

Fermentierte Lebensmittel restrukturieren die Darmmikrobiota und fördern die Immunregulation durch mikrobielle Metaboliten

Die Autoren:

Sean Paul Spencer^{1,2}, Evelyn Giselle Lemus Silva¹, Elisa Benedetti Caffery¹, Matthew Merrill Carter¹, Rebecca Neal Culver³, Min Wang^{4,5}, Rebecca Hope Gellman¹, Hannah Constance Wastyk⁴, Steven Kyle Higginbottom¹, und Justin Laine Sonnenburg^{1,6,7} *

Zugehörigkeiten:

¹Abteilung für Mikrobiologie und Immunologie, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, 94305, USA

²Fachbereich Medizin, Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie, Universität Stanford Fakultät für Medizin, Stanford, CA, 94305, USA

³Departments of Genetics, Stanford University, Stanford, CA, 94305, USA

⁴Department of Bioengineering, Stanford University, Stanford, CA, 94305, USA

⁵ChEM-H, Stanford University, Stanford, CA, 94305, USA

⁶Zentrum für Mikrobiomstudien am Menschen, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, 94305, USA.

⁷Chan Zuckerberg Biohub, San Francisco, CA, 94305, USA.

*Berichterstattender Autor. E-Mail: jsonnenburg@stanford.edu

Zusammenfassung:

Fermentierte Lebensmittel sind uralte und allgegenwärtig. Man geht davon aus, dass sie in den letzten 10.000 Jahren in fast allen Kulturen verzehrt wurden und seit Millionen von Jahren Bestandteil der Ernährung der Homininen sind. Es gibt immer mehr Belege für ihre potenziellen gesundheitlichen Vorteile, aber die mechanischen Grundlagen ihrer Auswirkungen auf das Darmmikrobiom und die Immunität des Wirts sind noch nicht geklärt. Fermentierte Lebensmittel sind vielfältig und stellen jeweils eine komplexe Mischung aus Lebensmitteln, Mikroben und Metaboliten dar, was es schwierig macht, die Auswirkungen der einzelnen Komponenten zu entschlüsseln. In diesem Beitrag definieren wir die chemische Signatur einzelner fermentierter Lebensmittel, um sie auf der Grundlage der primären metabolischen Endprodukte der Fermentation zu kategorisieren. Anhand von Mausmodellen haben wir festgestellt, dass fermentierte Lebensmittel sowohl mikrobiom- als auch wirtsspezifische Wirkungen haben, die mit ihrer Metabolitenzusammensetzung korrespondieren. Fermentierte Lebensmittel zeigen eine ortsspezifische Umstrukturierung des Darmmikrobioms und eine Förderung der tolerogenen Barriere-Immunität; die Fraktionierung der Salzlake zur Untersuchung der Auswirkungen des mikrobienfreien, metabilitenreichen Überstands zeigt eine ähnliche Aktivität. Laktat, der Hauptmetabolit der Milchsäuregärung und der Hauptmetabolit des Solegetränks, setzt bei Verabreichung in Wasser ein trans-kingdomiales Stoffwechselnetzwerk in Gang, um das Wachstum von *Akkermansia muciniphila* im Dünndarm selektiv zu fördern und gleichzeitig die Immuntoleranz über eine Zunahme der mikrobiota-abhängigen regulatorischen T-Zellen zu unterstützen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die positiven Auswirkungen des Verzehrs von fermentierten Lebensmitteln durch mikrobielle Metaboliten in fermentierten Lebensmitteln vermittelt werden können, unabhängig vom mikrobiellen Inhalt, und unterstreichen die Bedeutung einer weiteren Definition der vielfältigen chemischen Landschaft fermentierter Lebensmittel, um deren potenziellen gesundheitlichen Nutzen und therapeutischen Einsatz zu ermitteln.

Einleitung:

Fermentierte Lebensmittel werden in großem Umfang verzehrt und waren vor der Industrialisierung ein Grundnahrungsmittel auf der ganzen Welt¹. Der Mensch hat eine tiefe evolutionäre Beziehung zu fermentierten Nahrungsbestandteilen und ist an diese angepasst, was durch die positive Selektion von Alkoholdehydrogenase bei fruchtfressenden Vorfahren von Menschenaffen vor ca. 10 Mio. Jahren belegt wird, was auf den Verzehr fermentierter Nahrungsmittel durch Homininen lange vor der vom Menschen betriebenen Fermentation hindeutet². Die derzeitige Definition von fermentierten Lebensmitteln lautet: "Lebensmittel, die durch gewünschtes mikrobielles Wachstum und enzymatische Umwandlung von Nahrungsbestandteilen hergestellt werden"³. Die gesundheitlichen Vorteile von fermentierten Lebensmitteln sind in klinischen Studien noch weitgehend ungetestet^{4,5}, jedoch haben neuere Studien am Menschen die potenziellen Vorteile von fermentierten Lebensmitteln zur Verringerung von Entzündungen und zur Förderung der Mikrobiomvielfalt hervorgehoben^{6,7}. Darüber hinaus sind die mechanistischen Erkenntnisse über die Wirkung fermentierter Lebensmittel auf die Wirtsbiologie durch ihre mikrobielle Vielfalt und chemische Komplexität begrenzt⁸⁻¹⁴. Die chemischen Identitäten der verschiedenen mikrobiellen Stoffwechselprodukte in fermentierten Lebensmitteln sind weniger gut beschrieben und könnten der Schlüssel zum Verständnis ihrer gesundheitlichen Auswirkungen sein.

Das Immunsystem des Darms ist hervorragend darauf eingestellt, auf mikrobielle und metabolische Reize im Magen-Darm-Trakt zu reagieren, und frühere Daten haben gezeigt, dass die Verabreichung von fermentierten Lebensmitteln Auswirkungen auf das Immunsystem haben kann¹⁵. Wir stellten die Hypothese auf, dass fermentierte Lebensmittel die Immunität des Wirts sowohl über die lebende mikrobielle Komponente als auch über ihre chemischen Stoffwechselprodukte beeinflussen können. Wir verabreichten Mäusen ganze fermentierte Lebensmittel und verglichen ihre Auswirkungen direkt mit sterilisierten fermentierten Lebensmitteln, die chemische Metaboliten in Abwesenheit lebender Organismen enthielten.

Wir haben eine kürzlich entwickelte, auf Mikrobiom-Metaboliten fokussierte LC-MS-Pipeline verwendet, um die chemische Vielfalt gängiger fermentierter Lebensmittel¹⁶ in Kombination mit einer GC-MS-Bewertung des SCFA- und organischen Säuregehalts zu untersuchen. Wir haben festgestellt, dass fermentierte Lebensmittel anhand ihrer detaillierten Metabolitenprofile in Gruppen eingeteilt werden können, was auch einer Klassifizierung anhand ihrer dominanten Metaboliten entspricht: Laktat und/oder Acetat. Es ist bekannt, dass sowohl Laktat als auch Acetat mit dem Immunsystem interagieren, ihre Rolle im Zusammenhang mit oral verzehrten fermentierten Lebensmitteln ist jedoch noch nicht ausreichend untersucht worden. In diesem Beitrag charakterisieren wir die mikrobielle und chemische Zusammensetzung gängiger fermentierter Lebensmittel und bewerten ihre Auswirkungen auf die Zusammensetzung der Mikrobiota und die Immunität des Wirts anhand von Mausmodellen. Wir stellen fest, dass Laktat ein Schlüsselmetabolit ist, der die Zusammensetzung der Darmmikrobiota maßgeblich umstrukturiert und die Immunität des Wirts verändert.

Ergebnisse:

Um die chemische Zusammensetzung gängiger fermentierter Lebensmittel zu untersuchen, kauften wir im Handel erhältliche fermentierte Lebensmittel und untersuchten den Gehalt an Carbonsäuren, einschließlich kurzkettiger Fettsäuren (SCFA) (Abb. 1a). Laktat war in hohen Mengen in Joghurt und fermentierter Sauerkrautsole vorhanden, während es in Kombucha und Miso fehlte. Die einzige SCFA, die in nennenswerten Mengen vorhanden war, war Acetat, das in fermentierter Sauerkrautsole gefunden wurde und die einzige in Kombucha vorhandene Carbonsäure war. Miso-Paste wies keine nennenswerten Mengen an üblichen carbonsäurehaltigen Gärungsprodukten auf. Wir haben eine breitere Metaboliten-Untersuchung

durchgeführt, bei der wir eine kürzlich entwickelte mikrobiomorientierte Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie-Pipeline (LC-MS) eingesetzt haben, um mikrobielle Metaboliten in fermentierten Lebensmitteln zu identifizieren¹⁶. Wir fanden heraus, dass fermentierte Lebensmittel unterschiedliche chemische Signaturen aufweisen, die sich nach Art des fermentierten Lebensmittels und nach Art der Fermentation (acetogen vs. Milchsäure) gruppieren (Abbildung 1b).

