



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Einfluss einer standardisierten, ernährungsempfehlungs-
basierten Diät auf die intestinale Mikrobiota und die
Immunantwort bei gesunden Erwachsenen“

verfasst von / submitted by

Alex Ralser, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Master of Science (MSc)

Wien, 2023 / Vienna, 2023

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Dr. Ina Bergheim

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Ina Bergheim bedanken. Vielen Dank für die Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe und die engmaschige wissenschaftliche Betreuung bei der Erstellung der Masterarbeit. Danke für Ihre lösungsorientierte Herangehensweise, als Versuche im Labor nicht immer auf Anhieb funktioniert haben, die schnellen Rückmeldungen per Email und die zahlreichen Tipps und Ratschläge.

Weiters möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Amélia Camarinha Silva vom Fachgebiet Mikrobielle Ökologie bei Nutztieren (460 m) an der Universität Hohenheim bedanken. Vielen Dank für die Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe als Praktikant im Rahmen der Erstellung der Masterarbeit und für die spannenden und äußerst lehrreichen Einblicke in die faszinierende Welt der Mikrobiomforschung. Bedanken möchte ich mich auch bei all Ihren Mitarbeiter*innen, sowie bei Frau Prof. Dr. Jana Seifert und Ihren Mitarbeiter*innen für Ihre große Hilfsbereitschaft und die schöne Zeit in Hohenheim.

Bedanken möchte ich mich auch bei Anja Baumann, Annette Brandt, Victor Sánchez, Kerstin Schweiger, Katharina Burger, Maximilian Wodak, Katja Csarmann, Franziska Kromm, Beate Gärtner, Patricia De Oliveira Prada und Haktan Bozkir. Danke, dass Eure Tür bei Fragen oder Unklarheiten immer offen stand. Ein besonders großer Dank gilt Raphaela Staltner, die mich mit unendlich viel Energie und stets einer positiven Einstellung bei den Versuchen im Labor und bei den Auswertungen der Daten intensiv unterstützt hat. Ich habe das sehr geschätzt. Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Kommiliton*innen, mit welchen ich zusammen viel Zeit im Labor verbracht habe. Danke für den gemeinsamen Austausch und die Unterstützung.

Ein weiterer großer Dank gilt meiner Familie, meinen Freund*innen und allen Menschen, die mich auf verschiedene Weise während meines Studiums unterstützt haben und mir Rückhalt gegeben haben. Besonders bedanken möchte ich mich bei Carla und Abiodun für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

TABELLENVERZEICHNIS.....	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 ERNÄHRUNGSEMPFEHLUNGEN	1
1.1.1 Historische Entwicklung.....	1
1.1.2 Internationale Ernährungsempfehlungen	3
1.1.3 Ernährungsempfehlungen in Österreich, Deutschland und der Schweiz.....	4
1.2 INTERAKTION ZWISCHEN INTESTINALER MIKROBIOTA UND IMMUNSYSTEM	6
1.2.1 Entwicklung und Aufbau der intestinalen Mikrobiota	6
1.2.2 Die intestinale Mikrobiota, die Darmbarriere und das Immunsystem: Toll-like-Rezeptoren.....	8
1.3 EINFLUSS DER ERNÄHRUNG AUF DIE INTESTINALE MIKROBIOTA UND DAS IMMUNSYSTEM BEI GESUNDEN ERWACHSENEN.....	10
1.4 FRAGESTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT	13
2 MATERIAL	14
2.1 16S rRNA SEQUENZIERUNG	14
2.1.1 DNA-Extraktion aus Stuhlproben	14
2.1.2 Erstellung der Sequenzierungsbibliothek.....	14
2.1.3 Normalisierung der PCR-Produkte	15
2.2 ANALYSE DER IMMUNANTWORT	15
2.2.1 Stimulation von PBMCs mit LTA	15
2.2.2 Messung von IL-1 β -, IL-6-, TNF- α	16
2.2.3 Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	17
2.2.4 Software zur bioinformatischen Auswertung der Sequenzierungsdaten	18
2.2.5 Software zur allgemeinen Ergebnisauswertung.....	18
3 METHODEN	19
3.1 HUMANE INTERVENTIONSSTUDIE	19
3.2 ANALYSE DER MIKROBIOTA.....	20
3.2.1 16S rRNA Sequenzierung.....	20
3.3 BIOINFORMATISCHE ANALYSE DER ILLUMINA AMPLICON SEQUENZIERUNGSDATEN	22
3.4 ANALYSE DER IMMUNANTWORT	25
3.4.1 Herstellung des Zellkulturmediums	26
3.4.2 Auftauen der mononukleären Zellen des peripheren Blutes	26

3.4.3	<i>Berechnung der Zellanzahl</i>	26
3.4.4	<i>Stimulation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes mit Lipoteichonsäure</i>	27
3.4.5	<i>Abnahme des Zellüberstandes</i>	28
3.4.6	<i>Messung von Interleukin-1β, Interleukin-6 und Tumornekrosefaktor-α</i>	29
3.5	STATISTISCHE AUSWERTUNG	31
4	ERGEBNISSE	32
4.1	KALORIEN- UND NÄHRSTOFFAUFNABME SOWIE CHARAKTERISTIKA DER STUDIENTEILNEHMER	32
4.2	EINFLUSS EINER KURZFRISTIGEN, ISOKALORISCHEN ERNÄHRUNGSUMSTELLUNG HIN ZU EINER GESUNDEN ERNÄHRUNG AUF KLINISCH CHEMISCHE PARAMETER: ALANIN-AMINO-TRANSFERASE, ASPARTAT-AMINO-TRANSFERASE, HARNSÄURE.....	34
4.3	EINFLUSS EINER KURZFRISTIGEN, ISOKALORISCHEN ERNÄHRUNGSUMSTELLUNG HIN ZU EINER GESUNDEN ERNÄHRUNG AUF DIE ZUSAMMENSETZUNG DER INTESTINALEN MIKROBIOTA	37
4.4	EINFLUSS EINER KURZFRISTIGEN, ISOKALORISCHEN ERNÄHRUNGSUMSTELLUNG HIN ZU EINER GESUNDEN ERNÄHRUNG AUF DIE IMMUNANTWORT: STIMULATIONSEXPERIMENT VON MONONUKLEÄREN ZELLEN DES PERIPHEREN BLUTES MIT LIPOTEICHONSÄURE	41
4.5	EINFLUSS EINER KURZFRISTIGEN, ISOKALORISCHEN ERNÄHRUNGSUMSTELLUNG HIN ZU EINER GESUNDEN ERNÄHRUNG AUF MARKER DER DARMBARRIEREFUNKTION: INTESTINAL-FATTY ACID BINDING PROTEIN, CLUSTER OF DIFFERENTIATION 14, TOLL-LIKE REZEPTOR-2 LIGANDEN.....	45
5	DISKUSSION	50
5.1	EINFLUSS EINER KURZFRISTIGEN, ISOKALORISCHEN ERNÄHRUNGSUMSTELLUNG HIN ZU EINER GESUNDEN ERNÄHRUNG AUF DIE INTESTINALE MIKROBIOTA	50
5.2	ERNÄHRUNGSUMSTELLUNG, INTESTINALE MIKROBIOTA UND BAKTERIELLES TOXIN ALS MÖGLICHE FAKTOREN FÜR DIE EFFEKTE AUF KLINISCH CHEMISCHE PARAMETER, DIE DARMBARRIEREFUNKTION UND DIE STIMULIERBARKEIT VON IMMUNZELLEN.....	51
6	SCHLUSSFOLGERUNG	58
7	ZUSAMMENFASSUNG	59
8	SUMMARY	61
9	LITERATURVERZEICHNIS	62
10	ANHANG	71
11	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des Nährmediums für PBMCs.....	26
Tabelle 2: Zusammensetzung der Zellsuspension	27
Tabelle 3: Konditionen für die qPCR der ProQuantum Immunoassay Kits	30
Tabelle 4: Ausgangs-Charakteristika der Studienteilnehmer vor Interventionsbeginn.....	32
Tabelle 5: Auswertung der zwei 24 Stunden Recalls im Vergleich zur standardisierten Ernährung.....	33

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ernährungspyramiden und -kreis der einzelnen D-A-CH-Gesellschaften	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung der mikrobielle Besiedelung, des pH-Werts und des pO ₂ in den Segmenten des GITs	7
Abbildung 3: Bindung von LTA an TLR-2.....	10
Abbildung 4: Darstellung des Studiendesigns.....	19
Abbildung 5: Analyse der intestinalen Mikrobiota	22
Abbildung 6: Flussdiagramm zum Vorgang bei der bioinformatischen Analyse der Sequenzierungsdaten mit QIIME2.....	24
Abbildung 7: Analyse der Immunantwort.....	25
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Versuchsbedingungen des PBMCs- Stimulationsexperiments eines Probanden.....	28
Abbildung 9: ProQuantum Immunoassay Kits Invitrogen™.....	29
Abbildung 10: Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung bei einem repräsentativen Probanden auf die ALT-Aktivität	34
Abbildung 11: Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung bei einem repräsentativen Probanden auf die AST-Aktivität	35
Abbildung 12: Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung bei einem repräsentativen Probanden auf den Harnsäurespiegel.....	36
Abbildung 13: Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung bei gesunden Männern auf klinisch chemische Parameter	37
Abbildung 14: Relative Häufigkeit in % der Bakterienfamilien von Studienteilnehmer 8 vor und nach den Ernährungsinterventionen	38
Abbildung 15: Shannon entropy Plot von Studienteilnehmer 8.....	39
Abbildung 16: Relative Häufigkeit in % der Bakterienfamilien von Studienteilnehmer 16 vor und nach den Standardisierungen.	40
Abbildung 17: Shannon entropy Plot von Studienteilnehmer 16.....	40

Abbildung 18: Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung bei einem repräsentativen Probanden auf die TNF- α Sekretion von PBMCs stimuliert mit und ohne LTA in Zellmedium (10 $\mu\text{g/ml}$)	42
Abbildung 19: Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung bei einem repräsentativen Probanden auf die IL-1 β Sekretion von PBMCs stimuliert mit und ohne LTA in Zellmedium (10 $\mu\text{g/ml}$).....	43
Abbildung 20: Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung bei einem repräsentativen Probanden auf die IL-6 Sekretion von PBMCs stimuliert mit und ohne LTA in Zellmedium (10 $\mu\text{g/ml}$).....	44
Abbildung 21: Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung bei einem repräsentativen Probanden auf die TNF- α -, IL-1 β - und IL-6-Sekretion von PBMCs stimuliert mit und ohne LTA in Zellmedium (10 $\mu\text{g/ml}$)	45
Abbildung 22: Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung bei einem repräsentativen Probanden auf die I-FABP Konzentration im Serum.	46
Abbildung 23: Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung bei einem repräsentativen Probanden auf die CD14 Konzentration im Serum	47
Abbildung 24: Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung bei einem repräsentativen Probanden auf TLR-2 Liganden	48
Abbildung 25: Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung bei gesunden Männern auf Parameter der Darmbarrierefunktion.....	49
Abbildung 26: Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung bei gesunden Männern auf die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota	72

Abkürzungsverzeichnis

AVS	Amplicon sequence variant
D-A-CH	Deutschland-Österreich-Schweiz
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FBS	Fetales bovines Serum
GIT	Gastrointestinaltrakt
HEI	Healthy eating index
IECs	Intraepithelial cells
LTA	Lipoteichonsäure
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
NCDs	Non communicable diseases
OEGE	Österreichische Gesellschaft für Ernährung
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
PCoA	Principal coordinate analysis
PLATM	Proximity ligation assay
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PRRs	Pattern recognition receptors
QIIME2	Quantitive Insights Into Microbial Ecology 2
sCD14	Soluble cluster of differentiation 14
SCFAs	Short chain fatty acids
SGE	Schweizerische Gesellschaft für Ernährung
SIgA	Sekretorische Immunglobuline A
SNPs	Single nucleotide polymorphisms
TRIF	TIR-Domain-containing-Adapter-inducing Interferon-β

1 Einleitung

1.1 Ernährungsempfehlungen

1.1.1 Historische Entwicklung

Die historische Entwicklung der Empfehlungen zur Nährstoffzufuhr ist seit jeher mit der Geschichte der Ernährung und den wirtschaftlichen Gegebenheiten einzelner Länder eng verknüpft. Die Entdeckung der präventiven Wirkung von Zitrusfrüchten im Jahr 1753 gegen Skorbut kann als eine der ersten Ernährungsempfehlungen betrachtet werden [1]. Ökonomische, soziale und politische Ereignisse sowie neu gewonnene wissenschaftliche Erkenntnisse aus der naturwissenschaftlichen Forschung bildeten wiederholt den Grundstein für den Anstoß zur Reformation von Ernährungsempfehlungen [2]. Primär zielten die ersten Nährstoffempfehlungen darauf ab, die Arbeitskraft der unteren sozialen Bevölkerungsschichten aufrechtzuerhalten und somit die ökonomische Stabilität eines Landes fortlaufend zu sichern [3]. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts lösten die katastrophalen Folgen des ersten Weltkrieges und die nachfolgende Wirtschaftskrise eine Neukonzeptionierung der Ernährungsempfehlungen in Europa und den Vereinigten Staaten von Amerika aus, welche den heutigen Empfehlungen für die Nährstoffzufuhr nahekommen. Diese zielten darauf ab, die Gesundheit der Allgemeinbevölkerung zu erhalten bzw. zu verbessern [4]. Die weitere Entwicklung und Optimierung der Empfehlungen wurden von den USA geprägt und vorangetrieben [1]. Im Jahre 1943 erschien die erste Fassung der „Recommended Dietary Allowances“ die besagte, wie hoch der tägliche Nährstoffbedarf eines gesunden Menschen ist. Das Landwirtschaftsministerium der USA veröffentlichte 1992 die erste Lebensmittelpyramide. Diese sollte darstellen, in welchem Ausmaß bestimmte Lebensmittelgruppen konsumiert werden sollten [5]. Lebensmittel, welche die Grundlage der täglichen Ernährung bilden, stehen weiter unten in der Pyramide. Jene Lebensmittelgruppen, welche gelegentlich konsumiert werden sollten, werden in der Pyramide weiter oben abgebildet [1], [2]. Abbildung 1 zeigt die aktuellen lebensmittelbasierten Empfehlungen in Österreich, Deutschland und der Schweiz.

Während die Ernährungsempfehlungen am Ende des 20. Jahrhunderts die Quantität der einzelnen Nährstoffe in den Vordergrund stellten und einzelne Nährstoffe wie gesättigte Fettsäuren oder Cholesterin betonten, kam es in den letzten zwei Jahrzehnten in der Ernährungs-

wissenschaft zu einem Richtungswechsel [2]. Lebensmittel- und lebensstilbasierte Empfehlungen rückten vermehrt in den Vordergrund. Ernährungsmuster, in denen kulturelle und ökologisch nachhaltige Aspekte integriert wurden, hielten Einzug in den Empfehlungen einiger Ernährungsfachgesellschaften [6]. Beispielsweise fordert die EAT-Lancet Kommission in ihrer Stellungnahme zu nachhaltiger und gleichzeitig gesundheitsfördernder Ernährungssysteme eine Transformation des globalen Ernährungs- und Lebensmittelsystems, um einerseits die Bevölkerungsgesundheit zu verbessern und andererseits die nachhaltigen Entwicklungsziele „Sustainable Development Goals“ zu erreichen [7], [6]. Studienergebnisse geben Hinweise darauf, dass die Empfehlungen der Deutschland-Österreich-Schweiz (D-A-CH)-Gesellschaften den Aspekt Nachhaltigkeit in ihren Empfehlungen bereits mitberücksichtigen [8].

Das Hauptziel von Ernährungsempfehlungen ist es der Bevölkerung eine Orientierung hinsichtlich einer ausgewogenen, bedarfsgerechten Ernährung zu geben [9]. Die ausreichende Versorgung von Nährstoffen bei Säuglingen, Kleinkindern, Kindern, Jugendlichen, Erwachsenen, Schwangeren, Stillenden und älteren Menschen kann dazu beitragen, deren körperliche und psychische Gesundheit, Leistungsfähigkeit und damit Lebensqualität weiterzuentwickeln, zu erhalten und wenn möglich zu verbessern [10], [11]. Eine adäquate Nährstoffversorgung kann nährstoffabhängige Mangelkrankungen sowie Mangelsymptome vorbeugen, das Risiko einer Unter- bzw. Überversorgung mit Nährstoffen reduzieren, Körperreserven anlegen und somit einen kurzfristigen höheren Nährstoffbedarf ausgleichen [10], [11]. Zudem zielen die Ernährungsempfehlungen darauf ab, das Risiko für non communicable diseases (NCDs) (nicht übertragbare Erkrankungen) wie beispielsweise Adipositas, Typ 2 Diabetes, Metabolisches Syndrom, Herz-Kreislauferkrankungen und ernährungsmitbedingte Tumorerkrankungen, wie z. B. kolorektales Karzinom, zu reduzieren [10], [12], [13]. Neben den Ernährungsmustern und lebensmittelbasierten Empfehlungen bilden quantitative Angaben wie empfohlene Zufuhrwerte, Schätzwerte und Richtwerte nach wie vor die Grundlage für Ernährungsforschung und -lehre, sowie für die Translation der Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr in verständliche, effektive und einfach umsetzbare Public Health Maßnahmen, um die Gesundheit und Lebensqualität der Allgemeinbevölkerung langfristig zu gewährleisten [14].

1.1.2 Internationale Ernährungsempfehlungen

Die Erstellung und Implementation von lebensmittelbasierten Ernährungsempfehlungen erforderten neben den wissenschaftlichen Erkenntnissen und der Evidenz über die physiologischen Wirkungen von Nährstoffen die Berücksichtigung von sozialen, ökonomischen und kulturellen Gegebenheiten in den jeweiligen Nationen. Die richtige Wahl von spezifischen Lebensmitteln im Rahmen von Empfehlungen ist aufgrund von saisonalen Schwankungen, begrenztem Zugang zu frischen Lebensmitteln vieler Bevölkerungsschichten und Preisvolatilitäten komplex [15].

Laut Hereforth et al. existieren global 90 lebensmittelbasierte Ernährungsempfehlungen (Stand 2019). Dabei sind zahlreiche Parallelen zu den lebensmittelbasierten Empfehlungen der D-A-CH-Gesellschaften erkennbar: Der Konsum von Gemüse, Obst, komplexen Kohlenhydraten, Leguminosen und die maßvolle Ergänzung des Speiseplans mit tierischen Produkten wird in allen Empfehlungen erwähnt. Die Reduktion der Salz-, Zucker- und Fettaufnahme wird ebenso berücksichtigt. Außerdem wird in den Empfehlungen darauf hingewiesen, dass die angebotene Lebensmittelvielfalt bestmöglich ausgenutzt werden soll, um das Risiko einer einseitigen Ernährung zu verringern [16], [17].

Empfehlungen zur Aufnahme von Fleisch sind kontrovers. 11 % (Deutschland, Österreich, Schweiz, Schweden, Kroatien, Bulgarien, Kanada, Jamaika, Kenia, Philippinen, Thailand, Neuseeland) der Empfehlungen all jener berücksichtigen laut Hereforth et al. die Art von Fleisch und unterscheiden zwischen verarbeiteten und unverarbeiteten Fleischprodukten [17]. Milch- und Milchprodukte werden nicht von allen Fachgesellschaften als eigene Kategorie behandelt und werden zum Teil als alternative Proteinquelle vorgeschlagen [17]. Ebenso wird die lebensmittelbasierte Zufuhrempfehlung von Fett unterschiedlich gehandhabt. Zahlreiche Empfehlungen setzten hierbei auf die Reduktion von spezifischen Fetten oder die Gesamtfettaufnahme, während die Qualität der Fette in grafischen Abbildungen teilweise außen vorgelassen wird [17], [18].

Unterschiede in den lebensmittelbasierten Empfehlungen sind auch im Sinne der Nachhaltigkeit erkennbar. Modellrechnungen geben Hinweise darauf, dass neukonzeptionierte und an die aktuellen, weltweiten Herausforderungen angepasste Ernährungssysteme das Potential haben, die menschliche Gesundheit positiv zu beeinflussen und gleichzeitig nachhaltig und ressourcenschonend sein können [6]–[8], [19]. Laut Fischer & Garnett berücksichtigen nur vier von 90 untersuchten lebensmittelbasierten Empfehlungen explizit den Faktor Nachhaltigkeit, obwohl Ernährungsfachgesellschaften zunehmend damit konfrontiert werden

[19]. Es wird diskutiert, dass durch die Implementierung von Nachhaltigkeit in lebensmittelbasierten Empfehlungen Ernährungssysteme und somit auch Ernährungsempfehlungen in Zukunft so gestaltet werden können, dass alle Bevölkerungsgruppen auf globaler Ebene davon profitieren, die negativen Effekte von Ernährungssystemen auf die Erde reduziert werden und die ausreichende Versorgung mit Makro- und Mikronährstoffen gewährleistet wird [7].

1.1.3 Ernährungsempfehlungen in Österreich, Deutschland und der Schweiz

Die Ernährungsfachgesellschaften in Österreich (OEGE), Deutschland (DGE) und der Schweiz (SGE) veröffentlichen gemeinsam die Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr unter dem Namen D-A-CH-Referenzwerte [10]. Der Zusammenschluss der Ernährungsfachgesellschaften bei der Herausgabe der Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr soll einheitliche und evidenzbasierte Referenzwerte für den deutschsprachigen Raum zum Ziel haben. Die Zusammenarbeit von Ernährungsexpert*innen der drei Länder soll zudem die Kooperation der drei Nationen in der ernährungswissenschaftlichen Forschung stärken und der Ernährungsforschung als Informationsgrundlage dienen [10], [11]. Die Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr beinhalten Mengenbeschreibungen für die Zufuhr von Makro- und Mikronährstoffen. Abhängig von der aktuellen wissenschaftlichen Evidenz für den jeweiligen Nährstoff werden die Angaben als empfohlene Zufuhr, Schätzwerte oder Richtwerte angegeben. Diese Referenzwerte werden von den D-A-CH-Gesellschaften in lebensmittelbasierte Empfehlungen umgesetzt, sollen der Bevölkerung als Orientierung dienen und geben Aufschluss darüber, welche Lebensmittelgruppen in welchem Ausmaß konsumiert werden sollten, um so eine ausreichende Versorgung von Makro- und Mikronährstoffen zu erreichen [11] (Abb. 1).

Die adäquate Aufnahme von Makro- und Mikronährstoffen erfordert die Aufnahme von verschiedenen Lebensmitteln. Dabei können Lebensmittel abhängig von ihrem Ursprung, ihrer Nährstoffzusammensetzung und ihrem Bedarf in Gruppen eingeteilt werden [20]. Die D-A-CH-Gesellschaften fassen Lebensmittel in sieben große Gruppen zusammen. Zu diesen Lebensmittelgruppen zählen: Getreide, Getreideprodukte und Kartoffeln; Gemüse und Salat; Obst; Milch und Milchprodukte; Fleisch, Wurst, Fisch und Eier; Öle und Fette sowie Getränke [21].



Abbildung 1: Ernährungspyramiden und -kreis der einzelnen D-A-CH-Gesellschaften. Von links nach rechts: Lebensmittelpyramide der ÖGE [22], Ernährungskreis der DGE [23], Lebensmittelpyramide der SGE [24]. Die Lebensmittelpyramiden stellen die Lebensmittelgruppen, welche die Grundlage der täglichen Ernährung bilden, weiter unten dar. Lebensmittel, welche nur gelegentlich konsumiert werden sollten, stehen in den Pyramiden weiter oben. Der DGE Ernährungskreis zeigt den idealen Anteil der Lebensmittel in Form eines Kreisdiagramms, wobei im Zentrum Wasser zur Flüssigkeitszufuhr steht. Die angegebenen Zahlen dienen als Referenz zur genaueren Beschreibung. ÖGE = Österreichische Gesellschaft für Ernährung, DGE = Deutsche Gesellschaft für Ernährung, SGE = Schweizerische Gesellschaft für Ernährung.

Im Folgenden sollen die aktuellen Empfehlungen mit Fokus auf Lebensmittelgruppen kurz zusammengefasst werden. Die Grundlage der Empfehlungen stellt die Flüssigkeitszufuhr dar. Diese sollte in Form von Wasser und ungesüßten, alkoholfreien Getränken erfolgen. Mindestens 1,5 Liter Flüssigkeit sollten täglich aufgenommen werden [21]. Von Gemüse, Hülsenfrüchten und Obst sollten täglich insgesamt fünf Portionen konsumiert werden. Diese sollten aus drei Portionen Gemüse und/oder Hülsenfrüchte und aus zwei Portionen Obst bestehen [25]. Von Getreideprodukten und Kartoffeln sollten täglich 4 Portionen konsumiert werden, die Vollkornvariante bei Getreideprodukten sollte hierbei bevorzugt werden [26]. Die ÖGE und SGE empfehlen 3 Portionen Milch- und Milchprodukte pro Tag, während die DGE 2 Portionen pro Tag empfiehlt [27]–[29]. 300 g bis maximal 600 g Fleisch und Wurst pro Woche sollten nicht überschritten werden, zu bevorzugen ist helles Fleisch. Außerdem werden pro Woche zwei Portionen Fisch empfohlen, davon eine Portion fettreicher Fisch und eine Portion Seefisch. Drei Stück Eier pro Woche können die Ernährung ergänzen [18]. Der Einsatz von 10 g - 15 g Öl und 15 g - 30 g Streichfett pro Tag trägt zur Deckung des Bedarfs an Fettsäuren bei [30]. Aufgrund der hohen Energie- und der gleichzeitig geringen Nährstoffdichte sollten Süßigkeiten, Softgetränke und hochkalorische Snacks nur gelegentlich konsumiert werden. Diese Gruppen stehen in den Lebensmittelpyramiden an der Spitze [31].

1.2 Interaktion zwischen intestinaler Mikrobiota und Immunsystem

Die Ernährung und ihre potentiell positive Auswirkung auf das menschliche Wohlbefinden stehen in einem komplexen Zusammenspiel mit einem homöostatischem Verdauungssystem, welches maßgeblich von einer ausgewogenen Darmflora und einem intakten Immunsystem abhängt [32]. Im Folgenden sollen die bisherigen Erkenntnisse über die Entwicklung und des Aufbaus der intestinalen Mikrobiota kurz zusammengefasst werden.

1.2.1 Entwicklung und Aufbau der intestinalen Mikrobiota

Es wird davon ausgegangen, dass der humane Gastrointestinaltrakt (GIT) bis zu 100 Billionen Mikroorganismen beherbergt [32]–[35]. Daten geben Hinweise darauf, dass sich die mikrobielle Dichte, wie in Abbildung 2 dargestellt, im distalen Abschnitt des GITs ab dem Ileum erhöht und ihren Höhepunkt im Colon erreicht. Zudem deuten Studienergebnisse darauf hin, dass sich der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) und der pH-Wert in den verschiedenen Segmenten des GITs unterscheiden und dadurch Einfluss auf die Besiedelung der Mikroorganismen nehmen können [36]. Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass die intestinale Mikrobiota, welche sich aus Bakterien, Archaeen, Pilzen und Viren zusammensetzt, gebündelt ca. das zweihundertfache an Genen im Vergleich zum Wirtsgenom exprimiert [37]. Weitere Daten weisen auf die unterschiedlichen Lebensformen der Bakterien im Dünndarm und Colon hin: Die kommensal- (Zusammenleben von zwei Arten, wobei eine Art einen Nutzen daraus ziehen kann und die andere Art weder vom Zusammenleben profitiert noch Schaden erleidet [33]) und zum Teil mutualistisch- (Zusammenleben von zwei Arten, wobei beide Arten einen Nutzen daraus ziehen können [38]) koexistierenden Mikroorganismen besitzen die Fähigkeit, untereinander zu kommunizieren und Informationen in Form von chemischen Signalen an den Wirtsorganismus weiterzuleiten [33], [36]. Zudem deuten Daten darauf hin, dass Mikroorganismen im Verdauungstrakt in der Lage sind, Energie zu generieren, zu verbrauchen und zu speichern, physiologisch relevante, chemische Transformationen umzusetzen, ihren Fortbestand durch Replikation zu sichern und sich gegenseitig in ihrem Wachstum zu determinieren [34]–[36], [39]–[43].

