



Abschlussbericht

AgroClustEr: FoCus – Food Chain Plus – Gesundheitliche Bewertung und Konsumentenverhalten

TP 4.1 HealthKiK :

Anti-inflammatorische Wirksamkeit von Ernährungsmustern und
funktionalisierten Milchprodukten beim Menschen

Förderkennzeichen 0315540A

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

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

Klinik I für Innere Medizin – Allgemeine Innere Medizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein,
Campus Kiel

Verbundprojektleitung: Herr Prof. Dr. Döring

Teilprojektleitung: Herr Prof. Dr. Laudes

Teilprojektlaufzeit: 1.10.2010-31.3.16

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. Aufgabenstellung (stichpunktartig)

- Etablierung einer Professur „Klinische Ernährungsmedizin“ und einer entsprechenden Forschergruppe
- Rekrutierung und Aufbau der Kieler-Interventions-Kohorte „KIK“ mit insgesamt 2000 Probanden für die im Verbundprojekt geplanten Interventionsstudien
- Phänotypisierung der Kohortenteilnehmer (u.a. BMI, waist-to-hip-ratio sowie weitere anthropometrische Parameter), Bestimmung von Parametern des metabolischen Syndroms sowie von Surrogatbiomarkern des Stoffwechsels und der Inflammation
- Etablierung eines *in vivo* basierten Testsystems zur Antizipation von Interventionsstudien (Bereitstellung von Probandenseren zur Analyse von Biomarkern (z.B. wnt5a), Funktionsparametern (z.B. Inflammation) und der Genom-weiten Genexpression (Teilprojekte „HealthMap, HealthGenEx))
- Durchführung von insgesamt drei Interventionsstudien zur gesundheitlichen Bewertung der in Verbundprojekt 3 „Genetische Variabilität und funktionelle Milchhaltsstoffe“ generierten bioaktiven Peptid- und/ oder Oligosaccharidfraktionen (Teilprojekte 3.2 „LactoPep“ und 3.3 „LactoCarb“), von funktionalisierten Milchprodukten (Teilprojekt 3.6 „Unternehmensgruppe Theo Müller“) und abgeleiteten Ernährungsmustern (Teilprojekt 4.4 „HealthPat“)

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde:

Mitarbeiter Titel, Name, Vorname	Qualifikation	Durchschnittliche wöchentliche Arbeitszeit (h) für das Projekt	Finanzierung aus
Prof. Dr. med. Laudes, Matthias	W2 Professor	40	BMBF- Mitteln
MSc, Müller, Nike	Doktorand	40	BMBF- Mitteln
Türk, Kathrin	Study nurse	40	BMBF- Mitteln

3. Planung des Ablaufs und 4. Wissenschaftlicher Stand, an den angeknüpft wurde:

Im Rahmen des Bewilligungszeitraums wurde wie vorgesehen eine W2 Professur für Klinische Ernährungsmedizin implementiert. Diese Professur wurde mit Herrn PD Dr. Matthias Laudes im Jahre 2011 besetzt und zwischenzeitlich positiv evaluiert sowie verstetigt. Damit ist ein Hauptziel des TP4.1 erreicht, nämlich die langfristige Etablierung einer neuen Struktur in Forschung und Lehre an der CAU in Kiel, die die Nachhaltigkeit des Forschungsprojektes am Standort sichtbar macht.

In Bezug auf die KIK wurden wie geplant n=2000 Probanden rekrutiert und detailliert phänotypisiert und genotypisiert. Dabei wurden n=1500 Probanden über eine Zufallsstichprobe des Einwohnermeldeamtes gewonnen und n=500 Patienten mit schwerer Adipositas und assoziierter Entzündung über die neue Ambulanz der klinischen Ernährungsmedizin rekrutiert. Es sollte betont werden, dass zusätzlich zu den im Antrag beschriebenen Prozeduren auch Stuhlproben gesammelt wurden, welche nachfolgend -finanziert über Fakultätsmittel- mittels Mikrobiomanalyse untersucht wurden. Dadurch ist eine sehr große Kohorte entstanden, von der neben detaillierten Ernährungsdaten auch 16s rRNA Mikrobiomdaten vorliegen, was eine wissenschaftliche Besonderheit darstellt. Dies erklärt auch, warum schon viele externe Arbeitsgruppen eine Datennutzungsanfrage für externe Forschungsprojekte gestellt haben, was zu mehreren internationalen Kooperationen und gemeinsamen Publikationen (u. a. in *Science Advance*) geführt hat. Diese Kohorte wird dem Standort Kiel zukünftig eine besondere Sichtbarkeit vermitteln.

Im Hinblick auf die Etablierung eines *in vivo* basierten Testsystems für humane Interventionsstudien wurde das *in trans* System angewendet. Dabei wurden Serumproben von Probanden vor und nach der Intervention mit Milch-Oligopeptiden untersucht. Hier muss jedoch kritisch angemerkt werden, dass bis dato keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden konnten. Innerhalb des Projektes wurden parallel auch Entzündungszellen aus dem Vollblut isoliert gefolgt von Expressionsanalysen auf RNA Ebene, was im Vergleich zu den *in trans* Analysen wesentlich aussagefähigere Ergebnisse erbrachte.

Planungskonform wurden im Projektzeitraum 3 Interventionsstudien durchgeführt. In der ersten Studie erhielten Probanden zusätzlich zur Mischkost ein in TP 3.2 identifiziertes Milch-Oligopeptid, in der zweiten ein in VP 3.3 identifiziertes Milch-Oligosaccharid und in der dritten Studie eine Intervention mit einem anti-inflammatorischen Ernährungsmuster, das in TP 4.4 identifiziert wurde. Die Interventionen erfolgten allesamt über einen mehrwöchigen Zeitraum. Die generelle Idee der Interventionen war eine anti-inflammatorische Wirkung, da viele ernährungsassoziierte Erkrankungen mit Entzündungsreaktionen assoziiert sind (z. B. Adipositas, Typ 2 Diabetes und Atherosklerose). Leider konnte jedoch in keiner der Interventionen eine günstige Beeinflussung des inflammatorischen Markers Interleukin-6 im Serum nachgewiesen werden. Auch in den *in trans* Analysen (s. o.) zeigte sich kein Effekt auf die Expression von NF-kB auf zellulärer Ebene. Beim Oligopeptid und bei dem

Ernährungsmuster wurden keine unerwünschten Wirkungen angegeben, allerdings entwickelten einige Patienten unter der Oligosaccharid-Intervention Diarrhoen.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen:

Das TP 4.1 zeichnet sich aus durch eine intensive Zusammenarbeit mit anderen Forschungsgruppen und Einrichtungen der Infrastruktur der CAU in Kiel. So wurden neben den im FoCus Verbundprojekt ohnehin vorgesehenen Kooperationen z. B. die 16s rRNA Microbiomanalysen in Zusammenarbeit mit Professor Andre Franke (Institut für klinische Molekularbiologie in Kiel) durchgeführt. Daneben werden alle KIK Daten und Bioproben in der PopGen Biobank in Kiel für zukünftige Auswertungen gelagert. PopGen nimmt auch Teil am Aufbau der Nationalen Kohorte, was den hohen Standard der Biobank anzeigt.

II. eingehende Darstellung

1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen und 2. die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises:

Für die Leitung des Teilprojektes 4.1 wurde eine Forschergruppe „klinische Ernährungsmedizin“ geleitet von einer W2-Professorin / einem W2-Professor für „klinische Ernährungsmedizin“ ausgeschrieben. Die Professur wurde zum März 2011 von Herrn PD Dr. Matthias Laudes (vormals Universität Köln) angetreten. Nach der Aufnahme der Tätigkeit von Herrn Professor Laudes in Kiel ist es rasch gelungen, die zugehörigen Stellen auszuschreiben und zu besetzen (0,5 TV-L 13: Nike Müller MSc Ökotrophologie, 1 TV-L 9: Katrin Türk). Erfreulicherweise wurde die W2 Professur zwischenzeitlich positiv evaluiert und verstetigt und zwar einschließlich der o. g. Stellen und 25.000 Euro pro Jahr Verbrauchsmitteln als Ausstattung. Für die Durchführung des TP 4.1 wurden Mittel in Höhe von 1.052.815,00 € bewilligt. Davon entfielen 765.610,84 € auf Personalkosten, 6.000 € auf Reisemittel und 281.204,16 € auf Sachmittel.

