

Aus dem Departament für Diagnostische Labormedizin
der Universität Tübingen

Die Rolle des intestinalen Mikrobioms
bei der Überwindung und Wiederherstellung
der Kolonisierungsresistenz
im Mausmodell der intestinalen Kolonisierung
durch *Pseudomonas aeruginosa*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Hinkov, Hristian Georgiev

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. J.-S. Frick

2. Berichterstatter: Professor Dr. E. Tacconelli

Tag der Disputation: 16.11.2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung.....	9
1.1 Das intestinale Mikrobiom.....	9
1.2 Die intestinale Kolonisierungsresistenz	12
1.3 Das fakultativ pathogene Gram-negative Bakterium <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
1.4 Fäkaltransplantation	18
1.5 Klinische Probleme.....	19
1.6 Ziele der Arbeit	21
2 Material und Methoden.....	24
2.1 Etablierung eines murinen Kolonisationsmodells mit <i>P. aeruginosa</i> und einer Kolonisations-Referenzgruppe mit Rifampicin-resistenter <i>E. coli</i> Nissle	24
2.1.1 Mäuse.....	28
2.1.2 Zubereitung des keimbeladenen Trinkwassers	29
2.1.3 Zubereitung des autoklavierten Trinkwassers	32
2.1.4 Messung des Gewichts der Mäuse	32
2.1.5 Beprobung der Mäuse	33
2.1.6 Bearbeitung der Proben	33
2.1.7 DNA-Extraktion aus Nativstuhlproben	36
2.1.8 Qualitätskontrolle der gewonnenen DNA	39
2.1.9 Konzentrationsbestimmung der gewonnenen DNA.....	39
2.1.10 Sequenzierung der gewonnenen DNA und DNA-Datenanalyse	42
2.2 Modifikation des Kolonisationsmodells mit Exposition gegenüber dem Antibiotikum Ciprofloxacin in der präexpositionellen Versuchsphase	45
2.3 Modifikation des Kolonisationsmodells mit intragastral verabreichter Fäkaltransplantation in der postexpositionellen Phase	48
2.3.1 Donorenmausgruppe	51
2.3.2 Fäkalpool	53
3 Ergebnisse.....	54
3.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> kolonisiert das murine Intestinum	54

3.2 Die Ausprägung der Kolonisation mit <i>P. aeruginosa</i> korreliert mit Variationen des Vorkommens von <i>Lactobacillus spp.</i> und <i>Clostridium spp.</i>	58
3.3 Die Vorbehandlung mit dem Antibiotikum Ciprofloxacin hat keinen Einfluss auf das Kolonisierungsverhalten von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	72
3.4 Die Fäkaltransplantation kann <i>P. aeruginosa</i> aus dem murinen Intestinum eliminieren	74
4 Diskussion	78
4.1 Implikationen des Durchbrechens der intestinalen Kolonisierungsresistenz durch <i>P. aeruginosa</i>	78
4.2 Veränderungen der Komposition der intestinalen Mikrobiota während einer Periode der Kolonisation und ihrer Relevanz	81
4.3 Folgen der fehlenden Effekte der Applikation des Antibiotikums Ciprofloxacin auf den Ausprägungsgrad intestinaler Kolonisierung mit <i>P. aeruginosa</i>	86
4.4 Die Einflüsse der Fäkaltransplantation auf die intestinale Kolonisierung mit <i>P. aeruginosa</i> und ihrer potenziellen Anwendbarkeit	90
4.5 Limitationen	93
4.5.1 Limitationen des murinen Kolonisationsmodells und ihre Folgen.....	93
4.5.2 Limitationen der Interpretation der Ergebnisse aus dem Versuchsaufbau mit Ciprofloxacin-Vorbehandlung	95
4.5.3 Limitationen der DNA-Bearbeitung und der Sequenzieranalyse	97
4.5.4 Limitationen des Fäkaltransplantationsversuchs	101
5 Zusammenfassung	102
6 Literaturverzeichnis	107
Erklärung zum Eigenanteil	112
Danksagung	113

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
CDAD	<i>Clostridium difficile</i> assoziierte Diarrhoe
CFU	Colony Forming Units
CNA-Agar	Colistin-Naldixic-Acid-Agar
d	day
Da	Dalton
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie
DNA	Deoxyribonucleic acid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EcN	<i>Escherichia coli</i> Nissle
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
FTx	Fäkaltransplantation
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Glyc.	Glycerol
HP	Hybridisierungspuffer
i.g.	intragastral
IVC	Individually Ventilated Cage
KG	Körpergewicht
Log	Logarithmus
LB	Lysogeny Broth
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight- mass spectrometry
NGS	Next Generation Sequencing
OD	Optical Density
OprF	Outer protein F
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyd

PjP	<i>Pneumocystis-jirovecii</i> -Pneumonie
PVK	Peripherer venöser Katheter
PVPP	Polyvinylpyrrolidone
RNA	Ribonucleic acid
RR	Rifampicin-resistent
SPF	specific-pathogen-free
T3SS	Typ III Sekretionssystem
TBE	TRIS, Borat, EDTA
TENP	TRIS, EDTA, NaCl, PVPP
Treg	Regulatorische T-Zelle
TW	Trinkwasser
ÜNK	Übernachtkultur
WP	Waschpuffer

1 Einleitung

1.1 Das intestinale Mikrobiom

Das intestinale Mikrobiom stellt die Summe der Mikroorganismen dar, welche den Gastrointestinaltrakt eines Wirtsorganismus besiedeln. Ein mittlerweile obsoleter Begriff hierfür ist die „Darmflora“. Das intestinale Mikrobiom besteht aus den Darmmikrobiota. Es umfasst u. a. ca. 10^{14} Bakterien, was etwa dem Zehnfachen der Anzahl von Körperzellen entspricht, die ein erwachsener Mensch im Durchschnitt besitzt [1]. Die intestinalen Mikrobiota tragen eine Anzahl von ca. 500 000 – 600 000 Genen [2]. Das humane Genom beinhaltet im Vergleich dazu ca. 100 Mal weniger Genen [3, 4]. Dieser Unterschied in der Genomgröße mit konsequenter Vielzahl exprimierter Genprodukten implementiert die potenziell große funktionelle Relevanz des Mikrobioms für seinen Wirt.

Die intestinalen Mikrobiota erreichen die höchste bekannte Zelldichte aller Ökosysteme [5]. Dennoch ist die Diversität auf Phylumbene eine der geringsten: nur acht von den 55 bekannten bakteriellen Phyla sind bis heute im intestinalen Mikrobiom identifiziert worden und von diesen acht sind vier nur sehr wenig vertreten [6]. Die Phyla, welche das intestinale Mikrobiom dominieren sind demzufolge nur vier. Das sind die *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* und *Proteobacteria* [6] [7]. Die Struktur und Zusammensetzung der Darmmikrobiota stellt eine natürliche, evolutionäre Selektion auf zwei Ebenen dar und spricht somit für eine konkrete Spezialisierung der Mikrobiotavertreter auf ihrem Wirt [8]. Diese Selektion erfolgte zum einen auf der interbakteriellen Ebene, auf welcher die Überlebensstrategien eines Bakteriums im Vordergrund stehen. Solche sind zum Beispiel die speziesspezifische Vermehrungsrate und die Art von Nahrungsquellen, die ein Bakterium benutzen kann. Diese Überlebensstrategien haben einen Einfluss auf die sog. Fitness des individuellen Bakteriums in einem kompetitiven Umfeld. Um eine zweite Ebene handelt es sich bei der Interaktion zwischen Bakterium und Wirt. Auf dieser Wirtsebene findet die Selektion und entsprechend auch die Etablierung als dominierende bakterielle Gruppe im Darm

statt, indem bestimmte bakterielle Zusammensetzungen des Mikrobioms, welche für den Wirt eine suboptimale Funktionalität aufweisen und die Fitness des Wirtes beeinträchtigen könnten, eine geringere Chance für koevolutive Persistenz haben als solche, die für den Wirt von größerem selektiven Vorteil sind. Das bedeutet, dass bestimmte Mikrobiomzusammensetzungen, deren integrierte Aktivitäten auf Kosten des Wirtes entstehen oder zu der Entstehung von solchen führen, im Laufe einer evolutionären Zeitspanne zur Verminderung der Anzahl solcher Wirte führen würden und somit dementsprechend zur mangelnden Weiterverbreitung dieses Mikrobioms. Folglich repräsentiert die Tatsache, dass das im menschlichen Gastrointestinaltrakt gefundene Mikrobiom überwiegend aus nur vier Phyla zusammengesetzt ist, die durch sehr kompakte Cluster verwandter Bakterien repräsentiert werden, eine strenge Wirtsselektion dar. Dies gilt insbesondere bzgl. spezifischer Bakterien, deren Funktionen im Allgemeinen von Vorteil für den Wirt und sein Überleben sind. Diese Hypothese hat zwei wichtige Implikationen: (i) es existiert ein Mechanismus, der eine Kooperation zwischen Mikrobiom und Wirt fördert und (ii) die strukturelle Zusammensetzung der Mikrobiota fördert funktionelle Stabilität des intestinalen Ökosystems.

Die Entwicklung des Darmmikrobioms beginnt bereits vor der Geburt. Die mütterliche Flora wird auf den Fetus durch die Plazenta, Nabelschnur, Amnionmembranen und -flüssigkeit übertragen [9-11]. Es etabliert sich ein erstes elementares Mikrobiom, welches bereits im Mekonium nachweisbar ist [12, 13]. Der Geburtsvorgang ist der nächste Zeitpunkt, der zu einer Veränderung der Zusammensetzung des Mikrobioms führt. Diese ist insbesondere auch vom Geburtsmodus abhängig, da vaginal geborene Kinder ein Mikrobiom tragen, welches mehr der Vaginalflora der Mutter entspricht, während Kinder, die per Kaiserschnitt auf die Welt kommen, eher eine Mikrobiota besitzen, welche der mütterlichen Hautflora in ihrer Zusammensetzung ähnelt [14]. Es wurde gezeigt, dass auf Phylumebene vaginal entwickelte Kinder breitere Populationen von *Bacteroides* und *Firmicutes* tragen im Gegensatz zu per Kaiserschnitt geborenen Kindern [14]. Die Komposition der Darmmikrobiota verändert sich weiter im Verlauf von Jahren in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren wie Diätart,

Exposition zu Antibiotika und Fluktuationen der Umweltbedingungen [14, 15]. Im Alter von drei Jahren wird der Punkt erreicht, an dem das intestinale Mikrobiom eine Stabilität und eine relative Konstanz seiner vorhandenen Vertreter aufweist [16]. Erwachsene Menschen besitzen Mikrobiota die für das eigene Individuum so spezifisch sind, dass sie sogar eine Identitätsbestimmung erlauben [17, 18]. Im Laufe des Lebens erfährt das Mikrobiom i.d.R. weitere Veränderungen, die altersspezifisch sind (wie z.B. eine Zunahme von *Enterococcus spp.*, *Escherichia coli* und eine Abnahme von *Bacteroides spp.* und *Clostridium spp.*) aber auf Individuumebene findet bei einer gesunden Person so gut wie fast keine Veränderung der Komposition in Hinsicht auf das absolute Vorkommen bakterieller Vertreter auf Phylum-, Ordnungs-, Genus- oder Speziesebene statt. Der Grad der Diversität verändert sich auch nicht [19, 20].