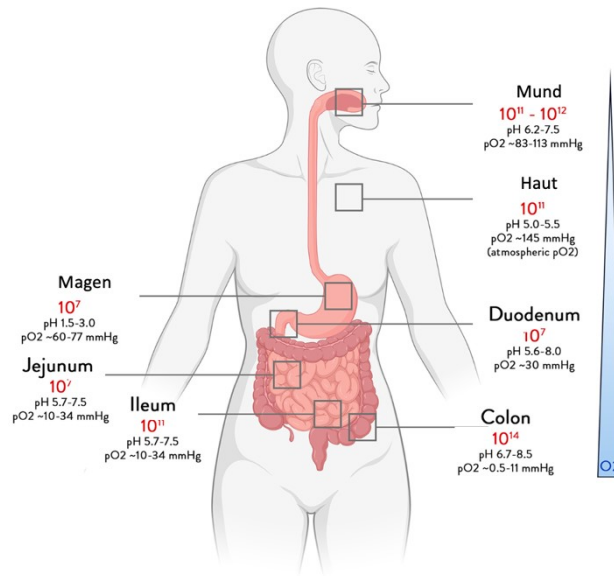


Abbildung 2: Schematische Darstellung der mikrobiellen Besiedelung, des pH-Werts und des pO₂ in den Segmenten des GITs (modifiziert nach [44]). Die mikrobielle Besiedelung steigt ab dem Magen an und erreicht im Colon ihren höchsten Wert mit ca. 10^{14} Bakterien. Der pH-Wert steigt ab dem Magen an und erreicht im Colon den höchsten Wert von bis zu 8,5. Der pO₂ reduziert sich fortlaufend in den distalen Segmenten und ist im Colon am niedrigsten. pO₂ = Sauerstoffpartialdruck.

In den letzten Jahren wurde die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota mit der Modulation von Pathogenese, Progression und der Behandlung von Erkrankungen assoziiert [45]. Es gibt Hinweise darauf, dass spezifische Mikrobiomsignaturen mit der Pathogenese von inflammatorischen und metabolischen Erkrankungen im Zusammenhang stehen und diese begünstigen [46]. Die Zusammensetzung der Mikroorganismen und deren Vielfalt wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. So wurde gezeigt, dass die Entbindungsmethode, die Art der Säuglingsnahrung und die erste feste Nahrung wesentlich den Aufbau des intestinalen Mikrobioms in den ersten Lebensmonaten beeinflussen kann. Es wird davon ausgegangen, dass Umweltfaktoren wie die Nahrungszusammensetzung und Zeitpunkt der Nahrungsaufnahme, Antibiotikaeinnahme, Medikamente, Wetter und Hygiene weitere wichtige

Ursachen für die individuell unterschiedliche Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota sind [47]. Jeder dieser Einflussfaktoren kann zudem von Individuum zu Individuum die Mikrobiota unterschiedlich stark determinieren [45], [48], [49].

1.2.2 Die intestinale Mikrobiota, die Darmbarriere und das Immunsystem: Toll-like-Rezeptoren

Die Voraussetzung für ein funktionierendes Zusammenspiel zwischen der intestinalen Mikrobiota und dem Immunsystem des Wirtes erfordert einen kontinuierlichen Austausch von Informationen in Form von biochemischen Signalen zwischen den Mikroorganismen und dem Immunsystem [34]. Dieses muss zwischen potenziell pathogenen Antigenen von Krankheitserregern und nicht-pathogenen Antigenen aus der Nahrung unterscheiden können. Es gibt Hinweise darauf, dass bestimmte Störungen, wie z. B. eine geschädigte Darmbarriere, Dysbiose (gestörte Konfiguration der Mikrobiota, welche jedoch relativ schwer zu definieren ist [50]) oder eine nicht bedarfsgerechte Ernährung die Balance zwischen intestinaler Mikrobiota und dem Immunsystem stören kann und infolgedessen zu inflammatorischen Prozessen und im weiteren Verlauf zu Erkrankungen führen kann [35].

Die intestinale Barriere setzt sich aus mikrobiellen, biochemischen, immunologischen und physikalischen Barrieren zusammen [51]. Es wird davon ausgegangen, dass die Darmbarriere eine wichtige Rolle in der Immunabwehr spielt [52]. Daten geben Hinweise darauf, dass die intestinale Mikrobiota zur Entwicklung und Ausbildung des Immunsystems beiträgt und die Aufrechterhaltung einer intakten intestinalen Barriere mitbeeinflussen kann. Beispielsweise produzieren bestimmte Bakterien, wie z. B. *Faecalibacterium prausnitzii* kurzkettige Fettsäuren „short chain fatty acids“ (SCFAs). SCFAs können von Epithelzellen als Energiesubstrat herangezogen werden können und somit die Integrität der Darmbarriere mitaufrechterhalten [53], [54]. Das Darmlumen besteht aus spezialisierten intraepithelialen Zellen (IECs) und ist Teil der physikalischen Barriere. Es gibt Hinweise darauf, dass die biochemischen und immunologischen Mechanismen der IECs, welche sich im Laufe der Evolution durch die symbiontische und mutualistische Beziehung zwischen Wirt und intestinaler Mikrobiota herausgebildet haben, zu einer intakten Darmbarriere beitragen [35]. Beispielsweise sorgen Becherzellen in der Epithelschicht für die Produktion von Glykoproteinen, welche eine Mucusschicht bilden und somit das Eindringen von Bakterien in die Epithelzellen verhindern [55]. Antimikrobielle Proteine wie Defensine, Cathelicidine und CLEC-typ Lectine, sezerniert von Epithel-, Becher- und Panethzellen, schützen ebenso vor der Anheftung von Bakterien [56]. Sekretorische Immunglobuline A (SIgA) verhindern den Eintritt von Pathogenen in die Zellen des intestinalen Epithels [57]. Studienergebnisse geben außerdem Hin-

weise darauf, dass IECs eine weitere wichtige Funktion zu einer intakten Darmbarriere leisten. Die Zellen sind durch Tight-Junction Komplexe, zu welchen beispielsweise Claudin und Occludin gehören, miteinander verbunden [61]. Diese Proteinkomplexe regulieren die Permeabilität von Wasser, Nährstoffen und Ionen [58], [59].

Bei Störungen der Darmbarrierefunktion können immunmodulierende Moleküle wie Endotoxin oder Lipoteichonsäure (LTA) in die Zirkulation gelangen [60]. Kommt es zum Übertritt von immunmodulierenden Molekülen in das Blut, wie z.B. LTA, werden diese unter anderem von sogenannten Toll-like Rezeptoren erkannt. Die zu den Musterkennungsrezeptoren oder „pattern recognition receptors“ (PRRs) gehörenden Rezeptoren erkennen allgemein vorkommende Membranstrukturen von Erregern, sogenannte „pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs) und initiieren eine Signaltransduktion, welche mit einer Immunantwort einhergeht [61], [62]. Studienergebnisse weisen darauf hin, dass verschiedene Ernährungsmuster auch die Expression von Toll-like Rezeptoren beeinflussen können [63], [64].

Zellen des Immunsystems wie mononukleäre Zellen des peripheren Blutes oder „peripheral blood mononuclear cells“ (PBMCs) verfügen über solche TLRs [65]. Bestimmte TLRs sind auf spezifische PAMPs spezialisiert, beispielsweise TLR-2. Dieser Rezeptor erkennt die PAMPs von grampositiven Bakterien wie LTA [66]. LTA kann über das Lipopolysaccharid-bindende Protein transportiert werden. Dieser Komplex wird über einen membrangebundenen, Glycosylphosphatidylinositol-(GPI) verankerten PRR, dem sogenannten soluble Cluster of differentiation 14 (CD14), erkannt [67], [68]. Wie in Abbildung 3 ersichtlich, bindet der sCD14-LTA-Komplex als Ligand an TLR-2 und es kommt zu einer Hetero-Dimerisierung mit TLR-1 oder TLR-6, um ein funktionstüchtiges Signalmolekül zu erzeugen. Die Rezeptor-Dimerisierung führt zu einer Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden. Es kommt zur Aktivierung von Adaptermolekülen wie „myeloid differentiation primary response 88“ (MyD88) und „TIR-Domain-containing Adapter-Inducing Interferon- β “ (TRIF) [69]. Beide Kaskaden führen zu ähnlichen Ergebnissen: Durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie „mitogen-activated protein kinases“ (MAPK) und im weiteren den nukleären Faktor Kappa-B (NF- κ B) kommt es zur Expression von proinflammatorischen Zytokinen, wie z. B. IL-1 β , IL-6 und TNF- α und Chemokinen und somit zu einer weitlaufenden Aktivierung des Immunsystems und zur Rekrutierung von Immunzellen [70].

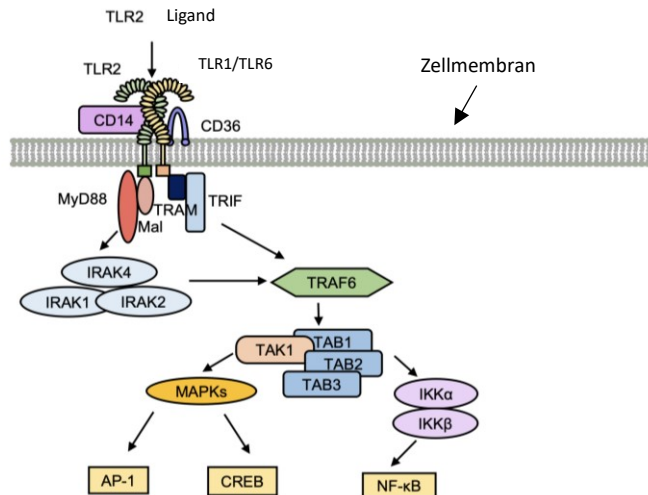


Abbildung 3: Bindung von LTA an TLR-2 (modifiziert nach [70]). Nach der Bindung von LTA an das Lipopolysaccharid-bindende Protein wird vom GIP-verankerten CD14 erkannt. Dieser Komplex bindet an TLR-2 und führt im Weiteren zur Hetero-Dimerisierung mit TLR-1 oder TLR-6. Es kommt im Weiteren zur Aktivierung von Adapterproteinen wie MyD88 oder TRIF. Dies löst unter anderem die Aktivierung von NF-κB und somit die Expression von proinflammatorischen Zytokinen aus. GIP = Glycosylphosphatidylinositol, TLR = Toll-Like-Rezeptor, MyD88 = Myeloid-differentiation primary response 88, TRIF = TIR-Domain-containing Adapter-Inducing Interferon-β, MAPK = Mitogen-activated protein kinases, NF-κB = nukleärer Faktor Kappa-B.

1.3 Einfluss der Ernährung auf die intestinale Mikrobiota und das Immunsystem bei gesunden Erwachsenen

Daten aus humanen Interventionsstudien und Untersuchungen in Tiermodellen geben Hinweise darauf, dass verschiedene Ernährungsmuster und bestimmte Nahrungsinhaltsstoffe Einfluss auf die Zusammensetzung und Diversität der intestinalen Mikrobiota nehmen können [32], [71]. Aus Zwillingstudien gibt es Hinweise, dass das Wirtsgenom durchaus die Konfiguration der intestinalen Mikrobiota mitbeeinflussen kann [47], [49], jedoch deuten Daten aus populationsbasierten Studien darauf hin, dass der Effekt der Ernährung auf die inter-individuelle Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota dem genetischen Einfluss wahrscheinlich überlegen ist [72], [73]. Beispielsweise können kurzfristige, extreme Diätinterventionen, wie der Wechsel von einer aus größtenteils tierischen Produkten zusammengesetzten Ernährung auf eine pflanzenbasierte Ernährung oder eine Veränderung im Fettgehalt der Diät zu sprunghaften Veränderungen in bakteriellen Häufigkeiten führen [74]. Es gibt Daten, welche darauf hinweisen, dass eine ballaststoffreiche (≥ 30 g Ballaststoffe pro

Tag) Ernährung die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota nicht signifikant beeinflusst [75]. Aus derselben Studie gibt es Hinweise darauf, dass eine Ernährung reich an fermentierten Lebensmitteln die Vielfalt der intestinalen Mikrobiota erhöhen kann [75]. Ergebnisse aus Tierstudien deuten darauf hin, dass eine fett- und zuckerreiche Diät in Mäusen die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota verändern kann. Dabei führte eine fett- und zuckerreiche Ernährung in den Tieren zu einer Zunahme von *Ruminococcus torques* [76]. Dieses Bakterium wird unter anderem mit der Degradation des Mucus und Entzündungsprozessen assoziiert [77]. Es gibt Hinweise darauf, dass der Austausch von einzelnen Lebensmitteln in der Ernährung von gesunden Menschen zu keinen signifikanten Veränderungen in der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota führt [32]. Demnach führte der Austausch von Weißbrot mit traditionell hergestelltem Sauerteigbrot zu keinen Veränderungen in der Bakterienzusammensetzung bei gesunden Erwachsenen [78].

Bezogen auf einzelne Nährstoffe wird eine allgemein hohe Fettaufnahme, insbesondere gesättigte Fettsäuren, mit einer tendenziell verringerten α -Diversität (bakterielle Vielfalt innerhalb einer Probe) bei Erwachsenen assoziiert [40], [79]. Eine Ernährung reich an tierischem Protein ist mit einer erhöhten Häufigkeit an *Bacteroides* assoziiert, während eine Diät reich an pflanzlichem Protein die Anzahl an kurzkettigen fettsäure-produzierenden Bakterien SCFAs erhöhen kann [80], [81]. Kohlenhydrate können, abhängig von der Art und der aufgenommenen Menge, unterschiedliche Effekte auf die intestinale Mikrobiota haben. Komplexe Kohlenhydrate und Ballaststoffe mit einem hohen Anteil an fermentierbaren Stoffen fördern teilweise die Bildung von SCFA durch Darmsymbionten, während einfache Kohlenhydrate die Produktion von SCFA tendenziell reduzieren [82]. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass die Dauer einer Ernährungsintervention oder einer Ernährungsumstellung sowie der Zeitpunkt der Nahrungseinnahme den Effekt der Ernährung auf die intestinale Mikrobiota, zumindest bei einzelnen Individuen, mitbeeinflussen kann [83]. Es wird davon ausgegangen, dass der Einfluss der Ernährung auf die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota bei gesunden Erwachsenen sehr vielfältig sein kann und sich von Individuum zu Individuum unterscheiden kann [32].

Studiendaten geben außerdem Hinweise darauf, dass weitere Nahrungsinhaltsstoffe, auf welche in dieser Arbeit nicht näher eingegangen wird, wie Mikronährstoffe, Süßstoffe, Lebensmittelzusatzstoffe und Phytochemikalien die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota ebenso mitbeeinflussen können [43]. Die Ernährungsempfehlungen der D-A-CH-

Gesellschaften und traditionelle Ernährungsmuster, wie beispielsweise die mediterrane Ernährung, enthalten im Gegensatz zu westlich geprägten Diäten mehr pflanzliche, frische Nahrungsmittel und deutlich weniger hochprozessierte Produkte [10], [84]. Daher wird davon ausgegangen, dass der Gehalt an Vitaminen, Mineralstoffen und Phytochemikalien in den lebensmittelbasierten Ernährungsempfehlungen höher ist. Daten geben Hinweise darauf, dass eine adäquate und bedarfsgerechte Nährstoffzufuhr bei der Aufrechterhaltung der Immunfunktion von gesunden Erwachsenen eine wichtige Rolle spielen kann [85]. Daten aus Humanstudien weisen darauf hin, dass fettreiche Mahlzeiten die Sekretion von IL-6 und TNF-alpha aus Leukozyten erhöhen können [86]. Es wird postuliert, dass der vermehrte Übertritt von bakteriellem Endotoxin aufgrund einer gestörten Darmbarriere durch eine fettreiche Diät die Ursache dafür sein könnte [86]. Es gibt zudem weitere Hinweise darauf, dass eine fettreiche Ernährung mit einem erhöhten Endotoxingehalt im Plasma assoziiert ist [87]. Zudem weisen Untersuchungen in Mäusen darauf hin, dass eine fettreiche Ernährungsweise die Expression von Tight-Junction Proteinen reduzieren kann und oxidativen Stress und Apoptose in IECs auslösen kann [88]. Es wird außerdem diskutiert, dass fettreiche Diäten in Mäusen die Darmbarriere durch proinflammatorische Signalkaskaden stört und die Sekretion von Zytokinen wie IL-1B, IL-5 und TNF-alpha induzieren [89]–[91].

Weitere Studiendaten geben Hinweise darauf, dass gesunde Erwachsene, welche eine Ernährung auf Grundlage von Ernährungsempfehlungen erhalten, eine geringere Expression von TLR-2 mRNA, TLR-4 mRNA und Endotoxin im Plasma aufweisen [63]. Studiendaten weisen zudem darauf hin, dass eine dreitägige Ernährung reich an Fruktose bei gesunden, normalgewichtigen Erwachsenen die mRNA Expression von TLR-2, TLR-4, MyD88 erhöhen kann [63].

Studienergebnisse deuten darauf hin, dass bestimmte Nahrungsbestandteile präventive Effekte gegen NCDs haben können [92]. Weitere Daten geben Hinweise darauf, dass ungesättigte Fettsäuren, insbesondere Omega-3-Fettsäuren, präventiv gegen Wirkungen Stoffwechselerkrankungen wirken und sich positiv auf die Proliferation von IECs auswirken [93]. Diskutiert wird, dass lösliche Ballaststoffe den glykämischen Index von Lebensmitteln reduzieren und sich positiv auf den Blutzuckerspiegel und den Stoffwechsel auswirken [94]. Es gibt Hinweise darauf, dass sich Polyphenole positiv auf die Endothelfunktion, Koagulation und oxidativen Stress auswirken und somit zur Immunfunktion beitragen können [95].

Die Beziehung zwischen Ernährung, intestinaler Mikrobiota und dem Immunsystem erfordert eine homöostatische Interaktion, um physiologische Funktionen aufrecht zu erhalten

und pathophysiologische Prozesse zu vermeiden. Dabei ist eine abgestimmte Reaktion des Immunsystems und der Darmflora auf die Ernährung die Grundvoraussetzung für Wohlbefinden, Gesundheit und Lebensqualität.

1.4 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Ernährungsempfehlungen zielen darauf ab, die Gesundheit des Großteils der Bevölkerung aufrechtzuerhalten und zu optimieren. Dadurch tragen sie mitunter zur normalen Funktion des Immunsystems bei [11]. Die Beziehung zwischen dem Immunsystem und der intestinalen Mikrobiota ist bidirektional und erfordert eine homöostatische Interaktion zwischen der Darmflora und der Immunabwehr, um physiologische Funktionen aufrechtzuerhalten [35]. Daten aus Studien geben Hinweise darauf, dass sich das Ernährungsmuster sowohl in der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota als auch in der Funktion der Immunabwehr bei gesunden Erwachsenen widerspiegeln kann [32], [80], [96], [97].

Inwiefern sich eine auf den Ernährungsempfehlungen basierte Diät auf die intestinale Mikrobiota und die Immunantwort bei gesunden Erwachsenen auswirkt, ist noch nicht vollständig geklärt. Ausgehend von diesem Hintergrund sollen folgende Fragestellungen im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden:

Welchen Einfluss hat eine wiederholte, isokalorische Standardisierung der Ernährung, in welcher sich gesunde Erwachsene nach einer empfohlenen Ernährung ernähren, auf Parametern des Immunsystems, der intestinalen Barriere und der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota? Hierbei sollen folgende Fragen erläutert werden:

- Wie wirkt sich eine wiederholte Standardisierung der Ernährung bei gesunden Personen auf die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota aus?
- Hat die Standardisierung der Ernährung einen Einfluss auf Parameter der Barrierefunktion und der Stimulierbarkeit von Immunzellen?
- Stehen diese Änderungen im Kontext mit den Veränderungen der intestinalen Mikrobiota?

2 Material

2.1 16S rRNA Sequenzierung

2.1.1 DNA-Extraktion aus Stuhlproben

Herstellerkit

FastDNA™ SPIN Kit for Soil

MP Biomedicals, Santa Ana, USA

2.1.2 Erstellung der Sequenzierungsbibliothek

Primer

1. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Primer: 27F Bifi

Eurofins Scientific SE, Luxemburg, Luxemburg

Primer: 338R

Eurofins Scientific SE, Luxemburg, Luxemburg

2. PCR

Primer: Illu1-2_B_F_XX

Eurofins Scientific SE, Luxemburg, Luxemburg

Primer: Illu rev V1-2

Eurofins Scientific SE, Luxemburg, Luxemburg

3. PCR

Primer: Index XX Primer

Eurofins Scientific SE, Luxemburg, Luxemburg

Primer: Multiplexing PCR

Eurofins Scientific SE, Luxemburg, Luxemburg

2.1.3 Normalisierung der PCR-Produkte

2.2 Analyse der Immunantwort

2.2.1 Stimulation von PBMCs mit LTA Chemikalien

DPBS (15ulbecco's phosphate-buffered saline), D8537-500 ml	Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA
Fetales Bovines Serum (FBS)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Lipoteichonsäure (LTA), Arbeitslösung: 10 µg LTA/1 ml RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA
Penicillin-Streptomycin	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
RPMI-1640 Medium, R8758-500 ml	Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA
Trizol (TRItdy G TM)	PanReac GmbH., Darmstadt, Deutschland
Trypan Blue solution T8154-20 ml	Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA

Materialien und Geräte

CO ₂ Inkubator MCO-170AIC	Panasonic Healthcare Co. Ltd, Oizumi-Machi, Japan
Deckgläser	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Neubauer-improved Zählkammer	LO- Laboroptik Ltd., Lancing, UK
Primovert Mikroskop 415510-1100-000	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Sicherheitswerkbank Heraeus HS 12/2	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Tissue Culture Platte 24 Well	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Wasserbad Type 1002 No. 106742940	Gesellschaft für Labortechnik GmbH., Burgwedel, Deutschland

Zentrifuge Centrifuge 5424 R

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.2.2 Messung von IL-1 β -, IL-6-, TNF- α

Herstellerkits

Human IL-6 Human ProQuantum Immunoassay Kit InvitrogenTM

Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

IL-1 β Human ProQuantum Immunoassay Kit InvitrogenTM

Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

TNF- α Human Human ProQuantum Immunoassay Kit InvitrogenTM

Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

Chemikalien

Antibody-conjugate A (IL-1 β /IL-6/ TNF- α)

Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

Antibody-conjugate B (IL-1 β /IL-6/ TNF- α)

Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

Antibody-conjugate Dilution Buffer

Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

Assay Dilution Buffer

Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

Ligase

Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

Mastermix

Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

Protein Standard (IL-1 β /IL-6/ TNF- α)

Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

Materialien und Geräte

CFX ConnectTM Real- Time system

Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA

DLAB Mini Zentrifuge Typ D1008

DLAB Scientific Co., Ltd., Beijing, China

Hard Shell PCR Plates 96 Well	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Microseal B PCR Plate Sealing Film	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA

2.2.3 Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte

Abfallbeutel	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Becherglas (250 ml)	Technische Glaswerke Ilmenau GmbH., Ilmenau, Deutschland
Falcon Tubes (15 ml, 50 ml)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nüm- brecht, Deutschland
Filterspitzen (1000 µl)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nüm- brecht, Deutschland
Filterspitzen (2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	
Flockeneisbereiter	ZIEGRA Eismaschinen GmbH, Isern- hagen, Deutschland
Kolbenhubpipetten (2,5 µl, 10 µl, 50 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Laborhandschuhe	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutsch- land
Laborhandschuhe	SHIELD Scientific, Bennekom, Nieder- lande
Laborstift	VWR International LLC., Radnor, USA
Laborstift	STAEDTLER Mars GmbH & Co. KG, Nürnberg, Deutschland
Pipettenspitzen (2,5 µl, 10 µl, 50 µl, 100 µl, 1000 µl)	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutsch- land
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nüm- brecht, Deutschland
Reaktionsgefäßständer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Reaktionsgefäßständer – ROTILABO®	Carl Roth GmbH. + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Schere	Laborbestand
Sequenzierung extern	Novogene UK, Cambridge, UK
Serologische Pipetten (5 ml)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Stoppuhr	Laborbestand
Styroporboxen	Laborbestand
Vortex REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge Z 216 MK	HERMLE Labortechnik GmbH., Wehingen, Deutschland
Zentrifuge Z446 K	HERMLE Labortechnik GmbH., Wehingen, Deutschland

2.2.4 Software zur bioinformatischen Auswertung der Sequenzierungsdaten

JupyterLab	Webbasiertes Interface
QIIME2 (Quantitative Insight Into Microbial Ecology 2) 2023.2	Lizenzfreies Anwendungsprogramm

2.2.5 Software zur allgemeinen Ergebnisauswertung

EBISpro Version 11.0	EBISpro, Willstätt, Detuschland
GraphPad Prism 7.0	GraphPad Software, INc., San Diego, USA
Microsoft Office 365	Microsoft Corporation, Redmon, USA
RStudio	RStudio, Boston, USA
ProQuantum App	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

3 Methoden

3.1 Humane Interventionsstudie

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Deutschen Sporthochschule Köln im Oktober 2021 genehmigt und wurde unter Einhaltung der ethischen Standards gemäß der Deklaration von Helsinki durchgeführt [98]. Die Studienteilnehmer erteilten ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung ihrer Daten im Rahmen der Untersuchungen. In der vorliegenden Arbeit wurden Proben und Daten analysiert, die im Vorfeld der Arbeit von Mitgliedern der Arbeitsgruppe in enger Kooperation mit der Deutschen Sporthochschule Köln erhoben wurden.

Die Bestimmung der ALT-Aktivität, AST-Aktivität und die Messung der Harnsäurekonzentration erfolgten in einem Routinelabor. sCD14 (OD) und I-FABP (pg/ml) wurde von Mitgliedern der Arbeitsgruppe im Vorfeld der Arbeit mittels DuoSet™ Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) gemessen. TLR-2 Liganden (OD) wurden von Mitgliedern der Arbeitsgruppe im Vorfeld der Arbeit mittels HEK293 Zellen analysiert. Im Folgenden ist das Studiendesign (Abb. 4) und der Studienablauf kurz zusammengefasst.

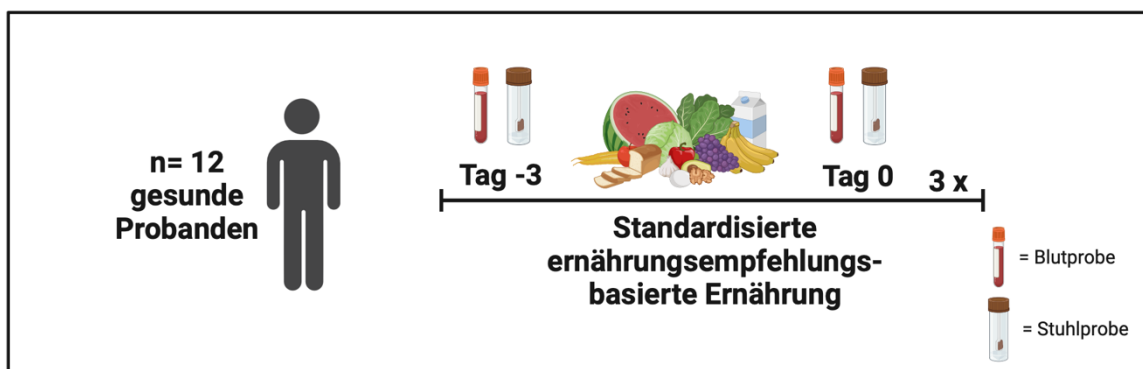


Abbildung 4: Darstellung des Studiendesigns (erstellt mit Biorender). 12 gesunde Probanden ernährten sich drei Tage lang nach einer standardisierten, ernährungsempfehlungs-basierten Ernährung. Zu Beginn der Intervention und im Anschluss an diese wurden Stuhl- und Blutproben entnommen. Insgesamt fand die Standardisierung pro Studienteilnehmer 3 mal statt.

