

Diplomarbeit

**Beurteilung der Wertigkeit von Trimethylamin-N-Oxid
(TMAO) als möglicher Biomarker im neurologischen
Patientengut**

eingereicht von

David Kathriner

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Klinischen Institut für Medizinische und Chemische Labordiagnostik

unter der Anleitung von

Priv.-Doz. Mag. Dr.scient.med. Andreas Meinitzer

Priv.-Doz. Dr.med.univ. MBA LL.M. Dietmar Enko

Graz, 18.04.2022

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 18.04.2022

David Kathriner, eh.

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich bei all jenen Menschen zu bedanken, die mich während des Studiums und dieser Diplomarbeit unterstützt haben.

Allen voran gilt mein herzlichster Dank meinem Diplomarbeitsbetreuer Priv.-Doz. Mag. Dr.scient.med. Andreas Meinitzer für die allzeit außerordentlich gute Betreuung und Unterstützung. Diese Diplomarbeit wäre ohne seine kompetente und rasche Hilfe nicht entstanden. Ein besonderer Dank gilt meinem Zweitbetreuer Priv.-Doz. Dr.med.univ. MBA LL.M. Dietmar Enko für die Unterstützung in zahlreichen Fragestellungen.

Meiner Familie und insbesondere meinen Eltern möchte ich danken, meinen Weg in jeglicher Hinsicht unterstützt zu haben. Ohne sie wäre dieses Studium nicht möglich gewesen.

Auch meinem Freundeskreis und insbesondere meiner Partnerin möchte ich für die emotionale, aber auch fachliche Unterstützung in dieser gesamten Zeit danken.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen.....	iii
Inhaltsverzeichnis	iv
Abkürzungsverzeichnis	vi
Abbildungsverzeichnis.....	viii
Tabellenverzeichnis.....	ix
Zusammenfassung	x
Abstract.....	xi
1 Einleitung.....	1
1.1 Einführung.....	1
1.2 Metabolismus von Trimethylamin und Trimethylamin-N-Oxid	2
1.2.1 Nutritive Aufnahme von TMA und TMAO.....	2
1.2.2 Biosynthese von TMA durch das Darmmikrobiom.....	3
1.2.3 Synthese von TMA zu TMAO durch Flavin-haltige Monooxygenasen.....	8
1.2.4 Konzentrationen und Ausscheidung von TMAO	10
1.3 TMAO als bioaktive Substanz	11
1.3.2 Trimethylamin-N-Oxid und kardiovaskuläre Erkrankungen.....	11
1.3.3 Trimethylamin-N-Oxid und die Niere.....	17
1.3.4 Trimethylamin-N-Oxid und Diabetes mellitus.....	20
1.3.5 Trimethylamin-N-Oxid und Malignome.....	21
1.4 Liquor cerebrospinalis und Blutliquorschranke.....	23
1.5 Trimethylamin-N-Oxid und neurologische Erkrankungen	26
1.5.1 Protektive Proteinstabilisierung	27
1.5.2 Tau-Protein, Amyloid- β und Morbus Alzheimer	30
1.5.3 Neurovaskuläre Erkrankungen	34

1.5.4 Direkte neuronale Schädigung	35
2 Studie.....	39
2.1 Studienziel/Forschungsfrage.....	39
2.2 Material und Methoden.....	40
2.3 Ergebnisse	41
2.3.1 Deskriptive Statistik der Studienpopulation.....	41
2.3.2 Verteilung der Daten.....	49
2.3.3 Korrelationen.....	50
3 Diskussion	54
3.1 Ergebnisse der Studie	54
3.2 Auswirkungen von TMAO auf das Gehirn	55
Literaturverzeichnis	59

Abkürzungsverzeichnis

AD	<i>Alzheimer-Krankheit</i>
APP	<i>Amyloid-Vorläuferprotein</i>
BHS	<i>Blut-Hirn-Schranke</i>
BLS	<i>Blut-Liquor-Schranke</i>
bzw.	<i>beziehungsweise</i>
CNI	<i>Chronische Niereninsuffizienz</i>
CRC	<i>Kolorektales Karzinom</i>
CSF	<i>Cerebrospinalflüssigkeit, Liquor cerebrospinalis</i>
DMA	<i>Dimethylamin</i>
DMB	<i>3,3-Dimethyl-1-butanol</i>
FAD	<i>Flavin-Adenin-Dinukleotid</i>
FMO	<i>Flavin-haltige Monooxygenase</i>
FXR	<i>Farnesoid X Rezeptor</i>
GBB	<i>γ-Butyrobetain</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
IDP	<i>Intrinsisch ungeordnetes Protein</i>
KIM-1	<i>Kidney Injury Molecule-1</i>
L.plantarum	<i>Lactobacillus plantarum</i>
LKB	<i>leichte kognitive Beeinträchtigung</i>
MATE1	<i>multidrug and toxin extrusion Protein 1</i>
NADP	<i>Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat</i>

NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NOCs	<i>N-Nitroso-Verbindungen</i>
NPC1L1	<i>Niemann-Pick C1-artiges Protein 1</i>
NT-pro-BNP	N-terminales pro brain natriuretic peptide
OCT2	<i>organischer Kationentransporter 2</i>
ox-LDL	<i>oxidiertes Low-Density-Lipoprotein</i>
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
p-Tau	<i>phosphoryliertes Tau</i>
Q _{Alb}	<i>Albumin CSF/Serum-Konzentrationsquotient</i>
R ²	<i>Determinationskoeffizient</i>
RCT	<i>Reverser Cholesterintransport</i>
T1DM	<i>Typ-1 Diabetes mellitus</i>
T2DM	<i>Typ-2 Diabetes mellitus</i>
TIA	<i>Transitorische ischämische Attacke</i>
TICE	<i>Transintestinale Cholesterolausscheidung</i>
TMA	<i>Trimethylamin</i>
TMAO	<i>Trimethylamin-N-Oxid</i>
t-Tau	<i>Gesamt-Tau</i>
u. a.	<i>unter anderem</i>
z.B.	<i>zum Beispiel</i>
ZNS	<i>Zentralnervensystem</i>
ρ	<i>Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stoffwechselwege zur Entstehung von Trimethylamin durch das menschliche Mikrobiom	5
Abbildung 2: Pathophysiologische Mechanismen von Atherosklerose werden durch TMAO beeinflusst	17
Abbildung 3: Metabolischer Stoffwechselweg mit der Bildung von TMAO und N-Nitroso-Verbindungen	23
Abbildung 4 : Reiber-Schema beispielhaft für Q_{IgG} und Q_{IgA}	25
Abbildung 5: Proteolytischer Abbauweg von humanem APP mit nicht-amyloidogener und amyloidogener Variante.....	34
Abbildung 6: Diagramm bezüglich Häufigkeiten der verschiedenen Kategorien neurologischer Diagnosen in der Studienpopulation	44
Abbildung 7: Boxplot-Diagramm von Q-TMAO in Abhängigkeit der Blutliquorschranke.....	45
Abbildung 8: Boxplot-Diagramme von Q-TMAO in Abhängigkeit von den Subgruppen „BLSnegAISneg“ und „BLSnegAISpos“	48
Abbildung 9: Boxplot-Diagramme von Q-TMAO in Abhängigkeit von den Subgruppen „BLSposAISneg“ und „BLSposAISpos“	48
Abbildung 10: Häufigkeitsverteilung von Q-Alb	49
Abbildung 11: Häufigkeitsverteilung von Q-TMAO	49
Abbildung 12: Punkt-Streudiagramm einer linearen Einfachregression zwischen Serum-Albumin und CSF-Albumin	50
Abbildung 13: Punkt-Streudiagramm einer linearen Einfachregression zwischen Serum-TMAO und CSF-TMAO.....	51
Abbildung 14: Punkt-Streudiagramm einer linearen Einfachregression zwischen Q-Albumin und Q-TMAO.....	52
Abbildung 15: Q-TMAO-Werte in aufsteigender Reihenfolge mit der Regressionsgerade und dazugehörigen Q-Albumin-Werten mit der Regressionsgerade aller 290 Studienteilnehmer*Innen	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Trimethylamin produzierende Bakterien aus verschiedenen Substraten	7
Tabelle 2 : Studienpopulation mit Laborwerten	42
Tabelle 3: Diagnosen der Studienpopulation.....	43
Tabelle 4: Unterschiede von Q-Albumin und Q-TMAO in Abhängigkeit der Blutliquorschrankenfunktion.....	45
Tabelle 5: Charakteristika der Subgruppen der Studienpopulation nach Abhängigkeit mit der Blutliquorschranke und der intrathekalen Immunglobulinsynthese	46
Tabelle 6: Subgruppen der Studienpopulation nach Abhängigkeit der Blutliquorschranke und der intrathekalen Immunglobulinsynthese mit Daten von Q-Albumin und Q-TMAO.....	47

Zusammenfassung

Hintergrund: Trimethylamin-N-Oxid (TMAO) und dessen Bedeutung im menschlichen Körper findet seit den letzten Jahren zunehmendes Interesse als möglicher prognostischer und diagnostischer Biomarker zahlreicher Erkrankungen. Hohe TMAO-Serumspiegel werden mit zahlreichen Erkrankungen in Verbindung gebracht. In der derzeitigen Literatur werden auch Zusammenhänge mit neurologischen Erkrankungen beschrieben, Studien bezüglich der Konzentration von TMAO in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) und der Passage von TMAO durch die Blut-Liquor-Schranke (BLS) fehlen.

Die Zielsetzung dieser Arbeit besteht darin zu klären, ob und in welchem Ausmaß TMAO die BLS passiert und welche diagnostische Wertigkeit dieser neue Parameter im neurologischen Patientengut besitzt.

Methoden: In einer retrospektiven Studienkohorte von 290 Patient*Innen mit neurologischen Symptomen wurden Konzentrationen von Albumin und TMAO im Serum und der CSF gemessen und statistisch ausgewertet. Die Bewertung des BLS-Status erfolgte mittels Reiber-Schema aus dem Quotienten der Albuminkonzentrationen von Serum und der CSF (Q-Alb).

Ergebnisse: Die TMAO-Konzentrationen im Serum und der CSF sowie die Quotienten von Albumin und TMAO (Q-Alb, Q-TMAO) korrelieren signifikant ($p=0,702$; $p<0,001$), (β -Koeffizient=0,286; $p<0,001$). Patienten mit BLS-Dysfunktion weisen signifikant höhere Q-TMAO Werte (Median, interquartile range, IQR) im Vergleich zu Patienten mit normaler BLS-Funktion auf (4.7 (2.8 – 7.5) vs. 3.8 (2.5 – 5.7) $\times 10^{-1}$, $p=0,002$). Diese Ergebnisse sprechen für die Hypothese eines Übertritts von TMAO über die BLS im neurologischen Patientengut. Eine passive Diffusion von TMAO über die BLS aufgrund der Korrelation von Q-TMAO mit Q-Albumin erscheint wahrscheinlich. Eine gestörte BLS-Funktion scheint mit einer erhöhten Permeabilität für TMAO einherzugehen.

In der Fachliteratur finden sich vorwiegend Ergebnisse, die auf eine schädliche Auswirkung von TMAO auf das Gehirn deuten. Eine gewisse Diskrepanz bleibt bestehen.

Abstract

Background: Trimethylamine-N-Oxide (TMAO) and its importance in the human body has gained increasing interest in recent years as a possible prognostic and diagnostic biomarker of numerous diseases. High serum TMAO levels have been associated with numerous diseases. The current literature also describes relationships with neurological diseases. However, studies on the concentration of TMAO in cerebrospinal fluid (CSF) and the passage of TMAO through the blood-CSF-barrier (BLS) are lacking.

The aim of this work is to clarify whether and to what extent TMAO passes through the BLS and what diagnostic value this new parameter has in neurological patients.

Methods: In a retrospective study cohort of 290 patients with neurological symptoms, concentrations of albumin and TMAO in serum and CSF were measured and statistically evaluated. BLS status was assessed using the Reiber scheme based on the ratio of serum and CSF albumin concentrations (Q-Alb).

Results: Serum and CSF TMAO-concentrations and quotients of albumin and TMAO (Q-Alb, Q-TMAO) are significantly correlated ($\rho=0,702$; $p<0,001$), (β -coefficient=0,286; $p<0,001$). Patients with BLS dysfunction have significantly higher Q-TMAO values (median, interquartile range, IQR) compared to patients with normal BLS function (4.7 (2.8 – 7.5) vs. 3.8 (2.5 – 5.7) $\times 10^{-1}$, $p=0,002$).

These results support the hypothesis of a crossing of TMAO via the BLS in the neurological patient population. Passive diffusion of TMAO across the BLS due to the correlation of Q-TMAO with Q-albumin seems likely. In addition, impaired BLS function appears to be associated with increased permeability for TMAO.

In the literature, there are predominantly findings indicating a harmful effect of TMAO on the brain. A certain discrepancy remains.

1 Einleitung

Im ersten Teil dieser Diplomarbeit wird sowohl auf die Herkunft als auch auf die Physiologie und Pathophysiologie des Aminoxids TMAO im menschlichen Körper eingegangen. Im zweiten Teil folgt die Präsentation der durchgeführten Studie mittels statistischer Auswertung.

1.1 Einführung

Bei TMAO handelt es sich um eine organische Verbindung mit der Summenformel $(\text{CH}_3)_3\text{NO}$. Es gehört zur Klasse der Aminoxide (5). In Tiefseefischen fungiert es in erhöhten Konzentrationen als Osmolyt, indem es die Proteinfaltung und Nucleinsäuren gegen Denaturierung vor Hitze und Druck schützt. Die Konzentrationen von TMAO steigen hierbei linear mit der Tiefe (5-7).

Auch beim Menschen lässt sich TMAO in geringen Konzentrationen von 0,5-5 μM im systemischen Kreislauf feststellen. Dieses wird entweder direkt als TMAO oder indirekt über dessen Vorläufersubstanz Trimethylamin (TMA) über die Nahrung aufgenommen. Ein großer Anteil des anfallenden TMAO wird jedoch auch indirekt durch das Darmmikrobiom, aus in der Nahrung enthaltenen Vorstufen, erzeugt (8, 9).

Es wurde lange angenommen, TMAO sei ein reines metabolisches Abfallprodukt. Der aktuelle Wissensstand beschreibt TMAO jedoch als biologisch aktive Substanz. Es wird mit Erkrankungen verschiedener Organsysteme in Verbindung gebracht, wie Herzversagen, Atherosklerose, Übergewicht, Diabetes mellitus mit Veränderungen der Glukose-Homöostase, Nierenversagen, Malignomen, thrombotischen Ereignissen und neurologischen Erkrankungen (8, 9).

Diese Diplomarbeit setzt sich mit den Assoziationen zwischen TMAO und neurologischen Erkrankungen auseinander, einem Themenbereich, in dem erst seit wenigen Jahren zunehmend Publikationen veröffentlicht werden. Es wurde zum Beispiel gezeigt, dass TMAO auch im Liquor cerebrospinalis (CSF) zu finden ist. Außerdem wurde in einer Studie beobachtet, dass die TMAO-Konzentrationen in

der CSF bei Patienten mit Alzheimer-Krankheit (AD) und leichter kognitiver Beeinträchtigung (LKB) erhöht sind (10, 11).

1.2 Metabolismus von Trimethylamin und Trimethylamin-N-Oxid

1.2.1 Nutritive Aufnahme von TMA und TMAO

Im Vergleich mit anderen Nahrungsquellen, wie beispielsweise Rindfleisch oder Eiern mit einer TMAO-Konzentration von 0,01 mg/g, befinden sich in Fischen und Krustentieren die höchsten Konzentrationen an TMAO (bis zu 3 mg/g) (2, 7, 9). Diese Konzentrationen sind jedoch stark variabel und vom Lebensraum, der Spezies, wie auch der Jahreszeit abhängig. So haben Salzwasserfische wie Kabeljau, Schellfisch, Heilbutt, Hering und Rochen höhere Konzentrationen als Süßwasserfische. Dies ist mit den Eigenschaften dieses Osmolyts zu erklären, die es Organismen im Lebensraum tief unter Wasser ermöglicht, sich an die dort vorherrschenden Umstände zu adaptieren. Es wird angenommen, dass es neben der Stabilisierung der Proteinfaltung über ein Ansteigen der osmotischen Konzentration zu einem Absinken des Gefrierpunktes von Körperflüssigkeiten in Fischen kommt. Auch wirkt es dem hydrostatischen Druck unter Wasser entgegen, der inhibitorischen Effekte auf zahlreiche Proteine zur Folge hätte (7, 9, 12).

Die Biosynthese von TMAO in Fischen erfolgt zum Teil über die nutritive Aufnahme von Cholin und anschließender Metabolisierung durch Darmbakterien zu TMA und weiterer Metabolisierung durch die Leber zu TMAO. Manche Fische sind jedoch auch in der Lage, TMAO ohne Hilfe eines Mikrobioms zu synthetisieren. Bei der Verwesung wird das TMAO bakteriell wieder zum giftigen TMA reduziert und es entsteht der charakteristische Fischgeruch (12).

Die Aufnahme von TMAO-haltigen Meerestieren durch den Menschen ist mit einem Anstieg der Plasma- und Urinkonzentrationen von TMAO assoziiert (13). Die Plasmakonzentrationen scheinen nach erfolgter Nahrungsaufnahme schon innerhalb von 15 Minuten erhöht, wodurch eine unveränderte enterale Absorption des TMAO wahrscheinlich ist (14).

1.2.2 Biosynthese von TMA durch das Darmmikrobiom

Das zirkulierende TMAO lässt sich nicht allein mit der Ernährung mit Meerestieren erklären. Das Mikrobiom des Darmes stellt eine zentrale Rolle bei der Entstehung von TMAO dar. So werden durch die Ernährung die Vorgängerstoffe Cholin, Betain, L-Carnitin und Ergothionein aufgenommen. Diese sind Bestandteile des Stoffwechsels zahlreicher im Colon befindlicher Mikroorganismen und werden dort enzymatisch unter anderem zu TMA metabolisiert (siehe Abbildung 1) (9, 15). Tabelle 1 zeigt eine Liste an Gattungen bzw. Arten von Bakterien, bei denen eine Synthese zu TMA durch genannte Substrate möglich ist. Das TMA wird anschließend vom Darmlumen über den Pfortaderkreislauf zur Leber transportiert und zu TMAO oxidiert (8).

Cholin ist ein wichtiger Bestandteil der Nahrung, da es als Vorläufersubstanz von Phospholipiden essenziell für die Synthese der Zellmembranen ist. Zudem ist es eine Vorläufersubstanz für den Neurotransmitter Acetylcholin. Cholin findet sich beispielsweise in Rinder- und Schweineleber, Eigelb, Karfiol, Erdnüssen, Milch und Soja (2, 16). Freies Cholin wird im Dünndarm aufgenommen und in der Leber zu Betain, Phosphocholine oder Phosphatidylcholin metabolisiert. Bei größeren Mengen wird die Absorptionskapazität überschritten und das Cholin gelangt in den Colon, wo es auf das Mikrobiom des Dickdarmes trifft. Hier wird mithilfe eines mikrobiellen Enzyms (Cholin-TMA-Lyase) eine Kohlenstoff-Stickstoff-Bindung am Cholin gespalten, sodass TMA und Acetaldehyd entsteht (siehe Abbildung 1) (2).

Carnitin spielt eine essenzielle Rolle beim Energiestoffwechsel, indem es langkettige Fettsäuren vom Zytosol in die innere Mitochondrienmembran für die β -Oxidation transportiert. Es wird sowohl in größeren Mengen mit der Nahrung, vor allem mit rotem Fleisch, aber auch Milcherzeugnissen aufgenommen. Ebenfalls wird Carnitin vom Menschen endogen aus den Aminosäuren Methionin und Lysin synthetisiert. Die Syntheseleistung umfasst in etwa 1-2 μmol pro kg Körpergewicht pro Tag und damit ungefähr 25% des täglichen Bedarfs. Der Rest wird über die Nahrung aufgenommen, wobei die Menge an Carnitin in der Ernährung der Industrieländer signifikant zugenommen hat. Der oder die durchschnittliche nichtvegetarische Amerikaner*in konsumiert 100-300 mg/Tag. Ist die Absorptionskapazität durch die Enterozyten überschritten, wird Carnitin im Colon

vom Mikrobiom metabolisiert. Hier wird angenommen, dass 3-Hydroperoxybutyryl von Carnitin durch das Enzym Carnitin-Oxidoreduktase abgespalten wird und TMA entsteht (siehe Abbildung 1) (2, 17, 18).

γ-Butyrobetain (GBB), ein Metabolit von Carnitin, kann ebenfalls durch das mikrobielle Enzym Carnitin-TMA-Lyase direkt zu TMA gespalten werden (siehe Abbildung 1). Hier zeigte sich in einer Studie, dass die Transformation von GBB zu TMA bei Omnivoren im Vergleich zu Veganer*innen und Vegetarier*innen signifikant gesteigert ist (15, 19).

Betain fungiert im Organismus als wichtiger Methylgruppendonator im Bereich des Zytoplasmas, in den Mitochondrien und im Nukleus. Es wird beispielsweise für die Remethylierung von Homocystein zu Methionin benötigt. Vollkornweizen, Spinat, Shrimps und rote Beete sind besonders reich an Betain. Täglich werden 100-300 mg/Tag mit der Nahrung aufgenommen. Zusätzlich wird es in der Leber und den Nieren, aber auch durch das Mikrobiom aus Cholin und Carnitin synthetisiert. Der katabole Stoffwechselweg des Mikrobioms führt in einer gekoppelten Reduktions-Oxidations-Reaktion, katalysiert durch das Enzym Betain-Reduktase, ebenfalls zu TMA (siehe Abbildung 1) (2, 20).

Ergothionein ist ein biogenes Amin und Derivat von Histidin. Obwohl nicht bekannt ist, welche Aufgaben Ergothionein im Menschen hat, wird eine antioxidative und zytoprotektive Funktion vermutet. Es ist in Pilzen und Bohnen sowie in höherer Konzentration in Leber, Nieren und Erythrozyten enthalten. Es kann nicht endogen synthetisiert werden, sodass es über diese Nahrungsbestandteile aufgenommen werden muss. Über das mikrobielle Enzym Ergothionase wird es zu TMA abgebaut (siehe Abbildung 1) (2, 15).

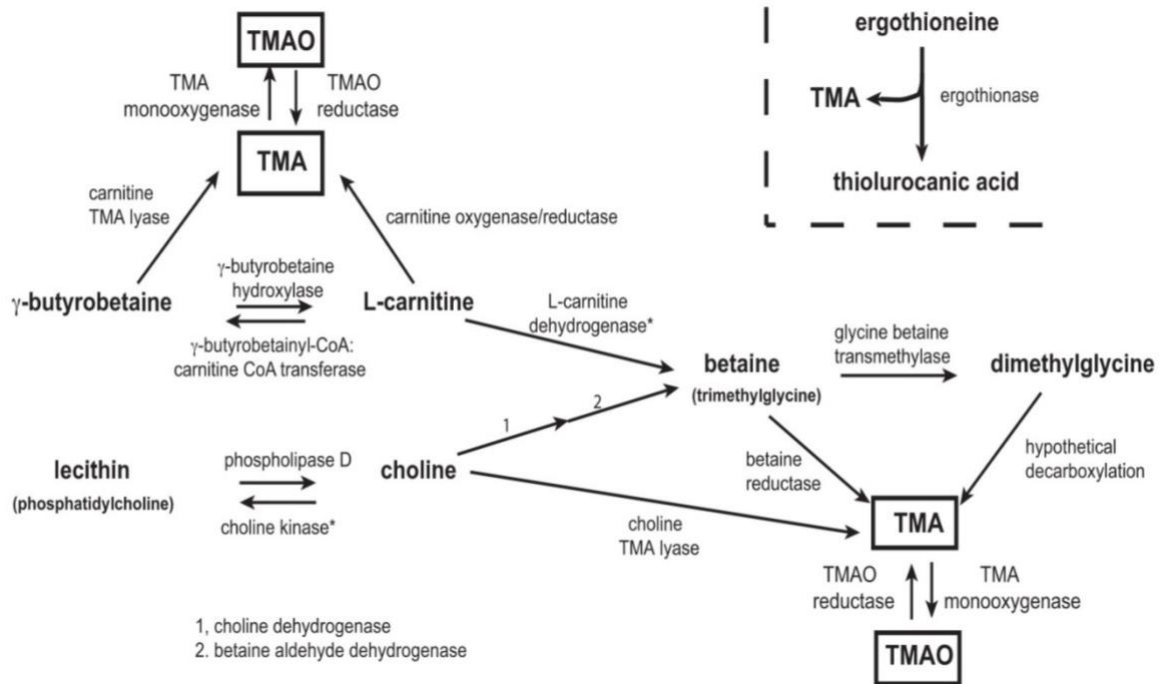


Abbildung 1: Stoffwechselwege zur Entstehung von Trimethylamin durch das menschliche Mikrobiom (2)

Wang et al. (21) beschrieben eine starke Erhöhung der TMA- und TMAO-Plasmakonzentrationen nach dreimonatiger Supplementation mit Cholin bei Mäusen.