Nach Verfassung eines Ethikantrages und Erwirkung eines Versicherungsschutzes wurde im Oktober 2011 mit der Rekrutierung von Probanden begonnen. Die Probanden wurden zum Teil aus Zufallsstichproben des Einwohnermeldeamtes (n=1500) und zum Teil aus dem Patientenpool der neu gegründeten Ambulanz für „Klinische Ernährungsmedizin“ an der Klinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein rekrutiert. Dazu wurden die Probanden auf dem Postwege angeschrieben und mit Fragebögen zur medizinischen und sozialen Vorgeschichte/Situation, mit Fragebögen zu den Ernährungsgewohnheiten (TP 4.4) und mit der Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie versorgt. Am Tage der Vorstellung im Ambulanzzentrum des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein legten die Patienten die ausgefüllten und unterschriebenen Unterlagen vor und es erfolgte eine weitere Interview-basierte Befragung zur Konsumpräferenz (TP 4.6), zum Verbraucherverhalten (TP 4.5) und zur Preisbildung funktioneller Lebensmittel (TP 4.7) während des Aufenthaltes im Klinikum. Wie im Antrag vorgesehen, wurde eine definierte Anzahl von Probanden zweimalig an zwei verschiedenen Zeitpunkten untersucht, um die erhobenen Daten validieren zu können.

An medizinischen Befunden wurde der aktuelle Blutdruck, Herzfrequenz, Gewicht, Größe, Body-Mass-Index, Muskelkraft sowie Taillen- und Hüftumfang dokumentiert. Es wurde anamnestisch sichergestellt, dass der Patient nüchtern ist und es wurden folgende Proben gewonnen:

Serumproben für klinische Routineparameter (Standardblutparameter): diese wurden am Tage der Vorstellung direkt bestimmt. Dabei wurden zu den im Vergleich zu normalen Klinikparametern auch folgende Parameter als essentiell für die Charakterisierung der Kohorte befunden: Insulin, Glukose, Triglyceride, C-reaktives Protein und Interleukin-6. Diese Parameter wurden bewusst ausgewählt, weil

man über Insulin und Glukosespiegel den so genannten HOMA-Index bestimmen und darüber die Insulinresistenz des Probanden als metabolische Störung abschätzen kann. Ebenso erhält man eine metabolische Information über die Höhe der Triglyceride. Dem gegenüber dienen das C-reaktive Protein und das Interleukin-6 zur Abschätzung der inflammatorischen Aktivität des Probanden. Mit diesen Parametern konnten im Folgenden Probanden mit eher milder oder starker inflammatorischer Aktivität mit oder ohne metabolische Abnormalitäten ausgewählt werden, was für die Subgruppenbildung für die Interventionsstudien von Bedeutung war. Es kann nämlich davon ausgegangen werden, dass eine anti-inflammatorische Wirkung eines funktionellen Milchproduktes sich bei einem Probanden mit hoher basaler inflammatorischer Aktivität besser auswirkt und damit eindeutigere Ergebnisse liefert, als bei Probanden mit normaler Stoffwechsel- und Entzündungsreaktion.

EDTA-Blutproben für die DNA Aufarbeitung für genetische Diagnostik: Von jedem Probanden wurden 19 ml EDTA-Blut entnommen zur Aufarbeitung der genomischen DNA. Diese wurden in der PopGen Biobank bei -80°C gelagert und für genetische Analysen durch das TP 4.8 genutzt.

EDTA-Blutproben zur Aufarbeitung von Monozyten: Für die Expressionsanalysen des TP 4.3 wurden Monozyten aus EDTA Blutproben mittels Dichtegradientenzentrifugation und Antikörper-basierter Techniken aufgereinigt und RNA wird isoliert. Diese Arbeiten zu Biomarkern der Inflammation (*ex vivo* Ansatz) fanden im Labor von TP4.1 statt, die RNA Analyse mittels Expressionsanalyse erfolgte dann im Labor von TP4.3

Serumproben für die in-trans Untersuchungen: Weiterhin wurde Serum asserviert für die durch das TP4.2 durchgeführten *in-trans* Experimente. Diese wurden ebenfalls in der PopGen Biobank bei -80°C gelagert und zwar in folgenden Aliquots: 4 x 0,5 ml, und 4 x 1,0 ml.

Urinproben für Metabolom-Experimente: Ebenso wurde der Proband während der Vorstellung im Ambulanzgebäude aufgefordert eine frische Urinprobe abzugeben und 10 ml dieser Probe wurden in der Biobank für Untersuchungen des TP 4.9 bei -80°C gelagert.

Stuhlproben für Mikrobiomanalysen: Über die im FoCus Antrag hinaus beschriebenen Probengewinnungen wurden von jedem Probanden eine Stuhlprobe bei -80°C in der PopGen Biobank gelagert. Diese zusätzliche Maßnahme wurde erhoben, da sich in neuerer Zeit Publikationen häufen, die bestimmte Bakterienpopulationen mit entzündlichen und metabolischen Erkrankungen in Zusammenhang bringen. Da im ursprünglichen Antrag keine speziellen Mittel für Mikrobiomanalysen beantragt wurden, wurden die anschliessenden 16s rRNA Sequenzierungen über Fakultätsmittel bezahlt.

Eine weitere Besonderheit des FoCus Projektes war die Erfassung von sozialen Netzwerken zusätzlich zu den anderen Phäno- und Genotypisierungen. Auch dieses stellt eine wissenschaftliche Besonderheit

dar und grenzt die KIK von den meisten anderen etablierten Kohorten in der Ernährungsforschung ab. In einer gemeinsamen Publikation mit Forschern um Prof. Dr. Christian Henning (TP4.5) konnten wir nachweisen, dass neben dem Körpergewicht auch die Insulinempfindlichkeit des Menschen bei ernährungsassoziierten Erkrankungen durch das soziale Netzwerk beeinflusst wird (Henning C et al. 2014).