Zur Erfassung der durchschnittlichen Energieaufnahme und der Makronährstoffverteilung der Probanden wurden zwei 24 Stunden Recalls durchgeführt. Abhängig vom individuell kalkulierten Energiebedarf wurden die Teilnehmer standardisiert und erhielten für drei Tage eine ernährungsempfehlungs-basierte, isokalorische Diät wie bei Staltner et al. [99] und Nier

et al. [63]. Die Auswertung des 24-Stunden-Recalls ist im Ergebnisteil in Tabelle 5 dargestellt. Vor (T-3) und nach (T-0) der jeweiligen standardisierten Ernährung wurden Stuhl- und venöse Blutproben abgegeben. Die Standardisierung fand an drei Zeitpunkten statt. Zwischen den drei einzelnen dreitägigen Standardisierungen lag jeweils eine Woche dazwischen. Die Studienteilnehmer wurden mittels Flyer und Mundpropaganda rekrutiert, wobei der Großteil jener Mitglieder der Deutschen Sporthochschule Köln war. Für die potenziellen Probanden galten definierte Ein- sowie Ausschlusskriterien. Beim Studienkollektiv handelte es sich um gesunde, normalgewichtige ($\text{BMI} > 18.5 \text{ kg/m}^2$ oder $< 24.9 \text{ kg/m}^2$) Erwachsene. Die Probanden waren Nichtraucher, litten weder an chronischen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, Malabsorptionsstörungen oder metabolischen Erkrankungen und ernährten sich omnivor. Die Probanden litten bis 3 Wochen vor Studienbeginn unter keinen viralen oder bakteriellen Infekten. Zudem berichteten die Studienteilnehmer Alkohol nur in moderaten Mengen (20g/Tag für Männer) zu konsumieren. Studienteilnehmer, welche diese Kriterien nicht erfüllten, wurde in die Studie nicht mitaufgenommen.

3.2 Analyse der Mikrobiota

3.2.1 16S rRNA Sequenzierung

Für die Analyse der intestinalen Mikrobiota und der Immunantwort nach einer standardisierten, ernährungsempfehlungsbasierten Diät wurden im Rahmen dieser Arbeit nur männliche Studienteilnehmer analysiert. Die 16S rRNA Sequenzierung war bereits im Vorfeld der vorliegenden Arbeit durchgeführt worden und die Schritte von der Stuhlprobenaufbereitung bis hin zur Sequenzierung sind hier nur kurz beschrieben. Die Vorgangsweise der Mikrobiota Analyse wird in Abbildung 5 zusammenfassend dargestellt.

DNA-Extraktion aus Stuhlproben

Zunächst wurde die DNA aus den Stuhlproben extrahiert [100], [101]. Hierfür wurde das kommerziell erhältliche FastDNATM SPIN Kit for Soil nach Angaben des Herstellers verwendet. Damit es zur Lyse der Zellen kommt, verwendet das Kit drei verschiedene Perlengrößen. Nach der Zugabe von Puffern und weiteren Chemikalien wurde die extrahierte DNA bei -80°C gelagert.

Messung der DNA-Konzentration

Im Anschluss an die DNA-Extraktion wurde die DNA-Konzentration gemessen. Die Quantifizierung von Nukleinsäuren aus DNA wird mit Hilfe von UV-Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt [102]. Dabei ist die Intensität der Lichtabsorption proportional zur Konzentration der in der Probe enthaltenen Nukleinsäuren [102].

Erstellung der Sequenzierungsbibliothek

Für die Erstellung der Sequenzierungsbibliothek waren insgesamt drei PCR Schritte notwendig. In der ersten PCR wurde das 16S rRNA Gen amplifiziert [103]. Mittels der zweiten PCR wurden die spezifischen Barcodes in die Forward Primer der Produkte der ersten PCR eingefügt [103]. Die dritte PCR diente dazu, den spezifischen Index in die Reverse Primer der Produkte aus der zweiten PCR einzufügen [103].

Gelelektrophorese

Nach Erstellung der Sequenzierungsbibliothek wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Diese Methode dient der Trennung von DNA-Fragmenten basierend auf deren Ladung und deren Größe [104]. Die Elektrophorese eignet sich somit für die Überprüfung der PCR Produkte [105]. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die geladenen DNA-Fragmente durch das Gel, wobei sich größere Fragmente langsamer bewegen als kleinere und diese sich auftrennen [104].

Normalisierung der PCR Produkte

Die Verwendung des SequalPrepTM Normalization Plate (96) Kit ermöglicht die Normalisierung der PCR-Produktkonzentrationen. Der Normalisierungsschritt dient dazu, Variationen in den Konzentrationen der PCR-Produkte zwischen einzelnen Proben zu korrigieren [106]. Die beschichteten Wells der Platte verfügen über eine begrenzte Bindungskapazität [107]. Dadurch können ~ 25 ng PCR-Amplikons pro Well gebunden werden. Proteine und weitere unerwünschte Bestandteile können mittels Waschschrte entfernt werden [107]. Dafür wurde nach den Angaben des Herstellers gearbeitet. Im Anschluss wurden die normalisierten PCR Produkte gepoolt und bei -20 °C gelagert.

Sequenzierung

Die Illumina Amplicon Sequenzierung der aufgereinigten, gepoolten PCR Produkte erfolgte bei der Firma Novogene mit dem Illumina Novogen Instrument für 350 bp Produkte.

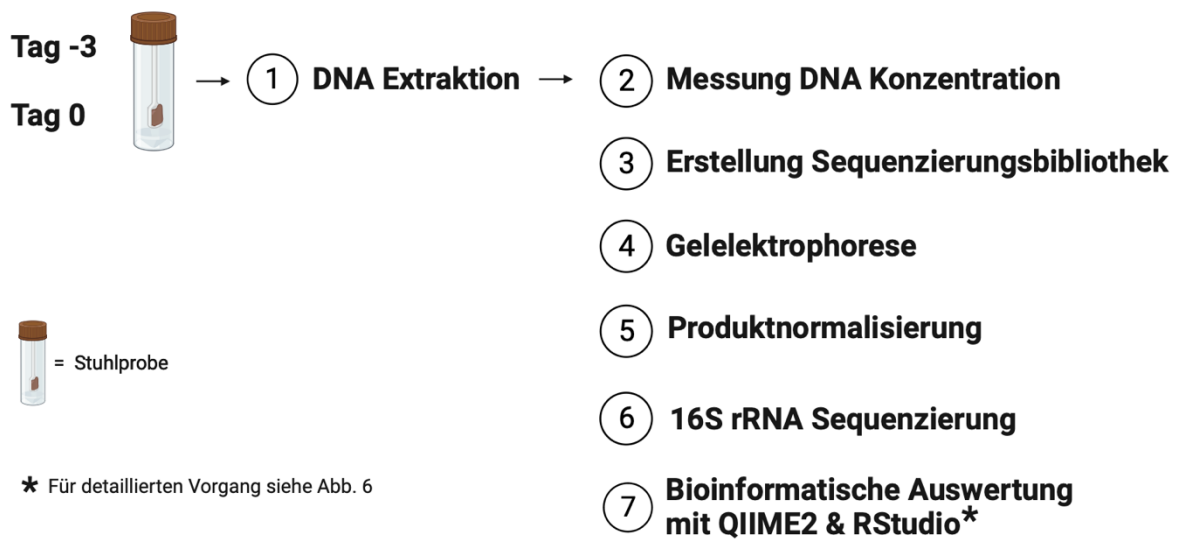


Abbildung 5: Analyse der intestinalen Mikrobiota (erstellt mit Biorender). Vor (T-3) und nach (T-0) den 3-tägigen Ernährungsumstellungen (insgesamt 3) wurden Stuhlproben von den Probanden abgegeben. Nach der DNA Extraktion folgte die Messung der DNA Konzentration, die Erstellung der Sequenzierungsbibliothek, die Gelelektrophorese, die Produktnormalisierung sowie die 16S rRNA Sequenzierung. Die bioinformatische Auswertung der Sequenzierungsdaten erfolgte mittels QIIME2 und RStudio. QIIME2: Quantitative Insight Into Microbial Ecology 2.

3.3 Bioinformatische Analyse der Illumina Amplicon Sequenzierungsdaten

Im Folgenden werden die Methoden der bioinformatischen Auswertung der Sequenzierungsdaten, die aus der Analyse der Stuhlproben resultierten, beschrieben. Am Ende gibt ein Flussdiagramm (Abb. 6) einen Überblick über die grundlegendsten Schritte der Vorgehensweise.

Für die Analyse wurde die lizenzfreie Plattform QIIME2 verwendet, die für die Auswertung und Analyse von mikrobiellen Sequenzierungsdaten entwickelt wurde [108]. Die Sequenzierungsdaten der humanen Stuhlproben wurden als FASTQ Daten von der extern beauftragten Firma bereitgestellt und als solche zugesandt. Für die bioinformatische Auswertung wurde zu Beginn ein Tabulatoren-getrenntes Metadaten Dokument erstellt, welches Informationen über die Studienteilnehmer wie Alter, Geschlecht, spezifische IDs, Zeitpunkt sowie Anzahl der Standardisierungen und Zeitpunkt der Abgabe der Stuhlprobe sowie die spezifischen Barcodes enthielt. Das Demultiplexing der FASTQ Daten wurde mittels Sabre

durchgeführt. Demultiplexing ermöglicht die Auftrennung von Sequenzdaten, die aus verschiedenen Proben stammen und auf demselben Laufband gemischt wurden. Dieses Vermischen der Proben wird durch die Verwendung von spezifischen Barcodes ermöglicht, die in den Rahmen der Erstellung der Sequenzierungsbibliothek eingefügt werden. Die Barcodes dienen als Identifikationscodes für die Proben. Die FASTQ-Dateien enthalten sowohl die biologischen Sequenzen als auch die Barcode Sequenzen. Die Demultiplexing-Software Sabre erkennt die spezifischen Barcode Sequenzen und gleicht sie mit der Metadaten Datei ab, in der die Zuordnung der Barcodes zu den Proben aufgeführt ist. Basierend auf dieser Zuordnung werden die Sequenzen in separate Datenstrukturen für jede Probe sortiert [109], [108]. Nach erfolgter Zuordnung der Sequenzen zu den entsprechenden Proben konnten die Daten in QIIME2 importiert werden. Aus Gründen der Praktikabilität und der Nutzerfreundlichkeit wurde QIIME2 im webbasierten Interface JupyterLab weiterverwendet. Nach dem Datenimport wurde Cutadapt angewendet. Dabei wurden die Primer aus den Sequenzen entfernt. Störfaktoren wie niedrige Frequenzen wurden mit Dada2 detektiert und korrigiert. Aufgrund der Qualität der Sequenzierungsdaten waren weitere Filterschritte, wie das Herausfiltern von unklaren Sequenzen, nicht erforderlich [108].

Im Anschluss an die Aufbereitung der FASTQ Daten wurden die Sequenzen taxonomisch klassifiziert, um diese den einzelnen Taxa zuzuordnen. Dafür wurden die amplicon sequence variant (ASV) der Sequenzierungsdaten mit den Daten aus der Referenzdatenbank Greengenes Database abgeglichen [110].

Zur Entfernung nicht benötigter Domänen, wie z. B. Mitochondrien, wurde ein separater Filterschritt angewendet. Als nächstes wurde ein phylogenetischer Baum erstellt, um die Similarität der verschiedenen Taxa zu evaluieren [108].

Zur Darstellung der relativen Häufigkeiten der Bakterien wurde ein Taxa Balkendiagramm erstellt. Schließlich wurden Diversitätsanalysen durchgeführt und α -Diversität sowie β -Diversität der Proben kalkuliert. Außerdem wurde ein Emperor Plot bzw. PCoA Plot (Principal Coordinate Analysis) erstellt. Die Datensätze und die Metadaten Datei wurden für die weitere statistische Analyse als comma-separated values (CSV)- und text (TXT)-Dokumente in RStudio hochgeladen.

Mit dem Statistikprogramm RStudio wurde die relative Häufigkeit der Bakterien auf Familienebene für jeden Studienteilnehmer berechnet und als Balkendiagramme dargestellt.

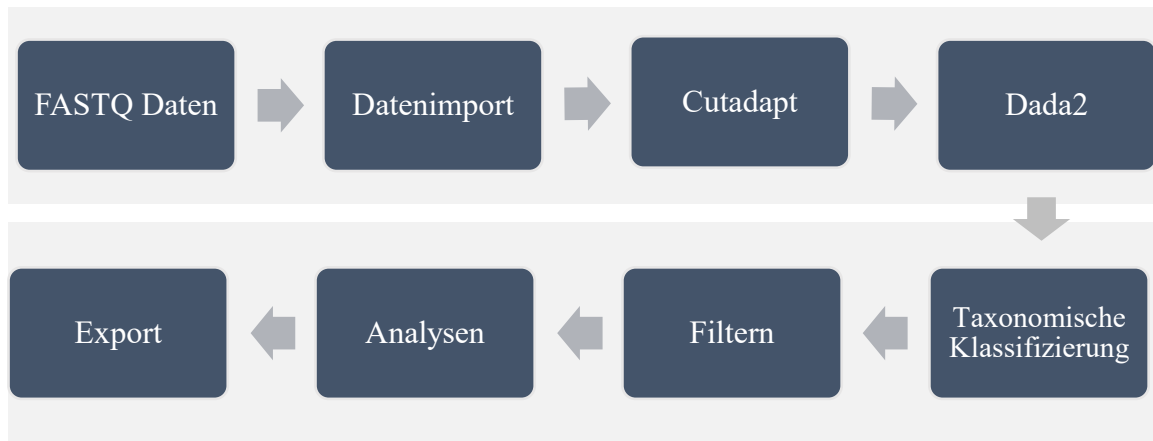


Abbildung 6: Flussdiagramm zum Vorgang bei der bioinformatischen Analyse der Sequenzierungsdaten mit QIIME2. Nach dem Import der FASTQ Daten wurden mittels Cutadapt die Primer entfernt und mit Dada2 Störfaktoren beseitigt. Nach der taxonomische Klassifizierung erfolgte ein weiterer Filterschritt und im Anschluss wurden Analysen durchgeführt und die Daten exportiert.

3.4 Analyse der Immunantwort

Für die Untersuchung der Immunantwort der Studienteilnehmer vor und nach den standardisierten Diäten wurden PBMCs aus dem Vollblut der Probanden extern isoliert. Die Immunzellen wurden dabei mit Gefriermedium versetzt und tiefgefroren. Die Vorgangsweise für das Auftauen und die Aufbereitung der isolierten PBMCs wird nachfolgend zusammengefasst und in Abbildung 7 dargestellt.

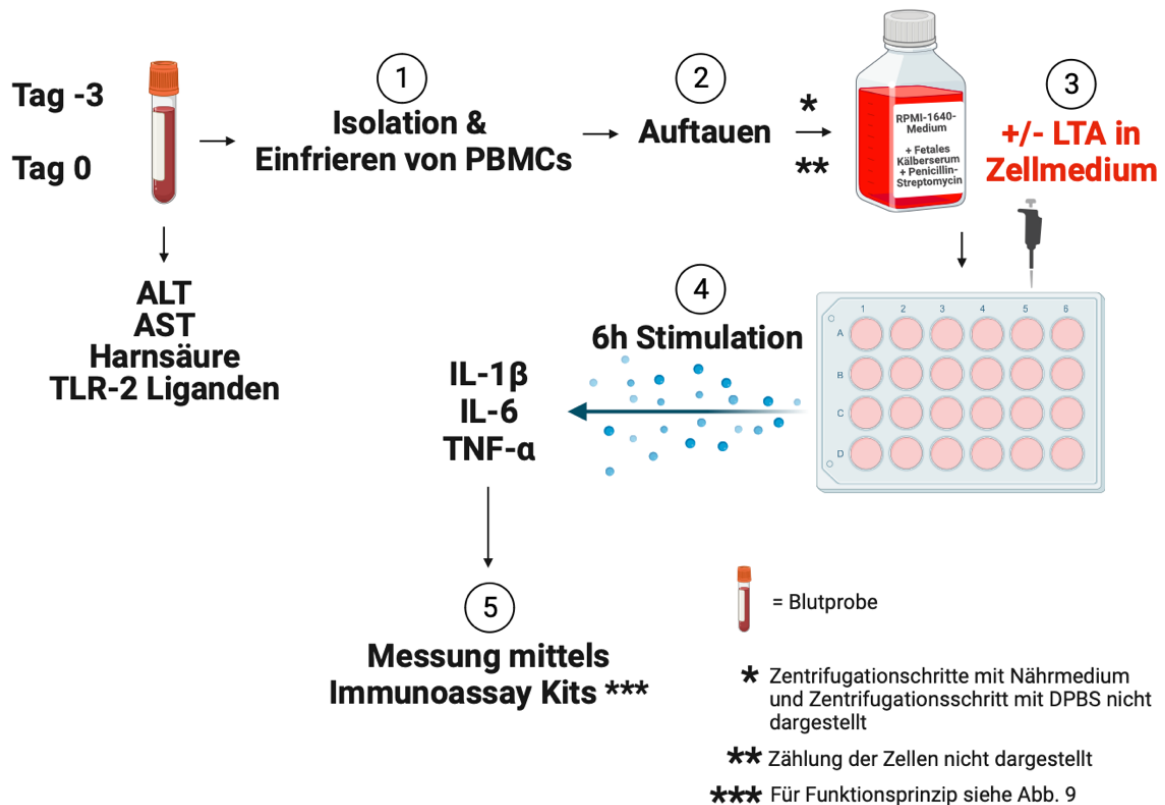


Abbildung 7: Analyse der Immunantwort (erstellt mit Biorender). Aus dem abgenommenen Blut vor und nach den 3 Ernährungsumstellungen (Tag -3 und Tag 0) wurden PBMCs isoliert und bei - 80 °C gelagert. Diese wurden nach dem Auftauen mit und ohne LTA (10 μ g LTA/ml) in Zellmedium für 6 Stunden stimuliert um im Anschluss die Konzentration von IL-1 β , IL-6 und TNF- α im Zellmedium mittels Immunoassay Kits gemessen. ALT: Alanin-Amino-Transferase; AST: Aspartat-Amino-Transferase; IL-1 β : Interleukin 1 β ; IL-6: Interleukin 6; TLR-2: Toll-like Rezeptor-2; TNF- α : Tumornekrosefaktor α ; LTA: Lipoteichonsäure; PBMCs: peripheral blood mononuclear cells (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes).

3.4.1 Herstellung des Zellkulturmediums

Während des Stimulationsexperiments wurden die PBMCs in einem Zellkulturmedium aufgenommen, das wie folgt zusammengesetzt war:

Tabelle 1: Zusammensetzung des Nährmediums für PBMCs

Substanz	Volumen
RPMI-Medium 1640	440 ml
Fetales Kälberserum	55 ml
Penicillin-Streptomycin	5 ml

3.4.2 Auftauen der mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Für das Stimulationsexperiment der PBMCs mit LTA wurden die Proben auf Eis aufgetaut. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Jeweils 5 ml vorgewärmtes Nährmedium (37 °C) wurde in 15 ml ml Falcons vorgelegt. Die einzelnen Proben wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in die jeweiligen Falcons transferiert. Die Falcons wurden bis auf 14 ml mit Nährmedium aufgefüllt und bei 300 rcf, 9 accel + 9 deaccel, 20 °C für 3 Minuten zentrifugiert. Die Immunzellen sammelten sich als Pellet am Boden der Falcons. Der entstandene Überstand wurde mit einer serologischen Pipette bis auf 1 ml abgenommen. Der verbleibende Überstand wurde mit einer 1000 µl Kolbenhubpipette verworfen. Das Zellpellet wurde mit 1000 µl Nährmedium vorsichtig resuspendiert bis es zur vollständigen Auflösung des Pellets kam und auf 5 ml mit Nährmedium aufgefüllt.

3.4.3 Berechnung der Zellanzahl

Für die Zählung der PBMCs wurde die Neubauer-improved Zählkammer verwendet. Für die Vorbereitung der zu pipettierenden Lösung wurden 20 µl Trypan Blue solution und 20 µl Zellsuspension aus dem jeweiligen Falcon in 0,5 µl Eppis pipettiert, resuspendiert und 10 µl von dieser Suspension auf die Zählkammer aufgetragen. Durch das Lichtmikroskop wurde die Zellzahl in den vier Quadraten bestimmt und nach folgender Formel die Gesamtzellzahl berechnet (VF = Verdünnungsfaktor):

$$\text{Gesamtzellzahl} = \frac{\sum \text{Zellzahl der Quadrate}}{\text{Anzahl Quadrate}} * VF * 10000 * \text{Volumen Zellsuspension}$$

Der Verdünnungsfaktor betrug 2, das Volumen der Zellsuspension 5 ml.

3.4.4 Stimulation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes mit Lipoteichonsäure

Nach der Berechnung der Zellzahl wurden die Falcon Tubes bei 300 rcf 9 accel + 9 deaccel bei 20 °C für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer serologischen Pipette bis auf 1 ml abgenommen, das restliche Nährmedium wurde mit der 1000 µl Kolbenhubpipette verworfen. Im Anschluss wurde 480 µl Nährmedium in jedes Falcon Tube pipettiert und das Zellpellet vorsichtig resuspendiert, bis es sich vollständig auflöste.

Für die Stimulation der Zellen wurde, wie in Tabelle 2 dargestellt, jede Probe stimuliert und unstimuliert in einer 24 Well Platte angesetzt. Das Gesamtvolumen pro Well betrug schließlich 300 µl. Abbildung 8 zeigt eine schematische Darstellung des Pipettierschemas eines Probanden. Die Zellen wurden im CO₂-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ für 6 Stunden inkubiert.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Zellsuspension

Substanz	Volumen
Zellsuspension	240 µl
Stimuliert mit LTA	60 µl LTA (10 µg LTA/ml)
Unstimuliert ohne LTA	60 µl Nährmedium (0 µg LTA)

LTA: Lipoteichonsäure

1. – 3. Standardisierung

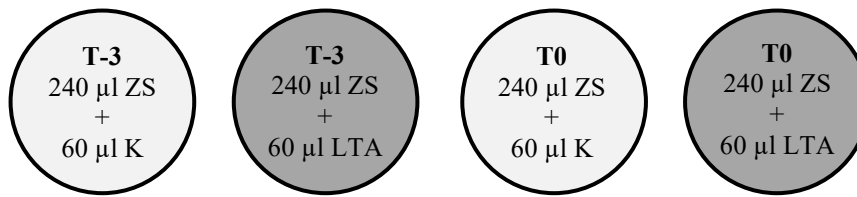


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Versuchsbedingungen des PBMCs-Stimulations-experiments eines Probanden. PBMCs wurden vor (T-3) und nach (T0) den drei Standardisierungen stimuliert. 240 µl Zellsuspension wurden mit 60 µl Nährmedium (0 µl LTA/ml) bzw. 60 µl LTA in Nährmedium (10 µg LTA/ml) versetzt. Die Immunzellen wurden für 6 Stunden im CO₂-Inkubator inkubiert und im Anschluss daraufhin abgenommen. Die Zellen wurden in Trizol aufgenommen und bei - 80 °C gelagert. Die Zellsuspension wurde bei - 80 °C gelagert. ZS: Zellsuspension; K: Kontrolle; LTA: Lipoteichonsäure.

3.4.5 Abnahme des Zellüberstandes

Im Anschluss an die Inkubation der Zellen mit LTA in Nährmedium bzw. ohne LTA in Nährmedium als Kontrolle wurde die Zellsuspension mit kreisenden Bewegungen im Well unter vorsichtigem Resuspendieren und der Vermeidung von Luftblasen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Zum Schutz vor Austrocknung und zur Vermeidung von Zellverlust wurden 500 µl DPBS in die Wells pipettiert. Die Tubes wurden bei 2000 rpm, 9 accel + 9 deaccel bei 20 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Am Boden der Tubes war ein kleines Zellpellet erkennbar. Daraufhin wurde der entstandene Zellüberstand in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Die Reaktionsgefäße mit dem Zellüberstand wurden in der Zwischenzeit auf Eis gelagert. Das DPBS in den Wells wurde mit einer Kolbenhubpipette unter kreisenden Bewegungen und vorsichtigem Resuspendieren sowie spülen der Wells in die 1,5 ml Reaktionsgefäße transferiert. Diese wurden erneut bei 2000 rpm, 9 accel + 9 deaccel bei 20 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Zellpellet blieb zurück. Die Reaktionsgefäße wurden mit 500 µl Trizol versetzt, für 1 Minute gevortext und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden der Zellüberstand und das in Trizol gelöste Zellpellet bei - 80 °C gelagert.

3.4.6 Messung von Interleukin-1 β , Interleukin-6 und Tumornekrosefaktor- α

Für die Analyse der Immunantwort vor und nach den Standardisierungen der Studienteilnehmer wurden die hochsensitiven Human ProQuantum Immunoassay Kits Invitrogen™ nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Messung wurde mit dem Zellüberstand der mit LTA bzw. Nährmedium (Kontrolle) stimulierten PBMCs durchgeführt, um die Konzentration der sekretierten Zytokine zu messen [111].

In Abbildung 9 ist das Funktionsprinzip der Human ProQuantum Immunoassays von IL-1 β , IL-6 und TNF- α dargestellt. Die Methode basiert auf dem Prinzip der Proximity Ligation Assay (PLATM)-Technologie [112]. Hierbei wird eine Antigen-Antikörper-Bindung für den Nachweis des Analyten mit einer qPCR-Signalverstärkung gemessen [112]. Der Assay besteht aus zwei Hauptschritten: Beim ersten Schritt verbinden sich die spezifischen Antikörperkonjugate A (3' Oligonukleotid) und B (5' Oligonukleotid). Binden nun die Antikörper an zwei verschiedenen Epitopen des Zielproteins, rücken die 3'- und 5'- Oligonukleotide aneinander [112]. Die Bindung der Antikörper an das Zielprotein ist Voraussetzung für den zweiten Schritt. Hierbei sorgt die DNA-Ligase mittels eines Splint-Oligos für die Oligoligierung. Bei 95 °C werden Ligase, Antikörper und weitere Proteine hitzeinaktiviert und 100 Basen Stränge bleiben zurück, die proportional zum Grad der Antikörper-Analyt-Bindung sind. Der 100 Basen Strang dient schließlich als Amplifikationsvorlage für 40 qPCR-Zyklen mit TaqMan-Assays [112].

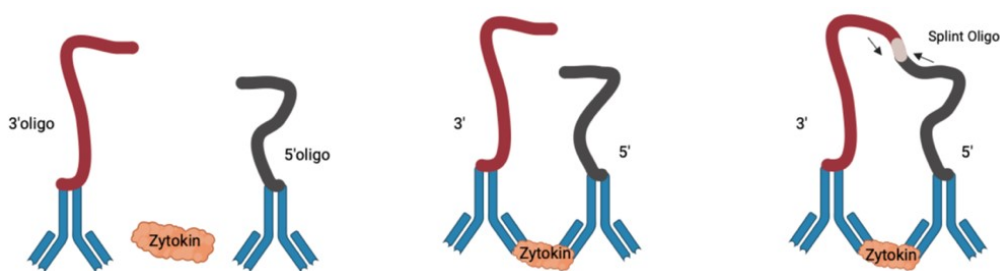


Abbildung 9: ProQuantum Immunoassay Kits Invitrogen™ (modifiziert nach Thermo Fisher Scientific – Invitrogen [94]; erstellt mit Biorender). Bei Vorliegen des Zielproteins binden die Antikörper an zwei verschiedenen Epitopen des Proteins, die 3' und 5' Oligonukleotide rücken aneinander und es kommt durch die DNA-Ligase zur Oligoligierung mittels eines Splint-Oligos. Nach einer Hitzeinaktivierung bei 95 °C werden die 100 Basen Stränge amplifiziert.