In einer kleinen Studie an gesunden Menschen wurde nach nutritiver Aufnahme von Eiern, die einen hohen Anteil an Cholin besitzen, eine signifikante Erhöhung der TMAO-Konzentrationen in Plasma und Urin beschrieben. Etwa 14% des Gesamtcholins wurde im Durchschnitt in TMAO umgewandelt (22).

In einer weiteren Studie mit 40 gesunden Partizipant*innen konnte nach oraler Aufnahme von Phosphatidylcholin (zwei hart-gekochte Eier und d9-markiertes Phosphatidylcholin) eine zeitabhängige Erhöhung von TMAO registriert werden. Nach einer einwöchigen Einnahme von oralen Breitspektrum-Antibiotika wurde die Phosphatidylcholin-Gabe erneut durchgeführt. Die TMAO-Plasma und Urinkonzentrationen waren daraufhin fast gänzlich supprimiert. Nach einem Intervall von mindestens einem Monat nach der letzten Antibiotikagabe wurde eine dritte Phosphatidylcholin-Gabe durchgeführt, bei der die folgenden TMAO-Plasma- und Urinkonzentrationsmessungen wieder zeitabhängige Erhöhungen zeigten (23).

Die Einnahme von Breitspektrum-Antibiotika führt zu einer Erniedrigung der TMAO-Plasmaspiegel. Dies wird auf die Elimination des TMA-produzierenden Mikrobioms zurückgeführt (5).

Die Menge an gebildeten TMA ist nicht nur von der Menge an Vorläuferstoffen und von der Art, wie sie in Nahrungsmitteln vorliegen abhängig, sondern auch von der individuellen Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms (2). In einer Studie wurde gezeigt, dass die Streuung der TMAO-Urinkonzentrationen zwischen den Teilnehmer*innen nach einer festgelegten Mahlzeit bestehend aus Eiern und Rindfleisch sehr hoch war. Daraufhin wurden die Teilnehmer*innen in die Gruppen „high-TMAO producers“ und „low-TMAO producers“ stratifiziert. Die Stuhlproben der „high-TMAO producers“ hatten eine geringere Diversität des Mikrobioms im Vergleich zur Referenzgruppe. Zudem konnten den beiden Gruppen eindeutige mikrobielle Profile zugeordnet werden. Den „high-TMAO producers“ konnte ein 2:1 Verhältnis der Bakterienstämme Firmicutes zu Bacteroidetes nachgewiesen werden, wohingegen bei den „low-TMAO producers“ ein 1 zu 1 Verhältnis vorlag. Archaeen waren nur im Stuhl der „low-TMAO producers“ nachzuweisen (14).

Resveratrol, ein natürliches Phytoalexin, ist, trotz seiner ungeklärten biologischen Mechanismen für seine möglichen antiatherosklerotischen Effekte bekannt. Bei einer Studie von Chen et al. verringerte Resveratrol bei Mäusen die TMAO-Konzentration aufgrund einer verringerten Synthese von TMA durch die Umgestaltung des Mikrobioms. Dabei verschob sich unter anderem das Verhältnis zu Gunsten des Bakterienstammes der Bacteroidetes mit Verringerung von Firmicutes (24).

In einer weiteren Studie wurden Veganer*Innen, Vegetarier*Innen und Omnivor*Innen auf den TMAO-Plasmaspiegel untersucht. Die Nüchtern-Konzentrationen von TMAO waren bei der Gruppe der Veganer*innen und Vegetarier*innen signifikant geringer. Nach oraler Aufnahme von d3(methyl)-Carnitin wurde bei den Veganern*innen und Vegetariern*innen eine deutlich reduzierte Synthesekapazität für TMAO aus oralem Carnitin im Vergleich zu den Omnivor*Innen festgestellt. Außerdem hatten Veganer*innen und Vegetarier*innen eine signifikant erhöhte d3-Carnitin Plasmakonzentration im Vergleich zu den Omnivor*Innen. Dies deutet auf einen verringerten mikrobiellen Metabolismus von

Carnitin und eine unveränderte enterale Aufnahme hin. Auch in dieser Studie konnten einige Arten von Bakterien signifikant mit Plasma-TMAO-Konzentrationen assoziiert werden (18).

Tabelle 1: Trimethylamin produzierende Bakterien aus verschiedenen Substraten (2)

Phylum	Genus or Species	References
TMA N-oxide		
Actinobacteria	<i>Micrococcus</i>	Robinson et al., 1952
	<i>Mobiluncus</i>	Cruden and Galask, 1988
Firmicutes	<i>Bacillus</i>	Robinson et al., 1952
	<i>Clostridium</i>	Robinson et al., 1952
	<i>Staphylococcus</i>	Robinson et al., 1952
	<i>Sarcina</i>	Robinson et al., 1952
	<i>Streptococcus</i>	Robinson et al., 1952
Proteobacteria	<i>Alcaligenes</i>	Robinson et al., 1952
	<i>Campylobacter</i>	Sellars et al., 2002
	<i>Citrobacter</i>	Lin and Hurng, 1989
	<i>Escherichia</i>	Robinson et al., 1952; Ishimoto and Shimokawa, 1978; Cox and Knight, 1981; Takagi et al., 1981; Easter et al., 1982; Lin and Hurng, 1989; Denby et al., 2015
	<i>Proteus</i>	Robinson et al., 1952; Strøm et al., 1979; Stenberg et al., 1982
	<i>Pseudomonas</i>	Robinson et al., 1952; Lee et al., 1977; Easter et al., 1982; Chen et al., 2011
Choline		
Actinobacteria	<i>Mobiluncus</i>	Cruden and Galask, 1988
Bacteroidetes	<i>Olsenella</i>	Craciun and Balskus, 2012; Martínez-del Campo et al., 2015
	<i>Bacteroides</i>	Cruden and Galask, 1988
Firmicutes	<i>Anaerococcus</i>	Craciun and Balskus, 2012; Romano et al., 2015
	<i>Clostridium</i>	Robinson et al., 1952; Bradbeer, 1965; Fiebig and Gottschalk, 1983; Möller et al., 1986; Craciun and Balskus, 2012; Martínez-del Campo et al., 2015; Romano et al., 2015
Proteobacteria	<i>Desulfotobacterium</i>	Craciun and Balskus, 2012
	<i>Enterococcus</i>	Simenhoff et al., 1976
	<i>Streptococcus</i>	Robinson et al., 1952; Simenhoff et al., 1976; Chao and Zeisel, 1990; Craciun and Balskus, 2012; Martínez-del Campo et al., 2015
	<i>Desulfovibrio^a</i>	Hayward and Stadtman, 1959, 1960; Baker et al., 1962; Bradbeer, 1965; Fiebig and Gottschalk, 1983; Craciun and Balskus, 2012
	<i>Edwardsiella</i>	Romano et al., 2015
	<i>Enterobacter^b</i>	Eddy, 1953; Craciun and Balskus, 2012
	<i>Escherichia</i>	Craciun and Balskus, 2012; Martínez-del Campo et al., 2015; Romano et al., 2015
	<i>Klebsiella^b</i>	Eddy, 1953; Craciun and Balskus, 2012; Kuka et al., 2014; Kalnins et al., 2015; Martínez-del Campo et al., 2015
	<i>Proteus</i>	Seim et al., 1982a; Craciun and Balskus, 2012; Kuka et al., 2014; Martínez-del Campo et al., 2015; Romano et al., 2015
	<i>Providencia</i>	Craciun and Balskus, 2012; Romano et al., 2015
Carnitine	<i>Pseudomonas</i>	Robinson et al., 1952; Kleber et al., 1978
	<i>Yokenella</i>	Craciun and Balskus, 2012
Proteobacteria	<i>Acinetobacter</i>	Kleber et al., 1977; Seim et al., 1982b; Miura-Fraboni et al., 1982; Ditullio et al., 1994; Zhu et al., 2014
	<i>Citrobacter</i>	Zhu et al., 2014
	<i>Escherichia</i>	Zhu et al., 2014
	<i>Klebsiella</i>	Kuka et al., 2014; Zhu et al., 2014
	<i>Proteus</i>	Seim et al., 1982a
	<i>Pseudomonas</i>	Kleber et al., 1978; Miura-Fraboni et al., 1982
Betaine		
Firmicutes	<i>Clostridium</i>	Naumann et al., 1983; Möller et al., 1986
	<i>Eubacterium</i>	Zindel et al., 1988; Hormann and Andreessen, 1989
	<i>Sporomusa</i>	Möller et al., 1986; Hormann and Andreessen, 1989
Ergothioneine		
Proteobacteria	<i>Alcaligenes</i>	Yanasugondha and Appleman, 1957; Kelly and Appleman, 1961
	<i>Escherichia</i>	Wolff, 1962

In einer Studie wurde untersucht, wie sich die TMAO-Plasmakonzentration durch den Einfluss der enteralen Aufnahme von Fisch auf die TMA-Synthese verändert. Die Erhöhung der Plasma-TMAO-Konzentrationen wurden in vielfach höheren Ausmaßen durch die Ernährung von Fisch bestimmt. Nach der Zufuhr von Fisch waren die TMAO-Konzentrationen im Plasma der Studienteilnehmer*Innen im Vergleich zu den Kontrollgruppen, die Eier und Rindfleisch oder Früchte aßen, um

48-62-mal höher. Auch das TMA war 4-5-mal höher. Aufgrund des raschen TMAO-Plasmaanstieges nach der Zufuhr von Fisch innerhalb von 15 Minuten wurde ein Mitwirken des Mikrobioms in Bezug auf eine Metabolisierung als unwahrscheinlich angesehen. Im Vergleich zu den Studienteilnehmer*innen, die Früchte aßen, hatten die Teilnehmer*innen, die Eier bzw. Rindfleisch aßen, jedoch jederzeit einen höheren TMAO-Plasmaspiegel (14).

1.2.3 Synthese von TMA zu TMAO durch Flavin-haltige Monooxygenasen

Ein Teil des TMA im Darmlumen wird durch das Mikrobiom weiter metabolisiert, ein weiterer Teil verlässt den Körper durch Defäkation. Das restliche TMA wird passiv durch die Enterozytenmembranen diffundiert und über den Pfortaderkreislauf zur Leber transportiert. Hier kommt es mit der Enzymfamilie der Flavin-haltigen Monooxygenasen (FMO) in Kontakt (9). Diese FMOs sind für die Metabolisierung von nukleophilen heteroatomhaltigen Xenobiotika in ungefährliche, polare und dadurch harngängige Metaboliten durch N-Oxidation verantwortlich, auch für die Metabolisierung von TMA zu TMAO (25). Dabei wird in der ersten Phase der Katalyse das in den FMO enthaltene FAD mithilfe NADPH zu FADH₂ reduziert. In der zweiten Phase reagiert der NADP+FADH₂-Enzymkomplex mit molekularem Sauerstoff, sodass ein Hydroperoxyflavin (FAD-OOH) (+NADP+) als Zwischenprodukt entsteht, welches ein Atom des O₂ an das Substrat (hier z.B. TMA) und das zweite mit H₂ zu Wasser abgibt, sodass wieder FAD entsteht (26, 27). Im menschlichen Organismus werden fünf FMOs exprimiert. Diese sind in Abhängigkeit der Isoform in größeren Mengen in der Leber, den Nieren, der Lunge und dem Gastrointestinaltrakt, aber auch anderen Organen konzentriert. Im Gehirn finden sich eine sehr geringe Expression von FMO. Die Konzentrationen sind vom Alter abhängig, was insbesondere zwischen fetalen und adulten Organen bemerkbar ist (25).

Die N-Oxidation von TMA zu TMAO kann nur durch FMO1 und FMO3 katalysiert werden, wobei FMO3 hier die Hauptaktivität zugesprochen wird. Diese spezifische Katalyse von FMO3 ist in der Leber etwa 10-mal so hoch als die des FMO1. Auch die Konzentration von FMO3 in der adulten Leber ist neben FMO5 die höchste und somit auch um ein Vielfaches höher als die von FMO1. Die enzymatische Aktivität

erreicht eine Oxidation von etwa 95% des TMA zu TMAO. Die Aktivität ist von mehreren Faktoren abhängig (9, 25, 28).

Ein Geschlechtsdimorphismus bei der Expression von FMO3 wurde sowohl bei Mäusen als auch bei Menschen beobachtet. Das weibliche Geschlecht zeigt hierbei eine vermehrte Expression als das männliche. An Mäusen wurde gezeigt, dass Testosteron eine hemmende Wirkung auf die Expression von FMO3 besitzt, Östrogen hingegen eine positive Wirkung aufweist. Zusätzlich wurde ein Östrogenrezeptor in der Promoter-Region von FMO3 gefunden (26). Bei Betrachtung der Plasma-TMAO-Konzentrationen in Hinblick auf das Geschlecht wurden beim Menschen in verschiedenen Studien kontroverse Ergebnisse publiziert. In einer größeren Studie wurde beobachtet, dass Männer eine signifikant höhere TMAO-Plasmakonzentrationen im Vergleich zu Frauen hatten (28).

Es gibt eine Reihe an Mutationen, die die Aktivität von FMO3 verringern oder es funktionslos machen. Hierbei spielt häufig eine Bindungsstörung der Kofaktoren FAD oder NADPH eine Rolle. Die dadurch fehlende N-Oxidation zu TMAO führt zu einer Anreicherung des Vorläufers TMA. Diese volatile, stark nach verwesendem Fisch riechende Substanz wird unverändert über den Urin, Schweiß und Atem ausgeschieden, wodurch das Krankheitsbild der autosomal rezessiven Erkrankung Trimethylaminurie, auch Fish-Odor-Syndrom genannt, entsteht. Therapeutisch wird eine Umstellung auf fett- und cholinarme Ernährung angestrebt, um die mikrobielle TMA-Synthese zu minimieren (26, 28). In ausgewählten Populationen in Regionen der Tropen wurden gehäuft Mutationen an FMO3 und daraus resultierender Trimethylaminurie beschrieben (29). Der Polymorphismus in diesen Regionen könnte womöglich als evolutionärer Vorteil entstanden sein, indem das ausgeschiedene TMA als volatiles Insektizid wirkt (25).

Ein weiterer Faktor, der zu einer Veränderung der hepatischen FMO3-Aktivität führt, sind Gallensäuren. Diese induzieren mittels dem nukleären Farnesoid X Rezeptor (FXR) eine Expression von FMO3. FXR fungiert als Sensor der intrazellulären Gallensäuren-Konzentrationen in Leber und Darm und spielt über eine Einflussnahme der Transkription von entscheidenden Genen eine zentrale Rolle in der Regulation des enterohepatischen Kreislaufes (15, 30, 31).

Durch die Aktivierung von FXR mittels Gallensäuren wird die Expression von CYP7A1 (Cholesterol-7 α -Hydroxylase), einem Schlüsselenzym in der Synthese von Gallensäuren, verringert. Dies stellt einen Feedback Mechanismus zur Homöostase der Gallensäuren dar (28, 30, 31).

In einer Studie von Bennett *et al.* konnte gezeigt werden, dass nicht nur FMO3, sondern auch TMAO-Spiegel bei mit Gallensäuren ernährten Mäusen erhöht waren (32).

Das Mikrobiom des Darmes steht in Verdacht einen Einfluss auf die Expression von FMO3 zu besitzen. Der Stoffwechsel des Mikrobioms führt, je nach Zusammensetzung dessen, zur Entstehung verschiedener sekundärer Gallensäuren. Diese Gallensäuren sind in der Lage mehrere nukleäre Rezeptoren zu aktivieren und so Transkriptionen zu induzieren. So wäre ein individuell unterschiedlicher Einfluss des Mikrobioms auf die Aktivierung von FXR und folgender ansteigender FMO3-Expression möglich (30).

Durch Guggulsteron, einem FXR-Antagonisten, wurde in einer kürzlich publizierten Studie durch die Inhibierung von FMO3 eine verringerte TMAO-Konzentration festgestellt. Dies verstärkt die Annahme der Einflussnahme des Farnesoid X Rezeptor (33).

1.2.4 Konzentrationen und Ausscheidung von TMAO

TMAO hat eine Größe von 75,1 Dalton und wird hauptsächlich renal ausgeschieden. In geringeren Ausmaßen wird es auch durch den Schweiß, Fäzes und die expiratorische Luft aus dem Körperkreislauf gebracht (5, 8, 9). Nach einer Verabreichung von radioaktiv-markiertem TMAO konnte nach 24 Stunden eine renale Ausscheidung von 94,5% der ursprünglichen Stoffmenge registriert werden. 4% der ursprünglichen Stoffmenge wurde durch die Fäzes und unter 1% durch die Lunge über den Atem abgegeben (9).

Mit einer renalen Clearance von 219 ± 78 mL/min erfolgt die Elimination durch die Niere schnell. Zum Vergleich: Kreatinin hat eine Clearance von 119 ± 21 mL/min. Zusätzlich zur glomerulären Filtration wird TMAO aktiv über die tubuläre Sekretion ausgeschieden (34, 35).

Obwohl die TMAO-Plasmaspiegel beim Menschen eine sehr große individuelle Variabilität besitzen, können die Konzentrationen unter gesunden Individuen im Bereich zwischen 0,5 und 5 $\mu\text{mol/L}$ eingegrenzt werden (8). Diese Variabilität ist von einer Vielzahl an Faktoren abhängig. Die Ernährung und die Interaktion mit dem individuell variablen Mikrobiom bestimmen über bereits beschriebene Mechanismen erheblich die TMAO-Spiegel. Gleichbedeutend ist die Expression und Aktivität von FMO3 und FMO1. Auch die Nierenfunktion beeinflusst die TMAO-Konzentration stark. Zusätzlich wird eine Zunahme der Konzentration bei gesunden Individuen mit dem Alter beobachtet (34). In einer größeren Studie konnte die Einflussnahme der Gene als Faktor für eine Erhöhung der TMAO-Plasmakonzentrationen hingegen nur als geringfügig gefolgert werden (36).

1.3 TMAO als bioaktive Substanz

1.3.2 Trimethylamin-N-Oxid und kardiovaskuläre Erkrankungen

Im Jahre 2011 beschrieben Wang et al. erstmals eine Assoziation zwischen TMAO und kardiovaskulären Erkrankungen (37).

Darauffolgende Studien bestätigten diese starke Assoziation und konnten TMAO als unabhängigen und dosisabhängigen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen festlegen. Erhöhte systemische TMAO-Konzentrationen korrelieren mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse und der Gesamtmortalität (23, 38).

Bei Patient*Innen konnten die Plasma-TMAO Konzentrationen mit der Anzahl der schweren kardialen Komplikationen assoziiert werden (23). Auch bei Patient*Innen mit akutem Myokardinfarkt waren die TMAO-Konzentrationen mit einer schlechten Prognose verbunden (39). Bei Patient*Innen mit akutem Koronarsyndrom konnte eine Assoziation der TMAO-Konzentrationen sowohl mit der Vulnerabilität als auch mit der Progression der atherosklerotischen koronaren Plaques beschrieben werden. Zudem war auch ein erhöhtes Langzeitrisiko für kardiovaskuläre Ereignisse positiv assoziiert (40).

Bei Patient*Innen mit Herzversagen wurden positive Assoziationen von TMAO-Konzentrationen und der Entstehung und Progression der Erkrankung beschrieben. Es konnte auf eine ungünstige Prognose bei erhöhten TMAO-Konzentrationen geschlossen werden. Nach Anpassungen der TMAO-Konzentrationen an die glomeruläre Filtrationsrate als Wert der Nierenfunktion wurde diese Assoziation jedoch abgeschwächt (41).

Im Gegensatz dazu konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden, dass in hypertonen Ratten mit erhöhten TMAO-Konzentrationen eine Erniedrigung von kardiovaskulären Markern wie NT-pro-BNP und Vasopressin, als auch eine Reduktion vom linksventrikulären enddiastolischen Druck und kardialer Fibrose auftraten (42).

Die negativen Auswirkungen von TMAO stehen aber im Vordergrund. Bei Patient*Innen mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit stellten TMAO-Konzentrationen einen signifikanten Prädiktor für das 5-Jahres-Mortalitätsrisiko dar (43). Eine positive Assoziation zwischen Plasma-TMAO-Konzentrationen und Vorhofflimmern konnte in einer weiteren Kohorten-Studie gezeigt werden (44).

Die Pathophysiologie, die die Vorgänge erklärt, wie TMAO zu einem Risikofaktor für atherosklerotische Erkrankungen wird, ist noch nicht ausreichend verstanden. Da die Atherosklerose eine fundamentale Ursache für kardiovaskuläre Erkrankungen darstellt und etwa die Hälfte aller Todesfälle weltweit darauf zurückzuführen sind, ist dieses Forschungsgebiet von höchster Wichtigkeit. Es gibt einige Ansätze, auf welchen Mechanismen die Pathophysiologie beruhen könnte (siehe Abbildung 2). Diese werden folgend erläutert.

Autoimmunprozesse

Es gibt mehrere potenzielle Wege, wie TMAO durch Autoimmunprozesse zu Atherosklerose führen könnte.

Als ein Schlüsselprozess der Atherogenese wird die Entstehung von Schaumzellen im Subendothelium beschrieben. Dies sind transformierte, durch massive Akkumulation von Lipidtropfen im Zytoplasma gekennzeichnete Makrophagen (45).

Ein Ansatz, wie TMAO die Bildung von Schaumzellen fördern könnte, ist die vermehrte Expression von Hitzeschockproteinen (HSP). Diese HSPs fungieren als Chaperone zur erleichterten Proteinfaltung. Bei Zellstress wird die Expression der meisten HSPs hochreguliert, da sie eine zytoprotektive Rolle besitzen und die Faltung anderer Proteine bei ungünstigen Situationen erhalten. Manche HSP besitzen stressinduziert jedoch auch eine immunmodulierende Wirkung, indem sie als Immunmarker extrazellulär sezerniert werden und dort, abhängig von Konzentration und Art des HSP, sowohl proinflammatorisch als auch antiinflammatorisch wirken (46).

HSPs wurden bereits als Antigen in atherosklerotischen Plaques und im Blutkreislauf gefunden. Die Immunreaktion gegen HSP60 konnte von Wick *et al.* als ein initiales Ereignis in der Entstehung von Atherosklerose zurückgeführt werden (4, 47).

Jüngst wurde gezeigt, dass TMAO die Expression der HSPs HSP60 und GRP78 in Makrophagen erhöhte. Dies ist Zeichen einer Stressinduktion und wurde als Risikofaktor für Atherosklerose beschrieben. Auch eine nachgewiesene erhöhte stressinduzierte Expression von HSP70 und GRP94 durch TMAO könnte zur abnormalen Transformation von Makrophagen zu Schaumzellen beitragen (siehe Abbildung 2, A) (4).

Es besteht ein weiterer möglicher Weg, wie TMAO zu einer vermehrten Schaumzellbildung führt. Das angeborene Immunsystem erkennt über eine Reihe von Pattern Recognition Receptors (PRRs) die konservierten Strukturen von Pathogenen und leiten so eine proinflammatorische Immunantwort durch die Aktivierung von Immunzellen und der folgenden Sezernierung von Zytokinen ein (4, 45).

Die Scavenger-Rezeptoren stellen eine Gruppe von PRRs auf der Oberfläche von Makrophagen dar. Diesen ist es möglich, das bioaktive und proinflammatorische oxidierte Low-Density-Lipoprotein (ox-LDL) zu erkennen und aktivieren die Phagozytose durch die Makrophagen (4). Ox-LDL stellt eine heterogene Gruppe unterschiedlich stark oxidiertes LDL dar, welche im prooxidativen, inflammatorischen Milieu des arteriellen Gewebes aus LDL entstehen. Dabei finden komplexe Umstrukturierungen sowohl am Protein als auch an den Lipiden statt. Ab

einem gewissen Ausmaß der Oxidation kann der Abbau nicht mehr über den herkömmlichen LDL-Rezeptorweg geschehen, da es von diesem nicht mehr erkannt wird. Somit bleibt nur der Weg über die Scavenger-Rezeptoren (48, 49). Diese verfügen jedoch über keinen negativen Feedback-Mechanismus, sodass die Aufnahme von Ox-LDL durch die Makrophagen ungehemmt geschieht und das Ox-LDL in diesen akkumuliert. Es entstehen Schaumzellen, die einen bedeutenden Beitrag in der Pathogenese von Atherosklerose leisten (4).