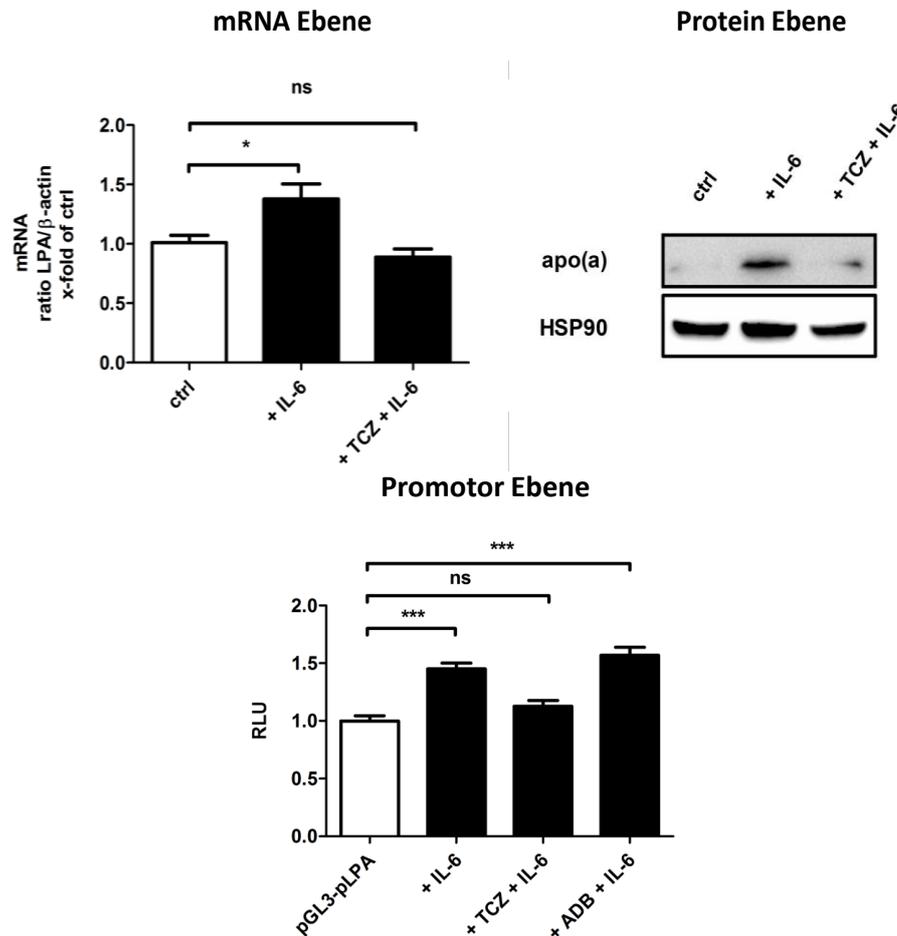


Abbildung 1: Effekt von IL6 und Anti-IL6 (TCZ) auf die Apo (a) Expression bzw. die Apo (a) Promotoraktivität in humanen Hepatozyten (HepG2). Als Spezifitätskontrolle für IL6 wurde in dem Promotor-Reporter-Experiment auch Anti-TNF-alpha (ADB) eingesetzt. Müller, N., ..., Laudes, M., *J Lipid Res* (2015), 56:1034-1042

Im Rahmen des FoCUS Verbundprojektes wurden verschiedene Faktoren im Serum untersucht, die für Ernährungsinterventionen zukünftig als Biomarker für anti-inflammatorische Effekte verwendet werden können. Dazu zählen wnt5a (Schulte DM et al. 2015), sRAGE (Hagen I et al. 2015) und BLYS (Müller N et al. 2014), die über ELISA bestimmt wurden. Darüber hinaus wurde mittels KIK ein Fettstoffwechselfaktor genauer untersucht, der bis dato noch nicht diätetisch beeinflusst werden kann: Lipoprotein (a). Die Ergebnisse zeigten, dass dieser Wert zukünftig nicht durch eine

fettarme Ernährung, sondern vielmehr durch eine anti-inflammatorische Diät beeinflusst werden kann (Müller N et al. 2015). Dieses ist nachfolgend genauer dargestellt:

Lipoprotein (a) ist ein hoch atherogenes Lipoprotein und kommt außer beim Menschen nur bei einer bestimmten Affenart vor. Klassische molekularbiologische Modellorganismen, wie z. B. Mäuse, exprimieren kein Lp (a). Lp (a) besteht aus einem LDL-Cholesterinpartikel an dessen Apo B 100 Einheit zusätzlich eine Peptidkette, das Apo (a), kovalent gebunden ist. Apo (a) wird in Hepatozyten gebildet und hat eine sehr starke Homologie zum tissue Plasminogen Activator (t-PA). Im Gegensatz zum t-PA blockiert Apo (a) die Konversion von Plasminogen in Plasmin, sodass Lp (a) pro-thrombogen wirkt. Somit verbindet Lp (a) Atherosklerose mit lokaler Thrombose und ist deshalb ein sehr starker, unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor. Die Serumspiegel von Lp (a) werden sowohl durch genetische Faktoren als auch durch Umwelteinflüsse bedingt. Unter den nicht-genetischen Faktoren scheint die systemische Entzündung von wesentlicher Bedeutung zu sein, da Lp (a) Erhöhungen für viele chronisch-entzündliche Erkrankungen beschrieben sind.

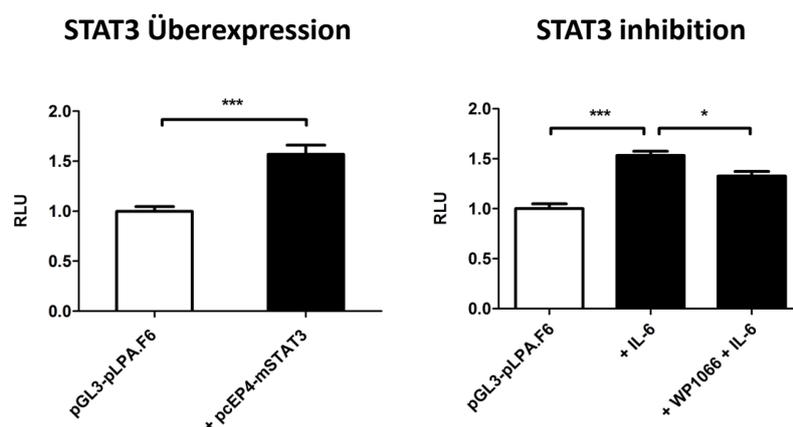


Abbildung 2: Effekt einer STAT3 Überexpression (links) und einer pharmakologischen STAT3 Inhibition (rechts, WP1065) auf die Apo (a) Promotoraktivität in humanen Hepatozyten (HepG2). Müller, N., ..., Laudes, M., *J Lipid Res* (2015), 56:1034-1042

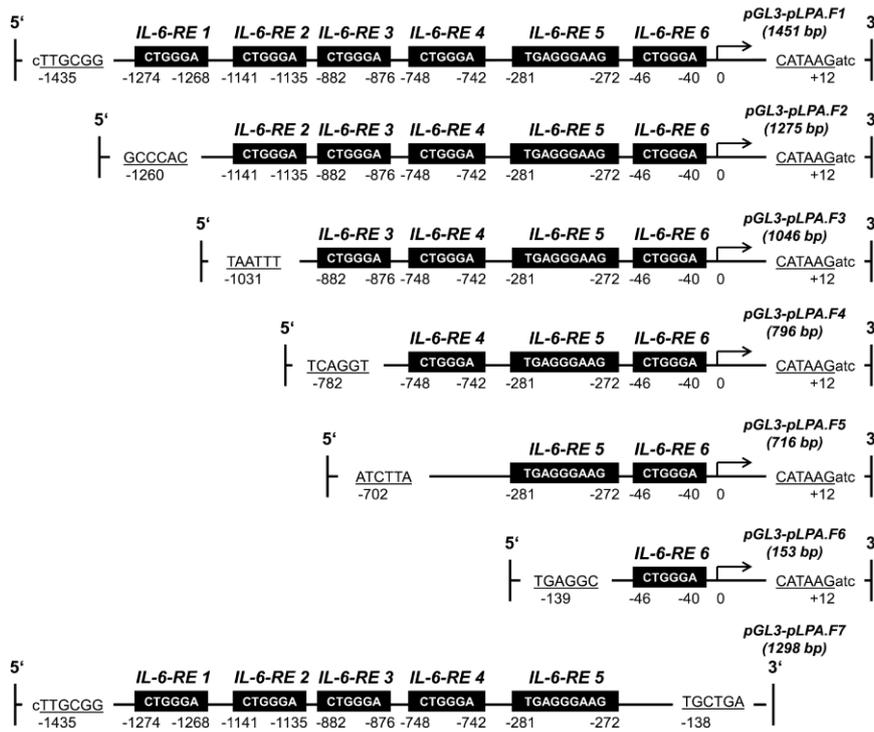
Unsere Arbeitsgruppe hat erstmalig beschrieben, dass eine spezifische Blockade des IL6 Signalweges zu einer 30-50% Senkung der Lp (a) Serumkonzentrationen bei Patienten führt. Diesen Befund konnten wir durch zwei nachfolgende Untersuchungen weiter untermauern in denen wir zeigen, dass (1.) in einer Kohorte der -174G/C Promotorpolymorphismus von IL6 mit Lp (a) Serumspiegeln signifikant assoziiert ist und dass (2.) in Expressionsanalysen von humanen Leberbiopsien die Apo (a) Expression mit der von anderen bekannten IL6 Zielgenen signifikant korreliert ist.