Die Funktionen, die das intestinale Mikrobiom erfüllt sind essentiell für den Wirt und umfassen auch solche, die er selbst nicht erfüllen kann. Somit handelt es sich um eine symbiotische Beziehung [8]. Demzufolge ist das intestinale Mikrobiom von kritischer Bedeutung für seinen Wirt und für die Aufrechterhaltung eines kompetenten Immunstatus und eine effiziente Verstoffwechslung von Nährstoffen [21]. Beispiele dafür sind die Fermentierung und dadurch Energiegewinnung von sonst nicht verdaulichen Substanzen, die Synthese von Vitaminen und Freisetzung von anderen Mikronutrienten, die Metabolisierung von Nahrungsmitteltoxinen und Karzinogenen, die Sicherstellung der Reifung des enterischen Immunsystems, Effekte auf das Wachstum und Differenzierung von Enterozyten und Epithelbarrieren, die Regulation der intestinalen Angiogenese und die Protektion gegenüber enteropathogenen Erregern [22, 23].

In den letzten Jahrzehnten sind die Zusammenhänge zwischen der Zusammensetzung, Störungen der Komposition, Einschränkungen in der Diversität der intestinalen Mikrobiota und dem Gesundheitszustand des Wirtes näher untersucht worden [24]. Eine sogenannte Dysbiose wird mit Immunstörungen, Suszeptibilität für Infektionen und neuerdings auch mit verschiedenen nicht-enterischen Pathologien wie z.B. Erkrankungen des Herz-

Kreislauf-Systems, Adipositas, Diabetes mellitus oder hepatologischen und neurologischen Krankheitsbildern assoziiert [25, 26].

1.2 Die intestinale Kolonisierungsresistenz

Wie unter Punkt 1.1 beschrieben besiedelt das intestinale Mikrobiom fast den gesamten menschlichen Gastrointestinaltrakt. Die Besiedlungsdichte im Dickdarm ist wesentlich höher als diese im Dünndarm [27]. Im gesunden Zustand und ohne äußere Einflüsse wie z.B. Antibiotikaexposition hat die intestinale Mikrobiota die Eigenschaft, die längerfristige Ansiedlung mit und Überwucherung durch andere, unter anderem auch opportunistisch pathogene Organismen zu verhindern [28]. Solche potenziell bedrohlichen Eindringlinge können Mikroorganismen sein, die den Gastrointestinaltrakt von oral oder aboral erstmalig erreichen, oder solche, die sich bereits im Darm befanden, aber eine viel schmalere ökologische Nische einnahmen, als in einem Zustand der Überwucherung. Dieses Phänomen nennt sich Kolonisierungsresistenz. Sie ist assoziiert mit einem stabilen und diversitätsreichen Mikrobiom und einem günstigen, kontrollierten Fehlen von Inflammation [29]. Ein Fortbestehen der Kolonisierungsresistenz hängt sowohl von den Interaktionen der einzelnen Mikrobiotavertreter untereinander, als auch von deren Interaktion mit dem Immunsystem des Wirtsorganismus ab [29].

Wie die im Darm residenten Mikrobiota erfolgreich potenziellen Pathogenen Widerstand leisten ist schon seit einigen Jahren Gegenstand intensiver Forschungen und die bislang entdeckten Mechanismen können grob in zwei Kategorien eingeteilt werden: (i) direkte Interaktionen zwischen den Kommensalen und den Pathogenen, wie z.B. Konkurrenz um gemeinsame Nahrungsquellen und Nischen [30] und (ii) Mikrobiom-vermittelte Leistungssteigerung des Immunsystems des Wirtes [29].

Ein sehr gutes Beispiel für den ersten Mechanismus ist die bereits oben gennante Konkurrenz für ähnliche ökologische Nischen. Da sich die Mikrobiota über viele Jahre als solche etabliert hat, verfügt sie in der Regel über bessere Fitnessfaktoren, die es Mikrobiotakeimen erlauben konkurrenzfähiger zu sein. Einige dieser Kommensalen sind z.B. in der Lage Bakteriocine zu produzieren und dadurch mit ihnen konkurrierende Pathogene zu schädigen [31]. Einige dieser Bakteriocine sind sogar gegen spezieidentische Bakterien gerichtet. Ein Beispiel dafür ist ein von *E. coli* produziertes Bakteriocin, welches auf enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) wirkt [32]. Kommensale verhindern Infektionen auch dadurch, dass sie Umweltbedingungen innerhalb des Wirtes verändern, wie z.B. den luminalen pH-Wert im Darm. Ein saurer pH-Wert ist per se ungünstig für das Wachstum und die Replikation der meisten Bakterien. Es sind aber unter anderem auch physiologische Vorgänge in den bakteriellen Mikroorganismen davon abhängig, wie die Expression von Genen, die für Virulenzfaktoren kodieren [33].

Eine alternative Strategie der Kolonisierungsresistenz seitens des intestinalen Mikrobioms ist die Bevorzugung von Nahrungsquellen, die für das Wachstum von konkurrierenden pathogenen Bakterien notwendig sind. Indem die Kommensalen die gemeinsamen begrenzten Nährstoffe verbrauchen, verursachen sie das „Verhungern“ von diesen anderen Bakterien [34]. Die Darmmikrobiota verbrauchen diese Nahrungsressourcen nicht bloß, sondern scheiden bei deren Verstoffwechslung unter anderem Metabolite aus, die das Wachstum und Virulenz von potenziell pathogenen Organismen stören [35]. So einen Einfluss haben die von vielen Mikrobiotavertretern freigesetzten kurzkettigen Fettsäuren beispielsweise auf die Expression des Typ-III-Sekretionssystems von *Salmonella enterica* Serovar *Enteritidis* und *Typhimurium*, wodurch die Virulenz von *Salmonella* gesenkt wird [35-37]. Zusätzlich zu der direkten Suppression von Virulenzgenen durch Stoffwechselprodukte der intestinalen Mikrobiota beeinflussen die Kommensalen die Virulenz von Pathogenen auch indem sie die Umgebung so verändern (pH-Wert, Sauerstoffkonzentration, etc), dass die bereits exprimierte Virulenzfaktoren an Effizienz verlieren [38].

Die kommensale Bakterien verhindern eine Kolonisation und demzufolge auch eine Infektion indem sie das wirtseigene Immunsystem funktionell verbessern. Ein solches Phänomen ist die Optimierung der Epithelbarriere und des angeborenen Immunsystems [39].

Das erste Hindernis bei der Entstehung einer Infektion stellt die Epithelbarriere mit ihrer Mukusschicht dar. Das Verständnis für die Verbesserung der protektiven Funktion der Epithelbarriere durch das intestinale Mikrobiom ist indirekt auf Versuche zurückzuführen, in denen keimfrei gezüchtete und gehaltene Mäuse ohne jegliche bakterielle Flora nur eine eingeschränkte Synthese antimikrobieller Peptide sowie eine pathologische Neigung zu unter anderem systemischen Infektionen gezeigt haben [40, 41]. Die Synthese von Immunoglobulin A ist in mikrobiomfreien Organismen ebenfalls beeinträchtigt, was zu einer lokalen Immunschwäche und erhöhter Suszeptibilität für potenziell pathogene Organismen führt [42, 43]. Eine weitere bereits identifizierte günstige Interaktion zwischen Mikrobiom und Immunsystem ist die Regulation der inflammatorischen Homöostase [44]. Genauer betrachtet handelt es sich um das Gleichgewicht zwischen regulatorischen T-Zellen und T-Helferzellen (Treg/Th17-Bilanz). Es ist bekannt, dass in der intestinalen Lamina propria lokalisierte regulatorische T-Zellen eine Wirkung auf die Suppression von pathologischen inflammatorischen Prozessen haben. Weiter ist bekannt, dass diverse Vertreter der Darmmikrobiota in der Lage sind eine Reifung naiver T-Helferzellen zu regulatorischen T-Zellen zu induzieren [45]. Auf diese Weise schützt das intestinale Mikrobiom seinen Wirt vor überschießender Inflammation, vor intestinalen Pathogenen oder einer Schleimhautschädigung [46].

Bei einer Störung der Kolonisierungsresistenz ist die logische Konsequenz eine gesteigerte Suszeptibilität gegenüber Infektionen, Inflammation und sonstigen pathologischen Prozessen. Zum Beispiel kann *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* das Intestinum von Mäusen mit einem physiologischen Mikrobiom nur ganz geringgradig besiedeln. Wenn aber diese Mäuse mit Antibiotika

vorbehandelt wurden oder ihr Mikrobiom nur eine geringe Diversität besitzt, kommt es zu einer sehr ausgeprägten Kolonisation [47]. Ein in seiner Komplexität und Diversität gestörtes Darmmikrobiom ermöglicht es auch potenziell schädlichen Anteilen des Mikrobioms sich auszubreiten und Pathologien zu verursachen [48]. Ein gut bekanntes Beispiel hierfür aus dem klinischen Alltag ist die *Clostridium difficile* assoziierte Diarrhoe. Dabei handelt es sich um eine überschießende intestinale Ausbreitung im Rahmen antibiotischer Therapien von dem Bakterium *Clostridium difficile*, welches eigentlich ein Vertreter der Darmmikrobiota ist, was zu einem Krankheitsbild mit Diarrhoeen intensiveren Ausmaßes und der sogenannten pseudomembranösen Colitis führen kann.

