

Abschlussbericht

Zuwendungsempfänger: Christian-Albrechts Universität zu Kiel Institut für Humanernährung und Lebensmittelkunde, Abt. Lebensmitteltechnologie Prof. Dr. Karin Schwarz	Förderkennzeichen: 2816ERA13E
Vorhabenbezeichnung deutsch: Massenspektrometrische Analyse der Mikrobiom-abhängigen Metabolitenprofile sowie deren Beeinflussung durch Ernährungsformen mit einem hohen Anteil an sekundären Pflanzenstoffen (BioNUGUT)	
Vorhabenbezeichnung englisch: Gut Metabotyps as Biomarkers for Nutrition and Health (BioNUGUT)	
Laufzeit des Vorhabens: 5.9.2017-30.11.2020	
Berichtszeitraum: 5.9.2017-30.11.2020	

1. Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen des BMEL (z. B "Zukunft nachhaltig gestalten - Forschungsfelder des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft" aus dem Jahr 2014), auch zwecks Evaluierung von Förderprogrammen.

Das Projekt BioNUGUT „*Gut Metabotypes as Biomarkers for Nutrition and Health*“ ist im Rahmen des JPI HDHL durchgeführt worden. Das übergeordnete Ziel des Projektes war es, Muster an Metabolitenprofilen des Darmmikrobioms im humanen Serum zu identifizieren, die auf eine symbiotische Homöostase von Mensch und Mikroben hinweisen und ein Indiz für eine gesunde Ernährung und einen guten Gesundheitszustand sind. Im Fokus stand dabei eine Ernährung mit einem hohen Anteil an sekundären Pflanzenstoffen.

Das Projekt gliederte sich in die drei folgenden Arbeitspakete.

AP1 **Identifizierung** der Ernährungs-Mikrobiom-Serum-Metabolit-Achse als Indikator für eine gesunde Ernährung und Gesundheit.

AP2 **Validierung** der Achse anhand von verschiedenen Kohorten und parallel durchgeführten *in-vitro* Assays.

AP3 **Verifizierung** der Eignung der identifizierten Metabolitenmuster als Marker für Ernährung und Gesundheit in Interventionsstudien.

Insgesamt wurden vier verschiedene Kohorten bezüglich ihrer Metaboliten-Profile untersucht, darunter drei Kohorten aus Deutschland (BioNUGUT als Subgruppe von FoCUS, PopGEN und eine Interventionskohorte) und eine kanadische Kohorte (TOMORROW). Alle mit einbezogenen und analysierten Kohorten setzten sich jeweils aus einer gesunden Kontrollgruppe und verschiedenen Probandengruppen zusammen, deren Krankheitsbilder mit einem möglichen dysbiotischem Mikrobiom im Zusammenhang stehen. Krankheitsbilder, die in diesem Kontext betrachtet wurden, waren chronische metabolische Erkrankungen, chronische kardiovaskuläre Erkrankungen, chronische inflammatorische Erkrankungen und manifestierte oder vorangegangene onkologische Erkrankungen. Das Projekt fällt somit unter dem Oberbegriff „Gesundheit und Ernährung“ mit dem förderpolitischen Ziel „Untersuchungen zu den Zusammenhängen von unterschiedlichen Ernährungsweisen (Einfluss bestimmter Lebensmittelgruppen) und Gesundheit bzw. dem Übergang zur Entwicklung von Stoffwechselerkrankungen.“

2a. Darstellung und Erläuterung zu dem wissenschaftlichen und technischen Stand an den angeknüpft wurde, insbesondere Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden.

Die Darmmikrobiota ist essentiell für die menschliche Gesundheit und die Homöostase des Gastrointestinaltrakts, da sie eine Rolle bei der Entwicklung und Aktivität des Immunsystems spielt, die Erneuerung des Darmepithels und die Aufrechterhaltung der Schleimhautintegrität reguliert sowie für die Energiegewinnung aus der Nahrung mit verantwortlich ist. Es ist mittlerweile allgemein anerkannt, dass Störungen im Darmmikrobiom mit vielen verschiedenen Krankheiten assoziiert sind. Dazu zählen 1. Stoffwechselstörungen (z. B. Typ-2-Diabetes und Adipositas), 2. kardiovaskuläre Erkrankungen (z. B. Atherosklerose und Herzinsuffizienz), 3. chronisch entzündliche Erkrankungen (z. B. rheumatoide Arthritis und Colitis ulcerosa) sowie 4. definierte maligne Erkrankungen (z. B. Magen- und Darmkrebs). Dass die Ernährung einen großen Einfluss auf das Mikrobiom hat, zeigt eine Studie aus dem Jahr 2011. Die Studie umfasste Datensätze aus 4 verschiedenen Ländern und ergab, dass beim Menschen drei Hauptgruppen der Darmmikrobiota (=„Enterotypen“) vorhanden sind, unabhängig von Nationalität, Alter, Geschlecht und BMI: (1) Bacteroidetes getrieben, (2) Prevotella getrieben oder (3) Ruminococcus (zu den Firmicutes gehört) getrieben (Arumugam et al. 2011). Folgend konnte gezeigt werden, dass die Ernährung, insbesondere die Langzeiternährung, ein starker Prädiktor für den individuellen Enterotyp ist, wobei eine hohe Aufnahme an tierischem Fett und Protein mit dem Bacteroidetes-Typ und eine kohlenhydratreiche Ernährung mit dem

Prevotella-Typ assoziiert ist (Wang et al. 2014). Neben Assoziationsstudien in größeren Populationen konnte der Einfluss der Ernährung auf das Darmmikrobiom auch in verschiedenen Interventionsstudien am Menschen gezeigt werden (Wu et al. 2011; Heisen et al. 2016).

In diesem Projekt wurde der Fokus auf pflanzliche Sekundärstoffe gerichtet beziehungsweise auf eine Ernährung mit einem hohen Anteil an pflanzlichen Sekundärstoffen. Ein Großteil der mit der Nahrung aufgenommenen pflanzlichen Sekundärstoffe gelangt unverdaut in den Dickdarm des Menschen und kann der dort assoziierten Mikrobiota als Substrat zur Verfügung stehen und diese zusätzlich beeinflussen. Zudem sind die in der Literatur beschriebenen positiven Effekte pflanzlicher Sekundärstoffe oftmals nicht auf die Substanz selbst, sondern vielmehr auf ihre mikrobiellen Abbauprodukte zurück zu führen.

Das Konsortium besteht aus zwei Arbeitsgruppen (AG), die hauptsächlich mit großen menschlichen Kohorten arbeiten (Laudes (Deutschland), Shearer (Kanada)) und zwei AGs, die sich mit Metabolomics/ Lipidomics beschäftigen (Schwarz (Deutschland), Köfeler (Österreich)). Neben dem Anschluss zu den verschiedenen Omics-Plattformen bestand zudem Zugang zu einer Bioinformatik-Plattform in Kiel, auf deren Expertisen im Zuge des Projekts zugegriffen wurde.

Die nun folgenden Abschnitte umfassen nur noch die in der AG Schwarz durchgeführten Arbeiten.

2b. Darstellung und Erläuterung zu den wissenschaftlich-technischen Ergebnissen des Vorhabens im Vergleich zu den ursprünglichen Zielen, die erreichten Nebenergebnisse und die gesammelten wesentlichen Erfahrungen mit Bezug zu den relevanten Arbeitspaketen des EU-Gesamtvorhabens. Methodik, Statistik und Diskussion der Ergebnisse sind gefordert.

Metabolomische Analysen der assoziierten Kohorten (semi-gezielter Ansatz)

Das Gesamtvorhaben des Projekts umfasste drei Arbeitspakete. Gegenstand aller Arbeitspakete waren metabolomische Analysen unterschiedlicher Biofluide der verschiedenen Kohorten und zusätzlich in AP 1 und 2 *in-vitro* Assays mit ausgewählten Bakterienspezies und Faeces-Kulturen mit zugesetzten pflanzlichen Sekundärstoffen.