Nachfolgend haben wir den Zusammenhang von IL6 und Lp (a) im Rahmen des FoCUS Projektes auf humaner (KIK) und zellulärer Ebene untersucht. Dazu wurden humane Hepatozyten (HepG2) mit IL6

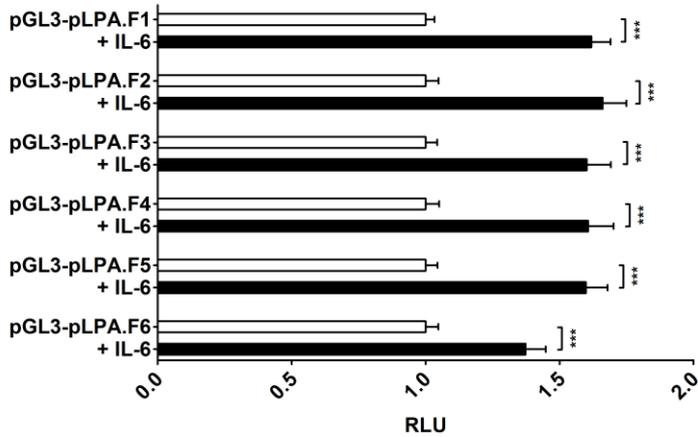
sowie einem IL6 Inhibitor (Tocilizumab) inkubiert und die Expression von Apo (a) auf Promotor-, RNA- (qRT-PCR mittels Taqman) und Proteinebene untersucht (Abb. 1). Hierbei zeigte sich, dass IL6 die Apo (a) Expression erhöht und dass dieser Effekt durch Tocilizumab (Anti-IL6R) aber nicht durch Adalimumab (Anti-TNF- α) gehemmt werden kann (*in trans* Äquivalent), was die Spezifität für den IL6 Signalweg anzeigt. Um zu überprüfen, ob die inflammatorische Regulation für Lp (a) spezifisch ist, oder ob der Fettstoffwechsel oder die Leberfunktion generell durch IL6 beeinflusst wird, wurden humane Hepatozyten auch mit einem Promotor-Reporter-gen Konstrukt transfiziert, in das der Promotor der Fettsäuresynthetase (FAS) kloniert wurde. Beim FAS Promotor zeigte IL6 keinen Effekt auf die Promotoraktivität. Dies belegt, dass der Effekt von inflammatorischer Seite IL6 spezifisch und von metabolischer Seite Apo (a) spezifisch ist. Im nächsten Schritt wurde die intrazelluläre Signaltransduktion untersucht. Dabei führte die Überexpression von STAT3 in Hepatozyten zu einer Erhöhung der Apo (a) Expression, wohingegen die pharmakologische Inhibition von STAT3 durch ein small molecule die IL6 induzierte Apo (a) Expression reduzierte (Abb. 2). Eine Datenbank gestützte Promotorsequenzanalyse ergab 6 potentielle STAT3 Bindungsstellen im humanen Apo (a) Promotor. Deshalb wurde nachfolgend der Apo (a) Promotor kloniert und es wurden zunächst 6 Promotordeletionskonstrukte generiert, denen einzelne potentielle STAT3 Bindungsstellen fehlen (Abb 3A). Nachfolgend wurden humane Hepatozyten mit diesen Konstrukten transfiziert gefolgt von Promotor-Reporter-gen Analysen. Dabei zeigte sich, dass das Element nahe dem Transkriptionstart die entscheidende regulatorische STAT3 Bindungsstelle ist (Abb. 3B). Dies wurde weiterhin dadurch untermauert, dass ein siebtes Promotordeletionskonstrukt kloniert wurde, dem nur dieses einzige regulatorische Element fehlt (Abb. 3A). Wie erwartet, führt dies zu einem kompletten Verlust des IL6-stimulatorischen Effektes (Abb. 3C). Letztlich wurde als CHiP Äquivalent mittels EMSA die Bindung von STAT3 an das STAT3 Bindungselement 6 untersucht, wobei die Spezifität sowohl durch Mutation des Elementes als auch durch ein Super-Shift Experiment belegt werden konnte (Abb. 3E).

Zusammenfassend zeigen diese Befunde, dass Lipoprotein (a) nicht durch die Nahrungszufuhr von Fetten beeinflusst werden kann, sondern durch eine anti-inflammatorische Ernährung, die zu einer IL6 Reduktion im Serum führt (siehe Abbildung 4). Deshalb wurde IL6 auch in den nachfolgenden Interventionsstudien als Serummarker gemessen, um zu überprüfen, ob die Milch-Oligopeptide bzw. Oligosaccharide und/oder das anti-inflammatorische Ernährungsmuster tatsächlich anti-inflammatorische Eigenschaften bei ernährungsassoziierten Erkrankungen aufweisen.

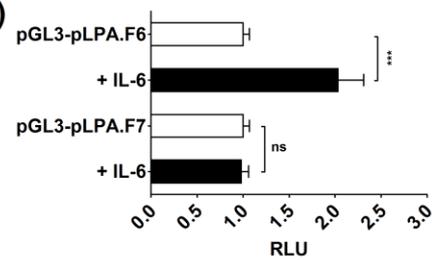
(A)



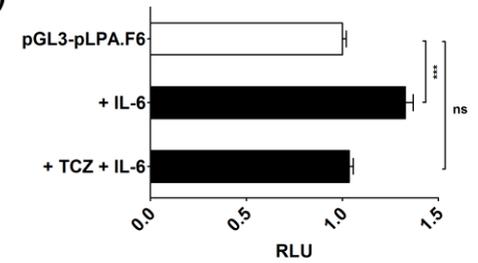
(B)



(C)



(D)



(E)

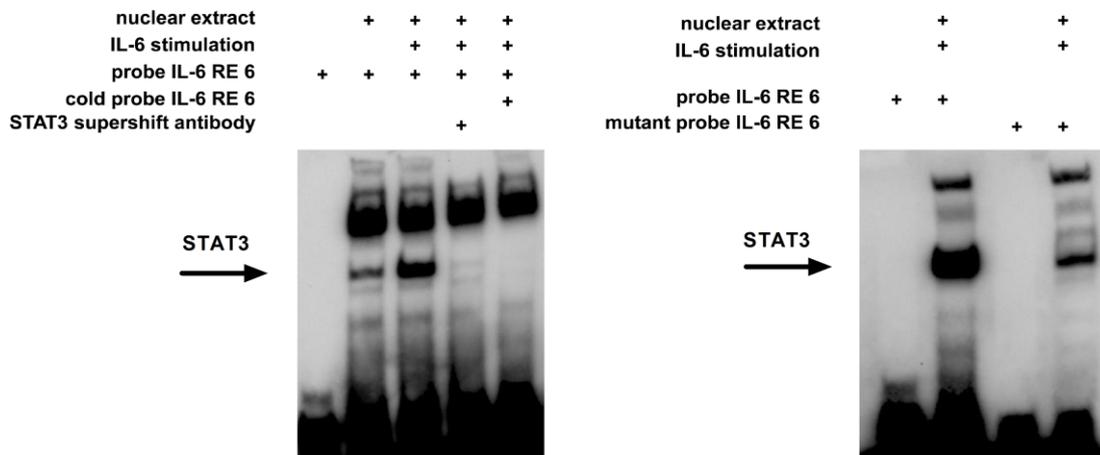
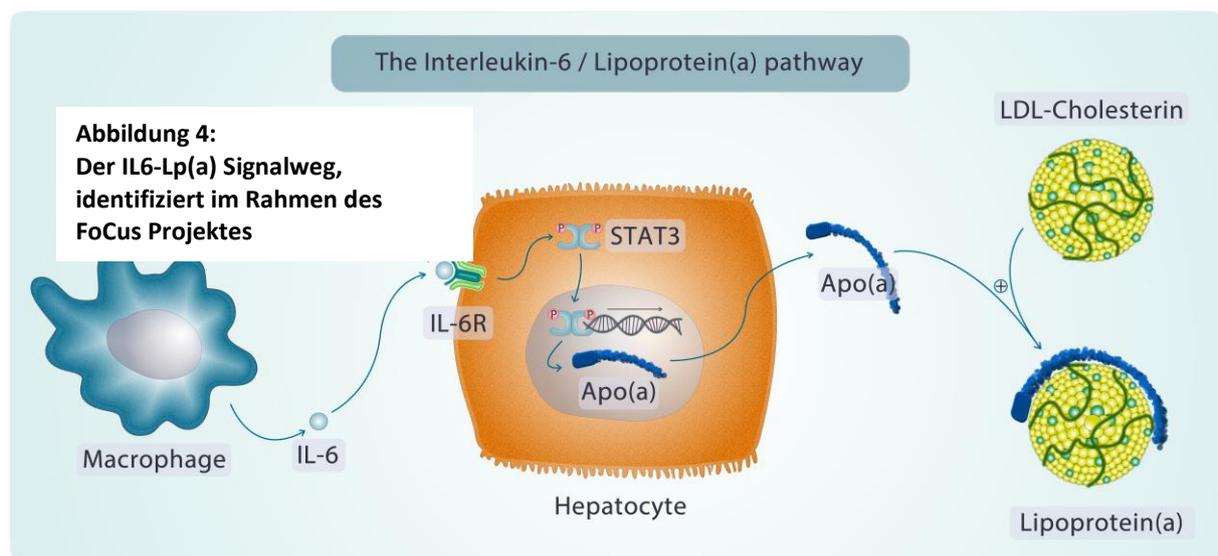