Da unsere frühere Studie darauf hinwies, dass fermentierte Lebensmittel die Zusammensetzung der Darmmikrobiota verändern können⁶, behandelten wir Mäuse mit einer konventionellen Mikrobiota entweder mit ganzer Sauerkrautsole, filtersterilisierter Sauerkrautsole oder Laktat (Abbildung 2a). Die fäkalen und zökalen Bakteriengemeinschaften jeder Behandlung wurden mit Hilfe der permutativen multivariaten Varianzanalyse (PERMANOVA) getrennt geordnet. Dabei zeigte sich, dass sowohl bakterielle Metaboliten als auch Laktat allein die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota signifikant verändern, und zwar im Gegensatz zu ganzer Sauerkrautsole (Abbildung 2a).

Anschließend untersuchten wir die Auswirkungen von Sauerkrautsole und Laktat auf die Zusammensetzung der Darmmikrobiota bei gnotobiotischen Mäusen, die mit einer gesunden menschlichen Stuhlprobe besiedelt waren (Abbildung 2b). Während die bakterielle Zusammensetzung der Fäkalien nicht signifikant verändert wurde, war dies bei der Zusammensetzung der Ilea der Fall, mit einer Anreicherung in den Familien *Akkermansiaceae* und *Lachnospiraceae* (Abbildung 2b). Diese Daten deuten auf eine dominante Wirkung der Aufnahme fermentierter Lebensmittel auf die Zusammensetzung der Mikrobiota im Dünndarm hin.

Angesichts unserer Daten, die darauf hindeuten, dass die Aufnahme fermentierter Lebensmittel die Mikrobiota des Dünndarms verändert, isolierten wir Immunzellen aus dem Dick- und Dünndarm zur Analyse (Abb. 3a). Wir fanden heraus, dass die Anzahl der CD4⁺ T-regulatorischen Zellen (Treg) in der Lamina propria des Dünndarms, nicht aber im Dickdarm nach der Verabreichung von ganzer Sauerkrautsalzlösung erhöht war (Abb. 3a). Die Anzahl der Treg-Zellen war bei der Verabreichung von ganzer Sauerkrautsole oder filtersterilisierter Sauerkrautsole ebenfalls erhöht, was darauf hindeutet, dass die Stoffwechselprodukte fermentierter Lebensmittel allein die Fähigkeit haben, regulatorische Reaktionen im Dünndarm zu fördern (Abb. 3b). Anschließend verabreichten wir Laktat, einen reichlich vorhandenen Metaboliten aus fermentierten Lebensmitteln, und stellten ebenfalls eine Zunahme der Tregs fest (Abb. 3c). Acetat, ein weiterer reichlich vorhandener Metabolit aus fermentierten Lebensmitteln, führte nicht zu einer Zunahme der Tregs, was auf eine besondere Fähigkeit von Laktat hinweist, die Immunität des Dünndarms zu beeinflussen (Abb. 3d).

Das Kompartiment der regulatorischen T-Zellen im Darm wird durch die Mikrobiota reguliert¹⁷. Wir testeten, ob die beobachtete Expansion dieses Zelltyps vom Vorhandensein eines Mikrobioms abhängig ist (Abb. 3e). In der Tat führte die Verabreichung von Laktat an keimfreie Mäuse nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Treg-Zahlen (Abb. 3e). Anschließend haben wir Mäuse mit einem einzigen Bakterienstamm aus fermentierten Lebensmitteln, *Lactocaseibacillus paracasei*, der den Dünndarm besiedelt (Abb. 4a) und reichlich Laktat produziert, monokolonisiert, um festzustellen, dass ein einziger Bakterienstamm aus fermentierten Lebensmitteln in der Lage war, die Zahl der regulatorischen T-Zellen zu erhöhen (Abb. 4a). Um die Rolle bakterieller Metaboliten bei der Förderung regulatorischer T-Zellen in einem reduktionistischen System zu klären, haben wir Mäuse mit einem einzigen Bakterienisolat mit Kolonisierung des Dünndarms (Abb. 4b) und begrenzter Kapazität zur Laktatproduktion, *E. coli* MG1655, monokolonisiert und filtrierte Sauerkrautsole verabreicht. *E. coli* allein hat keinen Einfluss auf die Tregs im Dünndarm (Abb. 4b). Wenn jedoch fermentierte Lebensmittelmetaboliten verabreicht werden, ist die durch *E. coli* induzierte Treg-Zell-Reaktion im Darm deutlich erhöht (Abb. 4b).

Diskussion:

Angesichts des weit verbreiteten und langjährigen Verzehrs von fermentierten Lebensmitteln und neuerer Daten, die darauf hindeuten, dass sie einen gesundheitlichen Nutzen haben können,

besteht ein dringender Bedarf, die mikrobielle und chemische Vielfalt sowie ihre Auswirkungen auf die Interaktionen zwischen Mikrobiom und Wirt weiter zu charakterisieren⁶. Die chemische Vielfalt von fermentierten Lebensmitteln mittels einer auf mikrobielle Metaboliten ausgerichteten LC/MS-Pipeline zeigt eine Gruppierung nach Fermentationsart. Die dominierenden Metaboliten organischer Säuren, die die Endprodukte der Fermentation sind, Laktat und Acetat, sind umgekehrt proportional, und ihre relative Häufigkeit entspricht den breiteren metabolomischen Profilgruppen.

Jüngste Erkenntnisse zeigen, dass die Aufnahme fermentierter Lebensmittel die Zusammensetzung der gastrointestinalen Mikrobiota verändert. Es bleibt jedoch unklar, wie lebende Mikroben oder chemische Metaboliten unabhängig voneinander mit dem Mikrobiom interagieren⁵⁻⁷. Wir fanden heraus, dass sterile Sauerkrautsole oder Laktat allein die fäkale und zökale Mikrobiota von konventionellen Mäusen auf eine andere Art und Weise veränderte als die ganze Sole, was darauf hindeutet, dass die Bestandteile fermentierter Lebensmittel, insbesondere die Metaboliten im Vergleich zum Gehalt an lebenden Mikroben, unterschiedliche Rollen spielen und die Darmmikroben beeinflussen können. Wurde keimfreien Mäusen, die mit gesunden menschlichen Fäkalienproben humanisiert wurden, Vollsole oder Laktat verabreicht, beobachteten wir eine signifikante Verschiebung der Mikrobiota im terminalen Ileum, die im Kot nicht erkennbar war, mit einer Anreicherung von *Akkermanisa muciniphila*. Bei humanisierten Mäusen sehen wir also, dass die Hauptauswirkungen der Aufnahme fermentierter Nahrungsmittel auf die Mikrobiota des Dünndarms ausgeübt werden und weitgehend unabhängig von lebenden Mikroben sind.

Angesichts der Förderung fermentierter Lebensmittel durch *A. muciniphila* und der zuvor berichteten Fähigkeit dieser Spezies, Tregs zu induzieren¹⁸, haben wir die Auswirkungen fermentierter Lebensmittel auf das Wirtsimmunsystem untersucht. Bemerkenswerterweise vermehren sich die Tregs in der Lamina propria des Dünndarms, aber nicht im Dickdarm. Die ortsspezifische Veränderung der Mikrobiota-Zusammensetzung und die Verschiebung des regulatorischen Immunsystems stehen im Einklang mit der oralen Aufnahme und den relativ höheren Konzentrationen fermentierter Lebensmittelmetaboliten im Dünndarm. Tregs im Dünndarm wurden in ähnlicher Weise durch die Verabreichung von steriler Sauerkrautsole oder Laktat allein, nicht aber durch Acetat, vermehrt. Da die Tregs im Darm durch das Vorhandensein des Mikrobioms reguliert werden, haben wir getestet, ob die beobachtete Wirkung von Laktat mikrobiomabhängig ist. In der Tat nahmen bei keimfreien Mäusen, die Laktat erhielten, die Tregs im Darm nicht zu, was darauf hindeutet, dass Laktat mikrobiomabhängige Tregs beeinträchtigt.

