert.

Die Daten der Sequenzierung wurden bei dem European Nucleotide Archive (ENA) eingereicht und sind unter der Kennnummer PRJEBXXXXX einsehbar.

## 2.10 Statistische und analytische Methoden

### 2.10.1 Prozessierung und Analyse der DNA-Sequenzierung

Die Prozessierung erfolgte durch Dr. Axel Küstner (Medizinische Systembiologie, LIED) und wird im Folgenden kurz skizziert:

Die „reads“ aus der Sequenzierung wurden mittels dem open source System VSEARCH (vsearch v2.12.0; <https://github.com/torognes/vsearch-eval>) hinsichtlich der Qualität gefiltert<sup>104</sup>.

Die durch inkorrekte Fusionierung, während der PCR, entstandenen Artefakte (Chimären) wurden mit dem entsprechenden Werkzeug von VSEARCH detektiert und eliminiert. Als Referenz dienten die Daten aus RDP Gold V9 (<http://rdp.cme.msu.edu/misc/rel10info.jsp#taxonomy>). Um falsch niedrigen Unterschieden in der Prävalenz einer gewissen Art<sup>105</sup> entgegenzusteuern wurde eine Dereplikation mittels VSEARCH durchgeführt.

Mit der Version V11.0.667 von USEARCH konnten aus den vorgefilterten Daten sogenannte operative taxonomische Einheiten (aus dem englischen Operative Taxonomic Unit, OTU) gebildet werden. Die OTUs wurden mittels mothur (v1.41.3, <https://github.com/mothur/mothur/releases>) unter Berücksichtigung der SILVA v123 (<https://www.arb-silva.de/documentation/release-123/>) Datenbank ausgerichtet. Um die evolutionären Beziehungen zwischen den einzelnen OTUs darzustellen, wurde ein phylogenetischer Baum erstellt. Der phylogenetische Baum selbst wurde mit dem Programm FastTree2 (<http://www.microbesonline.org/fasttree/>) erstellt.

Potenzielle Kontaminationen der Proben wurden mit dem Werkzeug decontam (1.8.0, <https://bioconductor.riken.jp/packages/3.11/bioc/html/decontam.html>) herausgefiltert.

Die Alpha-Diversität der gewonnenen Daten wurden mittels DivNet (0.3.6) als Shannondiversity errechnet und der Konfidenzintervall wurde als Vilion Plot dargestellt. Die Signifikanz der Unterschiede wurde hier durch ein Wilcoxon Test ermittelt. Die Beta-Diversität wurde mit phylr (1.14.0) und microbiome (1.10.0) mittels Hauptkomponentenanalyse (Principal component analysis, PCA) dargestellt, zur weiteren Auswertung wurde die Aitchison Distanz berechnet.

Die Unterschiede in der Abundanz der verschiedenen Phyla, Familien und Genera wurde mit dem Werkzeug ANCOMB (0.99.4, <https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/vignettes/ANCOMB/inst/doc/ANCOMB.html>) mittels einer differentialen Abundanz Analyse (Differential Abundance Analysis, DAA) beschrieben.

## 2.10.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Prism 8 (GraphPad, San Diego, USA). Die Datensätze der zwei Gruppen, nach Prüfung der Normalverteilung, wurden einem unpaired T-test unterzogen, um den Signifikanzwert der Unterschiede zu errechnen. Wenn zwei Faktoren überprüft werden sollten, wurde eine 2-way analysis of variance (ANOVA) benutzt. Unterschiede wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn der errechnete p-Wert kleiner als 5% war.

Wie bereits beschrieben (2.7.1 Indirekte Kalorimetrie), wurden die Messungen in der Kalorimetrie in 30-minütigen Messzyklen durchgeführt. Die Tiere wurden zu leicht unterschiedlichen Tageszeiten in die Kalorimetrie eingeschleust. Um die Vergleichbarkeit der Daten zu wahren, wurden die Messungen der erste und letzte Hellphase, in welcher die Tiere aus oder eingeschleust wurden, ausgeschlossen. Im Endeffekt wurden somit für jedes Tier 3 vollständige Dunkel- und 2 vollständige Hellphasen ausgewertet. Aus diesen Daten wurden jeweils die Messungen der ersten und letzten zwei Stunden einer jeden Phase ausgeschlossen, um mögliche Übergangseffekte zu vermeiden. Für die Auswertung wurden aus den verbliebenen Messungen für jedes Tier ein Mittelwert für die Hellphase und einer für die Dunkelphase gebildet und diese wurden für die weitere Analyse benutzt.

Die Effektgröße zwischen der taxonomischen Häufigkeit wurde unter Verwendung von „<http://www.statistik-beratung.net/?Effektstaerke-Rechner>“ berechnet.

### 3 Ergebnisse

Im Verlauf des Versuches sind zwei Tiere verstorben, wobei die Gründe unklar sind. Jedes der beiden Tiere gehörte einer anderen Versuchsgruppe an, entsprechend konnten die Daten von elf Tieren pro Gruppe ausgewertet werden.

#### 3.1 Körpergewicht und Körperzusammensetzung

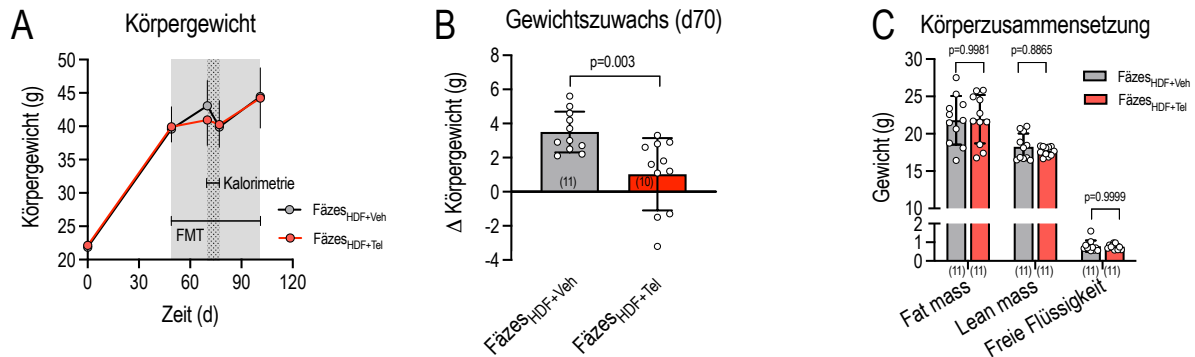
Bei Versuchsstart zeigten beide Gruppen ein nahezu identisches Gewicht (Tabelle 1). Die Versuchstiere wurden ab Beginn des Experiments einer HFD unterzogen und dreimal pro Woche gewogen. Erwartungsgemäß wuchs unter HFD das Körpergewicht stark und kontinuierlich an. So verliefen die Gewichtskurven der beiden hochkalorisch gefütterten Versuchsgruppen in den ersten 49 Tagen nahezu identisch (Abb. 4A), und das Körpergewicht der beiden Gruppen war beim Start der FMT Intervention nicht unterschiedlich (Tabelle 1).

**Tabelle 1** Körpergewicht beim Versuchsstart, vor dem Start der FMT Intervention und zum Versuchsende (MW±SD). Zu den drei Zeitpunkten liegt jeweils kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen vor.

Zeitpunkt	Fäzes <sub>HFD + Veh</sub>	Fäzes <sub>HFD + Tel</sub>	P-Wert (unpaired T-Test)
Versuchsstart (d0)	21,9 ± 1,0 g	22,1 ± 1,2 g	0,56
FMT-Start (d49)	39,6 ± 3,3 g	39,9 ± 2,3 g	0,79
Versuchsende (d101)	44,5 ± 4,3 g	44,2 ± 4,5 g	0,91

Im Laufe der FMT-Intervention (ab d49 bis zum Versuchsende bei d101) war bei allen Tieren das Körpergewicht weiter angestiegen (Abb. 4A). Die Kalorimetrie ab d70, hatte die Tiere wider Erwarten stark belastet. Ein Teil der Tiere hatte während der Messung nur sehr wenig oder gar nicht gefressen und getrunken, entsprechend war das Körpergewicht der Versuchstiere stark gesunken. Nach einer Übergangsphase haben die Gewichtskurven den initialen Verlauf nach Start der FMT-Intervention wieder

zurückgewonnen. Am Ende des Versuchs konnte man eine Angleichung des Körpergewichts der beiden Gruppen beobachten (Abb. 4A).



**Abbildung 4.** **Abb. A** zeigt den Verlauf des Körpergewichts zu den Zeitpunkten d0, d49, d70, d77 und d101 (MW±SD). Während d49 bis d101 erhielten die Mäuse alle 3 Tage einen FMT; die Kalorimetrie fand zwischen d70 und d77 statt; **Abb. B** zeigt den Gewichtszuwachs zwischen d49, Start des FMT und Tag 70, also vor der Kalorimetrie; Berechnung des Unterschieds zwischen den beiden Gruppen mittels t-Test; **Abb. C** zeigt die Körperzusammensetzung gemessen an d94; Ermittlung von Unterschieden mit 2-way ANOVA mit den Faktoren Kompartiment (F=752, p<0.0001) und Tel (F=0.078 p<0.7882); dargestellt sind die MW±SD, n=11.

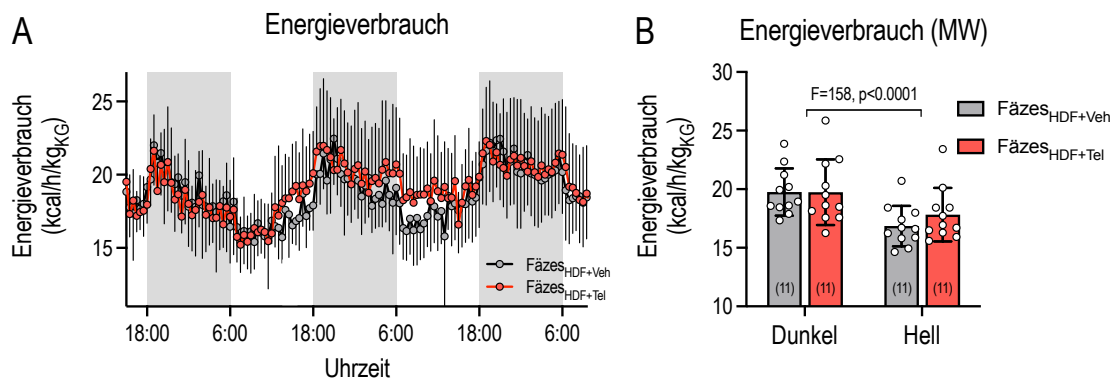
Da also die Kalorimetriemessung den Gewichtsverlauf selbst stark beeinflusst hat, haben wir die Gewichtsentwicklung bis zur Kalorimetrie zwischen dem Zeitpunkt d49, Start der FMT und d70 ausgewertet. Für diesen Zeitraum zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen (p=0,03). Bei der mit Fäzes<sub>HDF+Tel</sub> behandelten Gruppe war das Körpergewicht deutlich kleiner als bei der mit Fäzes<sub>HDF+Veh</sub> behandelten Gruppe (Abb. 4B).

In der vorletzten Versuchswoche (d94) wurde die Körperzusammensetzung der Versuchstiere gemessen. Bei den beiden Versuchsgruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der „fat mass“, „lean mass“ sowie in der freien Flüssigkeit (Abb. 4C).

## 3.2 Kalorimetrie

### 3.2.1 Energieverbrauch

Der Energieverbrauch wurde innerhalb eines jeden Messzyklus als pro Zeit verbrauchte Energie gemessen, welche dann noch auf das Körpergewicht des Versuchstieres bezogen wurde.

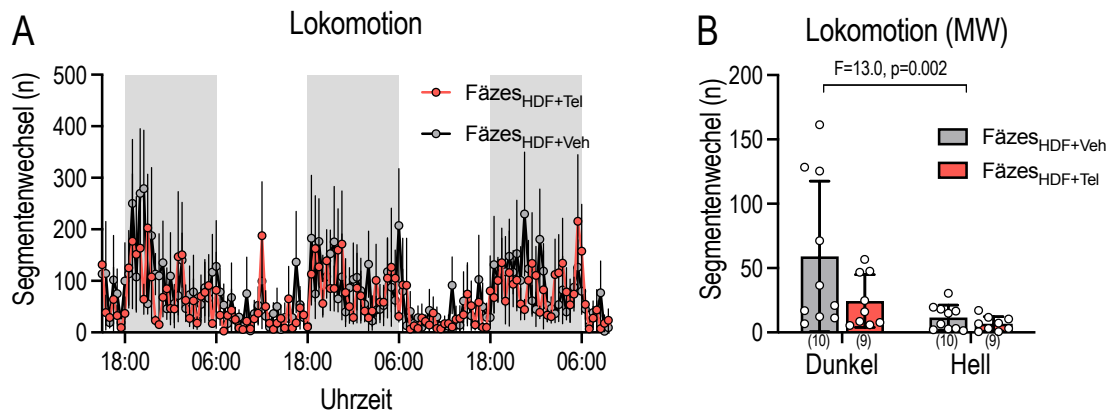


**Abbildung 5. Abb. A** zeigt den Energieverbrauch im Verlauf der Kalorimetrie (MW±SD), mit den Hellphasen von 6:00 bis 18:00 Uhr und den Dunkelphasen von 18:00 bis 6:00 Uhr; 2way ANOVA indiziert Einfluss von Zeit ( $F=10.3$ ,  $p<0.0001$ ), nicht aber von Fäzes<sub>HDF+Tel</sub> FMT ( $F=1.2$ ,  $p=0.662$ ). Dies wird durch die 2-way ANOVA in **Abb. B** bestätigt, wo die einzelnen MW des Energieverbrauches in der Hell- und Dunkelphase verglichen werden. Dargestellt sind die MW±SD  $n=11$ .

Die Tiere zeigten einen klaren zirkadianen Rhythmus, der Energieverbrauch der Tiere war in der Dunkelphase signifikant größer als in der Hellphase (Abb. 5A). Innerhalb der Hell- oder Dunkelphase zeigten sich jeweils keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Abb. 5B).

### 3.2.2 Bewegungsaktivität

Die Bewegungsaktivität wurde anhand der Anzahl an Bewegungen des Versuchstieres pro Messzyklus der Kalorimetrie gemessen. Aufgrund von Messungsproblemen konnten nur die Daten von einem Teil der Tiere ausgewertet werden.

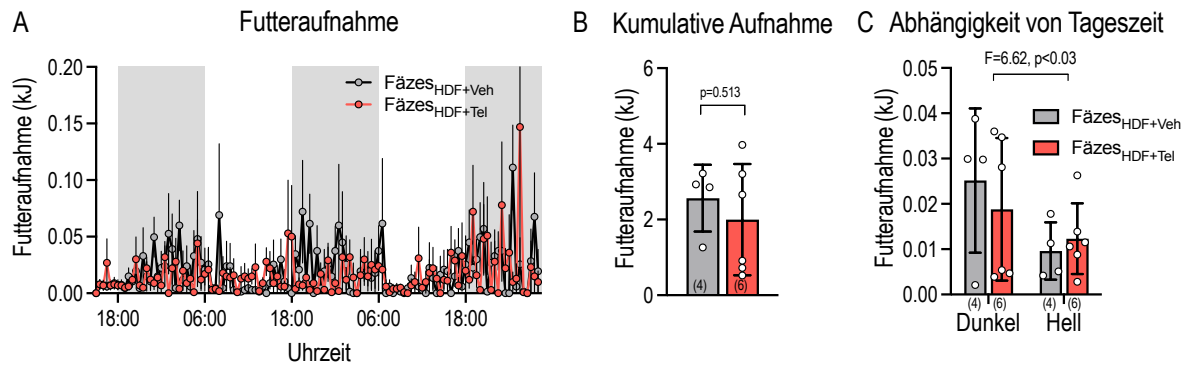


**Abbildung 6. Abb. A** zeigt die absolute Anzahl an Bewegungen pro Messzyklus im Verlauf der Kalorimetrie, mit den Hellphasen von 6:00 bis 18:00 Uhr und den Dunkelphasen von 18:00 bis 6:00 Uhr; 2way ANOVA indiziert Einfluss von Zeit ( $F=2.64$ ,  $p=0.0425$ ), nicht aber von  $Fäzes_{HDF+Tel}$  FMT ( $F=0,057$ ,  $p=0.813$ ). Dies wird durch die 2-way ANOVA in **Abb. B** auch bestätigt, wo die einzelnen MW der Bewegung in der Hell- und Dunkelphase verglichen werden. Dargestellt sind die  $MW \pm SD$   $n_{Fäzes_{HDF+Tel}}=9$   $n_{Fäzes_{HDF+Veh}}=10$ .

Die Tiere zeigten auch bei der Bewegung einen klaren zirkadianen Rhythmus, analog zum Energieverbrauch war bei den Versuchsgruppen die Bewegungsaktivität in der Dunkelphase signifikant größer als in der Hellphase (Abb. 6A). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen innerhalb der Hell- oder Dunkelphase (Abb. 6B).

### 3.2.3 Fress- und Trinkverhalten

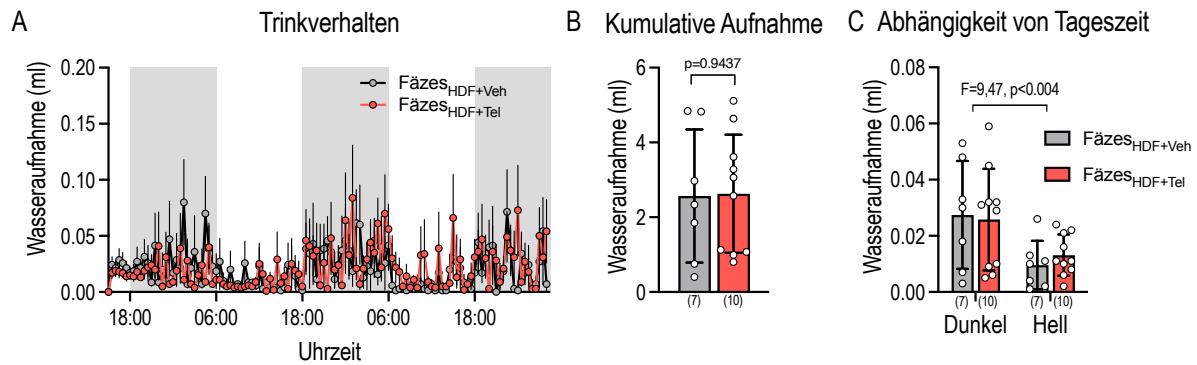
Im Rahmen der Kalorimetrie wurde die Menge an aufgenommenem Futter pro Messzyklus gemessen. Aufgrund des oben bereits erwähnten teilweise schlechten Ansprechens der Tiere auf die Maßnahmen im Rahmen der Kalorimetrie konnten die Daten zum Fressverhalten nur bei einem Teil der Versuchstiere ausgewertet werden.



**Abbildung 7. Abb. A** zeigt die konsumierte Futtermenge in KJ pro Messzyklus im Verlauf der Kalorimetrie, mit den Hellphasen von 6:00 bis 18:00 Uhr und den Dunkelphasen von 18:00 bis 6:00 Uhr; 2way ANOVA indiziert Einfluss von Zeit ( $F=0,98$ ,  $p=0.425$ ), nicht aber von Fäzes<sub>HDF+Tel</sub> FMT ( $F=0,16$ ,  $p=0.703$ ). **Abb. B** Durchschnittliche gesamt konsumierte Futtermenge in KJ im Verlauf der Kalorimetrie; Berechnung mittels t-Test, **Abb. C** 2way ANOVA Vergleich der einzelnen MW der Futtermenge in KJ in der Hell- und Dunkelphase. Dargestellt sind die MW $\pm$ SD  $n_{\text{FäzesHDF+Tel}}=6$   $n_{\text{FäzesHDF+Veh}}=4$ .