Abbildung 3 auf der vorherigen Seite: Der Promotor des humanen Apo (a) wurde kloniert. Dieser enthält 6 potentielle STAT3 Bindungsstellen. Deshalb wurden für Deletionsexperimente zunächst 6 Konstrukte kloniert (A) denen jeweils eine oder mehrere Bindungsstellen fehlen (pGL3-pLPA.F1 bis F6). (B) In den Promotoranalysen zeigte sich, dass das Vorhandensein der dem Transkriptionsstart am nächsten liegenden Bindungsstelle ausreicht, um die volle Promotoraktivität zu entfalten (pGL3-pLPA.F6). (C) Ein Konstrukt, pGL3-pLPA.F7, dem alleine diese Stelle fehlt, zeigt keine IL6 Stimulation mehr. (D) Die F6 STAT3 Bindungsstelle ist für den IL6 und den TCZ Effekt funktionell bedeutsam. (E) In EMSA Experimenten konnte durch IL6 Stimulation eine Zunahme der STAT3 Bindung an ein DNA Fragment, das die F6 Bindungsstelle trägt, nachgewiesen werden (links). Die Mutation dieses Bereiches führt zum Verlust der STAT3 Bindung (rechts). Zusammenfassend belegen diese Daten, dass IL6 den Apo (a) Promotor über eine Aktivierung des STAT3-Signalweges und Bindung des Transkriptionsfaktors an das F6 Promotorelement aktiviert. Müller, N., ..., Laudes, M., *J Lipid Res* (2015), 56:1034-1042



Interventionsstudien:

In der ersten Interventionsstudie wurden die in TP3 isolierten Milch-Oligopeptide untersucht. Dazu wurden 40 Probanden aus der KIK Kohorte ausgewählt, die neben einer ernährungsassoziierten Erkrankung (BMI > 30 kg/m² und Insulinresistenz (HOMA > 2)) auch eine erhöhte systemische Entzündung vorwiesen (Interleukin-6 > 5 pg/ml). Der Ansatz wurde deshalb gewählt, weil wir anti-inflammatorische Effekte besser erfassen können, wenn bereits eine systemische metabolische Entzündung im Körper vorliegt. Die Intervention wurde im Cross-Over Design durchgeführt. Dies bedeutet, dass 20 Probanden zunächst für 8 Wochen Placebo und nach einer Auswaschphase von 4 Wochen dann 8 Wochen Verum erhalten haben und die anderen 20 Probanden umgekehrt. Als Verum wurde das in LactoPep entwickelte Oligopeptid verwendet. Das Cross Over Design führte dazu, dass jeder Proband seine eigene Kontrolle darstellt, was die statistische Auswertung

erleichtert, da individuelle Besonderheiten so besser kontrolliert werden können (Studiendesign siehe Abb. 5).

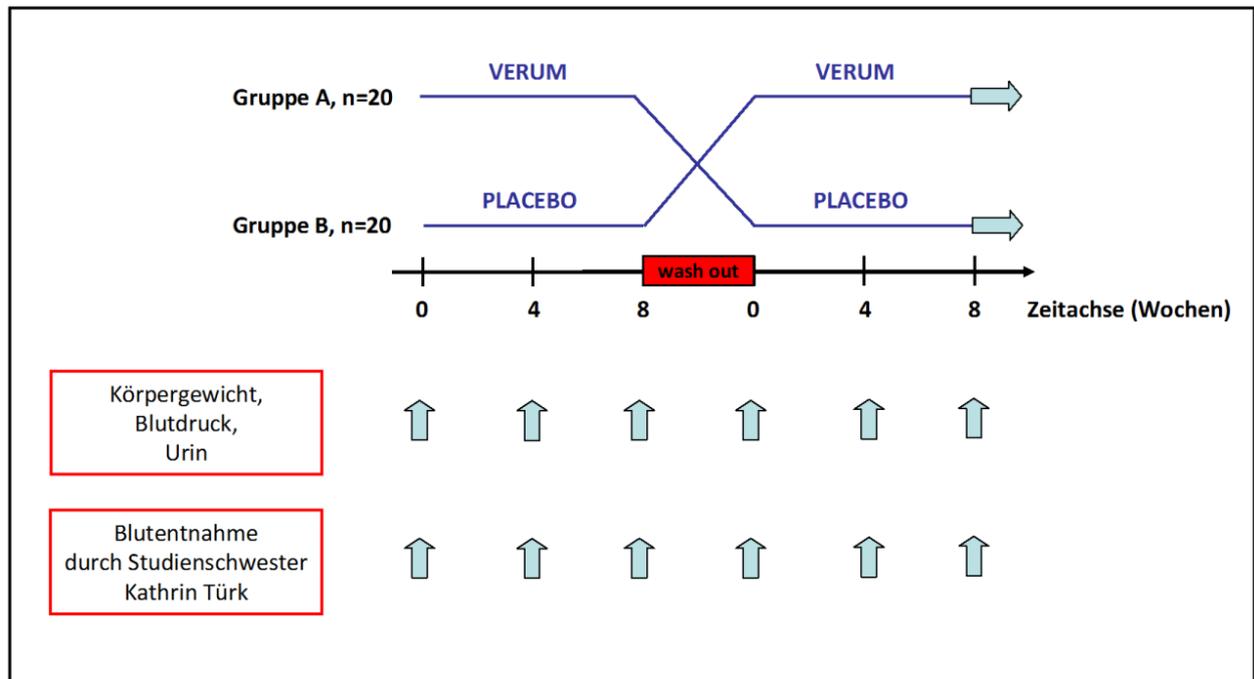


Abb. 5 Studiendesign

In Abbildung 6 sind die Ergebnisse zusammenfassend dargestellt. Während der gesamten Studienphase kam es nicht zu einer Veränderung des Körpergewichtes, was so gewollt war, da Gewichtseffekte schon einen eigenen, zum Teil deutlichen Effekt auf die systemische metabolische Entzündung auslösen. Passend dazu kam es ebenfalls nicht zu einer signifikanten Änderung der Insulinresistenz, gemessen über den HOMA Index. Das in TP 3.2 entwickelte Produkt hat in vorherigen *in vitro* Experimenten potentielle anti-inflammatorische Effekte in Zellkultur gezeigt. Auch in unserer Humanstudie zeigte sich ein Trend zu abfallenden Interleukin-6 Werten, was eine anti-inflammatorische Aktivität anzeigen könnte, allerdings war dieser Effekt statistisch nicht signifikant (Abb. 6). Zudem sahen wir einen ähnlichen Trend in der Placebo Gruppe, was die Notwendigkeit von Placebokontrollen auch in Ernährungsstudien klar anzeigt.