Die Besiedlung von keimfreien Mäusen mit einem einzigen Bakterium, von dem bekannt ist, dass es den Dünndarm besiedelt und Laktat produziert, *Lactocaseibacillus paracasei*, erhöhte die Tregs sowohl im Dün- als auch im Dickdarm, wahrscheinlich aufgrund der erhöhten Laktatkonzentrationen im Dün- und Dickdarm in dieser Situation. Die Monokolonisierung von keimfreien Mäusen mit *E. coli*, die den Dünndarm ohne signifikante Laktatproduktion besiedeln, führte nicht zu einer Zunahme der Tregs im Dünndarm; die Verabreichung steriler fermentierter Nahrung an *E. coli*-besiedelte Mäuse führte jedoch zu einer starken Zunahme der Tregs. Diese Ergebnisse in einem monoassoziierten gnotobiotischen Mausmodell zeigen, dass fermentierte Nahrungsmittel als ein von der Ernährung abgeleitetes Signal fungieren können, um den Tonus der Mikrobiota-induzierten Immunität unabhängig von einer veränderten Mikrobiota-Zusammensetzung zu verschieben.

Wir konnten zwar nachweisen, dass oral aufgenommenes Laktat starke, auf den Wirt gerichtete Wirkungen im Dünndarm hat, doch der Mechanismus dieser Interaktion bleibt unklar. Wir stellen die Hypothese auf, dass Laktat eine direkte Interaktion mit dem Wirt hat, insbesondere im Dünndarm. Laktat wird von Immunzellen über die Transportkanäle MCT1-4 als Energiequelle genutzt und kann auch über GPR81 und GPR31 signalisieren^{19,20}. Die Förderung von Tregs durch Laktat in der Tumormikroumgebung ist gut untersucht und es wird angenommen, dass sie sowohl die direkte Nutzung von Laktat als Kohlenstoffquelle durch Tregs als auch eine Signalkapazität in myeloischen Zellen beinhaltet^{21,22 23, 24}. Die Rolle von Laktat in der intestinalen Homöostase ist weniger gut untersucht, jedoch deuten neuere Daten darauf hin, dass

die Laktatsignalisierung über GPR81 auf hämatopoetischen Zellen ein wichtiger Regulator der Entzündung ist²⁵. Unsere Ergebnisse belegen, dass Laktat ein Schlüsselmetabolit ist, der zur Immunregulierung des Darms beiträgt, und dass die orale Aufnahme von laktathaltigen fermentierten Lebensmitteln ein starkes Signal zur Begrenzung von Entzündungen im Dünndarm sein kann, und zwar sowohl über die Mikrobiota als auch über direkte Effekte auf den Wirt.

Acetat, das fermentative Endprodukt der acetogenen Fermentation in Kombucha, verändert die Tregs im Dünndarm nicht, wenn es oral eingenommen wird. Dies deutet darauf hin, dass die kritische regulatorische Funktion von Acetat möglicherweise spezifisch für seine Erzeugung und Wahrnehmung im Dickdarm ist und nicht durch orale Aufnahme verstärkt wird²⁶⁻²⁸. Obwohl wir die Auswirkungen von ganzem oder sterilem Kombucha nicht untersucht haben, zeigen unsere Daten, dass die Acetatkomponente von Kombucha die Immunregulation im Dünndarm wahrscheinlich nicht fördert. Es ist wahrscheinlich, dass andere Stoffwechselprodukte aus fermentierten Lebensmitteln in Kombucha Auswirkungen auf den Wirt oder das Mikrobiom haben, aber dies bleibt ungetestet.

Diese Studie verdeutlicht die Komplexität und Vielfalt der gängigen fermentierten Lebensmittel. Während der relative Beitrag von lebenden Mikroben oder mikrobiellen Metaboliten zu den Wirtseffekten von fermentierten Lebensmitteln unklar geblieben ist, haben wir herausgefunden, dass mikrobielle Metaboliten allein die Fähigkeit haben, sowohl die Zusammensetzung der Mikrobiota als auch die Immunität des Wirts zu verändern. Darüber hinaus stellen wir fest, dass fermentierte Lebensmittel auf der Grundlage ihres vorherrschenden fermentativen Endprodukts, Laktat oder Acetat, funktionell unterteilt werden können, wobei laktathaltige fermentierte Lebensmittel eine starke immunregulierende Wirkung im Dünndarm haben.

Ähnlich wie bei den jüngsten Vorschlägen für eine tägliche Zufuhr von Mikroben deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass wir auch von einer täglichen Zufuhr von bakteriellen Stoffwechselprodukten und insbesondere von Laktat profitieren könnten²⁹. Künftige Studien sollten sich auf die Identifizierung spezifischer Metaboliten in fermentierten Lebensmitteln konzentrieren, die einen gesundheitlichen Nutzen haben, sowie auf die Mikroben und die Wege, die zu ihrer Produktion führen³⁰. Mikrobiologisch und chemisch definierte fermentierte Lebensmittel sind auf dem besten Weg, sich zu leistungsfähigen und wohlschmeckenden Instrumenten zur Förderung der Gesundheit sowie zur Prävention und Behandlung von Krankheiten zu entwickeln.

Beiträge der Autoren:

SPS und JLS konzipierten die Experimente und verfassten das Manuskript. ELS, RHG und SKH nahmen an Mausexperimenten teil und halfen bei deren Analyse. RNC und MMC halfen bei der Mikrobiomanalyse des Stuhls. HCW, MW und EBC halfen bei der Metabolomanalyse.

Danksagungen:

Diese Arbeit wurde durch großzügige Spenden des Center for Human Microbiome Research finanziert. SPS wurde von NIH T32 DK007056 unterstützt. MMC wurde durch das Stanford Graduate Smith Fellowship unterstützt. JLS ist ein Chan-Zuckerberg Biohub Forscher und wird von den National Institutes of Health mit DP1-AT009892 und R01-DK085025 unterstützt. Die Zellsortierung/Durchflusszytometrie-Analyse für dieses Projekt wurde mit Instrumenten in der Stanford Shared FACS Facility unter Verwendung der NIH Shared Instrument Grants S10RR025518-01, S10RR027431-01, 1S10OD026831-01 durchgeführt. Wir möchten Arianna Burke für die technische Unterstützung danken.

Erklärung über die Interessenbekundung:

HCW und JLS sind Gründer und Aktionäre von Interface Biosciences. JLS ist Gründer, Aktionär und Mitglied des wissenschaftlichen Beirats von Novome Biotechnologies.

Verfügbarkeit von Daten und Materialien:

Die Autoren erklären, dass die Daten, die die Ergebnisse dieser Studie untermauern, in der Veröffentlichung und den ergänzenden Informationsdateien enthalten sind.

