

---

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Charakterisierung der metabolisch-aktiven  
bakteriellen Gemeinschaften von verschiedenen  
Regionen des gastrointestinalen Trakts bei  
gesunden Menschen

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

*(doctor medicinae)*

an der Medizinischen Fakultät

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Riccardo Vasapoli

aus San Cataldo

Magdeburg 2019

---

## DOKUMENTATIONSBLATT

### **Bibliographische Beschreibung:**

**Vasapolli, Riccardo**

**Charakterisierung der metabolisch-aktiven bakteriellen Gemeinschaften von verschiedenen Regionen des gastrointestinalen Trakts bei gesunden Menschen**

**2019 – 69 Bl. - 8 Abb. - 14 Tab. - 2 Anl.**

### **Kurzreferat:**

Der aktuelle Wissensstand über das menschliche gastrointestinale Mikrobiom basiert hauptsächlich auf die Analyse von Stuhlproben. Die intraindividuelle Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaften in verschiedenen Regionen des GI-Trakts wurde bisher noch nicht untersucht. Unsere Studie war die erste, die untersucht hat, wie sich verschiedene mikrobielle Gemeinschaften entlang des gesamten Magen-Darm-Trakts derselben Individuen entwickeln. Primäres Ziel der Arbeit war es, die transkriptionell aktiven Bakterien an 8 verschiedenen Stellen des GI-Trakts (Speichel aus der Mundhöhle, Corpus und Antrum aus Magen, Duodenum, terminalem Ileum, Colon ascendens, Colon descendens und Faeces) von gesunden Probanden zu charakterisieren. Es wurde eine systematische Methodik zur Analyse der mikrobiellen Zusammensetzung auf allen phylogenetischen Ebenen verwendet, basierend auf Hochdurchsatz-Sequenzierungsmethoden und 16S-rRNA-Profilen. Die Ergebnisse liefern wichtige Informationen über die Zusammensetzung des gastrointestinalen Mikrobioms in Abhängigkeit davon, ob eine *H. pylori*-Infektion vorhanden ist oder nicht. Schlüsselerkenntnisse aus unserer Analyse sind, a) dass der GI-Trakt in vier verschiedene Regionen unterteilt werden kann bezugnehmend auf die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaften (Mundhöhle, oberer GI-Trakt, unterer GI-Trakt, Faeces), b) dass bestimmte aktive Bakterien auf gewisse Regionen beschränkt sind und nur in bestimmten Nischen zu finden sind, c) dass das fäkale Mikrobiom die globale mikrobielle Struktur im gesamten GI-Trakt nicht komplett widerspiegelt. Diese neuen Erkenntnisse über die Zusammensetzung der Darmmikrobiota an verschiedenen anatomischen Stellen bei gesunden Menschen stellen eine solide Grundlage für weitere Untersuchungen zur funktionellen Rolle der Mikroben für die Gesundheit und die Erkrankungen dar.

---

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1.</b>	<b>EINFÜHRUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das menschliche gastrointestinale Mikrobiom.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Etablierung und Entwicklung des Darmmikrobioms - vom Säuglingsalter bis zu fortgeschrittenen Altersstufen.....	2
1.1.2	Funktionen des Mikrobioms.....	3
<b>1.2</b>	<b>Eigenschaften des gastrointestinalen Mikrobioms bei gesunden Menschen.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3</b>	<b>Faktoren, die die Zusammensetzung des Mikrobioms beeinflussen.....</b>	<b>7</b>
<b>1.4</b>	<b>Zusammensetzung der Mikrobiota entlang des gastrointestinalen Traktes.....</b>	<b>9</b>
1.4.1	Die Mundhöhle.....	9
1.4.2	Der Ösophagus.....	9
1.4.3	Der Magen.....	10
1.4.4	Das Duodenum und der Dünndarm.....	11
1.4.5	Das Kolon.....	12
<b>1.5</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>13</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Studienkohorte und Einordnung in der EMGASTA Studie.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2</b>	<b>Probensammlung.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3</b>	<b>Histologische Analyse und Bestimmung vom <i>H. pylori</i>-Status.....</b>	<b>17</b>
<b>2.4</b>	<b>RNA-Extraktion, cDNA-Synthese und Bibliotheksvorbereitung.....</b>	<b>18</b>
<b>2.5</b>	<b>Bioinformatische und statistische Analysen.....</b>	<b>19</b>
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1</b>	<b>Interindividuelle Variation der globalen mikrobiellen Zusammensetzung im oberen und unteren GI-Trakt.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2</b>	<b>Unterschiede in der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften und in Diversitätsmessungen zwischen verschiedenen gastrointestinalen Regionen .....</b>	<b>25</b>
<b>3.3</b>	<b>Taxonomische Zusammensetzung auf verschiedenen phylogenetischen Ebenen der transkriptionell aktiven bakteriellen Gemeinschaften des menschlichen GI-Trakts..</b>	<b>29</b>
<b>3.4</b>	<b>Das gastrointestinale Mikrobiom in <i>H. pylori</i> positiven Probanden .....</b>	<b>33</b>
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Vergleich der Ergebnisse mit ähnlichen Studien der Literatur.....</b>	<b>36</b>

4.2	<b>Einfluss von Wirt und lokoregionalen Bedingungen auf die Zusammensetzung des gastrointestinalen Mikrobioms.....</b>	37
4.3	Entwicklung der Alpha-Diversität entlang des gesamten Gastrointestinaltrakts.....	39
4.4	Bedeutung und klinische Umsetzung: eine mögliche Unterstützung zur Entwicklung von Probiotika.....	40
4.5	<i>H. pylori</i> und die Zusammensetzung des gastrointestinalen Mikrobioms.....	41
4.6	Stärke, Grenzen und Schlussfolgerungen der Arbeit.....	42
5.	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>45</b>
6.	<b>ANHANG .....</b>	<b>47</b>
6.1	Sonstiges.....	47
6.2	Literaturverzeichnis .....	58
6.3	Lebenslauf.....	65
6.4	Verzeichnis der Wissenschaftlichen Veröffentlichungen.....	67
6.5	Danksagung .....	68
6.6	Ehrenerklärung .....	69



**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

16S-rRNA 16S	ribosomale Ribonukleinsäure
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ADL	<i>Activities of Daily Living</i>
aFMT	autologe Fäkale Mikrobiota Transplantation
AMPro	Altern und metabolische Programmierung
ANOSIM	<i>analysis of similarities</i>
BMI	<i>body mass index</i>
bp	<i>base pair</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIRS_IS	<i>Cumulative Illness Rating Scale-Severity Index</i>
CIRS_CI	<i>CIRS-Comorbidity Index</i>
DIFE	Deutsches Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRKS-ID	Identifikationsnummer im deutschen Register für klinischen Studien
ELISA	<i>Enzyme linked Immunosorbent Assay</i>
EMGASTA-Studie	Bedeutung der Ernährung, des gastrointestinalen Mikrobioms und eines gesunden Gastrointestinaltraktes für die Autonomie des alternden Menschen
EFRE	Europäischen Fond für regionale Entwicklung
EPIC-Studie	<i>The European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study</i>
ESS	<i>Exton Smith Scale</i>
FDR	<i>false discovery rate</i>
FMT	Fäkale Mikrobiota Transplantation
g	Gram
GABA	Glutamat in Gamma-Aminobuttersäure
GALT	<i>gut-associated lymphoid tissue</i>
GI	gastrointestinal

---

GCP	<i>gute klinische Praxis (good clinical practice)</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HMP	<i>Human Microbiome Project</i>
IADL	<i>Instrumental ADL</i>
iMed	<i>Helmholtz Initiative on Personalized Medicine</i>
IM	Intestinale Metaplasie
LF	Lymphfollikel
LYM	Lymphozyten
MA	Massachusetts
Max	Maximum
MetaHIT	<i>Metagenomics of the Human Intestinal Tract</i>
Min	Minimum
ml	Milliliter
MALT	<i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>
MNA	<i>Mini Nutritional Assessment</i>
MPI	<i>Multidimensional Prognostic Index</i>
N	<i>Number</i>
n/a	nicht applizierbar
ÖGD	Ösophagogastroduodenoskopie
OLGA	<i>operative link for gastritis assessment</i>
OLGIM	<i>operative link for gastric intestinal metaplasia assessment</i>
OTU	<i>Operational Taxonomic Unit</i>
PC	Plasmazellen
PCoA	<i>Principal Coordinates Analysis</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PERMANOVA	<i>permutational multivariate analysis of variance</i>
pMC	<i>Monte Carlo p-Werte</i>
PMN	Polymorphonukleozyten
PPI	Protonenpumpenhemmern
RNA	Ribonukleinsäure
RDP	<i>Ribosomal Database Project</i>
RUT	<i>Rapid Urease Test</i>
SAT	Stuhlantigentest

SCFA	<i>small chain fatty acids</i>
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SPMSQ	<i>Short Portable Mental Status Questionnaire</i>
Tab.	Tabelle
TLRs	Toll-like-Rezeptoren
USA	United States of America
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentralen Nervensystem

# 1. EINFÜHRUNG

## 1.1 Das menschliche gastrointestinale Mikrobiom

Die menschliche Mikrobiota ist der Komplex von Mikroorganismen, die Gewebe und Flüssigkeiten des menschlichen Körpers besiedeln. Der Großteil der Mikrobiota besteht aus Bakterien, aber auch Viren, Pilze, Protisten und Archaeen sind enthalten. Der Begriff Mikrobiom, der in der Praxis meist als Synonym von Mikrobiota verwendet wird, bezeichnet allerdings eher das gesamte genetische Material einer bestimmten Mikroflora, während sich beispielsweise Bakteriom, Mykom und Virom auf bestimmte Untergruppen derselben beziehen<sup>1</sup>.

In der wissenschaftlichen Literatur wird angegeben, dass in menschlichen Organismen mindestens so viele mikrobielle Zellen wie eukaryotische menschliche Zellen vorhanden sind, was je nach Schätzung absolute Werte in der Größenordnung von  $10^{13}$  oder  $10^{14}$  (Mikroben/menschlichen Zellen Ratio von etwa 10:1 bis 1:1) bedeutet<sup>2-4</sup>. Diese beeindruckende Anzahl von Organismen stellt eine ökologische Gemeinschaft dar, die hauptsächlich aus Kommensalen besteht, die zusammen mit dem menschlichen Wirt leben, ohne ihn zu beeinträchtigen, und Mutualisten, die Teil einer symbiotischen Beziehung sind, in der sowohl der Mensch als auch die Mikroben von der gegenseitigen Aktivität profitieren. Einige Mitglieder der menschlichen Mikrobiota werden als Pathobionten bezeichnet und sind Mikroorganismen, die ein pathogenes Potenzial haben und, unter bestimmten Umständen, zu spezifischen Pathologien führen können<sup>5</sup>.

Nahezu jeder Teil des menschlichen Körpers ist von Mikroben besiedelt. Abhängig von den spezifischen Umweltbedingungen wie beispielweise physikalisch-chemischen Bedingungen können unterschiedliche mikrobielle Gemeinschaften an verschiedenen Stellen des Körpers identifiziert werden, die als Nischen gekennzeichnet sind. Unter allen menschlichen Nischen beherbergt der Magen-Darm-Trakt eine der größten und vielfältigsten mikrobiellen Gemeinschaften<sup>6</sup>.

### 1.1.1 Etablierung und Entwicklung des Darmmikrobioms - vom Säuglingsalter bis zu fortgeschrittenen Altersstufen

Die Besiedlung des menschlichen Gastrointestinaltrakts (GI-Trakt) durch Mikroben beginnt zum Zeitpunkt der Geburt, wenn Säuglinge noch nahezu steril sind. In einigen Studien wurden jedoch Bakterien in Fruchtwasser<sup>7</sup> und Plazenta<sup>8</sup> gesunder Mütter identifiziert, so dass die Hypothese einer früheren Besiedlung, die bereits während des intrauterinen Lebens beginnt, aufgestellt wurde. Gleichwohl hängt die erste Bildung des gastrointestinalen Mikrobioms mit der ersten massiven mikrobiellen Exposition bei der Entbindung zusammen, wobei die anfängliche Zusammensetzung der Mikrobiota vom Entbindungsmodus stark beeinflusst wird. Die gastrointestinale mikrobielle Zusammensetzung von vaginal geborenen Säuglingen ähnelt am Anfang der vaginalen Mikrobiota der Mutter und wird von *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Prevotella* und *Sneathia* spp. dominiert, während mikrobielle Gemeinschaften von per Kaiserschnitt geborenen Kindern eine initial weniger diverse und hauttypische Zusammensetzung aufweisen, die von *Streptococcus*, *Staphylococcus* und *Propionibacterium* spp. dominiert wird<sup>9, 10</sup>. In den ersten Lebenswochen spielt dann die Ernährung bei der Modellierung des Mikrobioms eine wichtige Rolle. Signifikante Unterschiede in der bakteriellen Zusammensetzung wurden zwischen gestillten Neugeborenen und künstlich ernährten Neugeborenen detektiert. Die Exposition gegenüber Laktose und anderen in der Milch enthaltenen Oligosacchariden führt zu einer Dominanz von laktatproduzierenden Organismen wie zum Beispiel *Bifidobacterium* und *Lactobacillus*<sup>11</sup>. Während der Entwöhnungsphase führt die Einstellung des Stillens und die Einnahme von solider Nahrung zur Diversifizierung und funktionellen Reifung der Darmmikrobiota, wodurch der Abbau von Ballaststoffen und komplexen Kohlenhydraten effizienter wird. In den ersten Jahren nimmt die mikrobielle Vielfalt weiter zu und Bakterien wie *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Veillonella*, *Clostridium*, Enterobacteriaceae und andere Firmicutes werden nach und nach eingeführt<sup>12</sup>. Nach 36 Monaten erreicht die Darmmikrobiota eine relative Stabilität und ist ähnlich zu derjenigen eines Erwachsenen, die von den Phyla Bacteroidetes und Firmicutes dominiert wird<sup>13</sup>. Weitere Entwicklungen wurden jedoch bei kleinen Kindern und bei Jugendlichen beschrieben, die ein Mikrobiom haben, das insbesondere mit *Bifidobacterium* spp., *Faecalibacterium* spp. und Mitgliedern der Lachnospiraceae angereichert ist<sup>14</sup>.

Das ausgereiften Darmmikrobiom bleibt im Erwachsenenalter größtenteils stabil und zeichnet sich durch eine gewisse Belastbarkeit aus, dank derer die Zusammensetzung der

mikrobiellen Gemeinschaften nach kleinen Störungen in den ursprünglichen Zustand zurückkehrt (z.B. nach kurzfristiger Ernährungsumstellung oder einer Darmreinigung)<sup>15,16</sup>. Andere Hauptstörungen wie die wiederholte Einnahme von Antibiotika oder dauerhafte Ernährungsumstellungen können jedoch zu erheblichen Veränderungen führen und die Zusammensetzung des Mikrobioms in ein neues Gleichgewicht mit einer anderen Struktur bringen.

Bei älteren Menschen ist die Zusammensetzung des Mikrobioms aufgrund von Ernährungsumstellungen, Lebensgewohnheiten, Medikamenteneinnahme, zunehmender Gebrechlichkeit und altersbedingten Krankheitsbildern enorm variabel. Bei der Analyse des fäkalen Mikrobioms älterer Menschen im Vergleich zu jüngeren Erwachsenen identifizierten Claesson *et al.* relevante Unterschiede in der Häufigkeit von *Bacteroides* spp. und *Clostridium* spp. mit einer deutlich geringeren mikrobiellen Vielfalt und einer höheren interindividuellen Variabilität bei älteren Menschen<sup>17</sup>.

### 1.1.2 Funktionen des Mikrobioms

Als Ergebnis der Koevolution von Wirt und Mikrobiota über Millionen von Jahren, sind Mikroorganismen, die den GI-Trakt besiedeln, bei mehreren Aspekten an der Wirtsphysiologie beteiligt: sie tragen im Rahmen einer symbiotischen Beziehung zu zahlreichen metabolischen, trophischen, protektiven und immunmodulatorischen Funktionen bei, welche essentiell sind für die Aufrechterhaltung der Homöostase des Menschen.

Eine der wichtigsten metabolischen Funktionen der Mikrobiota ist die Fermentation von ansonsten unverdaulichen Oligosacchariden zu kurzkettigen Fettsäuren (*small chain fatty acids*: SCFA) wie Acetat, Propionat und Butyrat, die eine wertvolle Energiequelle für den Wirt darstellen und die Ansammlung von toxischen metabolischen Substanzen wie beispielsweise D-Laktat verhindern können<sup>18,19</sup>. Durch die Expression von Peptidasen und Decarboxylasen sind Darmbakterien außerdem am Aminosäurestoffwechsel beteiligt und wandeln Glutamat in Gamma-Aminobuttersäure (GABA) um, die ein essentieller hemmender Neurotransmitter ist und den Darm mit dem zentralen Nervensystem (ZNS) für unterschiedliche Funktionen verbindet<sup>20</sup>. Des Weiteren stimulieren Bakterienprodukte stimulieren enteroendokrine Zellen, um verschiedene Neuropeptide wie Peptid YY, Neuropeptid Y, Cholecystokinin, *glucagon-like peptide*-1 und -2 und Substanz P zu produzieren. Diese und zahlreiche andere bakterielle Aktivitäten sind wichtig, um die

komplexen bidirektionalen Wechselwirkungen zwischen dem enterischen Nervensystem und dem ZNS (*gut-brain axis*) aufrechtzuerhalten<sup>21</sup>. Die Darmflora trägt auch zum Fettstoffwechsel bei, indem sie die Aktivität der Lipoproteinlipase und Colipase reguliert und die Fettspeicherung in Adipozyten fördert<sup>22, 23</sup>. Weitere wichtige Stoffwechselaktivitäten umfassen die Synthese von Vitamin K und anderen Vitaminen der B-Gruppe<sup>24</sup>, die Umwandlung primärer Gallensäuren in sekundäre Gallensäuren<sup>25</sup>, der Katabolismus von Poliphenolen<sup>26</sup> sowie die Aufnahme von Nahrungsmineralien wie zum Beispiel Kalzium, Magnesium und Eisen<sup>27</sup>. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Darmmikroorganismen am Stoffwechsel und an der Entgiftung zahlreicher Xenobiotika beteiligt sind, inklusive Medikamenten, giftigen Nahrungsbestandteilen und Umwelttoxinen<sup>28</sup>.

Die Reifung und Integrität der gastrointestinalen Schleimhaut hängt stark von den Interaktionen mit dem Mikrobiom ab. Die gastrointestinale Barriere besteht aus einem einschichtigen Zylinderepithel, wo die Zellen durch enge Verbindungen miteinander verbunden sind und lumenwärts von Schleim bedeckt sind, der von Becherzellen abgesondert wird und den Darm physisch vor Verletzungen schützt. Die bakteriellen Gemeinschaften im Darmlumen sind ein wesentlicher Bestandteil der gastrointestinalen Barriere und spielen aufgrund verschiedener Mechanismen eine entscheidende Rolle für die Protektion des Darms<sup>13</sup>. Die Besiedlung der GI-Nischen durch ein gesundes und eubiotisches Mikrobiom verhindert die Besiedlung und das Wachstum von Krankheitserregern nicht nur durch die direkte Konkurrenz um gemeinsam genutzte, begrenzte Ressourcen (wie Nährstoffe), sondern auch durch die Produktion von Bakteriozinen, die durch eine antimikrobielle Wirkung das Wachstum der Mitglieder der gleichen oder einer ähnlichen Bakterienart hemmen<sup>29, 30</sup>.

Wirt-Mikrobiota-Interaktionen spielen auch eine zentrale Rolle bei der funktionellen und strukturellen Reifung des GI-Trakts, indem sie die Mikroangiogenese fördern und die Entwicklung des enterischen Nervensystems beeinflussen, welches für die Darmperistaltik verantwortlich ist<sup>23</sup>. Auch die Aufrechterhaltung der Epithelintegrität und die Förderung der Epithelreparatur nach Verletzungen werden weitgehend durch das Mikrobiom beeinflusst. Es wurde berichtet, dass verschiedene Mikroorganismen dazu beitragen, die epitheliale Homöostase durch Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren (TLRs) aufrechtzuerhalten und die epitheliale Integrität durch Erhaltung der *tight junctions* zu unterstützen<sup>31, 32</sup>.

Das Mikrobiom ist für die normale Reifung und Funktionalität des mukosalen und des systemischen Immunsystems erforderlich. Von den ersten Lebenstagen an entwickelt sich das darmassoziierte Lymphgewebe (*gut-associated lymphoid tissue*, GALT) des Säuglings rasch parallel zur Etablierung der mikrobiellen Gemeinschaften im GI-Trakt<sup>33</sup>. Während dieses Prozesses erreicht das Immunsystem des Wirts eine Homöostase, bei der eine Vielzahl von Kommensalbakterien toleriert werden und gleichzeitig die Überwucherung der Bakterien, die Translokation in andere Systeme und die Besiedlung durch andere pathogene Erreger verhindert werden. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der Wirt-Mikroorganismen-Interaktionen sind komplex und weitgehend unbekannt. Es gibt jedoch genug Daten die zeigen, dass das Mikrobiom die Entwicklung von lymphoiden Strukturen induziert, die Aktivierung und Differenzierung verschiedener Lymphozytenpopulationen durch Expression mehrerer Zytokine und Chemokine moduliert, die Produktion anderer löslicher Immunmediatoren wie Immunglobulin A und antimikrobieller Peptide reguliert, und die Aktivität von Becherzellen, die eine wesentliche Rolle für die Struktur des Schleims spielen, beeinflussen kann<sup>33</sup>.

## **1.2 Eigenschaften des gastrointestinalen Mikrobioms bei gesunden Menschen**

Nach der Etablierung und Verbreitung von Hochdurchsatz-Sequenzierungsmethoden haben sich verschiedene groß angelegte Studien mit der Charakterisierung des Mikrobioms des menschlichen Darmtrakts befasst, und es wurden mehr als 1000 Bakterienarten identifiziert, die der Darm beherbergt. Die Hauptphyla, zu denen diese Bakterien gehören, sind Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria und in geringerem Maße Verrucomicrobia<sup>6,34</sup>.

Es ist bekannt, dass das Mikrobiom erhebliche interindividuelle Unterschiede aufweist, vor allem auf niedrigerer taxonomischer Ebene, wie beispielsweise Spezies und Subspezies, und dass jeder Mensch eine einzigartige Mikrobiomstruktur aufweist, die sich von jener anderer Menschen - ähnlich wie bei einem Fingerabdruck - deutlich unterscheidet<sup>35</sup>.

Um dieser extremen biologischen Variabilität zu begegnen und die Schichtung von mikrobiellen Gemeinschaften zu erleichtern, haben sich Wissenschaftler auf die Identifizierung von Bakterienarten konzentriert, die verschiedenen Individuen gemein sind und eine „gesunde“ Mikrobiota bilden. Es wurde die Existenz eines "Kern"-Mikrobioms postuliert, das aus einer begrenzten Anzahl von Bakterien (100-150 Taxa) besteht, die bei



allen gesunden Menschen gleich sind<sup>36</sup>. Allerdings ist die Identifizierung einer bestimmten Reihe von geteilten Bakterien bisher nicht gelungen<sup>37</sup>. Relevanter als die Identifizierung einzelner gemeinsamer Bakterienspezies scheint heutzutage die Analyse des „funktionellen Kerns“ zu sein<sup>38</sup>. Der Komplex von metabolischen und molekularen Funktionen, die vom Mikrobiom in einem bestimmten Lebensraum ausgeführt werden, scheint trotz der erheblichen interindividuellen taxonomischen Unterschiede konserviert zu sein. Dieselben geteilten essentiellen Funktionen können daher, infolge einer gewissen Redundanz, von unterschiedlichen Bakterien gewährleistet werden und nicht unbedingt von derselben Art von Organismen<sup>39</sup>.

Im Rahmen des kürzlich durchgeführten europäischen MetaHIT Projektes konnten einige klar differenzierbare Mikrobiomstrukturen, sogenannte „*enterotypes*“, identifiziert werden<sup>40</sup>. In dieser Studie analysierten die Autoren metagenomische Daten von 39 Stuhlproben von Probanden aus sechs Nationen. Die bioinformatische Auswertung zeigte sowohl auf phylogenetischer Ebene als auch auf funktioneller Ebene, dass die bakteriellen Gemeinschaften des GI-Trakts in drei Hauptcluster mit jeweils typischen Merkmalen eingeteilt werden können: Enterotyp 1, charakterisiert durch höhere Abundanz von *Bacteroides*, Enterotyp 2, dominiert von Bakterien der Gattung *Prevotella*, und Enterotyp 3, der am häufigsten zu finden ist und einen höheren Anteil an Bakterien der Gattung *Ruminococcus* aufweist. Die vorgeschlagene Stratifizierung war unabhängig von Wirtseigenschaften wie Nationalität, Geschlecht, Alter oder Body Mass Index (BMI) und konnte auch in der Analyse von 16S rRNA Datensätzen aus zwei weiteren größeren Kohorten von 154 amerikanischen und 85 dänischen Probanden validiert werden. Auch wenn nachfolgende Studien teilweise nicht die gleiche Schichtung der mikrobiellen Gemeinschaften wiederherstellen konnten, wurde bestätigt, dass einige spezifische Taxa wie *Prevotella*, *Bacteroides* und *Bifidobacteria* eine wichtige Rolle bei der Strukturierung eines stabilen Mikrobioms spielen<sup>6, 13, 41</sup>.