Die Messungen zeigten im Laufe des Versuches eine stetige Futteraufnahme welche, mit den restlichen Daten übereinstimmend, einer klaren zirkadianen Rhythmik unterliegt (Abb. 7A). In der Dunkelphase haben beide Versuchsgruppen signifikant mehr Futter aufgenommen als in der Hellphase (Abb. 7C). Beide HFD ernährten Gruppen zeigten innerhalb der gleichen Phase keine Unterschiede im Futterkonsum (Abb. 7C). Auch die gesamte konsumierte Futtermenge über die Dauer des Versuchs zeigte bei beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied (Abb. 7B).

Beim Trinkverhalten wurden, analog zum Fressverhalten, die Menge an konsumiertem Wasser pro Messzyklus sowie der kumulative Wasserkonsum ausgewertet.

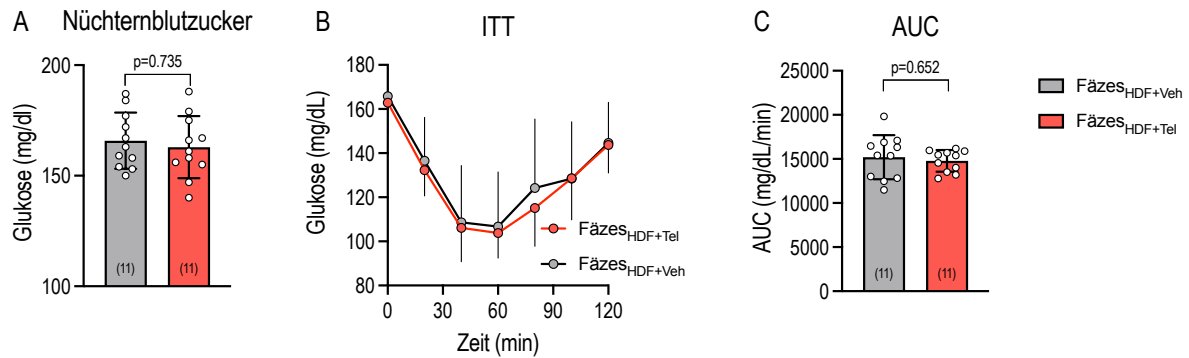


**Abbildung 8. Abb. A** zeigt die konsumierte Wassermenge in ml pro Messzyklus im Verlauf der Kalorimetrie, mit den Hellphasen von 6:00 bis 18:00 Uhr und den Dunkelphasen von 18:00 bis 6:00 Uhr; 2way ANOVA zeigt weder den Einfluss von Zeit ( $F=1,43$ ,  $p=0.225$ ) noch der von Fäzes<sub>HDF+Tel</sub> FMT ( $F=0,001$ ,  $p=0.922$ ). **Abb. B** Durchschnittliche gesamt konsumierte Wassermenge in ml im Verlauf der Kalorimetrie, Berechnung mittels t-Test. **Abb. C** 2way ANOVA Vergleich der einzelnen MW der konsumierten Wassermenge in ml in der Hell- und Dunkelphase. Dargestellt sind die  $MW \pm SD$   $n_{\text{FäzesHDF+Tel}} = 10$   $n_{\text{FäzesHDF+Veh}} = 7$ .

Das Trinkverhalten zeigte eine mit dem Futterverhalten sehr gut vergleichbare Dynamik (Abb. 8A). Alle Gruppen haben in der Dunkelphase signifikant mehr getrunken als in der Hellphase (Abb. 8C). Die beiden Gruppen unterschieden sich weder in der gleichen Lichtphase noch in der Gesamttrinkmenge voneinander (Abb. 8 B und C).

### 3.3 Insulintoleranztest

Um die Glukoseutilisation der Versuchstiere zu bestimmen, wurde ein Insulintoleranztest durchgeführt. Als Basalwert diente der vor dem Start des Versuchs gemessener Blutzuckerwert nach 6-stündiger Nüchternheit. Hier zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Abb. 9A). Wie bereits beschrieben (2.7.3 Insulintoleranztest), wurde nach Insulininjektion im 20-minütigem Rhythmus der Blutzuckerwert von jedem Tier über eine 120-minütige Gesamtdauer gemessen. Aus der resultierenden Verlaufskurve wurde die Area under the Curve (AUC) berechnet.



**Abbildung 9. Abb. A** zeigt die Nüchternblutzuckerwerte der Versuchstiere vor dem Start des ITT, Berechnung mittels t-Test. **Abb. B** zeigt den zeitlichen Verlauf des ITT, 2way ANOVA zeigt einen deutlichen Einfluss von der Zeit ( $F=58,32$ ,  $p<0.0001$ ) aber nicht von Fäzes<sub>HDF+Tel</sub> FMT ( $F=0,24$ ,  $p=0.631$ ); **Abb. C** zeigt den Vergleich AUC der beiden ITT Kurven, Berechnung mittels t-Test. Dargestellt sind die  $MW\pm SD$   $n=11$ .

Wie zu erwarten, war der Blutzuckerwert nach Injektion des Insulins im Vergleich zu dem Ausgangswert gesunken. Nach 60 Minuten war der Blutzucker bei beiden Versuchsgruppen wieder gleichmäßig ohne relevante Unterschiede angestiegen (Abb. 9B). Weder der Verlauf der Blutzuckerkurven noch die AUC zeigten bei den beiden Versuchsgruppen signifikante Unterschiede (Abb. 9C).

### 3.4 Mikrobiom

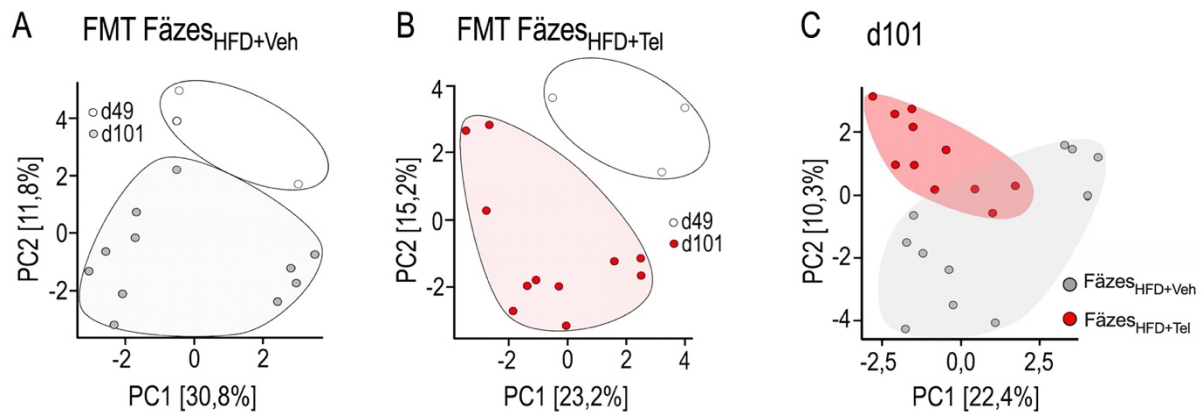
Stuhlproben, zur Mikrobiomanalyse, wurden zu drei Zeitpunkten gesammelt: d0, d49 und d101. Die Proben zu den Zeitpunkten d0 und d49 wurden aus den Käfigen gesammelt und stellten somit das gepoolte Mikrobiom von vier Versuchstieren dar. Die Proben am Versuchsende, zum Zeitpunkt d101 wurden bei der Tötung direkt aus dem Colon entnommen und stellten das spezifische Mikrobiom eines einzelnen Tieres dar. Die Sequenzierten DNA-Abschnitte aus den Stuhlproben wurden hinsichtlich ihrer Alpha- und Beta-Diversität analysiert. Bei der Alpha-Diversität handelt es sich um ein Maß für die Artenvielfalt in einer spezifischen Probe, bei der Beta-Diversität handelt es sich dagegen um ein Maß für den Unterschied in der Artenvielfalt zweier

unterschiedlicher Proben<sup>106</sup>. Die Alpha-Diversität wurde mittels des Shannon Index beschrieben, welcher die Anzahl der Arten berücksichtigt<sup>107</sup>.



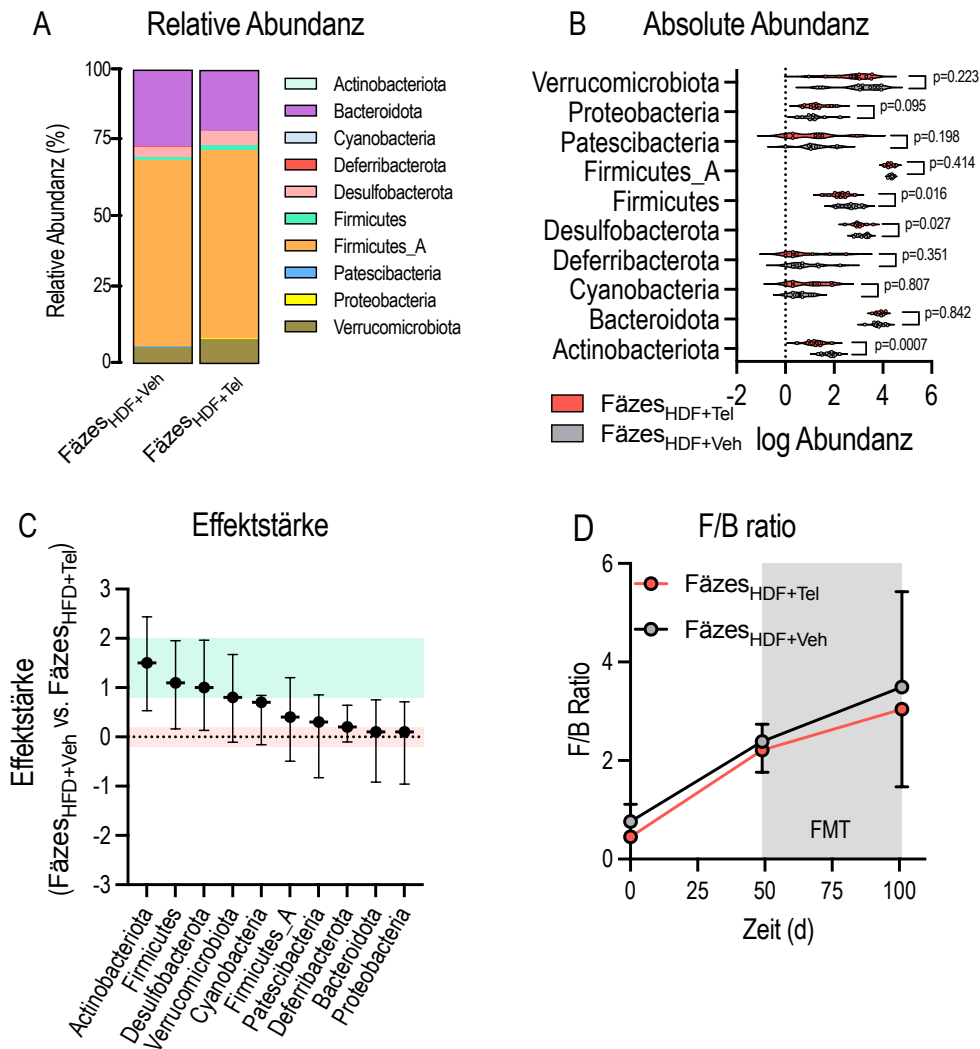
**Abbildung 10.** Alpha-Diversität an den Zeitpunkten d0 (**Abb. A**), d49 (**Abb. B**) und d101 (**Abb. C**) im Vergleich der beiden Kollektive Behandlung Fäzes<sub>HDF+Tel</sub> und Fäzes<sub>HDF+Veh</sub>. Die Transplantation der Stuhlproben erfolgte am d49 unmittelbar nach Stuhlgewinnung. An den Tagen 0 und 49 waren die Mäuse in Gruppen zu je 4 Tieren in den Käfigen. Die Stuhlproben wurden aus den Käfigen gesammelt. Deswegen repräsentiert ein Datenpunkt aus den **Abb. A** d0 und **Abb. B** d49 4 Mäuse;  $n=3$ . Im Gegensatz dazu wurde am d101 **Abb. C** die Fäzes individuell aus dem Colon gewonnen,  $n=11$ . Der statistische Vergleich erfolgte mit einem ungepaarten t-Test.

Zu den Zeitpunkten d0 und d49 zeigten sich keine Unterschiede zwischen der Alpha-Diversität beider Gruppen. Zu dem Zeitpunkt d101, am Versuchsende, zeigte sich ein tendenzieller Unterschied zwischen beiden Gruppen mit einem p-Wert von 0,066 (Abb. 10).



**Abbildung 11.** Beta-Diversität nach Aitchison. **Abb. A** zeigt den Vergleich innerhalb der Kontrollgruppe zu den Zeitpunkten d49 und d101, welcher ab d49 mit Fäzes<sub>HFD+Veh</sub> behandelt wurde ( $F=1,426$ ,  $p=0,095$ ). **Abb. B** zeigt die Interventionsgruppe, die ab d49 mit Fäzes<sub>HFD+Tel</sub> transplantiert wurde zu den Zeitpunkten d49 und d101 ( $F=2,34$ ,  $p=0,008$ ). **Abb. C** zeigt den Vergleich der beiden Gruppen am d101 ( $F=2,27$ ,  $p=0,005$ ).

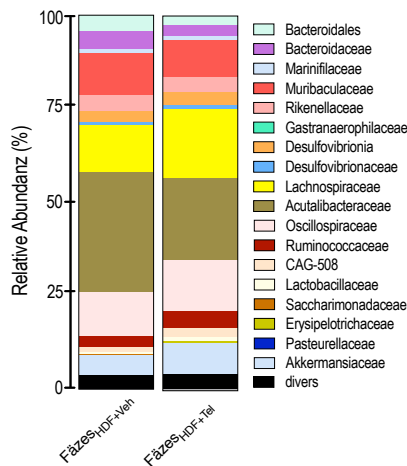
Bei der Beta-Diversität zeigten sich bei der Fäzes<sub>HFD+Veh</sub> behandelten Gruppe keine Unterschiede zu den Zeitpunkten d49 und d101 (Abb. 11A). Bei der Fäzes<sub>HFD+Tel</sub> behandelten Gruppe zeigten sich hingegen signifikante Unterschiede zwischen den beiden Zeitpunkten (Abb. 11B). Zum Zeitpunkt d101 zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Abb. 11C).



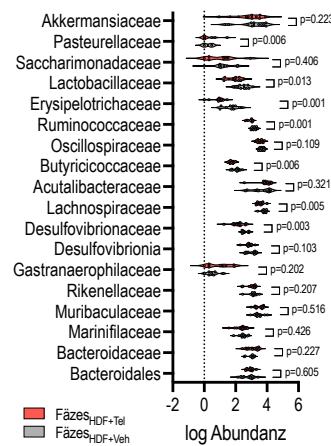
**Abbildung 12.** Relative (**Abb. A**) und absolute (**Abb. B**) Abundanzen der Phyla. Aus dem Vergleich der Abundanzen wurde die Effektstärke berechnet (**Abb C**) (<http://www.statistikberatung.net/?Effektstaerke-Rechner>). **Abb D** Vergleich der F/B Ration zwischen den beiden Versuchsgruppen an d101. Der statistische Vergleich erfolgte mit einem ungepaarten t-Test.

Bei der Analyse der einzelnen Phyla, zum Zeitpunkt d101, waren die Actinobacteriota, Desulfobacterota sowie die Firmicutes bei den mit Fäzes<sub>HDF+Tel</sub> behandelten Tieren signifikant weniger vertreten (Abb. 12A). Dies bestätigte sich auch in der Effektstärkenberechnung (Abb. 12B). Bei der Analyse der Taxonomischen Daten zum Versuchsende war kein Unterschied in der F/B Ratio zu erkennen, weder Zeitpunkt d0, d49 noch d101 (Abb. 12 C und D).

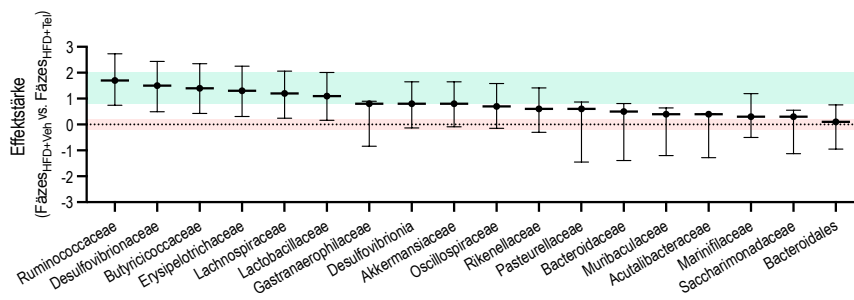
### A Relative Abundanz



### B Absolute Abundanz

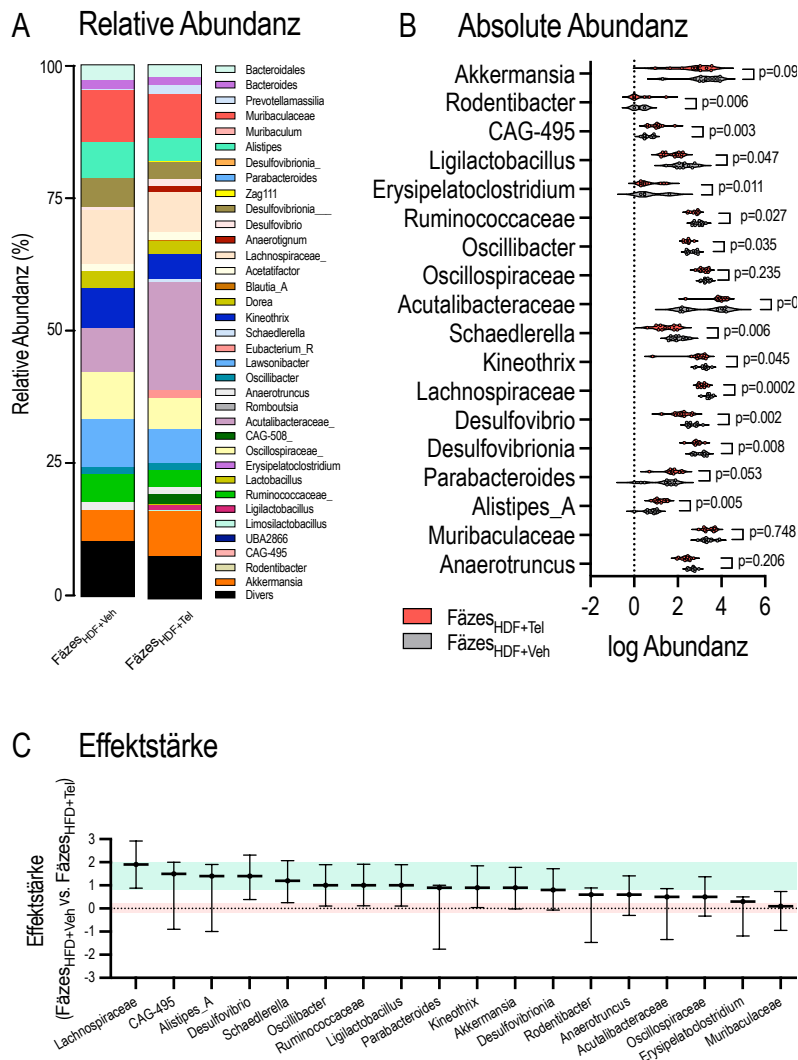


### C Effektstärke



**Abbildung 13.** Relative (**Abb. A**) und absolute (**Abb. B**) Abundanzen der Familien. Aus dem Vergleich der Abundanzen wurde die Effektstärke berechnet (**Abb. C**) (<http://www.statistikberatung.net/?Effektstaerke-Rechner>). Vergleich erfolgte mit einem ungeparten t-Test.

Die Bakterienfamilien zeigten zum Versuchsende signifikante Unterschiede in der Häufigkeit zwischen den beiden Gruppen. Ruminococcaceae, Desulfovibrionaceae, Butyricoccaceae, Erysipelothrichaceae, Lachnospiraceae, Lactobacillaceae waren geringer und Pasteurellaceae häufiger in der Fäzes<sub>HFD+Tel</sub> behandelten Gruppe vertreten (Abb. 13B). Dies zeigte und bestätigte sich in der Effektstärkendarstellung (Abb. 13C).