Für die Messung der Zytokine im Zellüberstand wurden die Proben und die Reagenzien in den Kits auf Eis aufgetaut. Es wurden zwei 96 Well Platten vorbereitet (eine Arbeitsplatte zur Vorbereitung und Verdünnung der Proben und eine Testplatte zur Messung). Die Standards wurden mit dem Assay Dilution Buffer verdünnt, mit der Pipette resuspendiert, bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert und im Anschluss auf Eis gestellt. Für die Analyse von 2 Probanden (24 Proben) wurden in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß 1,01 µl Antibody-conjugate A und 1,01 µl Antibody-conjugate B mit 64,1 µl Antibody-conjugate Dilution Buffer vermischt, gevortext und auf Eis gelagert. 10 µl der jeweiligen Probe wurden mit 10 µl Assay Dilution Buffer im Verhältnis von 1:2 verdünnt. Mit 80 µl Assay Dilution Buffer und 20 µl Protein-Standard wurde eine serielle Verdünnung zur Erstellung einer Standardgeraden pipettiert. Die Arbeitsplatte wurde mit Seal Film abgeklebt, vermischt und bei 3000 rcf für 1 Minute bei 25 °C zentrifugiert.

Im Anschluss wurde mit der Testplatte weitergearbeitet. Vom Antibody-conjugate Mix wurden 2 µl vorgelegt. Aus der Arbeitsplatte wurden 2 µl von der jeweiligen Probe und 2 µl vom jeweiligen Standard in die Testplatte vorgelegt und resuspendiert. Die Platte wurde mit Micro Seal Film abgedeckt, vermischt und bei 3000 rcf für 1 Minute bei 25 °C zentrifugiert. Es folgte eine Inkubation im Dunkeln bei 25 °C für 1 Stunde. Während dieser Inkubationszeit erfolgte die Bindung der Antikörper an das eventuell vorhandene Protein [111].

Für die anschließende qPCR wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 509 µl Mastermix und 3,05 µl Ligase vermischt, gevortext und abzentrifugiert. In jedes Well wurde 16 µl der vorbereiteten Mastermix-Ligase-Reagenz pipettiert. Die Platte wurde abgeklebt, vermischt und bei 3000 rcf für 1 Minute bei 25 °C zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die qPCR unter folgenden Konditionen:

Tabelle 3: Konditionen für die qPCR der ProQuantum Immunoassay Kits

Schritt	Temperatur	Zeit
Ligation	25 °C	20 min
	40 x Zyklen	
Ligase Inaktivierung	95 °C	2 min
Denaturierung	95 °C	2 min
Annealing/extension	60 °C	1 min
	4 °C	∞

Die Ct-Werte aus den Messungen der Zytokine wurden mittels der App ProQuantum von Thermo Fisher Scientific ausgewertet. Für die weiteren Analysen wurden delta Ct-Werte gebildet. Es wurden in die Auswertung nur Proben eingeschlossen, deren Ct-Wert nach der Stimulation mit LTA ein Ct-Wert > 0.5 von den unstimulierten Zellen aufwiesen.

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der experimentellen Mikrobiota Daten wurde mit RStudio durchgeführt. Hierfür wurden nach der bioinformatischen Auswertung mit QIIME2 die relativen Häufigkeiten der Bakterien auf Familienebene berechnet und in Form von Balkendiagrammen dargestellt.

Für die Darstellung der Daten zu den Zytokinen und zur ALT-Aktivität, AST-Aktivität, Harnsäurekonzentration sowie zu sCD14, I-FABP und TLR-2 Liganden wurde GraphPad Prism 7.0 verwendet. Für die Detektion von Ausreißern wurde der Grubbs-Test angewendet. Detektierte Ausreißer wurden aus der Analyse exkludiert. t-Test (für normalverteilte Daten) bzw. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (für nicht-normalverteilte Daten) dienten zur Testung der Ergebnisse auf Signifikanz, wobei Ergebnisse als signifikant unterschiedlich galten, wenn ein p-Wert von < 0.05 erreicht wurde.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer sich wiederholenden, isokalorischen, ernährungsempfehlungsbasierten Diät auf die intestinale Mikrobiota und die Immunantwort bei gesunden, männlichen Erwachsenen untersucht.

4.1 Kalorien- und Nährstoffaufnahme sowie Charakteristika der Studienteilnehmer

Die Ausgangs-Charakteristika der Studienteilnehmer vor Beginn der Studie sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Ausgangs-Charakteristika der Studienteilnehmer vor Interventionsbeginn

Charakteristika und Parameter	Baseline
BMI kg/m ²	22.4 ± 0.6
Alter (Jahre)	25.9 ± 1.2
ALT (U/L)	11.4 ± 0.8
AST (U/L)	25.3 ± 1.8
Harnsäure (mg/dL)	4.8 ± 0.3

Alle Werte sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM; n = 12. BMI: Body Mass Index; ALT: Alanin Amino-Transferase; AST: Aspartat-Amino-Transferase.

Die Auswertungen der zwei 24 Stunden Recalls und die durchschnittliche Energieaufnahme und Makronährstoffzusammensetzung der Diät während den Standardisierungen sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Dabei zeigte sich, dass sich die Aufnahme von gesättigten Fettsäuren, Protein und Kohlenhydraten im Vergleich zur „normalen“ Ernährung der Probanden signifikant ($p < 0.05$) unterschied. Die Aufnahme von gesättigten Fettsäuren verringerte sich signifikant ($p < 0.05$) um 39,5 %, die Aufnahme von Protein verringerte sich signifikant ($p < 0.05$) um 46,7 % und die Aufnahme von Kohlenhydraten erhöhte sich signifikant ($p < 0.05$) um 25,6 %.

Tabelle 5: Auswertung der zwei 24 Stunden Recalls im Vergleich zur standardisierten Ernährung

Nährstoff	24 Stunden Recall	Standardisierung	p-Wert
Energie (kcal/Tag)	2566 ± 154	2564 ± 136	0.95
Fett (Energie %)	32.8 ± 2.5	31.5 ± 0.1	0.61
Gesättigte Fettsäuren (Energie %)	11.9 ± 1.2	7.2 ± 0.1	< 0.05
Protein (g/kg/Körpergewicht)	1.5 ± 0.1	0.8 ± 0.0	< 0.05
Kohlenhydrate (Energie %)	47.2 ± 2.2	59.3 ± 0.2	< 0.05
Ballaststoffe (g)	35.9 ± 2.9	35.6 ± 1.0	0.93

Alle Werte sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM; n = 12.

4.2 Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung auf klinisch chemische Parameter: Alanin-Amino-Transferase, Aspartat-Amino-Transferase, Harnsäure

Um zu untersuchen, ob eine wiederholte, dreitägige Ernährungsumstellung hin auf eine DGE-empfohlene Diät einen Einfluss auf Parameter der Lebergesundheit und den Harnsäurespiegel hat, wurden diese in einem klinisch chemischen Routinelabor gemessen.

Alanin-Amino-Transferase (ALT)

Die Aktivität der ALT im Serum reduzierte sich bei einem repräsentativen Probanden nach jeder Intervention (Abb.10). Das Ergebnis fand sich auch bei der gepoolten Analyse aller Probanden, hier kam es zu einer signifikanten Reduktion von 14,8 % (Abb. 13).

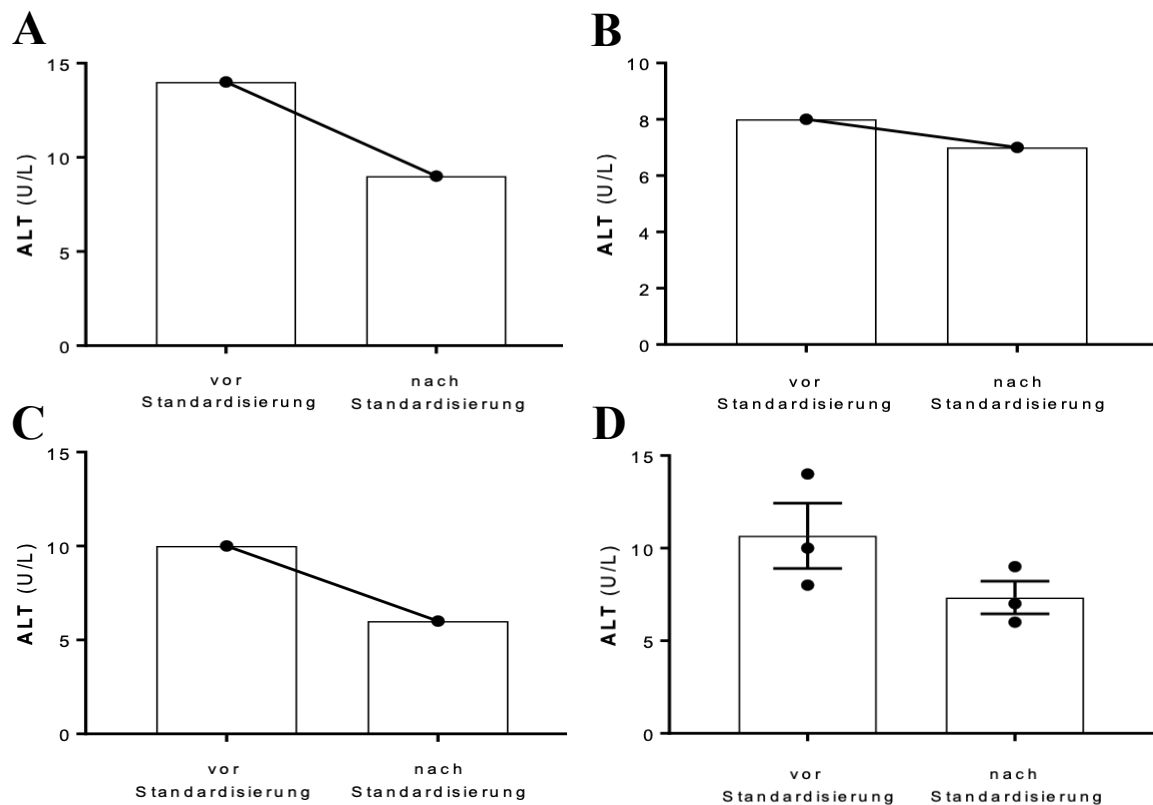


Abbildung 10: Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung bei einem repräsentativen Probanden auf die ALT-Aktivität. (A-C) ALT vor und nach der 1.-3. Intervention. **(D)** Gepoolte Analyse der ALT-Aktivität des repräsentativen Probanden vor und nach den 3 Interventionen, Mittelwert $\pm$ SEM. ALT: Alanin-Amino-Transferase.

Aspartat-Amino-Transferase (AST)

Im Gegensatz zur ALT-Aktivität im Serum fanden sich bei der AST-Aktivität bei einem repräsentativen Probanden nach den Interventionen keine Unterschiede (Abb.11). Bei der gepoolten Analyse aller Probanden fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Basiswerten und den Werten nach den Interventionen (Abb. 13).

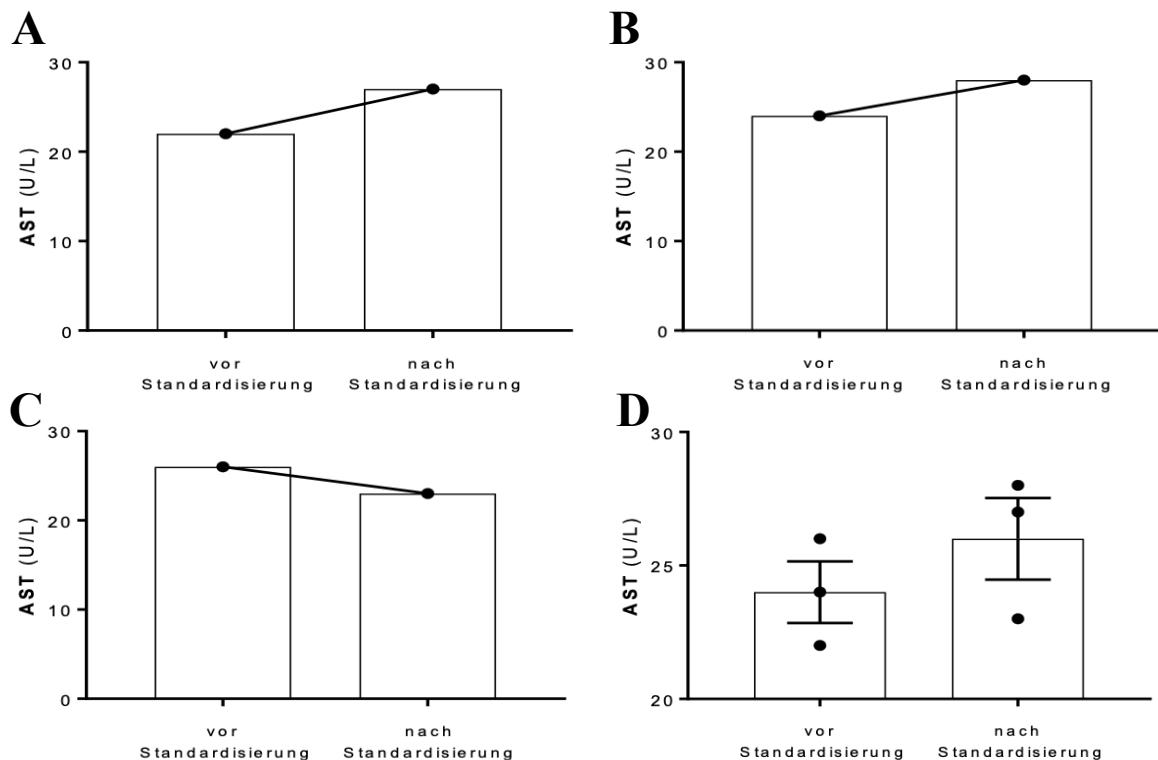


Abbildung 11: Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung bei einem repräsentativen Probanden auf die AST-Aktivität. (A-C) AST vor und nach der 1.-3. Intervention. **(D)** Gepoolte Analyse der AST-Aktivität des repräsentativen Probanden vor und nach den 3 Interventionen, Mittelwert $\pm$ SEM. AST: Aspartat-Amino-Transferase.

Harnsäure

Im Gegensatz zur AST-Aktivität reduzierte sich der Harnsäurespiegel beim repräsentativen Probanden während allen 3 Ernährungsinterventionen (Abb. 12). Bei der gepoolten Analyse aller Probanden reduzierte er sich signifikant um 6,7 % ($p < 0.05$, Abb. 13).

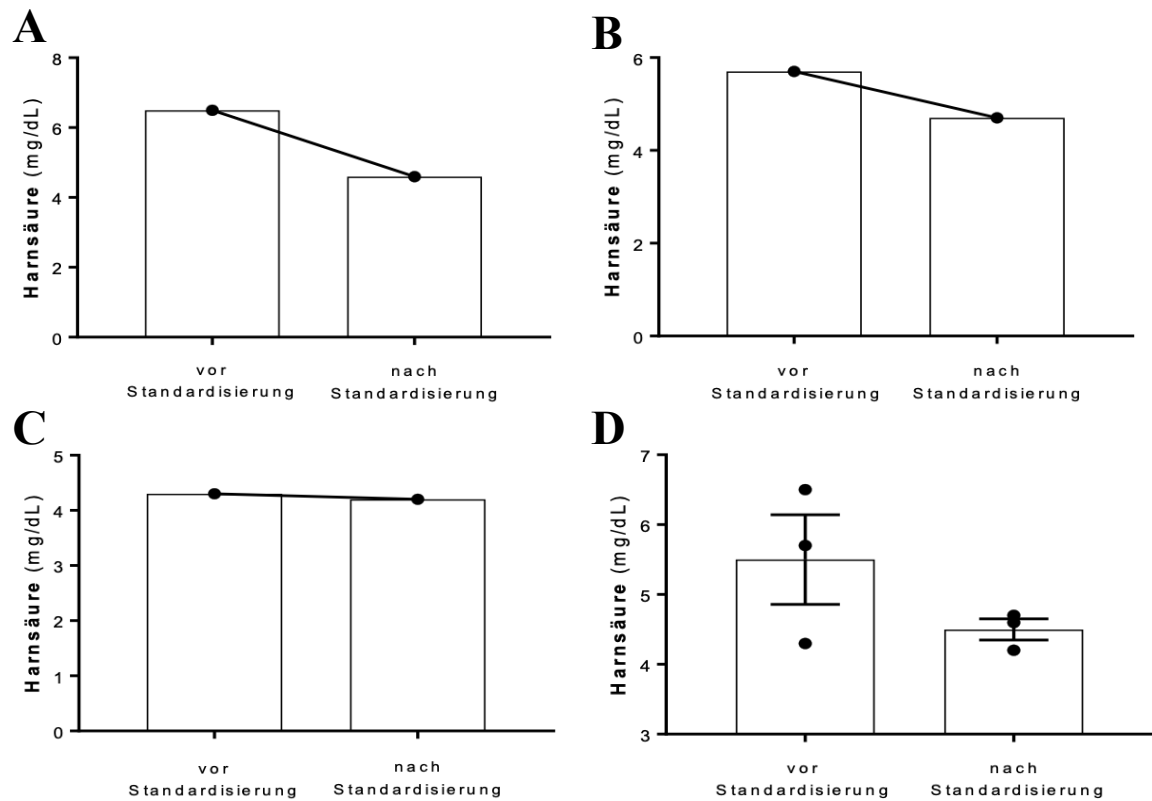


Abbildung 12: Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung bei einem repräsentativen Probanden auf den Harnsäurespiegel. (A-C) Harnsäurespiegel vor und nach der 1.-3. Intervention. (D) Gepoolte Analyse des Harnsäurespiegels des repräsentativen Probanden vor und nach den 3 Interventionen, Mittelwert $\pm$ SEM.

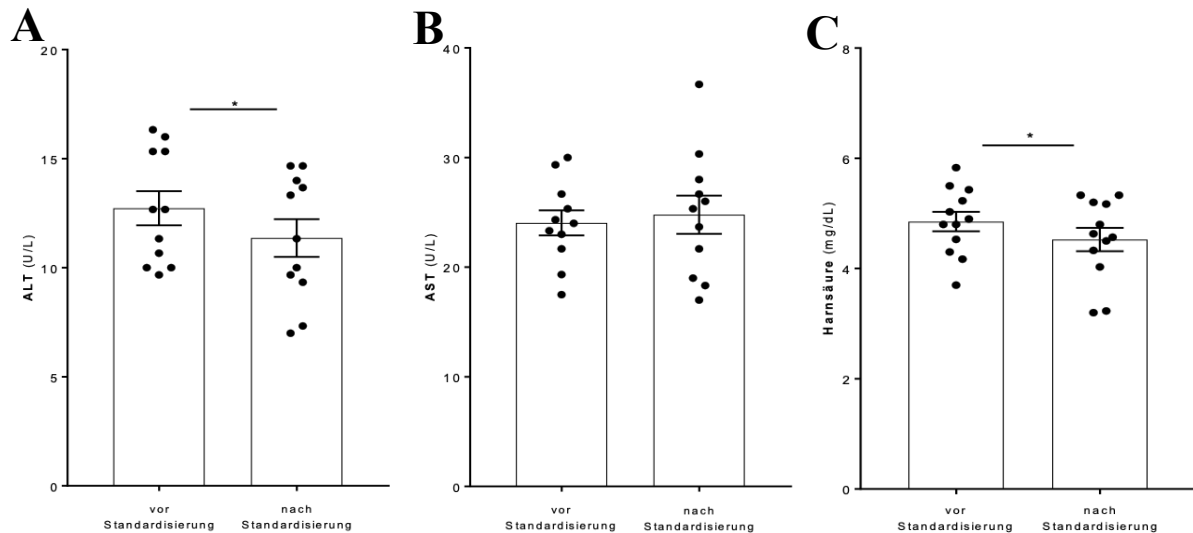


Abbildung 13: Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung bei gesunden Männern auf klinisch chemische Parameter. (A-C) Gepoolte Analyse der klinisch chemischen Parameter aller Probanden vor und nach den 3 Interventionen. Jeder Datenpunkt entspricht ein Proband bzw. den Mittelwert des jeweiligen Studienteilnehmers. * = ($p < 0.05$). ALT: $n = 11$ (1 Ausreiser); AST: $n = 11$ (1 Ausreiser); Harnsäure $n = 12$. ALT: Alanin-Amino-Transferase; AST: Aspartat-Amino-Transferase. Die Balken stellen die Mittelwerte $\pm$ SEM dar.

4.3 Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung auf die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota

Um zu untersuchen, ob eine wiederholte, dreitägige Ernährungsumstellung hin auf eine DGE-empfohlene Diät einen Einfluss auf die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota hat, wurden im Rahmen dieser Arbeit Sequenzierungsdaten ausgewertet. Mittels zwei exemplarischen Studienteilnehmern werden die Veränderungen der intestinalen Mikrobiota durch die Standardisierungen nachfolgend kurz zusammengefasst. Die weiteren Abbildungen befinden sich im Anhang.

Allgemein zeigten die Auswertungen, dass sich die relativen Häufigkeiten der einzelnen Bakterienfamilien vor und nach den Interventionen von Probanden zu Probanden unterschieden. So fanden sich auch keine Cluster. Diversitätsanalysen ergaben, dass sich weder α -Diversität, wie in Abbildung 15 und Abbildung 17 bei Proband 8 und 16 ersichtlich, noch β -Diversität vor und nach den Interventionen der Studienteilnehmer signifikant veränderten. Es fand sich auch hinsichtlich der Ab- und Zunahme von Bakterienfamilien vor und nach

den Interventionen keine Änderungen, welche auf alle Studienteilnehmer projiziert werden könnten.

Im Folgenden und in Abb. 14 ist exemplarisch der Effekt der kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung auf die DGE-empfohlene Diät dargestellt. *Lachnospiraceae* stellte dabei den höchsten Anteil der bakteriellen Häufigkeiten dar. Dieser Anteil verringerte sich nach den ersten zwei Standardisierungen, während nach der dritten Standardisierung der Anteil zunahm. Der Anteil an *Bifidobacteriaceae* nahm im Laufe der Standardisierungen geringfügig ab. Der Anteil an *Ruminococcaceae* verringerte sich vor Standardisierung 1 und 2, erhöhte sich jedoch nach jeder Standardisierung. Auffällig ist zudem, dass der Anteil an *Peptostreptococcaceae* sich im Laufe der 3 Standardisierungen zunehmend verringerte. Der Anteil von *Streptococcaceae* war in der 2. Standardisierung größer als in Standardisierung 1 und 3. *Erysipelotrichaceae* nahm in der 3. Standardisierung zu.

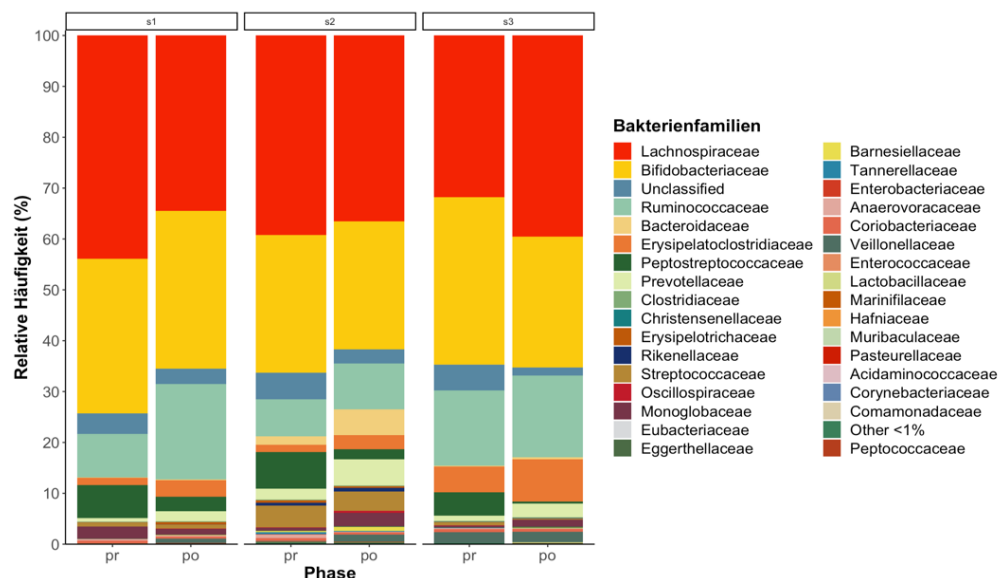


Abbildung 14: Relative Häufigkeit in % der Bakterienfamilien von Studienteilnehmer 8 vor und nach den Ernährungsinterventionen. Die relativen Häufigkeiten (%) sind dargestellt als Standardisierung 1, Standardisierung 2 und Standardisierung 3. Innerhalb der einzelnen Standardisierungen wird zwischen prä (vor) und post (nach) Standardisierung differenziert. s1: Standardisierung 1; s2: Standardisierung 2, s3: Standardisierung 3; pr: prä (vor) Standardisierung; po: post (nach) Standardisierung.

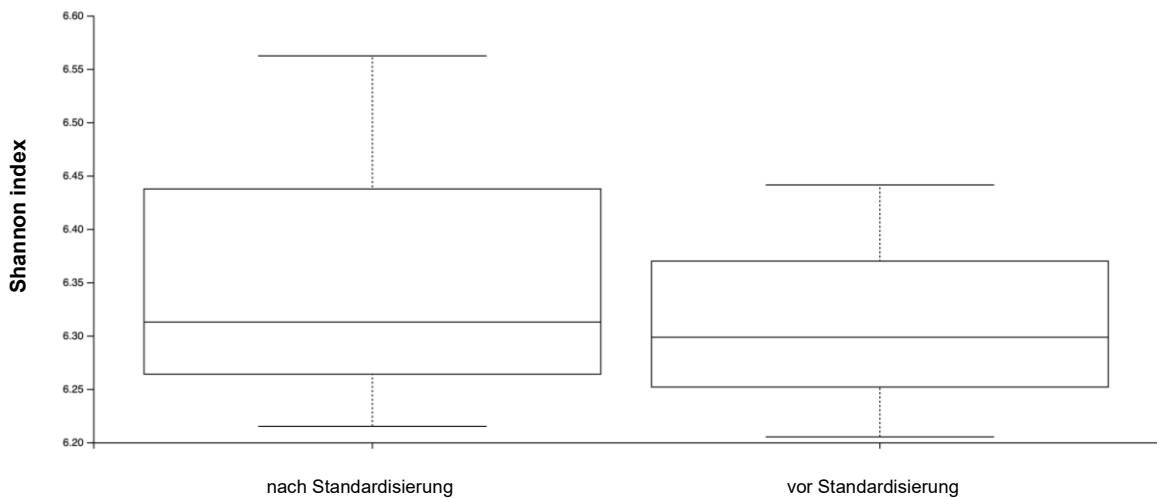


Abbildung 15: Shannon entropy Plot von Studienteilnehmer 8 (Abbildung aus QIIME2). Boxplots der α -Diversität nach und vor den Ernährungsinterventionen.

Abbildung 16 zeigt die relativen bakteriellen Häufigkeiten der Bakterienfamilien von Studienteilnehmer 16. Der Anteil von *Lachnospiraceae* verringerte sich nach den Standardisierungen, mit Ausnahme von Standardisierung 2. Erkennbar ist, wie *Bifidobacteriaceae* vor der ersten Standardisierung einen geringen Anteil an den bakteriellen Häufigkeiten ausmachte und im Laufe der Interventionen deren relative Häufigkeit stetig anstieg. Der Anteil von *Ruminococcaceae* nahm vor den Standardisierungen ab und, insbesondere nach den Standardisierungen, zu. Der *Peptostreptococcaceae* Anteil verringerte sich im Laufe der einzelnen Standardisierungen. Der Anteil von *Erysipelotrichaceae* stieg nach den drei Tagen der ernährungsempfehlungsbasierten Diäten stetig an, reduzierte sich jedoch nach den Interventionen. Bei einigen Bakterienfamilien, wie *Bifidobacteriaceae* (kontinuierliche Zunahme) oder *Peptostreptococcaceae* (kontinuierliche Abnahme), war ein Muster hinsichtlich der relativen Häufigkeit erkennbar.