In vergangenen Studien wurde gezeigt, dass TMAO die Expression von SR-A1 und CD36, zwei Scavenger-Rezeptoren, erhöht und so die Aufnahme von Ox-LDL mit folgender Schaumzellenbildung fördern konnte (siehe Abbildung 2). Bei der Hemmung der TMAO-Produktion durch eine Antibiose konnte eine reduzierte Anzahl an Makrophagen und eine geringere Bildung von Schaumzellen in aortalen Läsionen beschrieben werden (4).

Eine Atherogenese ohne die Bildung von Schaumzellen ist ebenfalls möglich. TMAO konnte die Aktivierung von NLRP3 induzieren. NLRP3 ist das bekannteste Inflammasom, das sich bei Signalen von PRRs bildet und Teil des angeborenen Immunsystems ist. Es aktiviert Caspase-1, ein proteolytisches Enzym, welches wiederum inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 beta (IL-1 β) und Interleukin-18 (IL-18) zu ihrer reifen Form transformiert. Dieser proinflammatorische Weg konnte aufgrund der Auswirkungen auf das Endothel als ein essenzieller Bestandteil der Pathophysiologie der Atherogenese beschrieben werden (siehe Abbildung 2, A) (4, 50).

Außerdem wurde eine signifikante Korrelation zwischen TMAO-Konzentrationen und dem Anteil an proinflammatorischen CD14⁺⁺ und CD16⁺ Monozyten bei Hirninfarkt-Patient*Innen beobachtet. In der gleichen Studie wurde eine Erhöhung von proinflammatorischen Ly6C^{high}-Monozyten bei Mäusen mit erhöhten TMAO-Konzentrationen beschrieben (siehe Abbildung 2, A). Die Erhöhung der Monozyten war nach Antibiose mit folgender Verringerung des Mikrobioms aufgehoben (51).

Inflammation

Über eine Reihe von proinflammatorischen Signalwegen scheint TMAO zu vaskulären Entzündungen und Endothelzellschäden beizutragen, die die Einlagerung von Cholesterin und folgend Plaque-Bildungen ermöglichen (38).

Es konnte eine erhöhte Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL-1 β mit gleichzeitiger Erniedrigung von antiinflammatorischem IL-10 gezeigt werden (siehe Abbildung 2, B) (4).

Ein weiterer Signalweg scheint über den nukleären Transkriptionsfaktor NF- κ B zu bestehen, der eine regulative Rolle auf die Expression von vielen proinflammatorischen Genen hat. Diese stehen in Verdacht einen atherosklerotischen Effekt zu besitzen. TMAO bewirkte unter direkter Aktivierung von NF- κ B eine erhöhte Expression von proinflammatorischen Genen im humanen aortalen Endothel und in glatten Muskelzellen (siehe Abbildung 2, B). In derselben Studie konnte eine durch TMAO hervorgerufene Adhäsion von aktivierten Leukozyten an Endothelzellen beobachtet werden. Dies ist ein Marker für eine proatherosklerotische Endothelzellaktivierung (4, 52).

Cholesterinstoffwechsel

Eine Störung in der Synthese oder der Ausscheidung von überschüssigem Cholesterin spielen entscheidende Rollen in der Entstehung von Atherosklerose. Im Zuge des reversen Cholesterintransports (RCT) wird überschüssiges Cholesterin aus den extrahepatischen Geweben durch Bindung an das High Density Lipoprotein (HDL) zur Leber transportiert. Über die Gallengänge werden die Gallensäuren und das Cholesterin schließlich über die Fäzes ausgeschieden. Ein alternativer Weg scheint durch die transintestinalen Cholesterinausscheidung (TICE) zu bestehen. Hier wird das Cholesterin direkt vom zirkulierenden Plasma über die Enterozyten in das Darmlumen befördert (28).

TMAO hemmt den RCT über mehrere Mechanismen.

Zum einen wurde gezeigt, dass die Aktivierung von FXR zu einer Inhibierung von Cyp7a1 führt und folgend die Synthese von Gallensäuren eingeschränkt wird. Dies

führt in weiterer Folge zu einer vermehrten Entstehung von Atherosklerose aufgrund eines Überschusses an Cholesterol (siehe Abbildung 2, C) (4).

Gleichzeitig führt TMAO zu einer erhöhten Expression von ABCA1 und ABCG1. Dies sind zwei Membranproteine, deren Funktion es ist, Cholesterol aus dem Zytosol an die Zelloberfläche zu transportieren (45).

Auch moduliert TMAO den RCT über eine verringerte Expression des Niemann-Pick C1-artigen Proteins 1 (NPC1L1), das für den Cholesteroltransport vom Darmlumen in die Enterozyten zuständig ist. Zudem inhibiert TMAO die Expression von ABCG5/8, welches essenziell für den TICE-Weg ist (siehe Abbildung 2, C). Es ist jedoch noch nicht klar, ob die verringerte Expression dieser Transporter zu dem verringerten RCT beitragen (4, 45).

Hyperreaktivität der Thrombozyten

Ein weiterer Mechanismus, der an atherosklerotischen und thrombotischen Geschehen beteiligt ist und durch TMAO beeinflusst wird, könnte eine

Hyperreaktivität der Thrombozyten sein. So führt die Einwirkung von TMAO auf Thrombozyten zu einer erhöhten Aktivierung, mediiert durch eine erhöhte Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern (siehe Abbildung 2, D) (38).

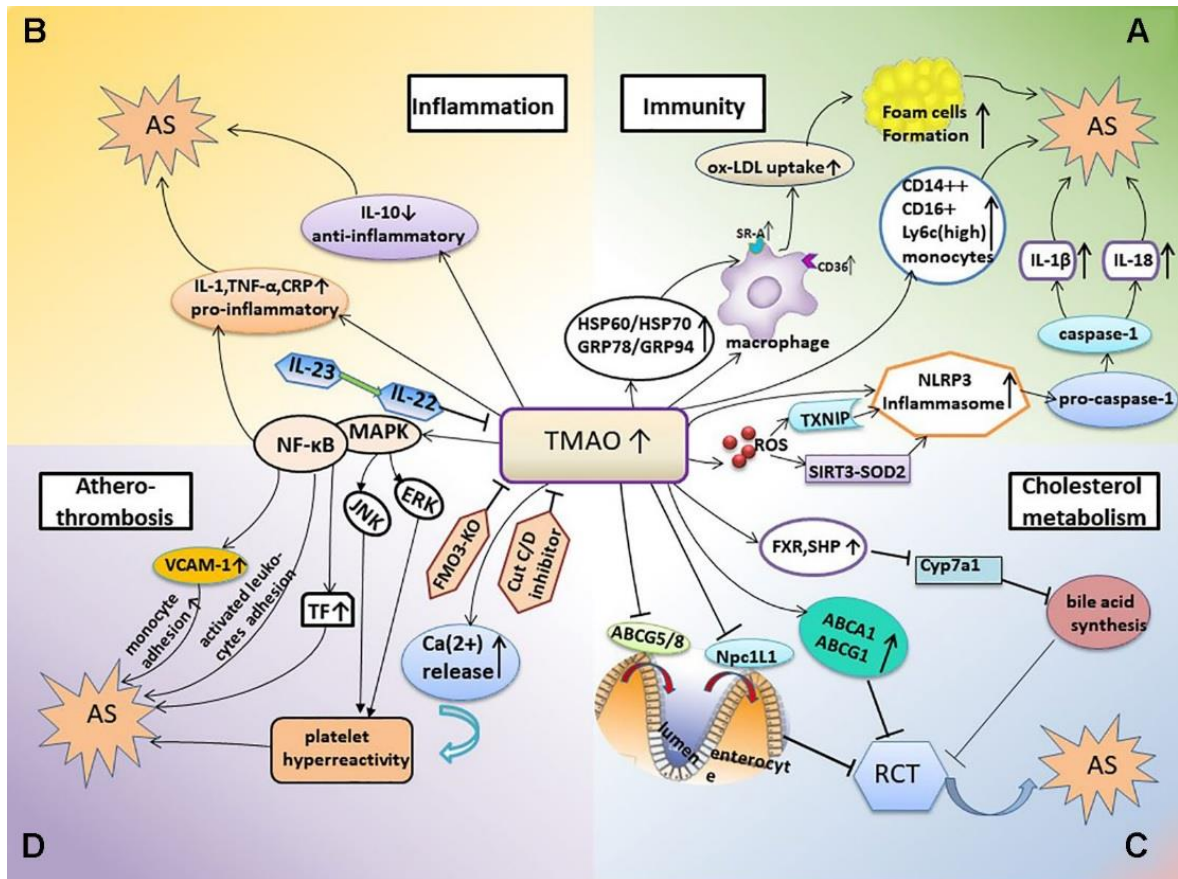


Abbildung 2: Pathophysiologische Mechanismen von Atherosklerose werden durch TMAO beeinflusst: A: Autoimmunprozesse, B: Inflammation, C: Cholesterinstoffwechsel, D: Hyperreaktivität der Thrombozyten (4)

1.3.3 Trimethylamin-N-Oxid und die Niere

Als wichtigstes Ausscheidungsorgan hat die Niere einen entscheidenden Einfluss auf die Höhe der TMAO-Konzentrationen. Da die renale Clearance von TMAO höher ist als die glomeruläre Filtrationsrate, wurde ein zusätzlicher Weg über die tubuläre Sekretion angenommen. OCT2 wurde als maßgeblicher Transporter von TMAO identifiziert. Dieses Transportprotein befindet sich in der basolateralen Membran der proximalen Tubuluszellen und mediiert die Aufnahme von organischen Kationen und Zwitterionen aus dem Blut in die Tubuluszellen. Es vermittelt sowohl den Influx als auch den Efflux der Zellen. Es konnte gezeigt

werden, dass auch MATE1, ein Antiporter in der apikalen Membran der proximalen Tubuluszellen an der tubulären Sekretion von TMAO beteiligt ist. Auch Transporter der ABC-Familie, darunter ABCG2 und ABCB1 scheinen einen Efflux zu ermöglichen (53-55).

Da die Exkretion von diesen Vorgängen abhängig ist, haben Patient*Innen mit chronischer Niereninsuffizienz (CNI) höhere TMAO-Plasmakonzentrationen als gesunde Personen (54, 56). Bei Patient*Innen mit beeinträchtigter Nierenfunktion waren die TMAO-Konzentrationen signifikant höher als in der gesunden Vergleichsgruppe (35). In einer Studie von Kaysen *et al.* zeigte sich eine starke Assoziation von TMAO-Serumkonzentrationen mit dem Grad der Nierenfunktion (57).

Bei Gabe von Schleifendiuretika (Furosemid, Torasemid) wurde eine Steigerung der TMAO-Plasmakonzentrationen festgestellt (58).

TMAO akkumuliert in hohen Maßen bei Patient*Innen, die auf eine chronische Hämodialyse angewiesen sind. Bei erfolgreichen Nierentransplantationen konnte eine wesentliche Reduktion der TMAO-Konzentration festgestellt werden (34, 59, 60).

Gleichzeitig zeigte sich in mehreren Studien, dass TMAO direkt zu einer progressiven renalen tubulo-interstitiellen Fibrose mit folgender renaler Insuffizienz führen könnte (56, 61).

Tang *et al.* konnten bei Tierversuchen sowohl nach Gabe einer mehrwöchigen cholinreichen Ernährung als auch nach TMAO-reicher Ernährung eine Erhöhung der TMAO-Konzentrationen feststellen. Diese Konzentrationen waren vergleichbar mit den Werten von CNI-Patienten. Die erhöhten TMAO-Konzentrationen waren mit histopathologischen tubulointerstitiell-fibrotischen Veränderungen assoziiert. Außerdem kam es bei beiden Gruppen zu einem Konzentrationsanstieg von KIM-1, einem Biomarker für eine proximale tubuläre Schädigung, sowie zu einer vermehrten Phosphorylierung von SMAD3, welches eine zentrale Rolle in der Aktivierung der renalen Fibrose besitzt. Weiters führte eine Verlängerung der cholin- bzw. TMAO-reichen Ernährung auf 16 Wochen zu einer Erhöhung von Cystatin C, einem sensitiven Marker der Niereninsuffizienz (54, 62, 63).

Auch Sun et al. kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Nach 16-wöchiger Gabe von fetthaltiger Nahrung an Mäusen kam es neben Übergewicht und metabolischen Störungen zu einem Anstieg der TMAO-Konzentrationen. Ebenfalls kam es zu renaler interstitieller Fibrose, zu einer vermehrten Expression von phosphoryliertem SMAD3, KIM-1 und zu einer Erhöhung der Cystatin-C-Konzentration. All diese Veränderungen konnten durch eine begleitende Gabe von 3,3-Dimethyl-1-butanol (DMB), einem Hemmer der Trimethylaminsynthese, verhindert werden. Hierbei waren die TMAO-Konzentrationen signifikant erniedrigt. Ebenfalls hatten die Mäuse eine signifikante Erhöhung in der Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und Interleukin-1 β , die ebenso Marker von oxidativem Stress im Nierengewebe darstellen. Auch diese Veränderungen waren mit einer begleitenden Gabe von DMB, einhergehend mit sinkenden TMAO-Konzentrationen, reversibel. DMB veränderte in dieser Studie keine der metabolischen Parameter. Die TMAO-Konzentrationen korrelierten positiv mit dem Grad der renalen interstitiellen Fibrose und Biomarkern der Niereninsuffizienz (61).

In einer kürzlich publizierten Studie von Gupta et al. wurde bei durch cholinreicher Ernährung induzierten niereninsuffizienten und nierenfibrosierten Mäusen ein Inhibitor der Trimethylamin-Lyase, Iodomethylcholin, verabreicht. Dieser verhinderte selektiv die Synthese von Cholin zu TMA im Mikrobiom und in weiterer Folge die Synthese von TMAO. Dies führte zu einer Verbesserung der Nierenfunktion und schwächte die Marker der tubulointerstitiellen Fibrose ab. Zusätzlich kehrte Iodomethylcholin die cholin-induzierten Veränderungen im Mikrobiom zu einem Großteil um (64).

So kann gemutmaßt werden, dass einerseits eine Niereninsuffizienz zu einer reduzierten renalen Ausscheidung von TMAO führt, wodurch folglich erhöhte TMAO-Konzentrationen entstehen. Diese verschlechtern wiederum die Niereninsuffizienz und führen zur renalen tubulointerstitiellen Fibrose.

Kim et al. beschrieben eine starke unabhängige Assoziation zwischen TMAO-Plasmakonzentrationen und ischämischen Ereignissen bei CNI-Patienten. In einer weiteren Studie war TMAO besonders bei Personen mit einer geschätzten glomerulären Filtrationsrate von unter 90 mL/min/1,73m² positiv assoziiert mit der Gesamtsterblichkeit (65, 66).

Bei Nierentransplantationen wird TMAO als Urinmarker für nichtspezifische medulläre Schäden in Betracht gezogen (67).

In einer kürzlich publizierten Studie wurde eine durch TMAO induzierte erhöhte Expression von Aquaporin-2 in der Medulla renalis festgestellt. TMAO könnte demnach durch eine Erhöhung des osmotischen Druckes und der erhöhten Expression von Aquaporin-2 zu Hypertonie führen (68).

1.3.4 Trimethylamin-N-Oxid und Diabetes mellitus

In zahlreichen Studien wurden erhöhte TMAO-Konzentrationen in Typ-2 Diabetes mellitus (T2DM)-Patient*Innen beobachtet (38, 69-71).

In einer Metaanalyse von 12 Studien wurden hohe Konzentrationen von TMAO mit einer erhöhten Prävalenz von T2DM assoziiert. So bestand bei den Individuen mit hohen TMAO-Konzentrationen in Relation zu Individuen mit geringer TMAO-Konzentration eine etwa 50% höhere Wahrscheinlichkeit an T2DM zu erkranken. Es konnte eine direkte Assoziation zwischen TMAO-Plasmakonzentrationen und dem Risiko, an T2DM zu erkranken, gezeigt werden. Es wurde ein Anstieg der Prävalenz von T2DM um 54% pro 5 µmol/L Anstieg der TMAO-Plasmakonzentrationen, beziehungsweise 13% pro 5 µmol/L Anstieg der TMAO-Serumkonzentrationen beschrieben (71).

Als möglicher pathophysiologischer Vorgang wird eine vermehrte TMAO-abhängige Freisetzung von N-Nitroso-Verbindungen (NOCs) vermutet. Diese wurden in Studien als Ursache für Insulinresistenzkrankungen beschrieben. Weiter beeinträchtigt TMAO die hepatische Glukoneogenese und den Glukosetransport. Dies führt zu einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Insulinresistenz (72).

Insulin hemmt die Expression von FMO3, dem TMAO-bildenden Enzym, wohingegen Glukagon diese fördert. Das Knockdown von FMO3 in insulinresistenten Mäusen supprimierte den Transkriptionsfaktor FOXO1, der eine zentrale Rolle im Metabolismus spielt. Dies verhinderte die Entstehung von Hyperglykämien, Hyperlipidämien und Atherosklerose. Dies lässt vermuten, dass FMO3 für die FOXO1-Expression benötigt wird, die bei Insulinresistenz zu weiteren metabolischen Störungen führt (73, 74).

Kontrovers ist eine Studie von Papandreou et al., in der erhöhte TMAO-Konzentrationen zu einem geringeren Risiko für T2DM führten. Besonders die Studienteilnehmer*Innen im oberen Quartil der TMAO-Konzentrationen hatten im Vergleich zu den Teilnehmer*Innen im unteren Quartil ein 48% geringeres Risiko an T2DM zu erkranken. Auch L-Carnitin und Betain wurden in dieser Studie als protektiv beschrieben (75).

Roy et al. konnten keine Assoziation zwischen TMAO-Konzentrationen und der Insulinresistenz oder dem HbA1c-Wert finden. Jedoch gab es eine positive Assoziation zwischen den TMAO-Konzentrationen und der Prävalenz von Prädiabetes (76).

TMAO-Konzentrationen konnten mit schweren kardialen Komplikationen und der Mortalität bei T2DM-Patienten assoziiert werden (77).

Auch bei Diabetes mellitus Typ 1 (T1DM)-Patient*Innen konnte eine Assoziation von erhöhten TMAO-Konzentrationen mit kardiovaskulären Ereignissen, Mortalität und einer schlechten renalen Entwicklung gezeigt werden (78).

In einer Studie von Li et al. wurde eine positive Assoziation zwischen TMAO-Konzentrationen und Gestationsdiabetes gefunden. In einer weiteren Studie konnte zwar TMA mit Gestationsdiabetes assoziiert werden, für TMAO wurde im Gegensatz jedoch eine negative Assoziation mit Gestationsdiabetes beschrieben (79, 80).

1.3.5 Trimethylamin-N-Oxid und Malignome

TMA und TMAO konnten ebenfalls mit malignen Prozessen in Verbindung gebracht werden (81).

Bae et al. konnten in einer Studie mit postmenopausalen Partizipantinnen die Plasma-TMAO-Konzentration unter Berücksichtigung von Kovariaten positiv mit dem Rektalkarzinom assoziieren. In Bezug auf das kolorektale Karzinom (CRC) konnte eine positive Assoziation mit TMAO-Konzentrationen geschlossen werden, jedoch nur bei Frauen mit geringen Vitamin B12-Plasmakonzentrationen, nicht jedoch bei Frauen mit hohen B12-Konzentrationen (82).

In einer genomweiten Assoziationsstudie (83) konnte zudem eine starke genetische Assoziation zwischen TMAO und CRC beschrieben werden. Mehr als 50 Gene konnten gleichzeitig für TMAO-Erhöhungen und ebenfalls einem erhöhten CRC-Risiko beschrieben werden. Ebenso wurden 20 gemeinsame Stoffwechselwege gefunden, die sowohl in Zusammenhang mit TMAO stehen als auch in der Entstehung von CRC involviert sind. (72)

In einer Studie von Liu et al. waren die medianen Serum-TMAO-Konzentrationen bei CRC-Patient*Innen signifikant höher als in der gesunden Kontrollgruppe. Außerdem war das krankheitsfreie Überleben bei Patient*Innen mit hohen Serum-TMAO-Konzentrationen signifikant kürzer als bei jenen mit geringen Konzentrationen. In einem multivariaten Verfahren konnten die TMAO-Konzentrationen neben der Existenz von Fernmetastasen einen unabhängigen Prognosefaktor in Bezug auf das CRC darstellen (84).

Im Gegensatz dazu fanden Guertin et al. in einer prospektiven Studie diskrepante Ergebnisse. Zwar bestand eine starke Assoziation zwischen Serum-Cholin und dem Risiko an CRC zu erkranken, jedoch konnte diese Assoziation nicht mit Serum-TMAO gefunden werden (85).

Die Mechanismen, die TMAO womöglich zu einem Risikofaktor in der Entstehung des CRC werden lassen, könnten durch NOCs begründet sein. Diese finden sich in hohen Konzentrationen in verarbeitetem Fleisch und im Zigarettenrauch. Beides stellen Risikofaktoren für die Entstehung von Kolonkarzinomen dar, im Besonderen auch für die Entstehung des CRC. So konnten bereits spezifische, durch NOCs ausgelöste Mutationen als eine Ursache von CRC identifiziert werden. Hohe TMAO-Plasmakonzentrationen spiegeln eine hohe intestinale Konzentration von TMA und Dimethylamin (DMA), einem weiteren Metaboliten von TMA, wider. Methylamine wie TMA und DMA stellen ein Substrat für die Bildung von NOCs dar. Über eine Nitrosierung mit dem Substrat N_2O_3 , das von Darmbakterien gebildet wird, kann DMA zu einem NOC metabolisiert werden (siehe Abbildung 3) (8, 72).

Ein weiterer möglicher Mechanismus in der Karzinogenese stellt die Möglichkeit von TMAO, aber auch seinem Präkursor Betain dar, als Methylgruppendonator zu fungieren. Dies könnte durch DNA-Methylierungen zu epigenetischen Veränderungen und im Folgenden zu malignen Transformationen führen (72).

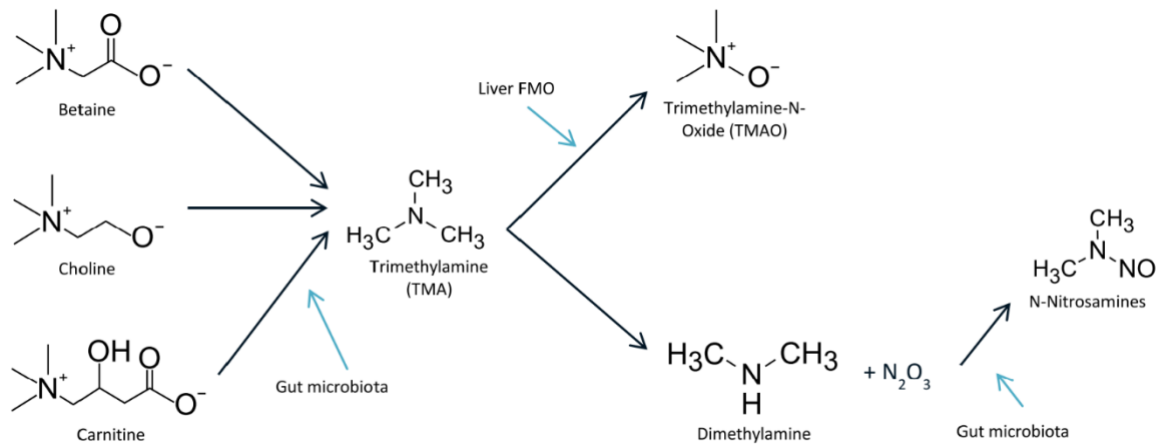


Abbildung 3: Metabolischer Stoffwechselweg mit der Bildung von TMAO und N-Nitroso-Verbindungen (72)

Im Gegensatz dazu gibt es auch eine Studie, die aufgrund des proteinstabilisierenden Effekts protektive Ergebnisse von TMAO in Bezug auf die Karzinogenese erhielt. Es wurde beschrieben, dass eine stabilisierende Wirkung an der humanen Nucleosid-Diphosphat-Kinase A mit der Punktmutation S120G besteht. Diese Mutation wurde beim Glioblastom entdeckt. TMAO korrigierte die entstandenen Fehlfaltungen und stabilisierte das Protein (86).

1.4 Liquor cerebrospinalis und Blutliquorschranke

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) ist eine physiologische Barriere zwischen Blut und neuronalem Gewebe an den ZNS-versorgenden Gefäßen. Sie ist einerseits für eine stabile Homöostase durch Regulation des Austausches von Ionen, Molekülen und Zellen zwischen dem ZNS und dem restlichen Körper unentbehrlich, andererseits kann die BHS als Barriere, und somit als Schutz vor Toxinen und Pathogenen wirken (87).