Abbildung

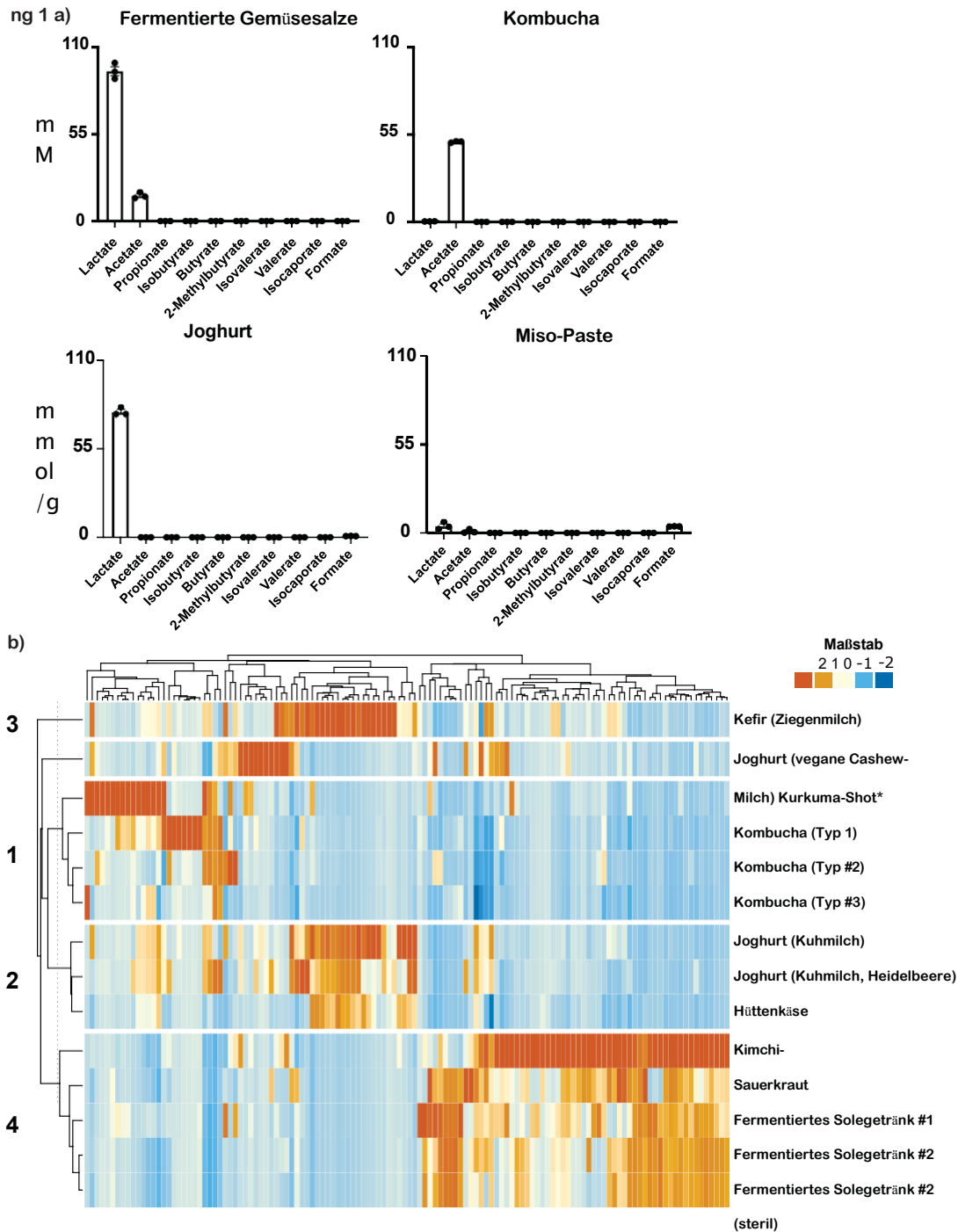
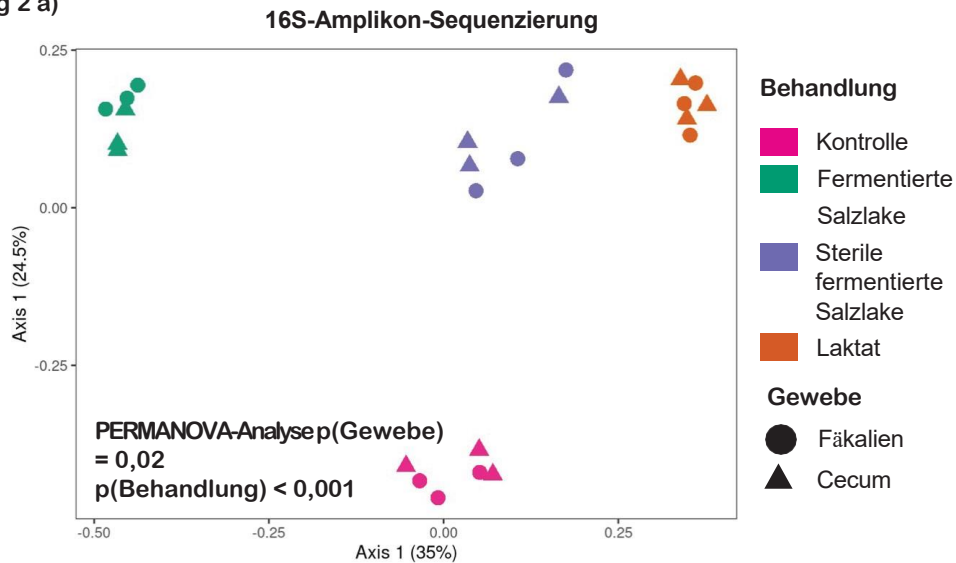


Abbildung 1: Fermentierte Lebensmittel weisen unterschiedliche chemische Signaturen auf.

a) Konzentrationen organischer Säuren in kommerziell erhältlichen fermentierten Lebensmitteln (* bedeutet, dass das Lebensmittel nicht fermentiert wurde). b) Hierarchische Clusterbildung von Metaboliten, die in kommerziell fermentierten Lebensmitteln nachgewiesen wurden. Dargestellt sind die Metaboliten mit einer relativen Häufigkeit in den obersten 5 % aller Metaboliten, die in mindestens einem fermentierten Lebensmittel gefunden wurden.

Abbildung

ng 2 a)



b)

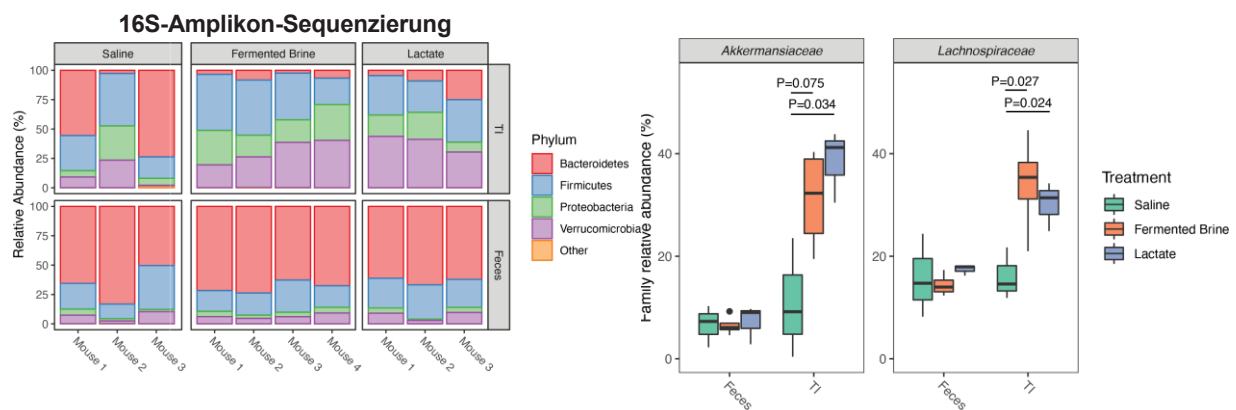


Abbildung 2: Bestandteile fermentierter Lebensmittel verändern das intestinale Mikrobiom auf unterschiedliche Weise

a) Herkömmliche Mäuse, die 5 Wochen lang die angegebene Behandlung erhielten und mittels 16S-Amplikon-Sequenzierung von Kot und Zäkuminhalt analysiert wurden. Die dargestellte Grafik ist eine Hauptkoordinatenanalyse (PCoA), die mittels PERMANOVA analysiert wurde.

b) Gnotobiotische Mäuse, die mit gesundem menschlichen Stuhl kolonisiert wurden und die angegebene Behandlung für 4 Wochen erhielten, wurden mittels 16S-Amplikon-Sequenzierung analysiert, wobei die relative Häufigkeit auf Phylum-Ebene (linkes Feld) und signifikant veränderte Bakterienfamilien (rechtes Feld) angezeigt wurden.