In Abbildung 7 sind die Ergebnisse des *in trans* Ansatzes dargestellt. Dabei wurden die Verum Patientenserum vor und nach Intervention auf THP1 Zellen (Entzündungszellen) gegeben und auf zellulärer Ebene mittels Western Blot die Aktivierung der Zellen über NF- κ B Expression untersucht. Wie aus der Abbildung ersichtlich wird, ließ sich mit dieser Untersuchung kein signifikanter Unterschied vor und nach der Intervention nachweisen. Der *in trans* Ansatz sollte im Rahmen des FoCUS Projektes als neuer zellulärer Validierungssassay aufgebaut werden. Es sollte aber kritisch angemerkt werden, dass die im FoCUS Verbundprojekt gewonnenen Ergebnisse dies nicht abbilden können.

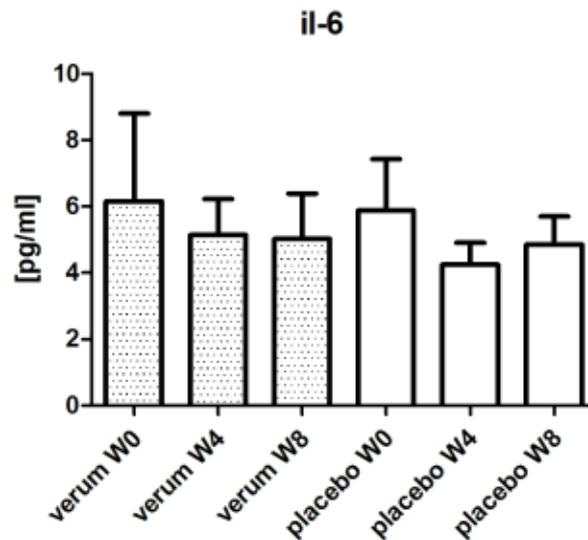


Abb.6 Ergebnisse der ersten Interventionsstudie (*LactoPep, Milch Oligopeptide*). W0 bis W8 = Woche 0 bis Woche 8, BMI = body mass index, homa-ir = Homa Index zur Abschätzung der Insulinresistenz (HOMA-Index = Insulin (nüchtern, $\mu\text{U}/\text{ml}$) x Blutzucker (nüchtern, mg/dl) / 405), tg = Triglyceride, crp = C-reaktives Protein und il-6 = Interleukin 6. n = 40, Mittelwert und Standardabweichung.

In der zweiten Interventionsstudie wurden die Milch-Galaktooligosaccharide in einer ähnlichen Versuchsanordnung untersucht. Auch diese wurden durch das TP 3.3 zur Verfügung gestellt (Max Rubner Institut und Unternehmensgruppe Theo Müller). Die Interventionsstudie fand in den Wintermonaten statt. Interessanterweise ist dabei das IL-6 als Entzündungsmarker bei der Kontrollgruppe signifikant angestiegen, was vermuten lässt, dass in der Kontrollgruppe leichte (ggf. subklinische) grippale Infekte aufgetreten sind (Abb. 8). Postuliert man diesen Sachverhalt, dann könnte argumentiert werden, dass durch die Milch-Galaktooligosaccharide tatsächlich entzündungshemmende Eigenschaften ausgelöst werden, weil dort IL6 nicht angestiegen ist und dies als eine Prävention von grippalen Infekten gedeutet werden könnte. Dieses sollte aber in einer unabhängigen Untersuchung zunächst weiter untersucht werden.

In der dritten Interventionsstudie wurden die in TP4.4 identifizierten Ernährungsmuster untersucht. Dabei wurde in der Interventionsgruppe folgende Ernährungsempfehlung gegeben:

Verzehrt werden sollen:
- Frühstückscerealien (z.B. Müsli, Getreideflocken, etc)
- Vegetarische Speisen (Milchprodukte, Tofu-/Sojaprodukte) und vegetarische Brotaufstriche (nicht tierische Brotbeläge: z.B. pflanzliche Brotaufstriche, vegetarische Pasten)
- Butter statt Margarine
- Fisch
- Vegetarische Speisen

Vermieden werden sollten:

- Softdrinks
- Fleisch- und Fleischprodukte

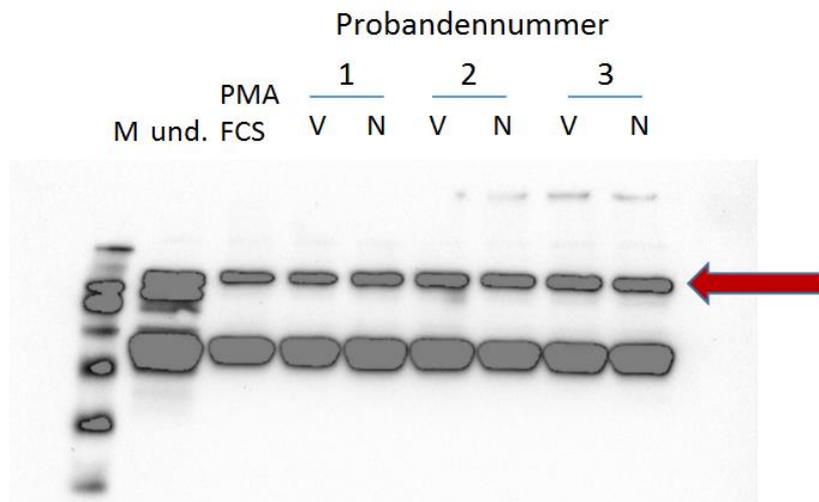


Abb. 7: *In trans* Analysen in den Interventionsstudien. Exemplarisch sind die Ergebnisse von 3 Probanden gezeigt, die mit dem Milch-Oligopeptid versorgt wurden. Wie man erkennt führt die Inkubation von THP1 Monozyten mit Probanden Serum nicht zu einer Veränderung der NF-kB Aktivierung (V=vorher, N=nacher).

Die Patienten wurden dann wie in den ersten beiden Interventionen betreut und es wurden Serum Proben für die Bestimmung des Biomarkers IL-6 und für die *in trans* Analysen entnommen. Obwohl sich bei den Milch-Oligopeptiden und den Milch-Galaktosacchariden jeweils ein Trend zu einer anti-inflammatorischen Wirkung zeigte (s. o.), konnten wir bei der Intervention mit den Ernährungsmustern leider keinerlei Effekt auf das Immunsystem nachweisen (Abb. 9).

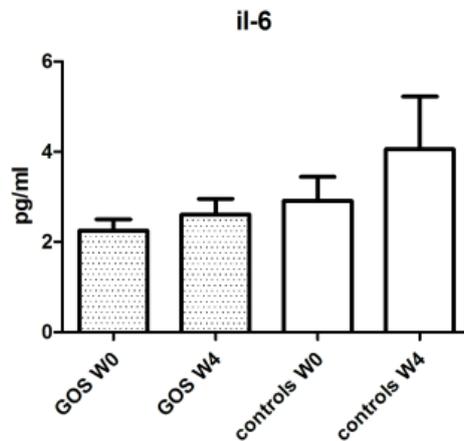


Abb. 8: Interleukin 6 Spiegel vor und nach der Intervention mit GOS (Milch-Galaktooligosaccharide)

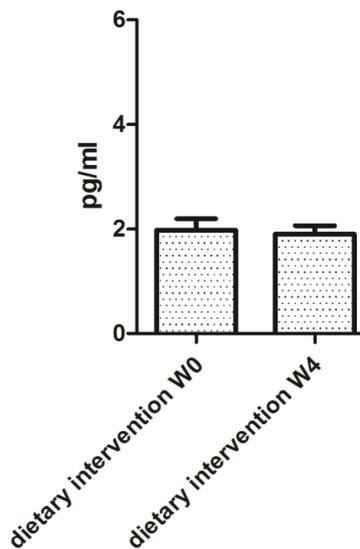


Abb. 9: Interleukin 6 Spiegel vor und nach der Ernährungsmuster Intervention

[3] Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit und [4] voraussichtlicher Nutzen:

Die im Rahmen des FoCus Projektes etablierte W2 Professur für klinische Ernährungsmedizin sowie die große Kohorte KIK werden zukünftig eine besondere Infrastruktur darstellen, um translationale Forschung in der Ernährungsmedizin auf einem hohen wissenschaftlichen Niveau international sichtbar in Kiel zu betreiben. Dies stellt eine besondere Form der Nachhaltigkeit dar und ist wohl der

größte zukünftige Nutzen des FoCus Verbundprojektes. Zur Etablierung der Professur und zum Aufbau der Kohorte waren die finanziellen Mittel in der Art notwendig, wie sie veranschlagt waren.