1.3 Das fakultativ pathogene Gram-negative Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa ist ein ubiquitär vorkommendes, nicht-fermentierendes Bakterium, welches sich in der Gram-Färbung negativ verhält. Die bakterielle Zelle von *P. aeruginosa* hat eine Länge von 1-5 µm und eine Breite von 0.5-1µm und ist monobegeißelt. Das unter optimalen Bedingungen obligat aerobe Bakterium ist in der Lage alternative metabolische Mechanismen zu benutzen und kann bei Sauerstoffmangel anaerob mittels Nitraten oder alternativen Elektronenakzeptoren funktionieren [49]. Demzufolge ist *P. aeruginosa* in der Lage ein breites Spektrum an organischen Verbindungen zu katabolisieren, was zu einer ausgeprägten Umweltbedingungsresistenz beiträgt und das ubiquitäre Vorkommen des Organismus ermöglicht [50]. *P. aeruginosa* befindet sich in der Erde, im Grundwasser, in Abwässern, Menschen und Tieren, Pflanzen und ist auch als ein nosokomialer Erreger bekannt. Die allerdings von dem Bakterium bevorzugten Habitaten, in denen *Pseudomonas aeruginosa* äußerst erfolgreich dominiert, sind oligotrophe Milieus mit hohem Sauerstoffgehalt und niedrigem Gehalt an pflanzlichen Nährstoffen. Im klinisch-

relevanten Setting sind das insbesondere Waschbecken und Toiletten von Patientenzimmern, Wasserleitungen, Schwimmbecken in Rehabilitationsanstalten und auch sämtliche Krankenhausapparaturen, die über Wasserbehälter verfügen, wie zum Beispiel Beatmungsgeräte in der Anästhesie oder auf Intensivstationen, Verneblersystemen, Katheterschläuche etc. [51-54].

Pseudomonas aeruginosa verursacht in gesunden Menschen nur selten Infektionen. Dieser Mikroorganismus ist vor allem mit Krankheiten assoziiert, die bei immunkompromittierten Patienten auftreten, z.B. aufgrund von Krankheit, Traumata oder auch iatrogen [55-57]. Die Sterblichkeitsraten von Infektionen mit *P. aeruginosa* sind höher als diejenigen mit allen anderen Gram-negativen Organismen. Bei immunkompetenten Personen führt *P. aeruginosa* meist nur zu einer Kolonisation. Aus dieser Kolonisation kann bei Auftreten einer Neutropenie eine sekundäre Infektion entstehen [58]. So eine Infektion ist in aller Regel sehr schwer therapierbar, aufgrund einerseits des Immunitätszustands des Patienten und andererseits der Resistenzcharakteristika von *P. aeruginosa*.

Die Pathogenität von *Pseudomonas aeruginosa* ist auf zahlreiche Virulenzfaktoren zurückzuführen. Als ein Gram-negativer Organismus verfügt *P. aeruginosa* über eine äußere Membran, die Protein F enthält (OprF). Da OprF als ein Porin mit maximaler Größe der durchgelassenen Substanzen von 500Da fungiert, vermindert es insgesamt die Permeabilität der äußeren Membran des Bakteriums, was die Aufnahme und das Eindringen von Antibiotika und anderen potenziell schädlichen Substanzen minimiert und zu der hohen natürlichen Antibiotikaresistenz des Organismus führt [59].

Zusätzlich zu seiner bemerkenswerten intrinsischen Antibiotikaresistenz ist *P. aeruginosa* in der Lage weitere Resistenzen gegenüber jeglichen vorhandenen Antibiotika zu entwickeln [60]. Der Hauptmechanismus beruht auf Selektion von Mutationen in chromosomalen Genen, wie zum Beispiel von AmpC. AmpC ist eine Betalaktamase der Klasse C, die in der Lage ist Aminopenicilline und die meisten Cephalosporine abzubauen und durch Betalaktamaseinhibitoren, wie

Clavulansäure nicht inhibierbar ist [61]. Weitere ähnliche mutierte Gene, die dem Bakterium ein Peptidoglykanrecycling ermöglichen sind AmpD, DacB und AmpR, und diese führen konsekutiv auch zu einer Überexpression von AmpC [62]. *Pseudomonas aeruginosa* verfügt zunehmend auch über zwei Metallo-Betalaktamasen kodierende Gene – IMP und VIM. Das IMP-Gen kodiert für eine Imipenemase, die Carbapenem-Antibiotika abbauen kann, während VIM für „Verona-Imipenemase“ steht, unter Zusatz des Ortes der Erstisolation. Diese Gene können zwischen verschiedenen *P. aeruginosa*-Stämmen horizontal transferiert und somit ausgebreitet werden. Demzufolge ist die Antibiotikaresistenz des Bakteriums sehr hoch, sowie die Prävalenz von MDR- und XDR-Stämmen, wobei die Tendenz, was Vorkommen und Letalität an solchen Stämmen steigend ist und umfassend bis zu 20% beträgt [63].

Virulenzfaktoren von *Pseudomonas aeruginosa*, die nicht auf eine Resistenz gegenüber Therapeutika beruhen, sondern eher eine Umweltfitness zur Folge haben und es dem Bakterium erleichtern viele ökologische Nischen zu besiedeln sind unter anderem die folgenden:

Das Flagellum, das *P. aeruginosa* besitzt, ermöglicht dem Bakterium eine effiziente Chemotaxis zu nützlichen Molekülen und Nährstoffen. Weiterhin ist das Flagellum in den frühen Stadien einer Infektion von Bedeutung, da es sich an Zellen und Geweben des Wirtes anheftet und eine Invasion erleichtert, auch unter ungünstigen Umweltbedingungen und niedrigem Nährstoffangebot. Ähnlich dem Flagellum fungieren die Pilli als bakterielle Strukturen, die eine Adhäsion an Epithelien erlauben. Das ermöglicht sowohl eine Invasion, als auch die für *Pseudomonas* typische Biofilmbildung, die als wichtiger Virulenzfaktor an sich gilt [64].

Die Siderophore Pyochelin und Pyoverdin werden von *Pseudomonas aeruginosa* auf die Außenseite der bakteriellen Zelle sezerniert. Diese Siderophore binden Eisen und bringen es in das Bakterium hinein. Auf diese Weise entkommt *P. aeruginosa* eins der primären angeborenen Abwehrmechanismen des

Immunsystems - der Eisendeprivation. Außerdem ist *P. aeruginosa* auch in der Lage Eisen von Enterobactin zu bekommen, welches ein von *Escherichia coli* synthetisiertes Siderophor ist.

Darüber hinaus kann *Pseudomonas aeruginosa* ein Typ III Sekretionsystem benutzen um Effektormoleküle in humane und tierische Zellen zu injizieren und dadurch diese zu infizieren. Aktuell sind mindestens vier solche Effektormoleküle bekannt. Diese sind ExoS, ExoT, ExoU und ExoY [65]. ExoS ist ein bifunktionelles Protein, welches zum einen das Zytoskelett der Wirtszelle zerstört, zum anderen inhibiert es die DNA-Synthese und induziert den Zelltod. Das Protein ExoT ist mit ExoS verwandt und besitzt nahezu identische Funktionen. ExoU ist ein potentes nekrotisierendes Toxin mit Phospholipase-Aktivität, welches in der Lage ist schnell Zelltod von eukaryontischen Zellen zu induzieren. Die genaue Funktionsweise von ExoY ist immernoch unbekannt, alledrings gibt es Hinweise, dass sie auch zu Zytotoxizität führt und die Endothelproliferation hemmt. Allumfassend dienen die vom T3SS sezernierten Proteine einer Schädigung von Epithelbarrieren und ermöglichen es dem Bakterium unter diesen Umständen diese zu passieren und sich im Wirtsorganismus auszubreiten [66].

1.4 Fäkaltransplantation

Die Fäkaltransplantation ist eine seit vielen Jahren bekannte therapeutische Methode, bei der Stuhl von einem gesunden Donor einem Rezipienten mit gestörter gastrointestinalen Hömoosthase übertragen wird [67, 68]. Diese Methode findet auch heutzutage keine breite Anwendung in der Klinik, unter anderem aufgrund ihrer unästhetischen Natur und weil bis vor einigen Jahren nur sehr geringe Evidenz für ihre Effektivität zur Verfügung stand. Mittlerweile findet die Fäkaltransplantation als Verfahren für die Wiederherstellung eines funktionell gesundes intestinales Mikrobioms breitere Akzeptanz in der Medizin und steht

sogar bei der *Clostridium difficile*-assoziierten Diarrhoe als leitliniengerechte therapeutische Option zur Wahl [69]. Es ist in mehreren Studien gezeigt worden, dass eine FTX im Vergleich zu der bis dato standardmäßigen antibiotischen Therapie von CDAD mit Vancomycin und Metronidazol, nicht nur ein besseres und schnelleres Ansprechen besitzt, sondern auch niedrigere Rezidivraten und ein sehr gutes Nebenwirkungsprofil zeigt [70]. CDAD-Patienten, die fäkaltransplantiert werden, haben auf Dauer eine bis zu 98%-ige Heilungsrate [71]. Antibiotisch behandelte Patienten dagegen erleiden in ca. 26% der Fälle ein Rezidiv, wobei das Risiko für folgende Rezidive danach etwa 45% beträgt [72-74]. Die Folge von diesen Erkenntnissen ist, dass die Methodologie der FTX in den letzten Jahren in vielen Hinsichten, wie Selektion der Donoren, Art der Applikation und Dosis, sehr stark standardisiert wurde [75]. Das macht die Anwendung dieser Methode einfacher und unterlegt ihre Applizierbarkeit im klinischen Umfeld.

Darüber hinaus gibt es in der naturwissenschaftlichen Literatur mehrere Beispiele für die erfolgreiche und effiziente Verwendung einer Fäkaltransplantation für verschiedene Erkrankungen des gastroenterologischen Formenkreises bei Mäusen [76] und auch für gastrointestinale Infektionen, die unter anderem in Bakteriämie und Sepsis übergehen.

1.5 Klinische Probleme

Pseudomonas aeruginosa stellt einen der häufigsten Gram-negativen nosokomialen Erregern dar. Aufgrund seiner hohen Virulenz und hohe endogene Antibiotikaresistenz, stellt es auch einen der häufigsten Problemerreger dar, wenn es um seine Therapierbarkeit geht [77]. Nicht nur die Inzidenz von Kolonisationen und Infektionen in Krankenhäusern mit Wildtyp – *P. aeruginosa* ist ansteigend, sondern auch das Vorkommen von multidrug- und extensively-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*-Stämmen [78]. Bei seiner bereits

problematischen Natur als Infektionserreger, stellen solche hochresistente Stämme ein noch größeres klinisches Problem dar [79]. In Hinsicht auf die Tatsache, dass *P. aeruginosa* hauptsächlich immunsupprimierte Patienten infiziert, die sich bereits in einem sehr risikobehafteten Zustand befinden, ist die Gefahr, die eine solche Infektion mit sich trägt, je nach genauer Art sehr wesentlich und in der Literatur mit einer Letalität von bis zu 17%-20% angegeben [80, 81].

Ein MDR – *P. aeruginosa* wird dadurch definiert, dass das Bakterium gegen mindestens eine antibiotische Substanz in drei oder mehreren von den für *P. aeruginosa* insgesamt acht bekannten Antibiotikagruppen resistent ist. Zusätzlich zu diesen Resistenzen, trägt ein XDR – *P. aeruginosa* noch weitere Resistenzen, sodass wirksame Antibiotika aus nicht mehr als zwei von den acht Gruppen zu therapeutischer Verfügung stehen [82]. Panresistente *Pseudomonas aeruginosa* Stämme sind selten, kommen aber auch vor. In der Praxis führt das dazu, dass sehr wenige bis gar keine antibiotischen Substanzen für die Therapie einer solchen Infektion in Frage kommen. Wenn das doch der Fall ist, sind sie auch nicht selten sehr nebenwirkungsreich, was für Reservemedikamente nicht untypisch ist und ihre Anwendung auch nicht erwünscht machen könnte.