Neben der taxonomischen Variabilität und der funktionellen Redundanz sind die langfristige Stabilität der Mikrobiomstruktur über die Zeit, der Widerstand gegen Störungen und die Fähigkeit, nach einer Störung in einen gesunden Zustand zurückzukehren (Resilienz), weitere Merkmale der Mikrobiota<sup>13</sup>. Alle diese Eigenschaften sind essenziell für die Aufrechterhaltung eines gesunden Gleichgewichtszustands des mikrobiellen Ökosystems.

### 1.3 Faktoren, die die Zusammensetzung des Mikrobioms beeinflussen

Das Mikrobiom ist ein dynamisches System, das in Abhängigkeit von mehreren Faktoren geformt und verändert wird. Mehrere Beobachtungsstudien konnten zeigen, dass die wichtigsten Veränderungen nach der Geburt und im frühen Leben auftreten (siehe Kapitel 1.1.1). Es gibt Evidenz, dass die Bakteriengemeinschaften zum Teil durch die genetische Ausstattung des Wirts beeinflusst werden. Es wurde zum Beispiel festgestellt, dass Familienmitglieder ähnlichere Mikrobiota-Gemeinschaften aufweisen als nicht verwandte Personen, und dass das gastrointestinale Mikrobiom bei monozygoten Zwillingen ähnlicher als bei dizygoten Zwillingen ist<sup>42</sup>. Des Weiteren wurden einige Assoziationen zwischen Genvarianten des Wirts und mikrobiellen Taxa in genomweiten Studien beschrieben<sup>43, 44</sup>. Die Analyse der genetischen Einflüsse auf die Zusammensetzung der Mikrobiota ist jedoch aufgrund multipler Störfaktoren schwierig, da die mikrobiellen Gemeinschaften neben der Genetik stark von Umweltfaktoren wie Diät, Lebensgewohnheiten, allgemeinem Gesundheitszustand und Medikamenteneinnahme beeinflusst werden<sup>45, 46</sup>. Die Umwelt spielt eine entscheidende Rolle bei der Zusammensetzung des menschlichen Mikrobioms und scheint eher ursächlich für die interpersonelle Variabilität zu sein als die genetische Faktoren<sup>47</sup>. Umweltfaktoren formen und verändern das Mikrobiom von den ersten Momenten des postnatalen Lebens an und auch danach während der gesamten Lebensdauer. Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen den Ernährungsgewohnheiten und Bakteriengemeinschaften im GI-Trakt. Personen, die einer typischen westlichen Diät folgen, welche durch einen hohen Fett- und Kohlenhydratgehalt gekennzeichnet ist, weisen niedrigere mikrobielle Diversität und Reichtum auf und beherbergen eine Mikrobiota mit einer erhöhten Anzahl von Bacteroides und Anaerobiern<sup>48</sup>. Andererseits zeigen Menschen, die eine mediterrane Ernährung bevorzugen, einen erhöhten Gehalt an kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) und erhöhte Abundanz von *Prevotella* und bestimmten Firmicutes<sup>49</sup>. Es wurde auch gezeigt, dass die relativen Konzentrationen spezifischer Komponenten wie Kohlenhydraten, Proteinen, Fetten, Ballaststoffen und Vitaminen Auswirkungen auf die Zusammensetzung des Mikrobioms haben<sup>50-53</sup>. Einer der wichtigsten Faktoren, der die Mikrobiomzusammensetzung beeinflusst, ist der Einsatz von Arzneimitteln. Antibiotika sind die bekannteste Klasse von Medikamenten, die zu Verschiebungen des Mikrobioms führen können, und obwohl die mikrobiellen Gemeinschaften größtenteils in ihren prätherapeutischen Zustand zurückkehren, zeigen vorherige Studien, dass gelegentlich eine

postantibiotische Exposition zu einem neuen „*steady-state*“ führen kann<sup>54</sup>, und dass die Veränderungen bis zu mehreren Jahren nach der Exposition andauern können<sup>55</sup>. Wiederholte antibiotische Therapien können einen gewissen selektiven Druck für die Darmflora darstellen und können zur Veränderung der Mikrobiomstruktur führen, indem gewisse antibiotikaresistente Stämme oder Pathobionten sich ausbreiten. Das beste Beispiel für dieses Szenario ist die Infektion mit *Clostridium difficile*, die sich normalerweise nach Exposition gegenüber Antibiotika entwickelt, welche Veränderungen in der Mikroumgebung hervorruft und die Keimung und Besiedlung von *C. difficile* begünstigt<sup>56</sup>. Bei rezidivierenden *C. difficile*-Infektionen (nach Standardtherapien mit Metronidazol, Vancomycin und/oder Fidaxomycin) hat sich die Fäkale Mikrobiota Transplantation (FMT) als hochwirksame Behandlung erwiesen und wird heutzutage zunehmend in der klinischen Praxis eingesetzt, um das Gleichgewicht der gesunden Darmflora wiederherzustellen<sup>57</sup>. Zunehmende Evidenz deutet darauf hin, dass nicht nur Antibiotika, sondern auch andere Klassen von häufig verwendeten Medikamenten mit Veränderungen des menschlichen Mikrobioms assoziiert sind. Es wurde zum Beispiel gezeigt, dass Protonenpumpeninhibitoren (PPI) durch eine verringerte Säureproduktion und den damit einhergehenden erhöhten luminalen pH-Wert das Mikrobiom beeinflussen<sup>58, 59</sup>. Auch Antidiabetika haben einen relevanten Einfluss auf die gastrointestinale Mikrobiota gezeigt. In einer randomisierten Doppelblindstudie von Wu *et al.* wurden Patienten mit therapienaivem Typ-2 Diabetes eingeschlossen und erhielten entweder Metformin für 4 Monate oder Placebo. Die Studie zeigte, dass Metformin starke Auswirkungen auf das Darmmikrobiom hatte<sup>60</sup>. Zudem zeigte die Übertragung von Stuhlproben von Patienten der Metformin-Gruppe auf keimfreie Mäuse eine verbesserte Glukosetoleranz im Vergleich zu Mäusen die einen Stuhltransfer von Patienten der Placebo-Gruppe erhielten. Dies deutet darauf hin, dass das veränderte Mikrobiom einige der antidiabetischen Wirkungen von Metformin vermitteln könnte

## 1.4 Zusammensetzung der Mikrobiota entlang des gastrointestinalen Traktes

Der menschliche GI-Trakt kann in anatomische Regionen unterteilt werden, die jeweils durch unterschiedliche physikochemische Bedingungen charakterisiert sind und einzigartige Lebensräume für das mikrobielle Wachstum darstellen. Die Zusammensetzung der Mikrobiota variiert dementsprechend entlang des GI-Trakts und wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Zu den wichtigsten Faktoren, die die mikrobiellen Gemeinschaften beeinflussen, gehören der pH-Wert, der Sauerstoffgradient, der Nährstoffgehalt, die Beweglichkeit des Darmes und das Vorhandensein von Wirtssekretionen und antimikrobiellen Substanzen wie Verdauungsenzyme, Galle und Schleim<sup>61</sup>. Unterschiedliche Bedingungen finden sich auch zwischen Schleimhautebene und Lumen einer bestimmten anatomischen Region, sodass eine relevante Differenzierung zwischen mukosaanhaftenden Gemeinschaften und luminalen Gemeinschaften besteht. Die mikrobielle Dichte nimmt entlang des GI-Trakts zu. Pro Gramm Darminhalt steigt die Keimdichte von  $10^1$ – $10^4$  Keimzellen im Magen und Duodenum,  $10^4$ – $10^8$  Zellen im Jejunum und Ileum auf  $10^{10}$ – $10^{12}$  Zellen im Kolon und im Stuhl<sup>62</sup>.

### 1.4.1 Die Mundhöhle

Das orale Mikrobiom ist eines der vielfältigsten und dynamischsten Ökosysteme des menschlichen Körpers und umfasst mehr als 1000 verschiedene Arten der Phyla Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, Spirochaetes, Synergistetes und Tenericutes sowie der nicht kultivierten Divisionen GN02, SR1 und TM7<sup>63</sup>. Die am häufigsten vorkommenden Gattungen sind *Streptococcus*, *Veillonella*, *Rothia*, *Actinomyces*, *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Granulicatella*, *Haemophilus*, *Porphyromonas*, *Neisseria* und *Selenomonas*<sup>64</sup>. Darüber hinaus können Viren, Protozoen, Pilze und eine geringe Anzahl von methanogenen Archaeen nachgewiesen werden. In der Mundhöhle kolonisieren die meisten Mikroben die Schleimhautoberflächen der Wangen und der Zunge sowie die harten Oberflächen von Zähnen. Da hier die Durchgangszeit von Speichel und Speisen sehr kurz ist, fehlt ein residentes luminales Mikrobiom.

### 1.4.2 Der Ösophagus

Bisher haben sich wenige Studien mit der Zusammensetzung des Mikrobioms im Ösophagus befasst. Ähnlich wie in der Mundhöhle bleibt die Nahrung nicht lange genug in der Speiseröhre und viele Mikroben an diesem Ort gehören zur transienten Flora.

Dementsprechend zeigen die vorliegenden Daten, dass die mikrobiellen Gemeinschaften des Ösophagus ähnlich wie die in der Mundhöhle sind und dass die Mehrheit der Bakterien dieser Nische zu den Phyla Firmicutes, Bacteroides, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria und TM7 gehört. *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Prevotella* und *Veillonella* sind die am häufigsten identifizierten Gattungen<sup>65</sup>. Ein wichtiger Einflussfaktor ist hier das Vorhandensein eines gastroösophagealen Reflux. Es wurde nämlich gezeigt, dass Schleimhautproben von Patienten mit Refluxösophagitis eine Verschiebung der Mikrobiota aufweisen, die mit gramnegativen Taxa angereichert ist (z. B. *Veillonella*, *Prevotella*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Campylobacter* und *Fusobacterium*), während das gesunde ösophageale Mikrobiom von grampositiven Taxa, wie beispielsweise *Streptococcus*, dominiert wird<sup>66</sup>.

### 1.4.3 Der Magen

Das dogmatische Konzept, dass der Magen aufgrund der ungünstigen Bedingungen wie zum Beispiel dem sauren pH-Wert oder der energischen Peristaltik für die Besiedlung von Bakterien nicht geeignet und dementsprechend ein steriles Organ sei, wurde in den 1980er Jahren mit der Entdeckung von *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) durch Marshall und Warren verworfen<sup>67</sup>. Bereits in den darauffolgenden Jahren konnten verschiedene säureresistente Bakterienstämme, darunter *Streptococcus*, *Neisseria* und *Lactobacillus*, durch konventionelle kulturbasierte Methoden identifiziert werden, die Teil der einheimischen Flora des Magens sind<sup>68</sup>. Mehrere Bakterien, die den Magen besiedeln, wurden auch in der Mundhöhle und den Atemwegen identifiziert, was darauf hinweist, dass ein Teil der Mikrobiota in dieser Nische vorübergehend ist und aus den kontinuierlich verschluckten Mundflüssigkeiten stammt<sup>69</sup>. Dank der jüngsten sequenzierungs-basierten Analysen des Mikrobioms im Magen konnten die indigenen Bakteriengemeinschaften charakterisiert werden und eine erhebliche mikrobielle Diversität mit höher interindividueller Variabilität nachgewiesen werden. Mehr als 100 unterschiedliche - zuvor nicht bekannte- Taxa wurden identifiziert, wobei die Hauptgenera von *Streptococcus*, *Prevotella*, *Rothia*, *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Neisseria*, *Haemophilus* und *Porphyromonas* repräsentiert werden<sup>70,71</sup>. Die am häufigsten detektierten Phyla im Magen sind Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria und Fusobacteria. Zusätzlich zu anderen üblichen Umweltfaktoren haben PPI und die Infektion mit *H. pylori* einen extrem relevanten Einfluss auf die Zusammensetzung des Mikrobioms im Magen. Verschiedene Studien zeigten, dass die Einnahme von PPI zu signifikanten Veränderungen der Darmmikrobiota führt, die sich

nicht nur in Magenbiopsien<sup>72</sup>, sondern auch in Stuhlproben<sup>59, 73</sup> nachweisen lassen. In Patienten unter PPI-Therapie wurden signifikante Veränderungen in der Abundanz von bestimmten Taxa festgestellt, wie beispielsweise ein erhöhtes Vorkommen von Streptococcaceae, sowie eine reduzierte Gesamtdiversität der mikrobiellen Gemeinschaften<sup>58</sup>.

*H. pylori* besiedelt den Magen von mehr als 50% der Weltbevölkerung und verursacht eine chronische aktive Gastritis, die bei einer Minderheit infizierter Individuen zu verschiedenen gastrointestinalen Pathologien wie Ulkuskrankheit, chronische Gastritis, MALT-Lymphom und Magenkrebs führen kann<sup>74</sup>. Bei *H. pylori*-infizierten Menschen wird das Magenmikrobiom von *H. pylori* dominiert und weist einen signifikant höheren Anteil des Phylum Proteobacteria auf (zu dem auch *H. pylori* gehört) sowie eine geringere Biodiversität<sup>70, 75</sup>. Eine höhere Diversität wurde im Gegenteil in Magenflüssigkeiten bei *H. pylori*-positiven Personen festgestellt, wahrscheinlich als Folge des erhöhten pH-Werts in *H. pylori*-infizierten Magen<sup>76</sup>.

#### 1.4.4 Das Duodenum und der Dünndarm

Der Dünndarm hat im Durchschnitt eine Länge von ca. 5 Metern und wird durch eine graduelle Variation verschiedener Faktoren charakterisiert, die unterschiedliche Lebensräume für die mikrobiellen Gemeinschaften bilden. Im Duodenum und Jejunum befinden sich einzigartigen Bedingungen (niedriger pH-Wert, hoher Sauerstoffgehalt, schnelle Transitzeit, Vorhandensein von antimikrobiellen Gallensäuren und Verdauungsenzymen), die sich ungünstig auf das mikrobielle Wachstum auswirken. Das Mikrobiom wird hier von schnell wachsenden fakultativen Anaerobiern wie zum Beispiel Lactobacillaceae und Enterobacteriaceae dominiert<sup>61</sup>. Nur wenige Studien haben bisher die mikrobielle Zusammensetzung des mukosalen Mikrobioms im Dünndarm untersucht. Die am häufigsten nachgewiesenen Phyla sind Firmicutes, Bacteroides, Proteobacteria, und die am häufigsten detektierten Gattungen sind *Streptococcus*, *Prevotella*, *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Gemella* und *Fusobacterium*<sup>77, 78</sup>. Informationen über die mikrobielle Zusammensetzung im mittleren und distalen Ileum sind ebenfalls sehr begrenzt, da es schwierig ist, diese Nische zu erreichen, um Proben zu sammeln. Die Mikrobiomanalyse von Proben aus Patienten mit Ileostoma zeigen, dass Bacilli, Clostridium cluster IV, IX und XIVa, Gammaproteobacteria die häufigsten Taxa dieser Nische sind<sup>79</sup>. Im terminalen Ileum

steigt die Bakterienanzahl auf bis zu  $10^8$ – $10^9$  Zellen pro Milliliter ilealen Inhalt und die Zusammensetzung ähnelt hier immer mehr der des Dickdarms<sup>80, 81</sup>.

#### 1.4.5 Das Kolon

Der Dickdarm beherbergt die dichtesten und vielfältigsten Gemeinschaften des menschlichen Mikrobioms. In dieser Nische bestehen geringe Konzentrationen an Sauerstoff und an antimikrobiellen Substanzen und eine langsamere Transitzeit. Außerdem fehlen verfügbare einfache Kohlenstoffquellen, sodass das Wachstum von anaeroben Mikroorganismen, die für die Fermentation von noch unverdauten Polysacchariden verantwortlich sind, favorisiert wird<sup>61</sup>. Die häufigsten im Kolon gefundenen Mikroorganismen sind Mitglieder der Phyla Firmicutes, hauptsächlich Mitglieder der verschiedenen Clostridiumklassen (Lachnospiraceae, Ruminococcaceae), Bacteroidetes und in geringerer Abundanz Actinobacteria (*Bifidobacterium*), Verrucobacteria (*Akkermansia muciniphila*), Fusobacteria und Proteobacteria (Enterobacteriaceae)<sup>82</sup>.

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Obwohl die Charakterisierung der Zusammensetzung der gastrointestinalen Mikrobiota bereits in verschiedenen Studien untersucht wurde, basiert unser derzeitiges Wissen über das Mikrobiom hauptsächlich auf der Analyse leicht zugänglicher und sammelbarer Proben wie Speichel und Faeces, die durch nicht-invasive Verfahren gewonnen wurden<sup>6, 40</sup>. Unterschiede in den Bakteriengemeinschaften zwischen Schleimhautproben aus bestimmten gastrointestinalen Nischen und entsprechenden Biofluiden, die an derselben Stelle entnommen wurden, konnten beobachtet werden<sup>71, 78, 83</sup>. Nur eine begrenzte Anzahl von Studien analysierte gezielt die ortsspezifische Struktur der mikrobiellen Gemeinschaften in der Mundhöhle<sup>64</sup>, in der Speiseröhre<sup>84</sup>, des Magens<sup>70</sup>, des Duodenums<sup>77</sup> und im Kolon<sup>82</sup>. Untersuchungen, die sich auf die intra- und interindividuellen Veränderungen der mikrobiellen Zusammensetzung konzentrieren und sich über den gesamten GI-Trakt erstrecken, wurden bisher noch nicht durchgeführt.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren dementsprechend:

- die systematische Charakterisierung der metabolisch-aktiven bakteriellen Gemeinschaften von 8 verschiedenen Stellen des GI-Trakts (Speichel aus der Mundhöhle, Corpus und Antrum aus Magen, Duodenum, terminalem Ileum, Colon ascendens, Colon descendens und Faeces) von gesunden Probanden;
- die Analyse sowohl der interindividuellen als auch der intraindividuellen Variabilität des gastrointestinalen Mikrobioms in gesunden Probanden;
- die Darstellung der Entwicklung von Diversitätsmessungen in verschiedenen Regionen entlang des GI-Trakts;
- die Untersuchung des Einflusses einer *H. pylori*-Infektion auf die mikrobielle Zusammensetzung in verschiedenen Regionen des GI-Trakts.



## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Studienkohorte und Einordnung in der EMGASTA

#### Studie

Speichel, Schleimhautgewebe und Stuhlproben wurden von gesunden erwachsenen Probanden entnommen, die zwischen Dezember 2015 und September 2016 an der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg eine Endoskopie des oberen und unteren GI-Trakts erhielten. Die Kohorte bestand aus 21 gesunden Probanden (männlich: 10, weiblich: 11, Durchschnittsalter  $59,0 \pm$  SD 12,3 Jahre); 8 Probanden erhielten die endoskopischen Untersuchungen als Freiwillige und 13 Probanden im Rahmen des Screeningprogramms. Eine Übersicht über die klinischen und demographischen Eigenschaften der in diese Studie einbezogenen Probanden ist in Tabelle 1 gegeben (im Anhang).

Die Probanden wurden im Rahmen des EMGASTA-Projekts („Bedeutung der Ernährung, des gastrointestinalen Mikrobioms und eines gesunden Gastrointestinaltrakts für die Autonomie des alternden Menschen“; DRKS-ID: DRKS00009737) rekrutiert. Dieses Projekt wurde in der Forschungsgruppe „Autonomie im Alter“ in Sachsen-Anhalt durchgeführt und von der Europäischen Kommission durch den „Europäischen Fond für regionale Entwicklung“ (EFRE) sowie vom Regionalministerium für Wirtschaft, Wissenschaft und Digitalisierung unterstützt. Diese Studie wurde auch in Kollaboration mit dem Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig durchgeführt und durch die Projekte der Helmholtz-Gemeinschaft iMed (Helmholtz Initiative on Personalized Medicine) und AMPro (Altern und metabolische Programmierung) unterstützt. EMGASTA ist eine große monozentrische prospektive nicht-interventionelle Studie, die sich auf die Erforschung von Darmmikrobiota-Profilen bei gesunden alten Menschen und Patienten mit funktioneller gastrointestinaler Erkrankung, Magenkarzinom, Pankreaskarzinom, kolorektalem Karzinom oder neurodegenerativer Erkrankung fokussiert. Primärer Endpunkt dieses Projekts ist es zu untersuchen, wie sich das gastrointestinale Mikrobiom im Hinblick auf dominante Genera zwischen gesunden alten Menschen und Patienten der oben genannten Gruppen unterscheidet. Weitere sekundäre Endpunkte fokussieren sich auf den Einfluss von verschiedenen Faktoren (zum Beispiel Alter, Wohnsituation, Ernährungsgewohnheiten, systemische Entzündung) auf die Zusammensetzung des gastrointestinalen Mikrobioms und sollen zur Identifizierung von krankheitsassoziierten

Dysbiosen führen, die eine Grundlage für die künftige Entwicklung therapeutischer Maßnahmen zur Korrektur der Dysbiose darstellen. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg genehmigt (siehe Anlage A im Anhang) und wurde gemäß den aktuellen GCP-Leitlinien und der Deklaration von Helsinki durchgeführt<sup>85</sup>. Eine schriftliche Einwilligungserklärung wurde von jedem Teilnehmer erhoben (siehe Anlage B im Anhang). Das Mindestalter für die gesunden Probanden war 40 Jahre. Die Probanden galten als gesund, wenn sie keine gastrointestinale Erkrankung, Tumorerkrankung in den letzten 5 Jahren, schwerwiegende therapiepflichtige Stoffwechsel- oder kardiovaskuläre Erkrankung oder neurodegenerative Erkrankungen hatten. Ausschlusskriterien waren die Einnahme von Antibiotika innerhalb der letzten 8 Wochen oder eine regelmäßige Therapie mit PPI.

Drei Probanden berichteten über eine gelegentliche PPI-Einnahme aufgrund episodischen Sodbrennens, allerdings wurde kein PPI innerhalb des Monats vor Studieneinschluss eingenommen. Bei allen Studienteilnehmern lag der pH-Wert im Magen bei 1 oder 2. Informationen über ethnische Herkunft, Lebensstilfaktoren wie Raucherstatus und Alkoholkonsum wurden zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie erfasst (siehe Tabelle 1 im Anhang). Die Ernährungsgewohnheiten der Probanden wurden mithilfe von einem standardisierten, selbst-ausgefüllten, semi-quantitativen Fragebogen erhoben, der zuvor für den deutschen Teil der EPIC-Studie validiert wurde<sup>86-88</sup>. Eine deskriptive Analyse der täglichen Aufnahme von ausgewählten Lebensmitteln ist in Tabelle 2 (im Anhang) aufgezeigt. Keiner der eingeschlossenen Probanden hatte sich mit einer besonderen Diät ernährt (zum Beispiel vegetarische oder vegane Diät), alle hatten eine ausgewogene und typisch westliche Diät befolgt. Ein detailliertes geriatrisches Assessment anhand des zuvor validierten Multidimensional Prognostic Index (MPI) wurde durchgeführt, um die Gebrechlichkeit von eingeschlossenen älteren Probanden auszuschließen<sup>89</sup>. Daten bezüglich der klinischen Fitness, wie aus jedem Fragebogen-Teil des MPI-Scores dokumentiert, sind in Tabelle 3 (im Anhang) dargestellt. Keine der eingeschlossenen Probanden wurde anhand des MPI-Frailty-Index als gebrechlich eingestuft.

Um Mikrobiom-Profile an verschiedenen Stellen des GI-Trakts zu analysieren, wurden von jedem Probanden Speichelproben, Biopsien aus Magen (Antrum und Corpus), Duodenum, terminalem Ileum, Colon ascendens und Colon descendens sowie Stuhlproben gewonnen. Weitere Biopsien wurden von jeder untersuchten Region des GI-Trakts zur histologischen Charakterisierung und zur Durchführung von invasiven *H. pylori*-Tests entnommen.

Darüber hinaus wurden vor der Endoskopie Blutproben zur Bestimmung von Antikörpern gegen *H. pylori* im Serum entnommen.