Im Zuge des Projekts wurden 1820 Serumproben in doppelter Bestimmung mit einem standardisierten Multiomics-Ansatz aufgearbeitet. Die Anteile der unterschiedlichen Kohorten betragen BioNUGUT n=900, TOMORROW n=400, PopGEN n=400 und Interventionsstudie n=120 Serumproben. Zusätzlich wurden n=600 Urinproben der BioNUGUT-Kohorte in 3-fach Bestimmung aufgearbeitet. Anschließend wurden sämtliche Bioproben via ultrahochauflösender FT-ICR Massenspektrometrie

analysiert. Der für die Serumproben gewählte Multiomics-Ansatz resultiert in drei Phasen. Einer lipophilen Phase, einer hydrophilen Phase und einer proteinogenen Phase. Teil des Projekts war ursprünglich nur die Analyse des hydrophilen Anteils. Da jedoch viele pflanzliche Vorläufermoleküle unpolar sind, wurde zusätzlich die lipophile Phase analysiert. Sämtliche Serumproben wurden mit zwei unterschiedlichen Methoden und zwei unterschiedlichen Ionisationsverfahren massenspektrometrisch analysiert, sodass für jede Serumprobe 8 unterschiedliche Datensätze vorliegen. Von den doppelt aufgearbeiteten Serumproben wurde jeweils eine Probe vermessen, die zweite wurde als Rückstellprobe verwahrt. Die Urinproben wurden jeweils mit einer Methode und zwei Ionisationsverfahren gemessen, sodass für jede Urinprobe zwei Datensätze vorliegen. Von den aufgearbeiteten Urinproben wurden alle Proben analysiert. Aus den Messungen resultieren somit 14560 Datensätze für die Serumproben und 3600 Datensätze für die Urinproben.

Die Datenanalyse erfolgte in einem semi-gezielten Ansatz. Dafür wurden die gemessenen hydrophilen Metaboliten im Bereich **small molecules** bis 1.500 Da identifiziert. Dieses erfolgte anhand einer 1.300 Serum-Metaboliten umfassenden in-house-Datenbank. In den Serumproben der BioNUGUT-Kohorte konnten 413, in der PopGEN-Kohorte 547, in der TOMORROW-Kohorte 307 und in der Interventionsstudie 351 eindeutige Metaboliten identifiziert werden. Zudem 704 eindeutige Metaboliten in den Urinproben der BioNUGUT-Kohorte. Die Schnittmenge aller Metaboliten über alle Serumproben der Kohorten, die zu Vergleichsanalysen herangezogen werden können, beträgt 198 Metabolite. Sämtliche Schnittmengen zeigt die folgende Abbildung.

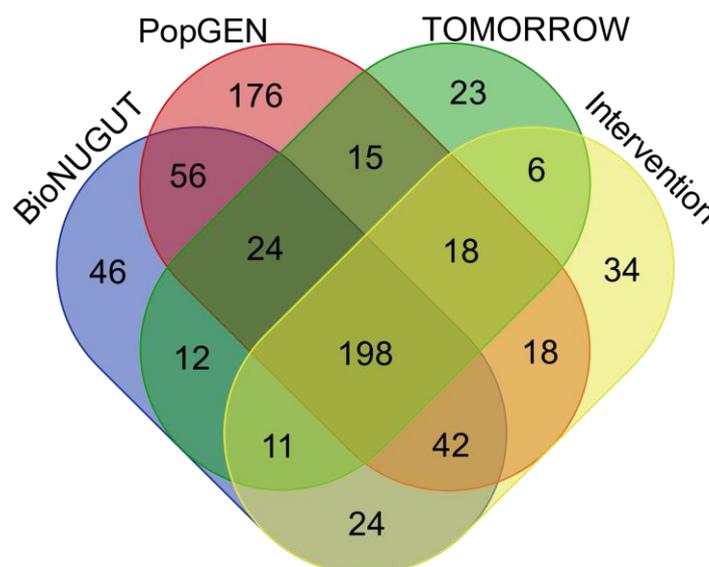


Abb. 1: Schnittmengendiagramm der hydrophilen Metaboliten der Serumproben der untersuchten Kohorten BioNUGUT, PopGEN, TOMORROW und der Intervention.

Aufgrund der hohen Anzahl an identifizierten Metaboliten mit der FT-ICR-MS wurde die Verifizierung nicht über LC-QTOF-MS, sondern über eine bioinformatische Auswertungspipeline zur Pathwayenrichmentanalyse vorgenommen.

Metabolomische Analysen zum mikrobiellen Abbau pflanzlicher Sekundärstoffe (semi-gezielter Ansatz)

Um zu untersuchen, welche mikrobiellen Abbauprodukte pflanzlicher Sekundärstoffe potentiell in humanen Biofluiden wie Blut und Urin nachweisbar sein können, waren im Zuge des Projekts in AP2 *in-vitro* Assays zur Identifizierung von Metabolisierungsprofilen, und in AP3 *in-vitro* Assays zur Darmpermeabilität vorgesehen. Die ursprünglich vorgesehenen Arbeiten konnten durch die Unternehmensumstrukturierung beim industriellen Partner nicht erbracht werden. Stattdessen wurden das Max-Rubner-Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie (MRI) mit Experimenten zum Mikrobiom beauftragt. Das MRI verfügt über die Expertise zur Durchführung von *in-vitro* Assays unter anaeroben Bedingungen und konnte sehr gut zur Erfüllung der Projektziele beitragen. Abweichend von den im AP3 vorgesehenen Permeabilitäts-Assays wurden Faeceskultur-Modelle etabliert und erfolgreich durchgeführt. Dazu wurde ein Konzept aus unterschiedlichen Ansätzen entwickelt, um die vorliegende Fragestellung nach Biomarkern für eine gesunde Ernährung und eine gesunde mikrobielle Zusammensetzung zu beantworten. Die folgende Abb. 2 zeigt die verschiedenen Versuchsansätze vom einfachen *in-vitro* Bakterien-Modell über *ex-vivo* Modelle und *in-vivo* Studien bis hin zu dem Vergleich mit den Kohorten.

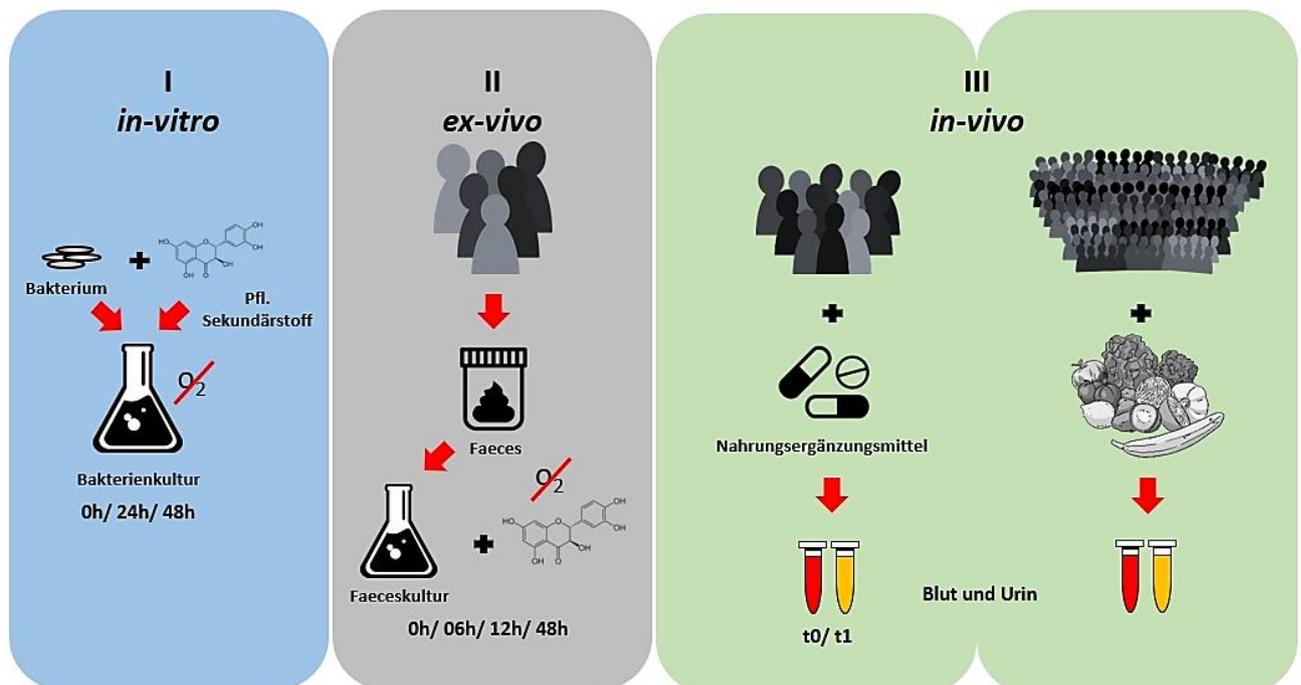


Abb. 2: Konzeptübersicht über die im Projekt angewandten Ansätze.