Eine ähnlich wichtige Funktion für die Homöostase im Bereich des ZNS stellt die Blut-Liquor-Schranke (BLS) dar. Diese wird hauptsächlich von den Plexus chorioidei der vier Ventrikel und zusätzlich von den subarachnoidalen epithelialen Strukturen gebildet. Diese BLS stellt eine Barriere zwischen der CSF und dem vaskulären System dar. Durch die BLS wird die CSF aus dem Blut filtriert. Die BLS

ist wie die BHS essenziell für die Aufrechterhaltung der sensiblen Homöostase des ZNS, indem es dieses vom Systemkreislauf abschirmt. Jedoch unterscheidet sie sich in Bezug auf Morphologie und Permeabilität von der BHS. So besitzt die BLS zahlreiche Fenestrierungen in Form von Gap junctions. Der passive Transfer durch diese Barriere, der neben dem aktiven Transport (u. a. Glukose) die Konzentrationen von hydrophilen Substanzen im CSF bestimmt, ist von mehreren Faktoren abhängig. Zum einen vom hydrodynamischen Radius der Substanz, zum anderen von der jeweiligen Konzentration im Blutkreislauf und schließlich von der Permeabilität der BLS (88, 89).

Beim passiven Transport bestimmt der Konzentrationsgradient zwischen Serum- und CSF-Konzentration eines permeablen Stoffes die CSF-Konzentration. Um einen solchen Transport, der in der Regel aufgrund ändernder Serumkonzentrationen ständigen Fluktuationen der Konzentration ausgesetzt ist, beschreiben zu können, wird dieser als CSF/Serum-Konzentrationsquotient ($Q_{\text{Substanz}} = \text{CSF}_{\text{Substanz}} / \text{Serum}_{\text{Substanz}}$) ausgedrückt. Dieser stellt einen normalisierten, dimensionslosen Wert dar und ist unabhängig von Serumkonzentrationsschwankungen. Der Albumin CSF/Serum-Konzentrationsquotient (Q_{Alb}) setzte sich aufgrund der fehlenden Produktion von Albumin im ZNS als Marker der Permeabilität und Funktion der BLS durch (1).

Mit einer Filtration von 450-550 mL in 24 Stunden und einem Volumen von 90-150 mL des Liquorraumes wird die CSF in etwa 3-5-mal am Tag ausgewechselt. Diesen hohen Fluss durch die Barrieren ermöglichen Aquaporin-4-Kanäle, die zahlreich an der BLS vorhanden sind. Die Absorption der CSF erfolgt zum Teil über die Villi der Granulationes arachnoideales, kleinen Ausstülpungen der Arachnoidea mater, die durch die Dura mater treten. Die CSF gelangt dann über die venösen Sinus in das Blut. Auch drainiert die CSF perineural über die Hirnnerven in periphere lymphatische Gefäße. Unter physiologischen Bedingungen besteht ein ausgeglichenes Verhältnis an Neubildung und Absorption der CSF, das unter pathologischen Veränderungen aufgrund erhöhter Bildung, wie beim Papillom des Plexus choroideus, oder durch eine verminderte Absorption durch Obstruktion im Bereich des Ventrikelsystems oder des Subarachnoidalraumes zu einem Ungleichgewicht führt (89-92).

Laut Hansotto Reiber können durch einen verminderten CSF-Fluss jegliche Umstände einer Erhöhung der CSF-Proteinkonzentration durch diesen erklärt werden. Bei Erkrankungen, die zu einer geringeren Absorption und demnach zu einem geringeren CSF-Fluss führen, kommt es dementsprechend zu einer Erhöhung der Konzentration von Serumproteinen in der CSF durch einen gesteigerten passiven Transport durch die BLS. Diese Serumproteine können bei vorliegender BLS-Störung ein Vielfaches der Konzentration der Referenzwerte einnehmen. Demnach kann unabhängig von der zugrunde liegenden Erkrankung durch Q_{Alb} auf die Proteindurchlässigkeit und folgend einer etwaigen Dysfunktion der BLS geschlossen werden (89, 91). Der Grenzwert von Q_{Alb} , bei dessen Überschreitung eine BLS-Dysfunktion diagnostiziert werden kann, ist altersabhängig. Dieser Grenzwert liegt beispielsweise im Alter bis 15 Jahren bei 5×10^{-3} , bis 40 Jahre bei $6,5 \times 10^{-3}$ und bis zu 60 Jahren bei 8×10^{-3} , wobei die folgende Formel für die Berechnung jeden Alters über 5 Jahre gilt: $Q_{Alb} = (4 + \text{Alter}/15) \times 10^{-3}$ (1).

Bei einer Vielzahl von neurologischen Erkrankungen kommt es zu einer intrathekalen Synthese von Immunglobulinen, also einer Synthese innerhalb des ZNS. Um eine Differenzierung zwischen einer intrathekalen Synthese und der Diffusion durch die BLS zu ermöglichen, werden die Quotienten der jeweiligen

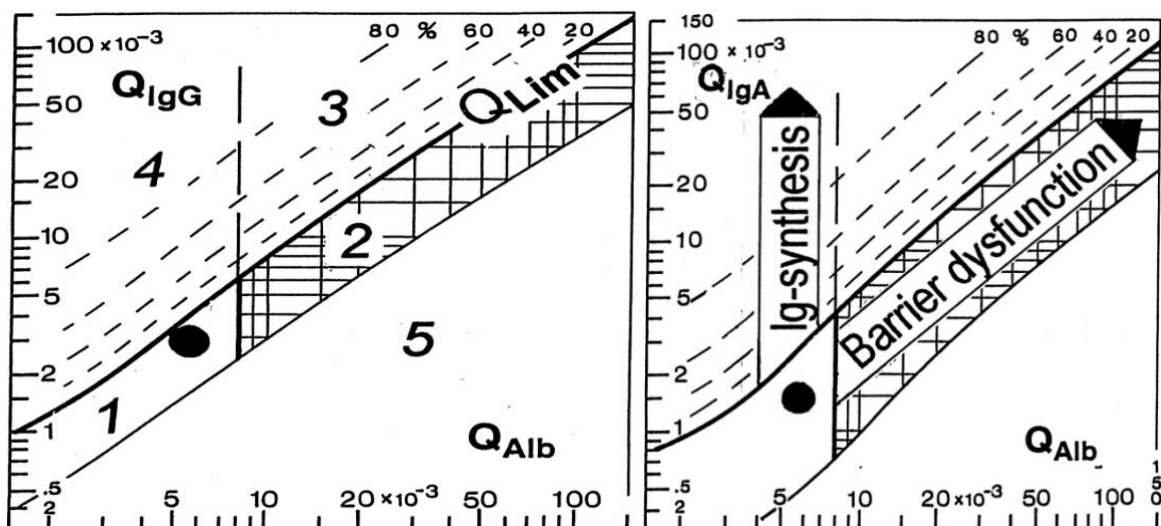


Abbildung 4 : Reiber-Schema beispielhaft für Q_{IgG} und Q_{IgA}
(In Anlehnung an (1))

Die Positionen der fünf Zahlen stellen folgende Ergebnisse dar:
1: normal; 2: isolierte BLS-Störung; 3: kombiniert intrathekale Immunglobulin-Synthese mit BLS-Störung; 4: isolierte intrathekale Immunglobulin-Synthese; 5: systematischer Fehler

Immunglobuline Q_{IgG} , Q_{IgA} und Q_{IgM} mit Q_{Alb} in Beziehung gebracht. Dies wurde im Reiber-Schema realisiert (siehe Abbildung 4). Dadurch kann eine eventuell höhere Konzentration an Immunglobulinen, als dies durch eine alleinige Schrankenstörung erklärbar wäre, als intrathekale Synthese diagnostiziert werden. Die hyperbolische Funktion Q_{Lim} , die den Grenzwert der Immunglobulinkonzentration in Abhängigkeit von Q_{Alb} darstellt, lässt die Diagnostik einer intrathekalen Synthese zu (siehe Abbildung 4) (92).

Um einen möglichen Einfluss von TMAO auf neuronale Zellen in Erwägung zu ziehen, stellt sich die Frage, ob es im CSF nachweisbar ist. Eine Antwort konnten Del Rio *et al.* im Jahr 2017 anhand von Messungen des CSF neurologisch erkrankter Individuen liefern. So konnte bei allen 58 Patient*Innen eine variable Konzentration zwischen 0,11 und 6,43 $\mu\text{mol/L}$ beobachtet werden. Dies war der erste Nachweis der Anwesenheit von TMAO im CSF (11).

Verneti *et al.* konnten in einer in vitro-Studie zeigen, dass 26% des applizierten TMAO durch die BHS penetrieren konnte (93).

Liu und Huang konnten eine gestörte BHS bei Patient*Innen mit erhöhten TMAO-Spiegeln in Kombination mit einer verringerten Expression von Tight-Junction-Proteinen wie Claudin-5 und ZO-1 beobachten (8, 94).

In einer kleinen Studie mit 18 Morbus Parkinson-Patientinnen und Patienten konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 9 Personen eine signifikant höhere CSF-TMAO-Konzentration gemessen werden (95).

Es ist jedoch noch unklar, ob das gemessene TMAO ausschließlich aus dem Blutkreislauf, hepatisch metabolisiert über die BLS gelangt oder eine de novo-Synthese im Gehirn stattfindet. Da FMO 1-5 auch im adulten Gehirn in geringem Maße vorhanden ist, wäre dies möglich (15, 25).

1.5 Trimethylamin-N-Oxid und neurologische Erkrankungen

Neben den vielen Bereichen im menschlichen Körper, in denen TMAO einen Einfluss auf physiologische und pathophysiologische Vorgänge zu haben scheint,

wird in jüngster Zeit auch in Bezug auf neurologische Erkrankungen und einen möglichen Zusammenhang mit TMAO geforscht.

Dieser Zusammenhang scheint, wie in den folgenden Kapiteln beschrieben, gegeben. Zum einen wird eine zytoprotektive Funktion im Zuge von Erkrankungen mit Proteinfehlfaltungen beschrieben, zum anderen wird ein negativer Einfluss auf verschiedenste zytotoxische Vorgänge beobachtet (15).

1.5.1 Protektive Proteinstabilisierung

TMAO ist durch seine stabilisierende Wirkung in der Lage, die Struktur der Proteinfaltung und demnach die Aktivität der Proteine bei vielen biologisch wichtigen Vorgängen unter ungünstigen biologischen Bedingungen wie Hitze und Druck zu erhalten (5).

Mehrere Studien und Experimente kamen zu dem Ergebnis, dass TMAO einen protektiven und stabilisierenden Einfluss auf nativ gefaltete Proteine aufweist und damit einer toxischen Aggregation entgegenwirkt. Dagegen wird die Aggregation von intrinsisch unstrukturierten Proteinen gefördert (96).

PrP^C ist ein Glykoprotein, das an der Zelloberfläche von Neuronen, aber auch in geringeren Konzentrationen auf Gliazellen im ZNS vorkommt. Bei einer Vielzahl an Prionenerkrankungen wie der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, Kuru, dem Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom, der letalen familiären Insomnie, sowie Scrapie bei Schafen und der bovinen spongiformen Enzephalopathie bei Rindern ist eine Konformitätsänderung von PrP^C als Ursache dieser Erkrankungen anzusehen. Dabei werden eine oder mehrere α -Helices von PrP^C zu β -Faltblättern umgefaltet. Das Produkt dieser Konformitätsänderung ist die pathogene Isoform PrP^{Sc}, die in weiterer Folge zu den erwähnten Prionenerkrankungen führt (97, 98).

Tatzelt *et al.* beschrieben im Jahre 1996 einen Einfluss von TMAO auf das Faltungsverhalten von PrP^C. TMAO konnte die Konformitätsänderung von PrP^C zu PrP^{Sc} verhindern. Die Autor*Innen vermuten, dass TMAO die Struktur der α -Helices stabilisiert und das Protein so in seinem physiologischen Zustand verbleibt. Eine Rückwandlung von bereits vorhandenem PrP^{Sc} zu PrP^C konnte TMAO jedoch nicht induzieren (97).

Auch Bennion et al. konnten bei Simulationen mit PrP protektive Eigenschaften durch TMAO beobachten. Die durch einen niedrigen pH-Wert induzierte Konformitätsänderung von PrP^C zu PrP^{Sc} konnte durch die Anwesenheit von 1 mol/L TMAO durch eine Verstärkung der ursprünglichen Struktur entgegengewirkt werden. Zusätzlich zeigten sie, dass die Proteinstruktur von bereits vorhandenem PrP^{Sc} durch Zugabe von TMAO beeinflusst wird. Durch das Wiedererlangen von Intraproteinkontakten und Wasserstoffbrückenbindungen wurde PrP^{Sc} zum Teil in eine PrP^C-ähnliche Konformität zurückbildet (99).

Die Machado-Joseph-Krankheit ist eine autosomal dominant-vererbte Erkrankung, die durch eine Mutation zu einem veränderten Protein, Ataxin-3, mit einer Verlängerung des Polyglutaminbereichs führt. In Folge entstehen polyglutaminreiche Aggregationen, die zum Zelltod und somit unter anderem zur Ataxie führt. Yoshida et al. zeigten in vitro an mit mutiertem Ataxin-3 eingefügten Zellen, dass TMAO die Aggregation in einem Bereich bis 150 mmol/L TMAO-Konzentration konzentrations-abhängig unterdrückt. Zudem verringerte TMAO bei einer Konzentration von 150 mmol/L die Häufigkeit von Zelltod. Die Autor*Innen begründeten dies anhand der proteinstabilisierenden Eigenschaften von TMAO und dem folgenden Fehlen von zytotoxischen Aggregationen (100).

Eine weitere Erbkrankheit, die zu den Polyglutaminerkrankungen zählt, ist Chorea Huntington. Eine vielfache Wiederholung des Nukleotidtriplets CAG im HTT-Gen führt zu einem verlängerten Polyglutaminbereich im HTT-Protein. Dieses mutierte HTT-Protein hat die Eigenschaft abnorme Konfigurationen einzugehen und schließlich zu aggregieren. Bei in-vitro Versuchen mit TMAO kam es dosisabhängig zu einer zwar schnelleren Aggregation von mutiertem HTT-Protein, diese unstrukturierte Aggregation führte jedoch zu keinen neurotoxischen Eigenschaften (101, 102).

Die meisten Proteine haben eine festgelegte dreidimensionale Struktur, die Tertiärstruktur. Diese ist für die jeweilige Funktion unerlässlich. Im Gegensatz zu diesen existieren Proteine, die keine festgelegte Tertiärstruktur besitzen, je nach Funktion unterschiedliche Konformationen annehmen können und in ihrer Gesamtheit zwischen scheinbar unstrukturierten bis zu hochstrukturierten Proteinen variieren. Diese Proteine nennt man intrinsisch ungeordnete Proteine (IDPs). Sie

besitzen keinen bevorzugten stabilen Zustand. Für die Konformitätsänderung wird nur wenig Energie benötigt, weshalb ein Konformitätszustand nur kurz beibehalten wird (103, 104).

α -Synuclein gehört strukturell zur Familie der IDPs und ist eines der häufigsten Proteine im Gehirn. Es wird von Neuronen exprimiert. Obwohl seine Funktion unbekannt ist, wird eine Rolle in der Plastizität der Neuronen angenommen (105). Bei der Parkinson-Erkrankung kommt es zu einer pathologischen Aggregation von α -Synuclein, bei der es morphologisch u. a. zu Aggregationen im Hirnstamm, Kortex und Rückenmark kommt. Sogenannte Lewy-Körperchen enthalten aggregiertes α -Synuclein und führen u. a. in der Substantia nigra zu einem Substanzverlust der dopaminergen Neuronen (106, 107).

Die proteinstabilisierende Wirkung von TMAO konnte in einer in-vitro Studie an α -Synuclein gezeigt werden. Bei Zugabe von 5 mol/L TMAO war α -Synuclein stabiler und es bildeten sich keine Aggregationen. Dieser Effekt entstand durch die Umverteilung von Wassermolekülen um die Proteinoberfläche und weniger durch direkte Einwirkung auf das Protein. Die Autor*Innen kamen zu dem Schluss, dass TMAO die durch die Parkinson-Erkrankung vermittelte Aggregation von α -Synuclein möglicherweise vorbeugen könnte. (108)

Eine kürzlich publizierte Studie mit 85 Patient*Innen, bei denen eine frühe Form der Parkinson-Erkrankung diagnostiziert wurde, zeigte geringere Serum-TMAO-Konzentrationen bei den Parkinson-Erkrankten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Um den Medikationsbedarf der Patient*Innen über einen Zeitraum zu messen, wurde die „Levodopa-äquivalente Dosis“ herangezogen. Diese war bei den Patient*Innen mit geringen TMAO-Konzentrationen höher als bei Patient*Innen mit hohen TMAO-Konzentrationen und zeigte demnach eine Assoziation von geringen TMAO-Konzentrationen mit einem rascher gesteigerten Medikationsbedarf bei Parkinson-Patient*Innen (109).

Kontroverse Daten lieferte eine Studie mit 60 Parkinson-Patient*Innen. Dabei waren die TMAO-Konzentrationen bei den Parkinson-Patient*Innen höher als in der Kontrollgruppe. Darüber hinaus korrelierte eine erhöhte TMAO-Konzentration mit einem schwereren Krankheitsverlauf und mit einer Progression der Bewegungsstörungen (110).

1.5.2 Tau-Protein, Amyloid- β und Morbus Alzheimer

Auch das Tau-Protein ist ein solches IDP und scheint ein in seiner Funktion durch TMAO beeinflussbares Protein darzustellen. Es besitzt eine Schlüsselrolle in der Regulierung des Zusammenbaus von Mikrotubuli, axonalem Transport und neuronalem Wachstum. Im adulten Gehirn umfasst es sechs Isoformen, die durch alternatives mRNA-Spleißen gebildet werden. Dieses ist entwicklungsabhängig reguliert, sodass im fetalen Hirn lediglich die kürzeste Tau-Isoform besteht, die intensiver phosphoryliert ist als dies im adulten Gehirn der Fall ist. Die Phosphorylierung von Tau ist jedoch ein ständig wechselnder, dynamischer Vorgang, der die Aktivität und die Funktionalität des Proteins bestimmt und ermöglicht. Es sind pathophysiologische Vorgänge möglich, die Tau abnorm intensiv phosphorylieren. Dies führt in weiterer Folge zu einer Dysfunktion des Proteins. Diese Dysfunktion kann einerseits zu einer verminderten Fähigkeit der Mikrotubuli-Polymerisation führen, wie bei der frontotemporalen Demenz mit Parkinson-Syndrom bei Mutation des Tau-Proteins auf Chromosom 17 (FTDP-17). Andererseits kann dies zu einer toxischen Akkumulation durch Tau-Tau Interaktionen führen, wie unter anderem bei Morbus Alzheimer (AD). Die Tauopathien stellen die häufigsten Proteinopathien im menschlichen Nervensystem dar (111-113).

In-vitro-Studien, die hyperphosphoryliertes Tau-Protein untersuchten, das unfähig war Mikrotubulin zu polymerisieren, konnten unter Hinzugabe von 200 mmol/L TMAO eine wiederkehrende Funktionalität des Proteins mit der Fähigkeit der Mikrotubulin-Polymerisation beschreiben. Dies geschah nicht durch Dephosphorylierung, sondern durch eine Verringerung der kritischen Konzentration von notwendigem Tubulin. Die unter dem Einfluss von TMAO entstandenen Mikrotubuli erschienen unter dem Fluoreszenzmikroskop normal (113-116).

In einer weiteren Studie über den Einfluss von TMAO auf das Tau-Protein konnten neben dem gesteigerten Mikrotubuli-Zusammenbau auch ein weiterer Effekt beobachtet werden. Es ist bekannt, dass Heparin eine Aggregation von Tau induziert. Die durch (200 mmol/l) TMAO bedingte konformationelle Reorganisation des Proteins führte zu einer drastischen Beschleunigung der Aggregation von Tau bei vorhandenem Heparin und Tubulin. Da AD durch die Aggregation und der

Anwesenheit von neurofibrillären Bündeln charakterisiert ist, stellt dies eine interessante Beobachtung dar (111, 116).

Eine zweite charakteristische Gegebenheit bei AD stellen Aggregationen von Amyloid- β dar. Amyloid- β entsteht beim pathologischen Abbau des Amyloid-Vorläuferproteins (APP). Dies ist ein Transmembranprotein. Das APP wird hauptsächlich von Neuronen gebildet und ist an der Regulierung von Synapsenbildungen und deren Reparatur, dem anterograden neuronalen Transport und der Eisenausscheidung beteiligt. Unter physiologischen Umständen wird das APP bei dessen regulierten, nicht-amyloidogenen Abbau zunächst von einer α -Sekretase (in Neuronen hauptsächlich ADAM10 und ADAM17) gespalten. Das Spaltprodukt sAPP α ist mit einer physiologischen synaptischen Übertragung und Plastizität, einer normalen Lern- und Gedächtnisfähigkeit und normalem emotionalen Verhalten assoziiert. Eine weitere Spaltung erfolgt durch eine γ -Sekretase, wodurch das hydrophobe lösliche Fragment P3 entsteht (siehe Abbildung 5) (117, 118).

Der amyloidogene Abbau ist mit einer Spaltung durch eine β -Sekretase (BACE-1) im ersten Schritt begründet. BACE-1 spaltet APP an einer anderen Stelle, wodurch die γ -Sekretase im folgenden Schritt das unlösliche und potenziell neurotoxische Amyloid- β als Spaltprodukt erzeugt (siehe Abbildung 5) (118).

Das entstandene Monomer Amyloid- β kann aufgrund seiner strukturellen Beschaffenheit oligomerisieren und diffus extrazellulär verweilen. Im weiteren Verlauf neigen diese dazu, weiter zu polymerisieren und formen amyloide Fibrillen, die weiter zu Plaques aggregieren können. Besonders die beiden Polymere A β ₄₀ und A β ₄₂ führen zu einer Aggregation und Plaquebildung. Die Polymerisation zu Fibrillen und Plaques kann einerseits zur Hyperphosphorylation von Tau-Protein beitragen, andererseits über eine Rekrutierung von Mirkogliazellen eine lokale Entzündung auslösen, die zur Neurotoxizität beiträgt. Eine Tau-Aggregation kann in weiterer Folge zu einer Blockade von Ionenkanälen, einer veränderten Kalzium-Homöostase, vermehrtem mitochondrialen oxidativen Stress mit einem verringerten Energiehaushalt und einer gestörten Glukoseregulation führen. Diese Vorgänge können in weiterer Folge zum neuronalen Zelltod beitragen (118).

Das Monomer des Amyloid- β ist ein IDP. In der Literatur wird seine Struktur oft mit „random coils“ beschrieben. Die Konformität wechselt ständig zwischen den möglichen Zustandsformen. Bei pathophysiologischen Prozessen im Zuge von neurologischen Erkrankungen wie AD kommt es strukturell zu β -Faltblattbildungen dieser „random coils“, sodass sich ein früher amyloider Kern bildet, der konsekutiv zu weiteren Amyloidaggregationen führt und später als Plaque morphologisch imponieren kann (103, 119, 120).

Yang *et al.* beobachteten, dass eine TMAO-Konzentration von 50-150 $\mu\text{mol/L}$ die Konformitätsänderung von „random coils“ zu Amyloid- β mit vermehrten β -Faltblattstrukturen rasch beschleunigte. Die Anzahl der β -Faltblattstrukturen nahmen linear mit der Konzentration von TMAO zu, bis sie ein Plateau erreichten (119).

In molekulardynamischen Simulationen konnten Kumari *et al.* bei vorhandenem TMAO ebenfalls eine erhöhte Geschwindigkeit der Amyloid- β Aggregation feststellen. Die Autor*Innen begründen dies mit der modulierenden Eigenschaft von TMAO, durch die Umverteilung von Wasser, Amyloid- β mittels Wasserstoffbrückenbindungen zu stabilisieren. Dies lässt eine erleichterte Protein-Protein Interaktion zu und fördert die Aggregation (104).

In einer weiteren Computersimulation konnte zudem eine sehr starke Assoziation zwischen Biomarkern von AD und TMAO gestellt werden (121).