Abbildung 3

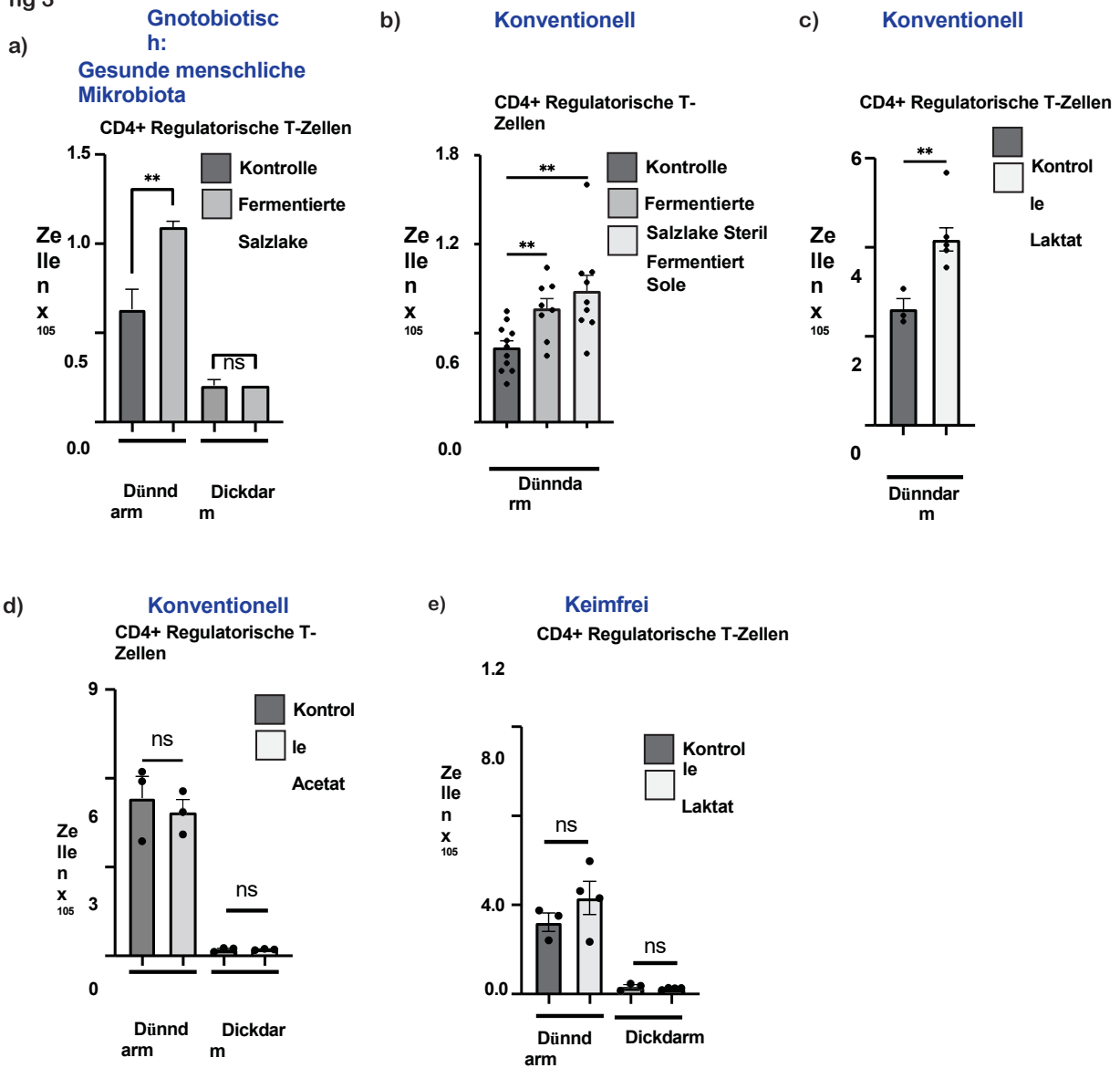


Abbildung 3: Metaboliten aus fermentierten Lebensmitteln fördern mikrobiota-abhängige regulatorische T-Zellen a) Gnotobiotische Mäuse, die mit gesundem menschlichem Stuhl kolonisiert wurden, erhielten 4 Wochen lang Sauerkrautsole und aus dem Darm isolierte CD4+Foxp3+ T-regulatorische Zellen wurden quantifiziert b) Herkömmliche Mäuse erhielten 4-5 Wochen lang die angegebene Behandlung und aus dem Darm isolierte CD4+Foxp3+ T-regulatorische Zellen wurden quantifiziert; Die Ergebnisse wurden über 3 Experimente gepoolt. c) Konventionelle Mäuse erhielten 4 Wochen lang Laktat und aus dem Darm isolierte CD4+Foxp3+ T-regulatorische Zellen wurden quantifiziert. d) Konventionelle Mäuse erhielten 4 Wochen lang Acetat und aus dem Darm isolierte CD4+Foxp3+ T-regulatorische Zellen wurden quantifiziert. e) Keimfreie Mäuse erhielten 4 Wochen lang Laktat und aus dem Darm isolierte T-regulatorische Zellen wurden quantifiziert. ** $p \leq 0.01$, nicht signifikant (NS).

Abbildung 4

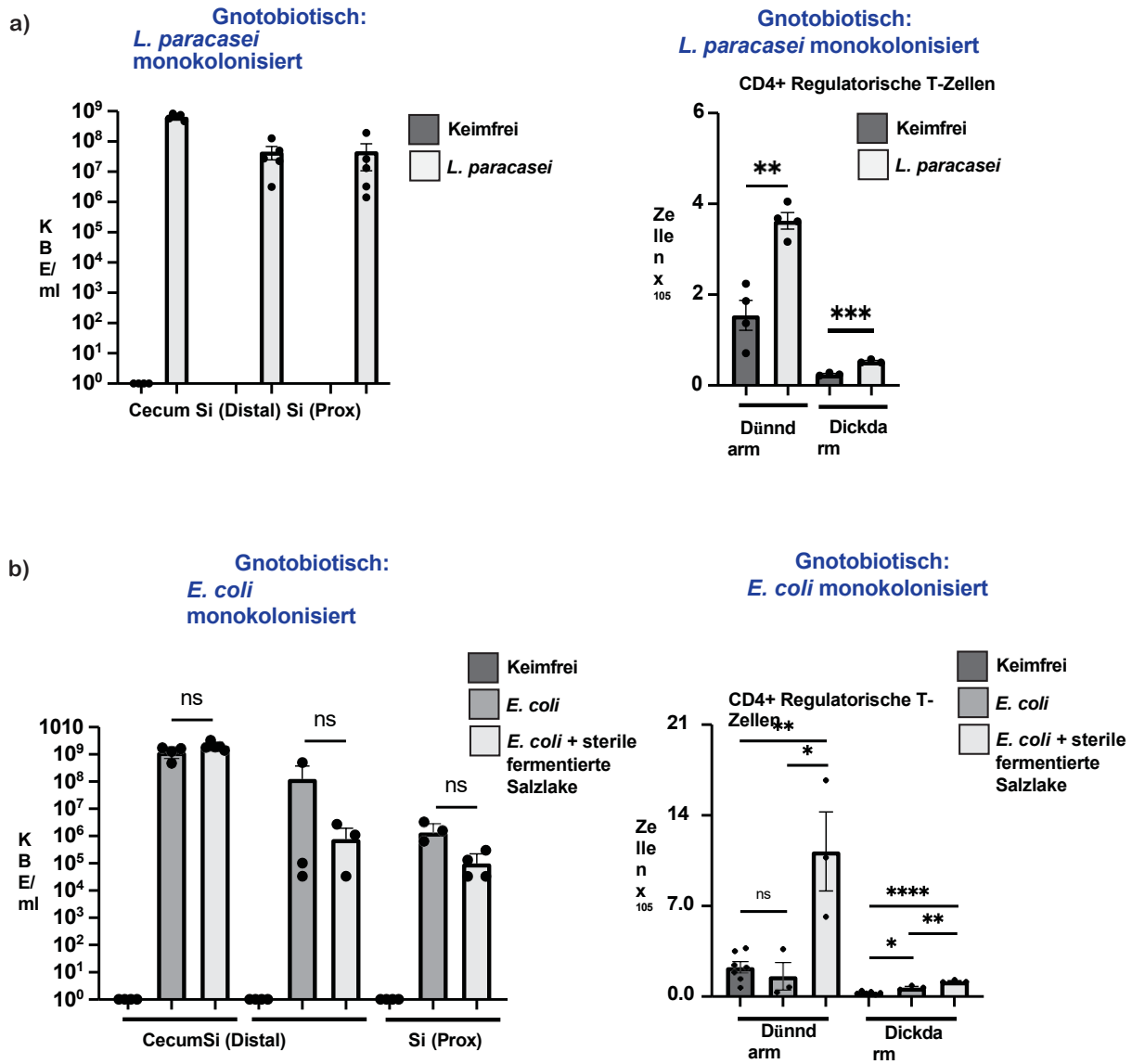


Abbildung 4: Probiotische Milchsäurebakterien oder chemische Stoffwechselprodukte aus fermentierten Lebensmitteln fördern regulatorische T-Zell-Reaktionen