Mit diesem Konzept wurde das Ziel verfolgt, anhand von Einzelbakterien-Modellen einen Einblick zu erhalten, welche Abbauprodukte pflanzlicher Sekundärstoffe durch die humane Mikrobiota entstehen. Des Weiteren, ob es im bakteriellen Stoffwechsel zu Veränderungen kommt, die sich auch in humanen Biofluiden nachweisen lassen. Die Faeces-Modelle spiegeln im Gegenzug zu den Einzelbakterien-Modellen die Wechselwirkungen der verschiedenen Bakterien untereinander, das sogenannte *Cross-Feeding*, besser wider. Die Faeces-Kulturen ermöglichen zudem den Vergleich der Stoffwechselkapazität unterschiedlicher Mikrobiome, insbesondere eines dysbiotischen Mikrobioms, wie es bei unterschiedlichen Krankheiten vorliegt, gegenüber einem gesunden Mikrobiom. Ein weiterer betrachteter Ansatz ist der Vergleich der Stoffwechselkapazität der Mikrobiome von Probanden mit unterschiedlichen Ernährungsformen. In diesem Kontext wurden die Faeces-Proben sowohl einzeln, als auch im Pool betrachtet. Der Pool bietet den Vorteil, Effekte des individuellen Mikrobioms zu minimieren und Effekte des Kernmikrobioms zu untersuchen. Das bedeutet die Gemeinsamkeiten, die charakteristisch für die Gruppe sind. Sämtliche Ergebnisse und beobachtete Effekte der *in-vitro* Versuche wurden dann mittels, unter kontrollierten Bedingungen durchgeführten, *in-vivo* Versuchen (Humane Interventionsstudie) mit Nahrungsergänzungsmitteln validiert und abschließend mit den Daten der unterschiedlichen Kohorten verglichen. Bei den *in-vivo* Versuchen wurden 8 stoffwechselgesunde Probanden bezüglich ihrer Metabolisierungsprofile pflanzlicher Sekundärstoffe untersucht. Die Applikation der pflanzlichen Sekundärstoffe erfolgte über frei verkäufliche Nahrungsergänzungsmittel. Die Probenentnahme (Blut/ Urin) erfolgte teilweise vor und spätestens 8 Stunden nach Applikation. Bei den pflanzlichen Sekundärstoffen wurde ein Hauptaugenmerk auf die Polyphenole gerichtet. Für diese Stoffklasse der pflanzlichen Sekundärstoffe ist bekannt, dass etwa 90% der mit der Nahrung aufgenommenen Polyphenole den Dickdarm erreichen und der dort assoziierten Mikrobiota als Substrat dienen oder mit dieser wechselwirken können. Die Untersuchungen fokussierten sich dabei auf Quercetin und deren Derivate Rutin und Quercetin-3-glucosid als Vertreter der Flavonoide und auf Daidzein, Genistein und Glycitein als Vertreter der Isoflavonoide. Dieses ist darin begründet, dass Quercetin und Quercetin-Derivate im Pflanzenreich sehr weit verbreitet sind und somit für die humane Ernährung von zentraler Bedeutung sind. Des Weiteren wurde davon ausgegangen, dass Probanden, die sich vegan oder vegetarisch ernähren, oftmals Sojaprodukte verzehren, sodass ein Augenmerk auf die Isoflavonoide gerichtet wurde.

Sowohl die *in-vitro* Versuche mit den Einzelbakterien, als auch die *ex-vivo* Versuche mit den Faeceskulturen wurden in dreifach Bestimmung angezogen, mit einzelnen sekundären Pflanzenstoffen inkubiert und in dreifach Bestimmung aufgearbeitet. Die Aufarbeitung und Messung erfolgten wie oben beschrieben. Um den zeitlichen Verlauf der Metabolisierung der zugefügten pflanzlichen Sekundärstoffe zu untersuchen sind zu unterschiedlichen Zeitpunkten zwischen 0 Stunden und 72 Stunden Proben entnommen worden. Des Weiteren wurden neben dem Ansatz mit Bakterien oder Faeces und dem pflanzlichen Sekundärstoff auch

Ansätze als Kontrolle ohne den pflanzlichen Sekundärstoff durchgeführt. Die Probenentnahme aus den Assays der Kontrolle erfolgte analog zu den Ansätzen mit dem Pflanzenstoff. Anhand der Kontrollen lässt sich beurteilen, ob ein entstandener Metabolit generell mikrobiellen Ursprungs ist oder als Folge des zugesetzten Pflanzenstoffs auftritt. Dabei wurde zudem unterschieden, ob es ein Abbauprodukt und somit ein Metabolit des Pflanzenstoffs ist oder eine mögliche Reaktion basierend auf der Zugabe des Pflanzenstoffs. Bei den *in-vivo* Versuchen wurde von gesunden Probanden (n=8) einmalig ein Nahrungsergänzungsmittel eingenommen.

Die Blutentnahme erfolgte bei den Isoflavonoiden 8 Stunden und 32 Stunden nach Applikation und bei den Flavonoiden vor der Applikation und 6 Stunden nach der Applikation.

Die hier gezeigten Ergebnisse sind lediglich ein Auszug der Gesamtergebnisse. Die folgenden Tabellen zeigen die Ergebnisse für den semi-gezielten Ansatz. Dabei sind sämtliche Proben hinsichtlich bekannter mikrobieller Metaboliten sowie in der Literatur (Mosele et al. 2015, Najmanova et al. 2016, Almeida et al. 2018) beschriebener Phase I- und Phase II-Metaboliten der Biotransformation der jeweiligen Pflanzenstoffe untersucht worden. In den folgenden Tabellen sind diese Metaboliten wie folgt farbcodiert. Vorläufermoleküle sind schwarz gekennzeichnet, Metaboliten bakteriellen Ursprungs sind blau markiert, in Grün sind Phase I- und Phase II-Metaboliten der Leber hervorgehoben. Die folgende Tabelle (Tab.1) der Metabolisierungsprofile von Quercetin, Rutin und Quercetin-3-glucosid basiert auf der Auswertung von 11.100 Datensätzen aus *in-vitro* Versuchen, 1.600 Datensätzen aus *ex-vivo* Versuchen, 150 Datensätzen aus *in-vivo* Versuchen und 18.160 Datensätzen der Kohorten. Bei den Bakterienversuchen wurden vier verschiedene Bakterienarten bezüglich ihrer Metabolisierungsprofile der drei oben genannten Flavonoide untersucht. Bei Rutin und Quercetin-3-glucosid handelt es sich um Derivate des Quercetins mit unterschiedlich langen Zuckerresten. Die Bakterien konnten alle pflanzlichen Sekundärstoffe in den Versuchen gleichermaßen verstoffwechseln. Gleiches konnte auch in den durchgeführten Faeces-Versuchen mit Rutin und Quercetin beobachtet werden. Rutin wird im ersten Schritt zu Quercetin-3-glucosid und dann weiter zu Quercetin durch die Mikrobiota deglycolysiert. Ihre Metaboliten sind in der folgenden Tabelle zusammenfassend dargestellt. In der ersten Spalte der Tabelle sind sämtliche potentiell messbare Vorläufer-Moleküle und Metaboliten aufgeführt (n=45). In der zweiten und dritten Spalte sind die Ergebnisse zum Vorkommen der Metaboliten in *in-vitro* Versuchen mit Bakterienstämmen und der Faeces-Versuche dargestellt. In Bakterien-Versuchen konnten insgesamt 27 und in Faeces-Versuchen insgesamt 30 der gesuchten Verbindungen detektiert werden. In der dritten Spalte sind die detektierten Metaboliten des Humanversuchs mit Rutin dargestellt, hier konnten 18 unterschiedliche Metaboliten detektiert werden. Dazugehörig in der letzten Spalte die Urinproben, hier wurden 11 Metaboliten gefunden. In den Spalten 5-8 sind die Ergebnisse der Blutproben der jeweiligen

Kohorten aufgelistet und in der vorletzten Spalte die Ergebnisse der Urinproben der BioNUGUT Kohorte. In den Blutproben von BioNUGUT sind 20, in den dazugehörigen Urinproben sind 27, in PopGEN 20, in TOMORROW 15 und in der Intervention ebenfalls 15 Metaboliten detektiert worden.