In einer größeren Studie mit AD-Demenz-Patient*Innen ($n=40$), Personen mit leichter kognitiver Beeinträchtigung (LKB) ($n=35$) und einer kognitiv unbeeinträchtigten Kontrollgruppe ($n=335$) wurde die TMAO-Konzentration im CSF gemessen. Es konnte eine signifikante Erhöhung der TMAO-Konzentrationen im CSF der AD- und LKB-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Die Störfaktoren Alter, Geschlecht und APOE $\epsilon 4$ -Genotyp wurden hierbei beachtet. Auch das Alter war mit einer höheren TMAO-Konzentration assoziiert, nicht jedoch das Geschlecht oder der APOE $\epsilon 4$ -Genotyp. Die Gruppen AD und LKB unterschieden sich in den CSF TMAO-Messungen nicht (10).

Eine Assoziation zwischen CSF-TMAO und CSF-Biomarkern von AD und neuronaler Degeneration konnte festgestellt werden. Es wird eine signifikante positive Relation zwischen CSF-TMAO und p-Tau (phosphoryliertes Tau) und

zwischen CSF-TMAO und p-tau/A β ₄₂ beschrieben. Auch war CSF-TMAO mit CSF-t-Tau (Gesamt-Tau) positiv assoziiert. Die Neurofilament-Leichtketten, ein Biomarker im CSF der auf axonale Degeneration hinweist, ist mit CSF-TMAO ebenfalls positiv assoziiert. Mit Neurogranin, ein Biomarker der synaptischen Degeneration, wurde jedoch keine Korrelation gefunden (10).

In einer kürzlich publizierten Studie wurde eine positive Korrelation zwischen Plasma-TMAO und kognitivem Abbau an Mäusen beschrieben. An Mäusen, die einem AD-Model entsprechen, zeigte sich eine Korrelation der TMA- und TMAO-Konzentrationen mit Amyloid- β -Plaques (A β ₁₋₄₂) im Hippokampus. Auch korrelierten die TMA/TMAO-Konzentrationen mit einem hippokampalen neuronalen Verfall und einer verschlechterten neuronalen Plastizität. Im Zuge dieser Studie wurde den Mäusen prebiotisch *Lactobacillus plantarum* verabreicht. Durch diese Supplementierung wurden die TMA/TMAO-Konzentrationen deutlich verringert. Zusätzlich verringerten sich Amyloid- β -Plaques im Hippokampus. Die Autoren gehen aufgrund der verringerten TMA/TMAO-Konzentrationen bei gleichbleibender Aktivität von FMO3 in der Leber von einer durch *L.plantarum* bedingten Veränderung des Mikrobioms mit verringerter Metabolisierung zu TMA aus (21).

Kontrovers zeigten die Ergebnisse einer Studie, dass weder die Konzentrationen von TMAO noch einer seiner Vorgängerstoffe (Betain, Carnitin, Cholin) signifikant mit dem Risiko von AD in Verbindung stehen und AD nicht kausal mit den Konzentrationen von TMAO sowie seinen Vorgängerstoffen assoziiert ist. Es wurden Serum-Konzentrationen herangezogen. Die Autor*Innen merkten an, dass die beobachteten Assoziationen in vergangenen Studien durch Confounding bedingt sein könnten (122).

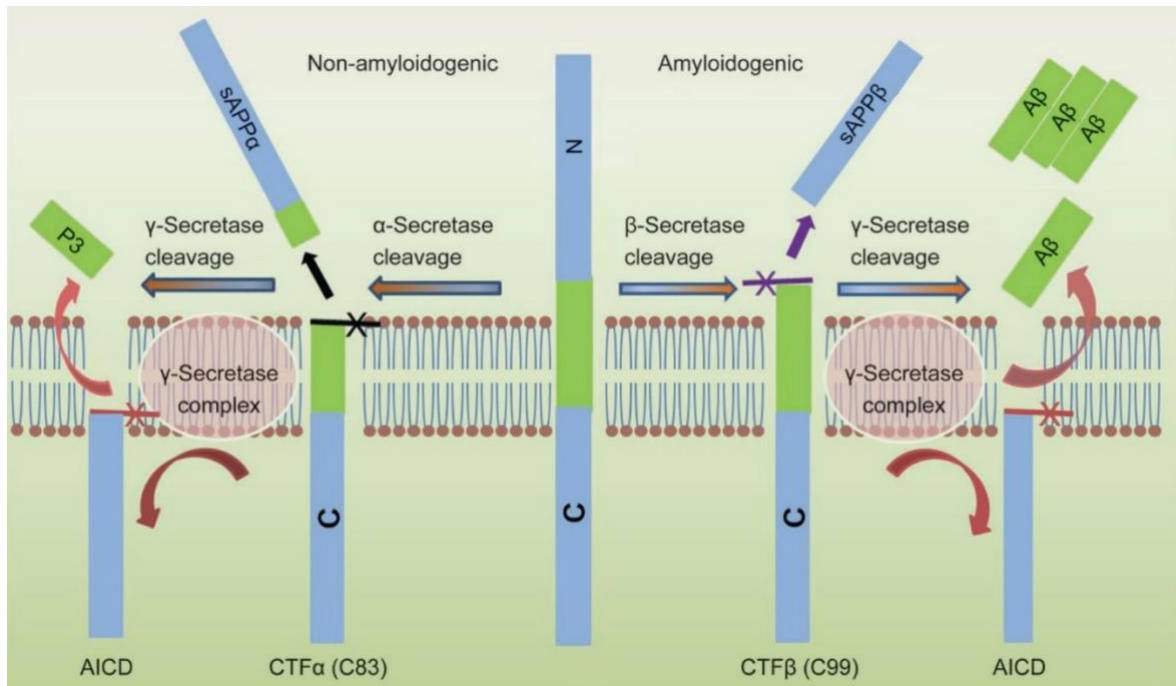


Abbildung 5: Proteolytischer Abbauweg von humanem APP mit nicht-amyloidogener und amyloidogener Variante (117)

1.5.3 Neurovaskuläre Erkrankungen

Die proatherosklerotischen und prothrombogenen Eigenschaften, die zum jetzigen Zeitpunkt von TMAO angenommen werden, zeigen auch Einflüsse auf Gefäße des Gehirns. Es konnte eine positive Assoziation der TMAO-Konzentrationen mit dem Risiko eines Erstereignisses von ischämischen Hirninfarkten beobachtet werden. Bei Patient*Innen mit bereits erfolgtem Hirninfarkt waren erhöhte TMAO-Konzentrationen mit dem Risiko eines Rezidivs assoziiert (38, 123).

Weiters zeigte sich, dass die TMAO-Konzentrationen bei Vorliegen einer zerebralen Mikroangiopathie im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht waren. In derselben Studie konnte gezeigt werden, dass es zu BHS-Störungen in der Gruppe der hoch-erhöhten TMAO-Konzentrationen kam und die Expression von Proteinen der Tight-Junctions verringert war (94).

Außerdem konnte eine Beteiligung von TMAO an der Entstehung einer verstärkten reaktiven Astroglieose festgestellt werden. Dabei zeigte sich eine verstärkte Bildung von glialen Narben nach ischämischen Hirninfarkten mit einer verminderten Wiederherstellung der neurologischen Funktion (124).

Innerhalb eines Maus-Modells wurden zerebralischämische Ereignisse mit anschließenden Reperfusionen durchgeführt, wonach die TMAO- und TMA-Konzentrationen anstiegen. Diese Anstiege korrelierten mit einem kognitiven Verfall (125).

Wu et al. untersuchten TMAO als möglichen prognostischen Marker für ischämische Hirnläsionen nach Stenting der Arteria carotis. Dabei zeigten die Ergebnisse bei erhöhten TMAO-Konzentrationen ein erhöhtes Risiko neue Läsionen nach dem Stenting aufzuweisen (126).

Die Wertigkeit von TMAO als prognostischen Marker bei akut ischämischen Hirninfarkten konnten von Tan et al. in Verbindung mit den konventionellen Biomarkern als signifikant beschrieben werden. TMAO als Biomarker verbesserte die prognostische Genauigkeit. Erhöhte TMAO-Konzentrationen deuteten auf einen schlechteren Outcome hin. Zudem beschrieben sie in der Studie den zeitlichen Konzentrationsverlauf von TMAO beim akuten ischämischen Hirninfarkt. Innerhalb der ersten 24 Stunden ab Therapiebeginn kam es zu keinen signifikanten Änderungen der TMAO-Konzentrationen. Nach dieser Zeit kam es unter der thrombozytenaggregationshemmenden Therapie jedoch zu einem signifikanten Abfall der Konzentrationen (127).

Erhöhte TMAO-Konzentrationen korrelierten bei Patient*Innen nach intrazerebraler Blutung signifikant mit einem schlechteren Outcome (128).

Ergebnisse von Yin et al. lieferten widersprüchliche Daten. Die TMAO-Konzentrationen der Hirninfarkt- und TIA-Patient*Innen in dieser Studie wiesen einen geringeren Wert auf als die Kontrollgruppe (129).

1.5.4 Direkte neuronale Schädigung

Es existieren mehrere Publikationen, die eine Beeinflussung durch TMAO der verschiedenen neuropathophysiologischen Vorgänge beschreiben (130-134).

Als regulative Grenze zwischen Blut und CSF spielen die Plexus chorioidei als Teil der BLS eine zentrale Rolle in der Erhaltung der neuronalen Funktion. Die Konzentration von gelösten Stoffen im CSF wird hierbei im physiologischen Bereich

gehalten. Bei verschiedenen Arten des Zellstresses wie Hyperthermie, Ischämie und Schwermetallbelastung kommt es jedoch zu einem verringerten Abtransport der anfallenden Stoffe in der CSF und dadurch zu potenzieller Neurotoxizität. Eine Gegenregulierung wird durch die erhöhte Expression von HSPs erreicht. Diese haben die Fähigkeit, die native Konformation von Proteinen wiederherzustellen und zu erhalten. Somit kann in Anwesenheit von HSPs ein physiologischer Transport zwischen der BLS bei ansonsten letalen Stressoren erfolgen. Unter bestimmten Umständen kann sogar eine erhöhte Transportrate ermöglicht werden (130).

Villalobos et al. stellten fest, dass nicht-letale Stressoren zu einer Induzierung der Expression von HSP70 führte und so der Transport von organischen Anionen der Plexus chorioidei trotz der Stressoren aufrecht erhalten werden konnte. Bei Anwesenheit von TMAO und einem Stressor fiel die Stressantwort durch HSPs reduziert aus. Es resultierte ein geringerer Transport der organischen Anionen. Gleichzeitig erhöhte sich der passive Leckfluss der BLS (130).

Eine weitere Studie befasste sich mit der Einflussnahme von TMAO auf das Altern des Gehirns. Es wurde eine signifikante Erhöhung der TMAO-Konzentrationen bei älteren Menschen und Mäusen im Vergleich zu den jungen und mittelalten Gruppen beschrieben. Einem Teil der Mäuse wurde 16 Wochen lang TMAO supplementiert, wobei die TMAO-Konzentrationen signifikant anstiegen. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen zeigten sich in den TMAO-Gruppen eine beeinträchtigte kognitive Leistung sowie größere Schäden an der Ultrastruktur der hippocampalen CA1-Region. Die Mitochondrien waren geschwollen oder zerstört. In der CA3-Region des Hippocampus fanden sich bei den TMAO-Gruppen vermehrt SA-beta-GAL-positive Zellen, vorrangig Neuronen. SA-beta-GAL stellt einen der am häufigsten benutzten Marker für Zellalterung dar. Weiters wurden die Zellen der Hippocampi auf Marker von oxidativem Stress untersucht. Hierbei wurde die Konzentration von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und die Aktivität der Superoxiddismutase herangezogen. Die hippocampalen Zellen der TMAO-Gruppen zeigten eine signifikant höhere Konzentration von Wasserstoffperoxid bei gleichzeitig signifikant verringerter Aktivität der Superoxiddismutase. Dies deutet auf einen höheren oxidativen Stress der hippocampalen Zellen der TMAO-Gruppe hin und spricht somit für ein schnelleres Altern der Zellen. Zusätzlich zeigten die TMAO-Gruppen einen größeren Rückgang von Proteinen, die eine essenzielle Rolle für die Plastizität des

Gehirns spielen. Ein möglicher Signalweg, der diese Abnahme an Proteinen erklären könnte, wurde untersucht. Die Phosphorylierung der Proteine des mTOR Signalwegs, der die Synthese dieser Proteine mediiert, waren bei den TMAO-Gruppen signifikant verringert. Aufgrund dieser Ergebnisse schließen die Autor*Innen darauf, dass TMAO die Zellalterung des Gehirns beschleunigt, schädlich auf Synapsen wirkt und die synaptische Plastizität reduziert (131).

Ältere Ratten, an denen eine Laparotomie unterzogen wurde, zeigten postoperativ hippocampal-bedingte kognitive Defizite und erhöhte proinflammatorische Zytokinkonzentrationen im Plasma. Zusätzlich zeigte sich eine mikroglia-medierte Neuroinflammation mit reaktiver Sauerstoffspezies-Produktion im Hippocampus. Die Gruppe von Ratten, deren Organismus vor der Operation mit TMAO angereichert wurden, zeigten eine stärkere mikroglia-medierte Neuroinflammation und Sauerstoffspezies-Produktion im Hippokampus. Dies führte zu einer verschlechterten kognitiven Leistung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit TMAO zu einer Minderung der Aktivität der Methionin-sulfoxid-Reduktase führte. Da dieses Enzym eine wichtige Rolle im antioxidativen Schutzsystem der Zelle darstellt, könnte dies laut den Autor*Innen ein Pathomechanismus im Zuge einer erhöhten Anfälligkeit auf oxidativen Stress darstellen (132).

Eine ähnliche Studie kam zu vergleichbaren Ergebnissen. Hier wurde alternden Ratten das volatile Anästhetikum Sevofluran verabreicht. Eine Woche später wurde die kognitive Leistungsfähigkeit, die Mikrogliaaktivität, die Konzentration von proinflammatorischen Zytokinen und die Sauerstoffspezies-Produktion im Hippocampus gemessen und als vergleichbar angesehen. Bei vorhergegangener dreiwöchiger Gabe von TMAO und erhöhten TMAO-Plasmakonzentrationen mit anschließender Sevoflurangabe kam es in dieser Subgruppe nach einer Woche zu einer signifikanten kognitiven Dysfunktion, einer erhöhten Mikrogliaaktivität, einer erhöhten Konzentration von proinflammatorischen Zytokinen und erhöhter Sauerstoffspezies-Produktion im Hippocampus. Zusätzlich wurde die Expression von der bereits genannten Methionin-sulfoxid-Reduktase im Hippocampus verringert (133).

Ein Pathomechanismus, der zu Zellstress durch modulierte Signalwege am endoplasmatischem Reticulum führt und durch TMAO induziert wird, wurde durch Govindarajulu et al. beschrieben. TMAO führte zu einer verringerten synaptischen Plastizität. Zudem wurde eine veränderte präsynaptische sowie reduzierte postsynaptische Rezeptorexpression beobachtet (134).

2 Studie

2.1 Studienziel/Forschungsfrage

Die Anwesenheit von TMAO im CSF wurde bereits von Del Rio et al. bestätigt (11). In-vivo Studien, die den Übertritt von TMAO vom Blut in die CSF über die BLS untersuchen, fehlten hingegen bis zu diesem Zeitpunkt.

Um das Potenzial von TMAO bezüglich dessen Übergang in die CSF über die BLS beim Menschen zu untersuchen, wurden die TMAO- und Albumin-Konzentrationen im Serum sowie in der CSF von 290 Patient*Innen retrospektiv gemessen (3).

Das Ziel der Studie ist es, mögliche Assoziationen der TMAO-Konzentrationen anhand von individuellen CSF/Serum-Paaren zu untersuchen. Dabei besteht die Hypothese, dass TMAO die BLS durchdringen kann.

Weiters wurden die Quotienten von CSF/Serum Albumin (Q_{ALB}) und CSF/Serum TMAO (Q_{TMAO}) auf mögliche Assoziationen untersucht. Die Hypothese einer passiven Diffusion von TMAO durch die BLS wäre bei einer Korrelation von Q_{ALB} und Q_{TMAO} gestärkt.

Schließlich wurde auf mögliche Assoziationen zwischen Q_{TMAO} und den Subgruppen der Studienpopulation mit und ohne BLS-Dysfunktion, sowie auch in Zusammenhang mit vorhandener oder fehlender intrathekalen Immunglobulinsynthese geachtet.

Die aus diesen Daten resultierenden Informationen sollen einen Einblick über die Permeabilität der BLS für TMAO geben, um so einen Beitrag für die Beurteilung der Wertigkeit von CSF-TMAO als möglichen Biomarker im neurologischen Patientengut zu liefern.

2.2 Material und Methoden

Patientenproben

Die Patientenproben wurden am Institut für Medizinische und Chemische Labordiagnostik am Landeskrankenhaus Hochsteiermark, Standort Leoben, gesammelt. Dabei wurden innerhalb eines Jahres (2019) von 290 Patient*Innen, die einer diagnostischen Lumbalpunktion unterzogen wurden, die Konzentrationen von TMAO und Albumin bestimmt. Patient*Innen unter 18 Jahren wurden von der Studie ausgeschlossen. Es wurden ausschließlich neurologische Patient*Innen inkludiert und einer retrospektiven Erhebung der Krankengeschichte unterzogen. Die erhobenen Daten wurden ausschließlich in pseudonymisierter Form bearbeitet und ausgewertet.

Eine Einverständniserklärung wurde von allen Patient*Innen gegeben. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz bewilligt (24.05.2019; EK-Nummer: 31-391 ex 18/19).

Labormethoden

Die CSF und das venöse Blut wurden den Patient*Innen zum gleichen Zeitpunkt entnommen und in 2 ml VACUETTE® Z (ohne Zusatz) für die CSF und 5 ml VACUETTE® Z (Serum Clot activator tubes) für das Blut gesammelt. Anschließend wurden die Proben bei 4° Celsius gekühlt und innerhalb einer Woche der Analyse zugeführt oder portioniert bei -20°C eingefroren.

Die Serum- und CSF-Konzentrationen von TMAO wurden mittels einer Isotopenverdünnungsanalyse und einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Elektrospray-Ionisation-Tandem-Massenspektrometrie (SCIEX QTRAP 4500 triple quadrupole instrument, Agilent 1260 Infinity HPLC system) gemessen. Die Variationskoeffizienten für Intra-Tages- sowie Inter-Tagesmessungen lagen bei 2,2-5,5% und 7,6-9,9%.

Die Serum- und CSF-Konzentrationen von Albumin wurden mittels Nephelometrie (mit einem Atellica NEPH 630 System) bestimmt. Die Variationskoeffizienten für Intra-Tages- sowie Inter-Tagesmessungen lagen bei 2,7-3,1% und 1,7-3,5%.

Statistische Analyse

Die statistischen Analysen wurden mit dem Programm SPSS Statistics (IBM, Build 1.0.0.1447) berechnet.

Um die Verteilung der Daten zu berechnen wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test angewandt.

Um mögliche Korrelationen zwischen zwei stetigen Variablen zu erkennen, wurde der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient ρ herangezogen.

Es wurden lineare Einfachregressionen berechnet, um Zusammenhänge zwischen zwei stetigen Variablen zu bewerten. Die Signifikanz dieser Regressionsmodelle wurden mittels ANOVA getestet. Mittels dem Determinatinskoeffizienten R^2 wird die Anpassungsgüte der Regressionen beschrieben. Der β -Koeffizient ist ein standardisierter Regressionskoeffizient und beschreibt die Steilheit der Regressionsgeraden im Regressionsmodell.

Da die Daten sämtlicher stetiger Variablen nicht-normalverteilt sind, wurde als nicht-parametrischer Test der Mann-Whitney-U-Test für Vergleiche zwischen den Subgruppen herangezogen.

Für die statistische Signifikanz wurde ein p-Wert von kleiner als 0,05 herangezogen.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Deskriptive Statistik der Studienpopulation

In der Studie wurden 290 Patient*Innen aufgenommen. Davon waren 145 Personen männlich (50%) und 145 Personen weiblich (50%). Der Mittelwert des Alters der Studienpopulation beträgt insgesamt 53 ± 20 Jahre. Im Durchschnitt beträgt das Alter der Männer 54 ± 18 Jahre und der Frauen 51 ± 21 Jahre. Die Altersspanne der Männer liegt zwischen 18 und 96 Jahre, die der Frauen zwischen 19 und 91 Jahre.

Tabelle 2 : Studienpopulation mit Laborwerten
(Eigene Darstellung nach (3))

	Studienpopulation	Referenzwerte
Patienten (n)	290	
Alter (Jahre)	53 ± 20	
Geschlecht (% männlich)	50	
Laborwerte		
Serum TMAO (µmol/L)	2,12 (1,34-3,43)	0,98 – 15,5
CSF TMAO (µmol/L)	0,91 (0,54-1,40)	-
Q-TMAO	41,35 (25,54-61,64)	-
Serum Albumin (g/dL)	4,07 (3,69-4,38)	3,5 – 5,2
CSF Albumin (g/L)	0,27 (0,20-0,38)	≤ 0,35
Q-Albumin	6,82 (4,96-9,82) x 10 ⁻³	< 15 Jahre: ≤ 5 x 10 ⁻³ < 40 Jahre: ≤ 6,5 x 10 ⁻³ < 60 Jahre: ≤ 8 x 10 ⁻³ < (4+Alter/15) x 10 ⁻³

Werte beschreiben den Mittelwert ± Standardabweichung, den Median (Q1-Q3) oder sind als Prozentangaben zu verstehen. Für CSF-TMAO und Q-TMAO bestehen bislang keine Referenzwerte. Referenzwert für Q-Albumin ist abhängig vom Alter

Die Serumkonzentrationen von TMAO der 290 Patient*Innen ergaben einen Median (sowie die 1. und 3. Quartile) von 2,12 (1,34-3,43) µmol/L sowie ein CSF-TMAO von 0,91 (0,54-1,40) µmol/L. Der aus den Variablen „Serum-TMAO“ und „CSF-TMAO“ errechnete Quotient Q-TMAO ergibt 41,35 (25,54-61,64).

Der Median (sowie die 1. und 3. Quartile) der Serum-Albumin-Konzentration ist 4,07 (3,69-4,38) g/dL. Für die medianen CSF-Albumin-Konzentrationen wurde ein Wert von 0,27 (0,20-0,38) g/L errechnet. Der aus diesen beiden Variablen errechnete Quotient Q-Albumin hat einen Median von 6,82 (4,96-9,82) x 10⁻³.

2.3.1.1 Inkludierte neurologische Erkrankungen

Alle in der Studie aufgenommenen Patient*Innen wurden aufgrund diagnostischer Fragestellungen einer Liquorpunktion unterzogen. In weiterer Folge wurden

verschiedene neurologische Erkrankungen diagnostiziert, die in folgende Kategorien eingeteilt wurden.

*Tabelle 3: Diagnosen der Studienpopulation
(Eigene Darstellung nach (3))*

Patient*Innen (n)	290
Neurologische Diagnosen	
Inflammatorisch (%)	24
Vaskulär (%)	19
Degenerativ (%)	18
Infektiös (%)	8
Idiopathisch (%)	7
Metabolisch (%)	3
Neoplastisch (%)	3
Keine neurologische Diagnose (%)	18

*Werte sind als Prozentangaben zu verstehen und beschreiben die Anteile verschiedener diagnostischer Kategorien in Hinblick auf die Gesamtheit der Studienteilnehmer*Innen*

24% der endgültigen Diagnosen fallen in die Kategorie „inflammatorisch“. Der Kategorie „vaskulär“ werden 19% der Diagnosen der Studienpopulation zugeschrieben. Weitere 18% fallen in die Kategorie „degenerativ“. Die Kategorie „infektiös“ enthält 8%, „idiopathisch“ 7%, „metabolisch“ 3% und „neoplastisch“ 3% der endgültigen Diagnosen der Studienpopulation. Bei 18% wurden keine neurologischen Diagnosen gefunden. Abbildung 6 gibt einen grafischen Überblick über die Häufigkeiten der verschiedenen diagnostischen Kategorien.

