



Veröffentlichung der Ergebnisse von Forschungsvorhaben im BMBF-Programm

AgroClustEr: FoCus – Food Chain Plus – Gesundheitliche Bewertung und
Konsumentenverhalten
TP 4.8 HealthPlat

Förderkennzeichen 0315540A

Zuwendungsempfänger: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 24098 Kiel

Ausführende Stelle: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel – Agrar- und
Ernährungswissenschaftliche Fakultät – Institut für Humanernährung und
Lebensmittelkunde, Olshausenstr. 40, 24118 Kiel

Verbundprojektleitung: Herr Prof. Dr. Döring
Teilprojektleitung: Herr Prof. Dr. Schreiber

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 zu

1. Aufgabenstellung

Im TP4.8 wird die Kieler-Interventionskohorte (KIK) in die Biobank Popgen eingebunden und molekular charakterisiert. Dies beinhaltet die Genotypisierung sowie die Analyse des mikrobiellen 16S rRNA Gens als auch die Metagenom-Shotgun Sequenzierung für ausgewählte Individuen der Kohorte (unter Co-Projektleiter Philip Rosenstiel). Weiterhin sollen die Autoantikörper ANA (Lupus), anti-CCP (rheumatoide Arthritis) und anti-TPO (Thyreoditis) im Serum gemessen und analysiert werden.

Die generierten Daten werden mit den Phänotypdaten (Alter, Geschlecht, BMI, klinische Parameter, Ernährung) korreliert, um somit die komplexe Interaktion von Ernährungsverhalten/-mustern, Genetik, Darmmikrobiom und relevanten klinischen Parametern zu entschlüsseln.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Voraussetzungen waren das etablierte Rekrutierungs-Verfahren der Biobank PopGen (Anschieben der Probanden, Aufbereitung der Phänotyp-Daten, Asservierung der Biomaterialien) und das standardisierte Vorgehen bei der Aufarbeitung der verschiedenen Biomaterialien. In diesem Teilprojekt umfasste die Aufbereitung der Biomaterialien die etablierte Extraktion der DNA aus den Stuhlproben und Erstellung von mikrobiellen 16S rRNA Gen Profilen bzw. Metagenom-Shotgun Bibliotheken sowie der DNA Extraktion aus den Blutproben und anschließender Genotypisierung mittels ImmunoChip und iScan Omni ExpressExomeBead Chip. Im Anschluss erfolgte eine bioinformatische Qualitätsüberprüfung und Auswertung der generierten Daten.