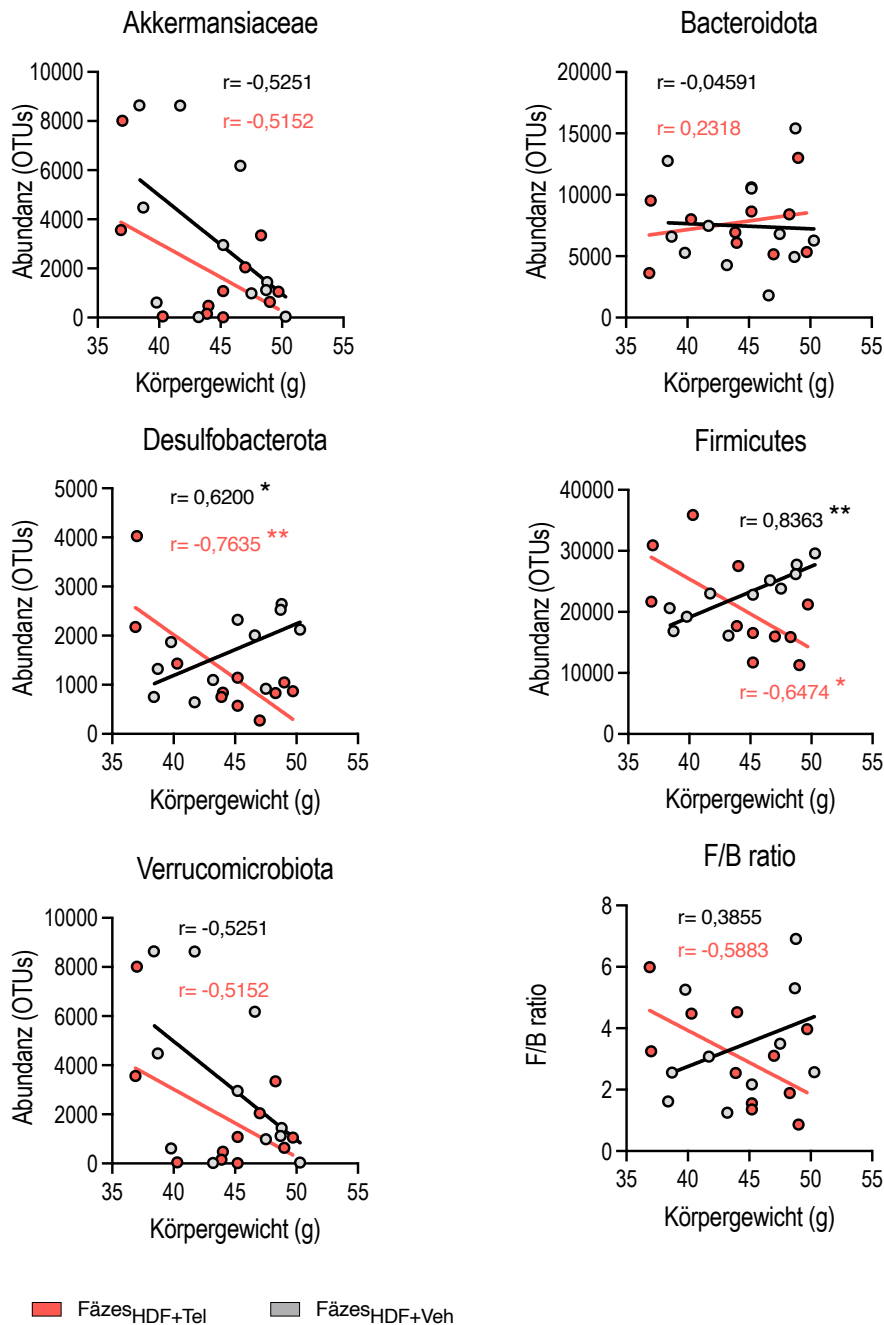


**Abbildung 14.** Relative (**Abb. A**) und absolute (**Abb. B**) Abundanzen der Genera. Aus dem Vergleich der Abundanzen wurde die Effektstärke berechnet (**Abb C**) (<http://www.statistikberatung.net/?Effektstaerke-Rechner>). Vergleich erfolgte mit einem ungepaarten t-Test.

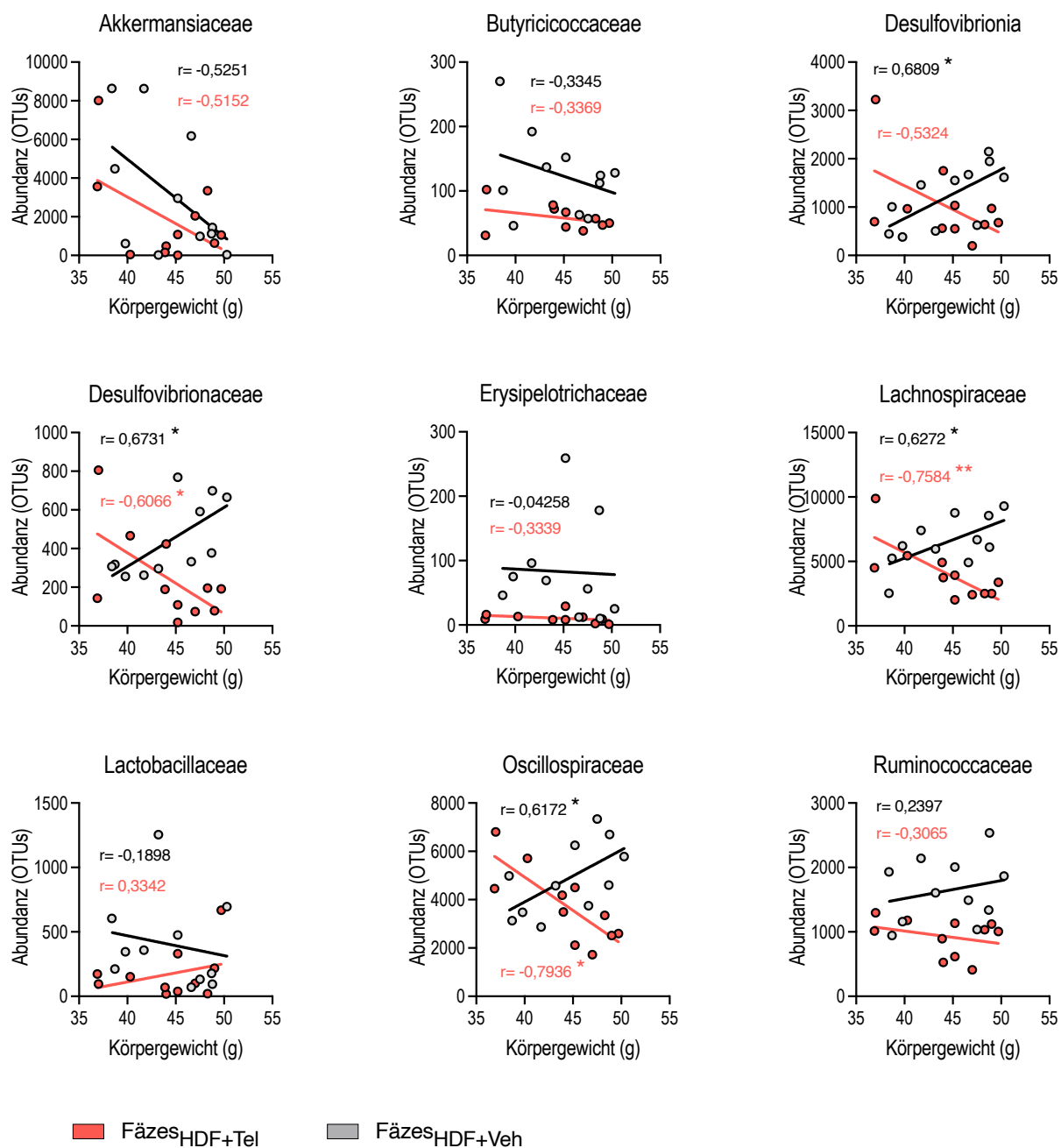
Bei den Genera waren auch zahlreiche signifikante Unterschiede in der Häufigkeit zu beobachten, in der mit Fäzes<sub>HFD+Tel</sub> behandelten Gruppe waren Lachnospiraceae, Desulfovibrio, Ligilactobacillus, Ruminococcaceae, Oscillibacter, Schaedlerella, Kineothrix seltener zu finden (Abb. 14B). Rodentibacter, CAG-495, Erysipelatoclostridium und Alistipes waren hingegen in der Fäzes<sub>HFD+Tel</sub> behandelten Gruppe häufiger vertreten (Abb. 14B). Dies zeigte sich auch in der Effektstärkendarstellung (Abb. 14C).

Bei den hier identifizierten signifikant unterschiedlichen Phyla, Familien und Genera wurde zusätzlich die Korrelation zwischen dem Körpergewicht des Versuchstieres und der Häufigkeit des jeweiligen Phylums, Familie oder Genus berechnet. Hier zeigten sich

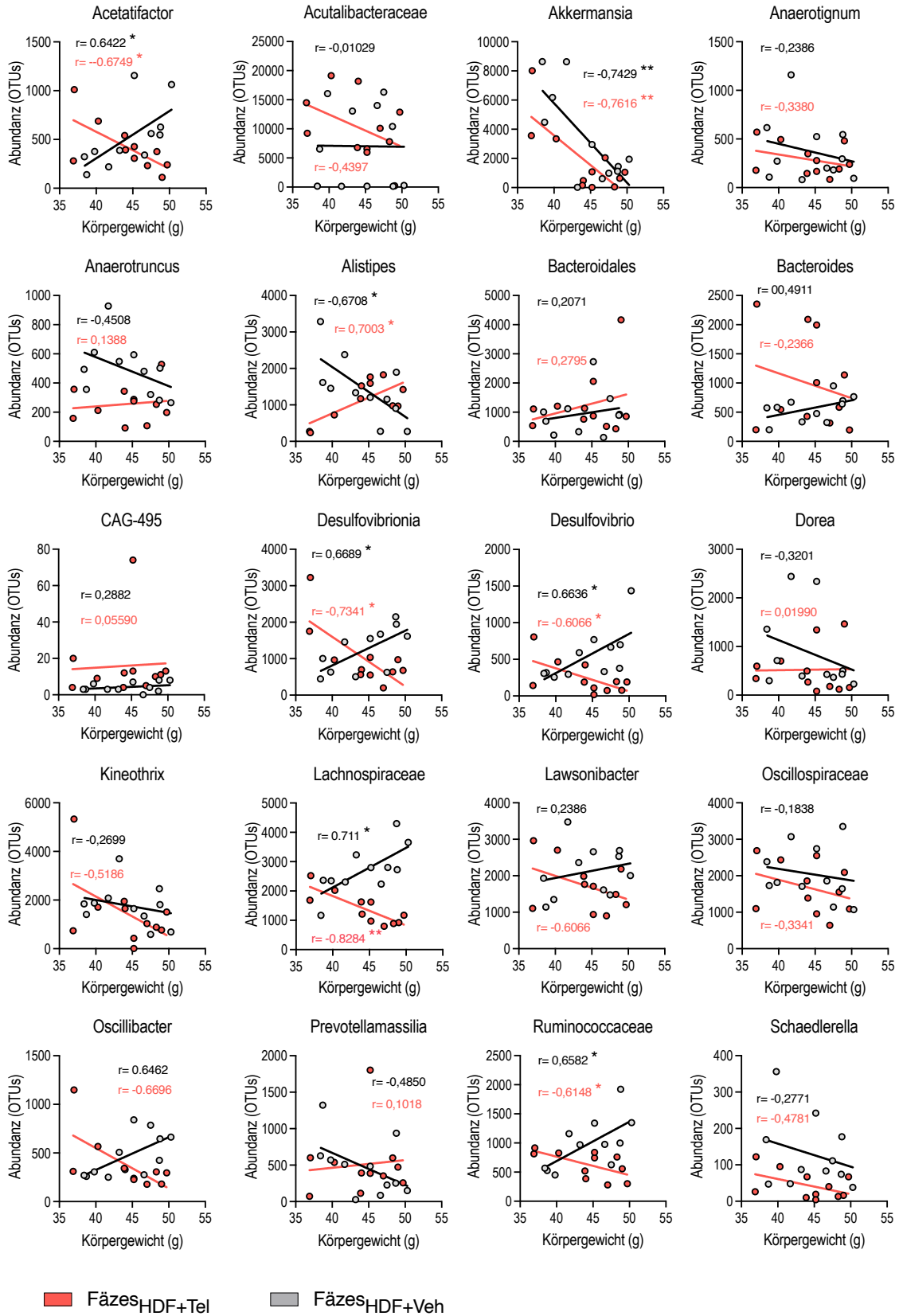
etliche signifikante Korrelationen zwischen Abundanz und Körpergewicht. Die Korrelationen sind in den Abbildungen 15, 16 und 17 dargestellt und die Signifikanzen aus den Korrelationen in der Heatmapdarstellung in Abbildung 18 nochmals verdeutlicht.



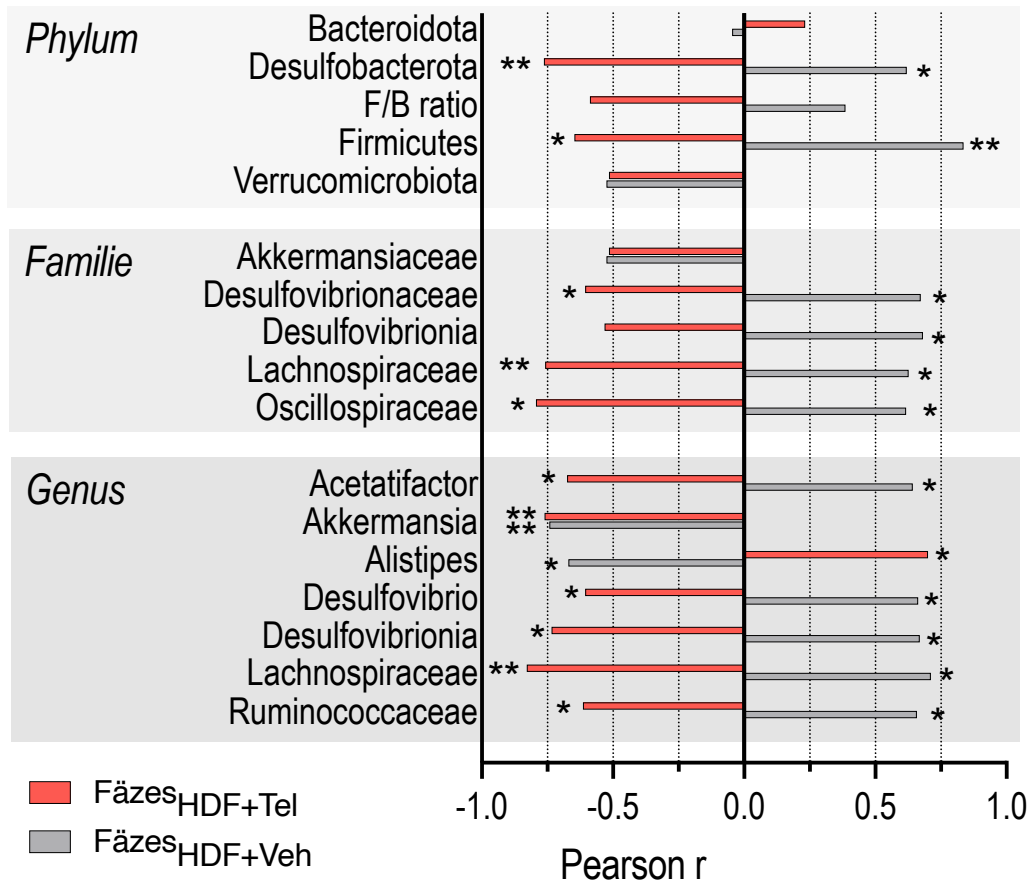
**Abbildung 15.** Korrelation zwischen dem Körpergewicht und den Abundanzen verschiedener Phyla. Die Korrelationsanalysen erfolgten mittel Prism 8.0. In den Abbildungen sind die Pearson r Werte angegeben, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ .



**Abbildung 16.** Korrelation zwischen dem Körpergewicht und den Abundanz verschiedener Familien. Die Korrelationsanalysen erfolgten mittels Prism 8.0. In den Abbildungen sind die Pearson  $r$  Werte angegeben, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ .



**Abbildung 17:** Korrelation zwischen dem Körpergewicht und den Abundanzen verschiedener Genera. Die Korrelationsanalysen erfolgten mittel Prism 8.0. In den Abbildungen sind die Pearson r Werte angegeben, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ .



**Abbildung 18.** Übersicht über die Pearson  $r$  Werte aus den Korrelationsanalysen zwischen dem Körpergewicht und den Abundanzen verschiedener Phyla, Familien und Genera; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ .

Das Genus Akkermansia korrelierte bei beide Versuchsgruppen negativ mit dem Körpergewicht. Bei den Fäzes<sub>HDF+Tel</sub> behandelten Tieren zeigten die Phyla Desulfobacterota, Firmicutes, die Familien Desulfovibrionaceae, Lachnospiraceae, Oscillospiraceae und die Genera Acetatifactor, Desulfovibrio, Desulfovibrionia, Lachnospiraceae, Ruminococcaceae eine negative Korrelation zum Körpergewicht, während Alistipes positiv korrelierte. Bei den Fäzes<sub>HDF+Veh</sub> behandelten Tieren zeigten sich die genau gegenteilige Korrelationen.

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit konnte bei den Versuchstieren, welche einen FMT mit Fäzes<sub>HFD+Tel</sub> erhalten haben, eine geringere Gewichtszunahme beobachtet werden im Vergleich zu den Fäzes<sub>HFD+Veh</sub> behandelten Tieren.

Bei der Mikrobiomanalyse zeigte sich ein Trend zur Signifikanz beim Vergleich der Alpha-Diversität beider Gruppen sowie deutliche Unterschiede in der Beta-Diversität des Mikrobioms vor und nach FMT in der Fäzes<sub>HFD+Tel</sub> behandelten Gruppe, sowie signifikante Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen nach der Intervention. Die genaue taxonomische Analyse zeigte nach FMT signifikante Unterschiede auf Phylum, Familien und Genus Ebene zwischen den beiden Versuchsgruppen. Bei einem Teil der sich signifikant unterscheidenden Phyla, Familien und Genera zeigten sich darüber hinaus eine Korrelation zwischen der Häufigkeit dieser und dem Körpergewicht der Versuchstiere. In der Körperzusammensetzung und der Insulinsensitivität zeigten sich keine Unterschiede. Aufgrund von einer sehr schlechten Akzeptanz der Tiere für die Kalorimetrie konnten die Daten aus dieser Messung nur bedingt verwertet werden. Unter Berücksichtigung der geringen Gruppengröße zeigten sich hier keine relevanten Unterschiede in dem Energiehaushalt, der Futter- und Flüssigkeitsaufnahme sowie der Lokomotion.

In diesem Teil sollen diese Ergebnisse, die Methodik sowie die Limitierung dieser Arbeit diskutiert werden.