## 2.2 Probensammlung

Speichelproben wurden aus der Mundhöhle vor der Durchführung der Ösophagogastroduodenoskopie (ÖGD) mit einer sterilen 5 ml-Spritze (BD Discardit™ II, Heidelberg, Deutschland) entnommen. Sie wurden für mindestens 4 Stunden (maximal 8 Stunden) bei Raumtemperatur in einem mit 1 ml RNAlater (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gefüllten RNase-freien Röhrchen (Cryovial T311-2, Symport, Beloeil, Kanada) aufbewahrt und anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Endoskopie von oberen und unteren GI-Trakten wurden mit Standard-Video-Gastroskopen (GIF H180J, GIF Q180, GIF Q160, Olympus Medical, Hamburg, Deutschland; EG-760Z, EG-760CT, Fujifilm Europe, Düsseldorf, Deutschland) und Koloskopen (CF-HQ190I, CF-Q165I, Olympus Medical; EC-760R-V/I Fujifilm Europa) durchgeführt. Bei Beginn der ÖGD wurde das Magenaspirat mit einem 0,035"-Katheter für endoskopische retrograde Cholangiopankreatographie (MTW® Endoscopy Manufacturer, Wesel, Deutschland) oder durch den Arbeitskanal vom Endoskop mit einer 20 ml-Spritze (BD Discardit™ II) entnommen und der pH-Wert im Magen mit einem pH-Indikatorpapier (Macherey-Nagel™ Tritest™, Düren, Deutschland) gemessen. Schleimhautproben vom Magen (Antrum und Korpus), vom Duodenum (Pars descendens duodeni), vom terminalen Ileum, vom C. ascendens und C. descendens wurden mit einer sterilen ovalen Standardzange mit Nadel (Olympus SwingJaw 2.8 mm FB-240 K, Olympus Medical) entnommen. Um die Schleimhautproben aus der Biopsiezange in die Röhrchen zu verlegen, wurden separate sterile Pinzetten (Peha®-Instrument, Hartmann, Heidenheim, Deutschland) und sterile Nadeln verwendet. Um Kontamination möglichst zu vermeiden, wurde im distalsten Teil mit der Entnahme von Biopsien begonnen, das Duodenum bei der ÖGD und das terminale Ileum bei der Ileo-Koloskopie. Die Biopsieentnahme wurde dann systematisch rückwärts während der Endoskopie durchgeführt, in aboraler Richtung bei der ÖGD und in aboraler Richtung bei der Ileo-Koloskopie. Zwischen den Biopsien wurde der Endoskopiekanal mit Wasser gespült und die Biopsiezange durch wiederholtes Eintauchen in Wasser gereinigt. Schleimhautproben für die Mikrobiomanalyse wurden in RNase-freien Röhrchen (Cryovial T311-2) gesammelt, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren molekularen Analyse bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Weitere Biopsien wurden aus Magenantrum und

-korpus, Duodenum, terminalem Ileum, C. ascendens und C. descendens für die histopathologische Auswertung und die *H. pylori* Diagnostik entnommen.

Vor Beginn der Koloskopievorbereitung wurden Blutproben und Stuhlproben von den Probanden gesammelt. Das Zeitintervall zwischen Stuhlentnahme und Endoskopie war maximal 14 Tage. Die Stuhlproben wurden nur zu einem Zeitpunkt gesammelt: vor der Darmspülung und den endoskopischen Untersuchungen. Die Vorbereitung für die Koloskopie wurde mit Verwendung von hyperosmotischen Abführmitteln durchgeführt. Stuhlproben zur RNA-Extraktion und Mikrobiomanalyse wurden in speziellen sterilen Stuhlröhrchen mit Löffel (PT26.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), die mit RNAlater (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gefüllt waren, gesammelt. Sie wurden innerhalb von 4 Stunden (maximal 8 Stunden) ins Labor transportiert, und nach einer Aufbewahrung bei Raumtemperatur (mindestens 4 Stunden bis maximal 8 Stunden) bis zur weiteren Analyse bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zusätzliche Proben zur Bestimmung von *H. pylori* Antigen im Stuhl wurden gesammelt und nach Aliquotierung im Labor im Tiefkühlschrank bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur Durchführung des Tests gelagert.

### **2.3 Histologische Analyse und Bestimmung vom *H. pylori*-Status**

Biopsien, die jeder untersuchten Region des GI-Trakts entnommen wurden, wurden histologisch von trainierten gastrointestinalen Pathologen am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Magdeburg charakterisiert. Histologische Schnitte wurden aus in Paraffin eingebetteten Biopsien nach Standardverfahren vorbereitet und nach Hämatoxylin und Eosin oder modifiziertem Giemsa (zur Identifizierung von *H. pylori*) Färbemethoden angefertigt. Die Auswertung von Magenschnitten erfolgte gemäß der updated Sydney Klassifikation<sup>90</sup> und den OLGA/OLGIM (*operative link for gastritis/gastric intestinal metaplasia assessment*) Klassifikationen<sup>91,92</sup>.

Die Infektion mit *H. pylori* wurde durch folgende Diagnosetechniken nachgewiesen: Histologie, Rapid Urease Test (RUT), Kultivierung und Stuhlantigentest (SAT). Die RUT wurde während der ÖGD mit Verwendung von zwei Biopsien aus Antrum und Korpus gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt (HUT, Astra Zeneca, Wedel, Deutschland). Zur Kultivierung von *H. pylori* wurden Magenbiopsien aus Antrum und Korpus sofort in 1,5 ml NaCl 0,9% enthaltende sterile Röhrchen überführt und anschließend

auf Columbia-Agar-basiertem Medium nach Standardverfahren am Institut für Mikrobiologie der Universität Magdeburg wie zuvor beschrieben kultiviert<sup>93</sup>. Die Platten wurden für maximal 10 Tage unter mikroaerophilen Bedingungen bei 37 ° C inkubiert. Das Bakterienwachstum wurde alle 2–3 Tage bewertet. *H. pylori* wurde durch typische Morphologie bei gramnegativer Färbung und positivem Urease-, Oxidase- und Katalase-Test identifiziert. Der serologische *H. pylori*-Antikörpernachweis erfolgte durch das anti-*H. pylori*-Immunglobulin (Ig) G-Enzymimmunosorbent-Assay (ELISA) (*Helicobacter pylori* IgG kit; Biohit, Helsinki, Finnland) gemäß dem Protokoll des Herstellers. Die qualitative Bestimmung von *H. pylori*-Antigenen in Stuhlproben wurde mit Verwendung eines Enzymimmunoassays (Ridascreen FemtoLab, R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland) nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Konkordante negative Ergebnisse in allen Tests mit Ausnahme der *H. pylori*-Serologie waren erforderlich, um die *H. pylori*-Infektion bei gesunden Patienten definitiv auszuschließen. Der *H. pylori*-Status der eingeschlossenen Probanden wird in Tabelle 4 (im Anhang) dargestellt.

## 2.4 RNA-Extraktion, cDNA-Synthese und Bibliotheksvorbereitung

Bakterielle Gemeinschaften wurden mittels Verwendung von Hochdurchsatz-Sequenzierung basierend auf 16S-rRNA-Profilen analysiert, um selektiv die transkriptionell aktiven Bakterien zu identifizieren. Alle Experimente und Analysen wurden nach bereits gut etablierten Methoden wie zuvor veröffentlicht durchgeführt<sup>78</sup>. Die Extraktion von RNA aus Schleimhautbiopsien, Speichel- und Stuhlproben erfolgte mittels RNeasy-Kits (Qiagen) gemäß den Anweisungen des Herstellers, wobei ein initialer mechanischer Lyse-Schritt hinzugefügt wurde. Nach dem DNA-Verdau wurde die Erststrang-cDNA unter Verwendung des Superscript IV-Erststrangsynthese-Systems (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) und random Primers gemäß den Anweisungen des Herstellers synthetisiert. Amplicon-Bibliotheken wurden wie zuvor beschrieben generiert<sup>94</sup>. Die V1-V2-Region der 16S-rRNA wurde nach 20 PCR-Zyklen unter Verwendung der 27F- und 338R-Primer amplifiziert und anschließend auf einem MiSeq-System (2 × 250 bp, Illumina, Hayward, California, USA) sequenziert.

## 2.5 Bioinformatische und statistische Analysen

Raw Reads wurden mit dem Ribosomal Database Project (RDP) Assembler<sup>95</sup> zu Sequenzen vereint. Insgesamt wurden 5 878 499 Paired-End-Reads mit einem Mittelwert von 36 064 Reads pro Probe erhalten. Proben mit weniger als 10.000 Reads wurden aus den Rohdaten verworfen (12 von 168 Proben).

Das Sequenzalignment erfolgte mittels MOTHUR (Gotoh-Algorithmus unter Verwendung der SILVA-Referenzdatenbank) und beim anschließenden Preclustering wurden Sequenzen, welche sich durch 2 oder weniger Nukleotiden unterscheiden zusammengeführt. Die dadurch erhaltenen „Phylotypen“ wurden vor der Analyse auf eine durchschnittliche Abundanz von  $\geq 0,001\%$  und eine Sequenzlänge von  $\geq 250$  bp gefiltert. Allen Proben wurden mit dem phyloseq package auf die kleinste Anzahl einer Probe, nämlich 10 435 Sequenzen, rarefied<sup>96</sup>, wobei 4 045 Phylotypen übrig blieben (siehe Tabelle I<sup>§</sup> im Anhang). Die Phylotypen wurden einer taxonomischen Zugehörigkeit zugeordnet, die auf der naiven Bayes'schen Klassifikation<sup>97</sup> mit einem Pseudo-Bootstrap von 80% basierte. Eine weitere Annotation von Phylotypen wurde mit der RDP-Datenbank unter Verwendung der Seqmatch-Funktion nach den zuvor veröffentlichten Kriterien annotiert, um die Diskriminierungskraft jeder Sequenz zu eruieren<sup>78</sup>.

Das EcoIndR package<sup>98</sup> (version 1.0 2017) von R wurde zur Berechnung vom Raritätsindex (basierend auf der Gleichung von Leroy<sup>99, 100</sup>), von Simpson- ( $1-\lambda$ ) und Shannon- ( $H'$ ) Indizes, vom Taxonomieindex<sup>101</sup> und vom Reichtum (S) verwendet. Die statistischen Analysen wurden mittels Prism 7 (Graph Pad Software, Inc.) durchgeführt. Zunächst wurde jede Variable von Interesse einem Normalitätstest mit dem D'Agostino & Pearson-Omnibus unterzogen. Die meisten Schätzungen zeigten eine Normalverteilung, daher wurden t-Tests verwendet, um Unterschiede zwischen Probengruppen zu analysieren. Alle p-Werte wurden mit der Benjamini–Hochberg false-discovery Rate korrigiert (gewünschter FDR = 5%)<sup>102</sup>. Mikrobielle Gemeinschaften wurden systematisch auf verschiedenen phylogenetischen Niveaus in sequentieller Weise analysiert, von Phylum über Klasse, Ordnung, Familie, Genus bis zum Phylotyp. Durch die Datenanalyse in absteigender taxonomischer Reihenfolge konnte ein konsistenter Überblick über die bakterielle Zusammensetzung des GI-Trakts geschaffen werden. Für die Analysen auf verschiedenen taxonomischen Niveaus wurden relative Abundanzen (in Prozent) verwendet (siehe Tabellen II<sup>§</sup>, III<sup>§</sup>, IV<sup>§</sup>, V<sup>§</sup>, VI<sup>§</sup> im Anhang).

Die Daten, welche den prozentualen Anteil der Abundanzen von jeder der oben genannten taxonomischen Ebene umfassten, wurden benutzt, um unter der Verwendung des Bray-Curtis-Algorithmus Ähnlichkeit-Matrizen von Proben zu konstruieren. Die Proben wurden mit der Principal-Koordinaten-Analyse (PCoA) mit Past 3 visualisiert<sup>103</sup>.

Signifikante Unterschiede zwischen den a priori definierten Gruppen Speichel (S), Corpus (C), Antrum (A), Duodenum (D), terminales Ileum (TI), Colon ascendens (CA), Colon descendens (CD) und Faeces (F) von *H. pylori*-negativen (X) und *H. pylori*-positiven (H) Probanden wurden mit ANOSIM (9999 Permutationen) unter Verwendung von Past 3 ausgewertet<sup>104</sup>. Die Software PRIMER (V.7.0.11, PRIMER-E, Plymouth MarineLaboratory, UK) wurde zur Durchführung der permutationalen multivariaten Varianzanalyse (PERMANOVA) verwendet. Hierbei waren Typ-III (Partiell) Quadratsummen, fixierte Effekte mit Summe auf Null für gemischte Terme erlaubt und Monte Carlo p-Werte wurden durch die uneingeschränkte Permutation von Rohdaten generiert. Gruppen wurden bei einem p-Wert  $<0,05$  als statistisch signifikant unterschiedlich betrachtet. Bakteriengemeinschaften der unterschiedlichen Abschnitte des menschlichen GI-Trakts wurden auf Phylum-, Klassen-, Ordnungs-, Familien-, Genus- und Phylotypniveau charakterisiert, wobei jede Region mit der nächstgelegenen Region verglichen wurde. Infolgedessen wurden sieben Vergleiche (SX / CX, CX / AX, AX / DX, DX / TIX, TIX / CAX, CAX / CDX und CDX / FX) bei allen sechs oben genannten taxonomischen Ebenen durchgeführt.

Da der D'Agostino & Pearson-Omnibus-Normalitätstest in den meisten Fällen eine nicht-normale Verteilung zeigte, wurden die Unterschiede in der Verteilung durch den Wilcoxon-Matched-Pair-Signed-Rank-Test ausgewertet, wobei ein 95%iges -Konfidenzintervall innerhalb des packages exactRankTests (version 0.8-29 2017) von R (<https://cran.r-project.org/web/packages/exactRankTests/index.html>) verwendet wurde. Vergleiche wurden mit Taxa durchgeführt, die in mindestens 7 Proben von mindestens einer der beiden verglichenen Stellen nachgewiesen wurden. Alle p-Werte wurden mit der Benjamini-Hochberg false-discovery Rate korrigiert (gewünschter FDR = 5%)<sup>102</sup>. Die Abundanz von Taxa zwischen verglichenen Regionen wurde als signifikant unterschiedlich bewertet, wenn der korrigierte p-Wert (q-Wert)  $<0,05$  war. Plots wurden mit Prism 7 und Past 3 erstellt.

### 3. ERGEBNISSE

Die transkriptionell aktiven Bakteriengemeinschaften aus Speichel, oberem GI-Trakt (Biopsien aus Corpus, Antrum und Duodenum), unterem GI-Trakt (Biopsien aus terminalem Ileum, Colon ascendens und Colon descendens) und Faeces von 21 Studienteilnehmern wurden identifiziert. 14 Probanden waren bei der klinischen Routinediagnostik *H. pylori*-negativ, bei 7 Probanden wurde eine *H. pylori*-Infektion diagnostiziert (siehe Tabelle 4 im Anhang). Die histopathologischen Eigenschaften der entnommenen Biopsien sind in den Tabellen 5 und 6 (im Anhang) dargestellt. Nach dem Sequenzieren und Rarefying der Bibliotheksgrößen auf die minimale Sequenzierungstiefe wurden 10 435 Sequenzen aus jeder Probe berücksichtigt und taxonomisch zu 4045 verschiedenen Phylotypen, die zu 14 verschiedenen Phyla und 169 Genera gehören, annotiert. Insgesamt 3 278 Phylotypen konnten einer bestimmten Gattung (81%) zugeordnet werden, was einem Median von 89% der gesamten Bakteriengemeinschaft entsprach (mit einem Minimum von 78% im C. ascendens und einem Maximum von 96% im Antrum).

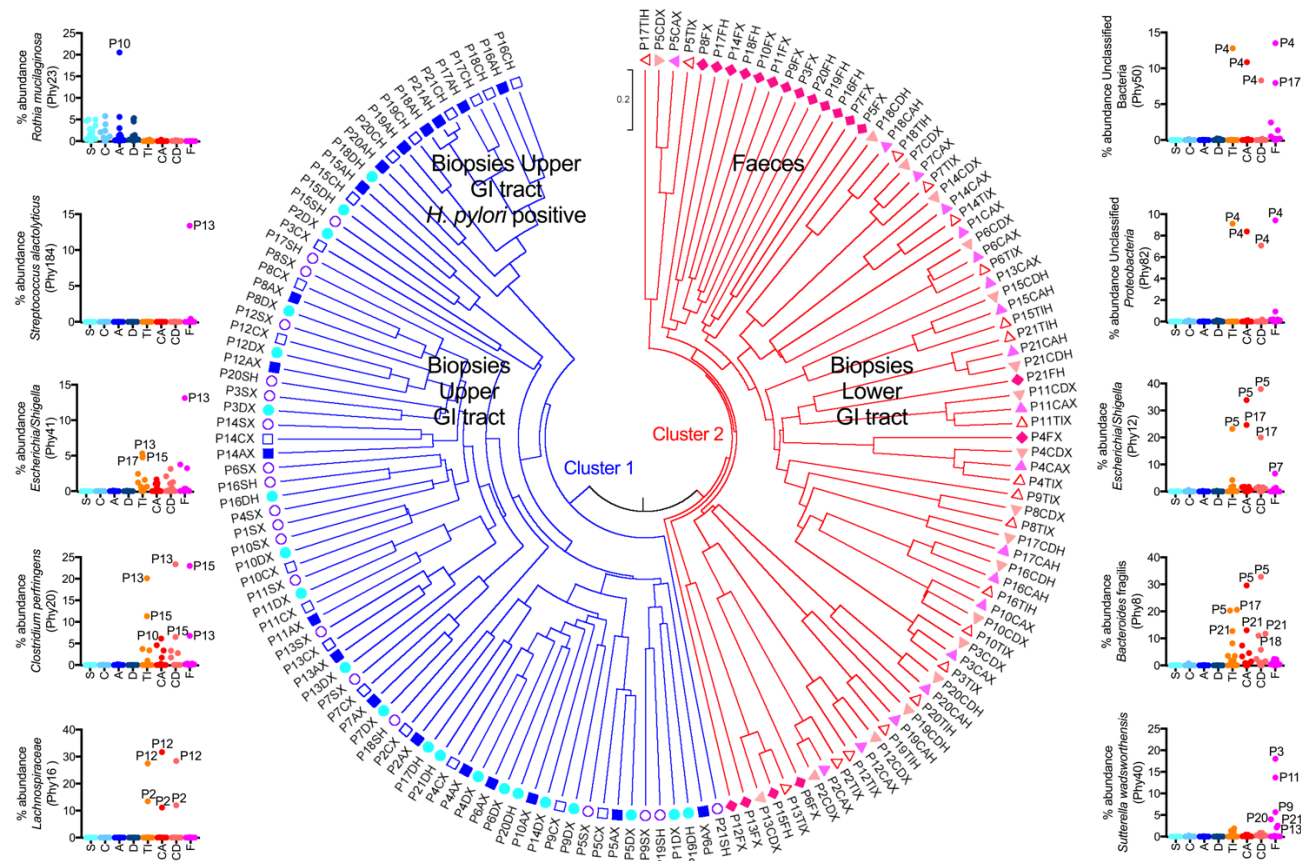
#### 3.1 Interindividuelle Variation der globalen mikrobiellen Zusammensetzung im oberen und unteren GI-Trakt

Die globalen bakteriellen Profile der Proben, welche aus dem gesamten GI-Trakt von 21 Individuen entnommen wurden, gruppierten sich in zwei Cluster, die eine Ähnlichkeit von nur 2% aufwiesen (Abbildung 1). Cluster 1 bestand aus Gemeinschaften aus Speichel und dem oberen GI-Trakt (Corpus, Antrum und Duodenum). Mit Ausnahme von Gemeinschaften aus Corpus und Antrum von *H. pylori*-infizierten Probanden, die sich von allen anderen mikrobiellen Gemeinschaften des oberen GI-Trakts klar unterschieden, gruppierten die Gemeinschaften aus allen Abschnitten des oberen GI-Trakts von jedem einzelnen Probanden zusammen (Abbildung 1, Zentrum). Proben aus dem oberen GI-Trakt, einschließlich Speichel, zeigten eine Ähnlichkeit von 20% bis 70%. Cluster 2 enthielt Proben, die aus dem unteren GI-Trakt entnommen wurden sowie Stuhlproben und zeigte eine größere Heterogenität als Cluster 1. Bakteriengemeinschaften aus C. descendens, C. ascendens und des terminalem Ileums wiesen eine Ähnlichkeit von 20-90% auf, wobei Bakteriengemeinschaften von Stuhlproben, die sich getrennt von

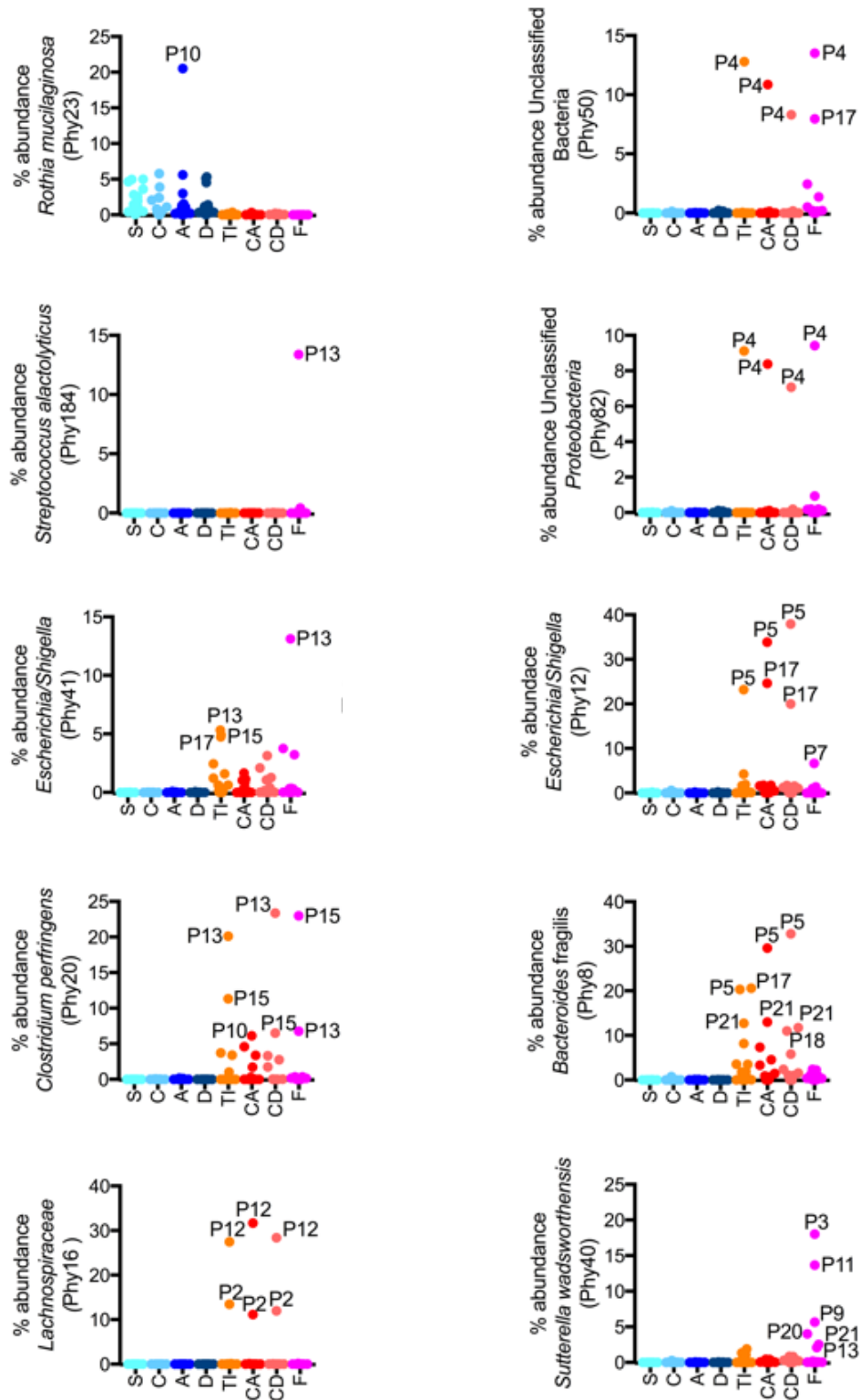


Schleimhautgemeinschaften des unteren GI-Trakts gruppierten, nur eine Ähnlichkeit von 12-35% zeigten. Auch hier war die globale mikrobielle Zusammensetzung in Proben aus C. descendens, C. ascendens und terminalem Ileum innerhalb einer Person ähnlich, jedoch unterschieden sich diese von den entsprechenden Stuhlproben. Wie bei dem exemplarischen Fall von Proband 3 (P3) waren die Gemeinschaften aus Biopsien vom terminalen Ileum, C. ascendens und C. descendens bis zu 85% ähnlich, während die jeweilige Bakteriengemeinschaft in der Stuhlprobe nur 18% Ähnlichkeit mit derjenigen von der Mukosa teilte.

Insgesamt wurde ein starker Einfluss des Wirts auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften sowohl im oberen als auch im unteren GI-Trakt beobachtet, was darauf hindeutet, dass jeder Proband sein einzigartiges individuelles Mikrobiom entlang des GI-Trakts beherbergt. Das ist zum Beispiel bei zwei Probanden, P12 und P2, ganz deutlich, bei denen die mikrobielle Gemeinschaft im unteren GI-Trakt von Phy16 dominiert wird, welcher der Familie Lachnospiraceae angegliedert ist und jeweils ca. 30% und 10% der Sequenzlesevorgänge ausmacht. Als weiteres Beispiel zeigte P5 eine hohe Besiedlung durch Phy12 *Escherichia/Shigella* und Phy8 *Bacteroides fragilis* Phylotypen. Phy12 und Phy8 machten zusammen fast 60% der gesamten Sequenzen im unteren GI-Trakt in diesem Probanden aus (Abbildung 1, links und rechts, und Abbildung 2). Zwischen den Abschnitten innerhalb des oberen GI-Trakts (Antrum, Corpus und Duodenum) und denen innerhalb des unteren GI-Trakts (terminales Ileum, C. ascendens und C. descendens) im einzelnen Proband wurden keine signifikanten Unterschiede in der globalen mikrobiellen Gemeinschaft festgestellt, mit seltenen Ausnahmen. Beispielsweise gruppierte sich die Gemeinschaft im Antrum von Proband P10 getrennt von denen in Corpus, Duodenum und Speichel, aufgrund der hohen Abundanz von *Rothia mucilaginosa* (Phy23), das 20% der gesamten Gemeinschaft im Antrum ausmachte.