Die in den Versuchen eingesetzten Pflanzenstoffe basieren auf dem Grundgerüst des Flavans. Flavane sind Benzopyranderivate, die aus zwei aromatischen Ringen bestehen, die über einen Tetrahydropyranring miteinander verbunden sind. Bei dem linken Ring spricht man vom A Ring, beim rechten vom B Ring und bei dem mittleren vom C Ring. Charakteristisch für den mikrobiellen Abbau, der auf dem Flavan-Grundgerüst basierenden Pflanzenstoffe, ist die Destabilisierung des C Rings durch Hydrolyse und anschließende Ringöffnung. Im Folgenden entstehen dann verschiedene Abbauprodukte, die Elemente des A oder B Rings tragen, dieses sind primär phenolische- und Benzoessäuren.

In den Versuchsansätzen mit den Bakterien und der Faeces konnte Dihydroquercetin detektiert werden. Deshalb ist davon auszugehen, dass ein mikrobieller Abbau stattgefunden hat und somit die weiteren niedermolekularen Verbindungen im Zusammenhang mit dem Vorläufermolekül entstehen können. Wie eingangs beschrieben wurden parallel zu den Versuchsansätzen mit dem Vorläufermolekül auch Versuchsansätze als Kontrollen ohne Vorläufermolekül durchgeführt. Diese ergaben, dass auch zahlreiche der hier aufgeführten mikrobiellen Abbauprodukte unabhängig vom Vorläufermolekül und somit unspezifisch durch die Mikrobiota entstehen können. Zur Bewertung der Spezifität sind die Bakterien-Assays herangezogen worden. Dort konnte gezeigt werden, dass lediglich Dihydroquercetin, Dihydroxyphenyl-oxo-essigsäure und Dihydroxytoluene in den Ansätzen mit dem Pflanzenstoff und nicht in der Kontrolle entstanden. Alle anderen Metaboliten konnten auch in den Kontrollen nachgewiesen werden, allerdings teilweise in signifikant höheren ($p < 0,05$) Konzentrationen. Metaboliten zwischen denen kein signifikanter Unterschied zwischen Ansatz und Kontrolle bestand waren Essigsäure, Buttersäure, Milchsäure, Benzoessäure, Hydroxyphenylpropionsäure, Phenyllessigsäure und Phenylpropionsäure.

Dihydroquercetin konnte neben den Bakterien-Versuchen und den Faeces-Versuchen ebenfalls in Blutproben der unterschiedlichen Kohorten nachgewiesen werden, aber nicht in den Urinproben. Dementsprechend könnte dieser Metabolit zum Nachweis eines Konsums von quercetinhaltenen Lebensmitteln für Blutproben herangezogen werden. Der Metabolit Dihydroxytoluene konnte wiederum nur in den Urinproben nachgewiesen werden. Dementsprechend könnte dieser Metabolit zur Beurteilung der Urinproben herangezogen werden. Gleiches gilt für Faeces und Dihydroxyphenyl-oxo-essigsäure.

Tab. 1: Übersicht Vorkommende Metaboliten der Flavonoide Quercetin, Rutin und Quercetin-3-Glucosid in Inkubationsversuchen mit einzelnen Bakterienstämmen und Faeces, in humanen Proben (Blut und Urin) aus verschiedenen Kohorten (BioNUGUT, PopGen, TOMORROW) sowie einem humanen Interventionsversuch mit Nahrungsergänzungsmittel (Humanversuch). Die erste Spalte (Name) enthält die potentiell detektierbaren Metabolite der Phase I und Phase II Transformationsprodukte der Leber sowie die potentiellen mikrobiellen Abbauprodukte. Isobare Verbindungen sind zusammengefasst. **Grüne** Felder in der Tabelle zeigen das Vorkommen des Metaboliten an.

Name	Medien	Medien	Blut					Urin		
	Bakterien	Faeces	Humanversuch	BioNUGUT	PopGen	TOMORROW	Intervention	BioNUGUT	Humanversuch	
Quercetin	x	x	\	\	\	\	\	x	\	
Quercetin diglucoside	\	\	\	x	\	\	\	\	\	
Rutin	x	x	\	\	\	\	x	\	\	
Quercetin glucoside	x	x	\	\	\	\	\	\	\	
Isoquercetin	\	\	\	\	\	\	\	\	\	
Quercetin acetate	\	\	\	x	x	\	\	x	\	
Quercetin glucoside acetate	\	\	\	\	\	\	\	\	\	
Quercetin diglucuronide sulfate	\	\	\	\	\	\	\	\	\	
Quercetin diglucuronide	\	\	\	\	\	\	\	\	\	
Quercetin glucoside glucuronide	\	\	\	\	\	\	\	\	\	
Quercetin glucoside sulfate	\	\	\	x	\	x	x	\	\	
Quercetin glucuronide sulfate	\	\	\	\	\	\	\	\	\	
Quercetin glucuronide	\	\	\	\	\	\	\	\	\	
Quercetin sulfate	\	\	\	\	\	\	\	\	\	
Methylquercetin	\	\	\	\	\	\	\	\	\	
Isorhamnetin	x	x	\	\	\	\	\	x	\	
Tamarixetin	\	\	\	\	\	\	\	\	\	
Dimethylquercetin sulfate	\	\	\	\	\	\	\	\	\	
Dimethylquercetin	x	x	\	\	\	\	\	x	\	
Isorhamnetin sulfate	\	\	\	\	\	\	\	\	\	
Isorhamnetin glucuronide	\	\	\	\	\	\	\	\	\	
Isorhamnetin glucuronide sulfate	\	\	\	\	\	\	\	\	\	
Methylquercetin diglucuronide	\	x	\	\	\	\	\	\	\	
Methylquercetin glucuronide	\	\	\	\	\	\	\	\	\	
Acetic acid	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Butanoic acid	x	x	x	\	x	x	x	x	x	
Dihydroquercetin (Taxifolin)	x	x	\	x	x	x	\	\	\	
Dihydroxybenzoic acid	x	x	x	x	x	x	x	x	\	
Protocatechuic acid	\	\	\	\	\	\	\	\	\	
Dihydroxyphenylacetic acid	x	x	x	x	x	\	\	x	x	
Hydroxy methoxybenzoic acid	\	\	\	\	\	\	\	\	\	
Dihydroxyphenylethanol	x	x	x	x	x	\	\	x	\	
Dihydroxyphenyl-oxoacetic acid	x	x	\	\	\	\	\	\	\	
Dihydroxytoluene	x	x	\	\	\	\	\	x	x	
Hydroxybenzoic acid	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Hydroxyphenyl acetic acid	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Hydroxyphenylbenzoic acid	\	\	\	\	\	\	\	x	\	
Hydroxyphenyl hydroxypropionic acid	\	\	\	\	\	\	\	\	\	
Methoxy hydroxyphenylacetic acid	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Dihydroxyphenyl propionic acid	\	\	\	\	\	\	\	\	\	
Hydroxyphenyl-propionic acid	x	x	x	x	x	x	x	x	\	
Lactic acid	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Methoxy hydroxyphenyl propionic acid	x	x	x	x	x	x	x	x	\	
Phenylacetic acid	x	x	x	x	x	x	x	x	\	
Phenylpropionic acid	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Phloroglucinol	x	x	x	x	\	\	\	x	x	
Trihydroxybenzoic acid	x	x	\	\	\	\	\	x	\	
Caffeic acid	x	x	x	\	x	\	\	x	\	
Ferulic acid	x	x	x	x	x	\	\	x	x	
Ferulic acid glucuronide	\	\	\	\	\	\	\	x	\	
Coumaric acid	x	x	x	x	x	x	x	x	\	
Benzoic acid	x	x	x	x	x	x	x	x	\	
	45	27	30	18	20	20	15	15	27	11