### 4.1 Körpergewicht und Körperzusammensetzung

Die Versuchstiere, die alle freien Zugang zu einer HFD hatten, haben erwartungsgemäß eine deutliche Adipositas entwickelt, wie bereits mehrfach im Tier- und Menschmodell beobachtet<sup>108,109</sup>. Verschiedene Mechanismen der Konsumregulierung auf kognitiver, metabolischer und mikrobiologischer Ebene konnten dafür verantwortlich gemacht werden<sup>110</sup>. Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, konnten in verschiedenen Studien der AG Raasch gezeigt werden, wie eine hochdosierte Tel

Therapie die Entwicklung von Übergewicht bei einer hochkalorischen Diät verhindert<sup>79,85,100,111</sup>. Dieser antiadipöse Effekt konnte mittels FMT teilweise erzielt werden. In den ersten drei Wochen der Intervention, vor der Kalorimetrie, war die Gewichtszunahme der Versuchsgruppe, welche mit Fäzes<sub>HFD+Tel</sub> behandelt wurde, signifikant kleiner als die der mit Fäzes<sub>HFD+Veh</sub> behandelten Tiere. Die schlechte Compliance in der Kalorimetrie, insbesondere das Fressverweigern von einem Teil der Versuchstiere, führte zu einem Abfall des Körpergewichts. Nach der Kalorimetrie haben die Tiere wieder über die Futterraufen normalen Zugang zum Futter, was auch zu einer gesteigerten Futteraufnahme führte demzufolge auch wieder zu einem Anstieg des Körpergewichts. Am Ende des Versuchs konnten keine Unterschiede mehr im Körpergewicht beider Gruppen beobachtet werden. Wir können sicherlich nicht ausschließen, dass durch die eingeschränkte Futteraufnahme während der Kalorimetrie ein übersteigertes Fressverhalten nach dieser Woche stattfand, denn es gibt Befunde, wo ein Fasten zu einem gesteigerten Fressverhalten in der Post-Fastenzeit führte<sup>112,113</sup>. Somit ist das Ausbleiben eines Unterschieds im Körpergewicht am Versuchsende vielleicht auch Folge dieses Effektes und die Betrachtung des Gewichtsunterschieds zum d70 umso entscheidender, da zu diesem Zeitpunkt ein vermindertes Körpergewicht in den Verum-Tieren festzustellen war.

Bei verschiedenen Studien unserer AG wurde zwischen der mit hochdosiertem Tel behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe am Endpunkt ein deutlich größerer Unterschied in der Gewichtszunahme beobachtet<sup>100,114</sup> im Vergleich zu der hier analysierten FMT Intervention am d70. Allerdings ist es eher nicht gerechtfertigt, das Ausmaß des Effekts zu vergleichen, es erscheint vielmehr wichtig hervorzuheben, dass ein Tel spezifisches Mikrobiom nach Transplantation auf Empfängertiere zu einem Effekt geführt hat. Zudem soll auch hervorgehoben werden, dass der therapeutische Effekt einer ARB-Therapie bei bereits adipösen Ratten auch einen deutlich kleineren Effekt zeigte, als wenn der ARB protektiv verabreicht wurde<sup>80</sup>. Zudem ist hier anzumerken, dass aufgrund der durch die Kalorimetrie verursachten Probleme der Effekt der FMT Intervention nur über eine relativ kurze Zeitspanne von ca. 3 Wochen beobachtet werden konnte. Bei den oben herangezogenen Vorgängerstudien wurde

die Tel Therapie stets über eine deutlich längere Zeitspanne von ca. 8 Wochen beobachtet.

Die naheliegendsten Erklärungen für die relative Schwäche des beobachteten Effekts bei der Gewichtsentwicklung sind einerseits, dass das Tel spezifische Mikrobiom nur teilweise für die antiadipöse Wirkung verantwortlich ist; somit wäre die Effektstärke der FMT Intervention schlichtweg geringer; andererseits könnte, wie oben schon erwähnt, die Dauer des Versuchs zu kurz sein, um das volle Potential der FMT Intervention zu demonstrieren. Darüber hinaus hat sich bei Stuhltransplantationen in therapeutischer Absicht ein interindividuell sehr unterschiedlich starkes Ansprechen auf die gleiche Intervention gezeigt, selbst bei identischem Spender<sup>115</sup>. Die Ursachen dafür sind noch nicht komplett erfasst, eine wichtige Rolle für ein gutes Ansprechen scheint dabei die Ähnlichkeit beziehungsweise Kompatibilität der Darmflora von Empfänger und Spender zu spielen<sup>115</sup>. Dieses interindividuelle Ansprechen auf eine FMT wurde hier nicht analysiert.

Bei den Prä-Kalorimetrie beobachteten Unterschieden im Körpergewicht wäre auch ein Unterschied in der Körperzusammensetzung zu erwarten. Eine solche konnten wir nicht beobachten, denn die Messung der Körperzusammensetzung erfolgte circa 5 Wochen nach der Kalorimetrie. Aufgrund der beschriebenen Probleme ist ein direkter Vergleich zwischen dem Körpergewicht Prä-Kalorimetrie und der Körperzusammensetzung Post-Kalorimetrie nur sehr bedingt möglich. Chow und Hall haben darüber hinaus verschiedene, mathematische Modelle untersucht, die versuchen den Zusammenhang zwischen Körpergewicht und -zusammensetzung zu erklären<sup>116</sup>; hier zeigte sich, dass eine Änderung von einem der beiden Parameter nicht zwangsläufig auch Wirkungen auf den anderen haben muss. Insbesondere bei kleineren Gewichtsunterschieden wie es hier der Fall ist.

Tel wird zum Großteil durch die Fäzes in einer reinen nicht konjugierten Form ausgeschieden<sup>117</sup>. In dieser Arbeit wurde keine Messung der Tel Konzentration in den für den FMT genutzten Stuhlproben durchgeführt. Ein möglicher Effekt von Tel in den Spender Fäzes könnte hier vermutet werden, dies ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da die Proben im Rahmen der Aufbereitung stark verdünnt wurden. Die HFD+Tel

Spendertiere haben ein durchschnittliches Körpergewicht von circa 30 g gehabt und wurden mit einer Dosis von 8 mg/Kg<sub>KG</sub> Tel pro Tag behandelt<sup>100</sup>. Unter der Annahme, dass es sich nach einer Anfangsphase bei der Ausscheidung vom Tel um ein steady state Gleichgewicht handelt, kann davon ausgegangen werden, dass die ausgeschiedene Menge an Tel der pro Tag eingenommenen Menge an Medikament entspricht. Eine HFD ernährte Maus scheidet circa 2,5g Fäzes pro Tag aus<sup>118</sup>. Unter diesen Annahmen resultiert in den Stuhlproben eine Tel Konzentration von circa 0,096 mg/g. Bei der Aufbereitung wird eine Verdünnung um den Faktor 100 durchgeführt und es werden dann 150 µl der Suspension 3mal pro Woche (durchschnittlich alle 2,3 Tage) appliziert. Bei einem durchschnittlichen Körpergewicht der FMT unterzogenen Versuchstiere von ca. 40 g resultiert eine tägliche Dosis Tel von ca. 0,00157 mg/Kg<sub>KG</sub>. Trotz aller notwendigen Vereinfachungen dieser Rechnung zeigt sich deutlich, dass die potentiell applizierte Menge Tel ca. 5000 mal kleiner ist als jene, die im Rahmen der Vorgängerstudien appliziert wurde. In Anbetracht dieser Hochrechnung sowie der Tatsache, dass der antiadipöse Effekt von Tel nur bei hochdosierter Therapie beobachtet wurde<sup>79</sup> ist ein störender Effekt von Tel in den Spender Fäzes nicht zu erwarten. Nichtsdestotrotz könnte in einer zukünftigen Arbeit eine Messung der tatsächlichen Tel Konzentration jeden Zweifel beseitigen.

## 4.2 Aktivität, Energieverbrauch, Fress- und Trinkverhalten

Alle Versuchstiere zeigten in der Kalorimetrie klare zirkadiane Rhythmen mit einer für die Art typischen Aktivitätssteigerung in der Dunkelphase<sup>119</sup>. Analog dazu verhält sich, wie bereits bekannt, der Energieverbrauch<sup>120</sup>, das Fress- und Trinkverhalten<sup>119,121</sup>. Aufgrund der Ergebnisse verschiedener Studien unserer Arbeitsgruppe zum antiadipösen Effekt von Tel sowohl an Mäusen wie Ratten<sup>79,85,100,111</sup> wären bei den in der Kalorimetrie untersuchten Parametern Unterschiede zwischen den zwei Gruppen zu erwarten. Zwischen den beiden Versuchsgruppen zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede. Durch die schlechte Compliance der Versuchstiere in der

Kalorimetrie, wo insbesondere die Wasser- und Futteraufnahme aus den vorgesehenen Spendern verweigert wurde, sind die Daten nur bedingt aussagekräftig. Das Gewicht der Tiere zeigte während der Messung einen klaren und drastischen Abfall durch die fehlende Futteraufnahme und die damit einhergehende Veränderung im Energieverbrauch<sup>122</sup> im Vergleich zu der vorherigen 3 wöchigen FMT. Der ermittelte Energieverbrauch in einem solch disruptiven Moment ist schlichthin nicht auf die bis dato beobachtete Gewichtsentwicklung beziehbar. Durch die Probleme in der Kalorimetrie konnten nur für einen Teil der Versuchstiere Daten erhoben werden. Die dadurch resultierenden kleinen Fallzahlen reduzieren die Chance einen möglicherweise existierenden Effekt überhaupt beobachten zu können. Es bleibt unklar, warum die Versuchstiere eine so schlechte Compliance in der Kalorimetrie gezeigt haben, da die Methode in der Arbeitsgruppe gut etabliert ist.

### 4.3 Insulintoleranz

Im Vergleich zu metabolisch gesunden Tieren ist die experimentell beobachtete Reaktion des Blutzuckers auf das Insulin deutlich verzögert und der Nüchternblutzucker deutlich erhöht, was auf eine Insulinresistenz deutet<sup>123</sup>. Diese wird auf Entzündungsprozesse zurück geführt, welche durch eine hochkalorische, fettreiche Ernährung ausgelöst werden<sup>124</sup>. Die dabei freigesetzten Zytokine spielen eine entscheidende Rolle in der Vermittlung der Insulinresistenz<sup>125</sup>.

Die Versuchstiere, welche mit Fäzes<sub>HDF+Tel</sub> behandelt wurden, zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Insulinresistenz im Vergleich zu der Fäzes<sub>HDF+Veh</sub> behandelten Gruppe. Dies passte nicht zu den vorherigen Studien unserer Arbeitsgruppe, wo eine Tel Therapie analysiert wurde<sup>85,114,126</sup>. In diesen Arbeiten zeigten die Tel behandelten Tieren stets eine bessere Glukoseutilisation als die Veh Kontrollgruppe trotz HFD. Diese beobachteten Effekte könnten durch wohl bekannte Peroxisom Proliferator aktivierte Rezeptor (PPAR $\gamma$ ) abhängige Mechanismen erklärt werden<sup>127</sup>. Darüber hinaus wurden auch PPAR $\gamma$  unabhängige Mechanismen

identifiziert wie die antiinflammatorische Wirkung von ARB<sup>128</sup>, welche als Gegenspieler zu der HFD induzierten inflammatorischen Wirkung<sup>124</sup> agieren. Andererseits spielen auch die Verbesserung durch ARB der Stressreaktion des Körper durch Einwirkung auf die HPA-Achse<sup>129–132</sup> sowie ein Effekt von Tel auf das Gehirn-RAS-System<sup>133</sup> eine wichtige Rolle. Da in dieser Arbeit kein Tel verabreicht wurde, sondern lediglich eine Veränderung des Mikrobioms erzielt wurde, kann nicht klar gesagt werden inwieweit man die Ergebnisse im ITT hier überhaupt mit denen aus den vorherigen oben erwähnten Arbeiten vergleichen kann. Es bestand bei den Tieren zum Zeitpunkt des ITT, anders als bei den oben erwähnten Studien der Arbeitsgruppe, kein signifikanter Unterschied im Körpergewicht.

In verschiedenen Tierversuchen konnte die Insulinsensitivität nach FMT von normalgewichtigen Spendertieren bei adipösen HFD ernährten Tiere deutlich verbessert werden<sup>71,134</sup>. Desulfovibrio, die in unserer Arbeit bei den Fäzes<sub>HDF+Tel</sub> behandelten Tieren deutlich reduziert waren, sind deutlich häufiger bei DMT2 Patienten zu finden<sup>135,136</sup>. Darüber hinaus konnte bei einer Liraglutid Behandlung in der Maus eine Reduktion von Desulfovibrio bei verbesserter Insulinsensitivität beobachtet werden<sup>137</sup>. Hier stellte sich die Frage, warum trotz FMT von normalgewichtigen metabolisch gesunden Spendern und Reduktion von Desulfovibrio die Fäzes<sub>HDF+Tel</sub> behandelten Tiere keine Veränderung der Insulinsensitivität gezeigt haben. Es kann spekuliert werden, dass das Tel spezifische Mikrobiom trotz normalgewichtiger, metabolisch gesunder Spendertiere keinen relevanten Effekt auf die Glukoseutilisation hat. Bei Desulfovibrio wäre eine H<sub>2</sub>S vermittelte Butyrate Reduktion denkbar<sup>138</sup>. Butyrate kann zu einer PPAR $\gamma$ <sup>139</sup> vermittelten Verbesserung der Insulinsensitivität<sup>140</sup> führen. Es wäre daher durchaus denkbar gewesen, dass die Reduktion von Desulfovibrio bei den Fäzes<sub>HDF+Tel</sub> behandelten Tieren zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität geführt haben könnte. Dieser Effekt blieb hier in der Arbeit schlichtweg aus, man könnte daher spekulieren, dass es sich bei Desulfovibrio und Insulinsensitivität eher um eine Korrelation als um eine Kausalität handelt. Summa summarum wäre es denkbar, dass die beobachtete Glukoseutilisation und das Tel

spezifische Mikrobiom in der Beckmann Arbeit an Ratten<sup>85</sup> keine kausale Beziehung haben, sondern beides eine Folge der oralen Tel Therapie sind.

## 4.4 Mikrobiom

Die große Anzahl an Daten zur Darmflora zeigt einmal mehr die Komplexität des Mikrobioms. Im Rahmen dieser Arbeit konnten keine signifikanten Unterschiede in der Alpha-Diversität zwischen den Gruppen zu den Zeitpunkten d0, Versuchsstart, d49, nach sieben Wochen HFD und d101 nach 8 Wochen FMT festgestellt werden. Bei den Zeitpunkten d0 und d49 Tagen liegen keine Unterschiede in der Behandlung vor, alle Tiere kamen vom gleichen Züchter und wurden mit der gleichen HFD gefüttert, entsprechend sind auch keine Unterschiede zu erwarten. Bei den Zeitpunkten d0 und d49 handelt es sich um gepoolte Proben und damit lediglich um 3 Werte.

Beim Zeitpunkt d101, nach FMT mit entweder Fäzes<sub>HFD+Tel</sub> oder Fäzes<sub>HFD+Veh</sub>, konnte ein Trend für einen Unterschied bei der Alpha-Diversität beobachtet werden. In der Arbeit von Beckmann an Ratten<sup>85</sup> konnten nach direkter medikamentöser Tel Therapie deutliche Unterschiede der Alpha-Diversität beobachtet werden. Bei einem p-Wert von 0,066 ist es durchaus denkbar, dass bei einer höheren Fallzahl ein signifikanter Effekt detektierbar gewesen wäre. Bei der Alpha-Diversität handelt es sich um ein Maß der Diversität innerhalb einer Probe. Bei starkem Übergewicht wird oft eine Reduktion der Variabilität des Mikrobioms beobachtet<sup>141</sup>. Entsprechend ist es eher unerwartet, dass bei der Behandlung mit Fäzes<sub>HFD+Tel</sub> keine Vergrößerung der Alpha-Diversität beobachtet wurde, da das transplantierte Mikrobiom von normalgewichtigen Tieren stammte. Die in der Beckmann Studie<sup>85</sup> beobachteten Unterschiede in der Alpha-Diversität zwischen der Veh behandelten Kontrollgruppe und der Tel Verum Gruppe bestanden bei zwei Gruppen, die deutliche Unterschiede im Körpergewicht gezeigt haben. Die mit Tel behandelten Tiere waren normalgewichtig, anders als in unserer Arbeit hier. In unserem Versuch waren beide Gruppen zum Zeitpunkt der

Probensammlung übergewichtig. Es ist plausibel, dass der Effekt des Körpergewichts auf die Alpha-Diversität schlichtweg dem der FMT überwiegt.

Bei der Beta-Diversität sieht man deutliche Unterschiede in der mit Fäzes<sub>HFD+Tel</sub> behandelten Gruppe, vor der Intervention bei d49 und am Versuchsende bei d101 nach 8 Wochen FMT. Bei der Fäzes<sub>HFD+Veh</sub> behandelten Gruppe zeigten sich hier keine Unterschiede. Parallel zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen am Versuchsende. In der Beckmann Arbeit unter Verwendung von Ratten<sup>85</sup>, zeigten Tel behandelte Tiere ein spezifisches Mikrobiom während die Tiere, die mit Veh behandelt wurden, schlichtweg das für adipöse Tiere typische Mikrobiom aufwiesen. Bei der mit Fäzes<sub>HFD+Veh</sub> behandelten Gruppe erscheint es nur logisch, dass sich kein Unterschied zeigte. Bei d49 handelte es sich um adipöse HFD ernährte Tiere. Bei d101 wurden die Tiere 8 Wochen lang mit den Fäzes von adipösen, HFD ernährten und mit Veh behandelten Spendertieren transplantiert. Es war entsprechend zu erwarten, dass das transplantierte Mikrobiom, bis auf leichte interindividuelle Variationen, dem des Empfängers bereits sehr ähnlich war, und somit waren auch keine relevanten Unterschiede zu erwarten. Aus den Ergebnissen der Beckmann Arbeit mit Ratten<sup>85</sup> vermuten wir, dass bei den mit Fäzes<sub>HFD+Tel</sub> behandelten Tieren das Tel spezifische Mikrobiom transplantiert wurde, welches sich deutlich von dem eines HFD ernährten adipösen Tier unterscheidet. Die beobachteten Unterschiede vor und nach FMT decken sich somit mit den theoretischen Erwartungen und sprechen für die Effektivität der FMT Methodik. Zum Zeitpunkt d101 unterschieden sich beide Gruppen deutlich. In Anbetracht der Tatsache, dass der einzige Unterschied in der Behandlung beider Gruppen, die für den FMT benutzten Stuhlproben waren, zeigt, dass die angewandte Methodik einen klaren Effekt hat, und dass sich das Mikrobiom der Tiere verändert wurde.

Bei der gezielten Betrachtung der taxonomischen Daten konnten signifikante Unterschiede auf der Phylum-, Familien- sowie Genusebene zwischen den zwei Gruppen festgestellt werden. Die beobachteten Unterschiede bei den Phylum Actinobacteriota wie bei den Familien Lachnospiraceae und Erysipelothrichaceae in den mit Fäzes<sub>HFD+Tel</sub> behandelten Tieren decken sich gut mit den in der Beckmann

Studie mit Ratten<sup>85</sup> beobachteten Effekte von Tel auf das Mikrobiom. Besonderer Fokus kann auf die Familie Erysipelothrichaceae gelegt werden. Diese war in der Beckmann Studie bei den Tel behandelten Ratten reduziert sowohl im Vergleich zu den adipösen hochkalorisch ernährten Veh behandelten Tieren, als auch zu den normalgewichtigen Gruppen unabhängig davon, ob diese „perfeed“ mit HFD waren oder mit Normaldiät gefüttert wurden<sup>85</sup>. Bei den mit Fäzes<sub>HFD+Tel</sub> behandelten Tieren war die Erysipelothrichaceae Familie deutlich reduziert. In der Beckmann Arbeit wurde an Ratten experimentiert, die verwendete hochkalorische Diät war eine andere als hier und die Tel behandelten Tiere zeigten bei Versuchsende deutliche Unterschiede im ITT sowie der Körperzusammensetzung. Die Überschneidungen im Mikrobiom, insbesondere die Familie Erysipelothrichaceae sprechen trotz aller Differenzen im Aufbau der Beckmann Arbeit<sup>85</sup> im Vergleich zu dieser Arbeit hier für die Vergleichbarkeit des Mikrobioms der Fäzes<sub>HFD+Tel</sub> behandelten Tieren mit dem Tel spezifischen Mikrobiom.

Das Verhältnis zwischen Firmicutes und Bacteroides (F/B ratio) war zwischen beiden Gruppen nicht verschieden. Die F/B ratio wird bei der Analyse des Mikrobioms als Indikator für eine Dysbiosis oft aufgeführt. Die Aussagekraft ist allerdings limitiert, weil dabei unter anderem feinere meistens relevante Unterschiede in der taxonomischen Zusammensetzung nicht erfasst werden<sup>142</sup>.