**Abbildung 1.** Group-average agglomeratives hierarchisches Clustering von 156 Proben, basierend auf globalen Bakterienprofilen (Phylotypenebene) entlang des oberen GI-Trakts (Speichel, S; Magenkorpus, C; Magenantrum, A; Duodenum, D) und des unteren GI-Trakts (terminales Ileum, TI; Colon ascendens, CA; Colon descendens, CD; Faeces, F) von 14 gesunden (X) Probanden (P1-14) und 7 Probanden (H) mit *H. pylori*-Infektion (P15-P21). Die verschiedenen anatomischen Stellen sind mit eindeutigen Symbolen gekennzeichnet. Ausgewählte Phylotypen, welche bei einzelnen Individuen detektiert wurden, sind als Einfügungen in Abb. 1 (links und rechts) und in Abb. 2 dargestellt. Die y-Achse zeigt die relative Abundanz des Phylotyps, die x-Achse zeigt den Probenursprung. Adaptiert aus Vasapolli et al. 2019<sup>105</sup>.



**Abbildung 2.** Vergrößerung aus Abbildung 1: Darstellung der ausgewählten Phylotypen, welche bei einzelnen Individuen detektiert wurden. Die y-Achse zeigt die relative Abundanz des Phylotyps, die x-Achse zeigt den Probenursprung. Adaptiert aus Vasapoli et al. 2019<sup>105</sup>.

### **3.2 Unterschiede in der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften und in Diversitätsmessungen zwischen verschiedenen gastrointestinalen Regionen**

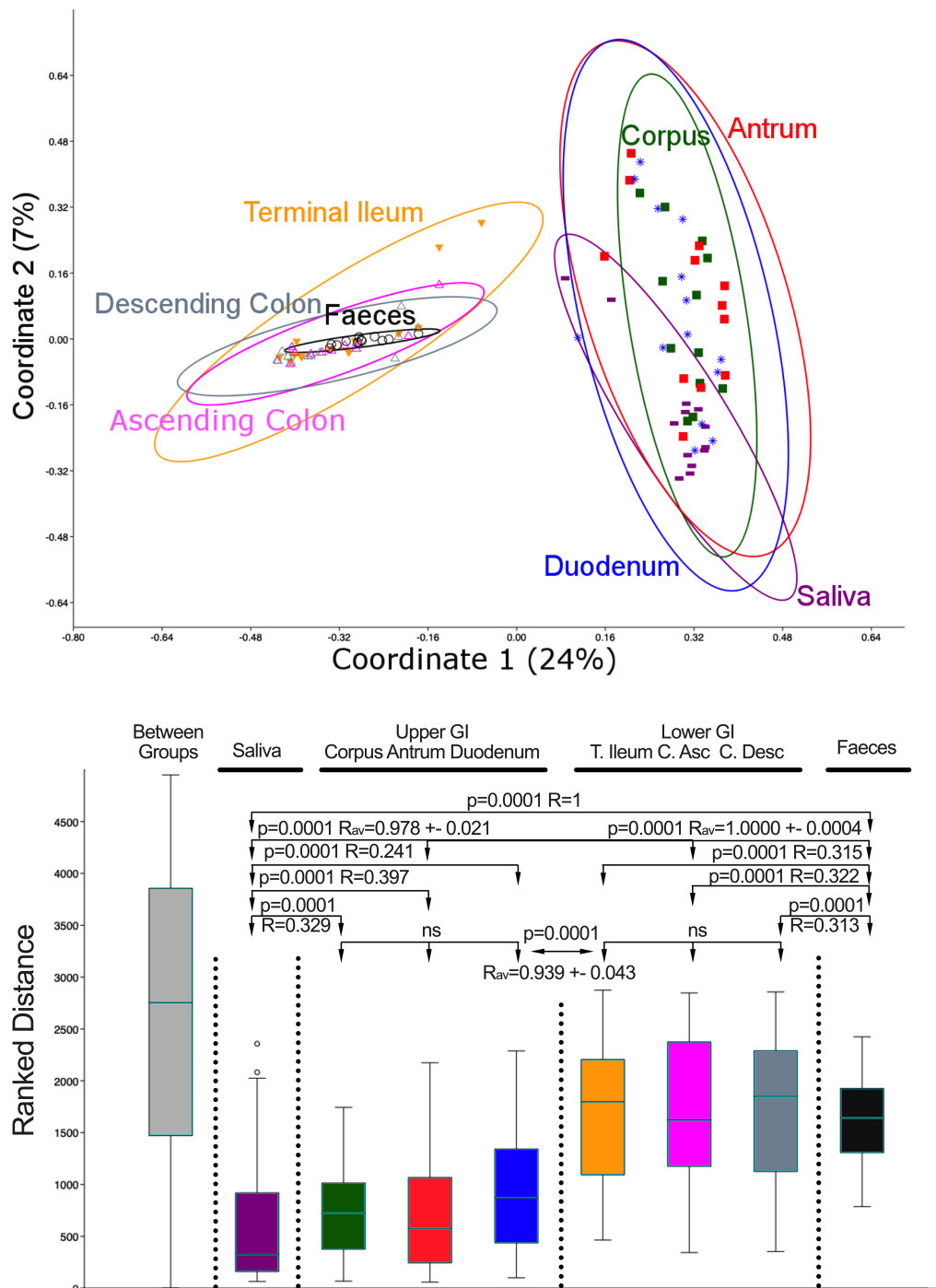
Vergleiche zwischen den globalen mikrobiellen Gemeinschaften auf Phylotypebene in den 8 verschiedenen Regionen des GI-Trakts zeigten, dass sich die globalen bakteriellen Strukturen signifikant unterschieden (PERMANOVA pseudo-F=5.70,  $p=0.001$ , siehe Tabelle VII<sup>§</sup> im Anhang; ANOSIM global  $R=0.586$ ,  $p=0.001$ ). Das wird auch in der Principal-Koordinaten-Analyse (PCoA) gezeigt mit deutlichen Unterschieden zwischen den Gemeinschaften des oberen GI-Trakts und denen des unteren GI-Trakts (Abbildung 3A).

Sowohl PERMANOVA als auch ANOSIM (siehe Abbildung 3B und Tabelle VII<sup>§</sup> im Anhang) zeigten signifikante Unterschiede zwischen den aufeinanderfolgenden GI-Regionen: Speichel und Corpus (PERMANOVA:  $t=3.02$ ,  $p=0.001$ ; ANOSIM:  $R=0.329$ ,  $p=0.001$ ), Duodenum und terminales Ileum (PERMANOVA:  $t=2.74$ ,  $p=0.001$  ANOSIM:  $R=0.888$ ,  $p=0.001$ ) sowie C. descendens und Faeces (PERMANOVA:  $t=1.71$ ,  $p=0.001$ ; ANOSIM;  $R=0.313$ ,  $p=0.001$ ) (Abbildung 3 und Tabelle VII<sup>§</sup> im Anhang). Außerdem wurden auf Phylotypebene keine signifikanten Unterschiede zwischen den Bakteriengemeinschaften von verschiedenen Stellen sowohl des oberen GI-Trakts (Corpus, Antrum und Duodenum) als auch des unteren GI-Trakts (terminales Ileum, Colon ascendens und Colon descendens) ermittelt (Abbildung 3).

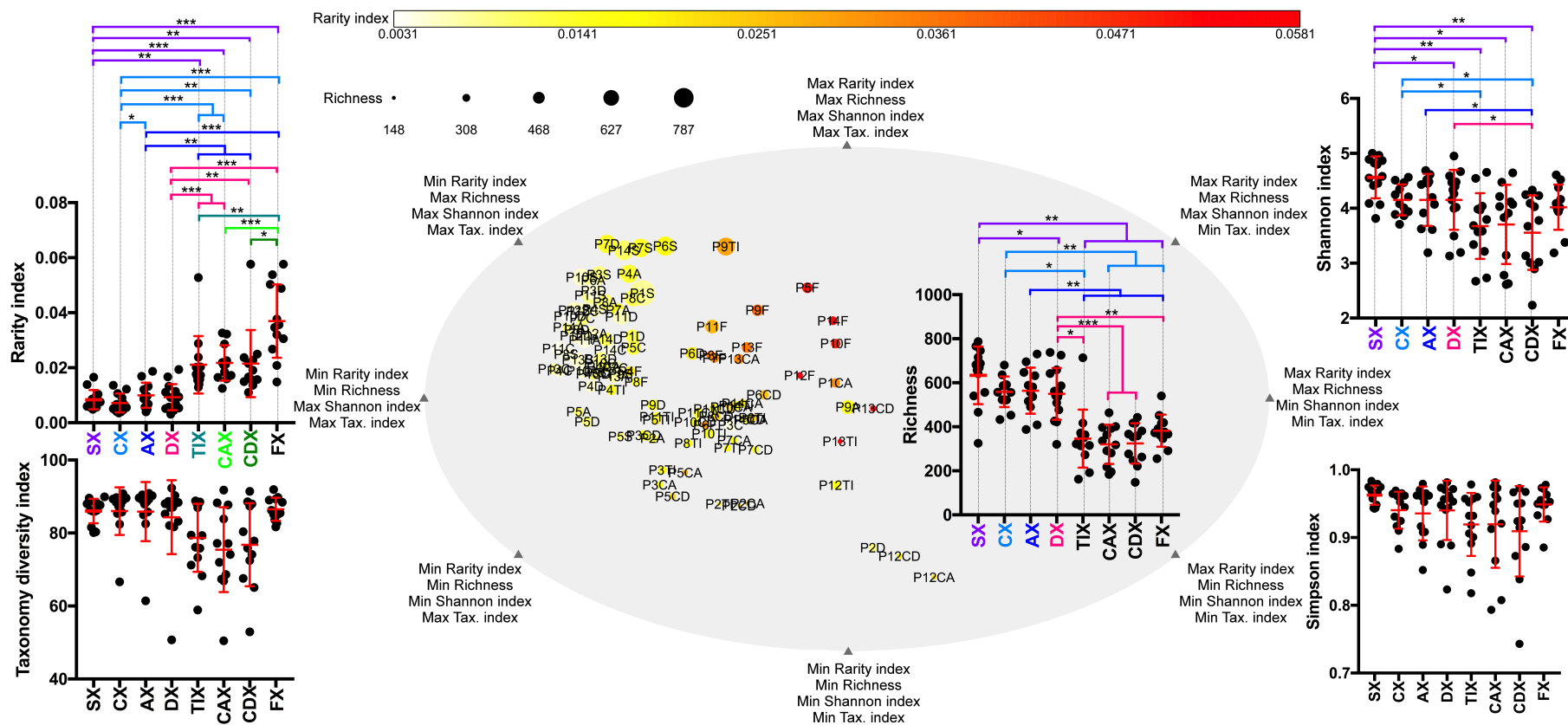
Zusätzlich zu den Unterschieden in der globalen mikrobiellen Zusammensetzung wurden signifikante Unterschiede im Phylotypenreichtum zwischen den verschiedenen GI-Regionen festgestellt (Abbildung 4). Im Speichel und im oberen GI-Trakt betrug die durchschnittliche Anzahl der Phylotypen  $634 \pm 131$ ,  $559 \pm 70$ ,  $564 \pm 105$  bzw.  $550 \pm 118$  jeweils im Antrum, Corpus und Duodenum. Diese Anzahl war im unteren GI-Trakt signifikant niedriger ( $346 \pm 131$ ,  $320 \pm 89$ ,  $324 \pm 91$  and  $382 \pm 73$  jeweils im terminalen Ileum, Colon ascendens und Colon descendens). Entsprechende Unterschiede zeigten sich auch im Shannon-Diversity-Index, der sowohl die Abundanz als auch die Gleichmäßigkeit der detektierten Phylotypen beschreibt, und im oberen GI-Trakt im Allgemeinen höhere Werte als im unteren GI-Trakt zeigte (Abbildung 4). Es wurden keine statistisch

signifikanten Unterschiede in der Gleichmäßigkeit, gemessen durch den Simpson-Index (1- $\lambda$ ), und in der Taxonomie-Biodiversität, ermittelt durch den  $\theta$ -Index, beobachtet (Abb. 4). Der relative Raritätsindex ist eine Messgröße zur Quantifizierung der Rarität in einer Gemeinschaft und definiert die Abundanzschwelle, unterhalb derer ein Phylotyp in der Gemeinschaft einer einzelnen Probe als selten angesehen werden kann<sup>99, 100</sup>. In einer Gemeinschaft mit gleichmäßig abundanten Mitgliedern ist dieser Index 0 und er steigt an, sobald die Gemeinschaft ungleichmäßig wird. Der relative Raritätsindex war im unteren GI-Trakt und in den Faeces signifikant höher als im oberen GI-Trakt und im Speichel (Abbildung 4).

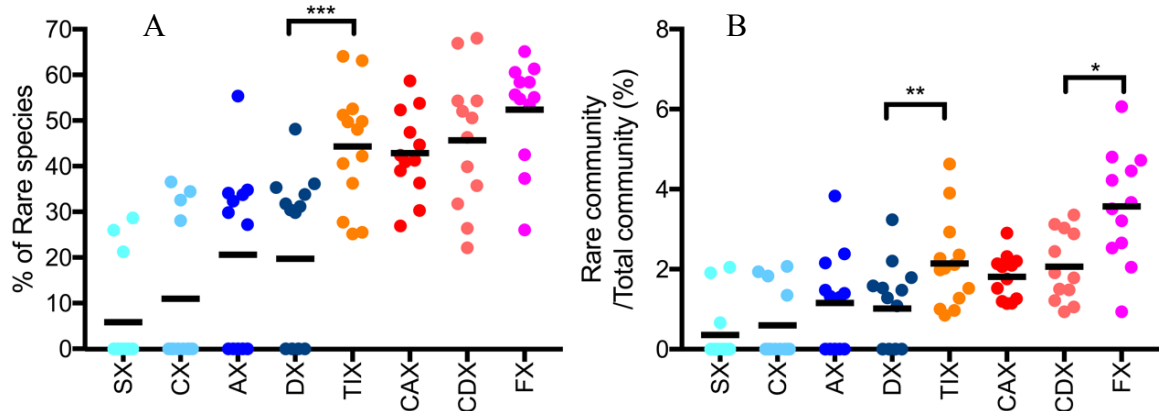
Die Berechnung des Anteils von seltenen Phylotypen mit Abundanz unter dem Raritätsindex in jeder einzelnen Probe ergab einen statistisch signifikanten Anstieg der relativen Menge von seltenen Phylotypen entlang des GI-Trakts. Dementsprechend konnten im Speichel nur 6% der gesamten Phylotypen als „selten“ betrachtet werden, wohingegen der Anteil von seltenen Phylotypen im *C. descendens* und im Stuhl auf 44% bzw. 52% anstieg (Abbildung 5A). Die seltenen Phylotypen repräsentierten nicht mehr als 3,5% der gesamten bakteriellen Gemeinschaft (Abbildung 5B) und machten daher nur einen kleinen Anteil der gesamten Bakterien aus. Dieser Aspekt zeigt, dass im unteren GI-Trakt eine relativ kleine Anzahl von Phylotypen die Mehrheit der gesamten Mikrobiota darstellt, während der obere GI-Trakt von einer größeren Anzahl von bakteriellen Phylotypen mit hoher relativen Abundanz besiedelt wird.



**Abbildung 3.** Unterschiede in den globalen bakteriellen Gemeinschaftsstrukturen entlang des oberen GI-Trakts (Speichel, S; Magenkörper, C; Magenantrum, A; Duodenum, D) und des unteren GI-Trakts (terminales Ileum, TI; Colon ascendens, CA; Colon descendens, CD; Faeces, F) von 14 gesunden Probanden, bewertet durch Principal-Koordinaten-Analyse (PCoA) basierend auf der Bray-Curtis-Ähnlichkeitsmatrix (A). Formale Vergleiche zwischen Regionen wurden durch Ähnlichkeitsanalyse (ANOSIM) bewertet. "ns" bezeichnet nicht signifikant (B). Adaptiert aus Vasapolli et al. 2019<sup>105</sup>.



**Abbildung 4.** Mitte: Räumliche Verteilung der Proben basierend auf 8 Referenzpunkten, die durch 8 mögliche Kombinationen definiert werden, wenn das Maximum und das Minimum von den 4 dargestellten Diversitätsindizes (Raritätsindex, Reichtum, Shannon-Index und taxonomische Diversität) berücksichtigt werden. Die Größe der Kreise entspricht den Reichtum und der Farbcodegradient hängt vom Raritätsindex ab. Die absolute Werte der Indizes (Rarität-Leroy-Index, taxonomische Diversität sowie Shannon- und Simpson-Indizes) werden als Einfügungen angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede sind durch \* wenn  $q < 0,05$ , \*\* wenn  $q < 0,01$  und \*\*\* wenn  $q < 0,001$  gekennzeichnet. Der Mittelwert und die Standardabweichung werden auch angezeigt. Adaptiert aus Vasapolli et al. 2019<sup>105</sup>.



**Abbildung 5.** Prozentsatz der seltenen Phylotypen in jeder der untersuchten Regionen: Speichel (SX), Corpus (CX), Antrum (AX), terminales Ileum (TIX), Colon ascendens (CAX), Colon descendens (CDX) und Faeces (FX), 4A. Der Anteil der seltenen Bakteriengemeinschaften (seltene Bakteriengemeinschaften / Gesamtbakteriengemeinschaften) ist rechts dargestellt (%) für jede der untersuchten Regionen (4B). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen benachbarten Regionen wurden unter Verwendung des t-Tests berechnet und sind durch \* wenn  $p < 0,05$ , \*\* wenn  $p < 0,01$  und \*\*\* wenn  $p < 0,001$  gekennzeichnet. Adaptiert aus Vasapolli et al. 2019<sup>105</sup>.

### 3.3 Taxonomische Zusammensetzung auf verschiedenen phylogenetischen Ebenen der transkriptionell aktiven bakteriellen Gemeinschaften des menschlichen GI-Trakts

Die Bakteriengemeinschaften wurden systematisch auf verschiedenen taxonomischen Stufen von Phylum bis Phylotyp analysiert. Wie bei der Analyse der globalen mikrobiellen Gemeinschaftsstrukturen wurden 4 unterschiedliche Lebensräume identifiziert: Speichel, oberer GI-Trakt, unterer GI-Trakt und Stuhl. Die Unterschiede waren bereits auf Phylum-Ebene zwischen Speichel und dem oberen GI-Trakt, zwischen oberem GI-Trakt und unterem GI-Trakt sowie zwischen unterem GI-Trakt und Faeces erkennbar (siehe Abbildung 6A). Der obere GI-Trakt war durch eine geringere Anzahl von Bacteroidetes gekennzeichnet, wobei nur im Speichel und im oberen GI-Trakt eine hohe Abundanz von Fusobacteria festgestellt wurde. Actinobacteria waren im unteren GI-Trakt von geringer Abundanz, jedoch häufiger in den Faeces, anzutreffen.

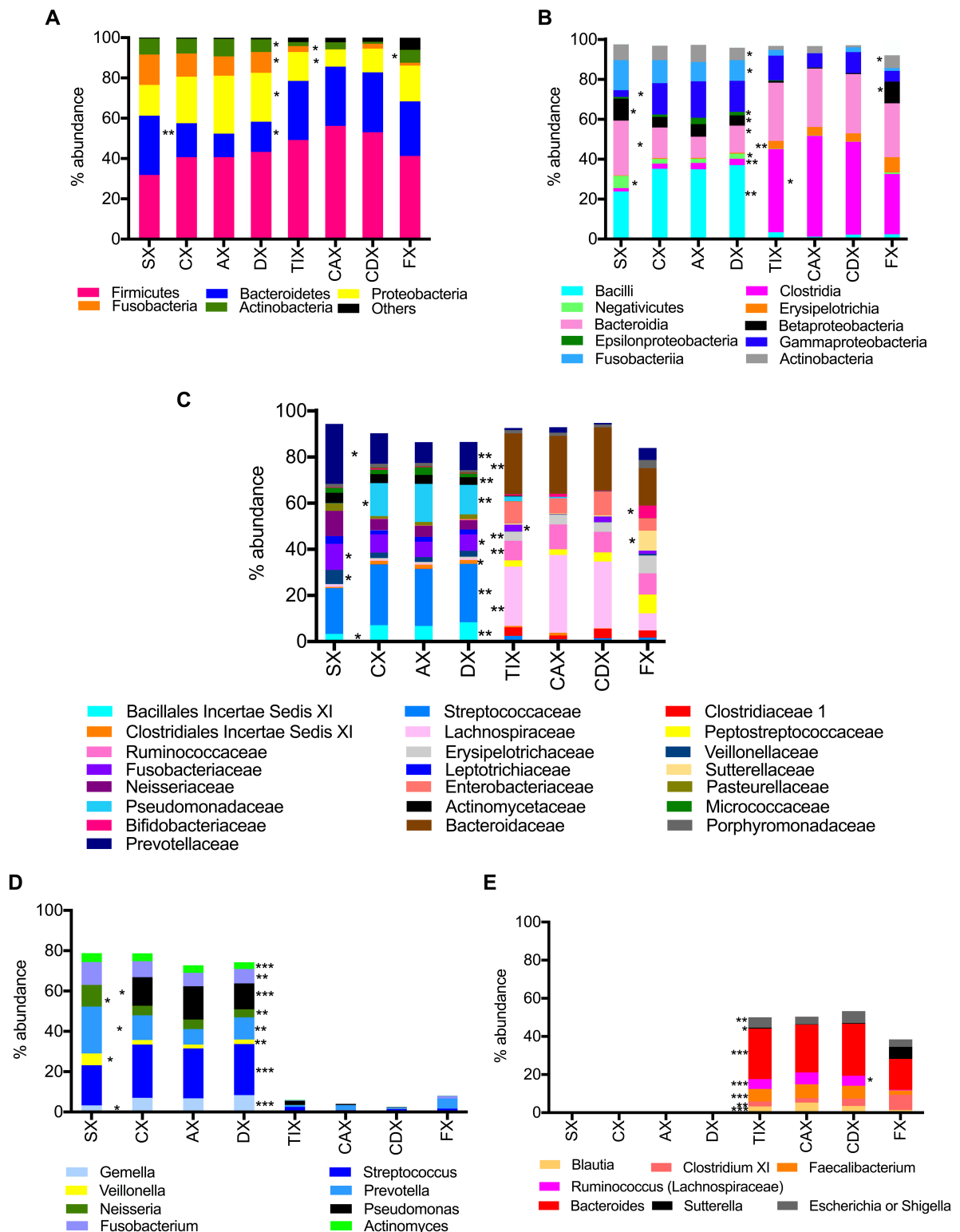
Diese Unterschiede waren durchweg auf allen phylogenetischen Ebenen mit einer zunehmenden Auflösung konsistent. Die Veränderungen der relativen Abundanz von