a) Gnotobiotische Mäuse, die 2 Wochen lang mit einem aus fermentierten Lebensmitteln gewonnenen *L. paracasei*-Stamm kolonisiert wurden. Linkes Feld: Bewertung der koloniebildenden Einheiten (KBE) an der angegebenen Stelle, Dünndarm (Si), proximal (Prox). Rechtes Feld: CD4+, Foxp3+ T-regulatorische Zellen, die aus dem Darm isoliert wurden, wurden quantifiziert. b) Gnotobiotische Mäuse, die mit *E. coli* MG1655 kolonisiert und 2 Wochen lang mit steriler, fermentierter Salzlösung behandelt wurden. Linkes Feld: Koloniebildende Einheiten (KBE), bewertet an der angegebenen Stelle, Dünndarm (Si), Proximal (Prox). Rechtes Feld: Aus dem Darm isolierte CD4+, Foxp3+ T-Regulatorzellen wurden quantifiziert. Nicht signifikant (NS), * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $< 0,001$, **** $< 0,0001$.

Materialien und Methoden:

DNA-Isolierung und 16S-Amplikon-Sequenzierung

Die DNA wurde aus der angegebenen Quelle mit dem MoBio PowerSoil-Kit gemäß dem Herstellerprotokoll extrahiert und an der V4-Region des 16S ribosomalen RNA (rRNA)-Untereinheiten-Gens amplifiziert. Es wurden 250 Nukleotide (nt) Illumina-Sequenzierungs-Reads erzeugt. 16S rRNA-Gen-Amplikon-Sequenzierungsdaten wurden mit der QIIME-Pipeline Version 1.8³² demultiplexiert. Amplikon-Sequenzvarianten (ASVs) wurden mit einem gelernten Sequenzierungsfehlerkorrekturmodell (DADA2-Methode)³³ unter Verwendung des dada2-Paketes in R identifiziert. ASVs wurden mithilfe der GreenGenes-Datenbank (Version 13.8) taxonomisch zugeordnet.

Fermentierte Lebensmittel

Bei den untersuchten fermentierten Lebensmitteln handelte es sich um handelsübliche Produkte, die in Lebensmittelgeschäften gekauft wurden.

Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) Analyse von SCFAs und Laktat

Für Joghurt und Miso wurden ~100 mg eines halbfesten Lebensmittels in ein 2-ml-Schraubverschlussröhrchen (oder eine 96-Well-Platte) eingewogen, das sechs 6-mm-Keramikkügelchen (Precellys® CK28 Lysing Kit) enthält. Anschließend wurden 500 µL einer Extraktionslösung (20 µL 10 mM n-Crotonsäure in Wasser als interner Standard, 100 µL 6 N HCl, 380 µL ddH₂O) und 500 µL Diethylether in jedes Röhrchen gegeben. *Für Sauerkrautsole und Kombucha* wurde 1 ml des flüssigen Lebensmittels bei 13000 x g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden in 400 µl Extraktionslösung (20 µl 10 mM n-Crotonsäure in Wasser als interner Standard, 100 µl 6 N HCl, 280 µl ddH₂O) und 500 µl Diethylether in das Perlenröhrchen gegeben. *Für authentische Standards* wurden 100 µl SCFAs/Lactat-Mischlösung (von 5000 µM bis 0,5 µM, 2-fache Verdünnungsreihe) zu 400 µl Extraktionslösung (20 µL 10 mM n-Crotonsäure in Wasser als interner Standard, 100 µL 6 N HCl, 280 µL ddH₂O) und 500 µL Diethylether im Perlenröhrchen gegeben.

Alle Proben wurden durch kräftiges Schütteln mit einem QIAGEN Tissue Lyser II bei 25/s für 10 min homogenisiert. Die resultierenden Homogenate wurden 10 Minuten lang bei 18000 x g zentrifugiert. Die organische Schicht wurde in ein neues Glasfläschchen (29391-U, Supelco) überführt, um die Derivatisierung nach folgendem Verfahren durchzuführen: 100 µl Diethylether-Extrakt wurden mit 10 µl MTBSTFA gemischt und 2 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. 1 µl der derivatisierten Proben wurde mit einem 7890B GC-System (Agilent Technologies) und einem 5973 Network Mass Selective Detector (Agilent Technologies) analysiert. Für die GC-MS wurden die folgenden Chromatographiebedingungen verwendet: Säule: HP-5MS, 30 m, 0,25 mm, 0,25 µm; Injektionsmodus: splitless; Temperaturprogramm: 40 °C für 0,1 min; 40-70 °C bei 5 °C/min, Halten bei 70 °C für 3,5 min; 70-160 °C bei 20 °C/min; 160-325 °C bei 35 °C/min, Gleichgewichtseinstellung für 3 min. 1 µL jeder Probe wurde injiziert und die Analytkonzentrationen wurden durch Vergleich ihrer Peakflächen mit denen der externen authentischen Standards mit der MassHunter Quantitative Analysis Software quantifiziert.

Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS)

Die fermentierten Lebensmittelproben wurden in LC-MS-Methanol extrahiert. Die Überstände der Proben wurden anschließend überführt, eingedampft und in einer internen Standardmischung (50 % Methanol) rekonstituiert. Die Metabolitenproben wurden auf einem LC-MS qTOF-Gerät mit Umkehrphasen-C18-Positiv-, C18-Negativ- und HILIC-Positiv-Methoden analysiert, wie unter¹⁶ beschrieben. Die Annotation der Verbindungen erfolgte mithilfe der MSDIAL-Software³¹

und einer authentischen Standardreferenzbibliothek¹⁶. Zur Quantifizierung der Metabolitenmengen wurde die Fläche unter der Kurve für jeden annotierten Metaboliten anhand der Summe der internen Standards in jeder Probe normalisiert.

Zellisolierung aus dem Darm

Das Protokoll wurde aus früheren^{34,35} übernommen. Den Mäusen wurde der Dünndarm entnommen, die Peyer'schen Flecken wurden entfernt, das Gewebe wurde in Längsrichtung geschnitten und in PBS gewaschen. Das Gewebe wurde dann in 1-2 cm lange Schnitte geschnitten und in einen 125-ml-Kolben mit 20 ml RPMI mit 2 % FBS, 5 mM EDTA und 5 mM DTT (DL-Dithiotreitol 99 %, Sigma-Aldrich Katalog Nr. D0632) gegeben und 20 Minuten lang auf einer Rührplatte inkubiert. Der Inhalt des Kolbens wurde dann durch ein feinmaschiges Küchensieb in ein 500-ml-Becherglas abgeseiht. Die Dünndarmstücke wurden in ein konisches 50-ml-Röhrchen mit 10 ml serumfreiem Medium mit 5 mM EDTA überführt, 30 Sekunden lang kräftig geschüttelt und dann dreimal durch dasselbe Küchensieb in dasselbe Becherglas abgeseiht. Die aus dem Sieb gewonnenen Dünndarmstücke wurden mit 5 ml PBS gewaschen und in ein 50-ml-Becherglas überführt, mit einer chirurgischen Schere fein zerkleinert, in 7 ml RPMI + 1 mg/ml Liberase + 0,5 mg/ml DNase gegeben und 25 Minuten lang bei 37 °C auf einer Rührplatte bebrütet. Am Ende der Inkubation wurden 5 ml RPMI mit 3 % FBS hinzugefügt, und jede Probe wurde mit Hilfe des Kolbens einer 3-ml-Spritze durch einen 70-µm- und 40-µm-Filter gegeben.