Bei der Analyse der Phyla, zeigte sich bei der mit Fäzes<sub>HFD+Tel</sub> behandelten Gruppe eine geringere Abundanz der Firmicutes, Desulfobacterota und der Actinobacteriota. Dies erscheint schlüssig, da eine Vermehrung der Phyla Firmicutes und Actinobacteriota bei Adipositas beobachtet wurde<sup>143</sup>. Eine entscheidende Rolle für diese Veränderungen spielt die bei Adipositas vorhandene Dysbalance zwischen Energieaufnahme durch die Nahrung und dem Energieverbrauch<sup>143</sup>. Desulfobacterota sind hingegen etwas ambivalenter. Einerseits wurde eine Vermehrung der Häufigkeit von Desulfobacterota in Tieren beobachtet, welche eine natürliche Resistenz zur Entwicklung von HFD induzierten Adipositas haben<sup>144</sup>. Andererseits konnte bei Adipösen, HFD ernährten Versuchstieren eine Erhöhung der Häufigkeit der Desulfobacterota Fraktion beobachtet werden<sup>145,146</sup>. Bei der Therapie mit Fenofibrat, den Konsum von

Theabrownin (wichtiger Bestandteil von Fu Brick Tee) oder einer ballaststoffreichen Ernährung konnten bei HFD Tieren eine Gewichtsreduktion sowie eine Reduktion der Abundanz der Desulfobacterota festgestellt werden<sup>146–148</sup>. Es bleibt daher schwierig, die Rolle der Desulfobacterota im Kontext von Adipositas einzuordnen. Inwieweit die von uns beobachtete Reduktion der Desulfobacterota kausal mit der Gewichtsreduktion zusammenhängt, kann hier nicht ausreichend geklärt werden.

Bei den mit Fäzes<sub>HFD+Tel</sub> behandelten Tieren waren die Familien Ruminococcaceae, Desulfovibrionaceae, Butyricoccaceae, Erysipelothrichaceae, Lachnospiraceae, Lactobacillaceae seltener, während Pasteurellaceae häufiger vertreten waren. Dies erscheint schlüssig, da experimentell bei Übergewicht und metabolischem Syndrom Erysipelothrichaceae, Lachnospiraceae, Lactobacillaceae und Desulfovibrionaceae häufiger und Pasteurella seltener beobachtet wurden<sup>149–153</sup>. Ruminococcaceae Butyricoccaceae zeigten hingegen ein kontraintuitives Verhalten, da beide Familien bei Adipositas und HFD experimentell seltener vertreten sind<sup>153,154</sup>.

Auf Genus Ebene konnte bei den Fäzes<sub>HFD+Tel</sub> behandelten Tieren eine geringere Abundanz bei Lachnospiraceae, Ligilactobacillus, Schaedlerella, Oscilobacter, Ruminococcaceae, Kineothrix, Desulfovibrio und eine größere Abundanz bei CAG-495, Alistipes, Rodentibacter, Erysipelatodoclostridium beobachtet werden.

Bei den Genera können in der Literatur verschiedene Korrelationen mit Adipositas und der metabolischen Gesundheit beobachtet werden. Wie von unseren Daten zu erwarten war, sind bei Adipositas die Genera Lachnospiraceae und Desulfovibrio, signifikant mehr vertreten<sup>155,156</sup>, Schaedlerella korreliert positiv mit einer fettreichen hochkalorischen Diät<sup>157</sup>, während Alistipes weniger bei Adipositas vertreten ist<sup>158</sup>. Desulfovibrio, ein opportunistisch pathogener Erreger, spielt bei gesunden Individuen lediglich eine untergeordnete Rolle im Mikrobiom<sup>159</sup>. Desulfovibrio ist signifikant häufiger bei CED, Morbus Parkinson, kognitive Dysfunktionen, Myokard Infarkt, Autismus Spektrum Störungen, chronische autoimmune Nierenerkrankungen zu finden<sup>159</sup> und es besteht auch der starke Verdacht, dass Desulfovibrio die Entwicklung einer nicht alkoholischen Fettleber fördert<sup>160</sup>. Bei der Behandlung mit Probiotika, dem Lipasehemmer Orlistat und dem Farbstoff Zeaxanthin (Inhaltsstoff in Präparaten zur

Behandlung der Makuladegeneration) zeigte sich sowohl eine Gewichtsreduktion im Tiermodell als auch eine Reduktion von *Desulfovibrio*<sup>161–163</sup>. Eine Erhöhung von *Desulfovibrio* wurde auch im Menschen bei DMT2 Patienten beobachtet<sup>136,164</sup>. Eine ballaststoffreiche Ernährung führte in zwei verschiedenen Arbeiten neben einer Verbesserung der Glukoseutilisation in DMT2 Patienten zu einer deutlichen Reduktion von *Desulfovibrio*<sup>165,166</sup>. Alle diese Ergebnisse sprechen für eine wichtige Korrelation von *Desulfovibrio* und Adipositas. Ein wichtiger Metabolit von *Desulfovibrio*, neben SCFAs, ist Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S), welcher die Aktivität des N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptor steigert<sup>167</sup>. Der NMDA-Rezeptor spielt beim Fressverhalten wiederum eine wichtige Rolle. Durch selektive Blockade im Tiermodell kann eine Normalisierung der Nahrungsaufnahme sowie des Körpergewichts erzielt werden<sup>168</sup>. In unserer Arbeit hier wurde weder dieser Wirkmechanismus noch die SCFAs analysiert. Es kann trotzdem spekuliert werden, dass die Reduktion von *Desulfovibrio* bei den mit Fäzes<sub>HFD+Tel</sub> behandelten Tieren eine Rolle bei der Gewichtsreduktion spielt. Inwieweit *Desulfovibrio* eine zentrale Rolle im Tel spezifischen Mikrobiom spielt, kann aber hier nicht ausreichend geklärt werden.

Anders als in unserem Versuch sind bei Adipositas und HFD die Abundanzen von *Ligilactobacillus*, *Oscilobacter*, *Ruminococcaceae* und *Kinotrinx* experimentell reduziert<sup>153,169–171</sup> während die *Erysipelatodoclostridium* Fraktion vergrößert ist<sup>172</sup>. Bei CAG-495 ist lediglich eine größere Präsenz bei Colitis Ulcerosa Patienten bekannt<sup>173</sup> während *Rodentibacter* als opportunistisches Bakterium bei Mäusen und Ratten bekannt<sup>174</sup> ist.

Bei den mit Fäzes<sub>HFD+Tel</sub> behandelten Versuchstieren stammte das transplantierte Mikrobiom von HFD ernährten Spendertieren, welche durch die Tel Behandlung normalgewichtig sowie metabolisch gesund waren<sup>100</sup>. Es ist daher zu erwarten, dass trotz Übergewicht die Fäzes<sub>HFD+Tel</sub> behandelten Tiere viele Analogien zu einem Mikrobiom von normalgewichtigen, metabolisch gesunden Tieren aufweisen. Bei der Familie *Coriobacteriaceae* und den Genera *Oscilospiraceae*, *Akkermansia*, *Oscillospirales*, *Anaerotruncus* und *Ligilactobacillus*, welche häufiger bei normalgewichtigen, metabolisch gesunden Individuen zu finden sind, sind die

Ergebnisse eher kontraintuitiv. Die Abundanz bei den Fäzes<sub>HFD+Tel</sub> behandelten Versuchstieren ist geringer als bei den Fäzes<sub>HFD+Veh</sub> behandelten Tieren, obwohl man bei dem Mikrobiom von einem normalgewichtigen, metabolisch gesunden Spender das Gegenteil erwarten würde. Der augenscheinliche Widerspruch könnte damit erklärt werden, dass bei den Tel behandelten Spendern nach unseren Erkenntnissen aus der Beckmann Arbeit an Ratten ein spezifisches Mikrobiom vorliegt<sup>85</sup>, welches sich sowohl von übergewichtigen als auch normalgewichtigen Tieren unterscheidet. Entsprechend ist es plausibel, dass sich bei den adipösen Fäzes<sub>HFD+Tel</sub> behandelten Versuchstieren Analogien, sowie markante Unterschiede zu einem Mikrobiom von normalgewichtigen metabolisch gesunden Individuen zeigen. Darüber hinaus wurden die verglichenen Proben gegen Versuchsende gesammelt. In welcher Stärke FMT und Adipositas sich je nach Bakterienart auf das Mikrobiom auswirken, kann hier nicht endgültig beantwortet werden.

Bei der Korrelationsanalyse der Abundanz und des Körpergewichts zeigte sich ein sehr interessantes Bild, einerseits markante Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen und andererseits viele Überschneidungen zwischen den Ergebnissen und der Literatur. Alle signifikanten Korrelationen, bis auf die für das Genus Akkermansia, zeigten einen genau gegenteiligen Verlauf bei den beiden Versuchsgruppen.

Das Genus Akkermansia korreliert negativ mit dem Körpergewicht bei beiden Versuchsgruppen. Die Vermehrung dieser Familie wird in der Literatur mit Normalgewicht zusammengebracht<sup>175</sup>. Die Korrelation spricht am ehesten dafür, dass es keinen Effekt von Tel spezifischen Mikrobiom auf diese Familie gibt und die Abundanz durch das Körpergewicht maßgeblich beeinflusst ist.

Bei den Fäzes<sub>HFD+Veh</sub> behandelten Tieren zeigten die Phyla Desulfobacterota, Firmicutes, die Familien Desulfovibrionaceae, Desulfovibrionia, Lachnospiraceae, Oscillospiraceae und die Genera Acetatifactor, Desulfovibrio, Desulfovibrionia, Lachnospiraceae, Ruminococcaceae eine positive Korrelation zum Körpergewicht, während Alistipes negativ korrelieren. In der Literatur sind die Phyla Desulfobacterota, Firmicutes, die Familien Desulfovibrionaceae, Lachnospiraceae, und die Genera

Acetatifactor, Desulfovibrio, Lachnospiraceae bei Adipositas häufiger zu finden, Alistipes sind dagegen seltener<sup>145,152,155,156,158,176,177</sup>. Wie bereits weiter oben besprochen, sind diese Ergebnisse zu erwarten, da die Fäzes<sub>HFD+Veh</sub> behandelten Tiere in plausibler Weise das Mikrobiom von Adipösen HFD Tieren aufweisen. Die Fäzes<sub>HFD+Tel</sub> behandelten Tiere zeigten die gegenteiligen Korrelationen im Vergleich zur Fäzes<sub>HFD+Veh</sub> behandelten Gruppe. Dies spricht einmal mehr für die markanten Unterschiede in dem Mikrobiom beider Gruppen. Darüber hinaus zeigte dies wie die Fäzes<sub>HFD+Tel</sub> behandelten Tiere trotz Adipositas viele Überschneidungen mit einem Mikrobiom normalgewichtiger Tiere aufweisen. Die Familie Oscilospiraceae und die Genera Desulfovibrionia, Ruminococcaceae sind in der Literatur seltener bei Adipositas zu finden<sup>153,178,179</sup>; diese korrelieren negativ bei den Fäzes<sub>HFD+Tel</sub> behandelten Tieren und positiv bei den Fäzes<sub>HFD+Veh</sub> behandelten Gruppen mit dem Körpergewicht. Dieses eher kontraintuitive Bild zeigte die weiter oben bereits beobachteten Überschneidungen zwischen adipösem Mikrobiom und Fäzes<sub>HFD+Tel</sub> behandelten Tieren. Wie bereits erwähnt, könnte dies auf das transplantierte Tel spezifische Mikrobiom zurückzuführen sein, welches sich sowohl von adipösen wie auch normalgewichtigen Tieren unterscheidet<sup>85</sup>. Auf der anderen Seite sind die beobachteten Korrelationen bei Oscilospiraceae, Desulfovibrionia und Ruminococcaceae bei den Fäzes<sub>HFD+Veh</sub> behandelten Tieren auch kontraintuitiv. Die genauen Gründe dafür bleiben unklar. Es könnte spekuliert werden, ob dies auf einen FMT assoziierten Effekt selbst zurückzuführen ist oder ob dieses Muster schon in der Spender Fäzes vorlag. Allerdings liegen keine Daten zu der mikrobiologischen Zusammensetzung der Spender Fäzes vor. Desweiteren könnte spekuliert werden, dass einige Arten aus den Spender Fäzes sich besser im Empfänger ansiedeln als andere. Aus der klinischen Praxis ist bekannt, dass die Ähnlichkeit der Darmflora von Empfänger und Spender eine wichtige Rolle für den Erfolg von FMT spielt<sup>115</sup>. Dies wird unter anderem auf die unterschiedliche Stärke der Immunantwort des Spenders auf das neue Mikrobiom zurückgeführt<sup>73</sup>. Die Korrelationen könnten auch dafürsprechen, dass hochgewichtiger Tiere anders auf die FMT ansprechen.

## 4.5 Methodik

Ein zentraler Baustein dieser Arbeit ist die FMT Methodik. Für den FMT wurden bewusst gefrorene Stuhlproben verwendet. Prinzipiell wäre es auch möglich frische Stuhlproben zu verwenden, welche von Spendertieren gesammelt werden, die den Versuchstieren zugeordnet werden und dem vorgesehenen Fütterungs- sowie Medikationsregime unterzogen werden. Für diese Methodik wären jedoch eine hohe Anzahl an Spendertieren zusätzlich zu den Versuchstieren notwendig gewesen. Das hätte deutlich die logistische Komplexität sowie die notwendigen Kapazitäten in der Tierhaltung erhöht. Nachweislich gibt es keinen signifikanten Nachteil bei dem FMT, wenn gefrorene Stuhlproben verwendet werden<sup>180</sup>. Entsprechend wurden in dieser Arbeit gefrorene Proben verwendet, welche in einer Vorgängerstudie<sup>100</sup> der Arbeitsgruppe gesammelt wurden. Die für die FMT verwendeten Proben wurden innerhalb einer Stunde nach der Ausscheidung gesammelt und eingefroren. Entsprechend waren diese einem verlängerten Kontakt mit Sauerstoff ausgesetzt. Für einen erfolgreichen FMT sind lebende Bakterien unerlässlich. Da es sich bei der Darmflora Großteiles um anaerobe Bakterien handelt, zeigt sich hier ein möglicher kritischer Punkt. In einigen Studien wurden die Proben für die FMT im Rahmen der Tötung direkt aus dem Colon in einer sauerstofffreien Umgebung gesammelt. Bei einer solchen Methode kann nur sehr wenig und einmalig Material von jedem Spendertier gewonnen werden, entsprechend wäre hier eine sehr große Anzahl an Tieren notwendig. Experimentell konnte gezeigt werden, dass bei Stuhlproben auch nach über einer Stunde Luftexposition noch über 50% der Bakterien, aerob wie anaerob, lebendig und anzüchtbar sind<sup>181</sup>. Aufgrund der geschilderten Datenlage, wenngleich kein Anzuchtversuch oder mikrobiologische Analyse der Stuhlproben stattgefunden hat, ist davon auszugehen, dass eine ausreichende Anzahl an lebenden und für die Darmflora repräsentativen Bakterien für die FMT verwendet wurden.

Eine vorherige antibiotische Therapie, um das native Mikrobiom zu reduzieren, ist nach aktuellen Erkenntnissen nicht notwendig. Ganz im Gegenteil könnte dies eher

kontraproduktiv sein, da sich die Effekte auf die Darmflora beider Maßnahmen kombinieren würden und damit zusätzliche Störfaktoren einbringen würden<sup>182</sup>.

Bei der Aufbereitung der Stuhlproben für den FMT wurden die Stuhlproben im Endeffekt um einen Faktor 1:100 verdünnt. Die von Ellekilde et al. etablierte Methode<sup>101</sup>, die wir repliziert haben, hat eine Verdünnung von 1:50 vorgesehen. Die Änderung im Protokoll war notwendig, weil schlichtweg nicht genug Stuhlproben vorhanden waren, um mit der vorgesehenen Verdünnung eine ausreichende Menge an Suspension für die vorgesehene Dauer des Versuches zu generieren. Aufgrund der großen Variabilität in der Zusammensetzung von Stuhlproben, wie beispielweise dem Feuchtigkeitsgehalt, ist generell eine gewisse Variabilität bei der FMT vorprogrammiert. Darüber hinaus gibt es keinen genauen Nachweis welche Menge Stuhlprobe das Optimum für einen FMT darstellt<sup>183</sup>. In verschiedenen Arbeiten haben sich deutlich verschiedene Schemata bewährt<sup>184</sup>. Es ist daher davon auszugehen, dass die aus der Notwendigkeit entstandene Verdopplung der Verdünnung keinen Nachteil darstellt. Die beobachteten Mikrobiomunterschiede, insbesondere die Beta-Diversität vor FMT-Start und am Ende des Versuches sprechen für einen deutlichen Effekt der Intervention. Im Rahmen dieser, wie anderer Arbeiten, werden die mikrobiologische Zusammensetzung von Stuhlproben sowie die Darmflora als vergleichbar angesehen. Unterschiede je nach Lokalisation der Proben innerhalb des Magendarmtraktes sind bekannt, experimentell konnte jedoch gezeigt werden, dass die mikrobiologische Zusammensetzung von den Fäzes sowie dem Colon Mikrobiom miteinander gut vergleichbar sind<sup>185</sup>.

## 4.6 Limitierungen

Diese Arbeit weist mehrere methodische Limitierungen auf, welche bei zukünftigen Studien adressiert werden könnten. Es wird nur der Einfluss von einem FMT mit Fäzes<sub>HFD+Tel</sub> auf HFD ernährte Tiere analysiert. Zwei nicht hochkalorisch ernährte Gruppen, welche jeweils mit Fäzes<sub>HFD+Tel</sub> oder mit Fäzes<sub>HFD+Veh</sub> FMT behandelt werden,

wären ein möglicherweise interessant, insbesondere um die metabolischen Parameter besser vergleichen und einordnen zu können.

Durch die schlechte Compliance der Tiere mit der Kalorimetrie konnten im Endeffekt nur 3 Wochen für die Gewichtsentwicklung ausgewertet werden. Eine deutlich längere auswertbare Interventionsdauer, wie etwa die 8 Wochen aus den vorherigen Studien unserer Arbeitsgruppe<sup>82,100</sup> wäre anzustreben. Eine zukünftige Arbeit ohne Kalorimetrie oder mit der Messung nach 8 Wochen FMT könnte die hier entstandene Limitierung adressieren.

## 4.7 Fazit

Abschließend kann gesagt werden, dass der FMT von Fäzes<sub>HDF+Tel</sub> die Effekte der direkten medikamentösen Behandlung teilweise replizieren kann, insbesondere ist ein klarer Effekt auf die Gewichtsentwicklung zu beobachten. Gleichmaßen zeigen die Fäzes<sub>HDF+Tel</sub> Empfänger im Mikrobiom deutliche Überschneidungen zu einem Tel spezifischen Mikrobiom sowie markante Unterschiede zu der Kontrollgruppe. Trotz aller Limitierungen, wie beispielweise die Dauer, die Anzahl an Versuchstieren oder die fehlende mikrobiologische Analyse der verwendeten Proben, dient diese Arbeit als Proof of Principle für die Beobachtungen zum Tel spezifischen Mikrobiom in der Beckmann Studie an Ratten<sup>85</sup>. Diese Arbeit hier kann als Basis für weitere Studien fungieren, um zu klären, wie genau sich das Tel spezifische Mikrobiom auf den Metabolismus auswirkt, beispielsweise über eine Analyse der SCFAs.