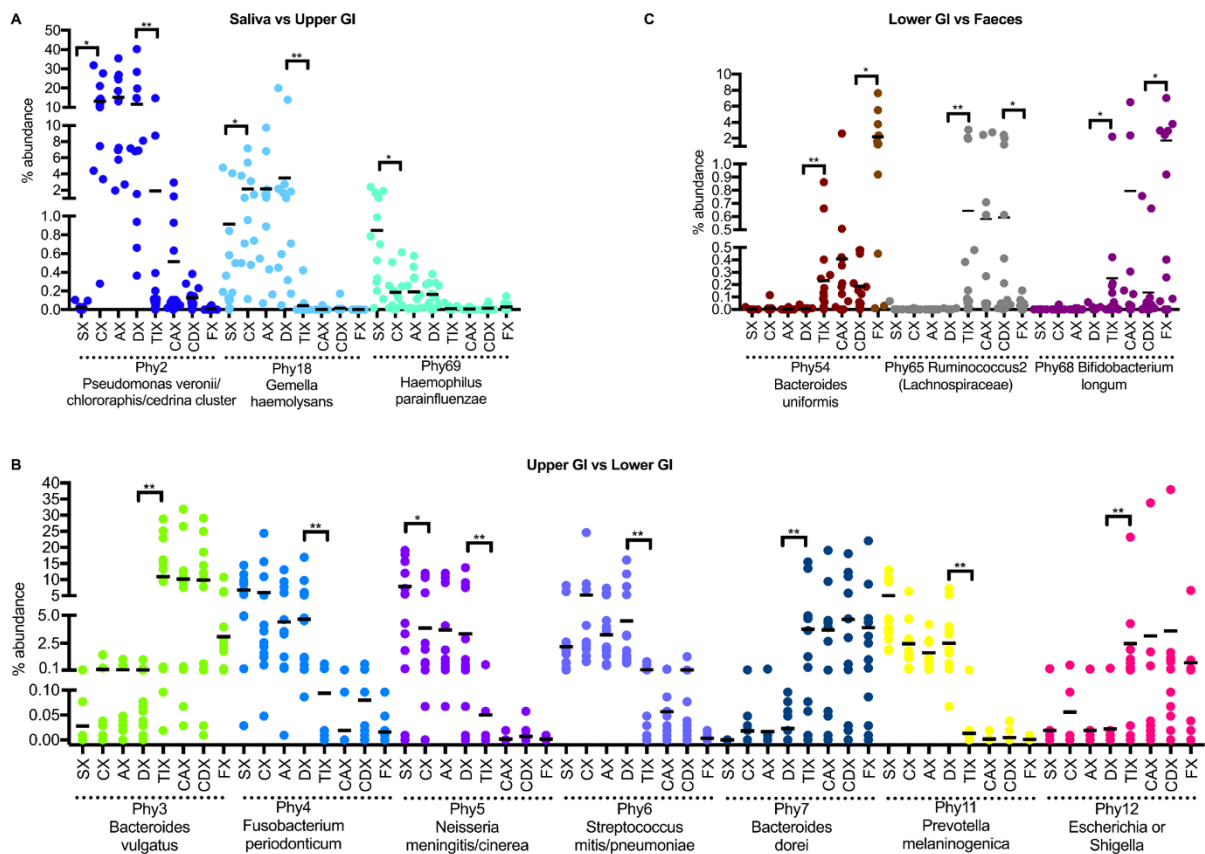
Bacteroidetes waren hauptsächlich auf Mitglieder der Gattungen *Prevotella* und *Bacteroides* zurückzuführen. Die Abundanz der Gattung *Prevotella* nahm vom Speichel zum oberen GI-Trakt ab und war nur in einer minimalen Menge im unteren GI-Trakt vorhanden. Mitglieder der Gattung *Bacteroides* waren im Speichel und im oberen GI-Trakt vernachlässigbar, deren Abundanz nahm jedoch im unteren GI-Trakt und in Faeces zu (Abbildungen 6D und 6E). Unterschiede in der Abundanz von *Prevotella* zwischen Speichel und oberem GI-Trakt wurden beobachtet, wobei diese im Speichel häufiger vorkamen. Das wurde auch in der relativ höheren Abundanz von zwei Phylotypen, Phy294 und Phy669, gezeigt. Statistisch signifikante Unterschiede in der Abundanz anderer *Prevotella*-Phylotypen wurden nicht detektiert, hauptsächlich aufgrund der hohen und wirtsspezifischen Diversität der Phylotypen. Zwischen Duodenum und terminalen Ileum wurde eine signifikante Veränderung in der *Bacteroidetes*-Gemeinschaft beobachtet. *Porphyromonas*, *Alloprevotella*, *Prevotella* und *Capnocytophaga* waren in höheren Abundanzen im Duodenum, wobei die Abundanzen von *Bacteroides*, *Odoribacter*, *Parabacteroides* und *Alistipes* höher im terminalen Ileum waren. Darüber hinaus waren die Abundanzen von spezifischen Phylotypen der Taxa *Porphyromonas*, *Alloprevotella* (jeweils 2 Phylotypen) und *Prevotella* (8 Phylotypen) im Duodenum signifikant höher; 10 *Bacteroides*-Phylotypen und ein *Odoribacter*-Phylotyp waren im terminalen Ileum häufiger vorhanden. Die Mitglieder des Phylums Firmicutes machten etwa 40% der gesamten Bakteriengemeinschaft aus, und zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede von ihrer Abundanzen im gesamten GI-Trakt (Abbildung 6). Unterschiede waren jedoch bereits auf Klassenebene erkennbar. Bacilli und Negativicutes besiedelten überwiegend den oberen GI-Trakt, während Clostridien und Erysipelotrichia hauptsächlich im unteren GI-Trakt zu identifizieren waren. Diese Ergebnisse waren auch auf tieferen Taxonomischen Ebenen konsistent. Die Gattungen *Gemella*, *Streptococcus* und *Veillonella* (Bacilli oder Negativicutes) waren im oberen GI-Trakt prädominant, während *Blautia*, *Clostridium* XI, *Faecalibacterium* und *Ruminococcus* (Clostridia) hauptsächlich den unteren GI-Trakt besiedelten (Abbildungen 6D, 6E).

Die Verteilung von nur einigen spezifischen Taxa war signifikant unterschiedlich zwischen Biopsien aus unterem GI-Trakt und Stuhlproben. Das Phylum Actinobacteria war signifikant abundanter in Faeces, was auf den Unterschied in der Abundanz von einem Mitglied der Gattung *Bifidobacterium* (Phy68, *B. longum*) zurückzuführen war (Abbildung 7). Die höhere Abundanz von Betaproteobacteria im Stuhl entsprach einer Anreicherung von *Sutterellaceae*. Taxa mit signifikant höherer Abundanz im Kolon im Vergleich zu

Faeces waren die Gattung *Ruminococcus*2 der Lachnospiraceae (einschließlich *Ruminococcus torques*) und Phy68, die zu dieser Gattung gehören. Sieben Phylotypen der Familie der Peptostreptococcaceae (die zu den Gattungen *Clostridium* XI und *Romboutsia* gehören) waren im Stuhl angereichert. Die Anzahl der bis zur Gattungsebene annotierten Sequenzen nahm entlang des menschlichen GI-Trakts fortschreitend ab, und 89%, 87%, 77% und 73% der Sequenzen aus Speichel, oberem GI-Trakt, unterem GI-Trakt und Stuhl wurden entsprechend annotiert. Das war hauptsächlich auf das Vorhandensein von nicht klassifizierten Ruminococcaceae und Lachnospiraceae zurückzuführen.



**Abbildung 6.** Relative Durchschnittsabundanz von Phyla (A), Klassen (B), Familien (C) und Gattungen (D und E) entlang des gesamten menschlichen GI-Trakts. Signifikant unterschiedlich verteilte Taxa sind mit \* wenn  $q < 0,05$ , \*\* wenn  $q < 0,01$  und \*\*\* wenn  $q < 0,001$  gekennzeichnet. Adaptiert aus Vasapolli et al. 2019<sup>105</sup>.



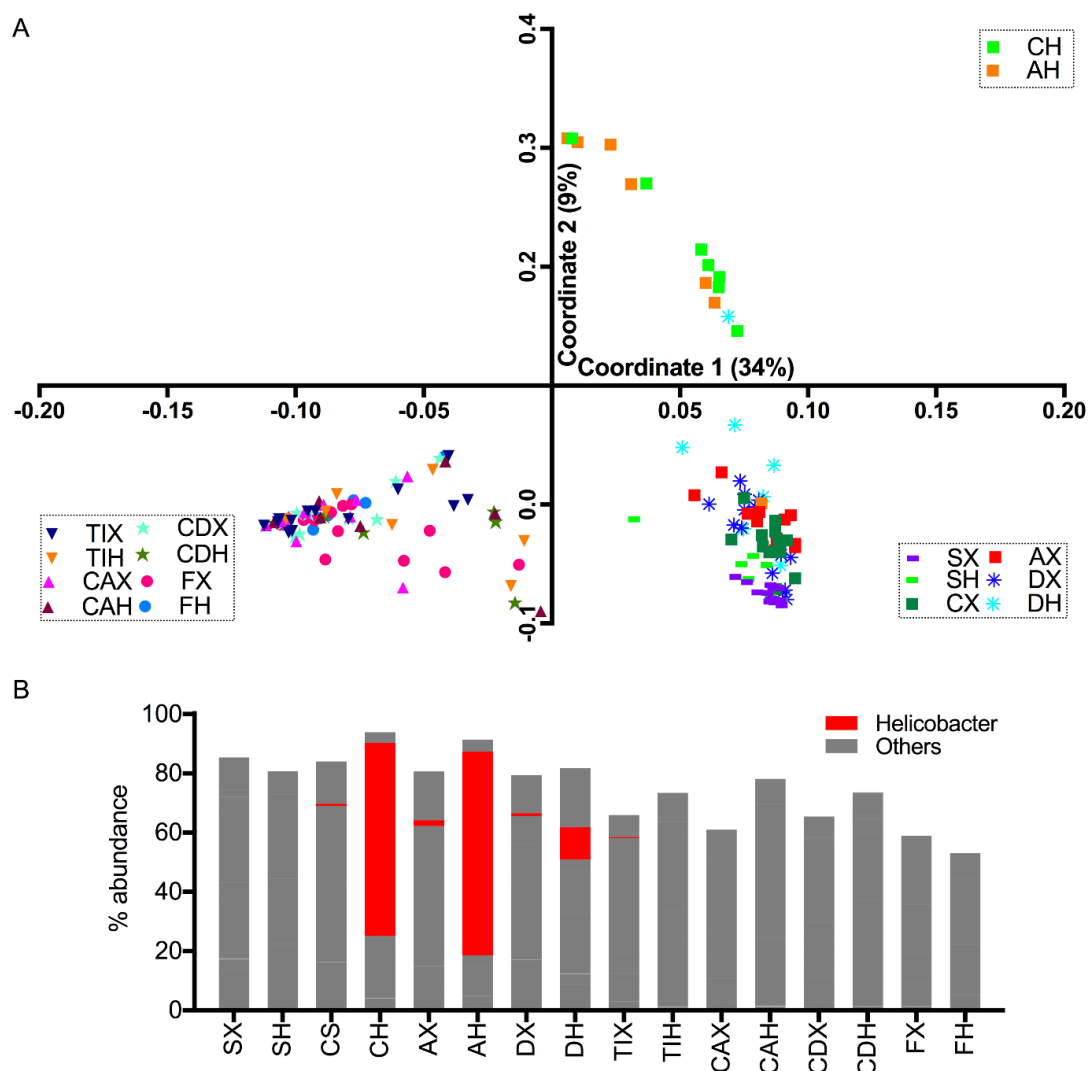
**Abbildung 7.** Signifikant unterschiedlich verteilte Phylotypen im Speichel im Vergleich zum oberen GI-Trakt (A), im oberen GI-Trakt im Vergleich zum unteren GI-Trakt (B) und im unteren GI-Trakt im Vergleich zu Faeces (C). Die y-Achse zeigt die Abundanz und die x-Achse die Regionen des GI-Trakts. Signifikant unterschiedlich verteilte Taxa sind mit \*  $q < 0,05$  und \*\*  $q < 0,01$  gekennzeichnet. Adaptiert aus Vasapolli et al. 2019<sup>105</sup>.

### 3.4 Das gastrointestinale Mikrobiom in *H. pylori* positiven Probanden

Vergleiche zwischen den globalen bakteriellen Gemeinschaften auf Phylotypenebene in den 8 verschiedenen Regionen des GI-Trakts und zwischen *H. pylori*-infizierten und nicht infizierten Probanden wurden mit PERMANOVA unter Verwendung eines bidirektionalen Kreuz-Designs (siehe Tabelle VIII<sup>§</sup> im Anhang) durchgeführt. Die Analyse zeigte nicht nur signifikante Unterschiede in der globalen mikrobiellen Gemeinschaftsstruktur nach Region (Pseudo-F = 7,24,  $p = 0,001$ ) und abhängig von der *H. pylori*-Infektion (Pseudo-F = 5,83,  $p = 0,001$ ), sondern auch eine Interaktion zwischen diese zwei Faktoren (Region; Pseudo-F = 2,04,  $p = 0,001$ ). Die Gemeinschaften vom Corpus ( $t = 3,19$ ,  $p = 0,001$ ) und Antrum ( $t$

= 2,99,  $p = 0,001$ ) waren zwischen den *H. pylori*-infizierten Probanden und *H. pylori*-negativ Probanden signifikant unterschiedlich (Tabelle VIII<sup>s</sup> im Anhang). *H. pylori* machte ca. 8-99% und 42-97% der gesamten gastralen bakteriellen Gemeinschaft im Antrum und im Corpus aus.

Zudem wurde metabolisch aktiver *H. pylori* in geringer Abundanz im Duodenum detektiert, er war allerdings in Biopsien aus dem unteren GI-Trakt und in Stuhlproben praktisch nicht vorhanden. Die mikrobiellen Gemeinschaften des unteren GI-Trakts und der Faeces unterschieden sich bei *H. pylori*-infizierten Probanden nicht signifikant von analogen Nischen der gesunden Gruppe (Abbildung 8 und Tabelle VIII<sup>s</sup> im Anhang.)



**Abbildung 8.** Globale bakterielle Gemeinschaftsstrukturen im menschlichen GI-Trakt bei gesunden Probanden und *H. pylori*-infizierten Probanden. Principal-Koordinaten-Analyse (PCoA) auf Gattungsniveau (A). Darstellung der relativen Durchschnittsabundanz repräsentativer Gattungen in Speichel (S), Corpus (C), Antrum (A), Duodenum (D), terminalem Ileum (TI), Colon ascendens (CA), Colon descendens (CD) und Faeces (F) von gesunden Probanden (X) und *H. pylori*-infizierten Personen (H). Adaptiert aus Vasapolli et al. 2019<sup>105</sup>.

## 4. DISKUSSION

In vorliegender Arbeit wird eine umfassende, hochauflösende Analyse der Zusammensetzung und der Biodiversität von aktiven bakteriellen Gemeinschaften entlang des gesamten menschlichen Verdauungstrakts dargestellt. Die bemerkenswerteste Erkenntnis aus dieser Analyse ist, dass der GI-Trakt in vier verschiedene Regionen unterteilt werden kann beziehungsweise auf die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaften, die vom Einfluss ortsspezifischer anatomischer und physikalisch-chemischen Bedingungen abhängig sind. Diese neuen Ergebnisse können einen wichtigen Einfluss auf unser Verständnis der funktionellen Rolle des Darmmikrobioms in seiner enormen Komplexität haben. Wie in einem kürzlich veröffentlichten Review festgestellt wurde, erfordert aktuell die Erforschung von Mikrobiota umfassendere Untersuchungen, bei denen nicht nur die allgemeine Zusammensetzung auf Phylum-Ebene, sondern auch auf tieferen taxonomischen Ebenen (zum Beispiel Gattung und Phylotype) berücksichtigt wird<sup>106</sup>. Darüber hinaus ist es extrem wichtig, die funktionelle Rolle der Mikroben und ihrer Metaboliten unter prospektiven Bedingungen zu untersuchen. Im Gegensatz zu den bis dato veröffentlichten Studien, bei denen die mikrobielle Zusammensetzung nur in einzelnen Zeitpunkten untersucht wurde, sind die Veränderungen der Gemeinschaften über die Zeit auch genauer zu charakterisieren. Die meisten Studien haben sich auf leicht zugängliches fäkales Material fokussiert, während das mukosale Mikrobiom anderer gastrointestinaler Nischen noch nicht ausreichend untersucht wurde. Um qualitativ hochwertige Daten aus den Analysen hervorzubringen, mit denen Vergleiche zwischen verschiedenen Studien und verschiedenen Forschungsgruppen möglich sind, ist die Entwicklung von vergleichbaren Methoden mit standardisierten Protokollen für die Probeentnahme, Speicherung und Analyse erforderlich.

In dieser Arbeit wurden einige dieser wichtigen Aspekte der Mikrobiomforschung berücksichtigt, sodass die erzeugten Daten insgesamt eine hochqualitative Charakterisierung des gastrointestinalen Mikrobioms von gesunden Menschen darstellen.

## 4.1 Vergleich der Ergebnisse mit ähnlichen Studien der Literatur

Bislang wurden Bakteriengemeinschaften in einzelnen selektionierten Regionen des gastrointestinalen Trakts charakterisiert<sup>6, 62, 107</sup>. Allerdings war bisher eine ausführliche systematische Charakterisierung des Mikrobioms entlang des gesamten GI-Trakts noch nicht verfügbar. In der wissenschaftlichen Literatur gibt es nur eine Studie von Stearns und Kollegen, die sich mit der bakteriellen Biogeographie im gesamten GI-Trakt beschäftigt hat<sup>108</sup>. In dieser kleinen Fallserie wurden vier gesunde Probanden (je zwei männlich und weiblich) untersucht und die mikrobielle Zusammensetzung in Proben aus Zahnbelag, Magen (Antrum und Corpus), Duodenum, Kolon (Colon transversum, Sigma, Rektum) und im Stuhl charakterisiert. Die Analyse war DNA-basiert und die Sequenzierung erfolgte mit einer Illumina-Plattform nach Amplifizierung der V3-Region des 16S-rRNA-Gens. In dieser Studie wurde keine systematische Analyse der Zusammensetzung der Mikrobiota über das Gattungsniveau hinaus durchgeführt. Auch wenn wesentliche methodische Unterschiede zwischen unserer Studie und der von Stearns *et al.* bestehen (zum Beispiel RNA-basierte vs. DNA-basierte Analyse, unterschiedliche Fallzahlen), waren die Ergebnisse beider Studien auf Phylum- und Genus-Niveau nahezu ähnlich. In der UniFrac Analyse und in der PCoA von Stearns *et al.* zeigte sich ein Clustering der globalen bakteriellen Profilen zunächst abhängig von der Hauptregion, dann vom Proband. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen war eine Unterteilung in Bakteriengemeinschaften aus dem oberen GI-Trakt und denen aus unteren GI-Trakt nicht eindeutig einsehbar, mutmaßlich aufgrund der eingeschränkten Aussagekraft der Studie bei der kleinen Kohorte. Vergleichbar zu unseren Daten, wurden eine hohe Ähnlichkeit zwischen Gemeinschaften aus Schleimhautproben von verschiedenen Regionen des Dickdarms (C. transversum, Sigma und Rektum) festgestellt und eindeutige Unterschiede zwischen der mikrobiellen Zusammensetzung im Kolon und in den Faeces beschrieben.

## 4.2 Einfluss von Wirt und lokoregionalen Bedingungen auf die Zusammensetzung des gastrointestinalen Mikrobioms

Eine systematische Analyse, bei der jede taxonomische Ebene berücksichtigt wird, ist die Grundlage für eine detaillierte Charakterisierung der mikrobiellen Zusammensetzung und Funktionen in einer bestimmten anatomischen Region. Die ausgeprägte interindividuelle Variation der Gemeinschaftsstrukturen der menschlichen Mikrobiota in verschiedenen Teilen des Körpers, einschließlich des Darms, wurde in mehreren groß angelegten Studien<sup>6, 78, 109</sup> beschrieben. Das Human Microbiome Project (HMP) war beispielsweise eine der wichtigsten Forschungsinitiativen, mit Fokus auf die Identifizierung und Charakterisierung des menschlichen Mikrobioms<sup>110</sup>. Im Rahmen dieses Projekts wurde die mikrobielle Zusammensetzung in 18 Körperräumen verteilt auf fünf Hauptkörperbereiche (Nasengänge, Mundhöhle, Haut, Gastrointestinaltrakt und Urogenitaltrakt) von 242 gesunden Menschen (129 männlich, 113 weiblich) untersucht. In dieser Studie wurden erhebliche Unterschiede (Beta-Diversität) der Gemeinschaftsstrukturen sowohl zwischen den Nischen als auch zwischen den Probanden beobachtet<sup>6</sup>. Mit Ausnahme der Biopsien aus Magen von *H. pylori*-positive Probanden und der Stuhlproben, zeigte sich in unserer agglomerativen hierarchischen Clusteranalyse (Abbildung 1), dass die globalen bakteriellen Gemeinschaften vom oberen GI-Trakt (Speichel, Magen und Duodenum) und vom unteren GI-Trakt (terminale Ileum und Kolon) jedes einzelnen Probanden zusammen gruppierten, unabhängig vom Ursprung der Proben. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Ergebnissen vom HMP-Projekt überein und bestätigen, dass jeder Mensch seine eigene individuelle Zusammensetzung des Mikrobioms hat, die in allen Regionen/Nischen innerhalb eines Hauptkörperbereichs (z. B. innerhalb des oberen oder des unteren GI-Trakts) konsistent bleibt.

Vorliegende Analyse zeigt klare Unterschiede zwischen luminalen und mukosalen Bakteriengemeinschaften. Signifikante Unterschiede zwischen mikrobiellen Gemeinschaften im Lumen und in den jeweiligen Schleimhautproben wurden auch in anderen früheren Studien beschrieben. In einer Untersuchung der aktiven Mikrobiota in luminalen und mukosalen Proben aus dem oberen GI-Trakt (Speichel, Magen, Duodenum) von 24 Patienten beobachteten Schulz *et al.* eine signifikante Variabilität der bakteriellen Zusammensetzung zwischen Magenaspirat und Magenbiopsien bereits auf Phylum-Ebene<sup>78</sup>. In den Magenschleimhautproben waren die relative Abundanzen von Phylotypen der



Gattungen *Prevotella*, *Alloprevotella*, *Porphyromonas* und *Tannerella* (Bacteroidetes) niedriger im Vergleich zu den Magenaspiratproben, und im Gegensatz, waren die relative Abundanzen von Phylotypen der Gattungen *Streptococcus* und *Staphylococcus* (Firmicutes) sowie von Phylotypen der Gattungen *Corynebacterium*, *Kocuria* und *Propionibacterium* (Actinobacteria) in höhere Abundanzen in der Magenschleimhaut. In dieser Arbeit wurde dasselbe Biopsieverfahren und derselbe Ansatz von Schulz und Kollegen zum Vergleich von mikrobiellen Gemeinschaften in Schleimhautbiopsien und Luminalaspiraten angewandt. Ähnlich wie bei der Arbeit von Schulz *et al.* war die mikrobielle Struktur im oberen GI-Trakt von gesunden Probanden durch die Genera *Gemella*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Streptococcus* und *Actinomyces* dominiert. Da bei der vorherigen Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen Speichel und Magenaspirat festgestellt wurden, wurde die Mikrobiomanalyse in dieser Arbeit auf Speichelproben und Stuhlproben begrenzt und keine weitere Luminalaspirate in Betracht gezogen.

Relevante Unterschiede zwischen den Gemeinschaftsstrukturen von Stuhlproben und denen von Schleimhautproben wurden bereits in der Pionierarbeit von Eckburg *et al.* angezeigt, bei der die anhaftenden mukosalen Gemeinschaften aus dem unteren GI-Trakt (multiplen Kolonregionen) und die Gemeinschaften in Faeces von drei gesunden Probanden charakterisiert wurden<sup>82</sup>. Diese Befunde wurden auch in späteren Studien bestätigt. Beispielsweise wurden in einer schwedischen Studie das mukosale Mikrobiom, welches in Biopsien aus unvorbereitetem Kolon analysiert wurde, und das fäkale Mikrobiom von 33 Patienten mit Reizdarmsyndrom und 16 gesunden Probanden verglichen<sup>111</sup>. In dieser Analyse zeigten Bakterien im Zusammenhang mit Mitgliedern des Phylum Bacteroidetes (*B. fragilis*, *B. vulgatus* und *Allistipes*) höhere relative Abundanzen in Kolonbiopsien im Vergleich zu Stuhlproben. Im Gegensatz dazu waren die relativen Abundanzen von Bakterien, die mit *Dorea formicigenerans* (Phylum Firmicutes) assoziiert waren, in den Faeces höher als in der Mukosa. Zudem wurden signifikant höhere relative Abundanzen von Actinobacteria, Bacilli und Clostridium-Clustern IV, IX und XIVa, sowie von Proteobacteria in den Stuhlproben festgestellt. Anhand vorliegender Analyse besiedelten Mitglieder der Gattung *Ruminococcus2* (Lachnospiraceae) bevorzugt die Mukosa des unteren GI-Trakts, während Sutterellaceae und Bifidobacteriaceae häufiger in Faeces im Vergleich zu der Schleimhaut des unteren GI-Trakts detektiert wurden. Diese Ergebnisse sind in kompletter Übereinstimmung mit denen von früheren Studien und bestätigen, dass das fäkale Mikrobiom sich vom mukosalen Mikrobiom signifikant

unterscheidet. Die Beobachtung, dass die Bakteriengemeinschaften im Speichel, im oberen GI-Trakt, im unteren GI-Trakt und in den Faeces unterschiedlich sind, unterstreicht daher die Unangemessenheit der Nutzung der fäkalen Mikrobiota als Surrogat für die gesamte Darmflora. Die Ergebnisse dieser Arbeit betonen, wie wichtig eine gezielte und selektive Probenentnahme ist, um eine genaue Darstellung des gastrointestinalen Mikrobioms zu ermöglichen.