Eine antibiotische Therapie führt auch zu einer Störung der Zusammensetzung des Mikrobioms. Dadurch werden Bakterien herausselektioniert, die gegen die angewendeten Antibiotika resistent sind [83]. Auf diese Weise können sie sich in den dann dank der Therapie freigewordenen ökologischen Nischen ausbreiten und dominieren. Da *P. aeruginosa* ein solcher hochresistenter Mikroorganismus ist, käme es bei einer Antibiose, egal ob prophylaktisch oder therapeutisch eingeleitet, zu einer Selektion und Domination dieses Bakteriums mit einer konsekutiven Kolonisation. Unter dem bereits erwähnten Setting einer neutropenen Immunschwäche geht eine Kolonisation in eine sekundäre Infektion über, indem die pathogenen Organismen das Darmgewebe invadieren und von dort aus zu einer Bakteriämie und Sepsis mit extrem hoher Letalität führen [84].

Indem man an erster Stelle eine Kolonisation verhindert, würde man auch eine sekundäre Infektion verhindern, sodass es in Situationen, in denen eine Immunsuppression unumgänglich ist, wie z.B. bei einer Chemotherapie oder Vorbereitung auf Knochenmarktransplantation, es nicht zu einer Lebensgefahr für den Patienten kommt. Dies wäre zum einen dadurch zu erreichen, indem es zu keiner Exposition des Patienten mit hochresistenten Erregern wie *P. aeruginosa* kommt, was durch die ubiquitäre Natur des Bakteriums nicht immer möglich ist. Ein anderer Ansatz wäre es, die Suszeptibilität des Gastrointestinaltraktes des Patienten für so einen Erreger zu minimieren, dadurch dass (i) keine Antibiotika angewendet werden, was bei einer Infektion, vor allem im neutropenen Zustand, unmöglich ist, oder (ii) die Kolonisierungsresistenz der Darmmikrobiota dermaßen stabilisiert, erhöht oder wiederhergestellt wird, dass es zu keiner Kolonisation kommen kann.

Der unter Punkt (ii) vorgeschlagene Lösungsansatz ist unter anderem aufgrund des Vermeidens der Applikation von häufig in Hinsicht der Infektion wirkungslosen und dazu auch nicht selten Darmmikrobiota-schädigenden antibakteriellen Substanzen sehr elegant und macht eine Erforschung der Rolle des intestinalen Mikrobioms bei der Wiederherstellung seiner Kolonisierungsresistenz nach einer Kolonisation mit potenziell pathogenen Erregern notwendig.

1.6 Ziele der Arbeit

Wie in Abschnitt 1.1 und 1.4 erwähnt, kann eine in eine Kolonisation mit konsekutiver Infektion resultierende Störung der Zusammensetzung der Darmmikrobiota äußerst ungünstig sein und führt in der klinischen Praxis mit einer nicht unbeträchtlichen Wahrscheinlichkeit zum Tode [80, 81]. Um solche Geschehnisse möglichst zu vermeiden, ist die Erforschung von Lösungsansätzen zur Stärkung der Kolonisierungsresistenz des intestinalen Mikrobioms notwendig. Um Veränderungen des Mikrobioms während des Durchbrechens der

Kolonisierungsresistenz zu untersuchen, ist die Auseinandersetzung mit folgenden Punkten notwendig:

1. Etablierung eines murinen Kolonisationsmodells

Dieses Kolonisierungsmodell wird mit gesunden Wildtypmäusen durchgeführt, die mit *P. aeruginosa* oder einem zweiten Mikroorganismus mit bekannter hoher Kolonisierungspotenz exponiert werden. Das zweite Bakterium dient als Referenz- und Kontrollgruppe. Dieser Organismus wird in dem Modell wahlweise *E. coli* Nissle sein, dessen Kolonisierungseigenschaften und Effekte auf die Gesundheit von Säugern schon längst bekannt sind [85, 86]. Wenn das Kolonisationsmodell etabliert ist und es gezeigt wurde, dass *P. aeruginosa* den murinen Wirt erfolgreich kolonisiert, wird das Modell modifiziert, sodass andere Einflüsse auf das Kolonisierungsverhalten von *P. aeruginosa* getestet werden können. Ein solcher Einfluss ist die antibiotische Vorbehandlung des potenziellen Wirtes.

2. Identifizierung von Mikrobiomzusammensetzungen, die eine potenziell höhere Kolonisierungsresistenz aufweisen

Indem der Stuhl der kolonisierten Mäuse zu den Zeitpunkten des höchsten Kolonisationsniveaus auf seine mikrobielle Zusammensetzung hin untersucht wird und diese dann definierte Zusammensetzung mit dem entsprechendem Niveau an Kolonisation mit *P. aeruginosa* der jeweiligen Maus korreliert wird, könnte man als Folge eines positiven oder negativen Korrelationstrends Äußerungen dazu treffen, welche Mikrobiotavertreter für eine Kolonisation begünstigend sind, oder gegen eine Kolonisation präventiv oder protektiv wirken könnten.

3. Testung des Einflusses einer antibiotischen Therapie auf das Kolonisierungs- und Kolonisierungsresistenzverhalten

Es ist bekannt, dass eine Antibiose zu einer Disruption der Zusammensetzung der Mikrobiota führt. Diese Disruption wiederum prädisponiert für eine Kolonisation mit u.a. pathogenen Erregern [87]. Ein Ziel dieser Arbeit ist es herauszufinden, ob auf den hämatoonkologischen Stationen des Universitätsklinikums Tübingen bei neutropenen Patienten durchgeführte prophylaktische Antibiose mit Ciprofloxacin die Kolonisation des murinen Gastrointestinaltraktes durch *P. aeruginosa* erleichtert.

4. Versuch der Wiederherstellung eines gesunden Mikrobioms mittels Fäkaltransplantation

Nachdem in dem Kolonisierungsmodell eine stabile Kolonisation mit *P. aeruginosa* erreicht ist, wird untersucht, ob sich diese Kolonisierung sanieren lässt. Da der Stuhl hauptsächlich aus Bakterien besteht, kann dieser als Quelle für eine Restaurierung der Zusammensetzung der Darmmikrobiota eingesetzt werden, wenn er aus einem gesunden Donor stammt [88]. Positive, vielversprechende Effekte einer solchen Fäkaltransplantation sind der Medizin auch vor einem Hintergrund limitierter Erfahrung schon bekannt und werden bereits in der Klinik bei Patienten mit *Clostridium difficile* assoziierter Diarrhoe erfolgreich angewandt [70, 89]. Hier sollen die möglichen therapeutisch sanierenden Effekte einer FTx bei mit *P. aeruginosa* kolonisierten Mäusen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Etablierung eines murinen Kolonisationsmodells mit *P. aeruginosa* und einer Kolonisations-Referenzgruppe mit Rifampicin-resistenter *E. coli* Nissle

Um an erster Stelle die Kolonisationsfähigkeit von *P. aeruginosa* im Mausmodell zu beweisen und eine Basis für die nächsten Versuchsvorhaben zu schaffen, war die Entwicklung eines solchen Kolonisationsmodells notwendig. Die Grundidee hierbei war es, Mäuse durch orale Gabe einer möglichst konkret definierten Menge *P. aeruginosa* mittels beimpften Trinkwassers zu kolonisieren, ohne dass eine Infektion der Tiere mit den Keimen auftritt. Die zu erwartende Keimdosis leitete sich dabei von der für Mäuse üblichen Trinkmenge pro Tag (ca. 3,64g Wasser/Tag pro Maus [90]) bei Bereitstellung von Futter und Flüssigkeit ad libitum ab. Parallel dazu wurde der Stuhl der Mäuse in zuvor festgelegten Zeitabständen gesammelt, konserviert und analysiert. Zum einen wurden Proben für eine CFU-Bestimmung gesammelt, um die intestinale *P. aeruginosa*-Last im zeitlichen Verlauf des Experiments zu bestimmen. Zum anderen wurden Stuhlproben für DNA-Isolation und weiterführende Analysen gesammelt, mit dem Ziel die Veränderungen in der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota in Abhängigkeit von der *P. aeruginosa*-Last zu identifizieren. Zusätzlich wurde Stuhl in 25%-iger LB-Glycerol-Lösung bei -80°C konserviert, um ihn eventuell als Material für zukünftige FTx-Experimente zu verwenden.

Das Kolonisationsmodell und sein zeitlicher Ablauf wurden wie in Abb. 1 konzipiert und durchgeführt:

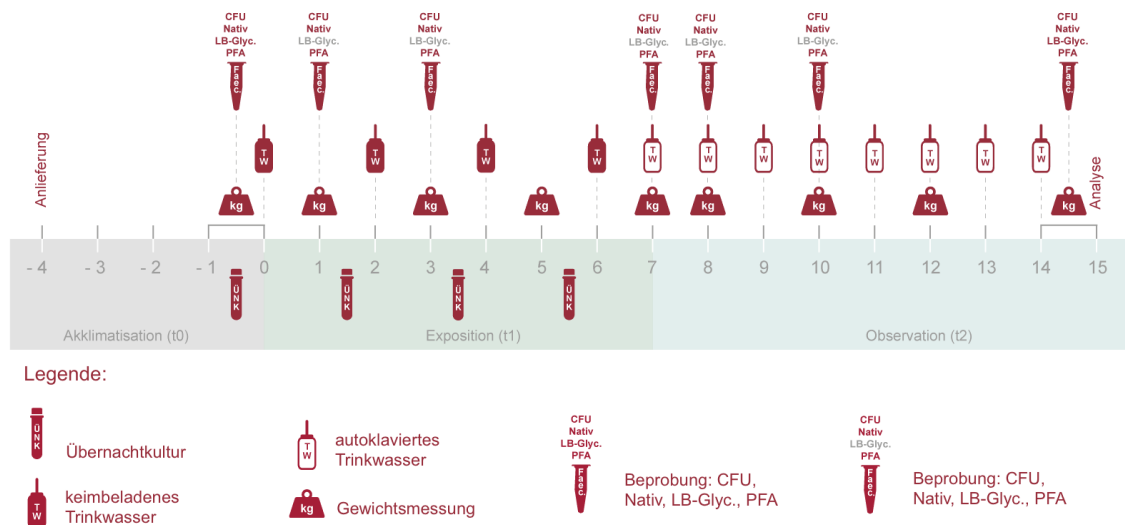


Abb. 1: Schematische Darstellung des Ablaufs der Versuchsreihe. Die Zeitachse mit einer Versuchsdauer von 15 Tagen ist in Phasen aufgeteilt. Dem tatsächlichen Anfang des Experiments im Anschluss der Anlieferung der Versuchstiere ist eine Akklimationsphase (t0) von 4 Tagen vorgeschaltet. Es folgt die Phase der Exposition (t1) in der die Versuchstiergruppen mit dem jeweiligen Bakterium exponiert werden, das zur Kolonisation führen soll. Die Observationsphase (t2) beginnt am Ende von Tag 7 und dauert bis Tag 15 an. Nach ihrem Ablauf werden die Mäuse analysiert. Die Stuhlprobensammlung, die Gewichtsmessung, das Ansetzen von Übernachtskulturen mit den Expositionsbakterien, das Anbringen von keimbeladenem Trinkwasser und der Tausch mit autoklaviertem Trinkwasser sind respektiv den Tagen ihrer Durchführung über der Zeit eingetragen.