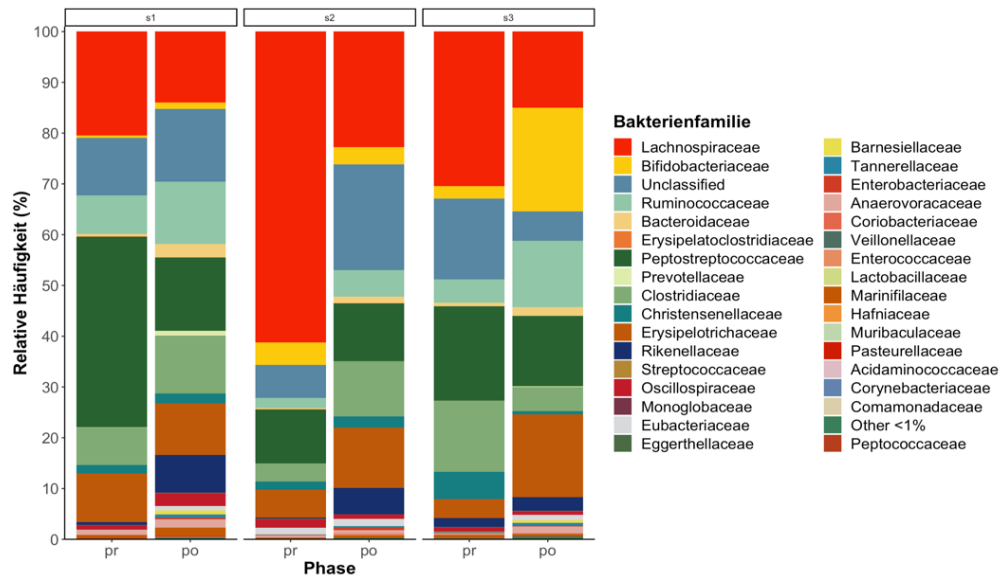


Abbildung 16: Relative Häufigkeit in % der Bakterienfamilien von Studienteilnehmer 16 vor und nach den Standardisierungen. Die relativen Häufigkeiten (%) sind dargestellt als Standardisierung 1, Standardisierung 2 und Standardisierung 3. Innerhalb der einzelnen Standardisierungen wird zwischen prä (vor) und post (nach) Standardisierung differenziert. s1: Standardisierung 1; s2: Standardisierung 2, s3: Standardisierung 3; pr: prä (vor) Standardisierung; po: post (nach) Standardisierung.

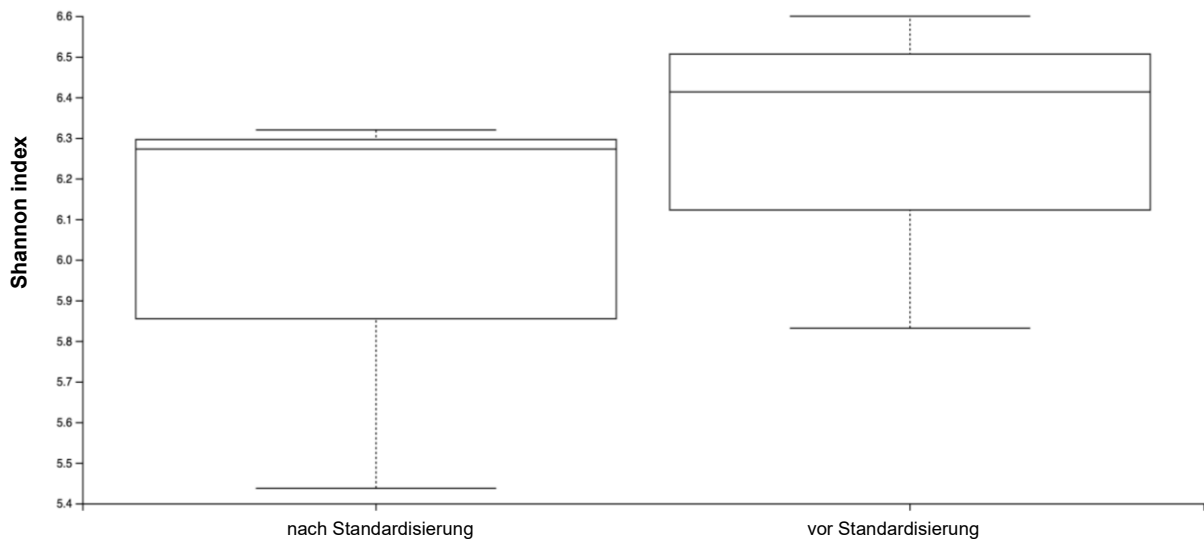


Abbildung 17: Shannon entropy Plot von Studienteilnehmer 16. (Abbildung aus QIIME2). Boxplots der α -Diversität nach und vor den Ernährungsinterventionen.

Aus den Analysen intestinalen Mikrobiota vor und nach den Ernährungsumstellungen hin auf eine DGE-empfohlene Diät lässt sich schließen, dass die Komposition der Bakterien über die drei Interventionen hinweg bei den meisten Probanden relativ stabil blieb, während sich die relativen Häufigkeiten der Bakterienfamilien zueinander bei einigen Studienteilnehmern veränderten. Die Variation der bakteriellen Zusammensetzung zwischen den einzelnen Studienteilnehmern war relativ hoch und es war kein einheitlicher Effekt erkennbar.

4.4 Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung auf die Immunantwort: Stimulationsexperiment von mononukleären Zellen des peripheren Blutes mit Lipoteichonsäure

Um den Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin auf eine von der DGE-empfohlenen Diät auf die LTA-vermittelte Immunantwort bei gesunden, männlichen Erwachsenen zu untersuchen, wurde die Ausschüttung von IL-1 β , IL-6 und TNF- α in PBMCs stimuliert mit und ohne LTA (10 μ g LTA/ml) untersucht. Im Folgenden werden von jedem Zytokin grafisch die drei Interventionen eines repräsentativen Probanden, der gepoolte Mittelwerte der drei Interventionen sowie am Ende die gepoolten Mittelwerte aller Probanden (deren Immunzellen stimulierbar waren) vor und nach den Interventionen (als delta-Ct-Werte) dargestellt und die Ergebnisse kurz beschrieben. Es wurden nur Proben in die Auswertung aufgenommen, deren Ct-Wert nach der Stimulation mit LTA ein Ct-Wert > 0.5 von den unstimulierten Zellen aufwiesen. Da die Zellzahl, die in den Stimulationsversuchen eingesetzt wurde, teilweise gering war und in Folge der Anstieg der Zytokinsekretion nach LTA Stimulation nicht einsetzte, konnten daher teilweise nicht alle 3 Interventionen eingeschlossen werden.

Tumornekrosefaktor α (TNF- α)

Wie erwartet war die Konzentration an TNF- α nach der 6-stündigen Stimulation mit LTA in Zellkulturmedium beim repräsentativen Probanden bei allen 3 Interventionen höher als ausschließlich in Zellkulturmedium behandelten Zellen. Im Mittel war die TNF- α Konzentration beim repräsentativen Probanden vor den Ernährungsumstellungen mit LTA Behandlung um 4,8 % erhöht, wohingegen sie nach den Ernährungsumstellungen um 8,6 % erhöht war (Abb. 18). Beim Vergleich der delta-Ct-Werte des Anstiegs der Gesamt-TNF- α -Proteinkonzentration der gepoolten Analyse ($n = 7$) im Zellmedium war

diese nach den Ernährungsumstellungen um das 1,05-fache erhöht (Abb. 21). Die Effekte waren nicht signifikant.

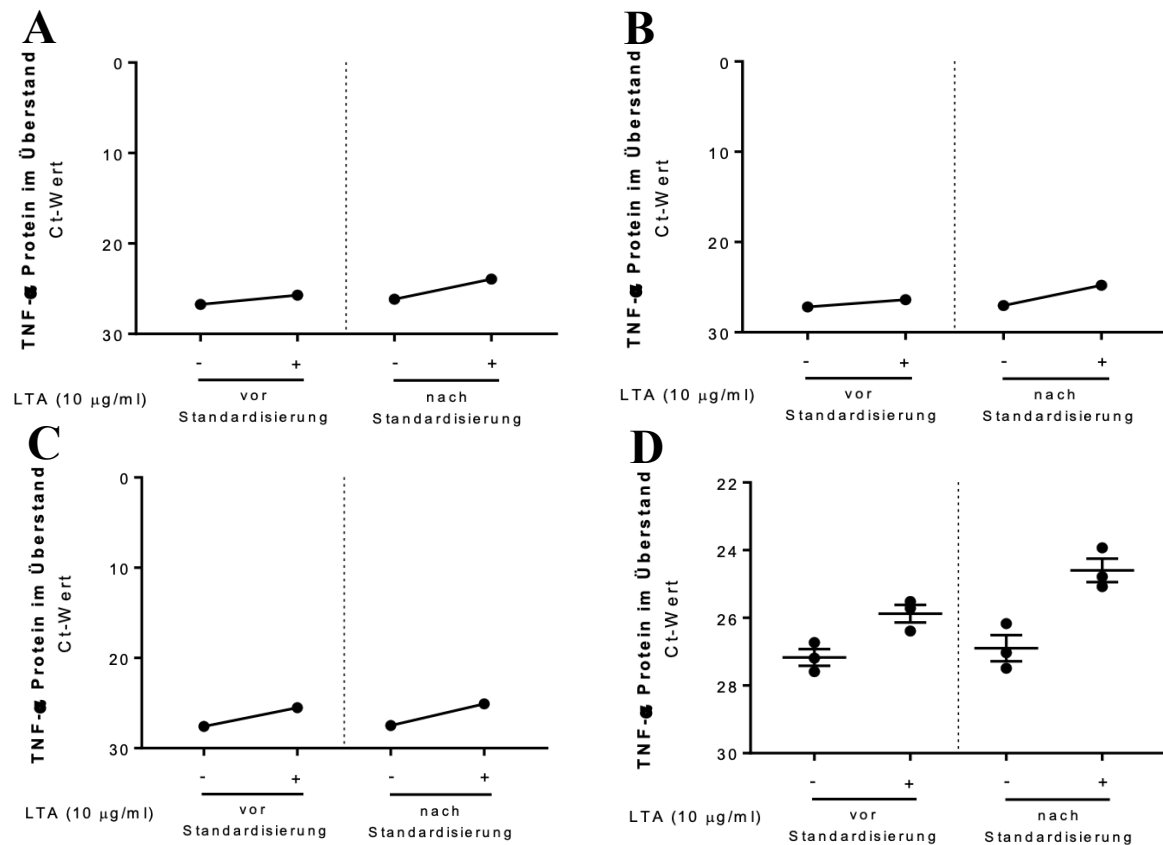


Abbildung 18: Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung bei einem repräsentativen Probanden auf die TNF- α Sekretion von PBMCs stimuliert mit und ohne LTA in Zellmedium (10 $\mu\text{g/ml}$). (A-C) TNF- α bei einem repräsentativen Probanden vor und nach der 1.-3. Intervention. (D) Gepoolte Analyse der TNF- α Konzentration des repräsentativen Probanden vor und nach den 3 Interventionen. Die Werte sind dargestellt als Ct-Werte vor und nach den Standardisierungen, mit (+) und ohne (-) LTA; $\pm$ SEM. TNF- α : Tumornekrosefaktor α ; LTA: Lipoteichonsäure.

Interleukin 1 β (IL-1 β)

Wie erwartet war auch die Konzentration an IL-1 β nach der 6-stündigen Stimulation mit LTA in Zellkulturmedium beim repräsentativen Probanden sowohl vor als auch nach den Ernährungsumstellungen höher als ausschließlich in Zellkulturmedium behandelten Zellen (Abb. 19). Im Mittel war die IL-1 β Konzentration beim repräsentativen Probanden vor den Ernährungsumstellungen mit LTA Behandlung um 14,5 % erhöht, wohingegen sie nach den Ernährungsumstellungen um 22,3 % erhöht war. Im Gegensatz dazu war der Vergleich der

delta-Ct-Werte der Gesamt-IL-1 β -Proteinkonzentration der gepoolten Analyse (n = 7) im Zellmedium nach den Ernährungsumstellungen um das 1,02-fache verringert (Abb. 21). Die Effekte waren nicht signifikant.

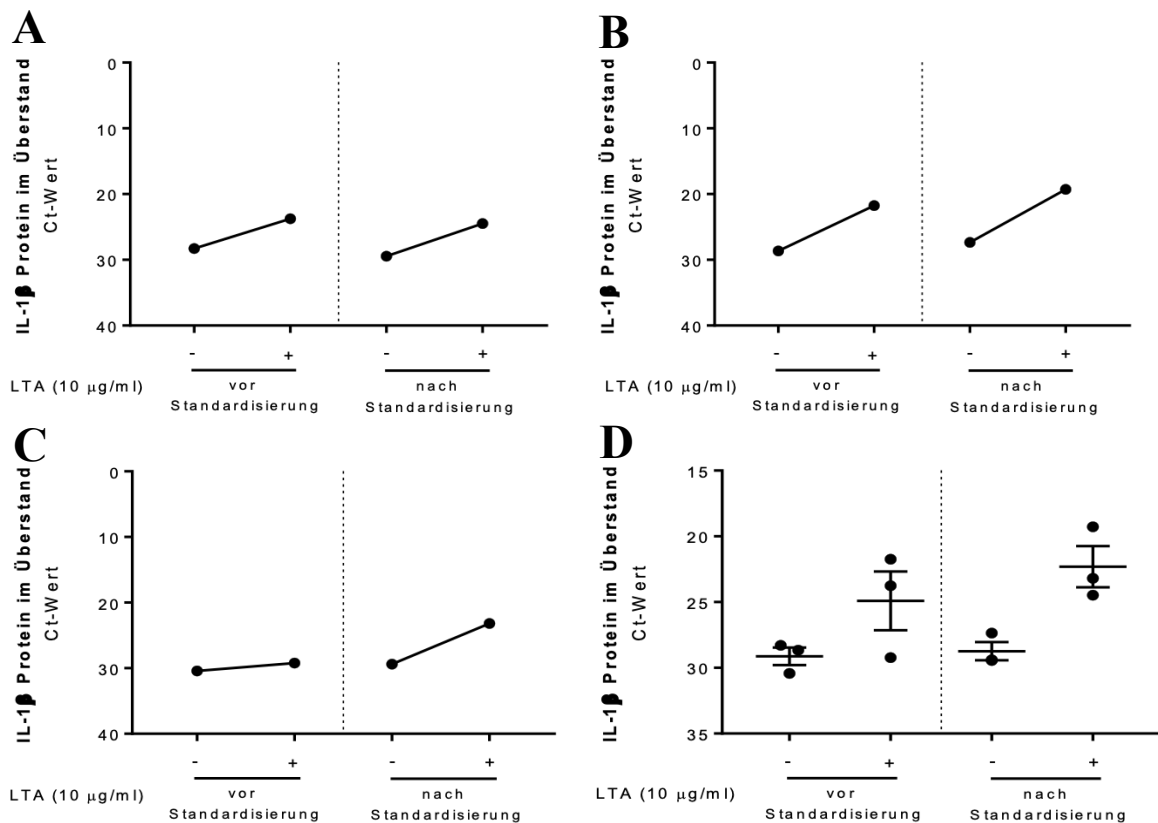


Abbildung 19: Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung bei einem repräsentativen Probanden auf die IL-1 β Sekretion von PBMCs stimuliert mit und ohne LTA in Zellmedium (10 μ g/ml). (A-C) IL-1 β bei einem repräsentativen Probanden vor und nach der 1.-3. Intervention. (D) Gepoolte Analyse der IL-1 β Konzentration des repräsentativen Probanden vor und nach den 3 Interventionen. Die Werte sind dargestellt als Ct-Werte vor und nach den Standardisierungen, mit (+) und ohne (-) LTA; $\pm$ SEM. IL-1 β : Interleukin 1 β ; LTA: Lipoteichonsäure.

Interleukin 6 (IL-6)

Genauso wie bei IL-1 β war beim repräsentativen Probanden die Konzentration an IL-6 nach der 6-stündigen Stimulation mit LTA in Zellkulturmedium sowohl vor als auch nach den Ernährungsumstellungen (Abb. 20) höher als ausschließlich in Zellkulturmedium behandelten Zellen. Im Mittel war die IL-6 Konzentration beim repräsentativen Probanden vor den Ernährungsumstellungen mit LTA Behandlung um 19 % erhöht, wohingegen sie nach den Ernährungsumstellungen um 20,9 % erhöht war. Beim Vergleich der delta-Ct-Werte des

Anstieg der Gesamt-IL-6-Proteinkonzentration der gepoolten Analyse (n = 8) im Zellmedium war dies nach den Ernährungsumstellungen um das 1,2-fache erhöht (Abb. 21). Die Effekte waren nicht signifikant.

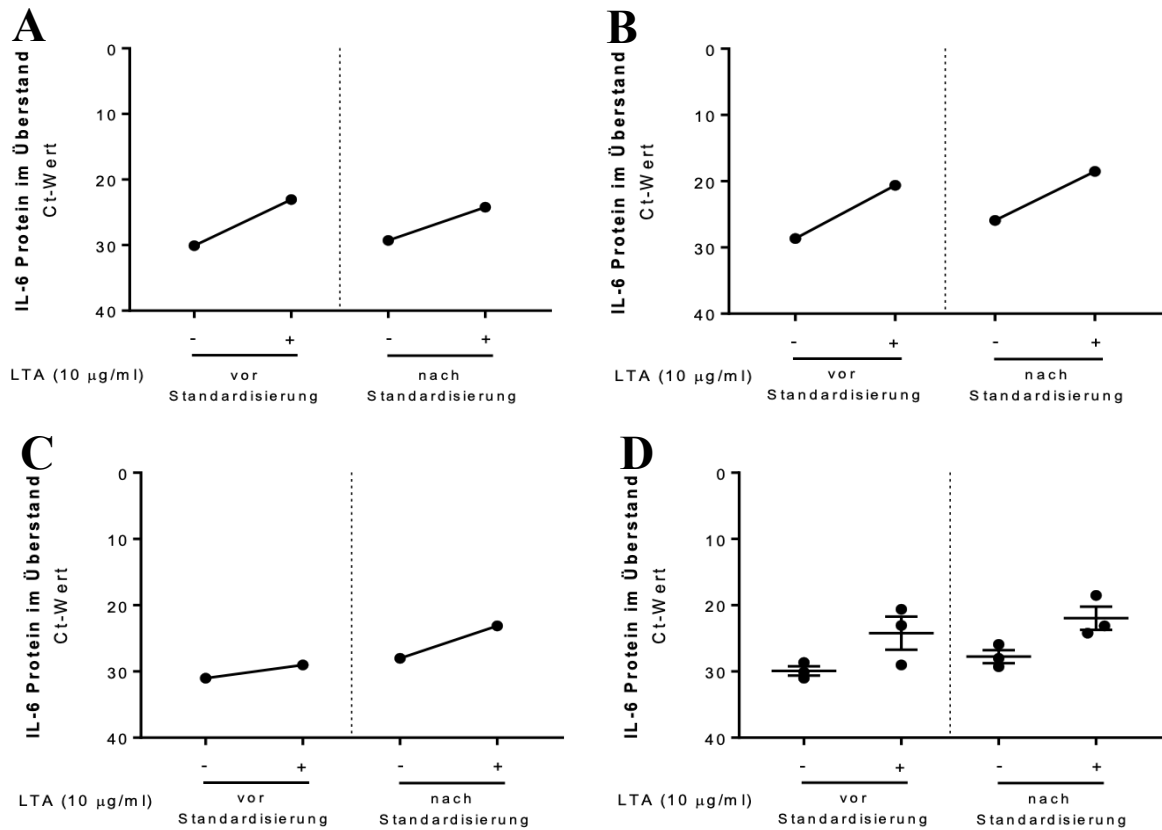


Abbildung 20: Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung bei einem repräsentativen Probanden auf die IL-6 Sekretion von PBMCs stimuliert mit und ohne LTA in Zellmedium (10 µg/ml). (A-C) IL-6 bei einem repräsentativen Probanden vor und nach der 1.-3. Intervention. (D) Gepoolte Analyse der IL-6 Konzentration des repräsentativen Probanden vor und nach den 3 Interventionen. Die Werte sind dargestellt als Ct-Werte vor und nach den Standardisierungen, mit (+) und ohne (-) LTA; $\pm$ SEM. IL-6: Interleukin 6; LTA: Lipoteichonsäure.

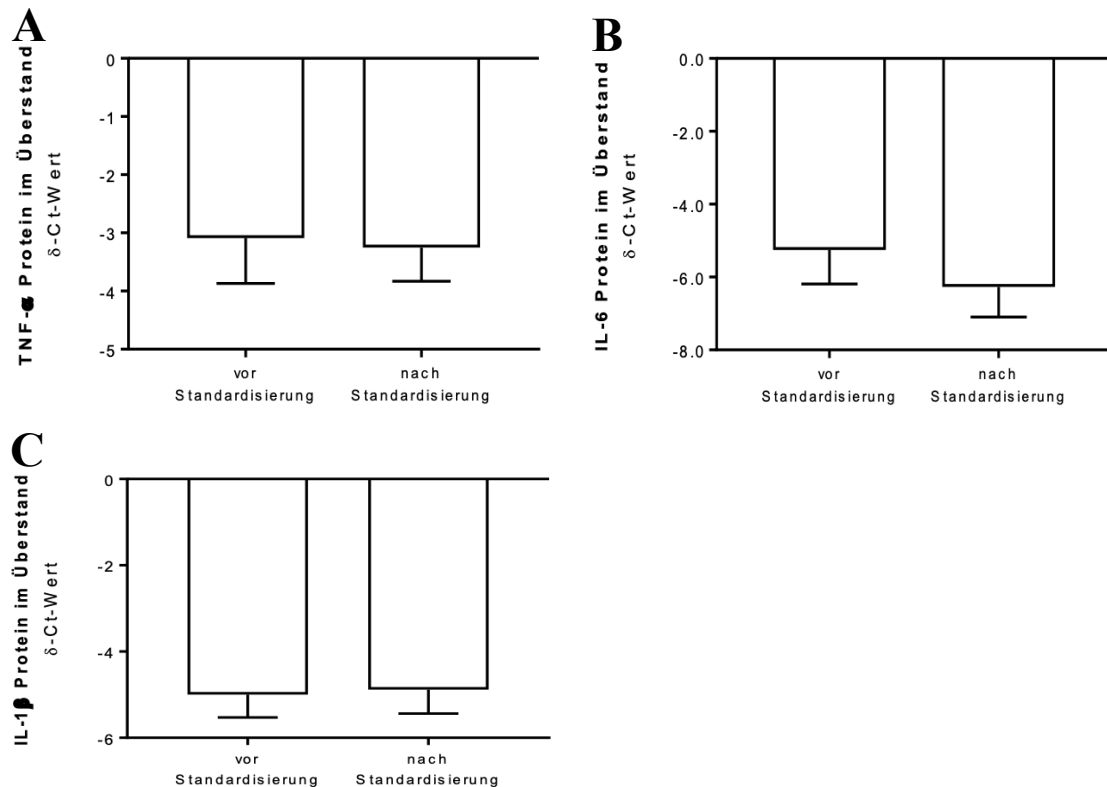


Abbildung 21: Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung bei gesunden Männern auf die TNF- α -, IL-1 β - und IL-6-Sekretion von PBMCs stimuliert mit und ohne LTA in Zellmedium (10 μ g/ml). (A-C) Gepoolte Analyse der Zytokin-Protein-Konzentrationen vor und nach der 1.-3. Intervention. TNF- α : n = 7; IL-1 β : n = 7; IL-6: n = 8; nicht stimulierbare Zellproben wurden ausgeschlossen. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte $\pm$ SEM. TNF- α : Tumornekrosefaktor α ; IL-6: Interleukin 6; IL-1 β : Interleukin 1 β .

4.5 Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung auf Marker der Darmbarrierefunktion: Intestinal-fatty acid binding protein, Cluster of differentiation 14, Toll-like Rezeptor-2 Liganden

Um zu untersuchen, ob eine wiederholte, dreitägige Ernährungsumstellung hin auf eine DGE-empfohlene Diät einen Einfluss auf Parameter der Darmbarrierefunktion hat, wurden von Mitgliedern der Arbeitsgruppe Parameter zur Darmbarrierefunktion untersucht und diese ausgewertet.

Intestinal-fatty acid binding protein (I-FABP)

Die 3 Interventionen zeigen unterschiedliche Ergebnisse beim repräsentativen Probanden (Abb. 22). Bei der gepoolten Analyse aller Probanden fand sich kein Unterschied (Abb. 25).

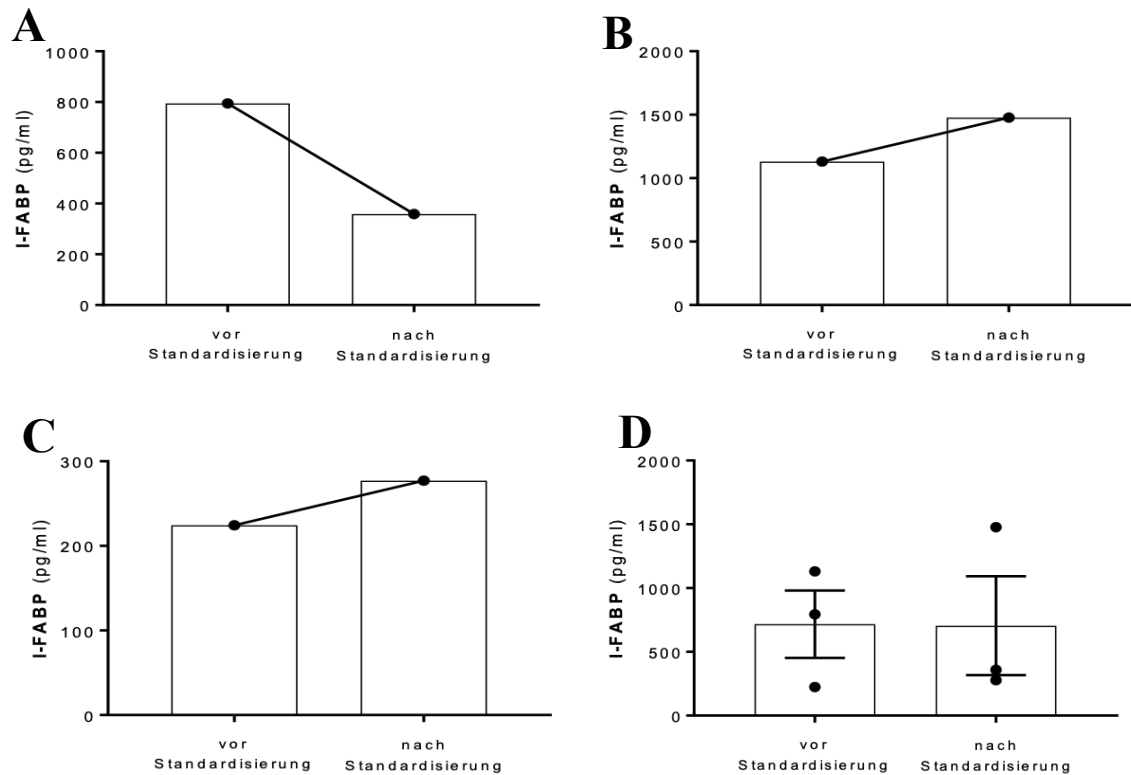


Abbildung 22: Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung bei einem repräsentativen Probanden auf die I-FABP Konzentration im Serum. (A-C) I-FABP Konzentration vor und nach der 1.-3. Intervention. (D) Gepoolte Analyse der I-FABP Konzentration des repräsentativen Probanden vor und nach den 3 Interventionen; $\pm$ SEM. I-FABP: intestinal- fatty acid binding protein.