[4] Gewonnener Fortschritt

Wie bereits unter [4] dargestellt, haben die etablierte Professur und die aufgebaute Kohorte einen wesentlichen Nutzen und tragen wesentlich zum wissenschaftlichen Fortschritt in der translationalen Ernährungsforschung bei (drei Manuskripte mit FoCus Daten sind aktuell alleine bei *Nature Genetics* in Begutachtung). Es muss aber auch kritisch angemerkt werden, dass die humanen Interventionsstudien trotz aufwendiger Vorbereitung und Durchführung unter GMP Bedingungen nicht die gewünschten anti-inflammatorischen Effekte der generierten Milchprodukte und Ernährungsmuster nachweisen konnten, und dies trotz Verwendung innovativer Techniken wie dem *in trans* Ansatz. Der wesentliche Erkenntnisgewinn hieraus ist, dass Zellkulturexperimente, wie sie vorab mit den Milch-Oligopeptiden und Milch-Oligosacchariden durchgeführt wurden, eben nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar sind. Umso wichtiger erscheint der Aufbau der translationalen Forschungsinfrastruktur für zukünftige Ernährungsinterventionen im Humansystem.

Im Sinne des gewonnenen Fortschrittes sollte auch erwähnt werden, dass im Zuge des FoCus Verbundprojektes im TP4.1 folgende akademische Abschlüsse erzielt wurden:

1. Eine Promotion (Note 1,0)
2. 10x Masterarbeiten
3. 9x Bachelorarbeiten

[5] Veröffentlichungen:

Ji, S.G., Mr. Juran, B., Mucha, S., Mrs. Folseraas, T., Jostins, L., Melum, E., Kumasaka, N., Atkinson, E., Schlicht, E., Liu, J., Shah, T., Gutierrez-Achury, J., Boberg, K., Bergquist, A., Vermeire, S., Eksteen, B., Durie, P., Färkkilä, M., Muller, T., Schramm, C., Sterneck, M., Gotthardt, D., Ellinghaus, D., Braun, F., Teufel, A., Laudes, M., Lieb, W., Jacobs, G., Beuers, U., Weersma, R., Wijmenga, C., Marschall, H. U., Milkiewicz, P., Pares, A., Kontula, K., Chazouilleres, O., Invernizzi, P., Goode, E., Spiess, K., Moore, C., Sambrook, J., Ouwehand, W., Danesh, J., Floreani, A., Gulamhusein, A., Eaton, J., Schreiber, S., Coltescu, C., Bowlus, C., Luketic, V., Odin, J., Chopra, K., Kowdley, K., Chalasani, N., Manns, M., Srivastava, B., Mells, G., Sandford, R., Alexander, G., Gaffney, D., Chapman, R., Hirschfield, G., de Andrade, M., Rushbrook, S., Franke, A., Karlsen, T., Lazaridis, K., Weissmüller, T.: „The high comorbidity of inflammatory bowel disease in primary sclerosing cholangitis is only partly explained by shared genetic risk factors” (2016), *Nature genetics*, under review [FoCus cohort data included]

Dand, N., Mucha, S., Tsoi, L., Mahil, S., Stuart, P., Arnold, A., Baurecht, H., Burden, D., Callis-Duffin, K., Chandran, V., Das, S., Ellinghaus, D., Ellinghaus, E., Enerback, C., Esko, T., Gladman, D., Griffiths, C., Gudjonsson, J., Hoffmann, P., Homuth, G., Hüffmeier, U., Krueger, G., Laudes, M., Lieb, W., Lim, H., Löhr, S., Mrowietz, U., Müller-Nurasyid, M., Nöthen, M., Peters, A., Rahman, P., Reis, A., Reynolds, N., Rodriguez, E., Schmidt, C., Spain, S., Strauch, K., Tejasvi, T., Voorhees, J., Warren, R., Weichenthal, M., Weidinger, S., Zawistowski, M., Nair, R., Capon, F., Smith, C., Trembath, R., Abecasis, G., Elder, J., Franke, A., Simpson, M.: "Exome-wide association study reveals novel psoriasis susceptibility loci and rare protective alleles in genes contributing to type I IFN signaling" (2016), *Nature genetics*, under review [FoCus cohort data included]

J. Wang, L. B. Thingholm, J. Skieceviciënė, P. Rausch, M. Kummen, J. R. Hov, F. Degenhardt, F. A. Heinsen, M. C. Rühlemann, S. Szymczak, K. Holm, T. Esko, J. Sun, M. Pricop-Jeckstadt, S. Al-Dury, P. Bohov, J. Bethune, F. Sommer, D. Ellinghaus, R. K. Berge, M. Hübenthal, M. Koch, M. D'Amato, K. Cloppenborg-Schmidt, S. Künzel, M. Laudes, H. U. Marschall, W. Lieb, U. Nöthlings, T. H. Karlsen, J. F. Baines, A. Franke.: "Genome-wide host-microbiota association analysis of 1,812 individuals identifies vitamin D receptor genetic variation and other host factors shaping the gut microbiota" (2016), *Nature genetics*, under review [FoCus cohort data included]

S. Aparicio-Siegmund, Y. Garbers, C. M. Flynn, G. H. Waetzig, I. Gouni-Berthold, W. Krone, H. K. Berthold, M. Laudes, S. Rose-John and C. Garbers: "The IL-6-neutralizing sIL-6R/sgp130 buffer system is disturbed in patients with type 2 diabetes mellitus" (2016), *Scientific Reports*, under review [FoCus cohort data included]

Andlauer, T.F.M, Buck, D., Antony, G., Bayas, A., Bechmann, L., Berthele, A., Chan, A., Gasperi, C., Gold, R., Graetz, C., Haas, J., Hecker, M., Infante-Duarte, C., Knop, M., Kümpfel, T., Limmroth, V., Linker, R.A., Loleit, V., Luessi, F., Meuth, S.G., Mühlau, M., Nischwitz, S., Paul, F., Pütz, M., Ruck, T., Salmen, A., Stangel, M., Stellmann, J.P., Stürner, K.H., Tackenberg, B., Then, F., Bergh, Tumani, H., Warnke, C., Weber, F., Wiendl, H., Wildemann, B., Zettl, U.K., Ziemann, U., Zipp, F., Arloth, J., Weber, P., Radivojkov-Blagojevic, M., Scheinhardt, M.O., Dankowski, T., Bettecken, T., Lichtner, P., Czamara, D., Carrillo-Roa, T., Binder, E.B., Berger, K., Bertram, L., Franke, A., Gieger, C., Herms, S., Homuth, G., Ising, M., Jöckel, K.H., Kacprowski, T., Kloiber, S., Laudes, M., Lieb, W., Lill, C.M., Lucae, S., Meitinger, T., Moebus, S., Müller-Nurasyid, Nöthen, M.M.M., Petersmann, A., Rawal, R., Schminke, U., Strauch, K., Völzke, H., Waldenberger, M., Wellmann, J., Porcu, E., Mulas, A., Pitzalis, M., Sidore, C., Zara, I., Cucca, F., Zoledziewska, M., Ziegler, A., Hemmer, B., Müller-Myhsok, B.: "Novel multiple sclerosis susceptibility loci implicated in epigenetic regulation" (2016), *Science Advance*, in press [FoCus cohort data included]