Verwendete Bakterien: *Eubacterium ramulus*, *Weissella confusa*, *Bacteroides vulgatus*, *Clostridium bolteae*

Gleiche Versuchsansätze wurden ebenfalls mit Daidzein, Genistein und Glycitein durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle (Tab.2) dargestellt. Die Farbcodierung ist den Quercetin-Versuchen entsprechend. In den Bakterien-Versuchen wurden drei unterschiedliche Bakterien bezüglich ihrer Metabolisierungsprofile von Daidzein untersucht. In den Faeces-Modellen wurden Daidzein und Genistein eingesetzt. Bei den Humanversuchen mit einem Nahrungsergänzungsmittel sowohl Daidzein, Genistein und Glycitein. Sämtliche Proben sind bezüglich des Vorkommens der in der ersten Spalte der Tab. 2 aufgeführten Verbindungen (n=46) analysiert worden. Diese Tabelle basiert auf der Auswertung von 480 Datensätzen aus *in-vitro* Versuchen, 10.840 Datensätzen aus *ex-vivo* Versuchen, 432 Datensätzen aus *in-vivo* Versuchen und 18.160 Datensätzen der Kohorten.

In den Einzelbakterien-Modellen konnten 16, in den Faeces-Modellen mit Daidzein 28 und in den Faeces-Modellen mit Genistein 23 der untersuchten Metaboliten detektiert werden. In den Proben der Probanden der *in-vivo* Versuche konnten im Blut nach Applikation 26 und in den Urinproben 14 Metaboliten nachgewiesen werden. In den Blutproben der BioNUGUT Kohorte konnten 16, bei PopGEN 23, bei TOMORROW 13 und bei der Intervention 23 Metaboliten nachgewiesen werden. In den Urinproben der BioNUGUT Kohorte konnten ebenfalls 23 Metaboliten detektiert werden. Basierend auf den Faeces und Bakterien-Modellen lassen sich, wie bereits für Quercetin beschrieben, auch spezifische Metaboliten für den Konsum von isoflavonoidhaltigen Lebensmitteln ableiten. Wie zuvor bereits für Quercetin beschrieben findet im ersten Schritt der mikrobiellen Transformation eine Modifikation am C Ring statt. Daraus resultieren aus den obengenannten Vorläufermolekülen Dihydrodaidzein, Dihydroglycitein und Dihydrogenistein. Diese wurden sowohl im Blut als auch Urin detektiert und können somit zur Beurteilung der beiden Biofluide herangezogen werden. Zudem wurde in allen Blutproben der Kohorten Dihydrodaidzein Sulfat nachgewiesen, sodass die sulfatierte Form ebenfalls als Indikator für Blutproben herangezogen werden kann. Die Sulfatierung kann in diesem Zusammenhang über Biotransformation in der Leber nach der Resorption aus dem Darmlumen erfolgt sein. Weitere spezifische Metaboliten sind die verschiedenen Angolensine. Dabei handelt es sich um die Metaboliten, die nach dem Bruch des C Rings entstehen, bevor sich einzelne A Ring und B Ring Metaboliten abspalten. Sie konnten sowohl in Blutproben als auch in den Urinproben nachgewiesen werden. Parallel zu den Angolensinen kann das Ringsystem auch intakt bleiben und es können verschiedene Verbindungen mit Equol als Grundkörper entstehen. Diese konnten ebenfalls in Blut- und Urinproben nachgewiesen werden und sind als mikrobiota-spezifisch einzustufen. Des Weiteren konnte in den Faeces-Modellen im Zusammenhang mit den pflanzlichen Sekundärstoffen Etylphenol detektiert werden. Dieses Abbauprodukt wurde ebenfalls in Blut- und Urinproben der Kohorten detektiert und wäre dementsprechend ein weiterer spezifischer Metabolit. Hydroxyphenylpropionsäure,

Dimethoxybenzoesäure, Dihydroxyphenyllessigsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure und p-Coumarsäure konnten sowohl in den bakteriellen Ansätzen mit pflanzlichen Sekundärstoffen als auch in den bakteriellen Kontrollen ohne zugesetzten pflanzlichen Sekundärstoff detektiert werden, allerdings in signifikant höherer ($p < 0,05$) Konzentration. Alle weiteren in der Tabelle aufgeführten bakteriellen Metaboliten wie Hippursäure und Resorcinol, traten sowohl in den Ansätzen als auch in den Kontrollen auf. Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, sodass diese Metaboliten als mikrobiell, aber unspezifisch einzustufen sind.

Tab. 2: Übersicht Vorkommende Metaboliten der Isoflavonoide Daidzein (DAI), Genistein (GEN) und Glycetein, Inkubationversuchen mit einzelnen Bakterienstämmen und Faeces, in humanen Proben (Blut und Urin) aus verschiedenen Kohorten (BioNUGUT, PopGen, TOMORROW) sowie einem humanen Interventionsversuch mit Nahrungsergänzungsmittel (Humanversuch). Die erste Spalte (Name) enthält die potentiell detektierbaren Metabolite der Phase I und Phase II Transformationsprodukte der Leber sowie die potentiellen mikrobiellen Abbauprodukte. Isobare Verbindungen sind zusammengefasst. **Grüne** Felder in der Tabelle zeigen das Vorkommen des Metaboliten an.

Name	Medien	Medien	Medien	Blut	Blut	Blut	Blut	Blut	Urin	Urin	
	Bakterien_DAI	Faeces_DAI	Faeces_GEN	Humanversuch	BioNUGUT	PopGen	TOMORROW	Intervention	BioNUGUT	Humanversuch	
Daidzein	x	x	/	x	/	x	/	/	/	x	
Genistein											
Hydroxydaidzein	x	x	x	/	/	x	/	/	/	/	
Trihydroxy-isoflavone											
Glycetein	/	/	/	/	/	x	/	/	/	x	
Methylgenistein	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
Hydroxygensitein	/	x	/	/	/	/	/	/	/	/	
Hydroxyglycetin	/	/	/	/	/	/	/	/	x	/	
Acetyldaizdin	/	/	/	/	/	x	/	/	/	/	
Daidzein glucuronide	/	/	/	/	/	/	/	/	/	x	
Daidzein sulfate	x	/	/	x	/	/	x	/	/	x	
Genistein sulfate	/	x	/	x	/	/	/	/	/	x	
Gensitein glucuronide	/	/	/	/	x	x	x	/	/	x	
Glycetein glucuronide	/	/	/	/	/	/	/	/	/	x	
Glycetin sulfate	/	/	/	x	/	/	/	/	/	x	
Glycetin sulfate glucuronide	/	/	x	/	/	/	/	/	/	x	
Methylglycetein	/	/	x	/	/	/	/	/	x	/	
Hydroxyphenyl propionic acid	x	x	x	x	x	x	x	x	x	/	
Dimethoxy bezoic acid	/	x	x	x	x	x	x	x	x	/	
Phenylpropanoic acid	x	x	x	x	x	x	x	x	x	/	
Dihydroxyphenylacetic acid	/	x	x	x	x	x	/	/	x	/	
Ethylphenol	/	x	x	x	/	/	/	/	x	/	
Hydroxy-o-desmethylangolensin	/	/	/	x	/	/	/	/	x	/	
Methoxy-o-desmethylangolensin	/	x	x	x	/	/	/	/	/	/	
Methoxyequol	/	x	x	/	/	x	/	/	x	/	
Benzoic acid	x	x	x	x	x	x	x	x	x	/	
Caffeic acid	/	x	x	/	/	x	/	/	x	/	
Dihydrodaidzein											
Dehydro-O-Desmethylangolensin	x	x	/	/	/	/	/	/	x	/	
Hydroxy-equol											
Dihydrodaidzein sulfate	/	/	/	x	x	x	x	x	/	/	
Dihydrogenistein	/	/	x	x	/	/	/	/	/	x	
Dihydro trihydroxy isoflavone	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
Dihydrogenistein sulfate	x	/	/	/	/	x	/	/	/	/	
Dihydroglycetein sulfate	/	/	/	x	/	x	/	/	/	/	
Dihydroglycetein	/	x	/	x	x	/	/	/	x	x	
Equol	x	x	/	/	/	/	x	/	/	/	
Equol glucuronide	/	x	/	/	/	/	/	/	/	/	
Equol sulfate	x	/	/	x	/	/	/	/	/	/	
Fumaric acid	x	x	x	x	x	x	/	x	x	/	
Gallic acid	/	x	/	/	/	/	/	/	x	/	
Glutaric acid	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Hippuric acid	/	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Hydroxybenzoic acid	x	x	x	x	x	x	x	x	x	/	
Methyl caffeic acid	/	x	x	/	x	x	/	/	x	/	
Ferulic acid	/	x	x	/	x	x	/	/	x	/	
o-Desmethylangolensin											
Tetrahydrodaidzein	x	x	x	x	/	x	/	/	x	/	
Hydroxyequol											
p-Coumaric acid	x	x	x	x	x	x	x	x	x	/	
Phloroglucinol	/	x	x	x	x	/	/	/	x	/	
Trihydroxybenzene											
Resorcinol	/	x	x	x	/	/	/	/	x	/	
Resorcinol sulfate	/	x	/	x	x	x	x	x	/	x	
Tetrahydrogenistein	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
Dehydroequol	x	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
	46	16	28	23	26	16	23	13	11	23	14