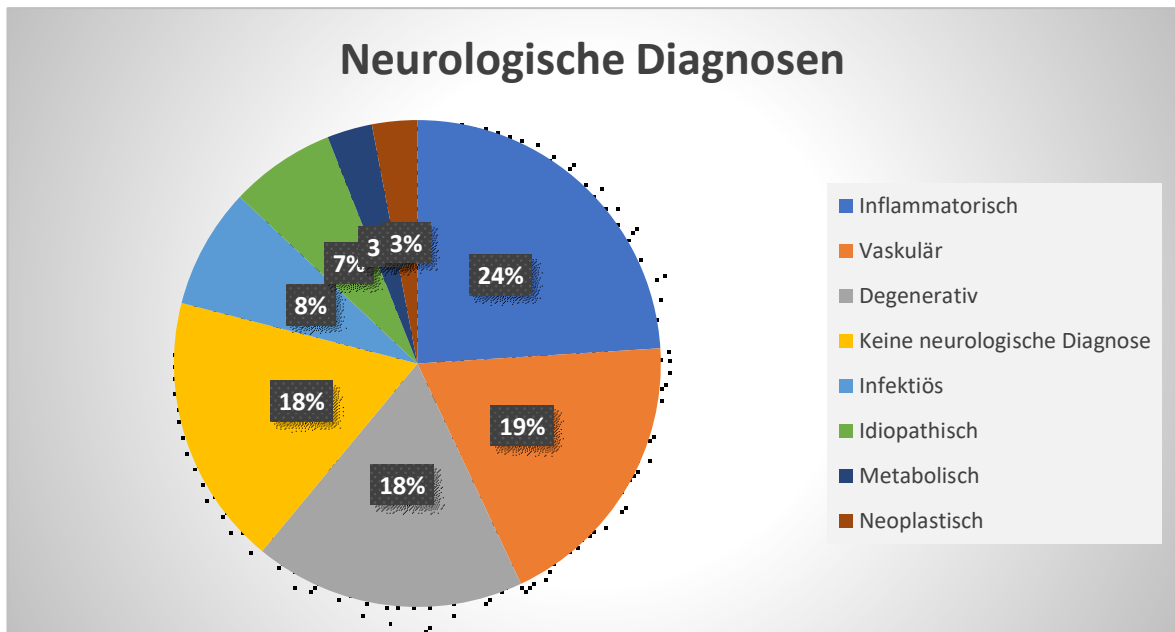


Abbildung 6: Diagramm bezüglich Häufigkeiten der verschiedenen Kategorien neurologischer Diagnosen in der Studienpopulation (Eigene Darstellung nach (3))

2.3.1.2 Blutliquorschranken

Mit Hilfe des Reiber-Schemas (siehe Abbildung 4) kann mit der Formel $(4 + \text{Alter}/15) \times 10^{-3}$ bei bekanntem Alter des Individuums der Grenzwert für Q-Albumin bestimmt werden, bei dessen Überschreiten eine BLS-Dysfunktion diagnostiziert wird.

Von den 290 Studienteilnehmer*Innen hatten demnach 117 Patient*Innen eine BLS-Dysfunktion und 173 Patient*Innen einen Q-Albumin-Wert im Referenzbereich und somit keine BLS-Dysfunktion (siehe Tabelle 4).

Bei der Gegenüberstellung von den Populationen mit physiologischer BLS-Funktion und BLS-Dysfunktion zeigten sich für Q-Albumin ($p = <0,001$), jedoch auch für Q-TMAO ($p = 0,002$) signifikante Unterschiede.

Die Patient*Innen mit einer BLS-Dysfunktion hatten signifikant höhere Q-TMAO-Werte (46,85 (27,99-75,22)) als Patient*Innen mit physiologischer BLS (37,76 (24,52-56,76)) (siehe Abbildung 7).

Tabelle 4: Unterschiede von Q-Albumin und Q-TMAO in Abhängigkeit der Blutliquorschrankenfunktion

	Gesamt	BLS Normal	BLS Dysfunktion	p
n	290	173	117	
QAlb	8,94 ± 8,17	5,22 ± 1,50	14,44 ± 10,57	<0,001
MW ± STD				
Median (Q1-Q3)	6,82 (4,96-9,82)	5,25 (3,94-6,42)	10,84 (9,08-14,52)	
QTMAO	49,25 ± 34,71	44,06 ± 30,02	56,92 ± 39,57	0,002
MW ± STD				
Median (Q1-Q3)	41,35 (25,54-61,64)	37,76 (24,52-56,76)	46,85 (27,99-75,22)	

Mittelwert ± Standardabweichung und Median (1. Quartil-3. Quartil) von Q-Albumin und Q-TMAO bei der Gesamt-Studienpopulation sowie bei der Population mit und ohne BLS-Dysfunktion mit dazugehörigem p-Wert der Differenzierung von BLS-Normal und BLS-Dysfunktion. p: p-Wert (Signifikanzwert)

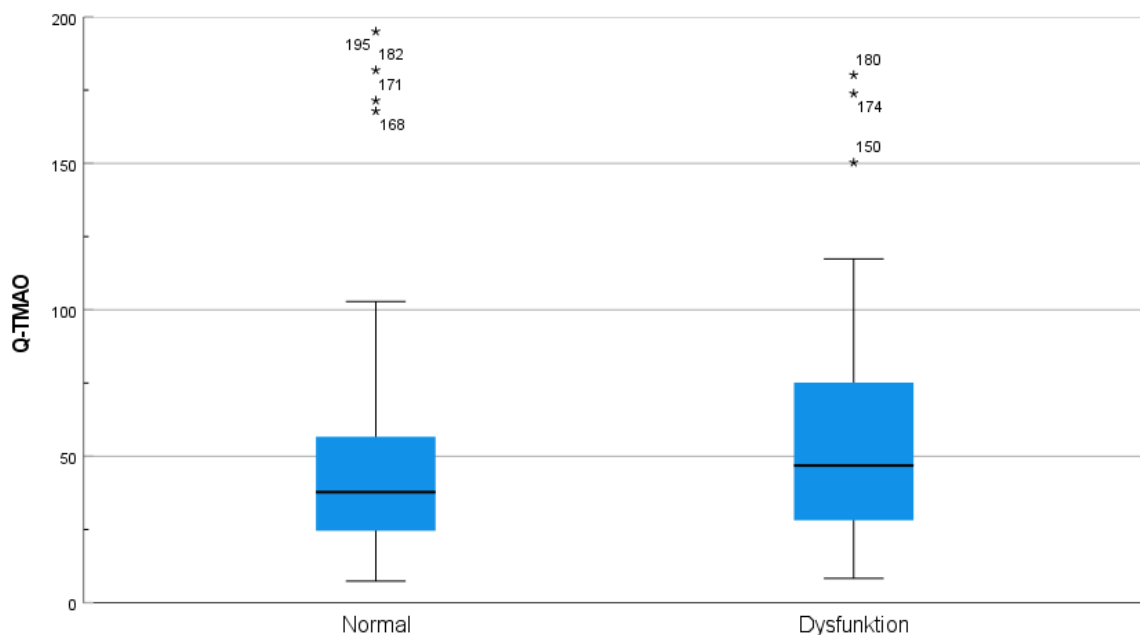


Abbildung 7: Boxplot-Diagramm von Q-TMAO in Abhängigkeit der Blutliquorschranke

Vergleich von 173 und 117 Patient*Innen ohne und mit Blutliquorschranken-Dysfunktion (p=0,002). Die blauen Boxen repräsentieren alle Werte zwischen der 1. Quartile und der 3. Quartile, die Linien in den Boxen repräsentieren den Median und die T-Balken repräsentieren den Minimal- und Maximalwert außerhalb der Ausreißer (*)

2.3.1.3 Subgruppen

Mit Hilfe des Reiber-Schemas (siehe Abbildung 4) kann eine intrathekale Immunglobulinsynthese nachgewiesen werden.

Innerhalb der Studienpopulation wurden 53 Patient*Innen mit einer solchen intrathekalen Immunglobulinsynthese ausgemacht, davon 30 Frauen und 23 Männer. Bei 237 Patient*Innen wurde diese nicht nachgewiesen.

Das durchschnittliche Alter dieser Patient*Innen war mit 45 ± 16 Jahren im Vergleich zur gesamten Studienpopulation (53 ± 20 Jahre) geringer ($p = 0,002$).

Tabelle 5: Charakteristika der Subgruppen der Studienpopulation nach Abhängigkeit mit der Blutliquorschranke und der intrathekalen Immunglobulinsynthese

	BLSneg&AISneg	BLSnegAISpos	BLSposAISneg	BLSposAISpos
Patient*Innen (<i>n</i>)	136	37	101	16
Alter (<i>Jahre</i>)	51 ± 19	43 ± 18	59 ± 20	49 ± 12
Geschlecht(% <i>männlich</i>)	44,9	32,4	60,4	68,8
Laborwerte				
Serum TMAO ($\mu\text{mol/L}$)	2,05 (1,34- 3,14)	1,93 (1,16- 3,26)	2,96 (1,55- 4,12)	1,12 (0,21- 2,37)
CSF TMAO ($\mu\text{mol/L}$)	0,85 (0,52- 1,17)	0,78 (0,38- 1,04)	1,15 (0,82- 2,17)	0,60 (0,26- 1,24)
Serum Albumin (<i>g/dL</i>)	4,14 (3,79- 4,47)	4,16 (3,92- 4,54)	3,88 (3,52- 4,23)	3,83 (3,66- 4,34)
CSF Albumin (<i>g/L</i>)	0,22 (0,17- 0,26)	0,21 (0,16- 0,24)	0,40 (0,33- 0,55)	0,57 (0,36- 1,00)

Werte beschreiben den Mittelwert \pm Standardabweichung, den Median (Q1-Q3) oder sind als Prozentangaben zu verstehen. BLSneg/pos: Blutliquorschranke normal/Dysfunktion, AISneg/pos: intrathekale Immunglobulinsynthese negativ/positiv

Die Studienpopulation ließ sich ebenfalls durch die Variablen „Blutliquorschranke normal/Dysfunktion“ (*BLSneg/pos*) und „intrathekale Immunglobulinsynthese negativ/positiv“ (*AISneg/pos*) in vier Gruppen einteilen. Die Daten dieser vier Subgruppen sind in Tabelle 5 und Tabelle 6 ersichtlich.

Tabelle 6: Subgruppen der Studienpopulation nach Abhängigkeit der Blutliquorschranke und der intrathekalen Immunglobulinsynthese mit Daten von Q-Albumin und Q-TMAO

	Gesamt	BLSneg	BLSneg &AISneg	BLSneg &AISpos	p	BLSpos	BLSpos &AISneg	BLSpos &AISpos	p
n	290	173	136	37		117	101	16	
Q-Albumin									
MW ± STD	8,94 ± 8,17	5,22 ± 1,50	5,29 ± 1,55	4,95 ± 1,27	0,184	14,44 ± 10,57	13,83 ± 10,07	18,28 ± 13,00	0,240
Median (25 th -75 th)	6,82 (4,96- 9,82)	5,25 (3,94- 6,42)	5,36 (3,94-6,66)	5,00 (3,83-5,93)		10,84 (9,08- 14,52)	10,77 (9,21- 13,62)	13,97 (8,44- 25,82)	
Q-TMAO									
MW ± STD	49,25 ±34,71	44,06 ±30,02	44,13 ±28,08	43,79 ±36,72	0,332	56,92 ±39,57	52,15 ±33,79	87,09 ±58,10	0,017*
Median (25 th -75 th)	41,35 (25,54 61,64)	37,76 (24,52- 56,76)	39,59 (25,34- 58,39)	32,58 (21,12- 54,79)		46,85 (27,99- 75,22)	43,83 (27,41- 64,75)	75,63 (41,24- 110,68)	

BLSneg/pos: Blutliquorschranke normal/Dysfunktion, AISneg/pos: intrathekale Immunglobulinsynthese negativ/positiv, p: p-Wert (Signifikanzwert)

In der Studienpopulation zeichneten sich 136 Patient*Innen durch eine physiologische BLS und die Abwesenheit einer intrathekalen Immunglobulinsynthese (BLSnegAISneg) aus. Im Vergleich zu den 37 Patient*Innen mit physiologischer BLS und positiver intrathekalen Immunglobulinsynthese (BLSneg&AISpos) war kein signifikanter Unterschied für Q-Albumin ($p=0,184$) und Q-TMAO ($p=0,332$) festzustellen (siehe Tabelle 6).

Abbildung 8 zeigt für beide Subgruppen ein Boxplot-Diagramm in Bezug auf Q-TMAO.

Für die 101 Patient*Innen mit BLS-Dysfunktion und negativer intrathekaler Immunglobulinsynthese (*BLSpos&AISneg*) fanden sich im Vergleich zu den 16 Patient*Innen mit einer BLS-Dysfunktion und einer intrathekalen Immunglobulinsynthese (*BLSpos&AISpos*) ein signifikanter Unterschied ($p=0,017$) für Q-TMAO (siehe Tabelle 6).

Abbildung 9 zeigt ein Boxplot-Diagramm dieser beiden Subgruppen in Bezug auf Q-TMAO.

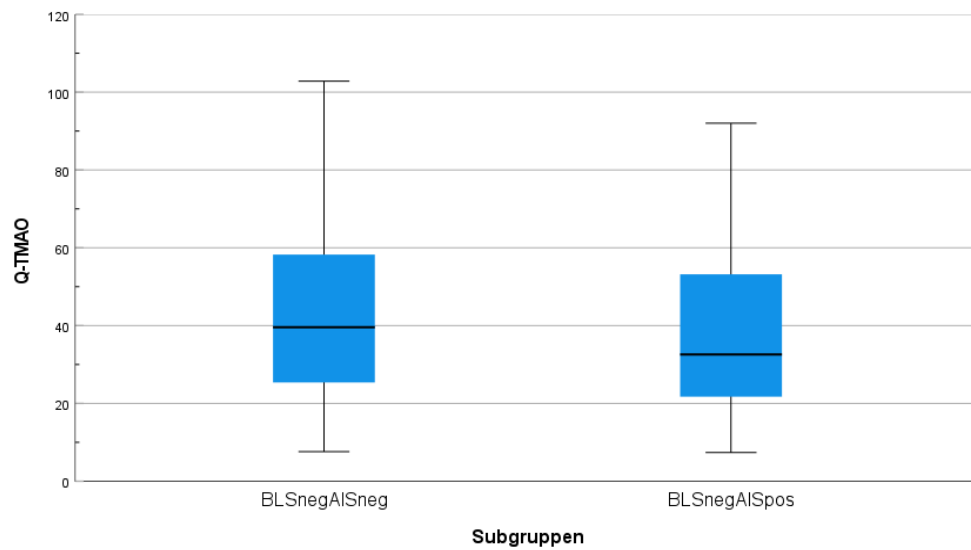


Abbildung 8: Boxplot-Diagramme von Q-TMAO in Abhängigkeit von den Subgruppen „BLSnegAISneg“ und „BLSnegAISpos“

BLSnegAISneg: physiologische BLS-Funktion und keine intrathekale Immunglobulinsynthese, BLSnegAISpos: physiologische BLS-Funktion und intrathekale Immunglobulinsynthese (p=0,332)

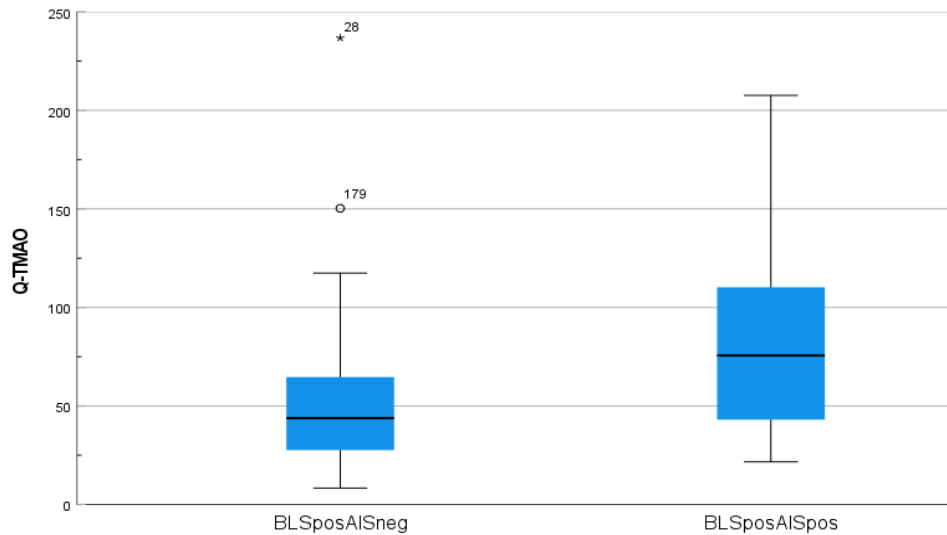


Abbildung 9: Boxplot-Diagramme von Q-TMAO in Abhängigkeit von den Subgruppen „BLSposAISneg“ und „BLSposAISpos“

BLSposAISneg: BLS-Dysfunktion und keine intrathekale Immunglobulinsynthese, BLSposAISpos: BLS-Dysfunktion und intrathekale Immunglobulinsynthese (p=0,017)

2.3.2 Verteilung der Daten

Um die Verteilung der Daten zu analysieren wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test angewandt. Dabei zeigte sich, dass alle stetigen Variablen (Serum-Albumin ($p=0,018$), CSF-Albumin ($p<0,001$), Q-Albumin ($p<0,001$), Serum-TMAO ($p<0,001$), CSF-TMAO ($p<0,001$) und Q-TMAO ($p<0,001$)) nicht-normalverteilt sind. Eine graphische Darstellung der Häufigkeitsverteilung von Q-Albumin und Q-TMAO ist in Abbildung 10 und Abbildung 11 abgebildet.

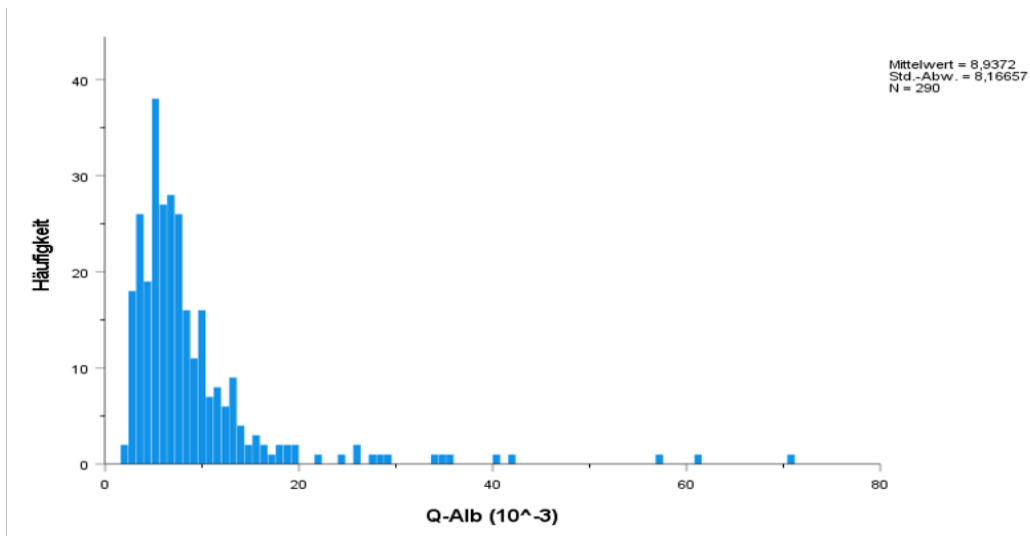


Abbildung 10: Häufigkeitsverteilung von Q-Alb

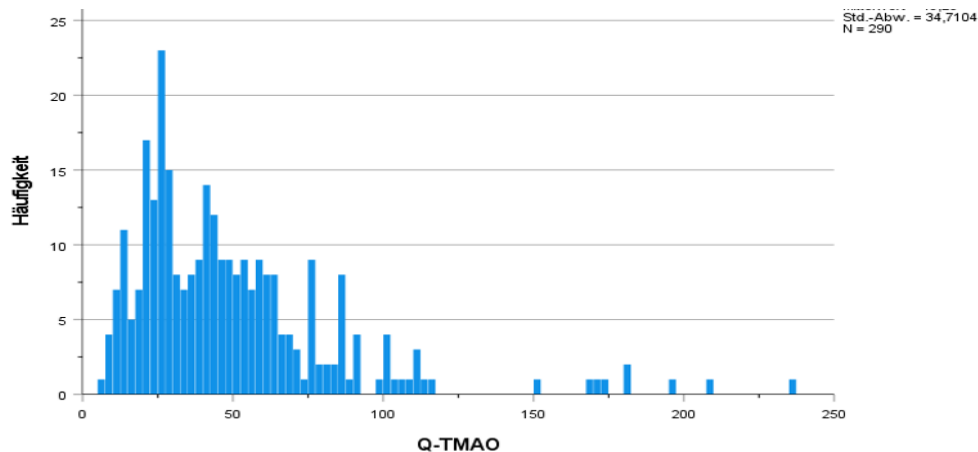


Abbildung 11: Häufigkeitsverteilung von Q-TMAO

2.3.3 Korrelationen

2.3.3.1 Serum/CSF-Albuminkonzentrationen

Um eine mögliche Korrelation zwischen den Serum-Albuminkonzentrationen und den CSF-Albuminkonzentrationen zu erkennen, wurde aufgrund der nicht-normalverteilten Daten der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient verwendet. Dieser hat einen Wert von $\rho = -0,078$ und ist damit nicht signifikant ($p=0,184$).

Ein Punkt-Streudiagramm einer linearen Einfachregression zwischen Serum-Albumin und CSF-Albumin ist in Abbildung 12 ersichtlich (β -Koeffizient= $-0,086$; $p=0,145$).

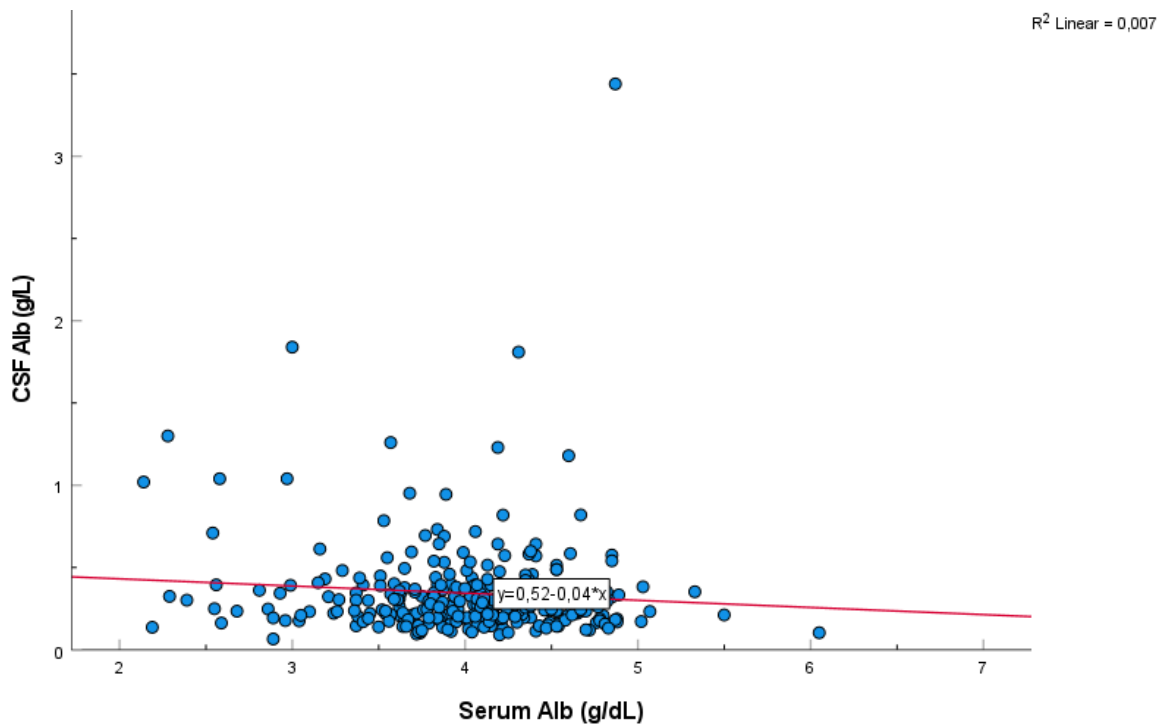


Abbildung 12: Punkt-Streudiagramm einer linearen Einfachregression zwischen Serum-Albumin und CSF-Albumin
 β -Koeffizient= $-0,086$; $p=0,145$

2.3.3.2 Serum/CSF-TMAO Konzentrationen

Um eine mögliche Korrelation zwischen den Serum-TMAO-Konzentrationen und den CSF-TMAO-Konzentrationen zu erkennen, wurde der Spearman'sche

Rangkorrelationskoeffizient aus diesen beiden Variablen errechnet. Dieser beträgt $\rho = 0,702$ und ist signifikant ($p < 0,001$). Die CSF-TMAO-Konzentrationen sind somit positiv mit den Serum-TMAO-Konzentrationen korreliert.

Ein Punkt-Streudiagramm einer linearen Einfachregression zwischen Serum-TMAO und CSF-TMAO ist in Abbildung 13 ersichtlich (β -Koeffizient=0,67; $p < 0,001$; $R^2=0,449$). Die Serum-TMAO-Konzentrationen zeigen eine signifikante Abhängigkeit zu den CSF-TMAO-Konzentrationen.