Die Tierhaltungbedingungen wurden bei allen durchgeführten Versuchsreihen streng identisch gehalten. Die Mäuse wurden über die Dauer der Studie in individuell ventilierten Käfigen (IVC) gehalten, wobei sich in einem Käfig nie mehr als fünf Versuchstiere gleichzeitig befanden, sodass immer gute räumliche Platzbedingungen gegeben waren. Der Tag-Nacht-Rhythmus des Raums in dem die Käfige gehalten wurden war auf 12h gestellt. Die Nahrung bestand ausschließlich aus sterilisierten Trockenpellets, die wie das Trinkwasser ad libitum zur Verfügung bereitstanden. Die innere Umgebung aller Käfige wurde mit gleicher Mengen an Nistmaterial und jeweils einem Holzhäuschen gestaltet.

Vor dem Beginn der Exposition mit *P. aeruginosa* wurden die Tiere in der Tierhaltung für mindestens vier Tage in den entsprechenden IVCs belassen, in denen sie bis zum Ende der Versuchsreihe verblieben. Dies diente im Rahmen der Akklimationsphase (t0) zur Gewöhnung der Tiere an die neue Käfigumgebung, Nahrung und ggfs. Florabedingungen. I.d.R. handelte es sich um zwei parallel untersuchte Gruppen mit jeweils fünf weiblichen

C57BL/JOlaHsd Mäusen (geliefert von Firma Harlan). Der ersten Gruppe wurde *P. aeruginosa*-haltiges Trinkwasser verabreicht. Die zweite Gruppe bekam stattdessen Trinkwasser, welches mit der gleichen Konzentration an Rifampicin-resistenten *EcN* beimpft wurde. Diese zweite Gruppe diente als Referenz- und Kontrollgruppe für das Kolonisationsverhalten in der Maus.

Der erste Beprobungszeitpunkt fing am -1. oder am Tag 0 an, jedoch vor der ersten Gabe von keimbeladenem Trinkwasser. Es wurden die in Abb. 1 beschriebenen Proben gesammelt (Nativstuhl, LB-Glyc. und CFU) und nach Protokoll bearbeitet. Am -1. Tag wurde die erste Übernachtkultur angesetzt und am Tag 0, nach der Beprobung wurde die erste Flasche mit *P. aeruginosa* oder *E. coli* Nissle RR angehängt. Die keimbeladenen Trinkwasserflaschen wurden alle zwei bis spätestens drei Tage ausgetauscht um eine konstante Keimexpositionsmenge in den angehängten Flaschen zu gewährleisten. An jedem Beprobungstag wurden die Mäuse gewogen und ihr Gewicht wird notiert, mit dem Ziel eine Gewichtsverlaufkurve für die einzelnen Mausgruppen zu erstellen, aus der ausgeprägte Veränderungen in Gewichtszunahme bzw. -verlust der Tiere in den verschiedenen Versuchsphasen ersichtlich wären. Eventuelle Veränderungen des Gewichts der Versuchstiere könnten eine Folge der durchgeführten Keimexposition und der damit ev. einhergehenden Kolonisation sein. Im Falle einer Translokation der Expositionskeime von intestinal Richtung Blutbahn im Sinne einer Bakteriämie wäre die Entwicklung von entsprechender Infektionskrankheitssymptomatik seitens der Mäuse zu erwarten. Deswegen wurden diese bei jedem Kontakt auf klinische Anzeichen von Erkrankung hin überprüft. Solche Anzeichen waren: ungepflegtes Fell, Schonhaltung, Fehlen von Bewegungen, Adynamie, verschmierter Kot im Käfig als Zeichen von Diarrhoe, Blut im Stuhl.

Die Expositionsphase (t1) dauerte vom 1. bis zum einschließlich 7. Tag. Beprobungen und Gewichtskontrollen fanden wie in Abb. 1 dargestellt statt.

Zu Beginn der Observationsphase (t₂) am Tag 7 wurde das keimbeladene Trinkwasser abgesetzt und gegen die erste Flasche autoklaviertes Trinkwasser ausgetauscht. Die ab diesem Zeitpunkt angesetzten Flaschen mit autoklaviertem Trinkwasser wurden täglich gewechselt, ebenso die IVC-Käfige, das Futter, das Einstreu und Nistmaterial (Zellstoff). Dies galt der Prävention möglicher Kontaminationen des frischen Trinkwassers (z.B. retrograd von den Mäusen in die Flaschen), der Einstreu und des Nistmaterials, durch Kontakt mit bzw. den Verzehr von Faeces etc. Eine solche Kontamination könnte zu einer autologen, ev. wiederholten Keimreexposition und somit zu einer Vortäuschung einer anhaltenden, kontinuierlichen Kolonisation führen.

Durch dieses Kolonisationsmodell zu erreichende Ziele sind:

- Bestätigung der These, dass *P. aeruginosa* zu einer mittel- und langfristigen Kolonisation des mäuseichen Intestinums führt.
- Ausschluss, dass es bei der gesunden Maus bei der Gabe von 5×10^7 Bakterien/ml über das Trinkwasser zu einer Translokation mit Invasion in die Blutbahn und die inneren Organe kommt.
- Gewinnung von Proben für weitere Analysen.

Am letzten Tag (Tag 15; Analyse) wurden die Mäuse mit CO₂ anästhesiert, mittels kompletter zervikaler Dislokation getötet und dann präpariert. Ziel der Präparation ist die Entnahme von den folgenden Organen und Körperteilen: Blut, Lunge, Leber, Milz und mesenteriale Lymphknoten. Zum Zweck einer sauberen Präparation, bei der eine Kontamination der Thoraxorgane mit Darminhalt vermieden werden soll, wurde zuerst die Brusthöhle eröffnet und nach Entnahme der Thoraxorgane und der notwendigen Blutmenge wurde erst dann das Abdomen der Versuchstiere eröffnet und präpariert. Die entnommenen Organe wurden dann homogenisiert und 100 µl des jeweiligen Homogenisats auf Agarplatten (Columbia Plus Schafblut-Agar) aufgetragen und mit sterilen Glasspateln ausplattiert. Die Organe wurden zuvor gewogen, um eventuelles Keimwachstum für die CFU-Berechnung mit dem Gewicht der Probe in Bezug

setzen zu können. Ein fehlendes Wachstum von bakteriellen Kolonien auf den Agarplatten wäre mit einer intestinalen Kolonisation vereinbar, macht aber eine Translokation von *P. aeruginosa* aus dem Darm ins Blut und andere Organe unwahrscheinlich.

Jede Maus wurde separat seziiert, um Kontaminationen zwischen den Kadavern zu vermeiden. Die entnommenen Organe und das Blut wurden einzeln in autoklavierte Eppendorfgläser überführt. Dem Blut wurden 500µl PBS-Lösung (Firma Gibco/Life Technologies®) zugegeben, um eine Thrombenbildung zu vermeiden, sodass das Material ausplattierbar bleibt. Dann wurden die Organe gewogen, sodass das oben beschriebene eventuelle Keimwachstum mit dem Gewicht der Organe in Bezug gesetzt werden konnte. Im nächsten Schritt wurden die Organe aus den Eppendorfgläsern herausgenommen und auf Zellsiebe mit einer Porengröße von 40µm überführt. Die Zellsiebe wurden jeweils in die Öffnung eines 50ml-Reaktionsgefäßes eingesetzt. Danach wurden diese Siebe mit 500µl PBS befeuchtet. Die darauf verbrachten Organproben wurden anschließend mit dem sterilen Plastikstempel einer 10ml Einmalspritze (Firma Braun®) zerpresst. Nachdem eine möglichst homogene Masse entstanden ist, wurde mit weiteren 500µl PBS nachgespült und das Filtrat im jeweiligen 50ml-Reaktionsgefäß gesammelt. 100µl des Homogenisats werden unverdünnt auf Columbia Plus Schafblut-Agarplatten aufgetragen und gleichmäßig ausplattiert. Die Platten wurden für ca. 18-24h bei 37°C bebrütet.

2.1.1 Mäuse

Die für die Etablierung des Kolonisationsmodells verwendeten Mäuse wurden bei der Firma Harlan Laboratories INC. bestellt. Es handelte sich um weibliche C57BL/6OlaHsd Wildtyp-Mäuse in einem Alter von etwa 6 Wochen. In allen Versuchsreihen des Kolonisationsmodells wurde immer der gleiche Stamm von Mäusen des gleichen Lieferants und des ungefähr gleichen Alters verwendet. Pro

Versuchsreihe wurden fünf Tiere in der *P. aeruginosa* Gruppe und fünf Tiere in der *E. coli* Nissle RR Referenzgruppe benutzt. Diese Anzahl gilt auch für die Versuchsreihen, in denen das Kolonisationsmodell modifiziert wurde.

2.1.2 Zubereitung des keimbeladenen Trinkwassers

Für die Zubereitung von Trinkwasserflaschen mit einer definierten Konzentration von Bakterien (5×10^7 Bakterien/ml) werden bei -20°C gelagerten Keimstocks mit dem entsprechenden Erreger (*P. aeruginosa* Stamm PAO1 und *E. coli* Nissle RR) über Nacht in Plastikreagenzgläser mit 5ml LB-Medium bei 37°C geschüttelt und inkubiert.

Am Folgetag werden die Übernachtskulturen in 500ml Erlenmeyerkolben mit 45ml LB-Medium überführt und für mindestens zwei Stunden hochgeschüttelt, sodass dieser Prozess in der Phase des exponentiellen Wachstums stattfindet. Um das Risiko einer Kontamination der Übernachtskulturen und der fertigen Trinkwasserflaschen mit anderen Bakterien zu minimieren wird stets unter der Sterilbank und bei jedem einzelnen Pipettierprozess mit neuen autoklavierten Pipettenspitzen gearbeitet.