### **4.3 Entwicklung der Alpha-Diversität entlang des gesamten Gastrointestinaltrakts**

Ein weiteres relevantes Ergebnis unserer Studie war die Abnahme des Reichtums und der Heterogenität der Mikrobiota entlang des Verdauungssystems, vom Speichel über den oberen und unteren GI-Trakt bis in die Faeces. Dieses Ergebnis ist am ehesten auf den Selektionsdruck im gesamten Verdauungstrakt zurückzuführen. Es stimmt mit den Ergebnissen früherer Studien gut überein, bei denen die Mundhöhle als eine der meisten biodiversen Nischen des menschlichen Körpers dargestellt wird. Zum Beispiel wiesen die Speichelproben unter allen untersuchten Habitaten (inklusive Stuhlproben) im Kollektiv des HMPs die höchste Alpha-Diversität (Biodiversität innerhalb der einzelnen Probe) auf. Die Alpha-Diversität wurde dabei mit dem relativ inversen Simpson-Index auf Gattungsebene und den 16S-rRNA-Gen OTUs (Phylotypen) gemessen<sup>6</sup>. Auch bei der kleinen Fallserie von Stearns *et al.* wurden die höchsten Diversitätsmessungen (Shannon-Diversity-Index und phylogenetische Diversität) in Mundproben beobachtet, während in den Magenproben die niedrigste Diversität detektiert wurde. Auch beobachteten Stearns und Kollegen im unteren GI-Trakt (Kolon- und Stuhlproben) eine sehr hohe Variabilität der Diversitätsmessungen<sup>108</sup>. In vorliegender Analyse wurde eine Abnahme des Phylotypenreichtums in zwei Schritten (zwischen Speichel und Biopsien aus Magen/Duodenum, und zwischen Duodenum und Biopsien aus Ileum/Kolon und Stuhlproben) beobachtet. Diese wurde von einem dementsprechenden Anstieg vom Leroy-Raritätsindex begleitet. Außerdem zeigte sich die Alpha-Diversität, gemessen mit dem Shannon-Diversity-Index, signifikant abnehmend vom Speichel und vom oberen GI-Trakt bis zum unteren GI-Trakt. Die Beobachtung eines höheren mikrobiellen Reichtums und einer höheren Diversität im Speichel und im oberen GI-Trakt lässt sich auf folgende Hypothese zurückführen. Die höchste Exposition gegenüber der mikrobiellen Umgebung findet in der Mundhöhle statt, die als erster Eingang zur Nahrungsaufnahme dient. Nach dem Verschlucken der Nahrung passt sich das mikrobielle Konsortium unter der Kontrolle

verschiedener Checkpoints entlang des GI-Trakts an. Diese Checkpoints umfassen unter anderem die Säurebarriere des Magens, das Festhalten an bestimmten Schleimhautoberflächen, die Selektion durch verschiedene Mucine und Gallensäuren und durch die abnehmende Sauerstoffverfügbarkeit, die für ein hauptsächlich anaeroben Milieu im Dickdarm verantwortlich ist<sup>61, 73</sup>.

#### **4.4 Bedeutung und klinische Umsetzung: eine mögliche Unterstützung zur Entwicklung von Probiotika**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Bakterien durch unterschiedliche physiologische Bedingungen in verschiedenen anatomischen Stellen des GI-Trakts stark beeinflusst werden. Auf Klassenebene zeigten sich zum Beispiel signifikante Unterschiede in der Abundanz von Bacilli und Negativicutes, die im oberen GI-Trakt in hohen relativen Anteilen vorkommen und im unteren GI-Trakt fast nicht vorhanden sind. Im Gegensatz dazu wurden Clostridia und Erysipelotrichia nur in geringen Abundanzen im oberen GI-Trakt nachgewiesen und waren im unteren GI-Trakt in höheren Abundanzen vorhanden. Clostridien und Erysipelotrichien sind daher im oberen GI-Trakt vorübergehend, während Bacilli und Negativicutes einen wichtigen Bestandteil des Mikrobioms mit funktioneller Relevanz im oberen GI-Trakt darstellen. Diese Ergebnisse stellen eine wichtige Beobachtung dar und könnten von einer konkreten Bedeutung für die Entwicklung und Optimierung probiotisch-basierter Therapien sein. Die aktuell am häufigsten aktuell verwendeten probiotischen Mischungen enthalten Lactobacilli<sup>112</sup>. Anhand unserer Ergebnisse könnten möglicherweise Probiotika, die Lactobacilli enthalten, ungünstige Bedingungen für die Besiedlung des GI-Trakts finden, wenn die probiotischen Formeln nicht in der Lage sind, die optimale Nische zu erreichen und eine korrekte Funktion der Bakterien zu favorisieren. Das Konzept, dass jede Intervention auf das Mikrobiota unterschiedliche (auch negative) Wirkungen haben kann, in Abhängigkeit von der bakteriellen Funktionsfähigkeit in bestimmten Regionen des GI-Trakt, wird durch kürzlich veröffentlichte Ergebnisse von Suez *et al.* unterstützt<sup>113</sup>. In dieser israelischen Studie wurde der Einfluss von Multi-Stamm-Probiotika oder autologer FMT (aFMT) auf die postantibiotische Rekonstitution des mukosalen Mikrobioms von 21 gesunden Menschen untersucht. Nach einer sieben Tage langen antibiotischen Therapie mit Ciprofloxacin und Metronidazol wurden die Probanden in drei Gruppen unterteilt: sechs Probanden erhielten einen aFMT, acht Probanden erhielten ein Probiotika-Präparat mit elf Stämmen

(einschließlich Stämme von *Lactobacilli*) für zwei Wochen. Bei den restlichen sieben Studienteilnehmern wurde keine Intervention durchgeführt und die spontane Rekonstitution des Mikrobioms beobachtet. Die Ergebnisse zeigten, dass die postantibiotische Probiotika-Einnahme im Vergleich zu entweder einer *watch-and-wait* Strategie oder einer aFMT zu einer verzögerten Rekonstitution des indigenen Mikrobioms führte. Eine gewisse Kolonisierungsresistenz gegenüber den probiotischen Stämmen wurde beobachtet. Nur die *Bifidobacterium*-Stämme waren nach Beendigung der Probiotika-Therapie bei einigen Probanden nachzuweisen. Im Gegensatz dazu war die aFMT deutlich hilfreicher, um die postantibiotische Dysbiose wiederherzustellen und führte zu einer schnellen und nahezu vollständigen Rekonstitution der ursprünglichen mikrobiellen Zusammensetzung. Diese Ergebnisse zeigen, dass die genaue Identifizierung der ökologischen Nische, in denen bestimmte Mitglieder des gesunden gastrointestinalen Mikrobioms lebensfähig sind und somit ihre Funktion ausüben können, für die Entwicklung therapeutischer mikrobieller Interventionen extrem wichtig ist.

#### **4.5 *H. pylori* und die Zusammensetzung des gastrointestinalen Mikrobioms**

Deutliche Unterschiede in der Mikrobiomzusammensetzung im Magen von *H. pylori*-infizierten Personen im Vergleich zu nicht infizierten Personen wurden in mehreren vorherigen Studien gezeigt<sup>70,75,114</sup>. Bereits bei einer der ersten Analysen von Bik *et al.*, die unter Verwendung von Hochdurchsatz-Sequenzierungsmethoden das Mikrobiom in Schleimhautproben aus Mägen von 23 Probanden (12 *H. pylori* positiv) charakterisierte, wurde eine deutlich höhere relative Abundanz von *H. pylori* in Proben aus infizierten Probanden festgestellt, wobei der durchschnittliche Prozentsatz von *H. pylori*-Klonen in positiven Probanden 72% betrug, verglichen mit einem Durchschnitt von 11% unter den *H. pylori*-negativen Probanden<sup>70</sup>. Auch zeigte sich in den Proben aus *H. pylori*-infizierten Personen eine geringere mikrobielle Diversität. Schulz *et al.* beobachteten in ihrer Studie signifikante Unterschiede sowohl im Phylotypenreichtum als auch in der Alpha-Diversität (dabei unter Verwendung des Shannon-Diversity-Index und des Pielou's-Evenness-Index gemessen) zwischen Magenbiopsien aus *H. pylori*-positiven Probanden und den entsprechenden Biopsien aus gesunden Kontrollen<sup>78</sup>. Zudem berichteten die Autoren über einen Einfluss von *H. pylori* auf die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaften in

Speichel und im Duodenum. In vorliegender Studie konnte bestätigt werden, dass die mikrobiellen Gemeinschaften der Magenschleimhautproben von *H. pylori*-positiven Probanden durch die Dominanz von *H. pylori* gekennzeichnet sind und im Vergleich zu nicht infizierten Personen eine geringere Diversität aufweisen. Ob *H. pylori* einen Einfluss auf die aktiven bakteriellen Gemeinschaften im unteren GI-Trakt und im Stuhl hat, wurde bisher noch nicht untersucht. Anhand der Ergebnisse vorliegender Studie waren die mikrobiellen Gemeinschaften in Schleimhautproben aus Duodenum, terminalem Ileum, Kolon und in Stuhlproben zwischen infizierten und nicht infizierten Probanden ähnlich. Dies lässt darauf schließen, dass *H. pylori* möglicherweise keine signifikante „Leitungsfunktion“ auf die Zusammensetzung des unteren Darmmikrobioms hat. Es ist wichtig anzumerken, dass durch eine RNA-basierte Sequenzierung die metabolisch aktiven Mitglieder der Darmmikrobiota selektiv identifiziert wurden, einschließlich transkriptionell aktive *H. pylori*. Die Abwesenheit von 16S rRNA von *H. pylori* im unteren GI-Trakt und in den Faeces zeigt, dass *H. pylori* kein Mitglied der aktiven Mikrobiota im unteren GI-Trakt ist. Dies widerspricht allerdings nicht der Tatsache, dass *H. pylori*-DNA und Antigene routinemäßig in den Stuhlproben von infizierten Menschen nachgewiesen werden können<sup>115</sup>.

#### **4.6 Stärke, Grenzen und Schlussfolgerungen der Arbeit**

Abgesehen von der Studie von Stearn *et al.* stellt die vorliegende Arbeit die erste ausführliche Charakterisierung des gastrointestinalen Mikrobioms entlang des gesamten GI-Trakts dar. Eine große Stärke dieser Studie besteht in dem strukturierten und systematischen Ansatz, durch den die bakteriellen Gemeinschaften auch auf den tieferen taxonomischen Ebenen identifiziert werden konnten.

Ein kritischer Punkt bei jeder Mikrobiomanalyse in Schleimhautproben liegt in dem Risiko einer Kreuzkontamination der entnommenen Biopsien. Obwohl in unseren Protokollen mehrere Maßnahmen ergriffen wurden, um mögliche Kontaminationen zu vermeiden, kann ein gewisser Grad der Kontamination (weder in unserer noch in anderen Studien) nicht ausgeschlossen werden, da das Endoskop selbst durch Positionsänderungen die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaften zwischen den benachbarten anatomischen Stellen beeinträchtigen kann. Selbstverständlich liegt es in der Natur eines offenen Systems, wie es im GI-Trakt der Fall ist, dass benachbarte ökologische Nischen wahrscheinlich überlappende mikrobielle Gemeinschaften beherbergen. Zugunsten der

hohen Qualität der vorliegenden Studie spricht die Tatsache, dass in unseren Ergebnissen keine relevante Kontamination aufgefallen ist. Beweisend ist zum Beispiel, dass die mit der Magenschleimhaut assoziierten Bakteriengemeinschaften in der Gruppe der *H. pylori*-positiven Probanden sich signifikant von den Gemeinschaften im Zwölffingerdarm unterscheiden.

Eine weitere Stärke dieser Arbeit besteht darin, dass, im Gegensatz zu den meisten bisher durchgeführten Mikrobiomanalysen, die auf DNA-Extraktion und Amplifikation vom ribosomalen 16S-RNA-Gen basierten, in unserer Methodik des ribosomale 16S-RNA als Vorlage zur Charakterisierung der bakteriellen Diversität verwendet wurde. Obwohl das DNA eine höhere Stabilität als RNA bietet, ist eine wichtige Einschränkung der DNA-basierten Methoden die Unfähigkeit der Untersuchung, zwischen DNA aus lebenden Bakterien und DNA aus inaktivierten oder toten Organismen zu unterscheiden<sup>116</sup>. Durch Sequenzierung von Amplicons, die aus der reversen Transkription von 16S-rRNA nach RNA-Extraktion stammen, war es möglich, in vorliegender Analyse nur die transkriptionell aktiven Mitglieder der Darmmikrobiota zu selektionieren und identifizieren.

Die Zusammensetzung der Darmflora wurde in dieser Studie zu einem bestimmten Zeitpunkt des Verdauungsprozesses charakterisiert, da alle Probanden zum Zeitpunkt der Probenentnahme nüchtern waren. Dies stellt einen potenziellen Schwachpunkt unserer Arbeit dar. Derzeit bleibt unbekannt, wie sich die mikrobiellen Gemeinschaften im Zusammenhang mit den verschiedenen Verdauungsphasen, die durch tiefgreifende Veränderungen der gastrointestinalen Motilität und der Sekretionen nach der Aufnahme von Nährstoffen gekennzeichnet sind, verändern<sup>117</sup>.

Es ist auch wichtig zu beachten, dass der Einfluss anderer Faktoren, wie zum Beispiel Lebensstil, Alter, Ernährung, Rauchen oder Alkoholkonsum auf die Zusammensetzung der Mikrobiota aufgrund der begrenzten Anzahl von Probanden nicht beurteilt werden konnte. Dies war jedoch nicht der primäre Endpunkt unserer Studie, da das primäre Ziel darin bestand, die Entwicklung der Bakteriengemeinschaften in verschiedenen Regionen des gastrointestinalen Trakts desselben Probanden zu untersuchen. Dennoch zeigten die anamnestischen Daten (zum Beispiel Ernährungsgewohnheiten, Frailty-Index) keine schwerwiegenden Abweichungen der Studienkohorte von der Normalbevölkerung, sodass kein relevanter Einfluss der obengenannten Faktoren auf die charakterisierten Hauptstrukturen des gastrointestinalen Mikrobioms angenommen wird.

Zusammenfassend bietet die vorliegende Studie neue Einblicke in die Biogeographie aktiver Bakteriengemeinschaften entlang des GI-Trakts von gesunden Menschen und stellt einen wichtigen Rahmen für zukünftige Studien dar, die sich mit der funktionellen Rolle von Darmmikrobiota in Gesundheit und Krankheit beschäftigen. Basierend auf unseren Ergebnissen besiedeln unterschiedliche mikrobielle Gemeinschaften vier verschiedene gastrointestinale Regionen. Gewisse aktive Phylotypen können nur in bestimmte Nischen gefunden werden. Die Daten, die aus Mikrobiomanalysen auf Gattungs- und Phylotypebene in Stuhlproben stammen, sollten mit Vorsicht interpretiert werden, da sie die globale mikrobielle Struktur im gesamten GI-Trakt nicht komplett widerspiegeln und möglicherweise keine Zuordnung einer spezifischen Rolle der fäkalen Mikrobiomstruktur zu Krankheiten des gesamten GI-Trakts zulassen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Zusammensetzung des gastrointestinalen Mikrobioms variiert im menschlichen GI-Trakt abhängig von luminalen und mukosalen Faktoren und wird von Genetik, Umwelt, Ernährungsgewohnheiten und Lebensstil beeinflusst. Das Ziel vorliegender Studie war es, aktive Bakteriengemeinschaften an acht verschiedenen Stellen entlang des GI-Trakts von gesunden Probanden zu charakterisieren und eine systematische Methode zur Analyse dieser Bakteriengemeinschaften unter Verwendung von Hochdurchsatz-Sequenzierungstechniken zu entwickeln.

Speichel-, Schleimhaut- und Stuhlproben von 21 gesunden Erwachsenen (10 männlich, 11 weiblich, Durchschnittsalter  $59 \pm 12,3$  Jahre) wurden von Dezember 2015 bis September 2016 in der Universitätsklinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie Magdeburg entnommen. Die Biopsien wurden während Routine-Endoskopien des oberen und unteren GI-Trakts aus Magen (Antrum und Corpus), Duodenum, terminalem Ileum, Colon ascendens und Colon descendens gesammelt. Die RNA wurde aus allen Proben extrahiert, in cDNA umgeschrieben und die V1-V2-Regionen von 16S-rRNA-Genen wurden amplifiziert und auf einer Illumina MiSeq-Plattform sequenziert. Abundanzen der Taxa auf allen taxonomischen Ebenen wurden verwendet, um Ähnlichkeitsmatrizen von Proben unter Verwendung des Bray-Curtis-Algorithmus zu konstruieren. Signifikante Unterschiede zwischen a priori definierten Gruppen wurden mittels Ähnlichkeitsanalyse (ANOSIM), Varianzanalyse für multivariate Daten (PERMANOVA) und Mann-Whitney-Test bewertet.

Nach taxonomischer Annotation wurden 4045 Phylotypen aus 169 verschiedenen Gattungen und 14 Phyla identifiziert. Jeder Proband beherbergte sein eigenes unterschiedliches Mikrobiom. In Speichel, oberem GI-Trakt, unterem GI-Trakt und Faeces wurden vier klar unterscheidbare mikrobielle Konsortien identifiziert. Die vorherrschenden Gattungen im oberen GI-Trakt (*Gemella*, *Veillonella*, *Neisseria*, *Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Pseudomonas* und *Actinomyces*) waren im unteren GI-Trakt fast nicht vorhanden. Die mikrobiellen Gemeinschaften im unteren GI-Trakt bestanden hauptsächlich aus *Faecalibacterium*, *Ruminococcus* und *Bacteroides*. Bakteriengemeinschaften im oberen GI-Trakt waren durch einen höheren Reichtum und eine höhere Heterogenität (gemessen unter Verwendung des Shannon-Index) im Vergleich zu den Bakteriengemeinschaften im unteren GI-Trakt gekennzeichnet. Seltene Phylotypen



wurden im unteren GI-Trakt und in Stuhlproben häufiger nachgewiesen als im Speichel und im oberen GI-Trakt. Transkriptionell aktives *H. pylori* wurde nur im oberen GI-Trakt detektiert.

Diese umfassende hochauflösende Studie zum Mikrobiom liefert wichtige Einblicke in die intra- und interindividuelle Variabilität der Bakteriengemeinschaften im menschlichen Verdauungstrakt. Unsere Ergebnisse zeigen eine starke Abhängigkeit der Bakterienvielfalt vom Wirt und eine ortsspezifische Unterscheidung der mikrobiellen Gemeinschaften entlang des GI-Trakts. Zusätzlich wird durch diese Arbeit ein Vorschlag für eine detaillierte systematische Methodik zur Analyse des Mikrobioms gegeben.

## 6. ANHANG

### 6.1 Sonstiges

**Tabelle 1. Klinische und demographische Eigenschaften der eingeschlossenen Probanden.** Alkoholkonsum: selten (1-5 Alkoholeinheiten/Monat), gelegentlich (1-5 Alkoholeinheiten/Woche), regelmäßig (1-2 Alkoholeinheiten/Tag), übermäßig (> 2 Alkoholeinheiten/Tag). \*: berichtete über eine gelegentliche PPI-Einnahme; BMI: body mass index; #: Proband mit schwerer Adipositas, allerdings ohne weitere Indizes von metabolischer Erkrankung.

Proband N.	Geschlecht	Alter	Ethnie	Raucherstatus	Alkoholkonsum	Säurehemmende Therapie	BMI	pH-Magen	H. pylori Status
P1	M	40	Kaukasisch	Nichtraucher	selten	keine	25	2	-
P2	F	42	Asiatisch	Nichtraucher	nie	keine	20,8	1	-
P3	M	44	Kaukasisch	Nichtraucher	regelmäßig	keine	31,2	2	-
P4	M	46	Kaukasisch	Raucher	regelmäßig	keine	26,6	1	-
P5	M	47	Kaukasisch	Raucher	gelegentlich	keine	23,6	1	-
P6	M	60	Kaukasisch	Nichtraucher	gelegentlich	keine	25,2	1	-
P7	M	75	Kaukasisch	Raucher	gelegentlich	keine	31,1	2	-
P8	F	52	Kaukasisch	Nichtraucher	nie	keine	53#	2	-
P9	F	60	Kaukasisch	Raucher	nie	keine	24,9	1	-
P10	F	62	Kaukasisch	Nichtraucher	gelegentlich	keine	25,2	1	-
P11	F	67	Kaukasisch	Nichtraucher	gelegentlich	keine *	28,3	1	-
P12	F	70	Kaukasisch	Nichtraucher	nie	keine	20,2	2	-
P13	F	75	Kaukasisch	Nichtraucher	gelegentlich	keine	34	1	-
P14	F	76	Kaukasisch	Nichtraucher	nie	keine *	23,3	2	-
P15	M	53	Kaukasisch	Nichtraucher	gelegentlich	keine *	29,8	1	+
P16	M	59	Kaukasisch	Raucher	gelegentlich	keine	28,1	1	+
P17	M	66	Kaukasisch	Raucher	gelegentlich	keine	28,7	1	+
P18	M	83	Kaukasisch	Nichtraucher	gelegentlich	keine	23,1	1	+
P19	F	52	Kaukasisch	Raucher	regelmäßig	keine	20,3	1	+
P20	F	55	Kaukasisch	Raucher	gelegentlich	keine	21,3	1	+
P21	F	56	Kaukasisch	Nichtraucher	nie	keine	22,9	1	+

**Tabelle 2. Ernährungsgewohnheiten der eingeschlossenen Patienten.** Durchschnittswerte, Medianwerte und Standardabweichung der täglichen Einnahme von 61 ausgewählten Lebensmitteln - so geschätzt mittels des standardisierten, selbst-ausgefüllten, semi-quantitativen Ernährungsfragebogens, der zuvor für den deutschen Teil der EPIC-Studie validiert wurde<sup>86-88</sup>. Die Fragebögen wurden den Patienten in deutscher Sprache vorgelegt. Die Auswertung erfolgte beim Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke (DIFE) und die Ergebnisse wurden in englischer Sprache übermittelt.

<b>Food groups</b>	<b>Mean</b>	<b>SD</b>	<b>Median</b>	<b>Range</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>
<b>Animal Food (g/day)</b>						
<b>Dairy products</b>						
Milk, milk beverages	112.7	101.1	100.4	143.8	12.9	404.0
Yoghurt	38.3	45.3	14.6	72.7	0.0	136.1
Fromage blanc, petits suisses	11.5	11.7	6.8	16.6	0.0	39.1
Cheese	31.9	33.9	24.3	24.0	2.3	168.4
Cream desserts, puddings	7.5	10.6	1.5	6.3	0.0	46.2
Dairy creams, milk for coffee and creamers	10.2	10.7	5.3	13.7	0.1	39.9
<b>Meat and meat products</b>						
Red meat	40.4	43.9	27.0	43.7	7.2	205.6
Poultry	13.9	17.1	8.6	16.7	0.0	74.5
Meat products, sausages	68.4	47.2	56.3	68.1	3.4	191.9
<b>Fish</b>	18.6	13.8	11.8	27.3	2.7	39.7
Crustaceans, molluscs	1.4	3.1	0.0	1.7	0.0	12.8
<b>Eggs</b>	13.9	6.5	13.9	9.2	1.1	25.7
<b>Fat (g/day)</b>						
<b>Total fat</b>	33.9	18.8	29.7	21.0	3.9	87.9
Vegetable oil	12.2	15.2	7.5	11.6	1.1	69.6
Butter	11.0	9.7	8.6	17.2	0.7	34.2
Margarines	10.0	12.9	3.1	12.0	0.1	50.6
Deep frying fats	0.2	0.2	0.2	0.2	0.0	0.6
Other animal fat	0.3	0.8	0.0	0.3	0.0	3.5
<b>Plant food groups (g/day)</b>						
<b>Potatoes</b>	72.2	40.7	75.5	59.8	5.4	146.9
<b>Vegetables</b>						
Total consumption	146.8	96.8	120.3	83.0	48.7	475.2
Leafy vegetables	10.0	16.1	5.3	8.7	0.9	77.4
Fruiting vegetables	74.9	40.7	75.5	59.8	5.4	146.9
Root vegetables	13.9	7.0	11.8	9.2	6.7	28.8
Cabbages	19.6	16.3	12.5	13.0	5.7	77.0
Mushrooms	1.3	1.2	0.9	1.0	0.0	5.0
Grain and pod vegetables	3.7	2.4	2.8	3.7	0.4	8.6
Onion, garlic	6.3	2.1	6.2	2.2	3.1	12.5
Stalk vegetables, sprouts	5.9	5.1	4.5	3.9	1.7	24.8

Mixed salad, mixed vegetables	12.3	11.5	9.4	12.0	1.5	45.5
Legumes	5.8	4.0	5.1	6.0	0.0	14.8
<b>Fruit</b>						
Fresh fruit	176.2	119.6	137.6	143.6	26.5	445.5
Canned fruit	4.1	4.0	2.7	2.4	1.1	19.1
Nuts and seeds	1.9	2.8	1.6	1.8	0.0	12.6
Olives	0.2	0.3	0.0	0.5	0.0	0.7
<b>Cereals and cereal products</b>						
Bread	142.3	66.6	121.4	126.3	36.1	236.2
Crispbread, rusks	2.6	0.2	2.4	0.5	2.4	2.8
Breakfast cereals	2.1	4.9	0.0	1.7	0.0	20.2
Flour, flakes, starches, semolina	0.8	1.9	0.0	0.6	0.0	7.9
Dough and pastry	4.8	4.7	1.9	6.4	0.4	19.6
Salty biscuits, aperitif biscuits	2.0	2.9	0.7	3.0	0.0	9.4
Pasta, rice, other grain	44.9	38.0	26.3	40.2	17.8	130.4
<b>Others (g/day)</b>						
Sugar, honey, jam	16.7	12.1	16.8	22.5	1.5	38.1
Cakes	78.2	60.4	48.8	98.7	23.7	211.1
Chocolate, candy bars	8.0	7.8	5.7	5.0	1.3	37.2
Confectionery non chocolate	3.6	4.5	2.2	5.4	0.0	18.2
Syrup	0.1	0.1	0.1	0.2	0.0	0.3
Ice cream	7.1	9.9	1.4	5.9	0.0	43.3
Soups	53.7	42.6	45.2	51.0	2.0	152.4
Sauces	107.2	47.8	100.1	75.8	15.0	183.3
Artificial sweeteners	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0	1.1
Soya products	1.2	0.9	1.0	0.2	0.8	4.8
Spices, herbs, condiments	3.4	6.1	1.9	1.7	0.5	29.0
Snacks	1.0	0.2	1.0	0.3	0.8	1.7
<b>Beverages (ml/day)</b>						
<b>Non-alcoholic beverages</b>						
Fruit and vegetable juice	56.7	64.1	45.7	72.6	1.0	268.9
Soft drinks	71.6	244.8	0.0	4.9	0.0	1100.0
Coffee	343.1	204.7	413.3	305.4	0.0	792.3
Tea	61.2	125.9	2.5	42.6	0.0	525.0
Herbal teas	143.9	222.3	42.7	225.0	0.0	825.0
Water	1200.0	622.1	1100.0	1000.0	300.0	2200.0
<b>Alcoholic beverages</b>						
Beer, cider	266.6	443.6	73.1	365.7	1.6	1501.9
Wine	69.2	111.0	15.1	73.5	1.0	437.0
Liquors	1.7	4.3	0.0	2.6	0.0	19.7
Spirits, brandy	1.0	1.7	0.0	1.5	0.0	6.0
Cocktails, punches	6.1	11.8	0.0	11.5	0.0	49.3
Total alcohol-intake	344.7	455.4	206.3	409.9	2.5	1681.3

**Tabelle 3. Geriatrisches Assessment der eingeschlossenen Probanden.** Die klinische Fitness wurde anhand des zuvor validierten Multidimensional Prognostic Index (MPI)<sup>89</sup> gewertet. Der MPI wurde unter Verwendung folgender items berechnet: ADL (Activities of Daily Living), IADL (Instrumental ADL), SPMSQ (Short Portable Mental Status Questionnaire), ESS (Exton Smith Scale), MNA (Mini Nutritional Assessment), CIRS\_IS (Cumulative Illness Rating Scale-Severity Index), CIRS\_CI (CIRS-Comorbidity Index). Es besteht ein geringes Risiko von Gebrechlichkeit wenn MPI 0-0.33, ein mäßiges Risiko wenn MPI 0.34-0.66 ein schweres Risiko wenn MPI >0.67.