## 5 Zusammenfassung

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass hochdosiertes Telmisartan antiadipöse Effekte bei hochkalorisch ernährten Tieren hat<sup>79,129</sup>. Zudem besaßen Telmisartan behandelte Ratten ein spezifisches und klar zuordenbares Mikrobiom<sup>85</sup>. Ziel des hier vorgelegten Dissertationsprojektes war es, diese Assoziation mittels einer alternativen Strategie zu überprüfen. Dafür erhielten zwei hochkalorisch gefütterte Gruppen a 12 Mäusen Stuhltransplantationen über einen Zeitraum von 7 Wochen. Diese Stuhlproben stammten von Spendermäusen aus der Studie von Huber et al.<sup>100</sup>, in der die hochkalorisch gefütterten Spendertiere entweder mit Vehikel oder hochdosiertem Telmisartan behandelt wurden. Bei den Mäusen, welche Fäzes von Telmisartan behandelten Spendern erhielten, war das Körpergewicht nach 3 Wochen reduziert. Es haben sich keine signifikanten Unterschiede im Energieverbrauch, der Lokomotion, dem Fress- und Trinkverhalten der Insulinsensibilität sowie die Körperzusammensetzung beider Gruppen gezeigt. Das Mikrobiom der Mäuse, die Fäzes von Telmisartan behandelten Spendern erhielten, zeigte tendenzielle Unterschiede in der Alpha-Diversität und signifikante Unterschiede in der Beta-Diversität vor Stuhltransplantation und am Versuchsende, was für einen klaren Effekt der Stuhltransplantation spricht. Auf taxonomischer Ebene zeigten sich Unterschiede bei den Phylum Actinobacteriota, bei den Familien Lachnospiraceae und Erysipelothrichaceae, was mit den Vorbefunden von Telmisartan behandelten Ratten übereinstimmt<sup>85</sup>. Von besonderem Interesse ist die Reduktion des opportunistisch pathogenen Erregers *Desulfovibrio*<sup>159</sup> bei den Mäusen, die Fäzes von Telmisartan behandelten Spendern erhielten. *Desulfovibrio* ist bei einer Vielzahl an intestinalen und extraintestinalen Erkrankungen vermehrt zu finden<sup>160</sup>. Während Gewichtsreduktionen und Verbesserungen der Glukoseutilisation mit einer Reduktion von *Desulfovibrio* korrelieren<sup>161–163</sup>. Die Modulation des N-Methyl-D-Aspartat Rezeptors sowie ein PPAR $\gamma$  vermittelter Effekt durch den von *Desulfovibrio* metabolisierten Schwefelwasserstoff könnten eine zentrale Rolle in der Gewichtsveränderung sowie der Glukoseutilisation spielen<sup>138–140,167,168</sup>.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Chooi, Y. C., Ding, C. & Magkos, F. The epidemiology of obesity. *Metabolism* 92, 6–10 (2019).
2. Bhurosy, T. & Jeewon, R. Overweight and Obesity Epidemic in Developing Countries: A Problem with Diet, Physical Activity, or Socioeconomic Status? *The Scientific World Journal* 2014, 1–7 (2014).
3. Engin, A. The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. *Adv Exp Med Biol* 960, 1–17 (2017).
4. Ortega, F. B., Sui, X., Lavie, C. J. & Blair, S. N. Body Mass Index, the Most Widely Used But Also Widely Criticized Index: Would a Criterion Standard Measure of Total Body Fat Be a Better Predictor of Cardiovascular Disease Mortality? *Mayo Clin Proc* 91, 443–455 (2016).
5. Jiang, S.-Z., Lu, W., Zong, X.-F., Ruan, H.-Y. & Liu, Y. Obesity and hypertension. *Experimental and Therapeutic Medicine* 12, 2395–2399 (2016).
6. Klein, S., Gastaldelli, A., Yki-Järvinen, H. & Scherer, P. E. Why does obesity cause diabetes? *Cell Metabolism* 34, 11–20 (2022).
7. Mannan, M., Mamun, A., Doi, S. & Clavarino, A. Prospective Associations between Depression and Obesity for Adolescent Males and Females- A Systematic Review and Meta-Analysis of Longitudinal Studies. *PLoS ONE* 11, e0157240 (2016).
8. Sutaria, S., Devakumar, D., Yasuda, S. S., Das, S. & Saxena, S. Is obesity associated with depression in children? Systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child* 104, 64–74 (2019).
9. Amiri, S. & Behnezhad, S. Obesity and anxiety symptoms: a systematic review and meta-analysis. *Neuropsychiatr* 33, 72–89 (2019).
10. Dye, L., Boyle, N. B., Champ, C. & Lawton, C. The relationship between obesity and cognitive health and decline. *Proc. Nutr. Soc.* 76, 443–454 (2017).
11. Hernandez Torres, L. D., Rezende, F., Peschke, E., Will, O., Hövener, J.-B., Spiecker, F., Özorhan, Ü., Lampe, J., Stölting, I., Aherrahrou, Z., Künne, C., Kusche-Vihrog, K., Matschl, U., Hille, S., Brandes, R. P., Schwaninger, M., Müller, O. J. & Raasch, W. Incidence of microvascular dysfunction is increased in hyperlipidemic mice, reducing cerebral blood flow and impairing remote memory. *Front. Endocrinol.* 15, 1338458 (2024).
12. Blagojevic, M., Jinks, C., Jeffery, A. & Jordan, K. P. Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage* 18, 24–33 (2010).
13. Jiang, L., Rong, J., Wang, Y., Hu, F., Bao, C., Li, X. & Zhao, Y. The relationship between body mass index and hip osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Joint Bone Spine* 78, 150–155 (2011).
14. Deng, T., Lyon, C. J., Bergin, S., Caligiuri, M. A. & Hsueh, W. A. Obesity, Inflammation, and Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 11, 421–449 (2016).
15. Peeters, A., Barendregt, J. J., Willekens, F., Mackenbach, J. P., Al Mamun, A., Bonneux, L., & NEDCOM, the Netherlands Epidemiology and Demography Compression of Morbidity Research Group. Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis. *Ann Intern Med* 138, 24–32 (2003).
16. Romieu, I., Dossus, L., Barquera, S., Blotière, H. M., Franks, P. W., Gunter, M., Hwalla, N., Hursting, S. D., Leitzmann, M., Margetts, B., Nishida, C., Potischman, N., Seidell, J., Stepien, M., Wang, Y., Westterterp, K., Winichagoon, P., Wiseman, M., Willett, W. C., & IARC working group on Energy Balance and Obesity. Energy balance and obesity: what are the main drivers? *Cancer Causes Control* 28, 247–258 (2017).
17. Westterterp, K. R., Donkers, J. H., Fredrix, E. W. & Boekhoudt, P. Energy intake, physical activity and body weight: a simulation model. *Br J Nutr* 73, 337–347 (1995).
18. Pérez-Escamilla, R., Obbagy, J. E., Altman, J. M., Essery, E. V., McGrane, M. M., Wong, Y. P., Spahn, J. M. & Williams, C. L. Dietary Energy Density and Body Weight in Adults and Children: A Systematic Review. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* 112, 671–684 (2012).
19. Poti, J. M., Braga, B. & Qin, B. Ultra-processed Food Intake and Obesity: What Really Matters for Health- Processing or Nutrient Content? *Curr Obes Rep* 6, 420–431 (2017).
20. Martínez-González, M. A., Martínez, J. A., Hu, F. B., Gibney, M. J. & Kearney, J. Physical inactivity, sedentary lifestyle and obesity in the European Union. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23, 1192–1201 (1999).
21. Keith, S. W., Redden, D. T., Katzmarzyk, P. T., Boggiano, M. M., Hanlon, E. C., Benca, R. M., Ruden, D., Pietrobelli, A., Barger, J. L., Fontaine, K. R., Wang, C., Aronne, L. J., Wright, S. M., Baskin, M., Dhurandhar, N. V., Lijoi, M. C., Grilo, C. M., DeLuca, M., Westfall, A. O. & Allison, D. B. Putative contributors to the secular increase in obesity: exploring the roads less traveled. *Int J Obes (Lond)* 30, 1585–1594 (2006).
22. Matijašić, M., Meštrović, T., Paljetak, H. Č., Perić, M., Barešić, A. & Verbanac, D. Gut Microbiota beyond Bacteria-Mycobiome, Virome, Archaeome, and Eukaryotic Parasites in IBD. *Int J Mol Sci* 21, (2020).
23. Sender, R., Fuchs, S. & Milo, R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell* 164, 337–340 (2016).
24. Luckey, T. D. Introduction to intestinal microecology. *Am J Clin Nutr* 25, 1292–1294 (1972).
25. Flint, H. J., Scott, K. P., Louis, P. & Duncan, S. H. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9, 577–589 (2012).
26. Almeida, A., Mitchell, A. L., Boland, M., Forster, S. C., Gloor, G. B., Tarkowska, A., Lawley, T. D. & Finn, R. D. A new genomic blueprint of the human gut microbiota. *Nature* 568, 499–504 (2019).

27. Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G., Gasbarrini, A. & Mele, M. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* 7, 14 (2019).
28. Tap, J., Mondot, S., Levenez, F., Pelletier, E., Caron, C., Furet, J.-P., Ugarte, E., Muñoz-Tamayo, R., Paslier, D. L. E., Nalin, R., Dore, J. & Leclerc, M. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environmental Microbiology* 11, 2574–2584 (2009).
29. Yang, T., Santisteban, M. M., Rodriguez, V., Li, E., Ahmari, N., Carvajal, J. M., Zadeh, M., Gong, M., Qi, Y., Zubcevic, J., Sahay, B., Pepine, C. J., Raizada, M. K. & Mohamadzadeh, M. Gut Dysbiosis Is Linked to Hypertension. *Hypertension* 65, 1331–1340 (2015).
30. Costea, P. I., Hildebrand, F., Arumugam, M., Bäckhed, F., Blaser, M. J., Bushman, F. D., de Vos, W. M., Ehrlich, S. D., Fraser, C. M., Hattori, M., Huttenhower, C., Jeffery, I. B., Knights, D., Lewis, J. D., Ley, R. E., Ochman, H., O'Toole, P. W., Quince, C., Relman, D. A., Shanahan, F., Sunagawa, S., Wang, J., Weinstock, G. M., Wu, G. D., Zeller, G., Zhao, L., Raes, J., Knight, R. & Bork, P. Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nat Microbiol* 3, 8–16 (2018).
31. Salminen, S. Influence of mode of delivery on gut microbiota composition in seven year old children. *Gut* 53, 1388–1389 (2004).
32. Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N. & Knight, R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 11971–11975 (2010).
33. Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F. F., Snijders, B., Kummeling, I., van den Brandt, P. A. & Stobberingh, E. E. Factors Influencing the Composition of the Intestinal Microbiota in Early Infancy. *Pediatrics* 118, 511–521 (2006).
34. Lugli, G. A., Mancabelli, L., Milani, C., Fontana, F., Tarracchini, C., Alessandri, G., Van Sinderen, D., Turrone, F. & Ventura, M. Comprehensive insights from composition to functional microbe-based biodiversity of the infant human gut microbiota. *npj Biofilms Microbiomes* 9, 25 (2023).
35. Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., Belzer, C., Delgado Palacio, S., Arbolea Montes, S., Mancabelli, L., Lugli, G. A., Rodriguez, J. M., Bode, L., De Vos, W., Gueimonde, M., Margolles, A., Van Sinderen, D. & Ventura, M. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev* 81, e00036-17 (2017).
36. Bai, J., Hu, Y. & Bruner, D. W. Composition of gut microbiota and its association with body mass index and lifestyle factors in a cohort of 7-18 years old children from the American Gut Project: Gut microbiota and BMI in children. *Pediatric Obesity* 14, e12480 (2019).
37. David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J. & Turnbaugh, P. J. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 505, 559–563 (2014).
38. De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J. B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G. & Lionetti, P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 14691–14696 (2010).
39. Hansen, D., De Strijcker, D. & Calders, P. Impact of Endurance Exercise Training in the Fasted State on Muscle Biochemistry and Metabolism in Healthy Subjects: Can These Effects be of Particular Clinical Benefit to Type 2 Diabetes Mellitus and Insulin-Resistant Patients? *Sports Med* 47, 415–428 (2017).
40. Evans, C. C., LePard, K. J., Kwak, J. W., Stancukas, M. C., Laskowski, S., Dougherty, J., Moulton, L., Glawe, A., Wang, Y., Leone, V., Antonopoulos, D. A., Smith, D., Chang, E. B. & Ciancio, M. J. Exercise Prevents Weight Gain and Alters the Gut Microbiota in a Mouse Model of High Fat Diet-Induced Obesity. *PLoS ONE* 9, e92193 (2014).
41. Aya, V., Flórez, A., Perez, L. & Ramírez, J. D. Association between physical activity and changes in intestinal microbiota composition: A systematic review. *PLoS ONE* 16, e0247039 (2021).
42. Bermon, S., Petriz, B., Kajénienè, A., Prestes, J., Castell, L. & Franco, O. L. The microbiota: an exercise immunology perspective. *Exerc Immunol Rev* 21, 70–79 (2015).
43. Sze, M. A. & Schloss, P. D. Looking for a Signal in the Noise: Revisiting Obesity and the Microbiome. *mBio* 7, (2016).
44. Lv, Y., Qin, X., Jia, H., Chen, S., Sun, W. & Wang, X. The association between gut microbiota composition and BMI in Chinese male college students, as analysed by next-generation sequencing. *Br J Nutr* 122, 986–995 (2019).
45. Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R. & Gordon, J. I. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027–1031 (2006).
46. Seganfredo, F. B., Blume, C. A., Moehlecke, M., Giongo, A., Casagrande, D. S., Spolidoro, J. V. N., Padoin, A. V., Schaan, B. D. & Mottin, C. C. Weight-loss interventions and gut microbiota changes in overweight and obese patients: a systematic review: Weight-loss impact on gut microbiota. *Obesity Reviews* 18, 832–851 (2017).
47. Lee, M. & Chang, E. B. Inflammatory Bowel Diseases (IBD) and the Microbiome—Searching the Crime Scene for Clues. *Gastroenterology* 160, 524–537 (2021).
48. Glymenaki, M., Singh, G., Brass, A., Warhurst, G., McBain, A. J., Else, K. J. & Cruickshank, S. M. Compositional Changes in the Gut Mucus Microbiota Precede the Onset of Colitis-Induced Inflammation: *Inflammatory Bowel Diseases* 23, 912–922 (2017).
49. Gurung, M., Li, Z., You, H., Rodrigues, R., Jump, D. B., Morgun, A. & Shulzhenko, N. Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology. *EBioMedicine* 51, 102590 (2020).

50. Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Tuohy, K. M., Chabo, C., Waget, A., Delmée, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrières, J., Tanti, J.-F., Gibson, G. R., Castella, L., Delzenne, N. M., Alessi, M. C. & Burcelin, R. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* 56, 1761–1772 (2007).
51. Kim, S.-H., Huh, C.-S., Choi, I.-D., Jeong, J.-W., Ku, H.-K., Ra, J.-H., Kim, T.-Y., Kim, G.-B., Sim, J.-H. & Ahn, Y.-T. The anti-diabetic activity of *Bifidobacterium lactis* HY8101 *in vitro* and *in vivo*. *J Appl Microbiol* 117, 834–845 (2014).
52. Romano, S., Savva, G. M., Bedarf, J. R., Charles, I. G., Hildebrand, F. & Narbad, A. Meta-analysis of the Parkinson's disease gut microbiome suggests alterations linked to intestinal inflammation. *npj Parkinsons Dis.* 7, 27 (2021).
53. Megur, A., Baltriukienė, D., Bukelskienė, V. & Burokas, A. The Microbiota–Gut–Brain Axis and Alzheimer's Disease: Neuroinflammation Is to Blame? *Nutrients* 13, 37 (2020).
54. Kostic, A. D., Chun, E., Robertson, L., Glickman, J. N., Gallini, C. A., Michaud, M., Clancy, T. E., Chung, D. C., Lochhead, P., Hold, G. L., El-Omar, E. M., Brenner, D., Fuchs, C. S., Meyerson, M. & Garrett, W. S. *Fusobacterium nucleatum* Potentiates Intestinal Tumorigenesis and Modulates the Tumor-Immune Microenvironment. *Cell Host & Microbe* 14, 207–215 (2013).
55. Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J.-M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H. B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E. G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos, W. M., Brunak, S., Doré, J., MetaHIT Consortium, Antolin, M., Artiguenave, F., Blottiere, H. M., Almeida, M., Brechot, C., Cara, C., Chervaux, C., Cultrone, A., Delorme, C., Denariuz, G., Dervyn, R., Foerster, K. U., Friss, C., van de Guchte, M., Guedon, E., Haimet, F., Huber, W., van Hylckama-Vlieg, J., Jamet, A., Juste, C., Kaci, G., Knol, J., Lakhdari, O., Layec, S., Le Roux, K., Maguin, E., Mérieux, A., Melo Minardi, R., M'rine, C., Muller, J., Oozeer, R., Parkhill, J., Renault, P., Rescigno, M., Sanchez, N., Sunagawa, S., Torrejon, A., Turner, K., Vandemeulebrouck, G., Varela, E., Winogradsky, Y., Zeller, G., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D. & Bork, P. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473, 174–180 (2011).
56. Borgo, F., Riva, A., Benetti, A., Casiraghi, M. C., Bertelli, S., Garbossa, S., Anselmetti, S., Scarone, S., Pontiroli, A. E., Morace, G. & Borghi, E. Microbiota in anorexia nervosa: The triangle between bacterial species, metabolites and psychological tests. *PLoS ONE* 12, e0179739 (2017).
57. Ríos-Covián, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., de Los Reyes-Gavilán, C. G. & Salazar, N. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Front Microbiol* 7, 185 (2016).
58. den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D.-J. & Bakker, B. M. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J. Lipid Res.* 54, 2325–2340 (2013).
59. Chambers, E. S., Preston, T., Frost, G. & Morrison, D. J. Role of Gut Microbiota-Generated Short-Chain Fatty Acids in Metabolic and Cardiovascular Health. *Curr Nutr Rep* 7, 198–206 (2018).
60. Holmes, Z. C., Silverman, J. D., Dressman, H. K., Wei, Z., Dallow, E. P., Armstrong, S. C., Seed, P. C., Rawls, J. F. & David, L. A. Short-Chain Fatty Acid Production by Gut Microbiota from Children with Obesity Differs According to Prebiotic Choice and Bacterial Community Composition. *mBio* 11, (2020).
61. Walker, A. W., Duncan, S. H., McWilliam Leitch, E. C., Child, M. W. & Flint, H. J. pH and Peptide Supply Can Radically Alter Bacterial Populations and Short-Chain Fatty Acid Ratios within Microbial Communities from the Human Colon. *Appl Environ Microbiol* 71, 3692–3700 (2005).
62. Vidyasagar, S., Barmeyer, C., Geibel, J., Binder, H. J. & Rajendran, V. M. Role of short-chain fatty acids in kic HCO<sub>3</sub> secretion. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 288, G1217–G1226 (2005).
63. Byrne, C. S., Chambers, E. S., Morrison, D. J. & Frost, G. The role of short chain fatty acids in appetite regulation and energy homeostasis. *Int J Obes* 39, 1331–1338 (2015).
64. Frost, G., Sleeth, M. L., Sahuri-Arisoylu, M., Lizarbe, B., Cerdan, S., Brody, L., Anastasovska, J., Ghourab, S., Hankir, M., Zhang, S., Carling, D., Swann, J. R., Gibson, G., Viardot, A., Morrison, D., Louise Thomas, E. & Bell, J. D. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nat Commun* 5, 3611 (2014).
65. Cammarota, G., Ianiro, G., Tilg, H., Rajilić-Stojanović, M., Kump, P., Satokari, R., Sokol, H., Arkkila, P., Pintus, C., Hart, A., Segal, J., Aloji, M., Masucci, L., Molinaro, A., Scaldaferrri, F., Gasbarrini, G., Lopez-Sanroman, A., Link, A., de Groot, P., de Vos, W. M., Högenauer, C., Malfertheiner, P., Mattila, E., Milosavljević, T., Nieuwdorp, M., Sanguinetti, M., Simren, M. & Gasbarrini, A. European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut* 66, 569–580 (2017).
66. Quraishi, M. N., Widlak, M., Bhala, N., Moore, D., Price, M., Sharma, N. & Iqbal, T. H. Systematic review with meta-analysis: the efficacy of faecal microbiota transplantation for the treatment of recurrent and refractory *Clostridium difficile* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 46, 479–493 (2017).
67. Aron-Wisnewsky, J., Clément, K. & Nieuwdorp, M. Fecal Microbiota Transplantation: a Future Therapeutic Option for Obesity/Diabetes? *Curr Diab Rep* 19, 51 (2019).
68. de Groot, P. F., Frissen, M. N., de Clercq, N. C. & Nieuwdorp, M. Fecal microbiota transplantation in metabolic syndrome: History, present and future. *Gut Microbes* 8, 253–267 (2017).
69. Lahtinen, P., Juuti, A., Luostarinen, M., Niskanen, L., Liukkonen, T., Tillonen, J., Kössi, J., Ilvesmäki, V., Viljakka, M., Satokari, R. & Arkkila, P. Effectiveness of Fecal Microbiota Transplantation for Weight Loss in Patients With Obesity Undergoing Bariatric Surgery: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw Open* 5, e2247226 (2022).

