GEFÖRDERT VOM

Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Veröffentlichung der Ergebnisse von Forschungsvorhaben im BMBF-Programm

AgroClustEr: FoCus – Food Chain Plus – Gesundheitliche Bewertung und Konsumentenverhalten
TP 4.3 Genexpressionsmuster als innovative Biomarker der Inflammation

Förderkennzeichen 0315540A
Zuwendungsempfänger: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 24098 Kiel
Ausführende Stelle: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel – Agrar- und Ernährungswissenschaftliche Fakultät – Institut für Humanernährung, Olshausenstr. 40, 24118 Kiel

Verbundprojektleitung: Herr Prof. Dr. Döring

Teilprojektleitung: Herr Prof. Dr. Döring

Teilprojektlaufzeit: 1.10.2010-30.09.2015

Das diesem Bericht zugrundeliegende BMBF-Forschungsvorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 0315540A gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

I. Kurze Darstellung

1.1 Aufgabenstellung

Das TP4.3 hatte die Aufgabe, funktionell wirksame Muster der Genexpression als innovative Biomarker der Inflammation zu etablieren. Diese Muster dienen der Diagnose des Ernährungszustandes bezüglich der Inflammation und der Evaluierung von Ernährungs-interventionen am Menschen. Die Identifikation funktionell wirksamer Netzwerke der Inflammation stand dabei an erster Stelle.

1.2 Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das Vorhaben war eng eingebettet in das Verbundprojekt 4 „Gesundheitliche Bewertung und Konsumentenverhalten“ des Gesamtprojektes „Food Chain Plus““. Durch die komplexe Themenstellung war eine stringente Kooperation zwischen den einzelnen APs erforderlich. Es ist uns im Gesamtprojekt gelungen, die Voraussetzungen auf fachlicher und logistischer Seite derart zu optimieren, dass die inhaltlichen und strukturellen Ziele erreicht werden konnten.

1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Bereits zu Beginn des Gesamtprojekts wurde ein hoch standardisiertes Protokoll etabliert, mit dessen Hilfe die Monozyten aus dem Blut der Probanden Antikörper-basiert isoliert werden können. Für die hier geplanten Analysen wurde die RNA-Isolation weiter optimiert und auf die Spezifika des *in-trans* Ansatzes abgestimmt. Anschließend wurde eine *in-silico* Analyse durchgeführt, um für das Projekt relevante Genexpressionsanalysen zu identifizieren und für vergleichende Analysen zu konvertieren. Es wurden verschiedene Protokolle (klassische Extraktion, säulen-basierte Kits) für die RNA-Isolation getestet. Das Qiagen-RNAeasy-Kit wurde schließlich für die weiteren Isolierungen ausgewählt und das erarbeitete standardisierte Protokoll wurde für die Identifizierung von Genexpressionsmustern angewendet. Die erzeugten Expressionsdaten (z. B. lincRNA) sowie die Muster der Inflammationsmarker wurden schließlich genutzt, um mit Hilfe bioinformatischer Methoden entsprechende Gen-Expressions-Muster abzuleiten. Weiterhin wurden die umfangreichen Klonierungen zu den Reporterassays zügig erarbeitet, sodass die in-vitro Untersuchungen systematisch durchgeführt wurden. Somit konnten insgesamt die geplanten funktionellen Genexpressionsmuster erarbeitet werden, welche wiederum mit den Ernährungsmustern in Beziehung gesetzt wurden. Planung und Ablauf des Vorhabens entsprachen sich weitgehend; mit den lincRNA konnte ein weiterer Aspekt in das Projekt integriert werden.

1.4. Wissenschaftlicher Stand, an den angeknüpft wurde

Das Projekt basierte auf dem damaligen Stand der Wissenschaft. Zuvor hatten die Fortschritte zur genomweiten Erfassung des menschlichen Transkriptoms zur Etablierung des Fachgebietes der *Nutrigenomik* geführt. Diese Disziplin hat das Ziel, den Einfluss von Ernährung (-smustern) auf die gewebe- und zellspezifische Genexpression zu erfassen. Im Laufe des Projektes ist es der Arbeitsgruppe gelungen auf Genexpressionsebene identifizierte Effekte mit funktionellen Parametern in Beziehung zu setzen. Weiterhin wurde an das ModEncode-Projekt angeknüpft. Hierdurch ist es gelungen, die lincRNA und die damit zusammenhängende Bioinformatik in das Projekt zu integrieren.