Um die definierte Keimkonzentration zu erreichen wird wie folgt vorgegangen. Die hochgeschüttelten ÜNK wurde in neue sterile Reaktionsgefäße unter der Sterilbank überführt und bei 4000rpm für 5 Minuten herunterzentrifugiert. Nach Entsorgung des Überstandes wird der Bodensatz mit 10ml autoklaviertem Trinkwasser verdünnt und gründlich mittels Vortex-Gerät vermischt.

Das zugegebene autoklavierte Trinkwasser wurde auf eventuelle bakterielle Kontamination untersucht, indem 1ml Trinkwasser zu 4ml LB-Medium in eine Kulturflasche gegeben wurden und über Nacht bei 37°C geschüttelt und inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurden diese Kulturflaschen optisch nach Trübung

der sonst klaren Flüssigkeit kontrolliert. Falls eine Trübung vorhanden war, wurden von den entsprechenden Flaschen 3-Impfösen-Ausstriche auf CNA- und auf Endo-Agarplatten gemacht. Die Platten werden dann bei 37°C für 24h inkubiert und wenn Wachstum vorhanden ist, werden die Kontaminanten mittels massenspektroskopischer Analyse identifiziert.

Von jedem der erzeugten Trinkwasseransätzen (PAO1 oder *EcN* RR) werden jeweils 50µl mit 950µl autoklaviertem Trinkwasser in eine Küvette gegeben. Die optische Dichte wird photometrisch bei 600nm Wellenlänge drei Mal gegen einen Leerwert von 1000µl autoklaviertem Trinkwasser gemessen und der Mittelwert der drei Messungen wird notiert.

Das notwendige Volumen, das von der Übernachtskultur in die Trinkwasserflasche zugegeben werden muss, um insgesamt 250ml keimbeladenes Wasser mit bakterieller Konzentration von 5×10^7 Bakterien/ml zu erhalten, wurde auf die folgende Weise ausgerechnet: Mittels Dreisatz wird das benötigte Volumen berechnet, um 250 ml keimbeladenes Wasser mit einer Konzentration von 5×10^7 Bakterien/ml herzustellen.

[Beispielrechnung:

-Ein OD-Wert von 0,500 entspricht 50×10^8 Erregern in 1ml gewaschener ÜNK.

- Zielwert ist eine Konzentration von 5×10^7 Bakterien/ml in 250ml endgültig zubereitetem Trinkwasser.

- Dazu wird ein Dreisatz gebildet:

1ml *entspricht* 50×10^8 Bakterien/ml

1ml : 500 *entspricht* $0,1 \times 10^8$ oder 1×10^7 Bakterien/ml

1ml : 500 x 5 *entspricht* 5×10^7 Bakterien/ml

1ml : 500 x 5 x 250 *entspricht* 5×10^7 Bakterien/ml in 250ml

Um eine Konzentration von 5×10^7 Bakterien/ml in einem Volumen von 250ml zu erreichen, wird hier die Zugabe eines ÜNK-Volumens von 2,5ml benötigt, das restliche Volumen der Trinkwasserflasche von 247,5ml wird mit autoklaviertem Trinkwasser aufgefüllt.]

Bevor die Trinkwasserflaschen mit den dazugehörigen Trinkstützen versetzt und auf diese Weise verschlossen werden, werden zusätzlich die folgenden Kontaminationstests durchgeführt:

Von der mit *EcN* RR versetzten Trinkwasserflasche werden drei 3-Impfösenausstriche gemacht:

- Auf Endo-Agarplatte (selektiv für gramnegative Bakterien, speziell für *Enterobacteriaceae*), um eine Kontamination mit anderen *Enterobacteriaceae* außer *E. coli* auszuschließen.
- Auf CNA-Agar (selektiv für grampositive Bakterien), um eine Kontamination mit grampositiven Bakterien auszuschließen.
- Auf Cetrimid-Agar (selektives Wachstum von *P. aeruginosa*), um eine Kreuzkontamination mit *P. aeruginosa* zwischen den beiden am selben Tag zubereiteten Trinkwasserflaschen auszuschließen.

Von der mit *P. aeruginosa* Stamm PAO1 versetzten Trinkwasserflasche werden drei 3-Impfösenausstriche gemacht:

- Auf Endo-Agarplatte, um eine Kontamination mit *Enterobacteriaceae*, unter anderem *E. coli* auszuschließen.
- Auf CNA-Agar, um eine Kontamination mit grampositiven Bakterien auszuschließen.
- Auf LB-Rifampicin-Agar, um eine Kreuzkontamination mit *EcN* RR zwischen den beiden am selben Tag zubereiteten Trinkwasserflaschen auszuschließen.

2.1.3 Zubereitung des autoklavierten Trinkwassers

Das zu Beginn der Observationsphase (t₂) gegebene Trinkwasser wurde autoklaviert bei 122°C für 15 Minuten. Für die Zubereitung des keimbeladenen Trinkwassers für die Expositionsphase (t₁) wurde das hier beschriebene autoklavierte Wasser verwendet. Die Flaschen in denen das Trinkwasser zum Autoklavieren gegeben wurde, wurden vorher bei 124°C für 20 Minuten ebenfalls autoklaviert. Die Flaschen, die an die IVC-Käfige angehängt wurden, wurden zusammen mit den dazugehörenden Trinkstützen bei 124°C für 20 Minuten autoklaviert. Sämtliche Flaschen wurden unter der Sterilbank befüllt. Auf diese Weise wird das Risiko einer Kontamination mit anderen Bakterien minimiert und die Wahrscheinlichkeit von Störungen und Verfälschung im Kolonisationsverhalten mit den Zielerregern (*P. aeruginosa* und der Referenz *E. coli* Nissle) vermindert.

2.1.4 Messung des Gewichts der Mäuse

Das Gewicht der Tiere wurde bei jeder Beprobung und an zwei weiteren Tagen auf die folgende Art und Weise gemessen: Unter der Sterilbank im Tierstall wurde eine Waage für Mäuse (Scout™ Pro von OHAUS 400 g, Modell SPU401), sowie fünf 500ml-Messbecher vorbereitet. In jeden Messbecher wurde eine durchsichtige Abwurfütte platziert, um während des Messvorganges abgesetzte Köttel aufzufangen. Pro Maus wurde ein eigener Messbecher mit einer eigenen Abwurfütte vorbereitet, sodass keine Kohortenbeprobung und -gewichtsmessung stattfindet, was zu einer Vermischung der Stuhlproben verschiedener Tiere führen würde und so die ermittelte interindividuelle Differenz in der Stuhlzusammensetzung, inklusive Diversität der im Stuhl abgesetzten Darmflora, verfälschen würde. Vor jedem Messvorgang wurde die Waage mit Messbecher und Abwurfütte neu tariert. Die Mäuse wurden einzeln gewogen und ihr Gewicht in eine Tabelle für spätere Analysen eingetragen.

2.1.5 Beprobung der Mäuse

Nach der Gewichtsmessung an den jeweiligen Beprobungsterminen werden die einzeln gewogenen Mäuse in den Messbechern belassen, bis sie ausreichend Stuhl abgesetzt haben. Wenn genug Proben vorhanden sind, werden die Tiere in ihren Käfig zurück überführt und der Stuhl mit den vorher vorbereiteten Eppendorfgefäßen eingesammelt. Die mit Stuhl befüllten Eppendorfgefäße werden sofort auf Eis gelagert, um eine Austrocknung der Proben zu vermeiden und metabolische Vorgänge zu verlangsamen. Der direkte Kontakt zwischen Eis und Proben wird durch einen Beutel verhindert, um eventuelle Kontamination von Faeces durch Schmelzwasser auszuschließen. Je nach Beprobungstermin werden bis zu vier verschiedene Proben pro Maus konserviert. Um Kontaminationen zwischen der *P. aeruginosa*- und *E. coli*-Nissle-Gruppe zu vermeiden wurden die zwei Versuchstiergruppen zeitlich getrennt beprobt, sodass zuerst die Gruppe mit *P. aeruginosa* als Expositionsbakterium beprobt wurde und erst im Anschluss nach einer Reinigung des Arbeitsplatzes mit Descosept AF® (Dr. Schumacher GmbH) von der Gruppe mit *EcN* als Expositionsbakterium Stuhlproben gewonnen wurden.

2.1.6 Bearbeitung der Proben

Nativstuhlproben

Die Nativstuhlproben werden nach der Gewinnung so schnell wie möglich in das Labor transportiert und sofort in dem -80°C Tiefkühlschrank gelagert. Von diesen Proben wird später DNA isoliert, mit dem Ziel eine 16S amplicon-based DNA-Sequenzierung durchzuführen und die Zusammensetzung der im Stuhl enthaltenen bakteriellen Mikrobiota zu untersuchen.

LB-Glycerol-Proben

Zusätzlich zu den Nativstuhlproben wurden am ersten und am letzten Tag jeder Versuchsreihe (siehe Abb. 1) Stuhlproben gesammelt, die in 25%-igen LB-Glycerol eingelegt wurden. Die Idee hinter dieser Probengewinnung ist, dass evtl. der im LB-Glycerol eingelegte Stuhl später für Fäkaltransplantationen eingesetzt werden könnte, wenn es sich herausstellen sollte, dass das jeweilige Donor-Tier kolonisationsresistent oder nur minimal kolonisiert war. So könnte die Hypothese untersucht werden, dass bestimmte Mikrobiota-zusammensetzungen für eine unterschiedliche Verhaltenstendenz gegenüber einer Kolonisation prädisponieren. Die LB-Glycerol-Faecesproben werden wie die Nativstuhlproben sofort nach dem Transport in das Labor bei -80°C gelagert.

PFA-Stuhl-Proben

Untersuchungen hinsichtlich der Verteilung von *P. aeruginosa* im Stuhl können mittels FISH durchgeführt werden. Nach gezielter Fluoreszenzfärbung von *P. aeruginosa* und anderen bakteriellen Vertreter kann gezeigt werden, wie diese topographisch im Darm lokalisiert sind. Das kann hinweisend für die Art von bakteriellen Interaktionen (synergistisch/agonistisch vs. antagonistisch) zwischen *P. aeruginosa* und den Mikrobiota sein, da sich z.B. gegenseitig positiv beeinflussende Mikroorganismen tendenziell in örtlicher Nähe zueinander zu finden sein sollten. Für den Fall, dass die Durchführung solcher Experimente nach Ablauf der Versuchsreihen und Evaluation der ersten Ergebnisse für sinnvoll gehalten werden sollten, wurden Stuhlproben gewonnen, die in PFA konserviert wurden, da dieses Medium die Realisierung von Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung ermöglicht.