Antikörper und Durchflusszytometrie

Die Antikörper für die Durchflusszytometrie wurden wie unten aufgeführt erworben. Die Identifizierung und das Gating toter Zellen erfolgte in allen Experimenten mit dem fixierbaren LIVE/DEAD-Farbstoff (ThermoFisher). Alle Färbungen wurden mit einem blockierenden Anti-CD16/32-Antikörper (Klon 93, BioLegend) durchgeführt. Für die intrazelluläre Färbung der Zellen wurde das FoxP3/Transkriptionsfaktor-Färbepufferset gemäß den Anweisungen des Herstellers (ThermoFisher) verwendet. **(Antikörper/Fluorophor/Klon/Quelle):** **CD45/PerCP/Cyanine5.5/30- F11/BioLegend**, **CD45.2/Brilliant Violet 711/A20/BioLegend**, **CD4/Brilliant Violet 650/L3T4/BioLegend**, **TCRb/Alexa Fluor 700/H57-597/BioLegend**, **TCRb/PE-Cyanine7/H57- 597/BioLegend**, **CD8a/Brilliant Violet 785/53-6.7/BioLegend**, **Tbet/PE-Cyanin7/4B10/Thermo Fisher**, **Foxp3/eFluor 450/FJK-16s/Thermo Fisher**, **ROR gamma (t)/PE/B2D/Thermo Fisher**, **GATA3/Alexa Fluor 488/L50-823/Thermo Fisher**, **CD90.2/BUV395/53-2.1/Thermo Fisher**, **Ki67/BD Horizon BV711/B56/Thermo Fisher**, **IgA/APC/mA-6E1/Thermo Fisher**

Mäuse

Konventionelle B6-Mäuse wurden entweder von Taconic Biosciences (B6NTac-EF) oder von The Jackson Laboratory erworben. Die Mäuse wurden im Alter von 6-12 Wochen verwendet. Alle Mäuse wurden unter pathogenfreien Bedingungen in einer von der American Association for the Accreditation of Laboratory Animal Care akkreditierten Tiereinrichtung gezüchtet und gehalten. Die fermentierten Lebensmittel wurden entweder 4 Wochen lang mit einer täglichen Schlundsonde von 200 ml verabreicht oder den Mäusen 2-6 Wochen lang in die Trinkwasserflaschen gegeben.

Statistische Analyse

Sofern nicht anders angegeben, wurde für alle statistischen Analysen ein zweiseitiger Student's t-Test verwendet, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$, nicht signifikant (ns, $p > 0,05$)

Referenzen

1. Dimidi E, Cox SR, Rossi M, Whelan K. Fermented Foods: Definitionen und Merkmale, Auswirkungen auf die Darmmikrobiota und Auswirkungen auf die Gesundheit und Krankheit des Magen-Darm-Trakts. *Nutrients*. 2019;11(8). Epub 20190805. doi: 10.3390/nu11081806. PubMed PMID: 31387262; PMCID: PMC6723656.
2. Carrigan MA, Uryasev O, Frye CB, Eckman BL, Myers CR, Hurley TD, Benner SA. Hominiden angepasst, um Ethanol zu metabolisieren, lange bevor der Mensch-gezielte Fermentation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(2):458-63. Epub 20141201. doi: 10.1073/pnas.1404167111. PubMed PMID: 25453080; PMCID: PMC4299227.
3. Marco ML, Sanders ME, Gänzle M, Arrieta MC, Cotter PD, De Vuyst L, Hill C, Holzapfel W, Lebeer S, Merenstein D, Reid G, Wolfe BE, Hutkins R. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021;18(3):196-208. Epub 20210104. doi: 10.1038/s41575-020-00390-5. PubMed PMID: 33398112; PMCID: PMC7925329.
4. Laveffe L, Marasini D, Carbonero F. Microbial Ecology of Fermented Vegetables and Non-Alcoholic Drinks and Current Knowledge on Their Impact on Human Health. *Adv Food Nutr Res*. 2019;87:147-85. Epub 20181207. doi: 10.1016/bs.afnr.2018.09.001. PubMed PMID: 30678814.
5. Marco ML, Heeney D, Binda S, Cifelli CJ, Cotter PD, Foligné B, Gänzle M, Kort R, Pasin G, Pihlanto A, Smid EJ, Hutkins R. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Curr Opin Biotechnol*. 2017;44:94-102. Epub 2016/12/18. doi: 10.1016/j.copbio.2016.11.010. PubMed PMID: 27998788.
6. Wastyk HC, Fragiadakis GK, Perelman D, Dahan D, Merrill BD, Yu FB, Topf M, Gonzalez CG, Van Treuren W, Han S, Robinson JL, Elias JE, Sonnenburg ED, Gardner CD, Sonnenburg JL. Auf die Darmmikrobiota ausgerichtete Ernährung moduliert den menschlichen Immunstatus. *Cell*. 2021;184(16):4137-53.e14. Epub 20210712. doi: 10.1016/j.cell.2021.06.019. PubMed PMID: 34256014.
7. Taylor BC, Lejzerowicz F, Poirel M, Shaffer JP, Jiang L, Aksenov A, Litwin N, Humphrey G, Martino C, Miller-Montgomery S, Dorrestein PC, Veiga P, Song SJ, McDonald D, Derrien M, Knight R. Consumption of Fermented Foods Is Associated with Systematic Differences in the Gut Microbiome and Metabolome. *mSystems*. 2020;5(2). Epub 20200317. doi: 10.1128/mSystems.00901-19. PubMed PMID: 32184365; PMCID: PMC7380580.
8. Tamang JP, Watanabe K, Holzapfel WH. Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. *Front Microbiol*. 2016;7:377. Epub 20160324. doi: 10.3389/fmicb.2016.00377. PubMed PMID: 27047484; PMCID: PMC4805592.
9. Obafemi YD, Oranusi SU, Ajanaku KO, Akinduti PA, Leech J, Cotter PD. Afrikanische fermentierte Lebensmittel: Überblick, neue Vorteile und neue Ansätze zur Erstellung von Mikrobiomprofilen. *NPJ Sci Food*. 2022;6(1):15. Epub 20220218. doi: 10.1038/s41538-022-00130-w. PubMed PMID: 35181677; PMCID: PMC8857253.
10. Leech J, Cabrera-Rubio R, Walsh AM, Macori G, Walsh CJ, Barton W, Finnegan L, Crispie F, O'Sullivan O, Claesson MJ, Cotter PD. Fermented-Food Metagenomics Reveals Substrate-Associated Differences in Taxonomy and Health-Associated and Antibiotic Resistance Determinants. *mSystems*. 2020;5(6). Epub 20201110. doi: 10.1128/mSystems.00522-20. PubMed PMID: 33172966; PMCID: PMC7657593.
11. Villarreal-Soto SA, Bouajila J, Pace M, Leech J, Cotter PD, Souchard JP, Taillandier P, Beaufort S. Metabolome-microbiome signatures in the fermented beverage, Kombucha. *Int J Food Microbiol*. 2020;333:108778. Epub 20200709. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108778. PubMed PMID: 32731153.
12. Macori G, Cotter PD. Neue Einblicke in die Mikrobiologie von fermentierten Milchprodukten. *Curr Opin Biotechnol*. 2018;49:172-8. Epub 20170929. doi: 10.1016/j.copbio.2017.09.002. PubMed PMID: 28964915.
13. Landis EA, Oliverio AM, McKenney EA, Nichols LM, Kfoury N, Biango-Daniels M, Shell LK, Madden AA, Shapiro L, Sakunala S, Drake K, Robbat A, Booker M, Dunn RR, Fierer N, Wolfe BE. Die Vielfalt und Funktion des Mikrobioms von Sauerteigstartern. *Elife*. 2021;10. Epub 20210126. doi: 10.7554/eLife.61644. PubMed PMID: 33496265; PMCID: PMC7837699.
14. Wolfe BE, Button JE, Santarelli M, Dutton RJ. Käserinden-Gemeinschaften bieten vertretbare Systeme für In-situ- und In-vitro-Studien der mikrobiellen Vielfalt. *Cell*. 2014;158(2):422-33. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.041. PubMed PMID: 25036636; PMCID: PMC4222527.
15. van de Wouw M, Walsh CJ, Vigano GMD, Lyte JM, Boehme M, Gual-Grau A, Crispie F, Walsh AM, Clarke G, Dinan TG, Cotter PD, Cryan JF. Kefir verbessert spezifische Beeinträchtigungen der Mikrobiota-Darm-Hirn-Achse in einem Mausmodell, das für Autismus-Spektrum-Störungen relevant ist. *Brain Behav Immun*. 2021;97:119-34. Epub 20210709. doi: 10.1016/j.bbi.2021.07.004. PubMed PMID: 34252569.
16. Han S, Van Treuren W, Fischer CR, Merrill BD, DeFelice BC, Sanchez JM, Higginbottom SK, Guthrie L, Fall LA, Dodd D, Fischbach MA, Sonnenburg JL. Eine Metabolomics-Pipeline für die mechanistische Untersuchung des Darmmikrobioms. *Nature*. 2021;595(7867):415-20. Epub 20210714. doi: 10.1038/s41586-021-03707-9. PubMed PMID: 34262212.