1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Eine sehr intensive Zusammenarbeit mit den anderen Teilprojekten des Verbundprojektes 4 „Gesundheitliche Bewertung und Konsumentenverhalten“ (insbesondere TP 4.1 (KIK), 4.2 (Funktionsstudien), 4.4 (Ernährungsmuster), 4.8 (Plattform) und 4.9 (Metabolomik) war von zentraler Bedeutung für den Erfolg des Vorhabens. Die Analyse sowie die anschließende bioinformatische Zusammenführung von Genexpressionsdaten und funktionellen Parametern konnte nur durch eine stringent koordinierte Zusammenarbeit der o.a. TPs erreicht werden.

II. Eingehende Darstellung

2.1 Erzielte Ergebnisse

Genexpressions-Analyse. Die bereits beim Antragsteller etablierte Methode zur Analyse der RNA-Isolation wurde zunächst optimiert und auf die Spezifika des *in-trans* Ansatzes abgestimmt. Für die RNA-Isolation wurden verschiedene Protokolle (klassische Extraktion, säulen-basierte Kits) getestet. Das Qiagen-RNAeasy-Kit wurde schließlich für die weiteren Isolierungen ausgewählt. Es wurde weiterhin eine *in-silico* Analyse zur Identifizierung relevanter Genexpressionsdatensätze durchgeführt. Hierzu wurden die Datenbanken ArrayExpress (EBI) und GeneExpressionOmnibus (NCBI) systematisch (Stichworte: dairy, peptides, oligosaccharides, FOS, inflammation, milk, whey, ß-lactogluboline) durchmustert. Hierdurch konnten folgende Datensätze herausgefiltert werden: GSE5943, GSE8587 und GSE9280. Diese Datensätze bilden Genexpressionsmuster (**Abb. 1**) ab, die durch Fructooligosaccharide und Milchproteine resultieren. Die Daten wurden konvertiert, um Sie mit den Genexpressionsanalysen vergleichen zu können.

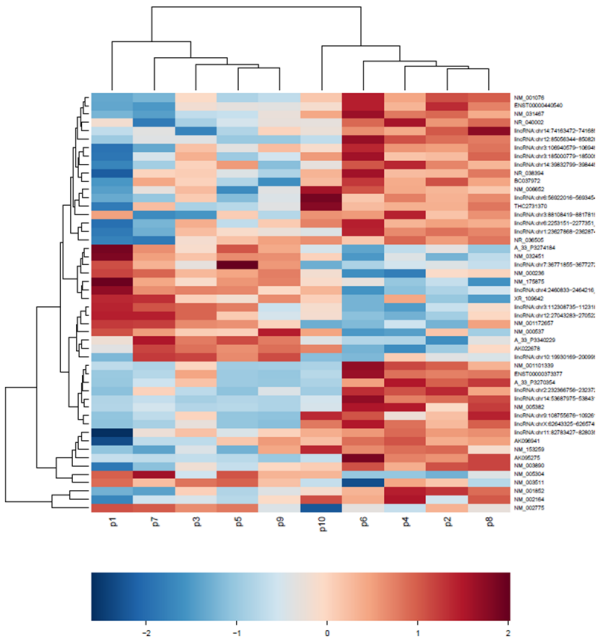

Abb. 1. „Heatmap“ einer Clusteranalyse (2D) der „top 50“ regulierten Gene

Identifizierung von Genexpressions-Mustern. Das erarbeitete standardisierte Protokoll wurde für die Identifizierung von Genexpressionsmustern angewendet. RNA wurde aus CD14-positiven Monocyten von den Probanden in Zusammenarbeit mit TP 4.1 gewonnen. Die erreichten RIN-Werte für die isolierte RNA von >8 waren für die Mikroarrayanalysen geeignet und wurden für die Genexpressionsanalysen mit anschließender Verifikation genutzt. Zur Identifizierung von Genexpressionsmustern, die als Biomarker der Inflammation angenommen wurden, wurden Analysen von solchen Probanden durchgeführt, die mit einem anti-inflammatorisch wirksamen Antikörper behandelt wurden. Die Genexpression wurde jeweils vor und nach der Behandlung bestimmt. Hierdurch wurden 184 Gene identifiziert, die nach der Behandlung um den Faktor > 1.5 in ihrer Expression signifikant erhöht oder erniedrigt waren. Diese Analyse spiegelte Ähnlichkeiten zwischen den Genen bezüglich ihrer Expression wieder. Es kann somit angenommen werden, dass ähnlich exprimierte Gene durch die gleichen Transkriptionsfaktoren reguliert werden. Weiterhin wurden 59 lincRNA-Gene identifiziert, deren Expression vom inflammatorischen Status der Probanden abhängig ist. Diese Gene waren bisher im Kontext ‚Inflammation‘ nicht beschrieben worden. Die Funktion der lincRNA-Gene ist jedoch nach wie vor weitgehend unbekannt. Bis zum Ende des Projektes wurden einige Kandidaten-Targetsequenzen für die lincRNAs identifiziert.