<b>Geriatrisches Assessment</b>						
	N	Mittelwert	SD	Median	Min	Max
Anzahl der eingenommenen Medikamenten	21	2,1	2,1	2,0	0,0	7,0
ADL	21	6,0	0,2	6,0	5,0	6,0
IADL	21	8,0	0,0	8,0	8,0	8,0
SPMSQ	21	0,4	0,7	0,0	0,0	2,0
ESS	21	19,9	0,5	20,0	18,0	20,0
MNA	21	24,7	2,2	25,5	19,5	28,0
CIRS_IS	21	1,2	0,2	1,2	1,0	1,5
CIRS_CI	21	0,2	0,5	0,0	0,0	2,0
<b>MPI</b>	21	0,1	0,1	0,1	0,0	0,2

**Tabelle 4. *H. pylori*-Status der eingeschlossenen Probanden.** Das Vorliegen einer Infektion mit *H. pylori* wurde durch folgende Diagnosetechniken nachgewiesen: histologische Auswertung von Biopsien aus Antrum (A) und Korpus (C), Rapid Urease Test (RUT), Kultivierung, Serologie und Stuhlantigentest (SAT). Konkordante negative Ergebnisse in allen Tests mit Ausnahme der *H. pylori*-Serologie waren erforderlich, um die *H. pylori*-Infektion bei gesunden Patienten definitiv auszuschließen.

Proband N.	<i>H. pylori</i> -Status	Giemsa/ Warthin Starry Färbung	RUT	<i>H. pylori</i> Kultivierung	<i>H. pylori</i> Serologie	Anti- <i>H. pylori</i> IgG Antikörper (EIU)	<i>H. pylori</i> SAT	<i>H. pylori</i> SAT optische Dichte
P1	-	-	-	-	-	17	-	0,163
P2	-	-	-	-	+	65,4	-	0,065
P3	-	-	-	-	-	5,3	-	0,074
P4	-	-	-	-	-	13,8	-	0,066
P5	-	-	-	-	-	27,2	-	0,118
P6	-	-	-	-	-	19,7	-	0,066
P7	-	-	-	-	+	33,6	-	0,076
P8	-	-	-	-	-	5,3	-	0,068
P9	-	-	-	-	-	6,6	-	0,077
P10	-	-	-	-	-	28,7	-	0,085
P11	-	-	-	-	-	19,8	-	0,062
P12	-	-	-	-	-	19,4	-	0,077
P13	-	-	-	-	-	10,2	-	0,126
P14	-	-	-	-	-	20,9	+	0,405
P15	+	+	+	-	+	86,3	+	3,492
P16	+	+	+	+(C)	+	115,3	-	0,184
P17	+	+	+	+(A&C)	+	68,8	+	0,26
P18	+	+	+	+(A&C)	+	117,9	+	0,619
P19	+	+	+	+(A&C)	+	97,2	+	0,214
P20	+	+	+	+(A&C)	+	106,7	+	0,821
P21	+	+	+	+(A&C)	+	83,29	+	2,733

**Tabelle 5. Histopathologische Charakterisierung der Biopsien vom oberen GI-Trakt. IM: Intestinale Metaplasie; PMN: Polimorphonukleozyten; LYM: Lymphozyten; PC: Plasmazellen.**

Proband N.	Geschlecht	Alter	Histopathologische Diagnose im oberen GI Trakt	Atrophie Antrum	Atrophie Corpus	IM Antrum	IM Corpus	<i>H. pylori</i> Antrum	<i>H. pylori</i> Corpus	PMN Antrum	PMN Corpus	LYM/PC Antrum	LYM/PC Corpus	Art des Infiltrats im Duodenum
P1	M	40	geringgradige chronische Gastritis	0	0	0	0	0	0	0	0	gering	gering	normal (geringes Infiltrat von LYM/PC in der Lamina propria)
P2	F	42	geringgradige chronische Gastritis	0	0	0	0	0	0	0	0	gering	gering	normal (geringes Infiltrat von LYM/PC in der Lamina propria)
P3	M	44	geringgradige chronische Gastritis, geringgradige chronische, uncharakteristische Duodenitis	0	0	0	0	0	0	0	0	gering	gering	Infiltrat von LYM/PC, wenige PMN
P4	M	46	geringgradige chronische Gastritis, geringgradige chronische, uncharakteristische Duodenitis	0	0	0	0	0	0	0	0	gering	gering	Infiltrat von LYM/PC, wenige PMN
P5	M	47	geringgradige chronische Gastritis, geringgradige chronische, uncharakteristische Duodenitis	0	0	0	0	0	0	0	0	gering	gering	Infiltrat von LYM/PC, wenige PMN
P6	M	60	geringgradige chronische Gastritis	0	0	0	0	0	0	0	0	gering	gering	normal (geringes Infiltrat von LYM/PC in der Lamina propria)
P7	M	75	geringgradige chronische Gastritis	0	0	0	0	0	0	0	0	gering	gering	normal (geringes Infiltrat von LYM/PC in der Lamina propria)
P8	F	52	geringgradige chronische Gastritis	0	0	0	0	0	0	0	0	gering	gering	normal (geringes Infiltrat von LYM/PC in der Lamina propria)
P9	F	60	Entzündungsfreie Magen- und Duodenumschleimhaut	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	normal
P10	F	62	geringgradige chronische Gastritis	0	0	0	0	0	0	0	0	gering	gering	normal (geringes Infiltrat von LYM/PC in der Lamina propria)
P11	F	67	geringgradige chronische Gastritis, geringgradige chronische, uncharakteristische Duodenitis	0	0	0	0	0	0	0	0	gering	gering	Infiltrat von LYM/PC, wenige PMN
P12	F	70	geringgradige chronische Gastritis, geringgradige chronische, uncharakteristische Duodenitis	0	0	0	0	0	0	0	0	gering	gering	Infiltrat von LYM/PC, wenige PMN
P13	F	75	geringgradige chronische Gastritis	0	0	0	0	0	0	0	0	gering	gering	normal (geringes Infiltrat von LYM/PC in der Lamina propria)
P14	F	76	geringgradige chronische Gastritis, geringgradige chronische, uncharakteristische Duodenitis	0	0	0	0	0	0	0	0	gering	gering	Infiltrat von LYM/PC, wenige PMN
P15	M	53	mäßiggradige-geringgradige <i>H. pylori</i> -assoziierte Gastritis, geringgradige chronische, uncharakteristische Duodenitis	0	mäßig	0	0	0	0	gering	gering	gering	mäßig	geringes Infiltrat von LYM/PC
P16	M	59	mäßiggradige <i>H. pylori</i> -assoziierte Gastritis	0	0	0	0	mäßig	gering	mäßig	mäßig	mäßig	mäßig	normal (geringes Infiltrat von LYM/PC in der Lamina propria)
P17	M	66	mäßiggradige-geringgradige <i>H. pylori</i> -assoziierte Gastritis	gering	0	0	0	mäßig	gering	mäßig	0	mäßig	gering	normal (geringes Infiltrat von LYM/PC in der Lamina propria)
P18	M	83	mäßiggradige-geringgradige <i>H. pylori</i> -assoziierte Gastritis, geringgradige chronische, uncharakteristische Duodenitis	0	0	0	0	mäßig	gering	mäßig	gering	mäßig	gering	geringes Infiltrat von LYM/PC, wenige PMN
P19	F	52	mäßiggradige-geringgradige <i>H. pylori</i> -assoziierte Gastritis, geringgradige chronische, uncharakteristische Duodenitis	0	0	0	0	mäßig	gering	mäßig	gering	mäßig	gering	geringes Infiltrat von LYM/PC
P20	F	55	mäßiggradige-schwergradige <i>H. pylori</i> -assoziierte Gastritis, geringgradige chronische, uncharakteristische Duodenitis	0	0	0	0	mäßig	gering	mäßig	gering	schwer	gering	geringes Infiltrat von LYM/PC, wenige PMN
P21	F	56	mäßiggradige-geringgradige <i>H. pylori</i> -assoziierte Gastritis, geringgradige chronische, uncharakteristische Duodenitis	0	0	0	0	gering	gering	gering	gering	mäßig	gering	geringes Infiltrat von LYM/PC, wenige PMN

**Tabelle 6. Histopathologische Charakterisierung der Biopsien vom unteren GI-Trakt.** MALT: mucosa-associated lymphoid tissue, PMN: Polymorphonukleozyten; LYM: Lymphozyten; PC: Plasmazellen; LF: Lymphfollikel; n/a: nicht applizierbar.

Proband N.	Geschlecht	Alter	Histopathologische Diagnose im unteren GI Trakt	Art des Infiltrats im terminalen Ileum	Art des Infiltrats im Colon ascendens	Art des Infiltrats im Colon descendens
P1	M	40	normal	normal (sporadische subepitheliale LYM und PC )	normal (geringe subepitheliale LYM und PC )	normal (sporadische subepitheliale LYM und PC, hyperplastische LF )
P2	F	42	leichte lymphoretikuläre Hyperplasie im terminalen Ileum, Colon normal	leichte lymphoretikuläre Hyperplasie	normal (geringe subepitheliale LYM und PC )	normal (geringe subepitheliale LYM und PC )
P3	M	44	normal	normal	normal	normal
P4	M	46	normal	normal	normal (geringe subepitheliale LYM und PC )	normal (geringe subepitheliale LYM und PC )
P5	M	47	normal	normal (geringe subepitheliale LYM)	normal	normal
P6	M	60	leichte chronische unspezifische Colitis	normal	geringes subepitheliales Infiltrat von LYM und PC	geringes subepitheliales Infiltrat von LYM und PC
P7	M	75	normal	normal (geringe subepitheliale LYM)	normal (hyperplastische LF)	normal
P8	F	52	normal	normal	normal	normal
P9	F	60	normal	normal	normal	normal
P10	F	62	normal	normal (sporadische subepitheliale LYM und PC )	normal (geringe subepitheliale LYM)	normal (geringe subepitheliale LYM und PC )
P11	F	67	normal	MALT Hyperplasie	normal	normal
P12	F	70	normal	normal (subepitheliale LYM, LF)	normal (geringe subepitheliale LYM und PC, LF )	normal (geringe subepitheliale LYM und PC, LF )
P13	F	75	leichte chronische unspezifische Ileitis terminalis	geringes Infiltrat von LYM/PC und eosinophilen PMN	normal	normal
P14	F	76	normal	normal	normal	normal
P15	M	53	normal	normal	normal (geringe subepitheliale LYM und PC )	geringes subepitheliales Infiltrat von LYM und PC
P16	M	59	normal	normal (geringe subepitheliale LYM und PC )	normal (geringe subepitheliale LYM und PC, einzelne PMN, LF)	normal (geringe subepitheliale LYM und PC, einzelne PMN, LF)
P17	M	66	normal	n/a	normal (geringe subepitheliale LYM)	normal (subepitheliale hyperplastische LF)
P18	M	83	normal	normal (subepitheliale hyperplastische LF)	normal	normal
P19	F	52	normal	normal (geringe subepitheliale LYM und PC )	normal (geringe subepitheliale LYM und PC )	normal (geringe subepitheliale LYM und PC )
P20	F	55	leichte chronische unspezifische Colitis	normal (geringe subepitheliale LYM und PC )	normal (geringe subepitheliale LYM und PC )	normal (geringe subepitheliale LYM und PC )
P21	F	56	normal	normal	normal	normal



**Tabelle I<sup>§</sup>.** Ausführliche Darstellung der mit dem phyloseq package identifizierten Phylotypen, der berücksichtigten Sequenzen und der taxonomischen Zuordnung. Nach dem Sequenzieren und Rarefying der Bibliotheksgrößen auf die minimale Sequenzierungstiefe wurden 10 435 Sequenzen aus jeder Probe berücksichtigt und taxonomisch zu 4045 verschiedenen Phylotypen, die zu 14 verschiedenen Phyla und 169 Genera gehören, annotiert.

**Tabelle II-VI<sup>§</sup>.** Relative Abundanzen (in Prozent) der aktiven Bakterien in jeder Probe auf verschiedenen taxonomischen Niveaus: Phylumebene (**Tab. II<sup>§</sup>**), Klassenebene (**Tab. III<sup>§</sup>**), Familienebene (**Tab. IV<sup>§</sup>**), Genusebene (**Tab. V<sup>§</sup>**) und Phylotypebene (**Tab. VI<sup>§</sup>**). Speichel, S; Magenkörper, C; Magenantrum, A; Duodenum, D; terminales Ileum, TI; Colon ascendens, CA; Colon descendens, CD; Faeces, F; gesunde Probanden (X, P1-14), Probanden mit *H. pylori*-Infektion (H, P15-P21).

**Tabelle VII<sup>§</sup>.** **Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA) – Gesunde Probanden.** Vergleiche zwischen den globalen mikrobiellen Gemeinschaften auf Phylotypebene in den 8 verschiedenen Regionen des GI-Trakts von 14 gesunden Probanden (X, P1-14). Die Analyse wurde unter Verwendung eines Einwegdesigns (Einzelfaktor: Probeentnahmestelle) durchgeführt. Speichel, S; Magenkörper, C; Magenantrum, A; Duodenum, D; terminales Ileum, TI; Colon ascendens, CA; Colon descendens, CD; Faeces, F. Darstellung der Ergebnisse der Haupttest und der paarweisen Tests inklusiv der Monte Carlo p-Werte. Gruppen wurden bei einem p-Wert <0,05 als statistisch signifikant unterschiedlich betrachtet.

**Tabelle VIII<sup>§</sup>.** **Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA) – Alle Probanden.** Vergleiche zwischen den globalen mikrobiellen Gemeinschaften auf Phylotypebene in den 8 verschiedenen Regionen des GI-Trakts von 14 gesunden Probanden (X) und 7 Probanden mit *H. pylori*-Infektion (H) und zwischen *H. pylori*-infizierten und nicht infizierten Probanden. Die Analyse wurde unter Verwendung eines two-way-crossed design (Faktoren: Probeentnahmestelle und *H. pylori*-Infektion) durchgeführt. Speichel, S; Magenkörper, C; Magenantrum, A; Duodenum, D; terminales Ileum, TI; Colon ascendens, CA; Colon descendens, CD; Faeces, F. Darstellung der Ergebnisse der Haupttest und der paarweisen Tests inklusiv der Monte Carlo p-Werte. Gruppen wurden bei einem p-Wert <0,05 als statistisch signifikant unterschiedlich betrachtet.

**§: Aufgrund des großen Datenvolumens werden die Tabelle I, II, III, IV, V, VI, VII und VIII ausschließlich in digitaler Form (Excel-Datei) zur Verfügung gestellt. Die Tabellen können unter folgenden Links heruntergeladen werden:**

- <https://drive.google.com/open?id=1eQI0eHx58H-VzBMnU2D6RRaWEpT7Wibr>
- [https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(19\)40986-4/addons](https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(19)40986-4/addons) (Table S4-S9, File S10)

**Anlage A: Ethikvotum der EMGASTA-Studie (1/2)****UNIVERSITÄTSKLINIKUM  
MAGDEBURG A.Ö.R.****OTTO VON GUERICKE  
UNIVERSITÄT  
MAGDEBURG****MEDIZINISCHE  
FAKULTÄT**Ethik-Kommission der  
Otto-von-Guericke-  
Universität an der  
Medizinischen Fakultät und  
am Universitätsklinikum  
Magdeburg A.Ö.R.

Ethik-Kommission, Medizinische Fakultät / Universitätsklinikum, Leipziger Str. 44 Haus 28, 39120 Magdeburg

Frau OÄ Dr. med. K. Schütte  
Universitätsklinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie  
Universitätsklinikum Magdeburg A.Ö.R.  
Leipziger Str. 44  
39120 MagdeburgUniv.-Prof. Dr. med. Christof Huth  
VorsitzenderDr. med. Norbert Beck  
GeschäftsführerTelefon: +49 391 67-14314  
Telefax: +49 391 67-14354  
elektr.Fax: +49 391 67-290185  
eMail: ethikkommission@ovgu.de**Datum**  
13.04.2015Unser Zeichen: **47/15****Bedeutung der Ernährung, des gastrointestinalen Mikrobioms und eines gesunden  
Gastrointestinaltraktes für die Autonomie des alternden Menschen**Sehr geehrte Frau OÄ Schütte,  
sehr geehrte Kolleginnen und Kollegen,die Ethik-Kommission der Otto-von-Guericke-Universität an der Medizinischen Fakultät und am  
Universitätsklinikum Magdeburg hat die übergebenen Unterlagen zur o. g. Studie überprüft, in der  
letzten Kommissionssitzung eingehend erörtert und ist zu der Auffassung gekommen, dass gegen die  
Durchführung keine ethischen Bedenken bestehen.  
Diese **zustimmende Bewertung** ergeht unter dem Vorbehalt gleichbleibender Gegebenheiten.Die Verantwortlichkeit des jeweiligen Prüfungswissenschaftlers / behandelnden Prüfarztes bleibt in vollem  
Umfang erhalten und wird durch diese Entscheidung nicht berührt. Alle zivil- oder haftungsrechtlichen  
Folgen, die sich ergeben könnten, verbleiben uneingeschränkt beim Projektleiter und seinen  
Mitarbeitern.Beim Monitoring sind die Bestimmungen des Bundes- und Landesdatenschutzgesetzes sowie die sich  
aus der ärztlichen Schweigepflicht ergebenden Einschränkungen zu beachten, was eine  
Aushändigung kompletter Patientenakten zum Monitoring ausschließt.  
Ein Monitoring personen- und studienbezogener Daten wird dadurch nicht beeinträchtigt.Um die Übersendung von studienbezogenen Jahresberichten / Abschlussberichten / Publikationen  
wird unter Nennung unserer Registrationsnummer gebeten.

Mit freundlichen Grüßen

  
(i. A. Dr. med. Norbert Beck, Geschäftsführer)  
Prof. Dr. med. C. Huth  
Vorsitzender der Ethik-Kommission**Ethik-Kommission**  
der Otto-von-Guericke-Universität an der Medizinischen Fakultät  
und am Universitätsklinikum Magdeburg A.Ö.R.  
Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. med. C. Huth


**Anlage A: Ethikvotum der EMGASTA-Studie (2/2)****Anlage zum Votum der Studie 47/15 vom 13.04.2015**

Zum Zeitpunkt der Bewertung der vorstehenden Studie waren folgende Damen und Herren Mitglied der Ethik-Kommission der Otto-von-Guericke-Universität an der Medizinischen Fakultät und am Universitätsklinikum Magdeburg:

Herr Prof. Dr. med. Norbert Bannert	Medizinische Fakultät / Universitätsklinikum, Pädiater
Frau Prof. Dr. phil. Eva Brinkschulte	Medizinische Fakultät / Universitätsklinikum, Bereich Geschichte, Ethik und Theorie der Medizin
Herr Prof. Dr.-Ing. Rolf Findeisen	Fakultät für Elektrotechnik und Informations- technik, Institut für Automatisierungstechnik
Herr Prof. Dr. med. Christof Huth	Medizinische Fakultät / Universitätsklinikum, Universitätsklinik für Herz- und Thoraxchirurgie
Frau Assessorin Ute Klanten	Medizinische Fakultät / Universitätsklinikum, Stabsstelle Recht
Herr OA Dr. med. Werner Kuchheuser	Medizinische Fakultät / Universitätsklinikum, Institut für Rechtsmedizin
Herr Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Läuter	Medizinische Fakultät / Universitätsklinikum, Mathematiker, Biometriker
Herr Prof. Dr. med. Frank Peter Meyer	Medizinische Fakultät / Universitätsklinikum, Klinischer Pharmakologe
Herr Prof. Dr. med. Jens Schreiber	Medizinische Fakultät / Universitätsklinikum, Universitätsklinik für Kardiologie, Angiologie und Pneumologie, Fachbereich Pneumologie
Herr Prof. Dr.-Ing. Klaus Tönnies	Fakultät für Informatik, Institut für Simulation und Graphik, AG Bildverarbeitung/Bildverstehen

Mitglieder der Ethik-Kommission, die in eine Studie eingebunden sind, haben für die Votierung der betreffenden Studie kein Stimmrecht.

Die Ethik-Kommission der Otto-von-Guericke-Universität an der Medizinischen Fakultät und am Universitätsklinikum Magdeburg ist unter Beachtung entsprechender internationaler Richtlinien (ICH, GCP) und nationaler Richtlinien (AMG, GCP-V, MPG, MPKPV) tätig, nach Landesrecht (Hochschulmedizingesetz des Landes Sachsen-Anhalt § 1 Abs. 4, Verordnung über Ethik-Kommissionen zur Bewertung klinischer Prüfungen von Arzneimitteln - Ethik-Kom-VO LSA - i. d. akt. Fassung) legitimiert. Weiterhin besteht eine Registrierung der Ethik-Kommission beim Bundesamt für Strahlenschutz nach § 28g Röntgenverordnung (EK-043/R) und § 92 Strahlenschutzverordnung (EK-046/S) sowie beim Office for Human Research Protections, reg. no. IRB00006099, Rockville, MD, U.S.A.

  
Dr. med. Norbert Beck  
Geschäftsführer der Ethik-Kommission

**Anlage B: Exemplar einer Einwilligungserklärung der EMGASTA-Studie**

OTTO VON GUERICKE  
UNIVERSITÄT  
MAGDEBURG



MEDIZINISCHE  
FAKULTÄT

Medizinische Fakultät, Leipziger Str. 44, 39120 Magdeburg

**Klinik für Gastroenterologie,  
Hepatology und Infektiologie**  
Prof. Dr. med. Peter Malfertheiner  
Direktor

Otto-von-Guericke-Universität  
Medizinische Fakultät  
Leipziger Str. 44  
39120 Magdeburg

Telefon: +49 391 67-13100  
Telefax: +49 391 67-13105

peter.malfertheiner@med.ovgu.de  
www.med.uni-magdeburg.de

## Einwilligungserklärung

Ihre Zeichen, Ihre Nachricht vom:

Unsere Zeichen:  
prof mal-

Durchwahl:  
13144

Datum:  
30.03.2015

### **Bedeutung der Ernährung, des gastrointestinalen Mikrobioms und eines gesunden Gastrointestinaltraktes für die Autonomie des alternden Menschen**

Patient (Etikett)

Name, Vorname \_\_\_\_\_

Geburtsdatum \_\_\_\_\_

Adresse \_\_\_\_\_

Ich erkläre mich mit der Durchführung zusätzlicher Untersuchungen (Fragebögen, Bestimmung des Ernährungszustandes, Untersuchung einer Stuhlprobe, Blutentnahme, Darmspiegelung, Magenspiegelung) einverstanden und bin mir darüber im Klaren, dass dieses Material nicht nur der klinischen Routinediagnostik, sondern auch wissenschaftlichen Zwecken dient (zum Beispiel Erbmaterialanalyse). Ich wurde in einem ausführlichen Gespräch über Wesen, Bedeutung und Tragweite der klinischen Studie, an der ich teilnehmen möchte, unterrichtet und mir wurde die Gelegenheit gegeben, meine Entscheidung zu überdenken. Meine Fragen zu diesen Untersuchungen wurden umfassend beantwortet und ich fühle mich ausreichend informiert.