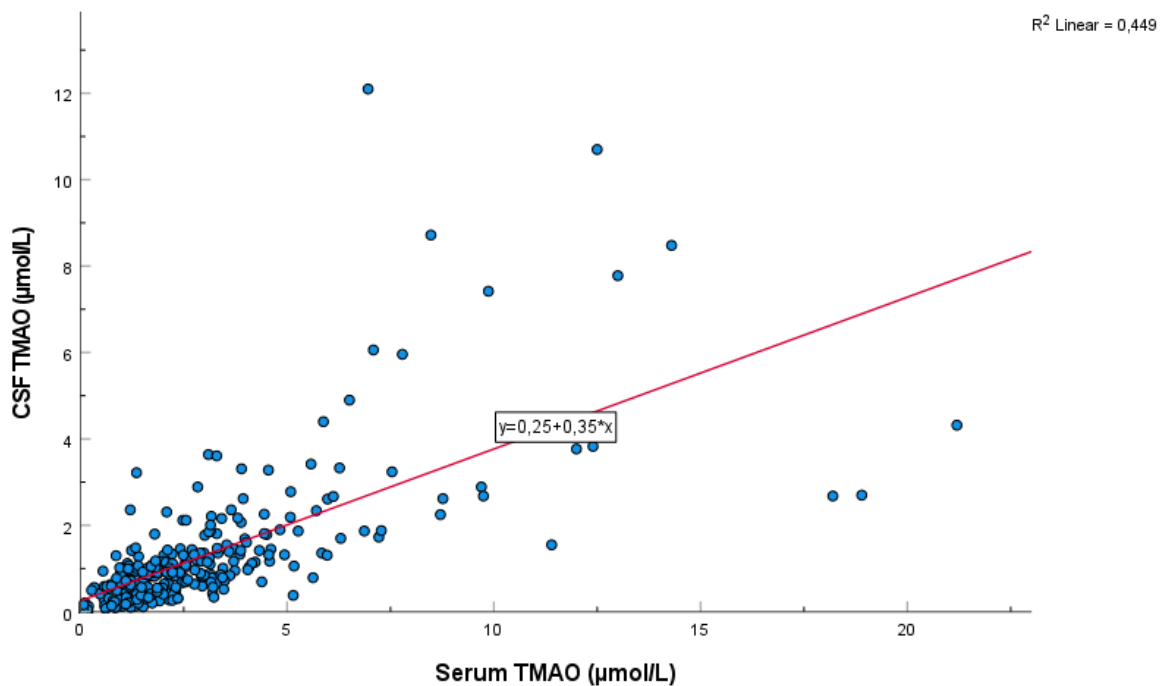


Abbildung 13: Punkt-Streudiagramm einer linearen Einfachregression zwischen Serum-TMAO und CSF-TMAO
 β -Koeffizient=0,67; $p < 0,001$; $R^2=0,449$

2.3.3.3 Albumin-Quotient und TMAO-Quotient

Um eine mögliche Korrelation zwischen Q-Albumin und Q-TMAO zu erkennen, wurde der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient aus diesen beiden Variablen errechnet. Dieser beträgt $\rho=0,191$ und ist signifikant ($p=0,001$).

Ein Punkt-Streudiagramm einer linearen Einfachregression zwischen Q-Albumin und Q-TMAO ist in Abbildung 14 ersichtlich (β -Koeffizient=0,286; $p < 0,001$; $R^2=0,082$). Q-Albumin zeigt somit eine signifikante Abhängigkeit zu Q-TMAO.

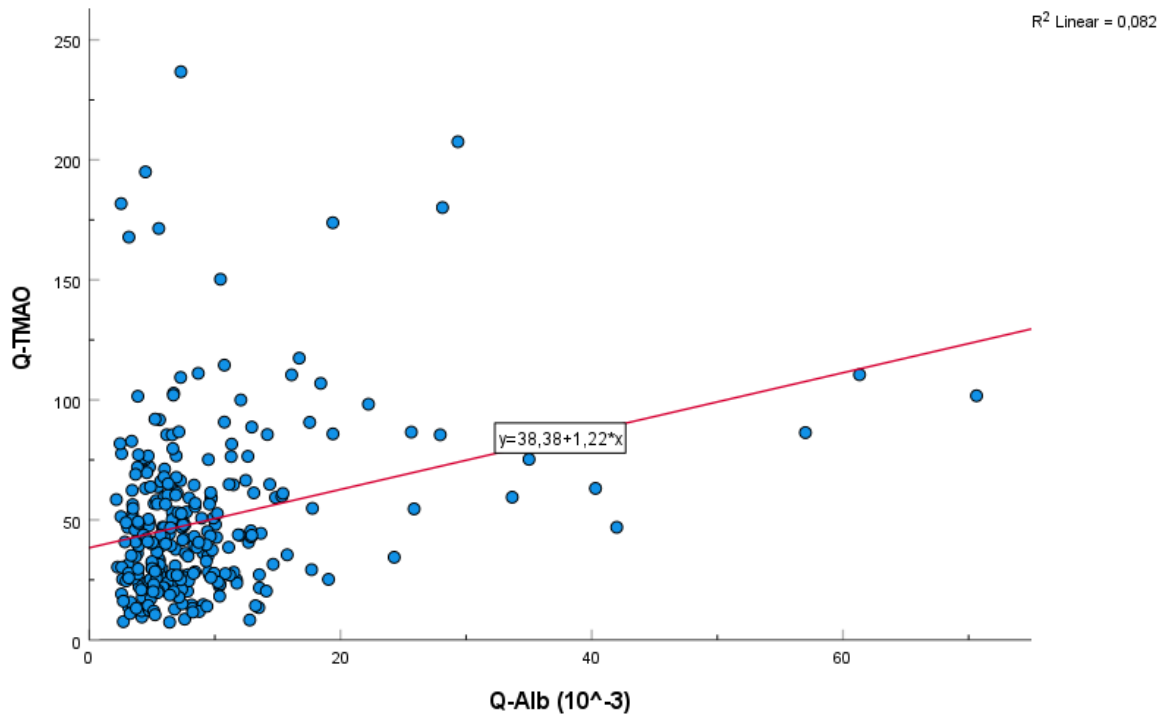


Abbildung 14: Punkt-Streudiagramm einer linearen Einfachregression zwischen Q-Albumin und Q-TMAO

β -Koeffizient=0,286; $p < 0,001$; $R^2 = 0,082$

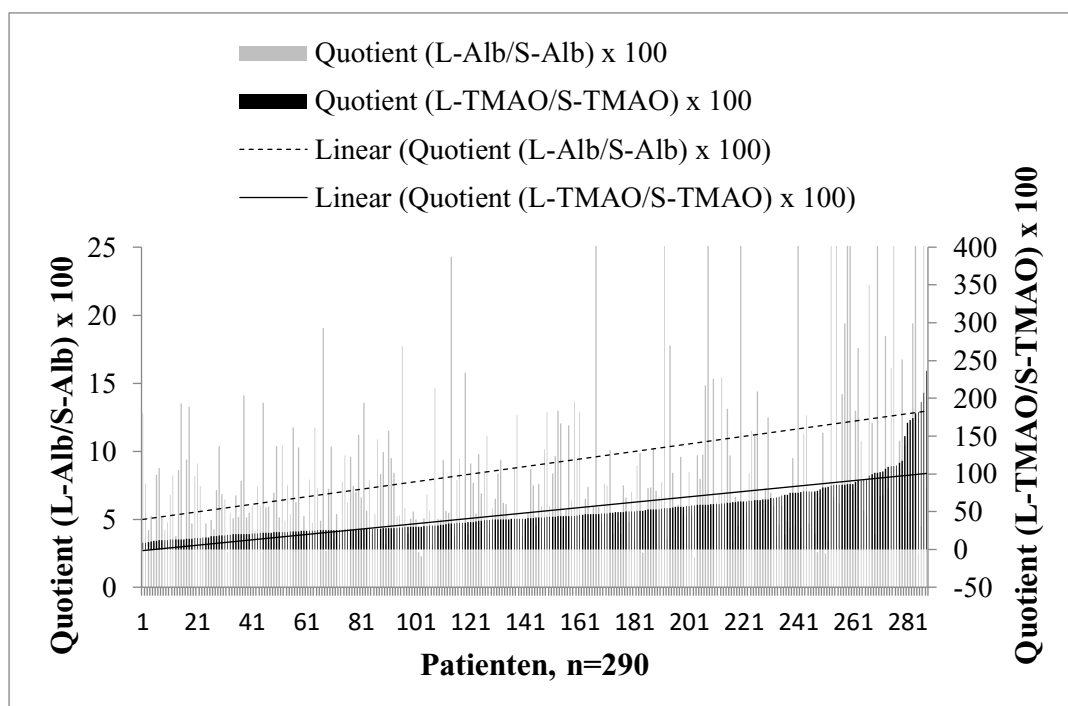


Abbildung 15: Q-TMAO-Werte in aufsteigender Reihenfolge mit der Regressionsgerade und dazugehörigen Q-Albumin-Werten mit der Regressionsgerade aller 290 Studienteilnehmer*Innen

Abbildung 15 zeigt eine graphische Darstellung der Q-TMAO- und Q-Albumin-Werte der Studienpopulation, wobei die Studienteilnehmer*Innen mit aufsteigender Reihenfolge des Q-TMAO sortiert wurden. Die Regressionsgeraden von Q-Albumin und Q-TMAO sind ebenfalls dargestellt.

2.3.4 Fazit

Die TMAO Serum- und CSF-Konzentrationen der 290 Studienteilnehmer*Innen korrelierten signifikant. Auch Q-Albumin und Q-TMAO waren signifikant korreliert. Ebenso hatten Patient*Innen mit BLS-Dysfunktion ein signifikant höheres Q-TMAO als Patient*Innen mit normaler BLS-Funktion.

3 Diskussion

3.1 Ergebnisse der Studie

Zusammenfassend konnte mit dieser Studie das erste Mal in vivo gezeigt werden, dass die TMAO Serum- und CSF-Konzentrationen der 290 Studienteilnehmer*Innen signifikant korrelieren ($\rho = 0,702$, $p = < 0,001$). Dies spricht für die Hypothese eines Übertritts von TMAO über die BLS.

Auch Q-Albumin und Q-TMAO waren signifikant korreliert (β -Koeffizient = 0,286, $p = < 0,001$). Dieses Ergebnis spricht aufgrund der passiven Diffusion von Albumin durch die BLS für eine ebenso passive Diffusion von TMAO. So scheint es, dass ein erhöhter Serumspiegel auf einen ebenso erhöhten CSF-Spiegel von TMAO hinweisen kann. Ein zusätzlich aktiver Transport über die BLS ist jedoch möglich und kann nicht ausgeschlossen werden. Da FMO1-5 auch im menschlichen Gehirn vorkommt, kann auch eine zusätzliche de novo TMAO-Synthese im Gehirn nicht ausgeschlossen werden (3). Die gemessenen TMAO-Konzentrationen im Liquor können dadurch beeinflusst sein.

Weiter konnte gezeigt werden, dass innerhalb der Studienpopulation Q-TMAO bei 117 Patient*Innen mit BLS-Störung (Median, Q1-Q3, 46,85, 27,99-75,22)) signifikant höher ist als bei 173 Patient*Innen ohne BLS-Störung (Median, Q1-Q3, 37,76, 24,52-56,76), ($p = 0,002$). Eine BLS-Dysfunktion scheint somit mit einer erhöhten Permeabilität für TMAO einherzugehen. Somit wird die passive Diffusion durch die BLS von TMAO durch die Qualität der BLS bestimmt. Eine BLS-Dysfunktion ist bei vielen neurologischen Erkrankungen zu erwarten (3). Daher ist eine erhöhte TMAO-Konzentration in der CSF im neurologischen Patientengut im Vergleich zur Normalbevölkerung möglich. Die Daten der Studie von Vogt et al. (10) liegen im Einklang mit dieser Vermutung. Die neurologisch erkrankte Population (AD, LKB) hat im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant höhere CSF-TMAO-Konzentration.

Die Subgruppen bezüglich einer positiven und negativen intrathekalen Immunglobulinsynthese in Zusammenschau mit der BLS-Funktion unterschieden

sich in Hinblick auf Q-TMAO und Q-Albumin nicht signifikant. Eine Ausnahme stellen die signifikant unterschiedlichen Q-TMAO-Werte bei BLSposAISneg und BLSposAISpos dar, die jedoch eine geringe Fallzahl aufweisen.

Eine Limitation dieser retrospektiven Studie besteht darin, dass keine Aussagen über die CSF-Konzentrationen von TMAO und der jeweiligen neurologischen Diagnose bzw. Krankheit möglich sind. Zukünftige prospektive Studien werden benötigt, um bei dieser Fragestellung Antworten zu finden.

3.2 Auswirkungen von TMAO auf das Gehirn

Obwohl erst seit wenigen Jahren bezüglich der Auswirkungen von TMAO auf das Gehirn geforscht wird, finden sich in der Literatur zunehmend wegweisende Publikationen.

Auf die Frage, ob TMAO dem Gehirn schadet oder eine unterstützende Funktion in der Erhaltung der Physiologie vorliegt, kann nicht geantwortet werden. Dies bedarf einer spezifischeren Herangehensweise an die verschiedenen pathophysiologischen Vorgänge und Erkrankungen. Jedoch sei zu erwähnen, dass auch innerhalb derselben krankheitsspezifischen Fragestellung oftmals eine Diskrepanz der einzelnen Studien besteht.

Die Alzheimer-Erkrankung stellt eine neurologische Krankheit dar, die bereits von einigen Studien in Bezug auf TMAO beschrieben wurde. Grundlagenstudien zeigen eine erhöhte Aggregationsbereitschaft von Amyloid- β bei vorhandenem TMAO sowie Assoziationen zwischen Biomarkern von AD und TMAO (10, 104, 119, 121).

Hyperphosphoryliertes Tau-Protein wird unter Laborbedingungen bei vorhandenem TMAO wieder zur Mikrotubulinpolymerisation fähig. Andererseits führte es ebenfalls zu einer Aggregation von Tau bei vorhandenem Heparin (113, 116). Diese Beobachtungen wurden jedoch mit einer Stoffmengenkonzentration über den zu erwartenden Konzentrationen im CSF gemacht und entsprechen nicht den Bedingungen *in vivo*.

In klinischen Studien konnten negative Effekte durch TMAO auf neurologische Erkrankungen gefunden werden. Erhöhte CSF-Konzentrationen sowie

Assoziationen zwischen CSF-TMAO und CSF-Biomarkern von AD und neuronaler Degeneration wurden festgestellt. Auch zeigten die TMAO-Konzentrationen eine positive Korrelation mit Amyloid- β -Plaques im Hippokampus (10, 21). Dem gegenüber steht jedoch eine aktuelle Studie, die keine kausale Assoziation von TMAO und AD beobachtet (122). In dieser Studie wurden jedoch nur die TMAO-Serum-Konzentrationen herangezogen und keine CSF-Konzentrationen. Die Ergebnisse dieser Studie stehen den vorangegangenen Studien entgegen.

Großteils einig ist sich die Forschung dagegen in Hinblick auf den negativen Einfluss von TMAO auf vaskulärer Ebene. TMAO wirkt proatherosklerotisch und prothrombogen und führt so zu einem erhöhten vaskulären Erkrankungsrisiko.

Gleiches gilt für neurovaskuläre Erkrankungen. Einerseits bestehen Assoziationen von TMAO-Konzentrationen und dem Risiko von Erstereignissen und Rezidiven von ischämischen Infarkten (38, 126). Darüber hinaus konnten in Studien ansteigende Serum-TMAO-Konzentrationen mit ischämischen Infarkten korreliert werden (125, 126). Zudem zeigte sich, dass die TMAO-Konzentrationen eine Wertigkeit als prognostischer Marker bei akut ischämischen Hirninfarkten hat und auf einen signifikant schlechteren Outcome hinweist (127). Schließlich geht eine erhöhte TMAO-Konzentration mit einer verstärkten glialen Narbenbildung und einer schlechteren Wiederherstellung der neurologischen Funktion nach ischämischem Infarkt einher (124). Auch das Vorliegen von zerebralen Mikroangiopathien konnten mit höheren TMAO-Konzentrationen in Verbindung gebracht werden (94). Ein schlechterer Outcome bei intrazerebralen Blutungen wurde ebenso mit der TMAO-Konzentration korreliert (128).

All diese Daten schließen auf einen negativen Einfluss von TMAO auf das ZNS-Gefäßsystem. Eine einzige Studie mit diskrepanten Ergebnissen mit verringerten TMAO-Konzentrationen bei Hirninfarkt-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe ist hier zu erwähnen (129).

Auch verschiedene Wege einer direkten Schädigung durch TMAO an Neuronen werden beschrieben. So werden Zellreaktionen auf Toxine bzw. Stressoren durch TMAO unterdrückt, wodurch es zu einem frühzeitigen Untergang der Zellen kommt (130). Nachgewiesen konnte auch eine Induzierung eines modulierten Signalweges durch TMAO, der in einer verringerten synaptischen Plastizität resultiert (134). Auch

größere Schäden an hippokampalen Strukturen wurden in mehreren Studien bei TMAO-Exposition beschrieben. Ursächlich ist eine verringerte Aktivität der Superoxiddismutase mit folgender Erhöhung des oxidativen Stresses. Der modulierte Signalweg mittels mTOR könnte auch in hippocampalen Strukturen zu verringerter synaptischer Plastizität führen. Ein weiterer Weg der neuronalen Zellschädigung durch TMAO scheint eine verstärkte mikroglia-medierte Neuroinflammation bei entsprechender Reizung zu sein (131-133).

Eine neuronale Schädigung aufgrund von Modulierungen mehrerer Signalwege scheinen somit von TMAO auszugehen. Diese führen zu einer Erhöhung des oxidativen Stresses und einem proinflammatorischen Effekt, mit daraus resultierenden kognitiven Defiziten.

Es bestehen einige in-vitro Studien, die die Auswirkungen von TMAO auf fehlgefaltete Proteine, die die Ursache zahlreicher Erkrankungen darstellen, untersuchen (97, 99-101, 108). Die allgemeine Beobachtung zeigt, dass TMAO proteinstabilisierend im Sinne einer Entgegenwirkung der Fehlfaltung ist. Eine Unterdrückung von Aggregationen der Proteine und verminderter Zelltod waren die Folge. In den Studien wurden jedoch hohe Stoffmengenkonzentrationen verwendet (150 mmol/L - 5 mol/L), sodass die Aussagekraft bei physiologischen Konzentrationen von TMAO (Referenzwerte Serum-TMAO: 0,98 - 15,5 µmol/L) eingeschränkt ist. Zudem gibt es eine diskrepante klinische Studie bezüglich der Parkinson-Erkrankung, die einen negativen Einfluss von TMAO auf den Krankheitsverlauf zeigt (110). In einer weiteren Studie wurde jedoch eine Assoziation von geringen TMAO-Konzentrationen mit einem rascher gesteigerten Medikationsbedarf bei Parkinson-Patienten gezeigt (109).

Um die Frage zu klären, ob TMAO günstige Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf von neurologischen Erkrankungen besitzt, die ihren Ursprung in der Aggregation fehlgefalteter Proteine finden, sind weitere Studien notwendig.

In der Gesamtheit der Fachliteratur finden sich also vorwiegend Ergebnisse, die auf eine schädliche Auswirkung von TMAO auf das Gehirn deuten, auch wenn eine gewisse Diskrepanz bestehen bleibt. Zusätzliche Studien mit in vivo zu erwartenden Stoffmengenkonzentrationen von TMAO sind notwendig, um weitere kausale

Zusammenhänge zwischen dem Metaboliten TMAO und neurologischen Erkrankungen zu finden.

Literaturverzeichnis

1. Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci.* 2001;184(2):101-22.
2. Fennema D, Phillips IR, Shephard EA. Trimethylamine and Trimethylamine N-Oxide, a Flavin-Containing Monooxygenase 3 (FMO3)-Mediated Host-Microbiome Metabolic Axis Implicated in Health and Disease. *Drug Metabolism and Disposition.* 2016;44(11):1839-50.
3. Enko D, Zelzer S, Niedrist T, Holasek S, Baranyi A, Schnedl WJ, et al. Assessment of trimethylamine-N-oxide at the blood-cerebrospinal fluid barrier: Results from 290 lumbar punctures. *EXCLI J.* 2020;19:1275-81.
4. Yang S, Li X, Yang F, Zhao R, Pan X, Liang J, et al. Gut Microbiota-Dependent Marker TMAO in Promoting Cardiovascular Disease: Inflammation Mechanism, Clinical Prognostic, and Potential as a Therapeutic Target. *Front Pharmacol.* 2019;10:1360.
5. Ufnal M, Zadlo A, Ostaszewski R. TMAO: A small molecule of great expectations. *Nutrition.* 2015;31(11-12):1317-23.
6. Cinar H, Fetahaj Z, Cinar S, Vernon RM, Chan HS, Winter RHA. Temperature, Hydrostatic Pressure, and Osmolyte Effects on Liquid-Liquid Phase Separation in Protein Condensates: Physical Chemistry and Biological Implications. *Chemistry.* 2019;25(57):13049-69.
7. Yancey PH. Cellular responses in marine animals to hydrostatic pressure. *J Exp Zool A Ecol Integr Physiol.* 2020.
8. Subramaniam S, Fletcher C. Trimethylamine N-oxide: breathe new life. *Br J Pharmacol.* 2018;175(8):1344-53.
9. Zeisel SH, Warriar M. Trimethylamine N-Oxide, the Microbiome, and Heart and Kidney Disease. *Annu Rev Nutr.* 2017;37:157-81.
10. Vogt NM, Romano KA, Darst BF, Engelman CD, Johnson SC, Carlsson CM, et al. The gut microbiota-derived metabolite trimethylamine N-oxide is elevated in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther.* 2018;10(1):124.
11. Del Rio D, Zimetti F, Caffarra P, Tassotti M, Bernini F, Brighenti F, et al. The Gut Microbial Metabolite Trimethylamine-N-Oxide Is Present in Human Cerebrospinal Fluid. *Nutrients.* 2017;9(10).
12. Seibel BA, Walsh PJ. Trimethylamine oxide accumulation in marine animals: relationship to acylglycerol storage. *J Exp Biol.* 2002;205(Pt 3):297-306.
13. Kruger R, Merz B, Rist MJ, Ferrario PG, Bub A, Kulling SE, et al. Associations of current diet with plasma and urine TMAO in the KarMeN study: direct and indirect contributions. *Mol Nutr Food Res.* 2017;61(11).

14. Cho CE, Taesuwan S, Malysheva OV, Bender E, Tulchinsky NF, Yan J, et al. Trimethylamine-N-oxide (TMAO) response to animal source foods varies among healthy young men and is influenced by their gut microbiota composition: A randomized controlled trial. *Mol Nutr Food Res*. 2017;61(1).
15. Janeiro MH, Ramirez MJ, Milagro FI, Martinez JA, Solas M. Implication of Trimethylamine N-Oxide (TMAO) in Disease: Potential Biomarker or New Therapeutic Target. *Nutrients*. 2018;10(10).
16. Lebensmitteln DVC-Gi. Website Online. 2020.
17. Longo N, Frigeni M, Pasquali M. Carnitine transport and fatty acid oxidation. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(10):2422-35.
18. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med*. 2013;19(5):576-85.
19. Koeth RA, Lam-Galvez BR, Kirsop J, Wang Z, Levison BS, Gu X, et al. L-Carnitine in omnivorous diets induces an atherogenic gut microbial pathway in humans. *J Clin Invest*. 2019;129(1):373-87.
20. Day CR, Kempson SA. Betaine chemistry, roles, and potential use in liver disease. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1860(6):1098-106.
21. Wang QJ, Shen YE, Wang X, Fu S, Zhang X, Zhang YN, et al. Concomitant memantine and *Lactobacillus plantarum* treatment attenuates cognitive impairments in APP/PS1 mice. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(1):628-49.
22. Miller CA, Corbin KD, da Costa KA, Zhang S, Zhao X, Galanko JA, et al. Effect of egg ingestion on trimethylamine-N-oxide production in humans: a randomized, controlled, dose-response study. *Am J Clin Nutr*. 2014;100(3):778-86.
23. Tang WH, Wang Z, Levison BS, Koeth RA, Britt EB, Fu X, et al. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2013;368(17):1575-84.
24. Chen ML, Yi L, Zhang Y, Zhou X, Ran L, Yang J, et al. Resveratrol Attenuates Trimethylamine-N-Oxide (TMAO)-Induced Atherosclerosis by Regulating TMAO Synthesis and Bile Acid Metabolism via Remodeling of the Gut Microbiota. *mBio*. 2016;7(2):e02210-15.
25. Cashman JR, Zhang J. Human flavin-containing monooxygenases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2006;46:65-100.
26. Schugar RC, Brown JM. Emerging roles of flavin monooxygenase 3 in cholesterol metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2015;26(5):426-31.
27. Ziegler DM. An overview of the mechanism, substrate specificities, and structure of FMOs. *Drug Metab Rev*. 2002;34(3):503-11.