Soluble cluster of differentiation (sCD14)

Die sCD14 Konzentration im Serum verringerte sich bei einem repräsentativen Probanden nach den drei Ernährungsinterventionen (Abb. 23). Bei der gepoolten Analyse aller Probanden kam es zu einer Reduktion von 2,9 % (Abb. 25).

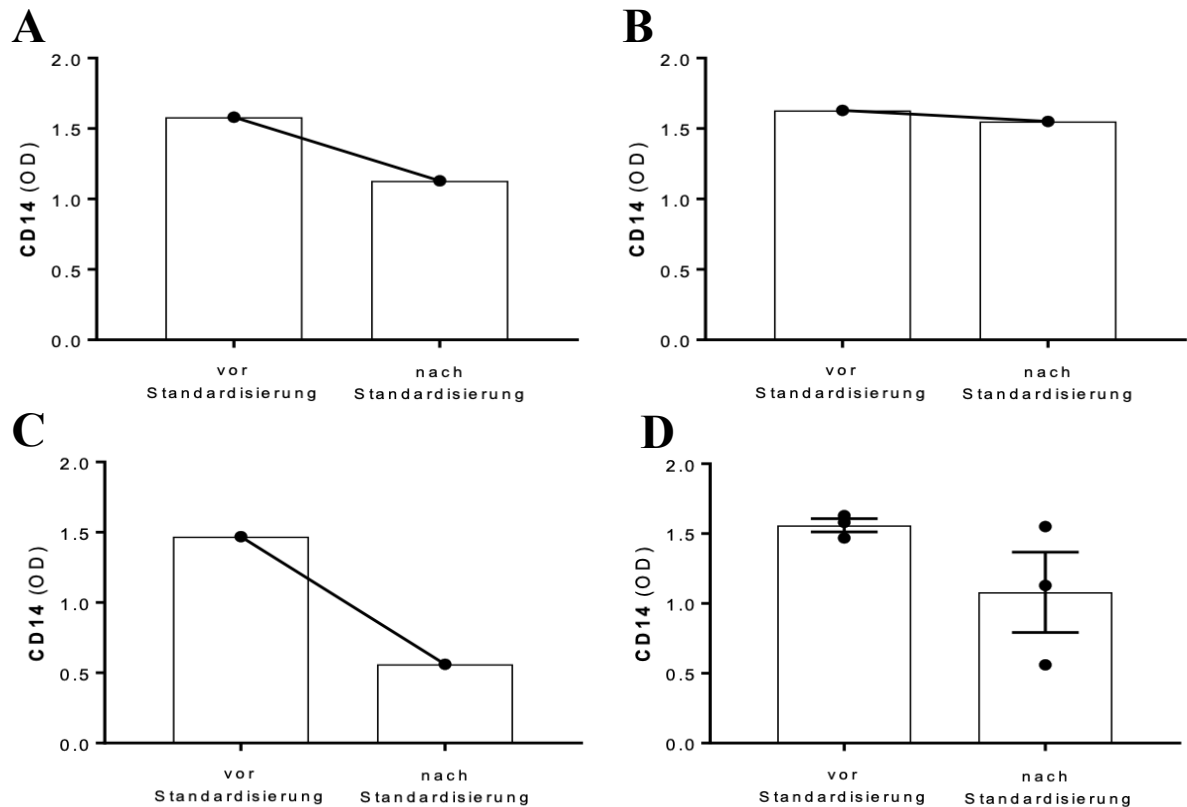


Abbildung 23: Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung bei einem repräsentativen Probanden auf die CD14 Konzentration im Serum. (A-C) CD14 Konzentration vor und nach der 1.-3. Intervention. (D) Gepoolte Analyse der CD14 Konzentration des repräsentativen Probanden vor und nach den 3 Interventionen; $\pm$ SEM. CD14: cluster of differentiation.

Toll-like Rezeptor-2 Liganden (TLR-2 Liganden)

Im Gegensatz dazu veränderte sich die Menge an TLR-2 Liganden bei einem repräsentativen Probanden nach den 3 Interventionen unterschiedlich (Abb. 24). Bei der gepoolten Analyse aller Probanden fand sich eine signifikante Reduktion von 8,2 % (Abb. 25).

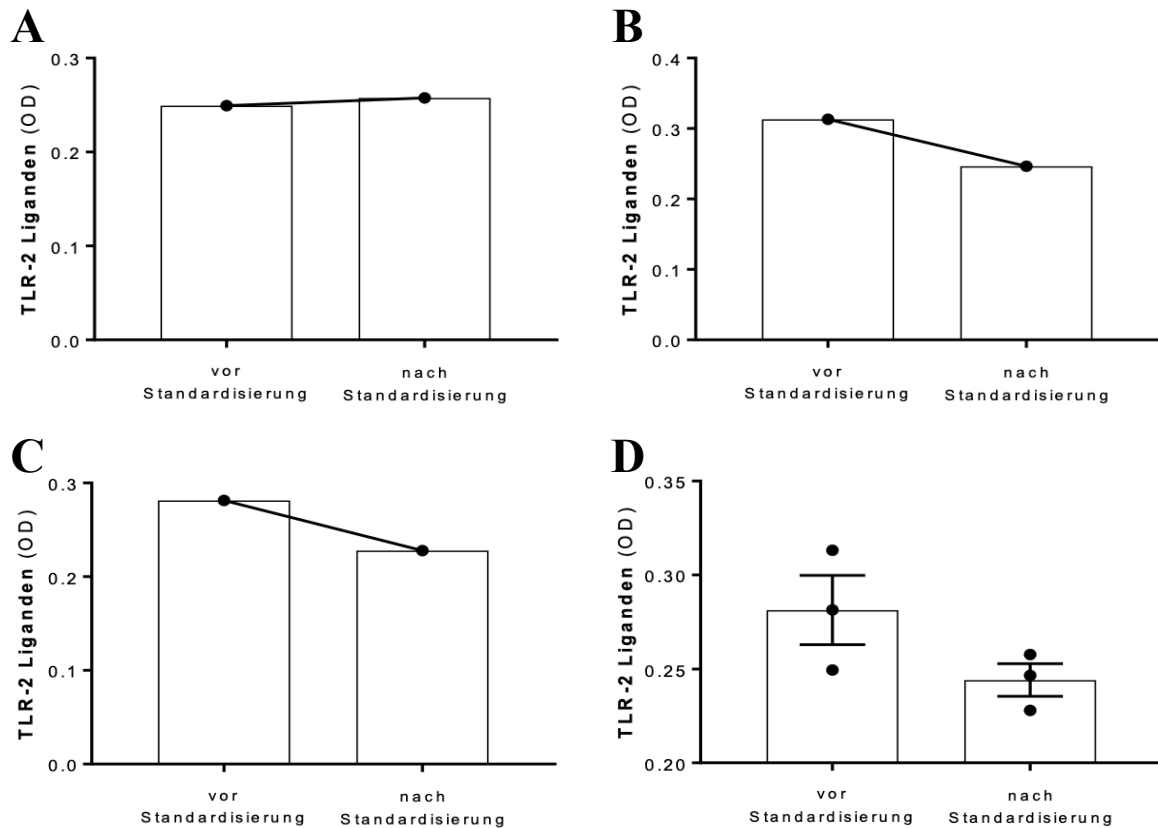


Abbildung 24: Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung bei einem repräsentativen Probanden auf TLR-2 Liganden. (A-C) TLR-2 Liganden vor und nach der 1.-3. Intervention. (D) Gepoolte Analyse der TLR-2 Liganden des repräsentativen Probanden vor und nach den 3 Interventionen; $\pm$ SEM. TLR-2: Toll-like-rezeptor 2.

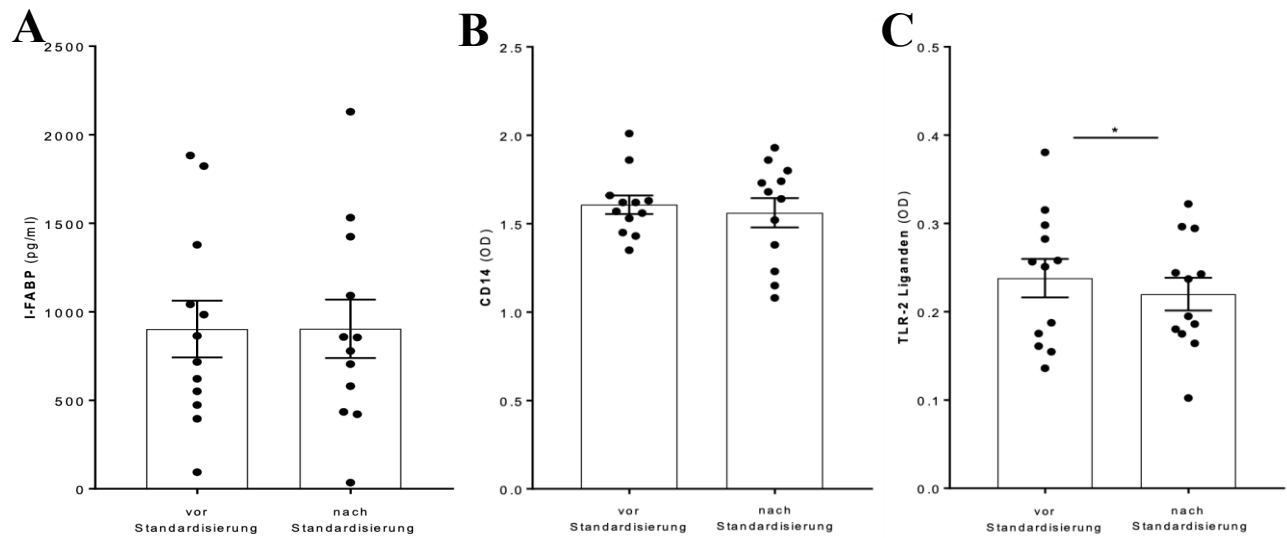


Abbildung 25: Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung bei gesunden Männern auf Parameter der Darmbarrierefunktion. (A-C) Gepoolte Analyse von Markern der Darmbarrierefunktion aller Probanden vor und nach den 3 Interventionen. Jeder Datenpunkt entspricht ein Proband bzw. den Mittelwert des jeweiligen Studienteilnehmers. * = ($p < 0.05$). I-FABP: $n = 12$; CD14: $n = 12$; TLR-2 Liganden: $n = 12$. I-FABP: intestinal-fatty acid binding protein; CD14: Cluster of differentiation 14; TLR-2: Toll-like Rezeptor-2. Die Balken stellen die Mittelwerte $\pm$ SEM dar.

5 Diskussion

Studiendaten geben Hinweise darauf, dass sich Ernährungsmuster auf die Funktion des Immunsystems und die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota auswirken können [32], [63], [71]. Inwiefern sich eine Ernährungsumstellung hin zu einer DGE-empfohlenen Diät auf das Immunsystem und die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota bei gesunden Erwachsenen auswirkt, ist noch nicht vollständig geklärt. Ausgehend von diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwiefern sich eine kurzfristige, isokalorische Ernährungsumstellung hin auf eine DGE-empfohlene Ernährung bei gesunden, männlichen Erwachsenen auf die LTA-vermittelte Immunantwort von PBMCs und die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota auswirkt. Zudem wurden klinisch chemische Parameter zur Lebergesundheit und Marker der Darmbarrierefunktion mit in die Auswertung einbezogen.

5.1 Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung auf die intestinale Mikrobiota

Um den Einfluss der Ernährungsumstellung hin auf eine DGE-empfohlene Diät auf die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Sequenzierungsdaten von Stuhlproben der Probanden ausgewertet. Aus den Analysen resultierte, dass die Ernährungsumstellung bei Betrachtung aller Studienteilnehmer keine signifikanten Unterschiede auf die Zusammensetzung der Mikrobiota, die α -Diversität sowie die β -Diversität hatte. Es zeigte sich jedoch, dass sich die Mikrobiota der Probanden auf individueller Ebene von T-3 hin zu T0 während jeder Intervention veränderten, wenn auch nicht im selben Ausmaß. Daten aus weiteren Studien zeigten ähnliche Ergebnisse [75]. Wastyk et al. untersuchten unter anderem den Einfluss einer kontinuierlichen Steigerung der Ballaststoffzufuhr (vor Beginn der Studie $21.5 \text{ g} \pm 8.0 \text{ g pro Tag}$; Ende der Studie $45.1 \pm 10.0 \text{ g pro Tag}$) bei gesunden Erwachsenen auf die Mikrobiota. Daraus resultierte, dass eine erhöhte Ballaststoffaufnahme insgesamt nicht mit einer erhöhten α -Diversität korrelierte und die Mikrobiotazusammensetzung über den Untersuchungszeitraum hinweg individuell variierte [75]. Es wird davon ausgegangen, dass gesunde Erwachsene eine relativ stabile Zusammensetzung der Mikrobiota aufweisen und diese gegenüber exogenen Einflüssen, wie z. B. einer kurzfristigen Änderung der Diät, relativ resilient sind [32], [113].

Daten aus einer weiteren Studie geben Aufschluss über den Zusammenhang zwischen dem Healthy Eating Index (HIE) und der intestinalen Mikrobiota [114]. Baldeon et al. sammelten über einen Zeitraum von 90 Tagen Ernährungsdaten mittels Fragebögen und eine einmalige Stuhlprobe von 432 Erwachsenen und werteten diese aus. Dabei zeigte sich, dass eine hohe Adhärenz zu den amerikanischen Ernährungsempfehlungen mit einer erhöhten α -Diversität assoziiert war, während eine verringerte Adhärenz mit einer reduzierten α -Diversität korrelierte [114]. Somit könnte die Dauer der 3-tägigen Ernährungsumstellung im Rahmen dieser Arbeit zu kurz sein, um einheitliche Änderungen zu beobachten. Zudem geht aus Studienergebnissen hervor, dass die Tageszeit bzw. der Zeitpunkt der Nahrungsaufnahme und der Stuhlprobenentnahme die Zusammensetzung der Mikrobiota beeinflussen kann, was bei den Probanden im Rahmen dieser Studie nicht einheitlich war [115]. Bei genauerer Betrachtung (Tabelle 11) der Auswertung der zwei 24 Stunden Recalls und der alltäglichen Ernährung der Probanden kann festgestellt werden, dass sich die Probanden vor der Ernährungsumstellung nicht exakt nach den Empfehlungen ernährten (39,5 % mehr gesättigte Fettsäuren, 46,7 % mehr Eiweiß, 25,6 % weniger Kohlenhydrate). Beispielsweise war die Ballaststoffaufnahme der Probanden bereits vor den Ernährungsumstellungen relativ hoch, jedoch führte die DGE-empfohlene Ernährungsumstellung zu einer erhöhten Aufnahme von Obst, Gemüse und Kohlenhydraten im Vergleich zur „normalen“ Ernährung der Probanden. Studienergebnisse weisen darauf hin, dass die Mikrobiotazusammensetzung neben Ballaststoffen auch von der Aufnahme von Proteinen, Fetten und Kohlenhydraten beeinflusst werden kann [32], [34], [40], [71], [113].

Insgesamt deuten die Ergebnisse der Mikrobiota Analyse darauf hin, dass die Ernährungsumstellung bei Betrachtung aller Probanden zu keinem einheitlichen Effekt führte. Die Mikrobiota der einzelnen Probanden änderte sich jedoch auf individueller Ebene nach allen drei Ernährungsinterventionen in unterschiedlichem Ausmaß.

5.2 Ernährungsumstellung, intestinale Mikrobiota und bakterielles Toxin als mögliche Faktoren für die Effekte auf klinisch chemische Parameter, die Darmbarrierefunktion und die Stimulierbarkeit von Immunzellen

Klinisch chemische Parameter

In der vorliegenden Arbeit verringerte sich die ALT Aktivität und der Harnsäurespiegel insgesamt signifikant ($p < 0.05$) nach den 3-tägigen Ernährungsumstellungen im Vergleich zum Ausgangswert. Im Gegensatz dazu veränderte sich die AST Aktivität im Serum nicht.

Auch bei Nier et al. kam es in Folge einer kurzfristigen, 4-tägigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin auf eine DGE-empfohlene Diät bei gesunden Probanden zu einer signifikanten ($p < 0.05$) Reduktion der ALT Aktivität im Plasma [63]. Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit kam es bei Nier et al. zu einer Reduktion der AST Aktivität im Plasma, diese war jedoch nicht signifikant [63]. Daten geben Hinweise darauf, dass ein Grund für diese Diskrepanzen das Studienkollektiv sein könnte: In der vorliegenden Arbeit wurden nur Männer in die Untersuchung mitaufgenommen, während in der Studie von Nier et al. auch Frauen teilnahmen [116]. Ergebnisse aus weiteren Studien geben Hinweise darauf, dass neben dem Geschlecht auch genetische Variationen einen Einfluss auf die AST Aktivität im Plasma haben können [117]. Weiters handelte es sich bei den Probanden im Rahmen dieser Arbeit sowie bei Nier et al. um gesunde Erwachsene, deren Ausgangs Parameter bereits im Normbereich lagen. Dies könnte ein Grund dafür sein, warum eine 3-tägige bzw. 4-tägige Ernährungsumstellung zu kurz sein könnte, um eine signifikante Reduktion aller klinisch-chemischen Parameter zu bewirken. Zudem geht aus Studiendaten hervor, dass die Zusammensetzung der Ernährung einen Einfluss auf den Harnsäurespiegel haben könnte [118], [119]. Eine Humanstudie untersuchte unter anderem den Einfluss einer 30-tägigen Dietary approach to stop hypertension (DASH)-Diät auf den Harnsäurespiegel bei Erwachsenen [119]. Eine DASH-Diät zeichnet sich durch einen hohen Verzehr von Gemüse, Früchten, gemäßigten Konsum von fettreduzierte/r/n Milch- und Milchprodukten, geringem Konsum von hellem Fleisch, Süßigkeiten, Fett und Salz aus. Somit bestehen deutliche Parallelen zur DGE-empfohlenen Diät [118]. Aus der 30-tägigen Ernährungsumstellung resultierte, dass es zu einer signifikanten Reduktion des Harnsäurespiegels bei den Studienteilnehmern kam [119]. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass neben der Dauer der Ernährungsintervention eine Diät reich an pflanzlichen Lebensmitteln und relativ arm an tierischen Produkten einen Einfluss auf den Harnsäurespiegel haben könnte und es bei einzelnen Studienteilnehmern erst längerfristig zu einer Reduktion der Harnsäurekonzentration kommen könnte. In Bezug auf die Zusammensetzung der Ernährung kam es durch die Ernährungsumstellungen im Rahmen dieser Arbeit zu einer signifikant erhöhten Aufnahme von Kohlenhydraten, während sich die Proteinaufnahme und die Aufnahme von gesättigten Fettsäuren im Vergleich zur „normalen“ Ernährung der Probanden signifikant verringerte. Studiendaten geben Hinweise darauf, dass eine chronisch erhöhte Fettaufnahme, insbesondere gesättigte Fettsäuren, sowie eine chronisch erhöhte Proteinaufnahme einen negativen Einfluss auf die Aktivität von Lebertransaminasen haben könnten [120], [121].

Neben den möglichen direkten Effekten der Ernährungsumstellung auf die klinisch chemischen Parameter können zudem Änderungen der Mikrobiota und bakterielle Toxine Einfluss auf klinisch chemische Parameter haben. Es gibt Hinweise, dass eine ausgewogene, pflanzenbetonte Ernährung (z. B. nach Empfehlungen der DGE) zur Aufrechterhaltung einer gesundheitsfördernden Mikrobiota und einer intakten Darmbarrierefunktion beitragen kann [41]. Dies könnte übermäßige, bakterielle Translokation vorbeugen und somit den Anteil an bakteriellen Toxinen, welche über die Portalvene in die Leber gelangen, verringern. Somit wäre die Leber weniger bakteriellen Toxinen ausgesetzt, was sich wiederum in der Verringerung von klinisch chemischen Parametern widerspiegeln könnte [122].

Um genau zu definieren, welcher/welche Faktor/en einen Effekt auf die Transaminasen und den Harnsäurespiegel haben, sind weitere Untersuchungen mit übergewichtigen und älteren Menschen, sowie Personen mit metabolischen Erkrankungen und weiblichen Personen nötig. Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass eine kurzfristige, isokalorische Ernährungsumstellung hin auf eine DGE-empfohlene Diät klinisch chemische Parameter von gesunden Männern optimieren kann.

Darmbarrierefunktion

Studienergebnisse weisen darauf hin, dass die Zusammensetzung der Ernährung Einfluss auf die Darmbarrierefunktion haben kann [52], [60], [123]. Die Arbeitsgruppe Bergheim konnte wiederholt zeigen, dass eine kurzfristige, isokalorische Ernährungsumstellung hin zu einer DGE-empfohlenen Ernährung in der Lage war, Marker der Darmbarrierefunktion zu verbessern und den Endotoxinspiegel im Serum zu reduzieren (siehe unten) [63], [99].

In der vorliegenden Arbeit waren zwar die Spiegel an TLR-2 Liganden insgesamt signifikant verringert, jedoch kam es zu keinen Änderungen der I-FABP Konzentration. Die Spiegel an sCD14 waren im Vergleich zu den Ausgangswerten reduziert.

Studien geben Hinweise darauf, dass die Konzentration von I-FABP im Plasma von der Zusammensetzung der Ernährung beeinflusst werden kann [123], [124]. Beispielsweise zeigen Daten aus einer Tierstudie, dass ein hoher Fettgehalt in der Diät mit einer erhöhten I-FABP Plasmakonzentration assoziiert ist [123]. In der Studie wurden Wistar Ratten in 3 Gruppen eingeteilt. Zwei Gruppen erhielten eine fettreiche Diät (Gruppe 1: 15 Energie %; Gruppe 2: 30 Energie %), die Kontrollgruppe erhielt eine herkömmliche Diät für 6 Wochen. Daraus resultierte, dass die zwei Gruppen mit einem erhöhten Fettgehalt in der Nahrung signifikant ($p < 0.05$) mehr I-FABP im Plasma aufwiesen [123]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit unterschied sich die Gesamtfettaufnahme in Energie % der Probanden vor und

nach der Ernährungsumstellung nicht signifikant. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass es nach der Ernährungsumstellung zu keiner Reduktion von I-FABP im Plasma kam. Jedoch zeigte sich, dass es einen signifikanten ($p < 0.05$) Unterschied in der Aufnahme von gesättigten Fettsäuren in Energie % bei den Probanden gab (24 Stunden Recall: 11.9 ± 1.2 ; Standardisierung: 7.2 ± 0.1). Hierbei gilt es zu beachten, dass die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Tierstudien auf den humanen Organismus nur bedingt möglich ist. Außerdem könnten die kurze Interventionsdauer der Studie (3 Tage) und die bereits im Normalbereich liegenden Ausgangs I-FABP Werte der Probanden im Rahmen dieser Arbeit für eine Reduktion von I-FBAP im Plasma nicht ausreichend gewesen sein. Nier et al. konnten nach einer kurzfristigen, viertägigen Ernährungsumstellung hin auf eine DGE-empfohlene Diät eine reduzierte mRNA Expression von TLR-2 Liganden in PBMCs ($p < 0.05$) messen [63]. Weiters zeigte die Auswertung der Daten im Rahmen der vorliegenden Arbeit, dass die Ernährungsumstellung bei den Probanden zu einer Reduktion von sCD14 führte. Als bedeutender Co-rezeptor und Vermittler für die Bindung von LTA an TLR-2 ist die Reduktion des membrangebundenen Rezeptors mit einer verminderten Darmpermeabilität assoziiert [125]. Möglicherweise haben auch individuelle Änderungen der Mikrobiota Einfluss auf die verbesserte Darmbarrierefunktion [53]. Studienergebnisse deuten darauf hin, dass bestimmte Bakterienfamilien durch ihre Stoffwechselprodukte zur Aufrechterhaltung der Darmbarrierefunktion beitragen können [52], [53], [126], [127]. Gleichzeitig werden bestimmte Bakterienfamilien mit einer Störung der intestinalen Barriere assoziiert, was wiederum eine vermehrte bakterielle Translokation zur Folge haben könnte, und im weiteren Verlauf die Lebergesundheit beeinträchtigen würde [41], [122].

Die Ergebnisse zum Einfluss einer Ernährungsumstellung hin auf eine DGE-empfohlene Diät bei gesunden, männlichen Erwachsenen auf die Darmbarrierefunktion deuten darauf hin, dass es zu einer verringerten luminalen, bakteriellen Translokation (z. B. LTA von grampositiven Bakterien) aufgrund der Reduktion von TLR-2 Liganden und sCD14 Proteine kam und somit die Permeabilität der Darmbarriere wahrscheinlich aufgrund der DGE-empfohlenen Diät sowie Änderungen in den Mikrobiota, reduziert wurde. Diese Beobachtungen könnten ein Indiz dafür sein, dass auch gesunde, junge Erwachsene ohne bestehende Erkrankungen ihre Darmbarrierefunktion mit einer Umstellung auf eine DGE-empfohlene Diät optimieren könnten und somit präventiv einer gestörten Darmbarriere entgegenwirken würden. Insgesamt weisen die Ergebnisse darauf hin, dass eine 3-tägige Ernährungsumstellung selbst bei gesunden Männern die Darmbarrierefunktion verbessern kann.

Stimulierbarkeit von Immunzellen

Die Untersuchung des Einflusses einer wiederholten, kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin auf eine von der DGE-empfohlene Diät auf die LTA-vermittelte Immunantwort von PBMCs bei gesunden Erwachsenen zeigte, dass sich die Sekretion von IL-6 und TNF- α nach den Interventionen und bei der gepoolten Analyse, mit Ausnahme von IL-1 β , tendenziell erhöhten. Da die Zellzahl, die in den Stimulationsversuchen verwendet wurde, teilweise niedrig war und infolgedessen der Anstieg der Zytokinsekretion nach LTA Stimulation ausblieb, konnten nicht in allen Fällen alle 3 Interventionen in die Auswertung einbezogen werden. Daten aus verschiedenen Studien geben Hinweise darauf, dass die Zusammensetzung der Ernährung als auch die intestinale Mikrobiota die Immunfunktion von gesunden Erwachsenen beeinflussen kann [85], [89]–[91]. Im Gegensatz zu den Beobachtungen im Rahmen dieser Arbeit kamen Wastyk et al. in ihrer prospektiven, randomisierten Humanstudie zum Ergebnis, dass eine 17-wöchige ballaststoffreiche Ernährung keine Änderungen in der LPS-vermittelten Zytokinreaktion von PBMCs auslöste [75]. Hierbei muss jedoch angemerkt werden, dass die Diät der Studienteilnehmer nicht hin auf eine DGE-empfohlene Ernährung umgestellt wurde und somit eine andere Zusammensetzung aufwies [75]. Weiters zeigte die Analyse der LTA-vermittelten Immunantwort, dass einige Probanden nicht immer auf die LTA-vermittelte Induktion einer Immunantwort reagierten. Laut Vidya et al. könnten die zugrundeliegenden Ursachen hierfür in der Expression von TLRs liegen. Es wird diskutiert, dass deren Expression von externen, internen, genetischen und Spezies-Faktoren mitbeeinflusst wird [128]. Daten deuten darauf hin, dass der Zellzyklus, in welchem sich die Immunzellen zum Zeitpunkt einer Stresssituation befinden, Einfluss auf die Expression von TLRs haben kann [129]. Zudem gibt es Hinweise aus einer Tierstudie, dass die Expression von TLR-2 von klimatischen Bedingungen und dem Ernährungsstatus abhängen kann [130]. Neben diesen Faktoren werden genetische Umstände diskutiert, welche die Funktion von TLRs beeinflussen können [128]. Sogenannte „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs) in Genen, welche für TLRs kodieren, können die Resistenz eines Individuums gegenüber PAMPs beeinflussen [131]. Studien weisen darauf hin, dass R677W den häufigsten TLR-2 SNP darstellt. Individuen mit diesem SNP weisen eine verringerte Kapazität zur Erkennung von PAMPs auf [132]. Zudem wird diskutiert, dass R677W zu einer verminderten Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α führen könnte. Hierzu sind weitere Untersuchungen notwendig, da Studien den Einfluss der genannten SNPs unterschiedlich stark bewerten [133]. Ein weiterer SNP, der so-

genannte R753Q in der TIR-Domäne von TLR-2, wird mit einer verminderten NF- κ B Expression assoziiert [133]. Dies könnte in einer reduzierten Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α resultieren [133], [134]. Weitere Studien sind notwendig, um Ursachen für die teilweise geringe LTA-induzierte Immunantwort in PBMCs genauer zu untersuchen. Zudem soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die Zytokine teilweise unter der Nachweisgrenze lagen und der Datensatz nur deskriptiv und mit Vorsicht zu interpretieren ist.