Ich verzichte darauf, dass mir die im Rahmen der wissenschaftlichen Untersuchung möglicherweise an meiner DNA-Probe identifizierten, genetischen Risikofaktoren (dem Wissensstand zum Untersuchungszeitpunkt entsprechend) mitgeteilt werden. Dies betrifft genetische Risikofaktoren für das Magenkarzinom als auch andere genetische Risikofaktoren, die ursächlich für andere Erkrankungen sind und als Zufallsbefund bei den geplanten Analysen identifiziert werden könnten.

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift/Stempel des aufklärenden Arztes

\_\_\_\_\_  
Unterschrift des Patienten

\_\_\_\_\_  
Name des aufklärenden Prüfarztes (in Druckbuchstaben)

## 6.2 Literaturverzeichnis

1. Quigley EMM. Gut microbiome as a clinical tool in gastrointestinal disease management: are we there yet? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;14:315-320.
2. Luckey TD. Introduction to intestinal microecology. *Am J Clin Nutr* 1972;25:1292-4.
3. Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* 1977;31:107-33.
4. Sender R, Fuchs S, Milo R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell* 2016;164:337-40.
5. Hornef M. Pathogens, Commensal Symbionts, and Pathobionts: Discovery and Functional Effects on the Host. *Ilar j* 2015;56:159-62.
6. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012;486:207-14.
7. Collado MC, Rautava S, Aakko J, et al. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci Rep* 2016;6:23129.
8. Aagaard K, Ma J, Antony KM, et al. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* 2014;6:237ra65.
9. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:11971-5.
10. Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, et al. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut* 2014;63:559-66.
11. Backhed F, Roswall J, Peng Y, et al. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe* 2015;17:690-703.
12. Valles Y, Artacho A, Pascual-Garcia A, et al. Microbial succession in the gut: directional trends of taxonomic and functional change in a birth cohort of Spanish infants. *PLoS Genet* 2014;10:e1004406.
13. Yatsunencko T, Rey FE, Manary MJ, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 2012;486:222-7.
14. Hollister EB, Riehle K, Luna RA, et al. Structure and function of the healthy pre-adolescent pediatric gut microbiome. *Microbiome* 2015;3:36.
15. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, et al. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 2012;489:220-30.
16. Jalanka J, Salonen A, Salojarvi J, et al. Effects of bowel cleansing on the intestinal microbiota. *Gut* 2015;64:1562-8.
17. Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 2012;488:178-84.
18. Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc* 2003;62:67-72.
19. Bourriaud C, Robins RJ, Martin L, et al. Lactate is mainly fermented to butyrate by human intestinal microfloras but inter-individual variation is evident. *J Appl Microbiol* 2005;99:201-12.

20. Yunes RA, Poluektova EU, Dyachkova MS, et al. GABA production and structure of gadB/gadC genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from human microbiota. *Anaerobe* 2016;42:197-204.
21. Carabotti M, Scirocco A, Maselli MA, et al. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann Gastroenterol* 2015;28:203-209.
22. Bäckhed F, Ding H, Wang T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:15718-15723.
23. Hooper LV, Wong MH, Thelin A, et al. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 2001;291:881-4.
24. LeBlanc JG, Milani C, de Giori GS, et al. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Curr Opin Biotechnol* 2013;24:160-8.
25. Sayin SI, Wahlstrom A, Felin J, et al. Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metab* 2013;17:225-35.
26. Marin L, Miguelez EM, Villar CJ, et al. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *Biomed Res Int* 2015;2015:905215.
27. Skrypnik K, Suliburska J. Association between the gut microbiota and mineral metabolism. *J Sci Food Agric* 2018;98:2449-2460.
28. Spanogiannopoulos P, Bess EN, Carmody RN, et al. The microbial pharmacists within us: a metagenomic view of xenobiotic metabolism. *Nat Rev Microbiol* 2016;14:273-87.
29. Kamada N, Chen GY, Inohara N, et al. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol* 2013;14:685-90.
30. Garcia-Gutierrez E, Mayer MJ, Cotter PD, et al. Gut microbiota as a source of novel antimicrobials. *Gut Microbes* 2019;10:1-21.
31. Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-Like Receptor 2 Controls Mucosal Inflammation by Regulating Epithelial Barrier Function. *Gastroenterology* 2007;132:1359-1374.
32. Femke L, Louis MAA, Johan DS. The Role of Microbiota and Probiotics in Stress-Induced Gastrointestinal Damage. *Current Molecular Medicine* 2008;8:282-298.
33. Ximenez C, Torres J. Development of Microbiota in Infants and its Role in Maturation of Gut Mucosa and Immune System. *Archives of Medical Research* 2017;48:666-680.
34. Ehrlich SD. MetaHIT: The European Union Project on Metagenomics of the Human Intestinal Tract. In: Nelson KE, ed. *Metagenomics of the Human Body*. New York, NY: Springer New York, 2011:307-316.
35. Zhu A, Sunagawa S, Mende DR, et al. Inter-individual differences in the gene content of human gut bacterial species. *Genome Biol* 2015;16:82.
36. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, et al. The Human Microbiome Project. *Nature* 2007;449:804-810.
37. Aguirre de Cárcer D. The human gut pan-microbiome presents a compositional core formed by discrete phylogenetic units. *Scientific Reports* 2018;8:14069.
38. Huttenhower C, Gevers D, Knight R, et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012;486:207-214.
39. Shafquat A, Joice R, Simmons SL, et al. Functional and phylogenetic assembly of microbial communities in the human microbiome. *Trends Microbiol* 2014;22:261-6.

40. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011;473:174-80.
41. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 2011;334:105-8.
42. Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, et al. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* 2014;159:789-99.
43. Davenport ER, Cusanovich DA, Michelini K, et al. Genome-Wide Association Studies of the Human Gut Microbiota. *PLOS ONE* 2015;10:e0140301.
44. Blekhman R, Goodrich JK, Huang K, et al. Host genetic variation impacts microbiome composition across human body sites. *Genome Biology* 2015;16:191.
45. Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science* 2016;352:560-4.
46. Zhernakova A, Kurilshikov A, Bonder MJ, et al. Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science* 2016;352:565-9.
47. Rothschild D, Weissbrod O, Barkan E, et al. Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature* 2018;555:210.
48. Singh RK, Chang HW, Yan D, et al. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J Transl Med* 2017;15:73.
49. De Filippis F, Pellegrini N, Vannini L, et al. High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome. *Gut* 2016;65:1812-1821.
50. Sonnenburg ED, Sonnenburg JL. Starving our microbial self: the deleterious consequences of a diet deficient in microbiota-accessible carbohydrates. *Cell Metab* 2014;20:779-786.
51. Clarke SF, Murphy EF, O'Sullivan O, et al. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut* 2014;63:1913-20.
52. Hildebrandt MA, Hoffmann C, Sherrill-Mix SA, et al. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology* 2009;137:1716-24.e1-2.
53. Kovatcheva-Datchary P, Nilsson A, Akrami R, et al. Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of *Prevotella*. *Cell Metabolism* 2015;22:971-982.
54. Dethlefsen L, Relman DA. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011;108:4554-4561.
55. Jakobsson HE, Jernberg C, Andersson AF, et al. Short-Term Antibiotic Treatment Has Differing Long-Term Impacts on the Human Throat and Gut Microbiome. *PLOS ONE* 2010;5:e9836.
56. Smits WK, Lyras D, Lacy DB, et al. *Clostridium difficile* infection. *Nature Reviews Disease Primers* 2016;2:16020.
57. D'Haens GR, Jobin C. Fecal Microbial Transplantation for Diseases Beyond Recurrent *Clostridium Difficile* Infection. *Gastroenterology* 2019;157:624-636.
58. Imhann F, Bonder MJ, Vich Vila A, et al. Proton pump inhibitors affect the gut microbiome. *Gut* 2016;65:740.
59. Jackson MA, Goodrich JK, Maxan ME, et al. Proton pump inhibitors alter the composition of the gut microbiota. *Gut* 2016;65:749-56.
60. Wu H, Esteve E, Tremaroli V, et al. Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naive type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. *Nat Med* 2017;23:850-858.

61. Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol* 2016;14:20-32.
62. Booiijink CC, Zoetendal EG, Kleerebezem M, et al. Microbial communities in the human small intestine: coupling diversity to metagenomics. *Future Microbiol* 2007;2:285-95.
63. Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res* 2013;69:137-43.
64. Bik EM, Long CD, Armitage GC, et al. Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *Isme j* 2010;4:962-74.
65. Di Pilato V, Freschi G, Ringressi MN, et al. The esophageal microbiota in health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 2016;1381:21-33.
66. Yang L, Lu X, Nossa CW, et al. Inflammation and intestinal metaplasia of the distal esophagus are associated with alterations in the microbiome. *Gastroenterology* 2009;137:588-97.
67. Malfertheiner P, Link A, Selgrad M. *Helicobacter pylori*: perspectives and time trends. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014;11:628-38.
68. Nardone G, Compare D, Rocco A. A microbiota-centric view of diseases of the upper gastrointestinal tract. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* 2017;2:298-312.
69. Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, et al. Analysis of the Upper Respiratory Tract Microbiotas as the Source of the Lung and Gastric Microbiotas in Healthy Individuals. *mBio* 2015;6:e00037-15.
70. Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, et al. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:732-7.
71. Delgado S, Cabrera-Rubio R, Mira A, et al. Microbiological survey of the human gastric ecosystem using culturing and pyrosequencing methods. *Microb Ecol* 2013;65:763-72.
72. Paroni Sterbini F, Palladini A, Masucci L, et al. Effects of Proton Pump Inhibitors on the Gastric Mucosa-Associated Microbiota in Dyspeptic Patients. *Applied and Environmental Microbiology* 2016;82:6633.
73. Freedberg DE, Toussaint NC, Chen SP, et al. Proton Pump Inhibitors Alter Specific Taxa in the Human Gastrointestinal Microbiome: A Crossover Trial. *Gastroenterology* 2015;149:883-5.e9.
74. Malfertheiner P, Megraud F, Morain CA, et al. Management of <em>Helicobacter pylori</em> infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut* 2017;66:6.
75. Andersson AF, Lindberg M, Jakobsson H, et al. Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS One* 2008;3:e2836.
76. Sung J, Kim N, Kim J, et al. Comparison of Gastric Microbiota Between Gastric Juice and Mucosa by Next Generation Sequencing Method. *J Cancer Prev* 2016;21:60-5.
77. Nistal E, Caminero A, Herrán AR, et al. Differences of small intestinal bacteria populations in adults and children with/without celiac disease: Effect of age, gluten diet, and disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 2012;18:649-656.
78. Schulz C, Schutte K, Koch N, et al. The active bacterial assemblages of the upper GI tract in individuals with and without *Helicobacter* infection. *Gut* 2018;67:216-225.
79. Zoetendal EG, Raes J, van den Bogert B, et al. The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbohydrates. *The ISME Journal* 2012;6:1415-1426.



80. Tlaskalova-Hogenova H, Stepankova R, Kozakova H, et al. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell Mol Immunol* 2011;8:110-20.
81. Wang M, Ahrné S, Jeppsson B, et al. Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology* 2005;54:219-231.
82. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* 2005;308:1635-1638.
83. Zoetendal EG, von Wright A, Vilpponen-Salmela T, et al. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:3401-7.
84. Fillon SA, Harris JK, Wagner BD, et al. Novel device to sample the esophageal microbiome--the esophageal string test. *PLoS One* 2012;7:e42938.
85. World Medical A. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* 2013;310:2191-4.
86. Boeing H, Bohlscheid-Thomas S, Voss S, et al. The relative validity of vitamin intakes derived from a food frequency questionnaire compared to 24-hour recalls and biological measurements: results from the EPIC pilot study in Germany. *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Int J Epidemiol* 1997;26 Suppl 1:S82-90.
87. Bohlscheid-Thomas S, Hoting I, Boeing H, et al. Reproducibility and relative validity of food group intake in a food frequency questionnaire developed for the German part of the EPIC project. *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Int J Epidemiol* 1997;26 Suppl 1:S59-70.
88. Bohlscheid-Thomas S, Hoting I, Boeing H, et al. Reproducibility and relative validity of energy and macronutrient intake of a food frequency questionnaire developed for the German part of the EPIC project. *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. Int J Epidemiol* 1997;26 Suppl 1:S71-81.
89. Pilotto A, Ferrucci L, Franceschi M, et al. Development and validation of a multidimensional prognostic index for one-year mortality from comprehensive geriatric assessment in hospitalized older patients. *Rejuvenation Res* 2008;11:151-61.
90. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, et al. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. *International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. Am J Surg Pathol* 1996;20:1161-81.
91. Rugge M, Fassan M, Pizzi M, et al. Operative link for gastritis assessment vs operative link on intestinal metaplasia assessment. *World journal of gastroenterology* 2011;17:4596-4601.
92. Rugge M, Meggio A, Pennelli G, et al. Gastritis staging in clinical practice: the OLGa staging system. *Gut* 2007;56:631-636.
93. Selgrad M, Tammer I, Langner C, et al. Different antibiotic susceptibility between antrum and corpus of the stomach, a possible reason for treatment failure of *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2014;20:16245-51.
94. Camarinha-Silva A, Jauregui R, Chaves-Moreno D, et al. Comparing the anterior nares bacterial community of two discrete human populations using Illumina amplicon sequencing. *Environ Microbiol* 2014;16:2939-52.

95. Cole JR, Wang Q, Fish JA, et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 2014;42:D633-42.
96. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 2013;8:e61217.
97. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:5261-7.
98. Guisande C, Heine J, García-Roselló E, et al. DER: An algorithm for comparing species diversity between assemblages. *Ecological Indicators* 2017;81:41-46.
99. LEROY B, PETILLON J, GALLON R, et al. Improving occurrence-based rarity metrics in conservation studies by including multiple rarity cut-off points. *Insect Conservation and Diversity* 2012;5:159-168.
100. Leroy B, Canard A, Ysnel F. Integrating multiple scales in rarity assessments of invertebrate taxa. *Diversity and Distributions* 2013;19:794-803.
101. Warwick R, Clarke K. New 'biodiversity' measures reveal a decrease in taxonomic distinctness with increasing stress. *Marine Ecology Progress Series* 1995;129:301-305.
102. Hochberg Y, Benjamini Y. More powerful procedures for multiple significance testing. *Stat Med* 1990;9:811-8.
103. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4, 9 p. [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm) 2001.
104. Clarke K, Warwick R. Clarke KR, Warwick RM. *Change in Marine Communities: An Approach to Statistical Analysis and Interpretation*. Primer-E Ltd: Plymouth, UK, 2001.
105. Vasapolli R, Schütte K, Schulz C, et al. Analysis of Transcriptionally Active Bacteria Throughout the Gastrointestinal Tract of Healthy Individuals. *Gastroenterology* 2019;157:1081-1092.e3.
106. Cani PD. Human gut microbiome: hopes, threats and promises. *Gut* 2018;67:1716-1725.
107. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006;124:837-48.
108. Stearns JC, Lynch MD, Senadheera DB, et al. Bacterial biogeography of the human digestive tract. *Sci Rep* 2011;1:170.
109. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* 2009;326:1694-7.
110. A framework for human microbiome research. *Nature* 2012;486:215-21.
111. Rangel I, Sundin J, Fuentes S, et al. The relationship between faecal-associated and mucosal-associated microbiota in irritable bowel syndrome patients and healthy subjects. *Aliment Pharmacol Ther* 2015;42:1211-21.
112. Fijan S. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *International journal of environmental research and public health* 2014;11:4745-4767.
113. Suez J, Zmora N, Zilberman-Schapira G, et al. Post-Antibiotic Gut Mucosal Microbiome Reconstitution Is Impaired by Probiotics and Improved by Autologous FMT. *Cell* 2018;174:1406-1423.e16.
114. Maldonado-Contreras A, Goldfarb KC, Godoy-Vitorino F, et al. Structure of the human gastric bacterial community in relation to *Helicobacter pylori* status. *Isme j* 2011;5:574-9.

115. Khadangi F, Yassi M, Kerachian MA. Review: Diagnostic accuracy of PCR-based detection tests for *Helicobacter Pylori* in stool samples. *Helicobacter* 2017;22.
116. Rehman A, Rausch P, Wang J, et al. Geographical patterns of the standing and active human gut microbiome in health and IBD. *Gut* 2016;65:238-48.
117. Farre R, Tack J. Food and symptom generation in functional gastrointestinal disorders: physiological aspects. *Am J Gastroenterol* 2013;108:698-706.

## 6.3 Lebenslauf

### Persönliche Angaben

<b>Name</b>	Vasapolli
<b>Vorname</b>	Riccardo
<b>Geburtsdatum</b>	22.12.1988
<b>Geburtsort</b>	San Cataldo (CL), Italien
<b>Nationalität</b>	Italienisch
<b>Familienstand</b>	Verheiratet

### Beruflicher Wedergang

- **seit Juli 2018** Assistenzarzt, Medizinische Poliklinik II, LMU Klinikum der Universität München, Direktor Prof. J. Mayerle  
Rotationen: gastroenterologische Normalstation, Notaufnahme, Sonographie
- **Januar 2017 - Juni 2018** Assistenzarzt, Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, „*Otto-von-Guericke*“ Universität, Magdeburg, Direktor Prof. A. Canbay  
Rotationen: Notaufnahme, Intensivstation
- **Mai 2015 - Dezember 2016** Assistenzarzt, Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, „*Otto-von-Guericke*“ Universität, Magdeburg, Direktor Prof. P. Malfertheiner  
Rotationen: gastroenterologische Normalstation, Forschungsrotation
- **April 2014 - Mai 2015** Research Fellowship, Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, „*Otto-von-Guericke*“ Universität, Magdeburg, Direktor Prof. P. Malfertheiner

### Studium

- **2007 - 2016** Student der Scuola Superiore di Catania (SSC), Elitehochschule in der Universität von Catania. Abschluss in Januar 2016 - Diplomarbeit: „*Modification of inflammatory microRNAs in gastric mucosa by aspirin, NSAIDs and proton-pump inhibitors*“
- **November 2014** Deutsche Approbation als Arzt, Landesverwaltungsamt Halle
- **2013 - 2014** Medizinische Staatsexamen und italienische Approbation als Arzt, Universität von Palermo
- **2007 - 2013** Studium der Humanmedizin, Universität von Catania. Abschluss in Juli 2013 (110/110 e Lode) - Diplomarbeit: „*Analyse der Proliferationindizes in Biopsien und Zellkulturen aus humanen Gliomen*“ (in italienischer Sprache)

### Schulbildung

- **2002 - 2007** Liceo Scientifico „*A. Volta*“, Caltanissetta (CL) - Abschluss: Abitur (100/100 e Lode)

### **Stipendien und Förderungen**

- SSC Förderung der Studienaufenthalte im Ausland für Absolventen. Magdeburg, Deutschland 2014
- IFMSA Medical Clerkship - Universitätsklinik für Neurochirurgie. Graz, Österreich August 2012
- Begabtenförderung für Studenten der Scuola Superiore di Catania, Italien 2007 - 2014

### **Preise**

- EAGEN Award for best oral presentation, *Fit for the Future in Gastroenterology*, Berlin, Deutschland, 17 November 2017
- 2nd Poster Prize, *Falk Symposium 200: VIII Falk GASTRO-CONFERENCE, Therapeutic Strategies in Diseases of the Digestive Tract - 2015 and Beyond*, Freiburg, Deutschland, 16-17 Oktober 2015
- EAGEN Award for best oral presentation, *European Bridging Meeting in Gastroenterology*, Berlin, Deutschland, 13-15 November 2014

### **Forschungsprofil**

Klinische und translationale Forschung mit Fokus auf *H. pylori*-assoziierte Erkrankungen und gastrointestinales Mikrobiom.

**Sprachkenntnisse** Italienisch (Muttersprache), Deutsch, Englisch

## 6.4 Verzeichnis der Wissenschaftlichen Veröffentlichungen

### Originalarbeiten

1. **§ Vasapolli R**, Schütte K, Schulz C, Vital M, Schomburg D, Pieper DH, Vilchez-Vargas R, Malfertheiner P. Analysis of Transcriptionally Active Bacteria Throughout the Gastrointestinal Tract of Healthy Individuals. *Gastroenterology* Oct. 2019;157(4):1081-1092.
2. Schulz C, Schütte K, Vilchez-Vargas R, **Vasapolli R**, Malfertheiner P. Long term effect of rifaximin with and without lactulose on the active bacterial assemblages in the upper intestine and faeces in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Dig Dis* 2019;37(2):161-169.
3. Schulz C, Schütte K, Kropf S, Schmitt FC, **Vasapolli R**, Kliegis LM, Riegger A, Malfertheiner P. RiMINI - the influence of rifaximin on minimal hepatic encephalopathy (MHE) and on the intestinal microbiome in patients with liver cirrhosis: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2016; 17(1):111

### Reviews, Buchartikel, Fallberichte

4. Venerito M, **Vasapolli R**, Rokkas T, Malfertheiner P. Gastric cancer: epidemiology, prevention, and therapy. *Helicobacter*. 2018;23 Suppl 1:e12518.
5. Venerito M, **Vasapolli R**, Rokkas T, Delchier JC, Malfertheiner P. Helicobacter pylori, gastric cancer and other gastrointestinal malignancies. *Helicobacter*. 2017;22 Suppl 1:10.
6. Venerito M, **Vasapolli R**, Malfertheiner P. Helicobacter pylori and Gastric Cancer: Timing and Impact of Preventive Measures. *Adv Exp Med Biol* 2016; 908: 409-18.
7. **Vasapolli R**, Malfertheiner P, Kandulski A. Helicobacter pylori and non-malignant upper gastrointestinal diseases. *Helicobacter* 2016; Suppl 1:30-3.
8. Venerito M, **Vasapolli R**, Malfertheiner P. [Prevention, early diagnosis and therapy of gastric cancer]. *MMW Fortschr Med* 2016; 158: 39-43.
9. Venerito M, **Vasapolli R**, Rokkas T, Malfertheiner P. Helicobacter pylori and Gastrointestinal Malignancies. *Helicobacter* 2015; 20 Suppl 1: 36-9

### Kongressbeiträge (Vorträge, Poster)

10. **§ Vasapolli R**, Schütte K, Schulz C, Vilchez-Vargas R, Malfertheiner P. Distinct microbiota communities along the entire human digestive tract. *Digestive disease week*. Poster. 02-05 Juni 2018, Washington, DC, USA
11. **Vasapolli R**, von Arnim U, Frauenschläger K, Weigt J, Malfertheiner P, Akute Cholangitis als seltene Komplikation der eosinophilen Gastroenteritis: Fallbericht. 25. *Kongress der Mitteldeutschen Gesellschaft für Gastroenterologie*. 03-04 Juni 2016, Meiningen, Deutschland
12. **Vasapolli R**, Schirrmeister W, Venerito M, Treiber G, Wex T, Link A, Malfertheiner P. Modification of inflammatory microRNAs in gastric mucosa by aspirin, NSAIDs and proton pump inhibitors. *Falk Symposium 200: VIII Falk Gastro-Conference, Therapeutic Strategies in Diseases of the Digestive Tract - 2015 and Beyond*, 16-17 Oktober 2015, Freiburg, Deutschland

§: Wissenschaftlichen Veröffentlichungen mit Bezug zur Dissertation

## 6.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Peter Malfertheiner für die hervorragende Betreuung, die lehrreichen Diskussionen und die stetige Motivation, die für meine wissenschaftlichen Entwicklung sehr prägend gewesen sind. Ihm bin ich sehr dankbar für die zahlreichen Möglichkeiten, an hochwertigen Forschungsprojekten mitarbeiten zu können.

Des Weiteren gilt mein Dank PD Dr. Kerstin Schütte und PD Dr. Christian Schulz für ihre stetige Unterstützung während aller Phasen dieser Arbeit und im klinischen Alltag. Ihr allzeit offenes Ohr, ihre Geduld, ihre Kompetenz und Zuverlässigkeit waren und sind weiterhin von größter Bedeutung für mich.

Danke an Dr. Ramiro Vilchez-Vargas für die großartige Unterstützung bei den Analysen der erworbenen Daten und die vermittelte Begeisterung für die Welt des Mikrobioms.

Ein großes Dankeschön auch an alle Oberärzte der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie des Uniklinikums Magdeburg, an Frau Worm und Frau Freitag, an die Teams der Endoskopie, der Ambulanz und des Forschungslabors für die unermüdliche Zusammenarbeit, die in kürzester und für mich spannender Zeit das Aufbauen der EMGASTA Kohorte ermöglicht hat.

Meinen Eltern, meinen Brüdern und meiner Frau danke ich von ganzem Herzen für den psychologischen sowie auch materiellen Rückhalt, der mir jederzeit eine unbegrenzte und sorglose akademische Ausbildung gesichert hat.

---

## 6.6 Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**„Charakterisierung der metabolisch-aktiven bakteriellen Gemeinschaften von verschiedenen Regionen des gastrointestinalen Trakts bei gesunden Menschen“**

in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie des Uniklinikums Magdeburg

mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. med. habil Dr. h.c. Peter Malfertheiner, PD Dr. Kerstin Schütte und PD Dr. Christian Schulz

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- und ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

München, den 05.12.2019

Riccardo Vasapolli