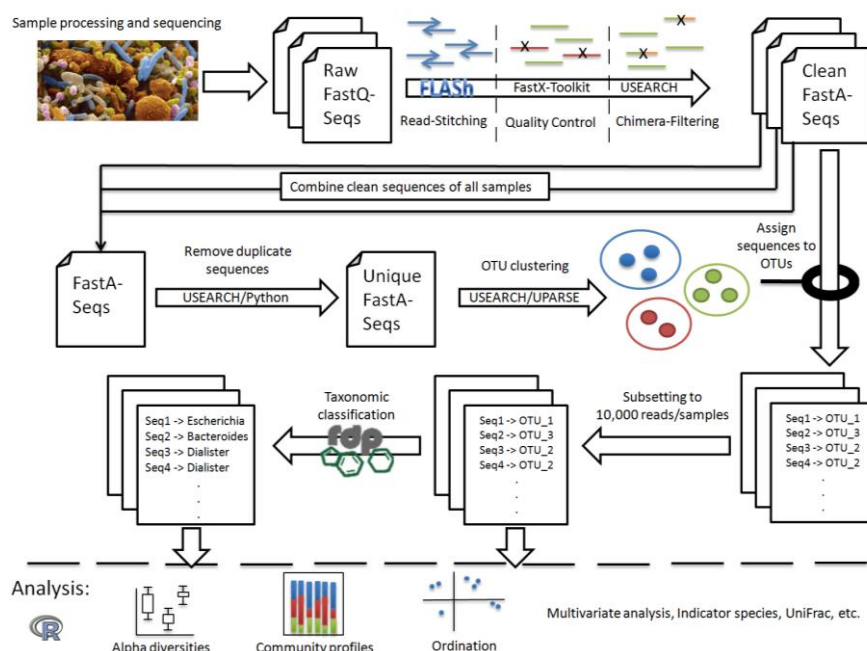


Abbildung 1: Etablierte Vorgehensweise zur Qualitätsüberprüfung und Auswertung von 16S rRNA Gen Daten.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Die Rekrutierung der Probanden sowie Anleitung über die Entnahme einer Stuhlprobe wurde von der Biobank PopGen durchgeführt. Nach dem Eintreffen der Stuhlproben im Labor wurden diese auf drei Aliquote pro Probe verteilt. Die Aliquote sowie das Originalröhrchen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die DNA wurde aus jeweils einem Stuhl-Aliquot (der Rest wurde für eventuelle Wiederholungen wieder eingefroren) mit einer etablierten automatisierten Methode extrahiert. Ausgehend von der DNA wurden dann entweder in einem Doppel-Index-Ansatz 16S rRNA Gen Bibliotheken erstellt und in einem 384-er Pool auf dem Illumina MiSeq sequenziert oder mittels Illumina Nextera Protokoll und einer Sequenzierung auf dem Illumina HiSeq Metagenom-Shotgun Daten generiert.

Die DNA aus den Blutproben wurde ebenfalls extrahiert und mittels ImmunoChip und iScan OmniExpressExome Bead Chip genotypisiert.

Die Biobank PopGen hat nach erneuter Pseudonymisierung der Individuen die unterschiedlichen Daten (Mikrobiom, Genetik, Phänotypen, Ernährung) zusammengefügt und für die nachfolgenden Analysen bereit gestellt.

4. Wissenschaftlichem und technischem Stand, an den angeknüpft wurde, insbesondere

- *Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden*

Das Konzept zur Sammlung, Speicherung und Verarbeitung aller Daten und Proben bei der Biobank PopGen wurde um Unabhängigen Landeszentrum für Datenschutz (AZ: LD4-16.1/03.001) und der Medizinischen Ethik-Kommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (AZ: A156/03) geprüft und positiv bewertet.

- *Angaben der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste*

Die Erstellung der 16S rRNA Gen Bibliotheken wurde in Anlehnung an die Veröffentlichung von Caporaso et al. (Caporaso JG et al. PNAS 2011, 108 Suppl 1:4516-22) durchgeführt. Die Auswertung wurde mit dem R Paket VEGAN durchgeführt (Oksanen J et al. Vegan: Community Ecology Package. 2011). Die Metagenom-Shotgun Sequenzierung sowie die Genotypisierung wurden mit den entsprechenden Protokollen der Firma Illumina durchgeführt.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Serummarker wurden in Zusammenarbeit mit und in den Laboren von Prof. Saleh Ibrahim und Dr. Susanne Lemcke (Klinik für Dermatologie, Lübeck) bestimmt.

II. Eingehende Darstellung

1. der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Ziel dieses Teilprojektes war die molekulare Charakterisierung des Darmmikrobioms und deren Einflussfaktoren bei Teilnehmern der Kieler-Interventionskohorte (KIK). Mit der Verwendung der Zuwendung konnten **mikrobielle Profile von 1.597 Individuen** generiert werden und **1.627 Individuen Genom-weit genotypisiert werden (13.286.751 SNPs nach Imputation)**. Somit wurden vielversprechende Kandidatenvarianten (z.B. Vitamin D Rezeptor und das bekannte CED Risikogen DNMT3A) entdeckt, die zu der bakteriellen Zusammensetzung im Darm beitragen.

Von **160 Individuen** wurde eine **zweite Stuhlprobe** abgegeben, die einen Einblick in die **zeitlichen Veränderungen des Darmmikrobioms** ermöglicht.

Zusätzlich wurden die Stuhlproben von **149 Individuen** einer **Metagenom Shotgun-Sequenzierung** unterzogen, um auch die funktionellen Eigenschaften des Mikrobioms aufklären zu können.

In den **Serumproben** von **1.817 Individuen** wurden ANA (Lupus), anti-CCP (rheumatoide Arthritis) und anti-TPO (Thyreoditis) **Autoantikörper** bestimmt. Zurzeit wird eine genomweite Assoziationsstudie (GWAS) durchgeführt.

2. der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Der Großteil der Zuwendung wurde für die Genotypisierung (ImmunoChip und iScan OmniExpressExome Bead Chip) und die Erstellung sowie Sequenzierung der 16S rRNA Gen Bibliotheken verwendet.

3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Analyse des 16S rRNA Gens ist die gängige Methode um kostengünstig das Darmmikrobiom zu untersuchen. Da diese Methode jedoch nur die Zusammensetzung und nicht die Funktion des Darmmikrobioms widerspiegelt, wurde zusätzlich die teurere Metagenom-Shotgun Sequenzierung für ausgewählte Proben durchgeführt. Die Genotypisierung mittels ImmunoChip erlaubt einen Vergleich mit bereits bestehenden Daten, der OmniExpressExome Bead Chip ist ein optimierter Illumina Chip und erfasst die größte Menge an häufigen SNP Variationen.