Zudem können Änderungen der Mikrobiota und die Reduktion von bakteriellen Toxinen für den Effekt auf die Immunantwort mit verantwortlich sein [126]. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Ernährungsumstellung die Darmbarrierefunktion verbesserte, wodurch es zu einer Reduktion immunmodulatorischer Effekte in der Leber (z. B. LTA-induzierte TLR-2 Signalkaskade) kam. Es gibt Hinweise darauf, dass eine intakte Darmbarriere die Funktion von Immunzellen positiv beeinflussen kann [135]. Die individuellen Änderungen der Mikrobiotazusammensetzung könnten immunmodulatorische Effekte verursacht haben [126]. Weitere Daten aus Studien weisen darauf hin, dass Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen die Funktion von Immunzellen beeinflussen können. Beispielsweise liefern Studiendaten Hinweise darauf, dass eine Ernährung reich an Gemüse, Obst und komplexen Kohlenhydraten (ähnlich wie DGE-empfohlene Ernährung) die Produktion von SCFAs im Kolon erhöhen [54]. Die kurzkettigen Fettsäuren sind in der Lage, sowohl im Darmlumen als auch in der Peripherie die Funktion von Immunzellen zu optimieren und damit möglicherweise auch deren Stimulierbarkeit zu erhöhen [126].

Die Ergebnisse zum Einfluss einer Ernährungsumstellung hin auf eine DGE-empfohlene Diät bei gesunden, männlichen Erwachsenen auf die Immunantwort deuten darauf hin, dass es zu einer tendenziell erhöhten LTA-vermittelten Zytokinexpression (mit Ausnahme von IL-1 β) von PBMCs nach der empfohlenen Ernährung kam. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Immunzellen nach einer DGE-empfohlenen Diät, möglicherweise durch eine Verbesserung der Darmbarrierefunktion und Änderungen der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota, stärker stimulierbar sind. Aufgrund der Einzigartigkeit des Studiendesigns und des Mangels an weiterer Literatur sind zusätzlichen Untersuchungen mit ähnlichem Studiendesign nötig, welche die längerfristigen Effekte einer Ernährungsumstellung auf die Immunantwort ermitteln. Inwiefern die Änderungen der intestinalen Mikrobiota mit den Änderungen der Immunantwort nach der Ernährungsumstellung auf eine von der DGE empfohlene Diät im Kontext stehen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend

geklärt werden. Dafür sind weitere Untersuchungen notwendig, welche ein großes Studienkollektiv für einen längeren Zeitraum untersuchen.

6 Schlussfolgerung

Insgesamt deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass eine kurzfristige, isokalorische Ernährungsumstellung hin auf eine DGE-empfohlene Diät bei gesunden männlichen Erwachsenen zu individuellen Veränderungen der Mikrobiotazusammensetzung während den einzelnen Standardisierungen führte, jedoch bei der Betrachtung aller Probanden zu keinen allgemein gültigen Änderungen in der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota sowie deren α -Diversität und β -Diversität. Der Einfluss der Ernährungsumstellung auf die LTA-vermittelte Immunantwort in PBMCs zeigte, dass PBMCs tendenziell stärker stimulierbar sind und mehr die Zytokine IL-6 und TNF- α ausschütteten. Jedoch sind weitere Studien nötig für eine abschließende Aussage, da nicht alle Proben in die Auswertung eingeschlossen werden konnten. Außerdem deuten die Daten dieser Arbeit darauf hin, dass die DGE-empfohlene Diät Marker der Lebergesundheit verbesserte (mit der Ausnahme der AST Aktivität) und den Harnsäurespiegel im Serum reduzierte. Zudem lässt sich aus der Datenauswertung schließen, dass sich die Darmbarrierefunktion der Probanden nach der Ernährungsumstellung hin auf eine gesunde Ernährung insgesamt verbesserte, da sich Marker für eine gestörte Darmbarrierefunktion (mit Ausnahme von I-FABP) reduzierten. Inwiefern die Änderungen der intestinalen Mikrobiota im Kontext zu den Änderungen der untersuchten Parameter stehen, konnte in dieser Arbeit nicht ausreichend geklärt werden. Hierfür sind weitere Langzeituntersuchungen, insbesondere Studien mit einer größeren Stichprobe, notwendig. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hindeuten, dass eine Ernährungsumstellung hin auf eine DGE-empfohlene Diät selbst bei gesunden Erwachsenen gesundheitliche Vorteile mit sich bringen kann. Basierend darauf könnten Studien, welche dieselben Parameter zum Beispiel bei älteren Personen im Vergleich zu Jüngeren, Menschen mit Übergewicht im Vergleich zu Normalgewichtigen und Menschen mit Stoffwechselstörungen im Vergleich zu Gesunden untersuchen, das Verständnis für zugrundeliegende Mechanismen verbessern und Aufschlüsse über das Potential der Gesundheitsförderung einer Ernährungsumstellung hin auf eine DGE-empfohlene Diät im Kontext von Alter, Gewicht und Gesundheitsstatus liefern. Außerdem könnten Untersuchungen, welche den Effekt einer Ernährungsumstellung hin auf eine DGE-empfohlene Diät im Kontext von bakteriellen und viralen Infektionen untersuchen, dazu beitragen, die Auswirkungen einer gesunden Ernährung auf das Immunsystem besser zu verstehen.

7 Zusammenfassung

Ernährungsempfehlungen haben zum Ziel, die Gesundheit der Bevölkerung zu optimieren. Aus Studienergebnissen geht hervor, dass sich Ernährungsmuster auf die Immunfunktion und die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota auswirken können. Welchen Einfluss eine von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung- (DGE) empfohlene Ernährung auf die Immunfunktion und die Mikrobiota hat, ist noch nicht ausreichend geklärt. Ausgehend von diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwiefern sich eine wiederholte, kurzfristige, isokalorische Ernährungsumstellung hin auf eine DGE-empfohlene Diät bei 12 gesunden Männern auf die Zusammensetzung der Mikrobiota, die Lipoteichonsäure- (LTA) vermittelte Immunantwort in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs), Marker der Darmbarrierefunktion sowie auf klinisch chemische Parameter auswirkt. Vor und nach den Interventionen wurden Stuhl- und Blutproben entnommen. Die bioinformatische Analyse der 16S rRNA Sequenzierungsdaten der Stuhlproben weisen darauf hin, dass die Ernährungsumstellungen zu individuellen Änderungen der Mikrobiotazusammensetzung führte, jedoch bei der Betrachtung aller Probanden keine allgemein gültigen Änderungen in der Zusammensetzung der Mikrobiota auftraten. Die Ernährungsumstellungen führten zu einer Reduktion der Alanin-Amino-Transferase (ALT) Aktivität und des Harnsäurespiegels, während sich die Aspartat-Amino-Transferase (AST) Aktivität nicht veränderte. Die Ergebnisse der Stimulation von PBMCs mit LTA weisen darauf hin, dass es nach den Ernährungsinterventionen tendenziell zu einer erhöhten Sekretion von Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und Interleukin 6 (IL-6) im Gegensatz zu Interleukin 1 β (IL-1 β) kam. Während Marker der Darmbarrierefunktion wie die Konzentration von Toll-like Rezeptor-2 (TLR-2) Liganden und soluble cluster of differentiation 14 (sCD14) Protein im Serum nach den Ernährungsumstellungen geringer wurden, fanden sich in der vorliegenden Arbeit keine Veränderungen des intestinal-fatty acid binding protein (I-FABP) Proteinspiegels. Inwiefern die individuellen Änderungen der Mikrobiota im Kontext zu den Änderungen der untersuchten Parameter stehen, konnte nicht abschließend geklärt werden. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass eine kurzfristige, isokalorische Ernährungsumstellung hin auf eine DGE-empfohlene Ernährung selbst bei gesunden Männern Marker der Darmbarrierefunktion und die Lebergesundheit verbessert, die Stimulierbarkeit von Immunzellen beeinflussen kann und sich auf die individuelle Analyse der

Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota auswirkt. Im Rahmen weiterer Untersuchungen sollten die Effekte einer Ernährungsumstellung bei älteren Menschen und Menschen mit Vorerkrankungen im Kontext von Geschlecht, bakteriellen und viralen Infektionen untersucht werden, um zugrundeliegende Mechanismen besser zu verstehen.

8 Summary

Dietary recommendations mainly aim to enhance human health in broad populations. Indeed, studies have demonstrated that dietary patterns can impact both host immune function as well as intestinal microbiota composition. It has not been clarified yet, if and how a diet according to the recommendations of the German Nutrition Society (DGE) impacts immune function and microbiota. In the light of the above, this Master's thesis investigated whether a repeated, short term, isocaloric DGE-based dietary intervention in 12 healthy men has an impact on gut microbiota composition, lipoteichoic acid- (LTA) induced immune response in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), markers of intestinal barrier function as well as liver health. Fecal and blood samples of the participants were collected both before and after the interventions. The bioinformatical analysis of the 16S rRNA sequencing data from the fecal samples revealed, that the interventions were associated with individual changes in the composition of the microbiota. However, overall microbiota composition did not change significantly. Alanine-amino-transferase (ALT) activity as well as uric acid concentration in serum decreased after the interventions, whereas aspartate-amino-transferase (AST) activity was not changed. Overall, the results of the lipoteichoic acid (LTA)-induced immune response in PBMCs suggests that, following the dietary interventions, there was a tendency towards an increased secretion of tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6), in contrast to interleukin 1 β (IL-1 β). Concentrations of Toll-like receptor-2 (TLR-2) ligands and soluble cluster of differentiation 14 (sCD14) protein in serum decreased following the dietary change, while intestinal-fatty acid binding (I-FABP) protein did not. The extent to which the individual alterations in microbiota composition relate to changes in the examined parameters could not be determined sufficiently. In summary, the results of this study suggest that a short-term, isocaloric DGE-based dietary intervention improves parameters of intestinal barrier function and liver health in healthy young men, affects immune response in PBMCs and changes the individual gut microbiota composition. Further studies are needed to determine if effects alike are also present in other populations, e.g., elderly, individuals with diseases and females in the context of bacterial and viral infections. This will help to better understand the underlying mechanisms.

9 Literaturverzeichnis

- [1] U. Hauber, M. Neuh, und / Iuser-Berthold, „Historische Entwicklung von Empfehlungen zur Nährstoffzufuhr“, 1996.
- [2] B. O. Schneeman, „Evolution of dietary guidelines“, in *Journal of the American Dietetic Association*, W.B. Saunders, 2003, S. 5–9. doi: 10.1016/j.jada.2003.09.030.
- [3] A. E. Harper, „Origin of Recommended Dietary Allowances - an historic review“, 1985. [Online]. Verfügbar unter: <https://academic.oup.com/ajcn/article-abstract/41/1/140/4691458>
- [4] A. E. Harper, „EVOLUTION OF RECOMMENDED DIETARY ALLOWANCES- New Directions?“, 1987. [Online]. Verfügbar unter: www.annualreviews.org
- [5] M. Nestle, „Food lobbies, the food pyramid, and U.S. nutrition policy“, *International Journal of Health Services*, Bd. 23, Nr. 3. S. 483–496, 1993. doi: 10.2190/32F2-2PFB-MEG7-8HPU.
- [6] K. L. Hefferon, S. Downs, G. O. Olu, und H. De Steur, „Editorial: Sustainable Development Goals (SDGs): Impact on Nutrition“, *Frontiers in Nutrition*, Bd. 8. Frontiers Media S.A., 28. Mai 2021. doi: 10.3389/fnut.2021.676080.
- [7] W. Willett u. a., „Food in the Anthropocene: the EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems“, *The Lancet*, Bd. 393, Nr. 10170. Lancet Publishing Group, S. 447–492, 2. Februar 2019. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31788-4.
- [8] B. Renner, U. Arens-Azevêd, B. Watzl, M. Richter, K. Virmani, und J. Linseisen, „DGE position statement on a more sustainable diet“, *Ernährungs Umschau*, Nr. 7, S. 144–154, 2021, doi: 10.4455/eu.2021.030.
- [9] P. Reed, J. Haven, E. E. Stoodly, K. L. Piercy, und J. M. de Jesus, „Looking ahead to the Dietary Guidelines for Americans, 2025–2030: a call to action“, *American Journal of Clinical Nutrition*, Bd. 117, Nr. 6, S. 1061–1062, Juni 2023, doi: 10.1016/j.ajcnut.2023.03.028.
- [10] Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Österreichische Gesellschaft für Ernährung, und Schweizerische Gesellschaft für Ernährung, „Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr“, Bonn, 2018.
- [11] A. Bechthold, „Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr“, *Ernährungs Umschau*, Bd. 6, S. 346–353, 2009.
- [12] L. G. Snetselaar, J. M. De Jesus, D. M. Desilva, und E. E. Stoodly, „Dietary Guidelines for Americans, 2020-2025: Understanding the Scientific Process, Guidelines, and Key Recommendations“, *Nutr Today*, Bd. 56, Nr. 6, S. 287–295, Dez. 2021, doi: 10.1097/NT.0000000000000512.
- [13] M. Arnold, M. S. Sierra, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, und F. Bray, „Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality“, *Gut*, Bd. 66, Nr. 4, S. 683–691, Apr. 2017, doi: 10.1136/gutjnl-2015-310912.
- [14] V. De Cosmi, A. Mazzocchi, G. P. Milani, und C. Agostoni, „Dietary Patterns vs. Dietary Recommendations“, *Frontiers in Nutrition*, Bd. 9. Frontiers Media S.A., 3. Mai 2022. doi: 10.3389/fnut.2022.883806.
- [15] Joint FAO/WHO Consultation, „Preparation and use of food-based dietary guidelines“, Geneva, 1998. Zugegriffen: 22. Juli 2023. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.who.int/publications/i/item/9241208805>
- [16] P. Douglas, „Food-based dietary guidelines for children and adolescents“, *Front Public Health*, 2022, doi: 10.17605/OSF.IO/J5Z6R.

- [17] A. Herforth, M. Arimond, C. Álvarez-Sánchez, J. Coates, K. Christianson, und E. Muehlhoff, „A Global Review of Food-Based Dietary Guidelines“, *Advances in Nutrition*, Bd. 10, Nr. 4. Oxford University Press, S. 590–605, 1. Juli 2019. doi: 10.1093/advances/nmy130.
- [18] Deutsche Gesellschaft für Ernährung, „Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) - DGE Ernährungskreis“. Zugegriffen: 22. Juli 2023. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.dge.de/gesunde-ernaehrung/dge-ernaehrungsempfehlungen/dge-ernaehrungskreis/fleisch-wurst-fisch-und-eier/>
- [19] C. Maria Gonzalez Fischer, „Plates, pyramids, planet. Developments in national healthy and sustainable dietary guidelines: a state of play assessment Towards the sustainability of the Argentine countryside: management and conservation of vertebrate wildlife in agroecosystems. View project“, 2016. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.researchgate.net/publication/303712683>
- [20] C. Montagnese u. a., „European food-based dietary guidelines: A comparison and update“, *Nutrition*, Bd. 31, Nr. 7–8. Elsevier Inc., S. 908–915, 2015. doi: 10.1016/j.nut.2015.01.002.
- [21] Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE), „Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) - DGE Ernährungskreis“. Zugegriffen: 23. Juli 2023. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.dge.de/gesunde-ernaehrung/dge-ernaehrungsempfehlungen/dge-ernaehrungskreis/getraenke/>
- [22] G. P. und K. (BMSGPK) Bundesministerium für Soziales, „Die österreichische Ernährungspyramide“. Zugegriffen: 30. Juli 2023. [Online]. Verfügbar unter: <https://broschuerenservice.sozialministerium.at/Home/Download?publicationId=524>
- [23] Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE), „Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) - DGE Ernährungskreis“. Zugegriffen: 30. Juli 2023. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.dge.de/fileadmin/Bilder/gesunde-ernaehrung/ernaehrungsempfehlung/kreis/dge-kreis-ganz.png>
- [24] Schweizerische Gesellschaft für Ernährung (SGE), „Schweizerische Gesellschaft für Ernährung (SGE) - Schweizer Lebensmittelpyramide“. Zugegriffen: 30. Juli 2023. [Online]. Verfügbar unter: https://www.blv.admin.ch/blv/de/home/lebensmittel-und-ernaehrung/ernaehrung/empfehlungen-informationen/schweizer-lebensmittelpyramide/_jcr_content/par/image/image.imagespooler.jpg/1660114556909/lebensmittelpyramide-4-3.jpg
- [25] Deutsche Gesellschaft für Ernährung, „Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) - DGE-Ernährungskreis“, Juli 2023, Zugegriffen: 22. Juli 2023. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.dge.de/gesunde-ernaehrung/dge-ernaehrungsempfehlungen/dge-ernaehrungskreis/gemuese-und-salat/>
- [26] Deutsche Gesellschaft für Ernährung, „Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) - DGE-Ernährungskreis“. Zugegriffen: 22. Juli 2023. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.dge.de/gesunde-ernaehrung/dge-ernaehrungsempfehlungen/dge-ernaehrungskreis/getreide-getreideprodukte-und-kartoffeln/>
- [27] Österreichische Gesellschaft für Ernährung, „Öffentliches Gesundheitsportal Österreich - Ernährungspyramide: Milch und Milchprodukte“. Zugegriffen: 22. Juli 2023. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.gesundheit.gv.at/leben/ernaehrung/info/oesterreichische-ernaehrungspyramide.html>
- [28] Deutsche Gesellschaft für Ernährung, „Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) - DGE-Ernährungskreis“. Zugegriffen: 22. Juli 2023. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.dge.de/gesunde-ernaehrung/dge-ernaehrungsempfehlungen/dge-ernaehrungskreis/milch-und-milchprodukte/>

- [29] Schweizerische Gesellschaft für Ernährung (SGE), „Schweizerische Gesellschaft für Ernährung (SGE) - Milch und Milchprodukte“, Juli 2023, Zugegriffen: 22. Juli 2023. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.sge-ssn.ch/ich-und-du/rund-um-lebensmittel/lebensmittelgruppen/milch-und-milchprodukte/>
- [30] Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE), „Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) - DGE-Ernährungskreis“. Zugegriffen: 23. Juli 2023. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.dge.de/gesunde-ernaehrung/dge-ernaehrungsempfehlungen/dge-ernaehrungskreis/oele-und-fette/>
- [31] Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE), „Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) - DGE-Ernährungskreis“. Zugegriffen: 22. Juli 2023. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.dge.de/gesunde-ernaehrung/dge-ernaehrungsempfehlungen/dge-ernaehrungskreis/>
- [32] N. Zmora, J. Suez, und E. Elinav, „You are what you eat: diet, health and the gut microbiota“, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, Bd. 16, Nr. 1. Nature Publishing Group, S. 35–56, 1. Jänner 2019. doi: 10.1038/s41575-018-0061-2.
- [33] E. C. Martens, M. Neumann, und M. S. Desai, „Interactions of commensal and pathogenic microorganisms with the intestinal mucosal barrier“, *Nature Reviews Microbiology*, Bd. 16, Nr. 8. Nature Publishing Group, S. 457–470, 1. August 2018. doi: 10.1038/s41579-018-0036-x.
- [34] A. Adak und M. R. Khan, „An insight into gut microbiota and its functionalities“, *Cellular and Molecular Life Sciences*, Bd. 76, Nr. 3. Birkhauser Verlag AG, S. 473–493, 15. Februar 2019. doi: 10.1007/s00018-018-2943-4.
- [35] J. L. Round und S. K. Mazmanian, „The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease“, *Nature Reviews Immunology*, Bd. 9, Nr. 5. S. 313–323, Mai 2009. doi: 10.1038/nri2515.
- [36] F. Bäckhed, R. E. Ley, J. L. Sonnenburg, D. A. Peterson, und J. I. Gordon, „Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine“, *Science (1979)*, Bd. 307, S. 1915–1920, 2005, [Online]. Verfügbar unter: <http://science.sciencemag.org/>
- [37] R. E. Ley, D. A. Peterson, und J. I. Gordon, „Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine“, *Cell*, Bd. 124, Nr. 4. Elsevier B.V., S. 837–848, 24. Februar 2006. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.017.
- [38] F. Bäckhed, R. E. Ley, J. L. Sonnenburg, D. A. Peterson, und J. I. Gordon, „Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine“. [Online]. Verfügbar unter: <http://science.sciencemag.org/>
- [39] S. J. Bultman, „Interplay between diet, gut microbiota, epigenetic events, and colorectal cancer“, *Molecular Nutrition and Food Research*, Bd. 61, Nr. 1. Wiley-VCH Verlag, 1. Jänner 2017. doi: 10.1002/mnfr.201500902.
- [40] M. Wolters u. a., „Dietary fat, the gut microbiota, and metabolic health – A systematic review conducted within the MyNewGut project“, *Clinical Nutrition*, Bd. 38, Nr. 6. Churchill Livingstone, S. 2504–2520, 1. Dezember 2019. doi: 10.1016/j.clnu.2018.12.024.
- [41] H. Tilg, N. Zmora, T. E. Adolph, und E. Elinav, „The intestinal microbiota fuelling metabolic inflammation“, *Nature Reviews Immunology*, Bd. 20, Nr. 1. Nature Research, S. 40–54, 1. Jänner 2020. doi: 10.1038/s41577-019-0198-4.
- [42] C. L. Maynard, C. O. Elson, R. D. Hatton, und C. T. Weaver, „Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system“, *Nature*, Bd. 489, Nr. 7415. S. 231–241, 13. September 2012. doi: 10.1038/nature11551.

- [43] M. Rajilić-Stojanović, H. G. H. J. Heilig, S. Tims, E. G. Zoetendal, und W. M. De Vos, „Long-term monitoring of the human intestinal microbiota composition“, *Environ Microbiol*, Bd. 15, Nr. 4, S. 1146–1159, Apr. 2013, doi: 10.1111/1462-2920.12023.
- [44] W. M. De Vos, H. Tilg, M. Van Hul, und P. D. Cani, „Gut microbiome and health: Mechanistic insights“, *Gut*. BMJ Publishing Group, 2022. doi: 10.1136/gutjnl-2021-326789.
- [45] I. Cho und M. J. Blaser, „The human microbiome: At the interface of health and disease“, *Nature Reviews Genetics*, Bd. 13, Nr. 4, S. 260–270, April 2012. doi: 10.1038/nrg3182.
- [46] A. Metwaly, S. Reitmeier, und D. Haller, „Microbiome risk profiles as biomarkers for inflammatory and metabolic disorders“, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, Bd. 19, Nr. 6. Nature Research, S. 383–397, 1. Juni 2022. doi: 10.1038/s41575-022-00581-2.
- [47] D. Rothschild u. a., „Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota“, *Nature*, Bd. 555, Nr. 7695, S. 210–215, März 2018, doi: 10.1038/nature25973.
- [48] D. Rothschild u. a., „Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota“, *Nature*, Bd. 555, Nr. 7695, S. 210–215, März 2018, doi: 10.1038/nature25973.
- [49] J. K. Goodrich u. a., „Human genetics shape the gut microbiome“, *Cell*, Bd. 159, Nr. 4, S. 789–799, Nov. 2014, doi: 10.1016/j.cell.2014.09.053.
- [50] A. Metwaly, S. Reitmeier, und D. Haller, „Microbiome risk profiles as biomarkers for inflammatory and metabolic disorders“, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, Bd. 19, Nr. 6. Nature Research, S. 383–397, 1. Juni 2022. doi: 10.1038/s41575-022-00581-2.
- [51] E. Untersmayr, A. Brandt, L. Koidl, und I. Bergheim, „The Intestinal Barrier Dysfunction as Driving Factor of Inflammation“, *Nutrients*, Bd. 14, Nr. 5. MDPI, 1. März 2022. doi: 10.3390/nu14050949.
- [52] J. König u. a., „Human intestinal barrier function in health and disease“, *Clin Transl Gastroenterol*, Bd. 7, Nr. 10, Okt. 2016, doi: 10.1038/ctg.2016.54.
- [53] T. Takiishi, C. I. M. Fenero, und N. O. S. Câmara, „Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life“, *Tissue Barriers*, Bd. 5, Nr. 4. Taylor and Francis Inc., 2. Oktober 2017. doi: 10.1080/21688370.2017.1373208.
- [54] D. J. Morrison und T. Preston, „Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism“, *Gut Microbes*, Bd. 7, Nr. 3. Taylor and Francis Inc., S. 189–200, 3. Mai 2016. doi: 10.1080/19490976.2015.1134082.
- [55] M. E. V Johansson u. a., „The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria“, 2008. [Online]. Verfügbar unter: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0803124105
- [56] K. Pütsep u. a., „Germ-free and colonized mice generate the same products from enteric prodefensins“, *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 275, Nr. 51, S. 40478–40482, Dez. 2000, doi: 10.1074/jbc.M007816200.
- [57] A. J. Macpherson und T. Uhr, „Induction of Protective IgA by Intestinal Dendritic Cells Carrying Commensal Bacteria“, *Science (1979)*, Bd. 303, Nr. 5664, S. 1662–1665, März 2004, doi: 10.1126/science.1091334.
- [58] M. A. Odenwald und J. R. Turner, „The intestinal epithelial barrier: A therapeutic target?“, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, Bd. 14, Nr. 1. Nature Publishing Group, S. 9–21, 1. Jänner 2017. doi: 10.1038/nrgastro.2016.169.