Bioinformatische Auswertung. Die Erstellung und Verifikation der genomweiten Expressionsdaten der Probanden wurde abgeschlossen und der umfangreiche Datensatz ausgewertet: Es wurde ein zentraler

Chemokin-Rezeptor-Signalweg identifiziert, dessen Expression vom inflammatorischen Status abhängig ist. Um die Validität dieser Genexpressionsmuster im Hinblick auf eine Biomarkereignung zu prüfen, wurden weitere Daten aus TP 4.2 und 4.9 mit herangezogen.

Reporterkonstrukte. Des Weiteren wurden Reporterkonstrukte (ZM, Luciferasereporter, NFKB) hergestellt, die zur *in-vitro* Verifikation und mechanistischen Analyse der Genexpressionsdaten dienen sollten (**Abb. 2**). Die Herstellung der Konstrukte geschah via PCR-Amplifizierung, Insertion, Klonierung und Kontrollanalyse per Restriktionsverdau. Die Konstrukte wurden in EA.hy926 Zellen transient transfiziert, mit LPS stimuliert und die resultierende Luciferaseaktivität bestimmt. Es wurde eine Reihe von Genen, die im Rahmen der Genexpresionsanalysen identifiziert wurden, im Hinblick auf LPS-Stimulierbarkeit geprüft. Hierbei standen insbesondere Gene des Eicosanoidstoffwechsels im Vordergrund. Die Befunde zeigen eine gute Übereinstimmung zwischen Genexpression und Reporteraktivität. Die Analysen zeigten, dass Gene, die unter der Kontrolle von NFkappaB stehen, gleichsam hochreguliert werden. Einige Gene, dessen Funktion jedoch nicht bekannt ist und die ebenfalls unter der Kontrolle von NFkappaB stehen, wurden unter pro-inflammatorischen Stimuli runterreguliert.

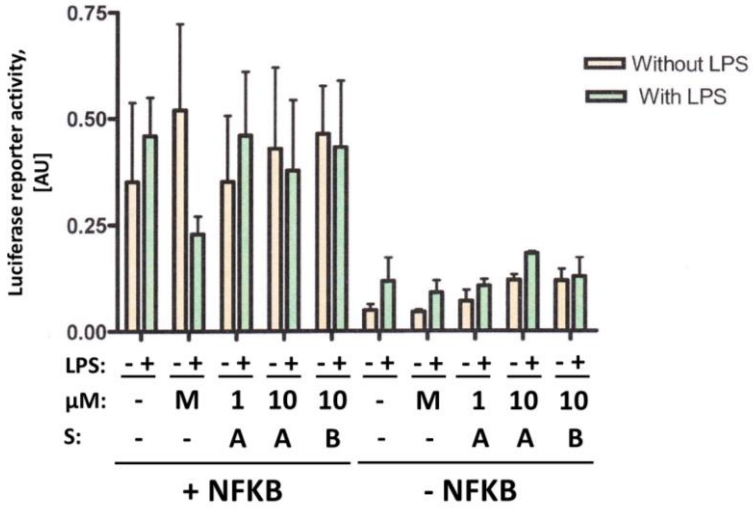

Abb. 2. Luciferaseraktivität nach transienter Transfektion (EA.hy926 Zellen) von Reporterkonstrukten, die eine (-) bzw. keine (+) NFKB Bindestelle aufweisen. LPS, Lipopolysaccharid; S, Testsubstanz; A, Antioxidans; B, SH-Reagenz; M, Matrix