4. des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Das Ziel dieses Projektes ist zunächst auf die Generierung von wissenschaftlichen Inhalten ausgelegt. Die Kohortenstudie mit der Verknüpfung von Mikrobiom und komplexen Ernährungsmustern könnte allerdings ein erster Schritt in die Entwicklung möglicher Biomarker sein.

Weiterhin stellt diese Kohorte einen wertvollen Datensatz an Mikrobiom-, Ernährungs- und genetischen Daten des gesunden Menschen dar, der bei der vergleichenden Untersuchung verschiedenster Krankheiten vielfache Verwendung finden wird.

5. des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

In zielgerichteten und Kandidatengen-Studien konnten Gen-Mikrobiom-Interaktionen mit z.B. *NOD2*, *ATG16L1* (Frank et al. 2011 PMID:20839241, Rehman et al. 2011 PMID:21421666) und *FUT2* (Rausch et al. 2011 PMID:22068912, Wacklin et al. 2011 PMID:21625510) gezeigt werden. Die bisher einzige Genom-weite Studie im Menschen zeigte SNPs im Gen *PLD1* und war mit der Abundanz von *Akkermansia* assoziiert.

Einen großen Einfluss auf das Mikrobiom hat die Ernährung, wobei die mikrobielle Zusammensetzung, zumindest in der westlichen Bevölkerung, hauptsächlich durch langfristige Ernährungseffekte beeinflusst wird. So ist die Gattung *Prevotella* bei einer ballaststoff- und kohlenhydratreichen Ernährung erhöht, wo hingegen die Gattung *Bacteroides* mit einer typischen „westlichen“ Ernährung (viel Protein und Fett) assoziiert wurde (Wu et al. 2013 PMID:21885731). Nichtsdestotrotz können extreme Ernährungsumstellungen innerhalb von 24 Stunden zu einer veränderten Mikrobiomzusammensetzung führen (David et al. 2014 PMID:24336217).

6. der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr.6

Bisher wird eine Veröffentlichung vorbereitet („Einfluss von Genvarianten auf die bakterielle Zusammensetzung im Darm“), zwei weitere sind in der Planung („GWAS von ANA (Lupus), anti-CCP (rheumatoide Arthritis) und anti-TPO (Thyreoditis) Autoantikörpern“ sowie „Zusammenhang von Mikrobiom und Adipositas-assoziierten Erkrankungen“).

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht	
3. Titel AgroClustEr: FoCus – Food Chain Plus – Gesundheitliche Bewertung und Konsumentenverhalten, Teilprojekt 4.8 - HealthPlat		
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Scheiber, Stefan	5. Abschlussdatum des Vorhabens 30.9.2015	
	6. Veröffentlichungsdatum 30.9.2016	
	7. Form der Publikation Schlussbericht	
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Christian-Albrechts-Platz 4 24118 Kiel Klinik I für Innere Medizin – Allgemeine Innere Medizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel	9. Ber. Nr. Durchführende Institution	
	10. Förderkennzeichen 0315540A	
	11. Seitenzahl 4	
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben	
	14. Tabellen	
	15. Abbildungen 1	
16. Zusätzliche Angaben		
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)		
18. Kurzfassung Das gastrointestinale Mikrobiom spielt eine große Rolle bei der Gesunderhaltung des Menschen. So sind zahlreiche Erkrankungen durch ein verändertes Mikrobiom charakterisiert. Auf der anderen Seite wird das Mikrobiom aber auch durch die Gene des Wirtes und das Ernährungsverhalten beeinflusst. Um diese komplexe Interaktion zu entschlüsseln werden die neuesten Hochdurchsatztechnologien angewendet, um das Mikrobiomprofil (mittels 16S rRNA Gen Sequenzierung) sowie das genetische Profil der Studienteilnehmer (mittels Genotypisierung) molekular zu charakterisieren. Weiterhin werden Fragebögen zu Lebensstil, Erkrankungen und Ernährung ausgewertet. Das Ergebnis ist ein umfassender Datensatz, der zum einen Hinweise auf die komplexe Interaktion von Ernährung, Genetik und Mikrobiom beim gesunden Menschen liefert, zum anderen aber auch als Kontrolldatensatz bei der Untersuchung verschiedenster Erkrankungen dienen kann.		
19. Schlagwörter Microbiome, GWAS, nutrition		
20. Verlag	21. Preis	