28. Canyelles M, Tondo M, Cedo L, Farras M, Escola-Gil JC, Blanco-Vaca F. Trimethylamine N-Oxide: A Link among Diet, Gut Microbiota, Gene Regulation of Liver and Intestine Cholesterol Homeostasis and HDL Function. *Int J Mol Sci.* 2018;19(10).
29. Mitchell SC, Zhang AQ, Barrett T, Ayesh R, Smith RL. Studies on the discontinuous N-oxidation of trimethylamine among Jordanian, Ecuadorian and New Guinean populations. *Pharmacogenetics.* 1997;7(1):45-50.
30. Wilson A, McLean C, Kim RB. Trimethylamine-N-oxide: a link between the gut microbiome, bile acid metabolism, and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2016;27(2):148-54.
31. Ding L, Chang M, Guo Y, Zhang L, Xue C, Yanagita T, et al. Trimethylamine-N-oxide (TMAO)-induced atherosclerosis is associated with bile acid metabolism. *Lipids Health Dis.* 2018;17(1):286-.
32. Bennett BJ, de Aguiar Vallim TQ, Wang Z, Shih DM, Meng Y, Gregory J, et al. Trimethylamine-N-oxide, a metabolite associated with atherosclerosis, exhibits complex genetic and dietary regulation. *Cell Metab.* 2013;17(1):49-60.
33. Gautam A, Paudel YN, Abidin S, Bhandari U. Guggulsterone, a farnesoid X receptor antagonist lowers plasma trimethylamine-N-oxide levels: An evidence from in vitro and in vivo studies. *Hum Exp Toxicol.* 2019;38(3):356-70.
34. Velasquez MT, Ramezani A, Manal A, Raj DS. Trimethylamine N-Oxide: The Good, the Bad and the Unknown. *Toxins (Basel).* 2016;8(11).
35. Castillo-Rodriguez E, Fernandez-Prado R, Esteras R, Perez-Gomez MV, Gracia-Iguacel C, Fernandez-Fernandez B, et al. Impact of Altered Intestinal Microbiota on Chronic Kidney Disease Progression. *Toxins (Basel).* 2018;10(7).
36. Hartiala J, Bennett BJ, Tang WH, Wang Z, Stewart AF, Roberts R, et al. Comparative genome-wide association studies in mice and humans for trimethylamine N-oxide, a proatherogenic metabolite of choline and L-carnitine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(6):1307-13.
37. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature.* 2011;472(7341):57-63.
38. Nam HS. Gut Microbiota and Ischemic Stroke: The Role of Trimethylamine N-Oxide. *J Stroke.* 2019;21(2):151-9.
39. Suzuki T, Heaney LM, Jones DJ, Ng LL. Trimethylamine N-oxide and Risk Stratification after Acute Myocardial Infarction. *Clin Chem.* 2017;63(1):420-8.
40. Fu Q, Zhao M, Wang D, Hu H, Guo C, Chen W, et al. Coronary Plaque Characterization Assessed by Optical Coherence Tomography and Plasma Trimethylamine-N-oxide Levels in Patients With Coronary Artery Disease. *Am J Cardiol.* 2016;118(9):1311-5.

41. Suzuki T, Heaney LM, Bhandari SS, Jones DJ, Ng LL. Trimethylamine N-oxide and prognosis in acute heart failure. *Heart*. 2016;102(11):841-8.
42. Huc T, Drapala A, Gawrys M, Konop M, Bielinska K, Zaorska E, et al. Chronic, low-dose TMAO treatment reduces diastolic dysfunction and heart fibrosis in hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;315(6):H1805-h20.
43. Senthong V, Wang Z, Fan Y, Wu Y, Hazen SL, Tang WH. Trimethylamine N-Oxide and Mortality Risk in Patients With Peripheral Artery Disease. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(10).
44. Svengen GFT, Zuo H, Ueland PM, Seifert R, Løland KH, Pedersen ER, et al. Increased plasma trimethylamine-N-oxide is associated with incident atrial fibrillation. *Int J Cardiol*. 2018;267:100-6.
45. Bu J, Wang Z. Cross-Talk between Gut Microbiota and Heart via the Routes of Metabolite and Immunity. *Gastroenterol Res Pract*. 2018;2018:6458094.
46. Zininga T, Ramatsui L, Shonhai A. Heat Shock Proteins as Immunomodulators. *Molecules*. 2018;23(11).
47. Wick G, Knoflach M, Xu Q. Autoimmune and Inflammatory Mechanisms in Atherosclerosis. *Annual Review of Immunology*. 2004;22(1):361-403.
48. Levitan I, Volkov S, Subbaiah PV. Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal*. 2010;13(1):39-75.
49. Parthasarathy S, Raghavamenon A, Garelnabi MO, Santanam N. Oxidized low-density lipoprotein. *Methods Mol Biol*. 2010;610:403-17.
50. Hoseini Z, Sepahvand F, Rashidi B, Sahebkar A, Masoudifar A, Mirzaei H. NLRP3 inflammasome: Its regulation and involvement in atherosclerosis. *J Cell Physiol*. 2018;233(3):2116-32.
51. Haghikia A, Li XS, Liman TG, Bledau N, Schmidt D, Zimmermann F, et al. Gut Microbiota-Dependent Trimethylamine N-Oxide Predicts Risk of Cardiovascular Events in Patients With Stroke and Is Related to Proinflammatory Monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018;38(9):2225-35.
52. Seldin MM, Meng Y, Qi H, Zhu W, Wang Z, Hazen SL, et al. Trimethylamine N-Oxide Promotes Vascular Inflammation Through Signaling of Mitogen-Activated Protein Kinase and Nuclear Factor- κ B. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(2).
53. Teft WA, Morse BL, Leake BF, Wilson A, Mansell SE, Hegele RA, et al. Identification and Characterization of Trimethylamine-N-oxide Uptake and Efflux Transporters. *Mol Pharm*. 2017;14(1):310-8.
54. Tang WHW, Wang Z, Kennedy DJ, Wu Y, Buffa JA, Agatsuma-Boyle B, et al. Gut Microbiota-Dependent Trimethylamine N-Oxide (TMAO) Pathway Contributes to Both Development of Renal Insufficiency and Mortality Risk in Chronic Kidney Disease. *Circulation Research*. 2015;116(3):448-55.

55. Gessner A, König J, Fromm MF. Contribution of multidrug and toxin extrusion protein 1 (MATE1) to renal secretion of trimethylamine-N-oxide (TMAO). *Sci Rep*. 2018;8(1):6659.
56. Mafune A, Iwamoto T, Tsutsumi Y, Nakashima A, Yamamoto I, Yokoyama K, et al. Associations among serum trimethylamine-N-oxide (TMAO) levels, kidney function and infarcted coronary artery number in patients undergoing cardiovascular surgery: a cross-sectional study. *Clin Exp Nephrol*. 2016;20(5):731-9.
57. Kaysen GA, Johansen KL, Chertow GM, Dalrymple LS, Kornak J, Grimes B, et al. Associations of Trimethylamine N-Oxide With Nutritional and Inflammatory Biomarkers and Cardiovascular Outcomes in Patients New to Dialysis. *J Ren Nutr*. 2015;25(4):351-6.
58. Latkovskis G, Makarova E, Mazule M, Bondare L, Hartmane D, Cirule H, et al. Loop diuretics decrease the renal elimination rate and increase the plasma levels of trimethylamine-N-oxide. *Br J Clin Pharmacol*. 2018;84(11):2634-44.
59. Liabeuf S, Cheddani L, Massy ZA. Uremic Toxins and Clinical Outcomes: The Impact of Kidney Transplantation. *Toxins (Basel)*. 2018;10(6).
60. Hai X, Landeras V, Dobre MA, DeOreo P, Meyer TW, Hostetter TH. Mechanism of Prominent Trimethylamine Oxide (TMAO) Accumulation in Hemodialysis Patients. *PLoS One*. 2015;10(12):e0143731.
61. Sun G, Yin Z, Liu N, Bian X, Yu R, Su X, et al. Gut microbial metabolite TMAO contributes to renal dysfunction in a mouse model of diet-induced obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;493(2):964-70.
62. Song J, Yu J, Prayogo GW, Cao W, Wu Y, Jia Z, et al. Understanding kidney injury molecule 1: a novel immune factor in kidney pathophysiology. *Am J Transl Res*. 2019;11(3):1219-29.
63. Meng X-M, Tang PM-K, Li J, Lan HY. TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis. *Front Physiol*. 2015;6:82-.
64. Gupta N, Buffa JA, Roberts AB, Sangwan N, Skye SM, Li L, et al. Targeted Inhibition of Gut Microbial Trimethylamine N-Oxide Production Reduces Renal Tubulointerstitial Fibrosis and Functional Impairment in a Murine Model of Chronic Kidney Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;40(5):1239-55.
65. Gruppen EG, Garcia E, Connelly MA, Jeyarajah EJ, Otvos JD, Bakker SJL, et al. TMAO is Associated with Mortality: Impact of Modestly Impaired Renal Function. *Sci Rep*. 2017;7(1):13781.
66. Kim RB, Morse BL, Djurdjev O, Tang M, Muirhead N, Barrett B, et al. Advanced chronic kidney disease populations have elevated trimethylamine N-oxide levels associated with increased cardiovascular events. *Kidney Int*. 2016;89(5):1144-52.

67. Serkova N, Fuller TF, Klawitter J, Freise CE, Niemann CU. H-NMR-based metabolic signatures of mild and severe ischemia/reperfusion injury in rat kidney transplants. *Kidney Int.* 2005;67(3):1142-51.
68. Liu M, Han Q, Yang J. Trimethylamine-N-oxide (TMAO) increased aquaporin-2 expression in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens.* 2019;41(4):312-22.
69. Mueller DM, Allenspach M, Othman A, Saely CH, Muendlein A, Vonbank A, et al. Plasma levels of trimethylamine-N-oxide are confounded by impaired kidney function and poor metabolic control. *Atherosclerosis.* 2015;243(2):638-44.
70. Dambrova M, Latkovskis G, Kuka J, Strele I, Konrade I, Grinberga S, et al. Diabetes is Associated with Higher Trimethylamine N-oxide Plasma Levels. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2016;124(4):251-6.
71. Zhuang R, Ge X, Han L, Yu P, Gong X, Meng Q, et al. Gut microbe-generated metabolite trimethylamine N-oxide and the risk of diabetes: A systematic review and dose-response meta-analysis. *Obes Rev.* 2019;20(6):883-94.
72. Oellgaard J, Winther SA, Hansen TS, Rossing P, von Scholten BJ. Trimethylamine N-oxide (TMAO) as a New Potential Therapeutic Target for Insulin Resistance and Cancer. *Curr Pharm Des.* 2017;23(25):3699-712.
73. Miao J, Ling AV, Manthena PV, Gearing ME, Graham MJ, Crooke RM, et al. Flavin-containing monooxygenase 3 as a potential player in diabetes-associated atherosclerosis. *Nature Communications.* 2015;6(1):6498.
74. Schugar RC, Shih DM, Warriar M, Helsley RN, Burrows A, Ferguson D, et al. The TMAO-Producing Enzyme Flavin-Containing Monooxygenase 3 Regulates Obesity and the Being of White Adipose Tissue. *Cell Rep.* 2017;19(12):2451-61.
75. Papandreou C, Bulló M, Zheng Y, Ruiz-Canela M, Yu E, Guasch-Ferré M, et al. Plasma trimethylamine-N-oxide and related metabolites are associated with type 2 diabetes risk in the Prevención con Dieta Mediterránea (PREDIMED) trial. *Am J Clin Nutr.* 2018;108(1):163-73.
76. Roy S, Yuzefpolskaya M, Nandakumar R, Colombo PC, Demmer RT. Plasma Trimethylamine-N-oxide and impaired glucose regulation: Results from The Oral Infections, Glucose Intolerance and Insulin Resistance Study (ORIGINS). *PLoS One.* 2020;15(1):e0227482.
77. Tang WH, Wang Z, Li XS, Fan Y, Li DS, Wu Y, et al. Increased Trimethylamine N-Oxide Portends High Mortality Risk Independent of Glycemic Control in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Clin Chem.* 2017;63(1):297-306.
78. Winther SA, Øllgaard JC, Tofte N, Tarnow L, Wang Z, Ahluwalia TS, et al. Utility of Plasma Concentration of Trimethylamine N-Oxide in Predicting Cardiovascular and Renal Complications in Individuals With Type 1 Diabetes. *Diabetes Care.* 2019;42(8):1512-20.

79. Huo X, Li J, Cao YF, Li SN, Shao P, Leng J, et al. Trimethylamine N-Oxide Metabolites in Early Pregnancy and Risk of Gestational Diabetes: A Nested Case-Control Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019;104(11):5529-39.
80. Li P, Zhong C, Li S, Sun T, Huang H, Chen X, et al. Plasma concentration of trimethylamine-N-oxide and risk of gestational diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr.* 2018;108(3):603-10.
81. Chhibber-Goel J, Singhal V, Parakh N, Bhargava B, Sharma A. The Metabolite Trimethylamine-N-Oxide is an Emergent Biomarker of Human Health. *Curr Med Chem.* 2017;24(36):3942-53.
82. Bae S, Ulrich CM, Neuhauser ML, Malysheva O, Bailey LB, Xiao L, et al. Plasma choline metabolites and colorectal cancer risk in the Women's Health Initiative Observational Study. *Cancer Res.* 2014;74(24):7442-52.
83. Xu R, Wang Q, Li L. A genome-wide systems analysis reveals strong link between colorectal cancer and trimethylamine N-oxide (TMAO), a gut microbial metabolite of dietary meat and fat. *BMC Genomics.* 2015;16 Suppl 7(Suppl 7):S4.
84. Liu X, Liu H, Yuan C, Zhang Y, Wang W, Hu S, et al. Preoperative serum TMAO level is a new prognostic marker for colorectal cancer. *Biomark Med.* 2017;11(5):443-7.
85. Guertin KA, Li XS, Graubard BI, Albanes D, Weinstein SJ, Goedert JJ, et al. Serum Trimethylamine N-oxide, Carnitine, Choline, and Betaine in Relation to Colorectal Cancer Risk in the Alpha Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2017;26(6):945-52.
86. Georgescauld F, Mocan I, Lacombe ML, Lascu I. Rescue of the neuroblastoma mutant of the human nucleoside diphosphate kinase A/nm23-H1 by the natural osmolyte trimethylamine-N-oxide. *FEBS Lett.* 2009;583(4):820-4.
87. Blanchette M, Daneman R. Formation and maintenance of the BBB. *Mech Dev.* 2015;138 Pt 1:8-16.
88. Liddelow SA. Development of the choroid plexus and blood-CSF barrier. *Frontiers in neuroscience.* 2015;9:32-.
89. Tumani H, Huss A, Bachhuber F. The cerebrospinal fluid and barriers - anatomic and physiologic considerations. *Handb Clin Neurol.* 2017;146:21-32.
90. Leinonen V, Vanninen R, Rauramaa T. Cerebrospinal fluid circulation and hydrocephalus. *Handb Clin Neurol.* 2017;145:39-50.
91. Reiber H. Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF)--a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. *J Neurol Sci.* 1994;122(2):189-203.
92. Reiber H. Proteins in cerebrospinal fluid and blood: barriers, CSF flow rate and source-related dynamics. *Restor Neurol Neurosci.* 2003;21(3-4):79-96.

93. Verneti L, Gough A, Baetz N, Blutt S, Broughman JR, Brown JA, et al. Functional Coupling of Human Microphysiology Systems: Intestine, Liver, Kidney Proximal Tubule, Blood-Brain Barrier and Skeletal Muscle. *Sci Rep*. 2017;7:42296.
94. Liu Y, Huang Y. Abstract 18781: Elevated Trimethylamine-n-oxide Levels May Contributes to Progression of Cerebral Small Vessel Diseases in Poststroke Patients via Blood Brain Barrier Disruption. *Circulation*. 2015;132(suppl_3):A18781-A.
95. Sankowski B, Książarczyk K, Raćkowska E, Szlufik S, Kozirowski D, Giebułtowicz J. Higher cerebrospinal fluid to plasma ratio of p-cresol sulfate and indoxyl sulfate in patients with Parkinson's disease. *Clin Chim Acta*. 2020;501:165-73.
96. Muttathukattil AN, Reddy G. Osmolyte Effects on the Growth of Amyloid Fibrils. *J Phys Chem B*. 2016;120(42):10979-89.
97. Tatzelt J, Prusiner SB, Welch WJ. Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. *Embo j*. 1996;15(23):6363-73.
98. Westergard L, Christensen HM, Harris DA. The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease. *Biochimica et biophysica acta*. 2007;1772(6):629-44.
99. Bennion BJ, DeMarco ML, Daggett V. Preventing misfolding of the prion protein by trimethylamine N-oxide. *Biochemistry*. 2004;43(41):12955-63.
100. Yoshida H, Yoshizawa T, Shibasaki F, Shoji S, Kanazawa I. Chemical chaperones reduce aggregate formation and cell death caused by the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. *Neurobiol Dis*. 2002;10(2):88-99.
101. Borwankar T, Rothlein C, Zhang G, Techen A, Dosche C, Ignatova Z. Natural osmolytes remodel the aggregation pathway of mutant huntingtin exon 1. *Biochemistry*. 2011;50(12):2048-60.
102. Ross CA, Tabrizi SJ. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol*. 2011;10(1):83-98.
103. Trumbore CN. Shear-induced amyloid formation of IDPs in the brain. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2019;166:225-309.
104. Kumari A, Rajput R, Shrivastava N, Somvanshi P, Grover A. Synergistic approaches unraveling regulation and aggregation of intrinsically disordered beta-amyloids implicated in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2018;99:19-27.
105. Sulzer D, Edwards RH. The physiological role of α -synuclein and its relationship to Parkinson's Disease. *J Neurochem*. 2019;150(5):475-86.
106. Outeiro TF, Klucken J, Bercery K, Tetzlaff J, Putcha P, Oliveira LMA, et al. Dopamine-induced conformational changes in alpha-synuclein. *PLoS one*. 2009;4(9):e6906-e.

107. Li B, Yuan Y, Zhang W, He W, Hu J, Chen N. Flavin-containing monooxygenase, a new clue of pathological proteins in the rotenone model of parkinsonism. *Neurosci Lett*. 2014;566:11-6.
108. Jahan I, Nayeem SM. Effect of Osmolytes on Conformational Behavior of Intrinsically Disordered Protein α -Synuclein. *Biophys J*. 2019;117(10):1922-34.
109. Chung SJ, Rim JH, Ji D, Lee S, Yoo HS, Jung JH, et al. Gut microbiota-derived metabolite trimethylamine N-oxide as a biomarker in early Parkinson's disease. *Nutrition*. 2021;83:111090.
110. Chen SJ, Kuo CH, Kuo HC, Chen CC, Wu WK, Liou JM, et al. The Gut Metabolite Trimethylamine N-oxide Is Associated With Parkinson's Disease Severity and Progression. *Mov Disord*. 2020;35(11):2115-6.
111. Zhang W, Falcon B, Murzin AG, Fan J, Crowther RA, Goedert M, et al. Heparin-induced tau filaments are polymorphic and differ from those in Alzheimer's and Pick's diseases. *Elife*. 2019;8:e43584.
112. Johnson GV, Stoothoff WH. Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 24):5721-9.
113. Smith MJ, Crowther RA, Goedert M. The natural osmolyte trimethylamine N-oxide (TMAO) restores the ability of mutant tau to promote microtubule assembly. *FEBS Letters*. 2000;484(3):265-70.
114. Tseng HC, Lu Q, Henderson E, Graves DJ. Phosphorylated tau can promote tubulin assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(17):9503-8.
115. Eidenmüller J, Fath T, Hellwig A, Reed J, Sontag E, Brandt R. Structural and functional implications of tau hyperphosphorylation: information from phosphorylation-mimicking mutated tau proteins. *Biochemistry*. 2000;39(43):13166-75.
116. Scaramozzino F, Peterson DW, Farmer P, Gerig JT, Graves DJ, Lew J. TMAO promotes fibrillization and microtubule assembly activity in the C-terminal repeat region of tau. *Biochemistry*. 2006;45(11):3684-91.
117. Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, Melcher K, et al. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin*. 2017;38(9):1205-35.
118. Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, Yndart A, Nair M. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:5541-54.
119. Yang DS, Yip CM, Huang TH, Chakrabartty A, Fraser PE. Manipulating the amyloid-beta aggregation pathway with chemical chaperones. *J Biol Chem*. 1999;274(46):32970-4.
120. Reiss AB, Arain HA, Stecker MM, Siegart NM, Kasselman LJ. Amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *Rev Neurosci*. 2018;29(6):613-27.

121. Xu R, Wang Q. Towards understanding brain-gut-microbiome connections in Alzheimer's disease. *BMC Syst Biol.* 2016;10 Suppl 3:63.
122. Zhuang Z, Gao M, Yang R, Liu Z, Cao W, Huang T. Causal relationships between gut metabolites and Alzheimer's disease: a bidirectional Mendelian randomization study. *Neurobiol Aging.* 2021;100:119.e15-.e18.
123. Nie J, Xie L, Zhao BX, Li Y, Qiu B, Zhu F, et al. Serum Trimethylamine N-Oxide Concentration Is Positively Associated With First Stroke in Hypertensive Patients. *Stroke.* 2018;49(9):2021-8.
124. Su H, Fan S, Zhang L, Qi H. TMAO Aggregates Neurological Damage Following Ischemic Stroke by Promoting Reactive Astrocytosis and Glial Scar Formation via the Smurf2/ALK5 Axis. *Front Cell Neurosci.* 2021;15:569424.
125. Liu J, Zhang T, Wang Y, Si C, Wang X, Wang RT, et al. Baicalin ameliorates neuropathology in repeated cerebral ischemia-reperfusion injury model mice by remodeling the gut microbiota. *Aging (Albany NY).* 2020;12(4):3791-806.
126. Wu C, Li C, Zhao W, Xie N, Yan F, Lian Y, et al. Elevated trimethylamine N-oxide related to ischemic brain lesions after carotid artery stenting. *Neurology.* 2018;90(15):e1283-e90.
127. Tan C, Wang H, Gao X, Xu R, Zeng X, Cui Z, et al. Dynamic Changes and Prognostic Value of Gut Microbiota-Dependent Trimethylamine-N-Oxide in Acute Ischemic Stroke. *Front Neurol.* 2020;11:29.
128. Zhai Q, Sun T, Sun C, Yan L, Wang X, Wang Y, et al. High plasma levels of trimethylamine N-oxide are associated with poor outcome in intracerebral hemorrhage patients. *Neurol Sci.* 2021;42(3):1009-16.
129. Yin J, Liao SX, He Y, Wang S, Xia GH, Liu FT, et al. Dysbiosis of Gut Microbiota With Reduced Trimethylamine-N-Oxide Level in Patients With Large-Artery Atherosclerotic Stroke or Transient Ischemic Attack. *J Am Heart Assoc.* 2015;4(11).
130. Villalobos AR, Renfro JL. Trimethylamine oxide suppresses stress-induced alteration of organic anion transport in choroid plexus. *J Exp Biol.* 2007;210(Pt 3):541-52.
131. Li D, Ke Y, Zhan R, Liu C, Zhao M, Zeng A, et al. Trimethylamine-N-oxide promotes brain aging and cognitive impairment in mice. *Aging Cell.* 2018;17(4):e12768.
132. Meng F, Li N, Li D, Song B, Li L. The presence of elevated circulating trimethylamine N-oxide exaggerates postoperative cognitive dysfunction in aged rats. *Behav Brain Res.* 2019;368:111902.
133. Zhao L, Zhang C, Cao G, Dong X, Li D, Jiang L. Higher Circulating Trimethylamine N-oxide Sensitizes Sevoflurane-Induced Cognitive Dysfunction in Aged Rats Probably by Downregulating Hippocampal Methionine Sulfoxide Reductase A. *Neurochem Res.* 2019;44(11):2506-16.

134. Govindarajulu M, Pinky PD, Steinke I, Bloemer J, Ramesh S, Kariharan T, et al. Gut Metabolite TMAO Induces Synaptic Plasticity Deficits by Promoting Endoplasmic Reticulum Stress. *Front Mol Neurosci.* 2020;13:138.