Die Analysen zu den identifizierten 59 lincRNA-Genen (**Abb. 3**) wurden besonders verfolgt, da diese Befunde besonders interessant und neuartig sind. Es konnten einige Targetsequenzen für die lincRNAs identifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die lincRNAs mit RNA-bindenden Proteinen interagieren. Weiterhin erfolgte eine funktionelle Allokation der Metaboliten in die KEGG Stoffwechselwege. Für die Verknüpfung der Metabolom- und Genexpressionsdaten wurde eine Reihe von bioinformatischen Werkzeugen (z. B. BioMart) geprüft. Dabei zeigte sich, dass sich die Genexpressionsdaten nicht immer eindeutig einem Stoffwechselweg zuordnen lassen. Eine Promotoranalyse ergab, dass einige lincRNAs über gemeinsame TF in ihrer Expression reguliert werden. Mehr als 70 % aller Metabolite, die mit Hilfe des Metabolomansatzes (TP 4.9) identifiziert wurden, konnten in die *KEGG*-Stoffwechselwege eingeordnet werden.

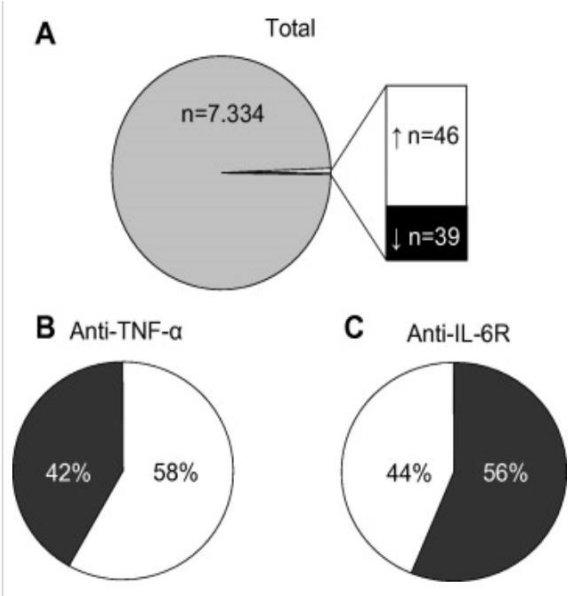

Abb. 3. Regulation der lincRNA über TNFα und IL-6 in CD14-Monocyten. A: Anzahl der unregulierten (grau), hochregulierten (weiß) und runterregulierten (schwarz) lincRNAs. B und C: % der hochregulierten (weiß) und runterregierten (schwarz) lincRNAs via TNFα (B) und IL-6 (C)

Metabolomik. Um regulatorische Netzwerke zu identifizieren, die im Hinblick auf Inflammation von Relevanz sind, wurden die Metabolomdaten aus TP 4.9 aufbereitet. Hier konnte gezeigt werden, dass die Mehrzahl der Metabolite, die mit Hilfe des Metabolomansatzes identifiziert wurden, in die *KEGG*-Stoffwechselwege eingeordnet werden konnten. Eine Zuordnung zu zentralen Signalwegen der Inflammation ist ebenfalls gelungen. In einem zweiten Schritt wurden die Genexpressionsdaten in die Stoffwechsel- und Signalwege integriert. Diese Zuordnung war schwieriger als ursprünglich angenommen, da Splicevarianten mit berücksichtigt werden mussten. Zur Vereinfachung wurden nur Splicevarianten berücksichtigt, die unter der Expressionskontrolle kanonischer Promotoren stehen. Hierdurch ist es gelungen, die Kandidatengene in die *KEGG*-Wege einzuordnen.

Verknüpfung von Transkriptom und Metabolom. In einem letzten Schritt wurden die beiden Datensätze, die aus den funktionellen Allokationen erzeugt wurden, miteinander verknüpft. Diese Verknüpfung zeigte auf, dass NFkappaB-abhängige Gene überrepräsentiert sind. Allerdings ergab sich hier erwartungsgemäß kein funktioneller Zusammenhang zu den Metaboliten. Die Allokation der Metabolite legt nahe, dass die Aktivität von Eicosanoid-abhängigen Wegen durch den inflammatorischen Status beeinflusst wird. Hier konnte eine Verknüpfung zur Genenexpression hergestellt werden. Somit könnten diese Eisosanoid-abhängigen Wege als Biomarker dienen, um Inflammation sensitiv und funktionell auf der Ebene der Genexpression und des Metaboloms abzubilden.

2.2 Zahlenmäßiger Nachweis

Für die Durchführung des TP 4.3 wurden für die Laufzeit (1.10.2010-30.9.2015) Mittel in Höhe von 310.149,567€ bewilligt. Davon entfielen 186.829,56 € auf Personalkosten, 4.000 € auf Reisemittel und 119.320,00 € auf Sachmittel.