70. Leong, K. S. W., Jayasinghe, T. N., Wilson, B. C., Derraik, J. G. B., Albert, B. B., Chiavaroli, V., Svirskis, D. M., Beck, K. L., Conlon, C. A., Jiang, Y., Schierding, W., Vatanen, T., Holland, D. J., O'Sullivan, J. M. & Cutfield, W. S. Effects of Fecal Microbiome Transfer in Adolescents With Obesity: The Gut Bugs Randomized Controlled Trial. *JAMA Netw Open* 3, e2030415 (2020).
71. Vrieze, A., Van Nood, E., Holleman, F., Salojärvi, J., Kootte, R. S., Bartelsman, J. F. W. M., Dallinga-Thie, G. M., Ackermans, M. T., Serlie, M. J., Oozeer, R., Derrien, M., Druesne, A., Van Hylckama Vlieg, J. E. T., Bloks, V. W., Groen, A. K., Heilig, H. G. H. J., Zoetendal, E. G., Stroes, E. S., de Vos, W. M., Hoekstra, J. B. L. & Nieuwdorp, M. Transfer of Intestinal Microbiota From Lean Donors Increases Insulin Sensitivity in Individuals With Metabolic Syndrome. *Gastroenterology* 143, 913-916.e7 (2012).
72. Kump, P., Wurm, P., Gröchenig, H. P., Wenzl, H., Petritsch, W., Halwachs, B., Wagner, M., Stadlbauer, V., Eherer, A., Hoffmann, K. M., Deutschmann, A., Reicht, G., Reiter, L., Slawitsch, P., Gorkiewicz, G. & Högenauer, C. The taxonomic composition of the donor intestinal microbiota is a major factor influencing the efficacy of faecal microbiota transplantation in therapy refractory ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 47, 67–77 (2018).
73. Wilson, B. C., Vatanen, T., Cutfield, W. S. & O'Sullivan, J. M. The Super-Donor Phenomenon in Fecal Microbiota Transplantation. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 2 (2019).
74. Ianiro, G., Porcari, S., Bibbò, S., Giambò, F., Quaranta, G., Masucci, L., Sanguinetti, M., Gasbarrini, A. & Cammarota, G. Donor program for fecal microbiota transplantation: A 3-year experience of a large-volume Italian stool bank. *Digestive and Liver Disease* 53, 1428–1432 (2021).
75. Napolitano, M. & Covasa, M. Microbiota Transplant in the Treatment of Obesity and Diabetes: Current and Future Perspectives. *Front. Microbiol.* 11, 590370 (2020).
76. Atlas, S. A. The Renin-Angiotensin Aldosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition. *JMCP* 13, 9–20 (2007).
77. Ruilope, L. M., Rosei, E. A., Bakris, G. L., Mancia, G., Poulter, N. R., Taddei, S., Unger, T., Volpe, M., Waeber, B. & Zannad, F. Angiotensin receptor blockers: Therapeutic targets and cardiovascular protection. *Blood Pressure* 14, 196–209 (2005).
78. Kintscher, U., Bramlage, P., Paar, W. D., Thoenes, M. & Unger, T. Irbesartan for the treatment of hypertension in patients with the metabolic syndrome: A sub analysis of the Treat to Target post authorization survey. Prospective observational, two armed study in 14,200 patients. *Cardiovasc Diabetol* 6, 12 (2007).
79. Müller-Fielitz, H., Markert, A., Wittmershaus, C., Pahlke, F., Jöhren, O. & Raasch, W. Weight loss and hypophagia after high-dose AT1-blockade is only observed after high dosing and depends on regular leptin signalling but not blood pressure. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 383, 373–384 (2011).
80. Müller-Fielitz, H., Hübel, N., Mildner, M., Vogt, F. M., Barkhausen, J. & Raasch, W. Chronic blockade of angiotensin AT<sub>1</sub> receptors improves cardinal symptoms of metabolic syndrome in diet-induced obesity in rats. *Br J Pharmacol* 171, 746–760 (2014).
81. Müller-Fielitz, H., Lau, M., Geißler, C., Werner, L., Winkler, M. & Raasch, W. Preventing leptin resistance by blocking angiotensin II AT<sub>1</sub> receptors in diet-induced obese rats: Leptin sensitivity and AT<sub>1</sub> receptor blockade. *Br J Pharmacol* 172, 857–868 (2015).
82. Schuster, F., Huber, G., Stölting, I., Wing, E. E., Saar, K., Hübner, N., Banks, W. A. & Raasch, W. Telmisartan prevents diet-induced obesity and preserves leptin transport across the blood-brain barrier in high-fat diet-fed mice. *Pflugers Arch* 470, 1673–1689 (2018).
83. Schuchard, J., Winkler, M., Stölting, I., Schuster, F., Vogt, F. M., Barkhausen, J., Thorns, C., Santos, R. A., Bader, M. & Raasch, W. Lack of weight gain after angiotensin AT<sub>1</sub> receptor blockade in diet-induced obesity is partly mediated by an angiotensin-(1-7)/Mas-dependent pathway: Ang(1-7) and weight loss after AT<sub>1</sub> blockade. *Br J Pharmacol* 172, 3764–3778 (2015).
84. Gustaityte, V., Winkler, M., Stölting, I. & Raasch, W. Influence of AT1 blockers on obesity and stress-induced eating of cafeteria diet. *Journal of Endocrinology* 240, 65–79 (2019).
85. Beckmann, L., Künstner, A., Freschi, M. L., Huber, G., Stölting, I., Ibrahim, S. M., Hirose, M., Freitag, M., Langan, E. A., Matschl, U., Galuska, C. E., Fuchs, B., Knobloch, J. K., Busch, H. & Raasch, W. Telmisartan induces a specific gut microbiota signature which may mediate its antiobesity effect. *Pharmacol Res* 170, 105724 (2021).
86. Nickel, L., Sünderhauf, A., Rawish, E., Stölting, I., Derer, S., Thorns, C., Matschl, U., Othman, A., Sina, C. & Raasch, W. The AT1 Receptor Blocker Telmisartan Reduces Intestinal Mucus Thickness in Obese Mice. *Front. Pharmacol.* 13, 815353 (2022).
87. Obradovic, M., Sudar-Milovanovic, E., Soskic, S., Essack, M., Arya, S., Stewart, A. J., Gojoberi, T. & Isenovic, E. R. Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication. *Front. Endocrinol.* 12, 585887 (2021).
88. Rong, X., Li, Y., Ebihara, K., Zhao, M., Naowaboot, J., Kusakabe, T., Kuwahara, K., Murray, M. & Nakao, K. Angiotensin II type 1 receptor-independent beneficial effects of telmisartan on dietary-induced obesity, insulin resistance and fatty liver in mice. *Diabetologia* 53, 1727–1731 (2010).
89. Cassis, L. A., Marshall, D. E., Fettingner, M. J., Rosenbluth, B. & Lodder, R. A. Mechanisms contributing to angiotensin II regulation of body weight. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 274, E867–E876 (1998).
90. Alvarez-Gallego, F., González-Blázquez, R., Gil-Ortega, M., Somoza, B., Calderón-Dominguez, M., Moratinos, J., García-García, V., Fernández, P., González-Moreno, D., Viana, M. & Alcalá, M. Angiotensin II type 2 receptor as a novel activator of brown adipose tissue in obesity. *BioFactors* 49, 1106–1120 (2023).
91. Patel, V. B., Zhong, J.-C., Grant, M. B. & Oudit, G. Y. Role of the ACE2/Angiotensin 1–7 Axis of the Renin–Angiotensin System in Heart Failure. *Circ Res* 118, 1313–1326 (2016).

92. Ishiyama, Y., Gallagher, P. E., Averill, D. B., Tallant, E. A., Brosnihan, K. B. & Ferrario, C. M. Upregulation of Angiotensin-Converting Enzyme 2 After Myocardial Infarction by Blockade of Angiotensin II Receptors. *Hypertension* 43, 970–976 (2004).
93. Bader, M. ACE2, angiotensin-(1–7), and Mas: the other side of the coin. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 465, 79–85 (2013).
94. Winkler, M., Bader, M., Schuster, F., Stölting, I., Binder, S. & Raasch, W. Development of obesity can be prevented in rats by chronic icv infusions of AngII but less by Ang(1–7). *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 470, 867–881 (2018).
95. DeMorrow, S. Role of the Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis in Health and Disease. *IJMS* 19, 986 (2018).
96. Bali, A. & Jaggi, A. S. Angiotensin as stress mediator: Role of its receptor and interrelationships among other stress mediators and receptors. *Pharmacological Research* 76, 49–57 (2013).
97. Dallman, M. F., la Fleur, S. E., Pecoraro, N. C., Gomez, F., Houshyar, H. & Akana, S. F. Minireview: Glucocorticoids—Food Intake, Abdominal Obesity, and Wealthy Nations in 2004. *Endocrinology* 145, 2633–2638 (2004).
98. Jakobsson, H. E., Rodríguez-Piñeiro, A. M., Schütte, A., Ermund, A., Boysen, P., Bemark, M., Sommer, F., Bäckhed, F., Hansson, G. C. & Johansson, M. E. The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO Reports* 16, 164–177 (2015).
99. Ivanov, I. I., Frutos, R. de L., Manel, N., Yoshinaga, K., Rifkin, D. B., Sartor, R. B., Finlay, B. B. & Littman, D. R. Specific Microbiota Direct the Differentiation of IL-17-Producing T-Helper Cells in the Mucosa of the Small Intestine. *Cell Host & Microbe* 4, 337–349 (2008).
100. Huber, G., Ogrodnik, M., Wenzel, J., Stölting, I., Huber, L., Will, O., Peschke, E., Matschl, U., Hövener, J.-B., Schwaninger, M., Jurk, D. & Raasch, W. Telmisartan prevents high-fat diet-induced neurovascular impairments and reduces anxiety-like behavior. *J Cereb Blood Flow Metab* 41, 2356–2369 (2021).
101. Ellekilde, M., Selfjord, E., Larsen, C. S., Jaksevic, M., Rune, I., Tranberg, B., Vogensen, F. K., Nielsen, D. S., Bahl, M. I., Licht, T. R., Hansen, A. K. & Hansen, C. H. F. Transfer of gut microbiota from lean and obese mice to antibiotic-treated mice. *Sci Rep* 4, 5922 (2015).
102. Dapper, C., Schuster, F., Stölting, I., Vogt, F., Castro e Souza, L. A., Alenina, N., Bader, M. & Raasch, W. The antiobese effect of AT1 receptor blockade is augmented in mice lacking Mas. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 392, 865–877 (2019).
103. Sirichoat, A., Sankuntaw, N., Engchanil, C., Buppasiri, P., Faksri, K., Namwat, W., Chantratita, W. & Lulitanond, V. Comparison of different hypervariable regions of 16S rRNA for taxonomic profiling of vaginal microbiota using next-generation sequencing. *Arch Microbiol* 203, 1159–1166 (2021).
104. Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C. & Mahé, F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* 4, e2584 (2016).
105. Evans, J. T. & Deneff, V. J. To Dereplicate or Not To Dereplicate? *mSphere* 5, e00971-19, /msphere/5/3/mSphere971-19.atom (2020).
106. Walters, K. E. & Martiny, J. B. H. Alpha-, beta-, and gamma-diversity of bacteria varies across habitats. *PLoS ONE* 15, e0233872 (2020).
107. Konopiński, M. K. Shannon diversity index: a call to replace the original Shannon's formula with unbiased estimator in the population genetics studies. *PeerJ* 8, e9391 (2020).
108. Wang, C.-Y. & Liao, J. K. in *mTOR* (ed. Weichhart, T.) 821, 421–433 (Humana Press, 2012).
109. Wang, L., Wang, H., Zhang, B., Popkin, B. M. & Du, S. Elevated Fat Intake Increases Body Weight and the Risk of Overweight and Obesity among Chinese Adults: 1991–2015 Trends. *Nutrients* 12, 3272 (2020).
110. de Moura e Dias, M., dos Reis, S. A., da Conceição, L. L., Sediyaama, C. M. N. de O., Pereira, S. S., de Oliveira, L. L., Gouveia Peluzio, M. do C., Martinez, J. A. & Milagro, F. I. Diet-induced obesity in animal models: points to consider and influence on metabolic markers. *Diabetol Metab Syndr* 13, 32 (2021).
111. Schuster, F., Huber, G., Stölting, I., Wing, E. E., Saar, K., Hübner, N., Banks, W. A. & Raasch, W. Telmisartan prevents diet-induced obesity and preserves leptin transport across the blood-brain barrier in high-fat diet-fed mice. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 470, 1673–1689 (2018).
112. Maroni, M. J., Capri, K. M., Cushman, A. V., Deane, H. V., Concepcion, H., DeCoursey, H. & Seggio, J. A. The timing of fasting leads to different levels of food consumption and PYY3–36 in nocturnal mice. *Hormones* 19, 549–558 (2020).
113. Krízová, E. & Simek, V. Effect of intermittent feeding with high-fat diet on changes of glycogen, protein and fat content in liver and skeletal muscle in the laboratory mouse. *Physiol Res* 45, 379–383 (1996).
114. Schuster, F., Huber, G., Stölting, I., Wing, E. E., Saar, K., Hübner, N., Banks, W. A. & Raasch, W. Telmisartan prevents diet-induced obesity and preserves leptin transport across the blood-brain barrier in high-fat diet-fed mice. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 470, 1673–1689 (2018).
115. Zhang, J., Guo, Y. & Duan, L. Features of Gut Microbiome Associated With Responses to Fecal Microbiota Transplantation for Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review. *Front. Med.* 9, 773105 (2022).
116. Chow, C. C. & Hall, K. D. The Dynamics of Human Body Weight Change. *PLoS Comput Biol* 4, e1000045 (2008).
117. Stangier, J., Schmid, J., Türck, D., Switek, H., Verhagen, A., Peeters, P. A., van Marle, S. P., Tamminga, W. J., Sollie, F. A. & Jonkman, J. H. Absorption, metabolism, and excretion of intravenously and orally administered [<sup>14</sup>C]telmisartan in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 40, 1312–1322 (2000).
118. Kraus, D., Yang, Q. & Kahn, B. Lipid Extraction from Mouse Feces. *BIO-PROTOCOL* 5, (2015).
119. Possidente, B. & Birnbaum, S. Circadian rhythms for food and water consumption in the mouse, *Mus musculus*. *Physiology & Behavior* 22, 657–660 (1979).

120. Orozco-Solis, R., Aguilar-Arnal, L., Murakami, M., Peruquetti, R., Ramadori, G., Coppari, R. & Sassone-Corsi, P. The Circadian Clock in the Ventromedial Hypothalamus Controls Cyclic Energy Expenditure. *Cell Metabolism* 23, 467–478 (2016).
121. Minaya, D. M., Rowland, N. E. & Robertson, K. L. Effect of day-night cycle on distribution of food intake and economic choice among imposed food opportunities in mice. *Physiology & Behavior* 164, 395–399 (2016).
122. Dulloo, A. G. & Calokatisa, R. Adaptation to low calorie intake in obese mice: contribution of a metabolic component to diminished energy expenditures during and after weight loss. *Int J Obes* 15, 7–16 (1991).
123. Benedé-Ubieto, R., Estévez-Vázquez, O., Ramadori, P., Cubero, F. J. & Nevzorova, Y. A. Guidelines and Considerations for Metabolic Tolerance Tests in Mice. *DMSO* Volume 13, 439–450 (2020).
124. Roberts-Toler, C., O'Neill, B. T. & Cypess, A. M. Diet-induced obesity causes insulin resistance in mouse brown adipose tissue: DIO Causes BAT Insulin Resistance. *Obesity* 23, 1765–1770 (2015).
125. Bradley, R. L., Jeon, J. Y., Liu, F.-F. & Maratos-Flier, E. Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 295, E586–E594 (2008).
126. Müller-Fielitz, H., Landolt, J., Heidbreder, M., Werth, S., Vogt, F. M., Jöhren, O. & Raasch, W. Improved Insulin Sensitivity after Long-Term Treatment with AT<sub>1</sub> Blockers Is Not Associated with PPAR $\gamma$  Target Gene Regulation. *Endocrinology* 153, 1103–1115 (2012).
127. Kintscher, U., Foryst-Ludwig, A. & Unger, T. Inhibiting angiotensin type 1 receptors as a target for diabetes. *Expert Opin Ther Targets* 12, 1257–1263 (2008).
128. Cole, B. K., Keller, S. R., Wu, R., Carter, J. D., Nadler, J. L. & Nunemaker, C. S. Valsartan protects pancreatic islets and adipose tissue from the inflammatory and metabolic consequences of a high-fat diet in mice. *Hypertension* 55, 715–721 (2010).
129. Miesel, A., Müller-Fielitz, H., Jöhren, O., Vogt, F. M. & Raasch, W. Double blockade of angiotensin II (AT<sub>1</sub>)-receptors and ACE does not improve weight gain and glucose homeostasis better than single-drug treatments in obese rats: Metabolic outcome after telmisartan. *British Journal of Pharmacology* 165, 2721–2735 (2012).
130. Müller, H., Schweitzer, N., Jöhren, O., Dominiak, P. & Raasch, W. Angiotensin II stimulates the reactivity of the pituitary-adrenal axis in leptin-resistant Zucker rats, thereby influencing the glucose utilization. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E802-810 (2007).
131. Müller-Fielitz, H. & Raasch, W. Angiotensin II impairs glucose utilization in obese Zucker rats by increasing HPA activity via an adrenal-dependent mechanism. *Horm Metab Res* 45, 173–180 (2013).
132. Raasch, W., Wittmershaus, C., Dendorfer, A., Voges, I., Pahlke, F., Dodt, C., Dominiak, P. & Jöhren, O. Angiotensin II inhibition reduces stress sensitivity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis in spontaneously hypertensive rats. *Endocrinology* 147, 3539–3546 (2006).
133. Winkler, M., Schuchard, J., Stölting, I., Vogt, F. M., Barkhausen, J., Thorns, C., Bader, M. & Raasch, W. The brain renin-angiotensin system plays a crucial role in regulating body weight in diet-induced obesity in rats: Angiotensinogen deficiency and weight loss. *British Journal of Pharmacology* 173, 1602–1617 (2016).
134. Kootte, R. S., Levin, E., Salojärvi, J., Smits, L. P., Hartstra, A. V., Udayappan, S. D., Hermes, G., Bouter, K. E., Koopen, A. M., Holst, J. J., Knop, F. K., Blaak, E. E., Zhao, J., Smidt, H., Harms, A. C., Hankemeijer, T., Bergman, J. J. G. H. M., Romijn, H. A., Schaap, F. G., Olde Damink, S. W. M., Ackermans, M. T., Dallinga-Thie, G. M., Zoetendal, E., de Vos, W. M., Serlie, M. J., Stroes, E. S. G., Groen, A. K. & Nieuwdorp, M. Improvement of Insulin Sensitivity after Lean Donor Feces in Metabolic Syndrome Is Driven by Baseline Intestinal Microbiota Composition. *Cell Metab* 26, 611–619.e6 (2017).
135. Karlsson, F., Tremaroli, V., Nielsen, J. & Backhed, F. Assessing the Human Gut Microbiota in Metabolic Diseases. *Diabetes* 62, 3341–3349 (2013).
136. Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., Liang, S., Zhang, W., Guan, Y., Shen, D., Peng, Y., Zhang, D., Jie, Z., Wu, W., Qin, Y., Xue, W., Li, J., Han, L., Lu, D., Wu, P., Dai, Y., Sun, X., Li, Z., Tang, A., Zhong, S., Li, X., Chen, W., Xu, R., Wang, M., Feng, Q., Gong, M., Yu, J., Zhang, Y., Zhang, M., Hansen, T., Sanchez, G., Raes, J., Falony, G., Okuda, S., Almeida, M., LeChatelier, E., Renault, P., Pons, N., Batto, J.-M., Zhang, Z., Chen, H., Yang, R., Zheng, W., Li, S., Yang, H., Wang, J., Ehrlich, S. D., Nielsen, R., Pedersen, O., Kristiansen, K. & Wang, J. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 490, 55–60 (2012).
137. Liu, Q., Cai, B., Zhu, L., Xin, X., Wang, X., An, Z., Li, S., Hu, Y. & Feng, Q. Liraglutide modulates gut microbiome and attenuates nonalcoholic fatty liver in db/db mice. *Life Sciences* 261, 118457 (2020).
138. Clark, R. L., Connors, B. M., Stevenson, D. M., Hromada, S. E., Hamilton, J. J., Amador-Noguez, D. & Venturelli, O. S. Design of synthetic human gut microbiome assembly and butyrate production. *Nat Commun* 12, 3254 (2021).
139. Portincasa, P., Khalil, M., Graziani, A., Frühbeck, G., Baffy, G., Garruti, G., Di Ciaula, A. & Bonfrate, L. Gut microbes in metabolic disturbances. Promising role for therapeutic manipulations? *European Journal of Internal Medicine* 119, 13–30 (2024).
140. Soccio, R. E., Chen, E. R. & Lazar, M. A. Thiazolidinediones and the Promise of Insulin Sensitization in Type 2 Diabetes. *Cell Metabolism* 20, 573–591 (2014).
141. Zsálíg, D., Berta, A., Tóth, V., Szabó, Z., Simon, K., Figler, M., Pusztalvi, H. & Polyák, É. A Review of the Relationship between Gut Microbiome and Obesity. *Applied Sciences* 13, 610 (2023).
142. Magne, F., Gotteland, M., Gauthier, L., Zazueta, A., Pessoa, S., Navarrete, P. & Balamurugan, R. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients* 12, 1474 (2020).