Verwendete Bakterien: *Slackia equolifaciens*, *Slackia isoflavoniconvertens*, *Eggerthella lenta*

Metabolomische Analysen zum mikrobiellen Abbau pflanzlicher Sekundärstoffe (ungezielter Ansatz)

Die Datenauswertung erfolgte neben dem semi-gezielten sogenannten *semi-targeted* Ansatz auch mit einem ungezielten sogenannten *non-targeted* Ansatz. Die ungerichteten Analysen sind allerdings noch nicht vollständig abgeschlossen. Ungezielte Datenanalysen haben das Ziel Biomarker mittels statistischer Verfahren zu identifizieren. Dabei werden die Daten auf wenige hoch- bzw. runterregulierte Merkmale reduziert. Ein gängiges Verfahren der multivariaten Statistik ist die Hauptkomponenten-Analyse. Mittels der Hauptkomponenten-Analyse lassen sich Zusammenhänge und Unterschiede zwischen Gruppen erkennen und visualisieren. Im Idealfall bilden ähnliche Proben sogenannte Cluster, deren Bildung auf metabolomischen Gemeinsamkeiten beruhen, die wiederum spezifischen Metaboliten zugeordnet werden können.

Der Fokus richtete sich in den hier beschriebenen Arbeitspaketen des Projekts auf die ungezielten metabolomischen Analysen von Bakterien- und Faeces-Modellen. In diesem Zusammenhang sollten weitere Metaboliten identifiziert werden, die als mikrobielle Antwort auf die zugesetzten pflanzlichen Sekundärstoffe entstehen. Zudem sollte untersucht werden, ob und wie sich ein gesundes Mikrobiom von einem dysbiotischem Mikrobiom in seiner Stoffwechselkapazität bezüglich pflanzlicher Sekundärstoffe unterscheidet.

Die folgende Abbildung (Abb. 3) zeigt die Ergebnisse eines Faeces-Versuchs. Dabei wurden 7 Faecesproben von Probanden mit einem gesunden Mikrobiom gepoolt und 7 Faecesproben von adipösen Probanden mit einem dysbiotischem Mikrobiom gepoolt. Der Pool soll wie oben beschrieben dazu beitragen den Einfluss des individuellen Mikrobioms zu minimieren und es ermöglichen, das Kernmikrobiom zu untersuchen. Zu den Ansätzen mit dem pflanzlichen Sekundärstoff Genistein wurden zusätzlich auch immer Kontroll-Ansätze ohne Zugabe des pflanzlichen Sekundärstoffs durchgeführt. Der *PCA-Scoreplot* Abb. 3 aller in dem beschriebenen Modell untersuchten Proben zeigt eindeutige Cluster. Jedes Symbol steht für eine Probe. Die unterschiedlichen Ansätze sind farblich hervorgehoben, jede Symbolform steht für einen unterschiedlichen Zeitpunkt. Während alle Ansätze zu den Zeitpunkten 0-6 Stunden noch relativ dicht zusammenliegen kommt es ab dem Zeitpunkt 8 Stunden bis hin zu den 48 Stunden der Inkubationszeit zu einer deutlichen Aufspaltung. Dabei orientieren sich die Kontrollansätze KBGG (Kontrolle-Bakterien-Genistein-Gesund) und KBGA (Kontrolle-Bakterien-Genistein-Adipositas) nach oben rechts und die Ansätze mit dem pflanzlichen Sekundärstoff ABGA (Ansatz-Bakterien-Genistein-Adipositas) und ABGG (Ansatz-Bakterien-Genistein-Gesund) nach unten rechts. Die deutliche Aufspaltung von Kontrollen und Ansätzen lässt vermuten, dass dieses durch die Zugabe von Genistein hervorgerufen wurde und die daraus resultierenden metabolomischen Unterschiede darin begründet sind.

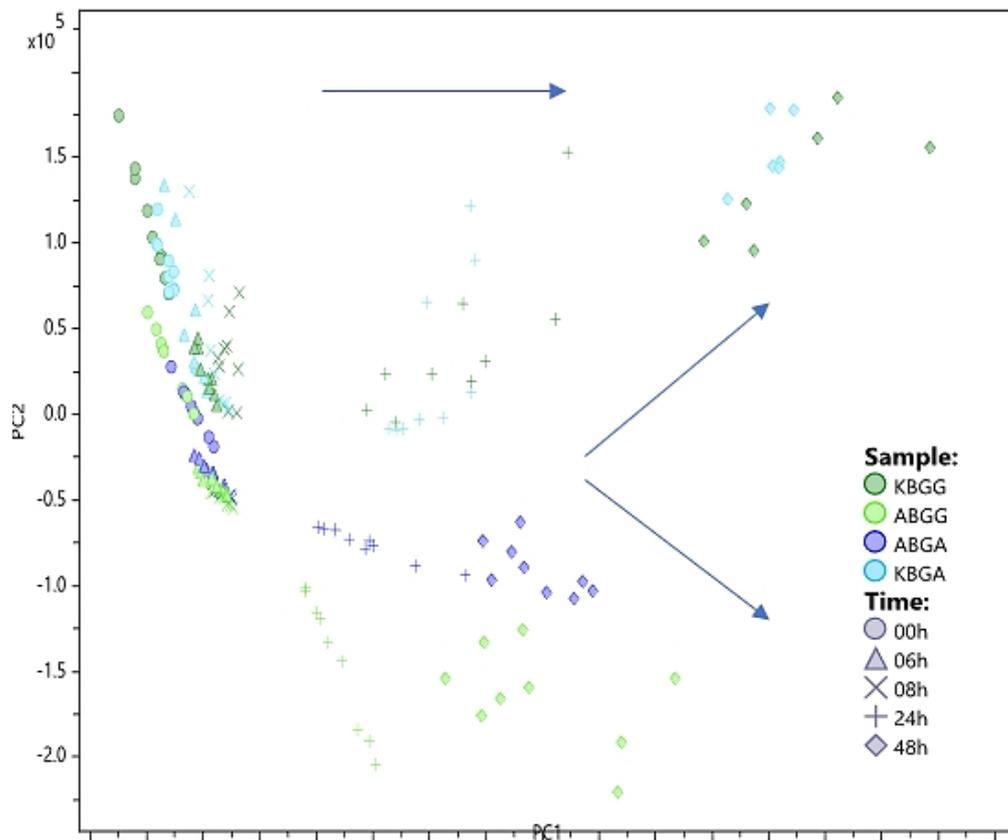


Abb. 3: PCA-Scoreplot eines Faeces-Kulturmodells mit Pool-Proben von Probanden mit einem gesunden und einem dysbiotischen Mikrobiom. AB Ansätze Bakterien, KB Kontrolle Bakterien, GA Genistein Adipositas, GG Genistein Gesund. Jedes Symbol steht für eine Probe, jede Form für einen unterschiedlichen Zeitpunkt.