2.3 Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeiten

Im Rahmen der Projektarbeit hat sich gezeigt, dass die geleisteten Arbeiten notwendig und angemessen waren, um das geplante Projekt erfolgreich abschließen zu können. Wie in dem Ergebnisbericht ausführlich dargelegt, haben alle Projektbereiche zum Erfolg des Gesamtkonsortiums beigetragen. Das galt insbesondere für die Bereiche Transkriptomik, Metabolomik und Bioinformatik.

2.4 Der voraussichtliche Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit der Ergebnisse

Neben den Ergebnissen, die publiziert wurden oder demnächst publiziert werden können und die demzufolge ob ihres Erkenntnisgewinns von besonderem Wert sind, sind insbesondere diejenigen Ergebnisse zu nennen, die final in eine direkte Nutzung münden könnten. Dabei handelt es sich primär um diejenigen Biomarker, die die Inflammation sensitiv und funktionell auf der Ebene von Transkriptom und Metabolom abbilden können.

2.5 Fortschritte auf dem Gebiet, die durch andere erbracht wurden.

Im Zeitraum des Zuwendungsempfangs haben sich natürlich wesentliche Fortschritte auf dem Gebiet ergeben. Dies betrifft z.B. die Weiterentwicklung und Sensitivitätssteigerung von Genexpressionsanalysen mittels Microarrays. Allerdings blieben diese Entwicklungen im Rahmen des normalen wissenschaftlichen Fortschritts, die unsere zu Grunde liegenden Hypothesen nicht beeinträchtigt haben und demzufolge auch keine wissenschaftliche Umorientierung der Arbeiten hätten notwendig oder sinnvoll erscheinen lassen.

2.6 Erfolgte und geplante Veröffentlichungen

Die erfolgten und geplanten Veröffentlichungen beziehen sich auf die Genexpressionsanalysen unter besonderer Berücksichtigung der lincRNA. Hier konnten verschiedene lincRNAs im Hinblick ihrer Signalwege differenziert werden. Diese ist im Hinblick auf die differenzierte Phänotypisierung von Menschen mit Entzündungen von Bedeutung. Weiterhin beziehen sich die geplanten Publikationen auf die funktionellen Verknüpfungen von Transkriptomik und Metabolomik. Hier ist es geplant, die experimentellen Daten zusammen mit den biionformatischen Analysen sowie den in-vitro Daten zu veröffentlichen.

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel Teilprojekt 4.3 – Genexpressionsmuster als innovative Biomarker der Inflammation	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Döring, Frank Lüersen, Kai	5. Abschlussdatum des Vorhabens 30.09.2015 6. Veröffentlichungsdatum September 2016 7. Form der Publikation Schlussbericht
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde Olshausenstr. 40 24118 Kiel	9. Ber. Nr. Durchführende Institution TP 4.3 10. Förderkennzeichen 0315540A 11. Seitenzahl 6
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 14. Tabellen 15. Abbildungen 3
16. Zusätzliche Angaben -/-	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) -/-	
18. Kurzfassung Ziel des TP war es, mit Hilfe von DNA-Arrays Gen-Expressionsmuster zu identifizieren, die als sensitive Biomarker der Inflammation dienen und damit die Wirkung von Ernährungsmustern und funktionalisierten Milchprodukten beim Menschen abbilden. Dies ist in dem Projekt realisiert worden. Hierfür wurde Instrumente etabliert, die zur Identifikation und Analyse des Transkriptoms und Metaboloms dienten. Dies war essentiell für die Durchführung des ambitionierten Vorhabens. In Kooperation mit den TP 4.1 (KIK), 4.2 (Funktionsstudien), 4.4 (Ernährungsmuster), 4.8 (Plattform) und 4.9 (Metabolomik) wurde der Einfluss von anti-inflammatorischen Ernährungsmustern auf die genomweite Genexpression untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von verschiedenen Signalwegen wie z. B. die Eicosanoid-abhängigen Wege durch den inflammatorischen Status beeinflusst wird. Zudem konnte eine Verknüpfung zur Genexpression hergestellt werden. Somit könnten diese Signalwege als Biomarker dienen, um Inflammation sensitiv und funktionell auf der Ebene von Transkriptom und Metabolom abzubilden.	
19. Schlagwörter	
20. Verlag	21. Preis