Nach dem Transport ins Labor wird der Stuhl in der PFA-Lösung mittels einer abgebrochenen Impföse steril zerstampft und danach durch Vortexen homogenisiert. Es folgt eine Inkubation bei 4°C für zwei bis vier Stunden. Anschließend werden die Proben bei 4000g für fünf Minuten zentrifugiert

(Eppendorf Centrifuge 5417R). Der Überstand wird abpipettiert, ohne dass der Bodensatz (sog. Pellet) beschädigt oder aufgewirbelt wird. Zum Pellet werden 1ml PBS-Lösung gegeben. Die Probe wird mittels Vortexer erneut homogenisiert, bei 4000g für fünf Minuten zentrifugiert und der neue Überstand vorsichtig abpipettiert. Dann wird 1ml einer Lösung mit 60% Ethanol und 40% PBS zu der Probe gegeben und diese bei -20°C konserviert.

CFU-Proben

Für die CFU-Bestimmung gesammelten Proben werden sofort nach dem Transport ins Labor mit 1ml PBS-Lösung vermengt um Austrocknung zu vermeiden. Danach werden die Köttel mit einer abgebrochenen sterilen Impföse zerkleinert und mit dem Vortexer homogenisiert. Um eine genauere Auszählung der CFU zu erlauben, wird eine Verdünnungsreihe durchgeführt, bevor der homogenisierte Stuhl auf die Agarplatten aufgetragen wird. Für die Verdünnungsreihe werden Eppendorfgefäße mit einem Volumen von 1,5ml verwendet, die mit 900µl PBS vorbefüllt wurden. Zu diesen 900µl PBS werden 100µl der Stuhlprobe gegeben um für die erste Verdünnungsstufe eine Verdünnung von 1:10 zu erreichen. Je nach Beprobungstag und erwarteter Keimlast werden bis zu vier Verdünnungsstufen gemacht, wobei die am geringsten konzentrierte eine Verdünnung der Originalprobe von 1:10000 aufweist. Nach gründlicher Vermischung mittels Vortexer zwischen den einzelnen Verdünnungsschritten werden 100µl der verdünnten Proben auf die entsprechenden Agarplatten aufgetragen. Für beide Gruppen wurden hauseigene Endo-Agarplatten verwendet, auf der sowohl *P. aeruginosa*, als auch *E. coli*-Stämme wachsen. Für die *P. aeruginosa*-Gruppe wurden zusätzlich zu den Endo-Agarplatten auch Cetrimidagarplatten verwendet, die für *P. aeruginosa* selektiv sind. Die Cetrimidplatten ermöglichen eine genauere Auszählung der *P. aeruginosa*-CFUs und das *P. aeruginosa*-Wachstum wird auf diesem Agar nicht durch sonstige Bakterien behindert. Für die *E. coli* Nissle RR Gruppe wurden zusätzlich zu den Endo-Agarplatten LB-Rifampicin-Agarplatten verwendet, um den Rifampicin-resistenten Referenzorganismus zu selektionieren. Diese LB-

Rifampicin-Agarplatten wurden von der Nährbodenküche des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Tübingen nach der Standardrezeptur für LB-Agar nach Miller mit einem Zusatz von 150µg/ml Rifampicin hergestellt. Im Aufbau des Kolonisationsmodells zeigte sich bei Stuhlproben unbehandelter Tiere kein Wachstum auf LB-Rifampicin-Agarplatten, sodass Rifampicin-Resistenz einen geeigneten Selektionsmarker für den Nachweis des über das Trinkwasser zugegebenen *E. coli* Nisse darstellt. Die Anwendung dieses Selektivmediums ermöglicht in Zusammenschau mit den Endo-Agarplatten die Unterscheidung zwischen der CFU-Anzahl von physiologischen, endogenen *E. coli* und der Anzahl von exogen mittels Trinkwasser zugeführten *E. coli* Nisse mit Rifampicinresistenz.

2.1.7 DNA-Extraktion aus Nativstuhlproben

Die Quelle für die extrahierte DNA waren die bei -80°C aufbewahrten Nativstuhlproben. Die Extraktion erfolgte nach einem an der Universität Kopenhagen sehr gut etablierten und erfolgreichen Protokoll, das DNA in ausgezeichneter Qualität liefert. Hierzu wurden primär die bakteriellen Zellen im Nativstuhl chemisch und mechanisch lysiert. Es folgte eine Elimination von Debris, Proteinen und aromatischen Verbindungen. Anschließend wurde die in den Proben enthaltenen RNA enzymatisch verdaut, sodass nur die zu amplifizierenden DNA verblieb. Zum Schluss wird die gereinigte DNA mittels Ethanol präzipitiert und bei -20°C gelagert.

Im Detail sah das Extraktionsverfahren folgende Schritte vor: Von jeder Probe wurden jeweils 200mg Faeces in Reaktionsgefäße mit einem Volumen von 2ml gegeben. An jedem Tag, an dem DNA-Extraktionen durchgeführt wurden, wurde auch ein leeres Reaktionsgefäß nach dem Protokoll behandelt, der später als Kontrolle für die Sauberkeit der durchgeführten Isolation dienen sollte. Pro Reaktionsgefäß wurden 250µl Guanidinthiocyanat und 40µl 10%-iges N-

Laurylsarcosin addiert. Dann wurden zehn Minuten abgewartet, sodass der noch gefrorene Stuhl auftauen konnte. Im nächsten Schritt werden 500µl 5%-iges N-Laurylsarcosin zugegeben und die Stuhlköttel mittels abgebrochenen, sterilen Impfösen zerkleinert. Es folgte die Homogenisierung mit Vortexer. Um die Reagenzien einwirken zu lassen, wurden die Proben für etwa 5 Sekunden bei 14 000rpm zentrifugiert und für eine Stunde im Heizblock bei 70°C inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben nochmal mechanisch homogenisiert, indem pro Probe ca. 750µl Glaskügelchen mit einer Größe von 0,1mm zugefügt wurden und auf einem horizontalen Vortexer 10 Minuten lang geschüttelt wurden. Zu den vollständig lysierten Nativstuhlproben wurden dann jeweils 15mg Polyvinylpyrrolidon zugegeben um Debris auszufällen und im Pelett abzuwerfen. Dann folgte erneutes Vortexen, bis das Polyvinylpyrrolidon nicht mehr auf der Oberfläche des Gemisches zu sehen ist. Im nächsten Schritt wurden die Proben für drei Minuten bei 14 000rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde vorsichtig in jeweils ein neues Eppendorfgefäß mit der Pipette überführt.

Der übriggebliebene Bodensatz wurde mit 500µl TENP Lösung (50M Tris Puffer mit pH 8, 20mM EDTA mit pH 8, 100mM NaCl, 1% PVPP in einem Verhältnis von 1,5:1,2:0,6:0,3) gewaschen und gevortext. Es erfolgte erneutes Zentrifugieren für drei Minuten bei 14 000rpm. Der entstandene Überstand wurde vorsichtig jeweils zu dem entsprechenden bei den vorigen Schritten entstandenen Überstand dazu pipettiert. Diese Waschung erfolgte insgesamt drei Mal, sodass ca. 1500µl Überstand resultierten, die den davor entnommenen 500µl addiert wurden. In der Summe kumulierten nach den Waschungen ca. 2000µl Überstand.

Diese ca. 2ml Überstand wurden dann für drei Minuten bei 14 000rpm zentrifugiert, sodass grobe Partikel als Bodensatz bleiben. Der sich dabei gebildete Überstand wurde jeweils auf zwei neue Eppendorfgefäße verteilt. Pro Reaktionsgefäß wurden 1ml Isopropanol dazupipettiert. Die Proben werden für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine erneute

Zentrifugation für zehn Minuten bei 14 000rpm, nach welcher der Überstand entfernt und entsorgt wurde. Die Pellets werden für 15 Minuten unter dem Abzug belassen, bis sie komplett getrocknet waren und keine Spuren von Flüssigkeit mehr aufwiesen. Dann wurden sie jeweils in 450µl Phosphatpuffer und 50µl Kaliumacetat aufgelöst und wieder in ein gemeinsames Eppendorfgefäß pro Nativstuhlprobe zurück überführt. Im nächsten Schritt wurden die soweit aufbereiteten Proben für mindestens 1,5 Stunden auf Eis gelagert.

Nach dieser Inkubation erfolgte eine 35-minütige Zentrifugation bei 14 000rpm. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße transferiert, zu denen 2µl RNase mit einer Konzentration von 10mg/ml gegeben wurde und die Proben wurden anschließend für 30 Minuten bei 37°C im Heizblock inkubiert, sodass das Enzym aktiviert wurde und vorhandene RNA-Reste verdaut wurden.

Nach Ablauf des RNA-Verdaus wurden zu den Proben 50µl Natriumacetat und 1ml auf -20°C gekühltes 100%-iges Ethanol zugegeben. Im nächsten Schritt wurde bei 14 000rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dann aspiriert und verworfen. Es erfolgte eine zweite Waschung, diesmal mit 1ml 70%-igem Ethanol, Zentrifugation, Aspiration und Verwerfen des Überstands. Der letzte Waschschrift wurde ein weiteres Mal durchgeführt, diesmal aber mit 500µl 70%-igem Ethanol (-20°C). Die entstandenen Pellets wurden dann für 15 Minuten bei 37°C im Heizblock getrocknet. Nachdem die Proben wieder flüssigkeitsfrei waren, wurden sie in 50µl TE Puffer (10mM Tris Puffer mit pH 8, 1 mM EDTA mit pH 8 und sterilem, pyrogen- und nukleotidfreiem Wasser in einem Verhältnis von 100:2:1) resuspendiert. Dann wurden die aufgereinigten DNA-Proben bei -20°C aufbewahrt.

2.1.8 Qualitätskontrolle der gewonnenen DNA

Die aus den Nativstuhlproben isolierte DNA durchlief eine Qualitätskontrolle in Bezug auf Reinheit und Konstanz der Größe der enthaltenen DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese.

Zu diesem Zweck wurden Agarose-Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,75% gegossen. Die Herstellung der Gele erfolgt aus 1,5g Agarose-Pulver (Fa. Sigma-Aldrich®) und 200 ml 0,5-TBE-Puffer. Pro Gel wurden zwei Kämmen für jeweils zwanzig Geltaschen benutzt, sodass im Gel zwei Reihen à 20 Taschen entstanden. Am Anfang jeder Reihe wurde eine DNA-Leiter (Gene Ruler™ von Firma Thermo Scientific®) mit maximaler Fragmentgröße von 100 bp aufgetragen. Dann wurden pro Gel insgesamt 30 DNA-Proben mit ihren entsprechenden drei Kontrollproben aufgetragen. Die Elektrophorese lief für eine Stunde bei 60 mV Spannung in einem PowerPac 200-Gerät der Firma BioRad®.

Nach Ablauf der Gelelektrophorese wurden die Gele für 10 Minuten in eine Ethidiumbromidlösung gelegt, angefärbt und anschließend für 10 Minuten im Wasserbad gewaschen. Es folgte die Analyse der Gele mit UV-Kammer und -Kamera, mit der Gelbilder angefertigt und für weitere Analysen gesichert wurden.