143. Machate, D. J., Figueiredo, P. S., Marcelino, G., Guimarães, R. D. C. A., Hiane, P. A., Bogo, D., Pinheiro, V. A. Z., Oliveira, L. C. S. D. & Pott, A. Fatty Acid Diets: Regulation of Gut Microbiota Composition and Obesity and Its Related Metabolic Dysbiosis. *IJMS* 21, 4093 (2020).
144. Raychaudhuri, S., Shahinozaman, M., Fan, S., Ogedengbe, O., Subedi, U. & Obanda, D. N. Resistance to Diet Induced Visceral Fat Accumulation in C57BL/6NTac Mice Is Associated with an Enriched Lactococcus in the Gut Microbiota and the Phenotype of Immune B Cells in Intestine and Adipose Tissue. *Microorganisms* 11, 2153 (2023).
145. Wei, J., Zhao, Y., Zhou, C., Zhao, Q., Zhong, H., Zhu, X., Fu, T., Pan, L., Shang, Q. & Yu, G. Dietary Polysaccharide from *Enteromorpha clathrata* Attenuates Obesity and Increases the Intestinal Abundance of Butyrate-Producing Bacterium, *Eubacterium xylanophilum*, in Mice Fed a High-Fat Diet. *Polymers* 13, 3286 (2021).
146. Wang, X., Yu, C., Liu, X., Yang, J., Feng, Y., Wu, Y., Xu, Y., Zhu, Y. & Li, W. Fenofibrate Ameliorated Systemic and Retinal Inflammation and Modulated Gut Microbiota in High-Fat Diet-Induced Mice. *Front Cell Infect Microbiol* 12, 839592 (2022).
147. Li, H., Dai, W., Zhang, X., Lu, J., Song, F. & Li, H. Chemical components of Fu brick tea and its potential preventive effects on metabolic syndrome. *Food Sci Nutr* 12, 35–47 (2024).
148. Guzmán-Carrasco, A., Kapravelou, G., López-Jurado, M., Bermúdez, F., Andrés-León, E., Terrón-Camero, L. C., Prados, J., Melguizo, C., Porres, J. M. & Martínez, R. A Novel Plant-Based Nutraceutical Combined with Exercise Can Revert Oxidative Status in Plasma and Liver in a Diet-Induced-Obesity Animal Model. *Antioxidants (Basel)* 13, 274 (2024).
149. Drissi, F., Raoult, D. & Merhej, V. Metabolic role of lactobacilli in weight modification in humans and animals. *Microbial Pathogenesis* 106, 182–194 (2017).
150. Kaakoush, N. O. Insights into the Role of Erysipelotrichaceae in the Human Host. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5, (2015).
151. Jin, J., Cheng, R., Ren, Y., Shen, X., Wang, J., Xue, Y., Zhang, H., Jia, X., Li, T., He, F. & Tian, H. Distinctive Gut Microbiota in Patients with Overweight and Obesity with Dyslipidemia and its Responses to Long-term Orlistat and Ezetimibe Intervention: A Randomized Controlled Open-label Trial. *Front. Pharmacol.* 12, 732541 (2021).
152. Wang, B., Kong, Q., Li, X., Zhao, J., Zhang, H., Chen, W. & Wang, G. A High-Fat Diet Increases Gut Microbiota Biodiversity and Energy Expenditure Due to Nutrient Difference. *Nutrients* 12, 3197 (2020).
153. Liu, S., Li, F., Cai, Y., Ren, L., Sun, L., Gang, X. & Wang, G. Unraveling the mystery: a Mendelian randomized exploration of gut microbiota and different types of obesity. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 14, 1352109 (2024).
154. Pessoa, J., Belew, G. D., Barroso, C., Egas, C. & Jones, J. G. The Gut Microbiome Responds Progressively to Fat and/or Sugar-Rich Diets and Is Differentially Modified by Dietary Fat and Sugar. *Nutrients* 15, 2097 (2023).
155. Vacca, M., Celano, G., Calabrese, F. M., Portincasa, P., Gobbetti, M. & De Angelis, M. The Controversial Role of Human Gut Lachnospiraceae. *Microorganisms* 8, 573 (2020).
156. Shahi, S. K., Ghimire, S., Lehman, P. & Mangalam, A. K. Obesity induced gut dysbiosis contributes to disease severity in an animal model of multiple sclerosis. *Front. Immunol.* 13, 966417 (2022).
157. Kadyan, S., Park, G., Wang, B. & Nagpal, R. Dietary fiber modulates gut microbiome and metabolome in a host sex-specific manner in a murine model of aging. *Front. Mol. Biosci.* 10, 1182643 (2023).
158. Chanda, D. & De, D. Meta-analysis reveals obesity associated gut microbial alteration patterns and reproducible contributors of functional shift. *Gut Microbes* 16, 2304900 (2024).
159. Singh, S. B., Carroll-Portillo, A. & Lin, H. C. Desulfovibrio in the Gut: The Enemy within? *Microorganisms* 11, 1772 (2023).
160. Lin, Y.-C., Lin, H.-F., Wu, C.-C., Chen, C.-L. & Ni, Y.-H. Pathogenic effects of Desulfovibrio in the gut on fatty liver in diet-induced obese mice and children with obesity. *J Gastroenterol* 57, 913–925 (2022).
161. Jin, J., Wang, J., Cheng, R., Ren, Y., Miao, Z., Luo, Y., Zhou, Q., Xue, Y., Shen, X., He, F. & Tian, H. Orlistat and ezetimibe could differently alleviate the high-fat diet-induced obesity phenotype by modulating the gut microbiota. *Front. Microbiol.* 13, 908327 (2022).
162. Wang, T., Yan, H., Lu, Y., Li, X., Wang, X., Shan, Y., Yi, Y., Liu, B., Zhou, Y. & Lü, X. Anti-obesity effect of *Lactobacillus rhamnosus* LS-8 and *Lactobacillus crustorum* MN047 on high-fat and high-fructose diet mice base on inflammatory response alleviation and gut microbiota regulation. *Eur J Nutr* 59, 2709–2728 (2020).
163. Xie, J., Liu, M., Liu, H., Jin, Z., Guan, F., Ge, S., Yan, J., Zheng, M., Cai, D. & Liu, J. Zeaxanthin ameliorates obesity by activating the  $\beta$ 3-adrenergic receptor to stimulate inguinal fat thermogenesis and modulating the gut microbiota. *Food Funct.* 12, 12734–12750 (2021).
164. Karlsson, F. H., Tremaroli, V., Nookaew, I., Bergström, G., Behre, C. J., Fagerberg, B., Nielsen, J. & Bäckhed, F. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature* 498, 99–103 (2013).
165. Fu, J., Xu, K., Ni, X., Li, X., Zhu, X. & Xu, W. Habitual Dietary Fiber Intake, Fecal Microbiota, and Hemoglobin A1c Level in Chinese Patients with Type 2 Diabetes. *Nutrients* 14, 1003 (2022).
166. Chen, L., Liu, B., Ren, L., Du, H., Fei, C., Qian, C., Li, B., Zhang, R., Liu, H., Li, Z. & Ma, Z. High-fiber diet ameliorates gut microbiota, serum metabolism and emotional mood in type 2 diabetes patients. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 13, 1069954 (2023).
167. Zhou, H., Huang, D., Sun, Z. & Chen, X. Effects of intestinal Desulfovibrio bacteria on host health and its potential regulatory strategies: A review. *Microbiological Research* 284, 127725 (2024).
168. Stanley, B. G., Urstadt, K. R., Charles, J. R. & Kee, T. Glutamate and GABA in lateral hypothalamic mechanisms controlling food intake. *Physiology & Behavior* 104, 40–46 (2011).

169. Liang, C., Zhou, X., Jiao, Y., Guo, M., Meng, L., Gong, P., Lyu, L., Niu, H., Wu, Y., Chen, S., Han, X. & Zhang, L. *Ligilactobacillus Salivarius* LCK11 Prevents Obesity by Promoting PYY Secretion to Inhibit Appetite and Regulating Gut Microbiota in C57BL/6J Mice. *Molecular Nutrition Food Res* 65, 2100136 (2021).
170. Choi, K. J., Yoon, M. Y., Kim, J.-E. & Yoon, S. S. Gut commensal *Kineothrix alysoides* mitigates liver dysfunction by restoring lipid metabolism and gut microbial balance. *Sci Rep* 13, 14668 (2023).
171. Shah, S., Mu, C., Moossavi, S., Shen-Tu, G., Schlicht, K., Rohmann, N., Geisler, C., Laudes, M., Franke, A., Züllig, T., Köfeler, H. & Shearer, J. Physical ACTIVITY-INDUCED alterations of the gut microbiota are BMI dependent. *The FASEB Journal* 37, e22882 (2023).
172. Jo, J.-K., Seo, S.-H., Park, S.-E., Kim, H.-W., Kim, E.-J., Kim, J.-S., Pyo, J.-Y., Cho, K.-M., Kwon, S.-J., Park, D.-H. & Son, H.-S. Gut Microbiome and Metabolome Profiles Associated with High-Fat Diet in Mice. *Metabolites* 11, 482 (2021).
173. Zhu, R., Tang, J., Xing, C., Nan, Q., Liang, G., Luo, J., Zhou, J., Miao, Y., Cao, Y., Dai, S. & Lan, D. The Distinguishing Bacterial Features From Active and Remission Stages of Ulcerative Colitis Revealed by Paired Fecal Metagenomes. *Front. Microbiol.* 13, 883495 (2022).
174. Benga, L., Knorr, J. I., Engelhardt, E., Gougoula, C., Benten, P. M., Christensen, H. & Sager, M. Current Distribution of *Rodentibacter* Species Among the Mice and Rats of an Experimental Facility. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 58, 475–478 (2019).
175. Hasani, A., Ebrahimzadeh, S., Hemmati, F., Khabbaz, A., Hasani, A. & Gholizadeh, P. The role of *Akkermansia muciniphila* in obesity, diabetes and atherosclerosis. *Journal of Medical Microbiology* 70, (2021).
176. Da Silva, C. C., Monteil, M. A. & Davis, E. M. Overweight and Obesity in Children Are Associated with an Abundance of Firmicutes and Reduction of Bifidobacterium in Their Gastrointestinal Microbiota. *Childhood Obesity* 16, 204–210 (2020).
177. Sun, Y., Wu, D., Zeng, W., Chen, Y., Guo, M., Lu, B., Li, H., Sun, C., Yang, L., Jiang, X. & Gao, Q. The Role of Intestinal Dysbacteriosis Induced Arachidonic Acid Metabolism Disorder in Inflammaging in Atherosclerosis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11, 618265 (2021).
178. Zhu, H. & Hou, T. Modulatory Effects of *Lactarius hatsudake* on Obesity and Gut Microbiota in High-Fat Diet-Fed C57BL/6 Mice. *Foods* 13, 948 (2024).
179. Li, L., Zhao, X., Abdugheni, R., Yu, F., Zhao, Y., Ma, B.-F., Yang, Z., Li, R., Li, Y., Maimaitiyiming, Y. & Maimaiti, M. Gut microbiota changes associated with low-carbohydrate diet intervention for obesity. *Open Life Sciences* 19, 20220803 (2024).
180. Ericsson, A. C., Personett, A. R., Turner, G., Dorfmeier, R. A. & Franklin, C. L. Variable Colonization after Reciprocal Fecal Microbiota Transfer between Mice with Low and High Richness Microbiota. *Front. Microbiol.* 8, (2017).
181. Bellali, S., Lagier, J.-C., Raoult, D. & Bou Khalil, J. Among Live and Dead Bacteria, the Optimization of Sample Collection and Processing Remains Essential in Recovering Gut Microbiota Components. *Front. Microbiol.* 10, 1606 (2019).
182. Manichanh, C., Reeder, J., Gibert, P., Varela, E., Llopis, M., Antolin, M., Guigo, R., Knight, R. & Guarner, F. Reshaping the gut microbiome with bacterial transplantation and antibiotic intake. *Genome Res.* 20, 1411–1419 (2010).
183. Bokoliya, S. C., Dorsett, Y., Panier, H. & Zhou, Y. Procedures for Fecal Microbiota Transplantation in Murine Microbiome Studies. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11, 711055 (2021).
184. Hintze, K. J., Cox, J. E., Rompato, G., Benninghoff, A. D., Ward, R. E., Broadbent, J. & Lefevre, M. Broad scope method for creating humanized animal models for animal health and disease research through antibiotic treatment and human fecal transfer. *Gut Microbes* 5, 183–191 (2014).
185. Gu, S., Chen, D., Zhang, J.-N., Lv, X., Wang, K., Duan, L.-P., Nie, Y. & Wu, X.-L. Bacterial Community Mapping of the Mouse Gastrointestinal Tract. *PLoS ONE* 8, e74957 (2013).

## 7 Anhänge

### Material und Geräte Liste

- 0,9% NaCl Lösung (Braun)
- 1.0 N NaOH Lösung (Illumina)
- 1ml Insulinspritze (Braun)
- 30G x 12 mm Nadel (Braun)
- 5µm Spritzenfilter (Minisart, Sartorius)
- 60% KJ Fat Lard (SSNIFF Spezialdiäten GmbH)
- Agarose
- AgencourtAMPure (Beckman Coulter)
- ANCOMB (0.99.4, <https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/vignettes/ANCOMBC/inst/doc/ANCOMBC.html>)
- Blutzuckermessgerät Accu Chek Performa
- Decontam (1.8.0, <https://bioconductor.riken.jp/packages/3.11/bioc/html/decontam.html>)
- DivNet (0.3.6)
- dNTPs 10 mM (Thermo Fisher Scientific)
- Einmalmessstreifen Accu Chek Inform II
- Elutionspuffer (Thermo Scientific TM)
- Eppendorf Gefäße
- Farbstoffes 6x loading dye (DNA Gel Loading Dye (6×), Thermo Scientific TM)
- FastTree2 (<http://www.microbesonline.org/fasttree/>)
- Formaldehydlösung 5 % (Carl Roth)
- Glycerol (Carl Roth)
- Heparin-Natrium (Ratiopharm)
- Hybridisierungspuffer HT1 (Illumina)
- Individuell ventilierte Käfige mit einer Fläche von 500 cm<sup>2</sup>
- Isopropanol

- Methyl-2-Butanol (Carl Roth)
- Microbiome (1.10.0)
- Mikrotitterplatte (PCR Plate half skirt flat, Sarstedt)
- Minispec BCA analyzer, LF-110 (Bruker)
- MiSeq System (Illumina)
- mothur (v1.41.3, <https://github.com/mothur/mothur/releases>)
- NEBNext Library Quant Kit für Illumina (New England BioLabs)
- PBS Lösung (Carl Roth)
- Phenomaster System (TSE)
- Philr (1.14.0)
- Phusion Hot Start DNA-Polymerase 2 U/μL (Thermo Fisher Scientific)
- Phusion HP-Puffer (Thermo Fisher Scientific)
- Prism 8 (GraphPad, San Diego, USA)
- Qiagen PowerSoil Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)
- Quantum ST4 System (Vilber, Eberhardzell, Deutschland)
- Rekombinante Normalinsulin (Insuman Rapid 40 IE/ml, Sanofi)
- Ringer Lösung (Berlin-Chemie)
- Schuldungssonde
- SILVA v123 Datenbank (<https://www.arb-silva.de/documentation/release-123/>)
- SpeedMill (Analytik Jena)
- TAE Puffer
- Tribromoethanol 97% (Avertin, Sigma)
- Tris-HCl Lösung
- ULTRA-TURRAX T8 (IKA-Werke)
- vorwärts und rückwärts Primern mit gekoppelten MiSeq Adaptern (341F-806R)
- VSEARCH (vsearch v2.12.0; <https://github.com/torognes/vsearch-eval>)
- Zentrifugensäule (Thermo Scientific TM)

## 8 Danksagungen

Folgenden Personen möchte ich danken, die mich so tatkräftig in der Ausarbeitung dieser Dissertation unterstützt haben.

Meinem Doktorvater, Prof. Dr. Walter Raasch, der mit viel Geduld und Engagement mir wissenschaftliches Arbeiten erklärt und beigebracht hat.

Frau Ines Stölting, die immer da war, wenn es darum ging, mich bei der praktischen Arbeit im Labor einzuweisen und zu führen.

PD Dr. rer. nat. Misa Hirose für die Unterstützung bei diesem Projekt durch die Sequenzierung des fäkalen Mikrobiom.

Dr. rer. nat. Axel Küstner dafür, dass er Licht ins Dunkle gebracht hat durch die Auswertung der Daten der Sequenzierung.

Dr. rer. nat. Gianna Huber für das Einsammeln und Bereitstellen der Stuhlproben aus ihrer eigenen Arbeit, die als Basis für die FMT meiner Arbeit dienten.

Meiner Mutter, die, obwohl sie nicht viel von dem, was ich geschrieben habe, verstanden hat, mich mit Tipps zur deutschen Grammatik und Rechtschreibung stets unterstützt hat.

Meinem Vater, der immer da war, obwohl er, glaube ich bis heute noch nicht ganz verstanden hat, warum ich nach dem abgeschlossenen Studium noch eine Dissertation schreibe.

Meiner Freundin dafür, dass sie unsere gemeinsame Zeit geopfert hat, damit ich an dieser Dissertation arbeiten konnte.

Meinem Chemielehrer dafür, dass er jedes Konzept mit einer Anekdote verdeutlicht hat und mir so eine einzigartige Herangehensweise an die Wissenschaft mitgegeben hat.