Dass ein Abbau sowohl bei den Proben ABGG und ABGA stattgefunden hat, zeigt der sogenannte *Bucketstatistic view* in der Teilabbildung 4A. Jedes Symbol steht für eine Probe, die Orientierung von links nach rechts entspricht dem zeitlichen Verlauf, die Farbgebung entspricht der des PCA-Modells. Hier ist deutlich zu erkennen, dass Genistein zum Zeitpunkt 24 Stunden vollständig sowohl in den ABGG als auch in den ABGA Proben abgebaut wurde. Die Teilabbildungen 4B-D zeigen in diesem Zusammenhang exemplarische Metaboliten, die im Verlauf der Inkubation entstanden sind. 4B ist ein Beispiel für einen Metaboliten, der im Verlauf der Inkubation gleichermaßen in ABGG und ABGA entstanden war. Es handelt sich hierbei um Phenylethanol. Teilabbildung 4C ist ein Beispiel für einen Metaboliten, der nur in den ABGA Proben nachzuweisen war, dabei handelt es sich um Glycyltyrosin. Und Teilabbildung 4D ist ein Beispiel für einen Metaboliten, der nur in den ABGG Proben detektiert werden konnte, dabei handelt es sich um Indolacetyl-säure. In diesem Plot sind zusätzlich die Kontrollen mit angegeben. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die pflanzlichen Sekundärstoffe das Metabolom in den Faecesproben beeinflussen und, dass es deutliche Unterschiede zwischen den beiden gegenübergestellten Ansätzen bezüglich der Metabolitenprofile gibt.

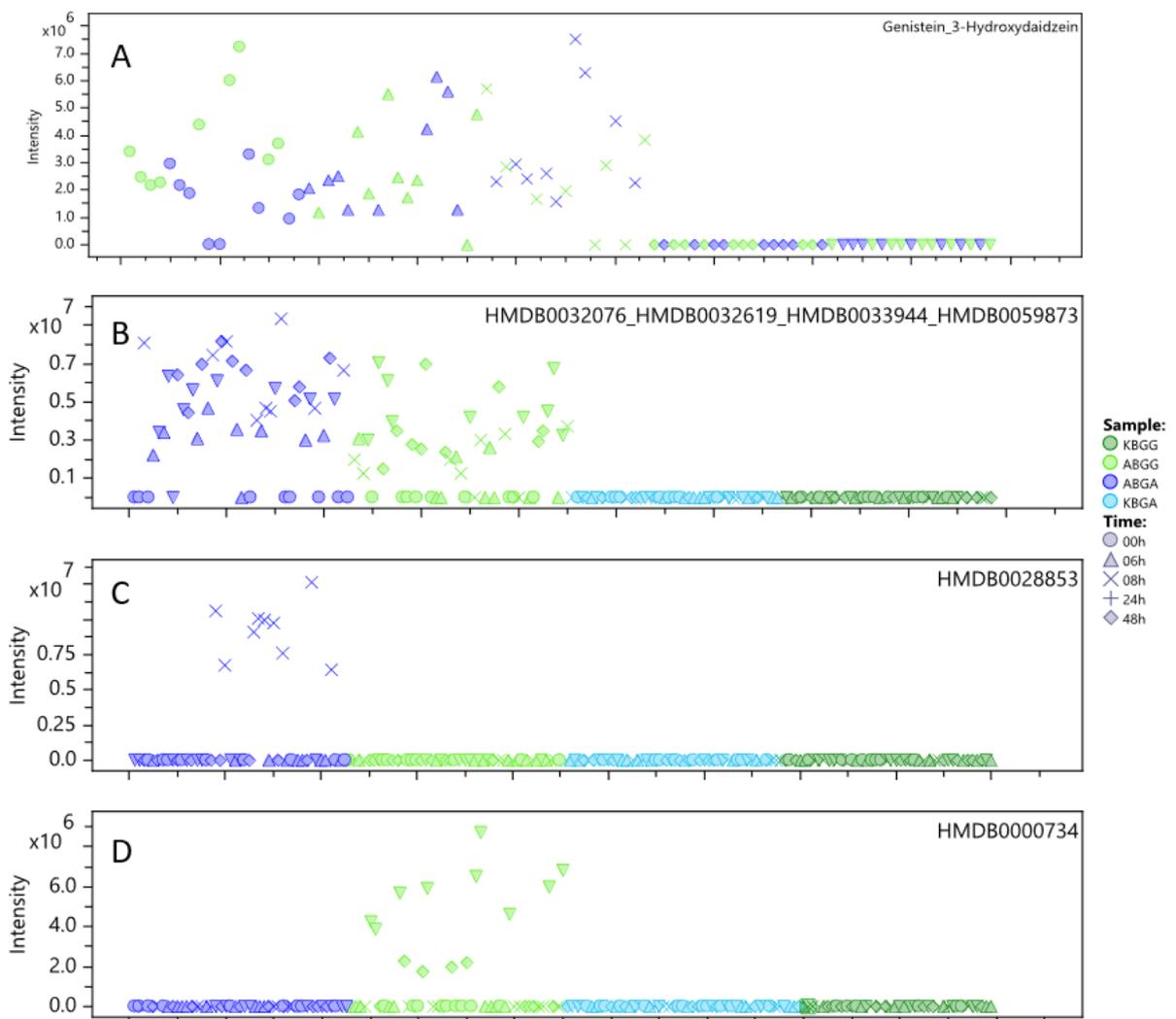


Abb. 4: *Bucketstatistic* views ausgewählter Metaboliten eines Faeces-Kulturmodells mit Pool-Proben von Probanden mit einem gesunden und einem dysbiotischen Mikrobiom. AB Ansätze Bakterien, KB Kontrolle Bakterien, GA Genistein Adipositas, GG Genistein Gesund. Jedes Symbol steht für eine Probe, jede Form für einen unterschiedlichen Zeitpunkt. A Abbau des Vorläufermoleküls Genistein im zeitlichen Verlauf bei ABGG und ABGA. B Beispiel für einen im zeitlichen Verlauf entstehen Metaboliten (Phenylethanol) sowohl in ABGA als auch in ABGG. C Beispiel für einen Metaboliten (Glycinyrosin), der nur in den ABGA-Ansätzen detektiert wurde. D Beispiel für einen Metaboliten (Indolacetylensäure), der nur in den ABGG-Ansätzen detektiert wurde.

2c. Darstellung und Erläuterung zu den wissenschaftlichen und/oder technischen Erfolgsaussichten nach Projektende (mit Zeithorizont) – u. a. wie die geplanten Ergebnisse in anderer Weise (z. B. für öffentliche Aufgaben, Datenbanken, Netzwerke, Transferstellen, etc.) genutzt werden können. Dabei ist auch eine etwaige Zusammenarbeit mit anderen Einrichtungen, Firmen, Netzwerken, Forschungsstellen u. a. einzubeziehen.

Die Ergebnisse des Projektes beruhen auf einer breiten Datengrundlage und werden deshalb in den kommenden zwei Jahren in hochwertigen internationalen *peer-reviewed* Journalen veröffentlicht werden können. Die dazugehörigen Methoden, die den Experimenten zu Grunde liegen, werden in sog. elektronischen Supplements zu den Publikationen veröffentlicht und stehen somit anderen Arbeitsgruppen als Anleitung zur Verfügung. Die massenspektrometrischen Methoden und bioinformatischen Pipelines werden auch nach Ende des Projektes zur Verfügung stehen. An der

Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der Universität Kiel ist geplant, ein Netzwerk für Metabolomics aufzubauen. In dieses Netzwerk wird die im Projekt aufgebaute Expertise eingebracht. Die Kooperationen, die sich im Laufe des Projektes mit anderen Forschungsinstituten ergeben haben, werden weiter ausgebaut und in den kommenden zwei Jahren in gemeinsamen Forschungsanträge münden.

2d. Darstellung und Erläuterung zu der Angemessenheit von Aufwand und Zeit.

Die geplanten Arbeiten konnten in der dafür vorgesehenen Zeit durchgeführt werden.

2e. Darstellung und Erläuterung zu den Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben.

Alle durchgeführten Arbeiten haben zu Ergebnissen geführt, die zu den Zielstellungen des Projektes bzw. zu Lösungen der Problemstellungen beigetragen haben.