- [59] A. M. Marchiando, W. V. Graham, und J. R. Turner, „Epithelial barriers in homeostasis and disease“, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, Bd. 5. S. 119–144, 2. Februar 2010. doi: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092135.
- [60] P. Portincasa u. a., „Intestinal Barrier and Permeability in Health, Obesity and NAFLD“, *Biomedicines*, Bd. 10, Nr. 1. MDPI, 1. Jänner 2022. doi: 10.3390/biomedicines10010083.
- [61] C. A. Janeway, „Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology“, in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 1989, S. 1–13. doi: 10.1101/sqb.1989.054.01.003.
- [62] T. Kawai und S. Akira, „Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity“, *Immunity*, Bd. 34, Nr. 5. S. 637–650, 27. Mai 2011. doi: 10.1016/j.immuni.2011.05.006.
- [63] A. Nier, A. Brandt, D. Rajcic, T. Bruns, und I. Bergheim, „Short-Term Isocaloric Intake of a Fructose- but not Glucose-Rich Diet Affects Bacterial Endotoxin Concentrations and Markers of Metabolic Health in Normal Weight Healthy Subjects“, *Mol Nutr Food Res*, Bd. 63, Nr. 6, März 2019, doi: 10.1002/mnfr.201800868.
- [64] M. B. Fessler, L. L. Rudel, und J. M. Brown, „Toll-like receptor signaling links dietary fatty acids to the metabolic syndrome“, *Current Opinion in Lipidology*, Bd. 20, Nr. 5. S. 379–385, Oktober 2009. doi: 10.1097/MOL.0b013e32832fa5c4.
- [65] I. Pantazi u. a., „SARS-CoV-2/ACE2 Interaction Suppresses IRAK-M Expression and Promotes Pro-Inflammatory Cytokine Production in Macrophages“, *Front Immunol*, Bd. 12, Juni 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.683800.
- [66] L. A. J. O’Neill und A. G. Bowie, „The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling“, *Nature Reviews Immunology*, Bd. 7, Nr. 5. S. 353–364, Mai 2007. doi: 10.1038/nri2079.
- [67] S. L. Kelley, T. Lukk, S. K. Nair, und R. I. Tapping, „The Crystal Structure of Human Soluble CD14 Reveals a Bent Solenoid with a Hydrophobic Amino-Terminal Pocket“, *The Journal of Immunology*, Bd. 190, Nr. 3, S. 1304–1311, Feb. 2013, doi: 10.4049/jimmunol.1202446.
- [68] N. W. J. Schröder u. a., „Lipoteichoic acid (LTA) of Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved“, *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 278, Nr. 18, S. 15587–15594, Mai 2003, doi: 10.1074/jbc.M212829200.
- [69] S. Akira, S. Uematsu, und O. Takeuchi, „Pathogen recognition and innate immunity“, *Cell*, Bd. 124, Nr. 4. S. 783–801, 24. Februar 2006. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015.
- [70] S. S. Kang, J. R. Sim, C. H. Yun, und S. H. Han, „Lipoteichoic acids as a major virulence factor causing inflammatory responses via Toll-like receptor 2“, *Archives of Pharmacal Research*, Bd. 39, Nr. 11. Pharmaceutical Society of Korea, S. 1519–1529, 1. November 2016. doi: 10.1007/s12272-016-0804-y.
- [71] E. Rinninella u. a., „Food components and dietary habits: Keys for a healthy gut microbiota composition“, *Nutrients*, Bd. 11, Nr. 10. MDPI AG, 1. Oktober 2019. doi: 10.3390/nu11102393.
- [72] A. Zhernakova u. a., „Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity“, *Science (1979)*, Bd. 352, Nr. 6285, S. 565–569, Apr. 2016, doi: 10.1126/science.aad3369.
- [73] G. Falony u. a., „Population-level analysis of gut microbiome variation“, *Science (1979)*, Bd. 352, Nr. 6285, S. 560–564, 2016, [Online]. Verfügbar unter: <http://science.sciencemag.org/>

- [74] L. A. David *u. a.*, „Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome“, *Nature*, Bd. 505, Nr. 7484, S. 559–563, 2014, doi: 10.1038/nature12820.
- [75] H. C. Wastyk *u. a.*, „Gut-microbiota-targeted diets modulate human immune status“, *Cell*, Bd. 184, Nr. 16, S. 4137–4153.e14, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.cell.2021.06.019.
- [76] M. Martinez-Medina *u. a.*, „Western diet induces dysbiosis with increased *e coli* in CEABAC10 mice, alters host barrier function favouring AIEC colonisation“, *Gut*, Bd. 63, Nr. 1, S. 116–124, Jän. 2014, doi: 10.1136/gutjnl-2012-304119.
- [77] M. A. Engevik *u. a.*, „Mucin-Degrading Microbes Release Monosaccharides That Chemoattract *Clostridioides difficile* and Facilitate Colonization of the Human Intestinal Mucus Layer“, *ACS Infect Dis*, Bd. 7, Nr. 5, S. 1126–1142, Mai 2021, doi: 10.1021/acsinfecdis.0c00634.
- [78] T. Korem *u. a.*, „Bread Affects Clinical Parameters and Induces Gut Microbiome-Associated Personal Glycemic Responses“, *Cell Metab*, Bd. 25, Nr. 6, S. 1243–1253.e5, Juni 2017, doi: 10.1016/j.cmet.2017.05.002.
- [79] K. E. Walters und J. B. H. Martiny, „Alpha-, beta-, and gamma-diversity of bacteria varies across habitats“, *PLoS One*, Bd. 15, Nr. 9 September, Sep. 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0233872.
- [80] G. D. Wu *u. a.*, „Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes“, *Science (1979)*, Bd. 334, Nr. 6052, S. 105–108, Okt. 2011, doi: 10.1126/science.1208344.
- [81] Ś. Dominika, N. Arjan, R. P. Karyn, und K. Henryk, „The study on the impact of glycated pea proteins on human intestinal bacteria“, *Int J Food Microbiol*, Bd. 145, Nr. 1, S. 267–272, Jän. 2011, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.002.
- [82] D. J. Morrison und T. Preston, „Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism“, *Gut Microbes*, Bd. 7, Nr. 3. Taylor and Francis Inc., S. 189–200, 3. Mai 2016. doi: 10.1080/19490976.2015.1134082.
- [83] C. A. Thaiss *u. a.*, „Transkingdom control of microbiota diurnal oscillations promotes metabolic homeostasis“, *Cell*, Bd. 159, Nr. 3, S. 514–529, Okt. 2014, doi: 10.1016/j.cell.2014.09.048.
- [84] L. Schwingshackl, J. Morze, und | Georg Hoffmann, „Mediterranean diet and health status: Active ingredients and pharmacological mechanisms“, *Br J Pharmacol.*, 2019, doi: 10.1111/bph.v177.6/issuetoc.
- [85] F. Imamura *u. a.*, „Dietary quality among men and women in 187 countries in 1990 and 2010: a systematic assessment“, *Lancet*, S. 132–142, 2015, [Online]. Verfügbar unter: www.thelancet.com/lancetgh
- [86] A. J. H. H. M. V. Oostrom *u. a.*, „Activation of leukocytes by postprandial lipemia in healthy volunteers“, *Atherosclerosis*, Bd. 177, Nr. 1, S. 175–182, Nov. 2004, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2004.07.004.
- [87] S. Pendyala, J. M. Walker, und P. R. Holt, „A high-fat diet is associated with endotoxemia that originates from the gut“, *Gastroenterology*, Bd. 142, Nr. 5, 2012, doi: 10.1053/j.gastro.2012.01.034.
- [88] P. D. Cani *u. a.*, „Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice“, *Diabetes*, Bd. 57, Nr. 6, S. 1470–1481, Juni 2008, doi: 10.2337/db07-1403.
- [89] Y. Fujiyama *u. a.*, „Butter feeding enhances TNF- α production from macrophages and lymphocyte adherence in murine small intestinal microvessels“, *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, Bd. 22, Nr. 11, S. 1838–1845, 2007, doi: 10.1111/j.1440-1746.2007.04905.x.

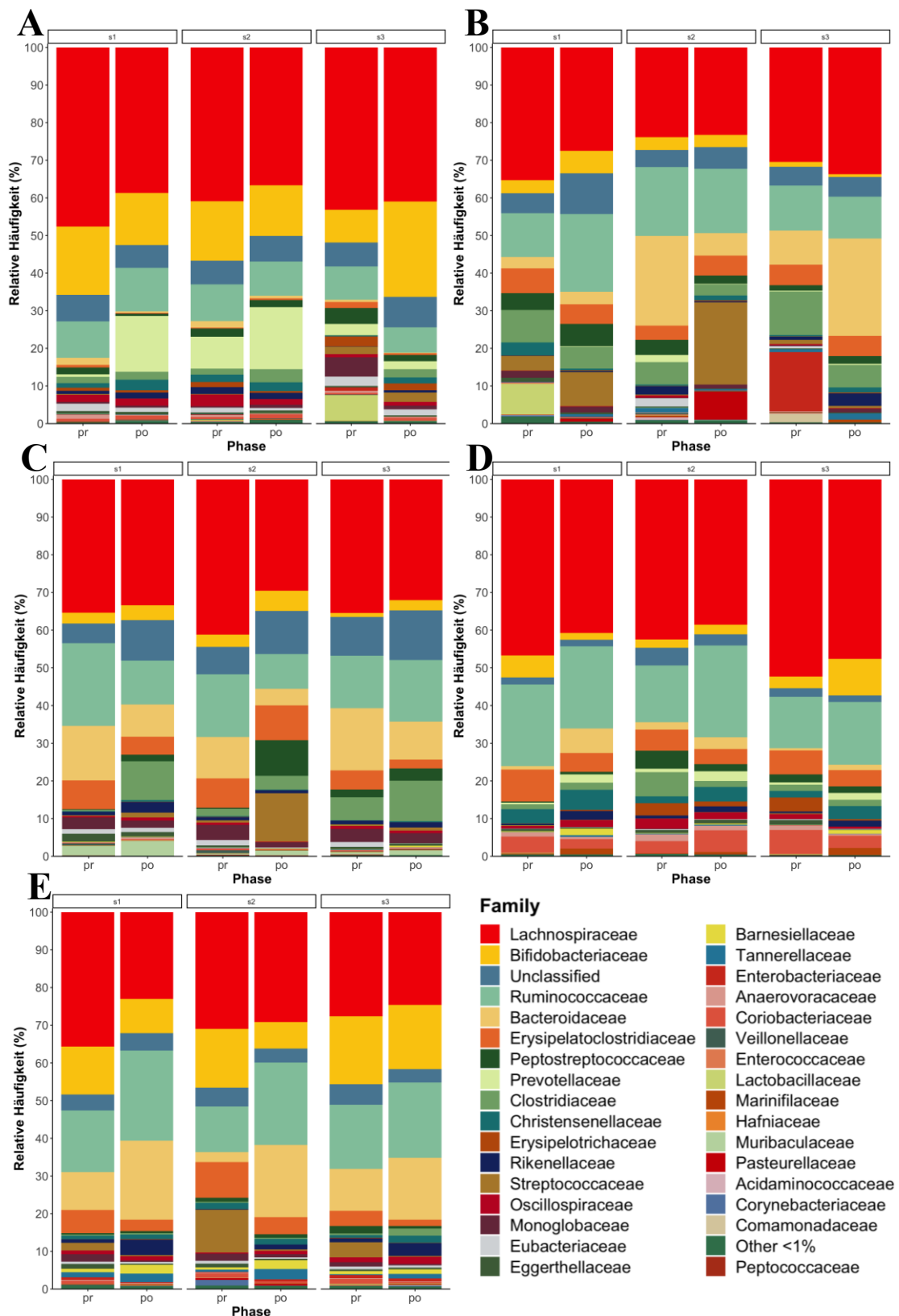
- [90] H. Yoshida *u. a.*, „Nutritional Immunology Fatty Acids Enhance GRO/CINC-1 and Interleukin-6 Production in Rat Intestinal Epithelial Cells 1“, 2001.
- [91] Y. Kawano *u. a.*, „Colonic Pro-inflammatory Macrophages Cause Insulin Resistance in an Intestinal Ccl2/Ccr2-Dependent Manner“, *Cell Metab*, Bd. 24, Nr. 2, S. 295–310, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.cmet.2016.07.009.
- [92] A. Budreviciute *u. a.*, „Management and Prevention Strategies for Non-communicable Diseases (NCDs) and Their Risk Factors“, *Frontiers in Public Health*, Bd. 8. Frontiers Media S.A., 26. November 2020. doi: 10.3389/fpubh.2020.574111.
- [93] C. R. Martin, V. Osadchiy, A. Kalani, und E. A. Mayer, „The Brain-Gut-Microbiome Axis“, *CMGH*, Bd. 6, Nr. 2. Elsevier Inc, S. 133–148, 1. Jänner 2018. doi: 10.1016/j.jcmgh.2018.04.003.
- [94] A. Aleixandre und M. Miguel, „Dietary fiber and blood pressure control“, *Food and Function*, Bd. 7, Nr. 4. Royal Society of Chemistry, S. 1864–1871, 1. April 2016. doi: 10.1039/c5fo00950b.
- [95] S. Ding, H. Jiang, und J. Fang, „Regulation of immune function by polyphenols“, *Journal of Immunology Research*, Bd. 2018. Hindawi Limited, 2018. doi: 10.1155/2018/1264074.
- [96] A. A. Kolodziejczyk, D. Zheng, und E. Elinav, „Diet–microbiota interactions and personalized nutrition“, *Nature Reviews Microbiology*, Bd. 17, Nr. 12. Nature Publishing Group, S. 742–753, 1. Dezember 2019. doi: 10.1038/s41579-019-0256-8.
- [97] A. A. Kolodziejczyk, D. Zheng, und E. Elinav, „Diet–microbiota interactions and personalized nutrition“, *Nature Reviews Microbiology*, Bd. 17, Nr. 12. Nature Publishing Group, S. 742–753, 1. Dezember 2019. doi: 10.1038/s41579-019-0256-8.
- [98] World Medical Association, „World Medical Association declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects“, *JAMA*, Bd. 310, Nr. 20. American Medical Association, S. 2191–2194, 27. November 2013. doi: 10.1001/jama.2013.281053.
- [99] R. Staltner, V. Sánchez, I. Bergheim, und A. Baumann, „Acute Intake of Sucrose but Not of the Intense Sweetener Sucralose Is Associated with Post-Prandial Endotoxemia in Healthy Young Adults—A Randomized Controlled Trial“, *Nutrients*, Bd. 15, Nr. 18, S. 4038, Sep. 2023, doi: 10.3390/nu15184038.
- [100] S. K. Shahi, K. Zarei, N. V Guseva, und A. K. Mangalam, „Microbiota Analysis Using Two-step PCR and Next-generation 16S rRNA Gene Sequencing HHS Public Access“. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.jove.com/video/59980/>
- [101] K. Burbach, J. Seifert, D. H. Pieper, und A. Camarinha-Silva, „Evaluation of DNA extraction kits and phylogenetic diversity of the porcine gastrointestinal tract based on Illumina sequencing of two hypervariable regions“, *Microbiologyopen*, Bd. 5, Nr. 1, S. 70–82, Feb. 2016, doi: 10.1002/mbo3.312.
- [102] A. M. García-Alegría, I. Anduro-Corona, C. J. Pérez-Martínez, M. A. G. Corella-Madueño, M. L. Rascón-Durán, und H. Astiazaran-Garcia, „Quantification of DNA through the nanodrop spectrophotometer: Methodological validation using standard reference material and sprague dawley rat and human DNA“, *Int J Anal Chem*, Bd. 2020, 2020, doi: 10.1155/2020/8896738.
- [103] C. Kaewtapee *u. a.*, „Effect of Bacillus subtilis and Bacillus licheniformis supplementation in diets with low- and high-protein content on ileal crude protein and amino acid digestibility and intestinal microbiota composition of growing pigs“, *J Anim Sci Biotechnol*, Bd. 8, Nr. 1, Mai 2017, doi: 10.1186/s40104-017-0168-2.
- [104] J. Weidner, T. Liedtke, I. Nasdala, W. Brabetz, und W. Göhde, „Diagnostik: All-in-one-Live-Imaging-Gelelektrophorese für die DNA-Analytik“, *BioSpektrum*, Bd. 17, Nr. 1, S. 64–65, Jän. 2011, doi: 10.1007/s12268-011-0013-7.

- [105] S. A. Bustin, V. Benes, T. Nolan, und M. W. Pfaffl, „Quantitative real-time RT-PCR - A perspective“, *Journal of Molecular Endocrinology*, Bd. 34, Nr. 3. S. 597–601, Juni 2005. doi: 10.1677/jme.1.01755.
- [106] M. L. Wong und J. F. Medrano, „One-Step Versus Two-Step Real-Time PCR“, *Biotechniques*, Bd. 39, Nr. 1, S. 75–85, 2005, [Online]. Verfügbar unter: www.BioTechniques.com
- [107] InvitrogenTM, „SequalPrepTM Normalization Plate (96) Kit“.
- [108] E. Bolyen u. a., „Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2“, *Nat Biotechnol*, Bd. 37, Nr. 8, S. 850–852, Aug. 2019, doi: 10.1038/s41587-019-0190-3.
- [109] J. Nowosad und T. F. Stepinski, „Spatial association between regionalizations using the information-theoretical V-measure“, *International Journal of Geographical Information Science*, Bd. 32, Nr. 12, S. 2386–2401, Dez. 2018, doi: 10.1080/13658816.2018.1511794.
- [110] D. H. Parks, M. Chuvochina, C. Rinke, A. J. Mussig, P. A. Chaumeil, und P. Hugenholtz, „GTDB: An ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent, rank normalized and complete genome-based taxonomy“, *Nucleic Acids Res*, Bd. 50, Nr. D1, S. D785–D794, Jän. 2022, doi: 10.1093/nar/gkab776.
- [111] Thermo Fisher Scientific - Invitrogen, „ProQuantumTM Technical Guide USER GUIDE“, 2021
- [112] M. S. Alam, „Proximity Ligation Assay (PLA)“, *Curr Protoc Immunol*, Bd. 123, Nr. 1, Nov. 2018, doi: 10.1002/cpim.58.
- [113] C. A. Lozupone, J. I. Stombaugh, J. I. Gordon, J. K. Jansson, und R. Knight, „Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota“, *Nature*, Bd. 489, Nr. 7415. S. 220–230, 13. September 2012. doi: 10.1038/nature11550.
- [114] A. D. Baldeon, D. McDonald, A. Gonzalez, R. Knight, und H. D. Holscher, „Diet Quality and the Fecal Microbiota in Adults in the American Gut Project“, *Journal of Nutrition*, Bd. 153, Nr. 7, S. 2004–2015, Juli 2023, doi: 10.1016/j.tjnut.2023.02.018.
- [115] C. A. Thaiss u. a., „Transkingdom control of microbiota diurnal oscillations promotes metabolic homeostasis“, *Cell*, Bd. 159, Nr. 3, S. 514–529, Okt. 2014, doi: 10.1016/j.cell.2014.09.048.
- [116] J. R. Mera, B. Dickson, und M. Feldman, „Influence of gender on the ratio of serum aspartate aminotransferase (AST) to alanine aminotransferase (ALT) in patients with and without hyperbilirubinemia“, *Dig Dis Sci*, Bd. 53, Nr. 3, S. 799–802, März 2008, doi: 10.1007/s10620-007-9924-z.
- [117] S. Sookoian und C. J. Pirola, „Liver enzymes, metabolomics and genome-wide association studies: From systems biology to the personalized medicine“, *World Journal of Gastroenterology*, Bd. 21, Nr. 3. WJG Press, S. 711–725, 21. Jänner 2015. doi: 10.3748/wjg.v21.i3.711.
- [118] B. E. Wickman u. a., „Dietary management of heart failure: Dash diet and precision nutrition perspectives“, *Nutrients*, Bd. 13, Nr. 12. MDPI, 1. Dezember 2021. doi: 10.3390/nu13124424.
- [119] O. Tang, E. R. Miller, A. C. Gelber, H. K. Choi, L. J. Appel, und S. P. Juraschek, „DASH diet and change in serum uric acid over time“, *Clin Rheumatol*, Bd. 36, Nr. 6, S. 1413–1417, Juni 2017, doi: 10.1007/s10067-017-3613-x.
- [120] F. Rosqvist u. a., „Overfeeding polyunsaturated and saturated fat causes distinct effects on liver and visceral fat accumulation in humans“, *Diabetes*, Bd. 63, Nr. 7, S. 2356–2368, 2014, doi: 10.2337/db13-1622.

- [121] S. Bilborough und N. Mann, „A Review of Issues of Dietary Protein Intake in Humans“, 2006.
- [122] H. Tilg, T. E. Adolph, und M. Trauner, „Gut-liver axis: Pathophysiological concepts and clinical implications“, *Cell Metabolism*, Bd. 34, Nr. 11. Cell Press, S. 1700–1718, 1. November 2022. doi: 10.1016/j.cmet.2022.09.017.
- [123] A. Mahmood u. a., „Association of a high-fat diet with I-FABP as a biomarker of intestinal barrier dysfunction driven by metabolic changes in Wistar rats“, *Lipids Health Dis*, Bd. 22, Nr. 1, Dez. 2023, doi: 10.1186/s12944-023-01837-9.
- [124] E. Lau u. a., „The role of I-FABP as a biomarker of intestinal barrier dysfunction driven by gut microbiota changes in obesity“, *Nutr Metab (Lond)*, Bd. 13, Nr. 1, 2016, doi: 10.1186/s12986-016-0089-7.
- [125] P. Brooks u. a., „CD14 and ALPK1 Affect Expression of Tight Junction Components and Proinflammatory Mediators upon Bacterial Stimulation in a Colonic 3D Organoid Model“, *Stem Cells Int*, Bd. 2020, 2020, doi: 10.1155/2020/4069354.
- [126] D. Zheng, T. Liwinski, und E. Elinav, „Interaction between microbiota and immunity in health and disease“, *Cell Research*, Bd. 30, Nr. 6. Springer Nature, S. 492–506, 1. Juni 2020. doi: 10.1038/s41422-020-0332-7.
- [127] G. C. Hansson, „Mucins and the Microbiome“, *Annual Review of Biochemistry*, Bd. 89. Annual Reviews Inc., S. 769–793, 20. Juni 2020. doi: 10.1146/annurev-biochem-011520-105053.
- [128] M. K. Vidya, V. G. Kumar, V. Sejian, M. Bagath, G. Krishnan, und R. Bhatta, „Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals“, *International Reviews of Immunology*, Bd. 37, Nr. 1. Taylor and Francis Ltd, S. 20–36, 2. Jänner 2018. doi: 10.1080/08830185.2017.1380200.
- [129] D. A. Lauffenburger und A. F. Horwitz, „Cell Migration: Review A Physically Integrated Molecular Process“, 1996.
- [130] I. Sophia, V. Sejian, M. Bagath, und R. Bhatta, „Quantitative expression of hepatic toll-like receptors 1–10 mRNA in Osmanabadi goats during different climatic stresses“, *Small Ruminant Research*, Bd. 141, S. 11–16, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.smallrumres.2016.06.005.
- [131] S. Mukherjee, S. Huda, und S. P. Sinha Babu, „Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: A review“, *Scandinavian Journal of Immunology*, Bd. 90, Nr. 1. Blackwell Publishing Ltd, 1. Juli 2019. doi: 10.1111/sji.12771.
- [132] R. K. Pai, M. E. Pennini, A. A. R. Tobian, D. H. Canaday, W. H. Boom, und C. V. Harding, „Prolonged toll-like receptor signaling by Mycobacterium tuberculosis and its 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-induced regulation of selected genes in macrophages“, *Infect Immun*, Bd. 72, Nr. 11, S. 6603–6614, Nov. 2004, doi: 10.1128/IAI.72.11.6603-6614.2004.
- [133] J. Texereau, J.-D. Chiche, W. Taylor, G. Choukroun, B. Comba, und J.-P. Mira, „The Importance of Toll-Like Receptor 2 Polymorphisms in Severe Infections“, 2005. [Online]. Verfügbar unter: <http://cid.oxfordjournals.org/>
- [134] T. Lawrence, „The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation.“, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, Bd. 1, Nr. 6. 2009. doi: 10.1101/cshperspect.a001651.
- [135] T. Takiishi, C. I. M. Fenero, und N. O. S. Câmara, „Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life“, *Tissue Barriers*, Bd. 5, Nr. 4. Taylor and Francis Inc., 2. Oktober 2017. doi: 10.1080/21688370.2017.1373208.

10 Anhang

Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota vor und nach den Ernährungsumstellungen



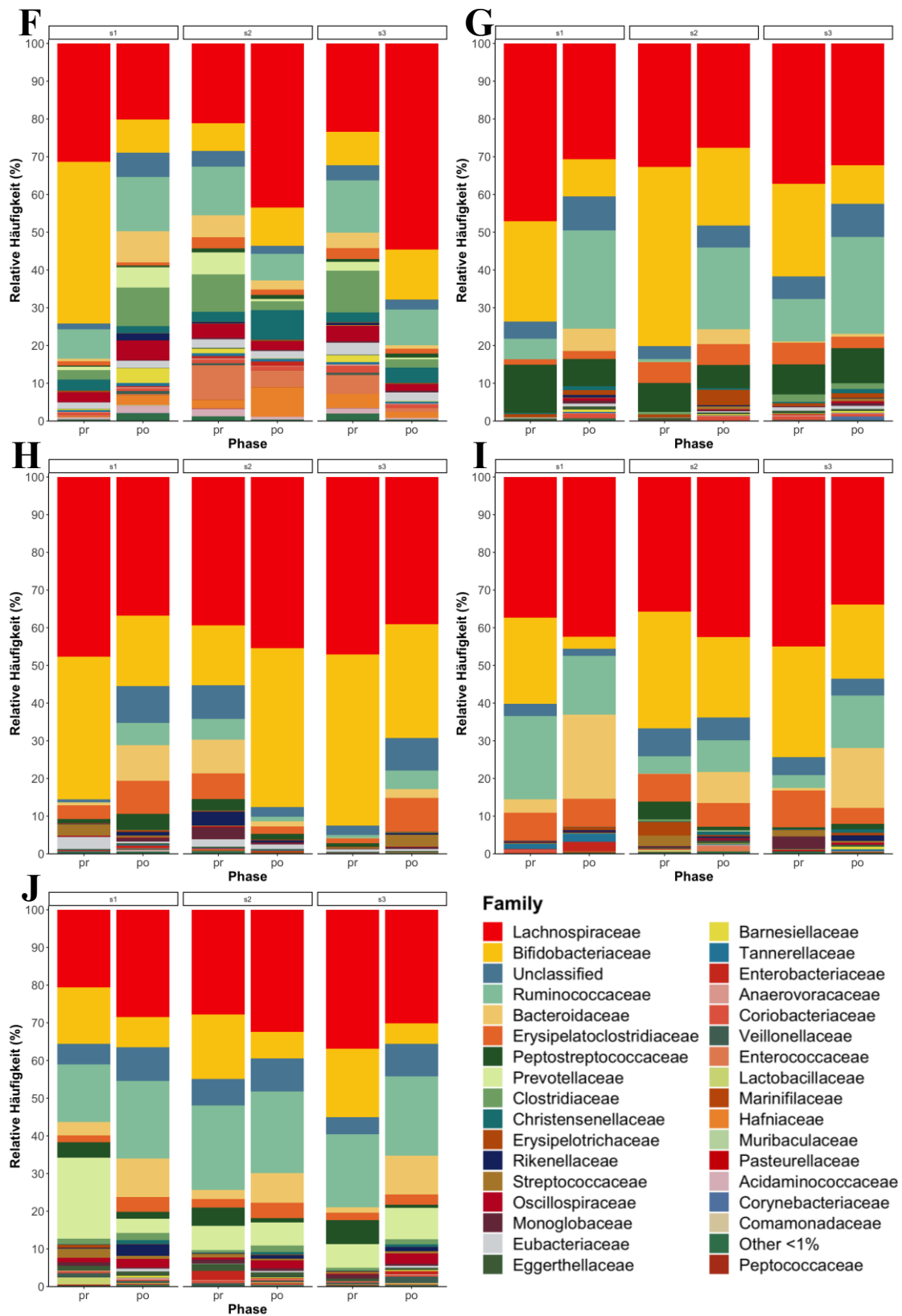


Abbildung 26: Einfluss einer kurzfristigen, isokalorischen Ernährungsumstellung hin zu einer gesunden Ernährung bei gesunden Männern auf die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota. (A-J) Die Relativen Häufigkeiten (%) der Bakterienfamilien pro Proband sind dargestellt als Standardisierung 1, Standardisierung 2 und Standardisierung 3. Innerhalb der einzelnen Standardisierungen wird zwischen prä (vor) und post (nach) Standardisierung differenziert. s1: Standardisierung 1; s2: Standardisierung 2, s3: Standardisierung 3; pr: prä (vor) Standardisierung; po: post (nach) Standardisierung.

11 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Ausführungen, die fremden Quellen wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, sind kenntlich gemacht. Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber*innen der Bildrechte ausfindig zu machen und versucht, ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit einzuholen. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir. Ich erkläre weiterhin, dass die vorliegende Arbeit nur bei der Universität Wien als Prüfarbeit eingereicht wurde und dass die von mir eingereichten Exemplare (ausgedruckt und elektronisch) identisch sind.