F. Degenhardt, P. Niklowitz, S. Szymczak, G. Jacobs, W. Lieb, T. Menke, M. Laudes, T. Esko, S. Weidinger, A. Franke, F. Döring, S. Onur: "Genome-wide association study of serum coenzyme Q10 levels identifies susceptibility loci linked to neuronal diseases" (2016), *Hum Mol Genet.*, in press [FoCus cohort data included]

Offenbacher, S., Divaris, K., Barros, S. P., Moss, K., Marchesan, J. T., Morelli, T., Zhang, S., Kim, S., Lu Sun1, Beck, J. D., Laudes, M., Mun, M., Schaefer, A. S., North, K. E.: "Genome-wide association study of biologically-informed periodontal complex traits offers novel insights into the genetic basis of periodontal disease" (2016), *Hum Mol Genet.*, in press [FoCus cohort data included]

A. Fischer, S. Onur, P. Niklowitz, T. Menke, M. Laudes, F. Döring: "Coenzyme Q10 redox state predicts the concentration of c-reactive protein (CRP) in a large Caucasian cohort" (2016), *Biofactors*, 42(3):268-76

Schulte, D. M., Paulsen, K., Türk, K., Freitag-Wolf, S., Müller, N., Zeuner, R., Schröder, J. O., Lieb, W., Franke, A., Nikolaus, S., Mrowietz, U., Gerdes, S., Schreiber, S., Laudes, M.: Small dense LDL

cholesterol is a cardiovascular risk factor in several chronic inflammatory diseases”, (2016), under review [FoCus cohort data included]

Heinsen, F.A., Fangmann, D., Müller, N., Schulte, D. M., Rühlemann, M. C., Türk, K., Settgast, U., Lieb, W., Baines, J. F., Schreiber, S., Franke, A., Laudes, M.: „Dietary and weight loss effects on human gut microbiome diversity and metabolism”, (2016), under review [FoCus cohort data included]

Müller, N., Schulte, D. M., Türk, K., Freitag-Wolf, S., Hampe, J., Rose-John, S., Zeuner, R., Schröder, J. O., Gouni-Berthold, I., Berthold, H., Krone, W., Schreiber, S., Laudes, M.: „IL-6 blockade by monoclonal antibodies inhibits apolipoprotein (a) expression and lipoprotein (a) synthesis in humans“, (2015), *J. Lipid. Res.*, 56: 1034-1042 [FoCus cohort data included]

Schulte, DM., Kragelund, K., Müller, N., Elke, G., Titz, A., Schädler, D., Schumacher, J., Weiler, H., Bewig, B., Schreiber, S., Laudes, M.: The wnt5a/sFRP5 system is dysregulated in human sepsis“ (2015), *Clin. Exp. Immunol.*, 180: 90-7 [FoCus cohort data included]

Hagen, I., Schulte DM., Müller N., Martinsen, J., Türk, K., Heederich, J., Neumann, K., Schreiber, S., Laudes, M.: “sRAGE as a potential biomarker to predict weight loss and improvement of insulin sensitivity by a very low calorie diet of obese human subjects”, (2015), *Cytokine*, 73: 265-269 [FoCus cohort data included]

Onur, S., Niklowitz, P., Jacobs, G., Lieb, W., Laudes, M., Menke, T., Döring, F. „Determination of the Coenzyme Q10 status in a large Caucasian study population” (2015), *Biofactors*, 41: 211-221 [FoCus cohort data included]

Demetrowitsch, T. J., Petersen, B., Keppler, J.K., Koch, A., Schreiber, S., Laudes, M., Schwarz, K.: „Validation of a QC-approach for a large scale human urine-metabolomic study of 3360 samples conducted in 7 experimental batches with LC-QTOF-MS” (2015), *Bioanalysis*, 7: 103-112. [FoCus cohort data included]

Koch, M., Borggreffe, J., Schlesinger, S., Barbaresko, J., Groth, G., Jacobs, G., Lieb, W., Laudes, M., Müller, M. J., Bosy-Westphal, A., Heller, M., Nöthlings, U.: “Association of a lifestyle index with MRI-determined liver fat content in a general population study” (2015), *J. Epidemiol. Community Health*, pii: jech-2014-204989 [FoCus cohort data included]

Schulte, DM., Kragelund, K., Müller, N., Elke, G., Titz, A., Schädler, D., Schumacher, J., Weiler, H., Bewig, B., Schreiber, S., Laudes, M.: The wnt5a/sFRP5 system is dysregulated in human sepsis“ (2015), *Clin. Exp. Immunol.*, 180:90-7 [FoCus cohort data included]

Henning C.H.C.A., Zarnekow N., Hedtrich J., Stark S., Türk K., Laudes, M. „ Identification of direct and indirect social network effects in the pathophysiology of insulin resistance in obese human subjects”, (2014) *PLoS one*, 9:e93860 [FoCus cohort data included]

Müller, N., Döring, F., Klapper, M., Neumann, K., Schulte, D. M., Türk, K., Schröder, J. O., Zeuner, R. A., Schreiber, S., Laudes, M. „Interleukin-6 and Tumor necrosis factor- α differentially regulate lincRNA transcripts in cells of the innate immune system in vivo in human subjects with rheumatoid arthritis“ (2014), *Cytokine*, 68:65-68. [FoCus cohort data included]

Müller, N., Hillebrand, S., Schulte, D. M., Türk, K., Neumann, K., Hampe, J., Schafmayer, C., Brosch, M., von Schönfels, W., Ahrens, M., Gutschow, C., Zeuner, R. A., Schröder, J. O., Blüher, M., Schreiber, S., Laudes, M. “B-lymphocyte stimulator (BLyS) is expressed in human adipocytes in vivo and is related to obesity but not to insulin resistance”, (2014) *PLoS one*, 9:e94282 [FoCus cohort data included]

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel AgroClustEr: FoCus – Food Chain Plus – Gesundheitliche Bewertung und Konsumentenverhalten Teilprojekt 4.1 – HealthKik: Anti-inflammatorische Wirksamkeit von Ernährungsmustern und funktionalisierten Milchprodukten beim Menschen	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Laudes, Matthias	5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.03.2016
	6. Veröffentlichungsdatum September 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 18
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 20
	14. Tabellen
	15. Abbildungen 9
16. Zusätzliche Angaben -/-	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) -/-	
18. Kurzfassung Im Rahmen des TP4.1 des FoCus Verbundprojektes wurde (1) die Kieler Interventionskohorte mit n=2000 Individuen kontinuierlich aufgebaut, (2) eine Interventionsplattform für ernährungsmedizinische und lebensmitteltechnologische Interventionsstudien etabliert und (3) es wurden 3 humane Interventionen mit Probanden aus der KIK in der Interventionsplattform erfolgreich durchgeführt. Ziel war es, Ernährungsmuster und funktionelle Milchprodukte zu etablieren, die eine anti-inflammatorische Wirkung beim Menschen entfalten. Aus diesem Grunde wurden die Interventionen bei Risikopatienten durchgeführt, die im Rahmen einer Adipositas eine chronische Entzündung (low-grade Inflammation) aufwiesen. Mit Hilfe so genannter in-trans Ansätze wurden zudem die molekularen Mechanismen der Entzündungshemmung im Zellkulturexperiment überprüft. In diesen Interventionen zeigten die Ernährungsmuster keine anti-inflammatorische Effekte, wohl aber wiesen einzelne Milchkomponenten Effekte auf das Immunsystem vor. Im Rahmen des TP4.1 wurden eine Promotion (Note 1,0), zehn Masterarbeiten und neun Bachelorarbeiten erfolgreich abgeschlossen. Bis zum aktuellen Zeitpunkt sind zudem 19 Publikationen mit Daten aus TP4.1 verfasst worden, wovon die Mehrzahl bereits in internationalen Fachzeitschriften veröffentlicht wurden.	
19. Schlagwörter anti-inflammatorisch, Ernährungsmuster, Milcholigopeptide, Intervention, Kohorte	
20. Verlag	21. Preis