2f. Darstellung und Erläuterung zu der wissenschaftlichen, technischen und wirtschaftlichen Anschlussfähigkeit für eine mögliche nächste Phase.

Die dargestellten Arbeiten sind die Grundlage für weitere Experimente mit sekundären Pflanzenstoffen, um ein besseres Verständnis zum Beitrag von sekundären Pflanzenstoffen auf die Stoffwechsellistung der Mikrobiota und das Metabolom des Menschen sowie die Möglichkeiten einer Steuerung bei ernährungsmitbedingten Erkrankungen zu erreichen. Die Arbeiten und Ergebnisse dieses Forschungsprojektes bieten die Grundlage für eine nachfolgende Projektphase. Insbesondere die Untersuchung der Verstoffwechslung von sekundären Pflanzenstoffen durch die dysbiotische Mikrobiota im Vergleich zu gesunden Probanden ist von hohem Interesse um gezielte Interventionen zu planen. Des Weiteren ist die Verstoffwechslung von sekundären Pflanzenstoffen durch die Mikrobiota in komplexeren Inkubationsversuchen, die typische Ernährungsmuster sowie komplexere physiologische Situationen abbilden, als nächster Schritt zu betrachten.

2g. Darstellung und Erläuterung zu der voraussichtlichen Ergebnisnutzung.

Die aus dem Projekt resultierenden Ergebnisse sollen in schriftlicher Form abgefasst und in internationalen *peer reviewed* Journalen publiziert werden. Die dazugehörigen Datensätze können in den kommenden Jahren zudem weiterhin zur Beantwortung unterschiedlicher Fragestellungen herangezogen werden. In diesem Zusammenhang haben sich bereits weitere Kooperationen ergeben. Dabei geht es insbesondere um die Validierung biostatistischer Vorhersagemodelle mikrobieller Metabolisierungsprofile anhand der generierten Datensätze. Damit schaffen die Ergebnisse dieses Projektes die notwendige Grundlage für weitere Forschungsanträge, die in Programmen von nationalen und internationalen Forschungsförderinstituten eingereicht werden.

2h. Darstellung und Erläuterung zu der Einhaltung der Kosten- und Zeitplanung.

Sämtliche im Projekt beschriebenen Vorhaben sind entsprechend der Projektplanung eingehalten worden, gleiches gilt für die veranschlagten Kosten. Aufgrund der erzielten Ergebnisse und der anhaltenden Erfolgsaussichten sind Arbeits- und Zeitaufwand als angemessen anzusehen.

3. Sind inzwischen von dritter Seite (FE-)Ergebnisse bekannt geworden, die für eine mögliche Fortführung des Vorhabens relevant sein können? Wenn ja, bitte ausführen.

Es gibt keine Ergebnisse von Seiten Dritter.

4. War der Einsatz der Bundesmittel für die Erreichung des geplanten Vorhabenziels ursächlich oder wäre dieses Ziel auch ohne Bundesmittel erreicht worden (einschließlich Bewertung evtl. Mitnahmeeffekte)?

Die zur Verfügung gestellten Bundesmittel waren ursächlich für die Durchführung des Vorhabens. Die Fragestellungen hätten ohne zusätzliche Mittel nicht bearbeitet werden können. Durch die erfolgreiche Bearbeitung dieses Projekts haben sich neue Forschungsansätze und neue Kooperationen ergeben und es ist ein Bestand an metabolomischen Daten erhoben worden, der fortwährend dazu beitragen kann unterschiedliche wissenschaftliche Fragestellungen zu beantworten.

5. Auflistung der erfolgten und geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses (Zitierung bzw. Belegexemplar).

Bisher sind keine Veröffentlichungen außer den unter 6. aufgeführten Konferenzteilnahmen erfolgt. Die Ergebnisse werden im Rahmen einer Dissertation (Julia Jensen-Kroll) sowie in mindestens drei Aufsätzen in peer reviewed Journalen publiziert werden. Im Kalenderjahr 2021 werden drei Manuskripte zur Veröffentlichung vorbereitet und in 2021/2 veröffentlicht. Gegenstand dieser Publikationen werden die Ergebnisse der *in-vitro* und *ex-vivo* Studien und deren Übertragbarkeit auf *in-vivo* sein. Aus dem Projekt heraus sind im Laufe der nächsten zwei Jahre weitere Publikationen zu erwarten. Da die erhobenen metabolomischen Daten einen fortwährenden Bestand haben, können sie in weiteren Kooperationen zur Beantwortung unterschiedlichster Fragestellungen und Validierungen herangezogen werden. In diesem Kontext sind in den folgenden Jahren weitere Publikationen in Kooperation mit anderen Projekten zu erwarten.

6. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer – z. B. Anwenderkonferenzen (Angaben, soweit die Art des Vorhabens dies zulässt).

Die Ergebnisse des Projektes werden 2021 und 2022 auf wissenschaftlichen Konferenzen vorgestellt und in Fachzeitschriften veröffentlicht.

7. Tabellarische Aufführung durchgeführter Maßnahmen des Wissenstransfers bzw. Bildung/Weiterbildung im Einzelvorhaben und – sofern erfolgt – im Kontext des EU-Gesamtvorhabens

Datum	Maßnahme	Beteiligte
2017-2020	Regelmäßige Telefonkonferenzen der Projektpartner	Schwarz/ Laudes/ Shaerer/ Köfeler
2020	Final JPI HDHL Symposium; Vortrag	Laudes / Schwarz/ Köfeler
2020	Hochschultagung Uni Kiel, Poster und Posterslam	Schwarz/ Jensen-Kroll
2019	Symposium Kiel Plant Center; Vortrag und Poster	Schwarz/ Demetrowitsch/ Jensen-Kroll
2019	MS Forum Kiel; Vortrag und Poster	Schwarz/ Demetrowitsch/ Jensen-Kroll
2017	Bachelorarbeit (Literatur) "Mikrobielle Abbauprodukte pflanzlicher Sekundärstoffe in vivo und in vitro am Beispiel von Flavanolen" A-K. Monegel	1.Gutachterin: Schwarz 2.Gutachterin: Steffen-Heins Betreuung: Demetrowitsch/ Jensen-Kroll
2018	Bachelorarbeit (Literatur) „Mikrobielle Abbauprodukte pflanzlicher Sekundärstoffe in vivo und in vitro am Beispiel des Flavonols Quercetin und dessen Derivat“ F. Fölster	1.Gutachterin: Schwarz 2.Gutachter: Demetrowitsch Betreuung: Demetrowitsch/ Jensen-Kroll
2018	Bachelorarbeit "Abbau von sekundären Pflanzenstoffen durch die humane Darmmikrobiota" L. Springer	1.Gutachterin: Schwarz 2.Gutachterin: Sprotte (MRI) Betreuung: Demetrowitsch/ Jensen-Kroll
2018	Bachelorarbeit "Analyse hydrophiler Metabolite des Blutes mittels FT-ICR-MS: Einflussparameter der Probenaufarbeitung" S. Fedde	1.Gutachterin: Schwarz 2.Gutachter: Demetrowitsch Betreuung: Demetrowitsch/ Jensen-Kroll
2019	Masterarbeit "Metabolic Profiling of Microbial Degradation Products of Quercetin and Derivatives by Mass Spectrometry" E. Droste	1.Gutachterin: Schwarz 2.Gutachterin: Sprotte (MRI) Betreuung: Demetrowitsch/ Jensen-Kroll
2020	Bachelorarbeit "Metabolisierung von Dopamin durch die humane Mikrobiota " A. Fricke	1.Gutachterin: Schwarz 2.Gutachterin: Sprotte (MRI) Betreuung: Demetrowitsch/ Jensen-Kroll
2020	Bachelorarbeit "Vorkommen von mikrobiellen Abbauprodukten aus Polyphenolen bei Probanden mit regelmäßigem Tee- oder Kaffee Konsum - Massenspektrometrische Analyse des Metaboloms-" S. Schröder	1.Gutachterin: Schwarz 2.Gutachter: Demetrowitsch Betreuung: Demetrowitsch/ Jensen-Kroll
2020	Wissenstransfer im Zuge des Moduls Metabolomics von sekundären Stoffen aus Pflanzen und Zellgesundheit	Schwarz/Demetrowitsch/ Jensen-Kroll