17. Whibley N, Tucci A, Powrie F. Anpassung regulatorischer T-Zellen in Darm und Haut. *Nat Immunol.* 2019;20(4):386-96. Epub 2019/03/19. doi: 10.1038/s41590-019-0351-z. PubMed PMID: 30890797.
18. Ansaldo E, Slayden LC, Ching KL, Koch MA, Wolf NK, Plichta DR, Brown EM, Graham DB, Xavier RJ, Moon JJ, Barton GM. induziert adaptive Immunreaktionen des Darms während der Homöostase. *Science.* 2019;364(6446):1179-84. doi: 10.1126/science.aaw7479. PubMed PMID: 31221858; PMCID: PMC6645389.
19. Llibre A, Grudzinska FS, O'Shea MK, Duffy D, Thickett DR, Mauro C, Scott A. Lactate cross-talk in host-pathogen interactions. *Biochem J.* 2021;478(17):3157-78. doi: 10.1042/BCJ20210263. PubMed PMID: 34492096; PMCID: PMC8454702.
20. Morita N, Umemoto E, Fujita S, Hayashi A, Kikuta J, Kimura I, Haneda T, Imai T, Inoue A, Mimuro H, Maeda Y, Kayama H, Okumura R, Aoki J, Okada N, Kida T, Ishii M, Nabeshima R, Takeda K. GPR31-abhängige Dendritenprotrusion von CX3CR1 im Darm. *Nature.* 2019;566(7742):110-4. Epub 20190123. doi: 10.1038/s41586-019-0884-1. PubMed PMID: 30675063.
21. Multhoff G, Vaupel P. Lactat-averse regulatorische T-Zellen: metabolische Plastizität steuert die Immunsuppression in der Mikroumgebung von Tumoren. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):171. Epub 20210430. doi: 10.1038/s41392-021-00598-0. PubMed PMID: 33931598; PMCID: PMC8087677.
22. Watson MJ, Vignali PDA, Mullett SJ, Overacre-Delgoffe AE, Peralta RM, Grebinoski S, Menk AV, Rittenhouse NL, DePeaux K, Whetstone RD, Vignali DAA, Hand TW, Poholek AC, Morrison BM, Rothstein JD, Wendell SG, Delgoffe GM. Metabolische Unterstützung von tumorinfiltrierenden regulatorischen T-Zellen durch Milchsäure. *Nature.* 2021;591(7851):645-51. Epub 20210215. doi: 10.1038/s41586-020-03045-2. PubMed PMID: 33589820; PMCID: PMC7990682.
23. Brown TP, Bhattacharjee P, Ramachandran S, Sivaprakasam S, Ristic B, Sikder MOF, Ganapathy V. Der Laktatrezeptor GPR81 fördert das Brustkrebswachstum über einen parakrinen Mechanismus, an dem Antigen-präsentierende Zellen in der Tumormikroumgebung beteiligt sind. *Oncogene.* 2020;39(16):3292-304. Epub 20200219. doi: 10.1038/s41388-020-1216-5. PubMed PMID: 32071396.
24. Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, Cyrus N, Brokowski CE, Eisenbarth SC, Phillips GM, Cline GW, Phillips AJ, Medzhitov R. Funktionelle Polarisierung von tumorassoziierten Makrophagen durch vom Tumor stammende Milchsäure. *Nature.* 2014;513(7519):559-63. Epub 20140713. doi: 10.1038/nature13490. PubMed PMID: 25043024; PMCID: PMC4301845.
25. Ranganathan P, Shanmugam A, Swafford D, Suryawanshi A, Bhattacharjee P, Hussein MS, Koni PA, Prasad PD, Kurago ZB, Thangaraju M, Ganapathy V, Manicassamy S. GPR81, ein Zelloberflächenrezeptor für Laktat, reguliert die intestinale Homöostase und schützt Mäuse vor experimenteller Kolitis. *J Immunol.* 2018;200(5):1781-9. Epub 20180131. doi: 10.4049/jimmunol.1700604. PubMed PMID: 29386257; PMCID: PMC5858928.
26. Takeuchi T, Miyauchi E, Kanaya T, Kato T, Nakanishi Y, Watanabe T, Kitami T, Taida T, Sasaki T, Negishi H, Shimamoto S, Matsuyama A, Kimura I, Williams IR, Ohara O, Ohno H. Acetat reguliert die IgA-Reaktivität auf kommensale Bakterien auf unterschiedliche Weise. *Nature.* 2021;595(7868):560-4. Epub 20210714. doi: 10.1038/s41586-021-03727-5. PubMed PMID: 34262176.
27. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly YM, Glickman JN, Garrett WS. Die mikrobiellen Stoffwechselprodukte, kurzkettige Fettsäuren, regulieren die Homöostase der Treg-Zellen im Dickdarm. *Science.* 2013;341(6145):569-73. doi: 10.1126/science.1241165. PubMed PMID: 23828891; PMCID: 3807819.
28. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Yu D, Schilter HC, Rolph MS, Mackay F, Artis D, Xavier RJ, Teixeira MM, Mackay CR. Regulierung von Entzündungsreaktionen durch die Darmmikrobiota und den chemoattraktiven Rezeptor GPR43. *Nature.* 2009;461(7268):1282-6. doi: 10.1038/nature08530. PubMed PMID: 19865172; PMCID: PMC3256734.
29. Marco ML, Hill C, Hutkins R, Slavin J, Tancredi DJ, Merenstein D, Sanders ME. Sollte es eine empfohlene tägliche Zufuhr von Mikroben geben? *J Nutr.* 2020;150(12):3061-7. doi: 10.1093/jn/nxaa323. PubMed PMID: 33269394; PMCID: PMC7726123.
30. Marco ML. Definieren, wie Mikroorganismen der menschlichen Gesundheit nützen. *Microb Biotechnol.* 2021;14(1):35-40. Epub 20201025. doi: 10.1111/1751-7915.13685. PubMed PMID: 33099885; PMCID: PMC7888441.
31. Tsugawa H, Cajka T, Kind T, Ma Y, Higgins B, Ikeda K, Kanazawa M, VanderGheynst J, Fiehn O, Arita M. MS-DIAL: Datenunabhängige MS/MS-Dekonvolution für umfassende Metabolomanalysen. *Nat Methods.* 2015;12(6):523-6. Epub 20150504. doi: 10.1038/nmeth.3393. PubMed PMID: 25938372; PMCID: PMC4449330.
32. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunencko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME ermöglicht die Analyse von Hochdurchsatz-Community-Sequenzierungsdaten. *Nat Methods.* 2010;7(5):335-6. Epub 2010/04/11. doi: 10.1038/nmeth.f.303. PubMed PMID: 20383131; PMCID: PMC3156573.

33. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. DADA2: Hochauflösende Probeninferenz aus Illumina-Amplikon-Daten. *Nat Methods*. 2016;13(7):581-3. doi: 10.1038/nmeth.3869. PubMed PMID: 27214047; PMCID: 4927377.
34. Goodyear AW, Kumar A, Dow S, Ryan EP. Optimierung der Isolierung von Leukozyten aus dem Dünndarm der Maus für die Analyse des globalen Immunphänotyps. *J Immunol Methods*. 2014;405:97-108. Epub 20140204. doi: 10.1016/j.jim.2014.01.014. PubMed PMID: 24508527.
35. Spencer SP, Wilhelm C, Yang Q, Hall JA, Bouladoux N, Boyd A, Nutman TB, Urban JF, Jr., Wang J, Ramalingam TR, Bhandoola A, Wynn TA, Belkaid Y. Adaptation of innate lymphoid cells to a micronutrient deficiency promotes type 2 barrier immunity. *Science*. 2014;343(6169):432-7. Epub 2014/01/25. doi: 10.1126/science.1247606. PubMed PMID: 24458645.