2.1.9 Konzentrationsbestimmung der gewonnenen DNA

Eine der Voraussetzungen für die erfolgreiche Next-Generation-Sequenzierung der 16S rRNA mittels einem Illumina MiSeq® Gerät ist es, DNA-Proben mit einer bestimmten bekannten Konzentration (50 ng/µl) in das Sequenziergerät zu laden. Das setzt seinerseits voraus, dass die Konzentration der extrahierten DNA bekannt ist und ggfs. angepasst werden kann. Für die Messung der Konzentration wurde ein TECAN® Infinite 200 PRO Multimode-Reader-Gerät und ein Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Detektionskit angewendet.

Von jeder Probe wurde zuerst eine Verdünnungsreihe mit zwei Verdünnungsstufen durchgeführt. Diese wiesen eine Verdünnung von 1:10 für die erste bzw. 1:100 für die zweite Verdünnungsstufe auf. Da jede Probe aus DNA in insgesamt 50µl TE Puffer besteht, wurden für die erste Verdünnungsstufe 2,5µl von der Probe in 25µl nukleasefreies Wasser zugegeben. Von dieser Verdünnungsstufe wurden dann wiederum 2,5µl zu 25µl nukleasefreiem Wasser hinzugegeben, um die für die zweite Stufe notwendige Verdünnung zu erreichen.

Bevor die DNA-Proben auf die für die Konzentrationsbestimmung angewendeten 96-Well-Platten aufgetragen wurden, mussten die Wells entsprechend der Anleitung des DNA-Detektionskit vorbereitet und befüllt werden. Es wurden schwarze 96-Well-Platten mit flachem Boden der Firma Greiner Bio-One® benutzt. In den ersten zwei Spalten der 96-Well-Plate wird ein in TE Puffer aufgelöster dsDNA-Standard in von A nach H aufsteigender Konzentration (2,5%-100%) pipettiert. Die restlichen Wells werden jeweils mit 99µl TE Puffer (gleiche Zusammensetzung wie bei der DNA-Extraktion) befüllt. Anschließend wird in diese Wells je 1µl DNA-Probe übertragen, sodass jede einzelne DNA-Probe in den beiden verschiedenen Verdünnungsstufen auf die Platte repräsentiert ist. Ziel ist zum einen, bei der Messung festzustellen, welche Verdünnungsstufe innerhalb des vom dsDNA-Standard gebildeten Referenzbereich liegt. Zum anderen sollen über Differenzen im gemessenen Fluoreszenzsignal der gleichen Probe mögliche Pipettierfehler detektiert werden.

Das entsprechende Pipettierschema kann der Abb. 2 entnommen werden:

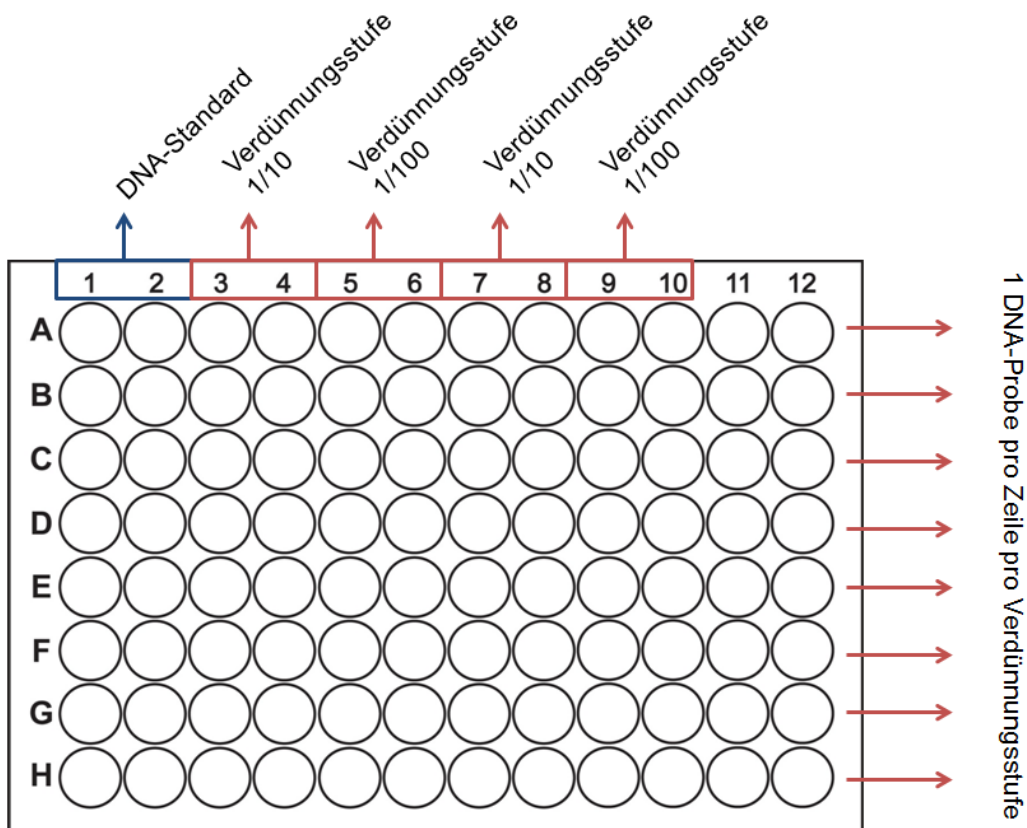


Abb. 2: Pipettierschema der DNA-Konzentrationsmessungen. Es ist eine 96-Wellplatte mit der für die DNA-Konzentrationsmessung durchgeführte Wellbesetzung schematisch dargestellt. In den ersten zwei Spalten (1 und 2) wurde der DNA-Standard eingetragen in einer von A nach H aufsteigenden Konzentration. In den restlichen Spalten wurden die isolierten DNA-Proben eingetragen, sodass jede Probe zwei Mal pro Verdünnungsstufe (insgesamt vier Auftragen pro Probe) aufgetragen wurde.

Etwa zehn Minuten bevor die Fluoreszenzmessung begonnen wurde, wurde die Färbelösung aus 11ml TE Puffer und 12µl Fluoreszenzfarbstoff zubereitet und pro Well wurden 100 µl davon zugegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von 3-5 Minuten, nach der die tatsächliche Fluoreszenzmessung begann.

Die Fluoreszenzmessung erfolgte mit der Tecan i-control Software (Version 1.10.4.0) und es wurden die folgenden Messparametereinstellungen vorgenommen:

- Mode: Fluorescence Top Reading
- Excitation Wavelength: 485nm
- Emission Wavelength: 530nm
- Excitation Bandwidth: 9nm
- Emission Bandwidth: 20nm
- Gain: 80 Optimal (100%)
- Number of Flashes: 25
- Integration Time: 20 μ s
- Lag Time: 0 μ s
- Settle Time: 0ms
- Temperatur: 37,1°C

2.1.10 Sequenzierung der gewonnenen DNA und DNA-Datenanalyse

Die aus den gesammelten Nativstuhlproben extrahierte DNA wurde sequenziert zum Zweck einer 16S rRNA-Analyse. Diese Analyse der verschiedenen in den Nativstuhlproben vorhandenen 16S-rRNA-Gen-Sequenzen erlaubt aufgrund des im diesen Gen vorkommenden hohem Gehalt an hoch konservierten Genregionen eine taxonomische Zuordnung der im Mäusestuhl vorhandenen Bakterien in den verschiedenen Phasen der Kolonisationsversuche und somit auch eine Identifizierung von während des Versuchs ablaufenden Veränderungen der bakteriellen Komposition des Mikrobioms.

Die Sequenzierung der Proben wurde extern von Firma Eurofins Genomics® GmbH mit Sitz in Ebersberg durchgeführt.

Als Sequenzierungsmethode wurde das Next-Generation-Sequencing-Verfahren mittels Brückensynthese und Sequencing-by-Synthesis der Firma Illumina® auf einem MiSeq-Gerät unter Verwendung der Illumina v3 Kit und Protokoll eingesetzt. Es wurden die variablen Regionen V3-V5 des 16S-Gens sequenziert.

PCR-Produkte von einer Länge zwischen 500 und 550 bp wurden generiert und zw. 30 Millionen und 50 Millionen Reads gelesen.

Anschließend wurden die Sequenziererergebnisse bioinformatisch analysiert. Wie im Punkt 1.5, Unterpunkt 3 beschrieben, ist das Ziel dieser bioinformatischen Analyse von Sequenzierungsergebnissen einen möglichen Zusammenhang zwischen verschiedenen Ausmaßen einer Kolonisation und verschiedenen Zusammensetzungen des intestinalen Mikrobioms herzustellen. Hierfür machte man sich die Identifikation der sog. „Relative Abundance“ zunutze – ergo die Bestimmung der relativen Häufigkeit von Reads, welche die relative Häufigkeit von Bakterien widerspiegelt. Eine solche Korrelationsanalyse setzte einerseits die Richtigkeit der sequenzierten Reads (gute Qualität der Sequenzen, i.e. möglichst wenige fehlerhaft gelesene Basen in einem Read) und andererseits eine ausreichend hohe Spezifität dieser Reads (ausreichende Sequenziertiefe, i.e. eine Länge des Reads, die eine möglichst konkrete Zuordnung des Reads zu einem Organismus erlaubt) voraus.

Das waren wichtige Voraussetzungen für ein valides Ergebnis. Demzufolge müssten die Sequenziererergebnisse vor der Durchführung der Korrelationsanalyse hinsichtlich ihrer Qualität untersucht werden und Reads mit einer nicht zufriedenstellenden Qualität bei der weiteren Analyse nicht in Betracht gezogen werden bzw. so bearbeitet werden, dass ihre Qualität optimiert wurde. In der weiteren Analyse wollte man auch Reads behalten, die eine ausreichende Länge haben, sodass ihre Sequenz spezifisch genug einem Organismus möglicherweise genauer als auf Genusebene zugeordnet werden könnte. Methodologisch bedingt wäre das nicht immer möglich, da mit der Zunahme der gelesenen Länge einer Sequenz die Wahrscheinlichkeit für das falsche Sequenzieren einer zu der Sequenz gehörenden Base steigt. Das bedeutet, dass lange Sequenzen möglicherweise falsch sind, i.e. eine niedrige Qualität besitzen. Die sich daraus ergebende Konsequenz ist, dass man ein Kompromiss zwischen Qualität und Länge der Sequenz, also zwischen Richtigkeit und Spezifität des Ergebnisses treffen musste.

Um so eine Abwägung treffen zu können, wurde das FastQC Software (Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, UK) benutzt. Dieses Tool gibt die Qualität des Reads in Abhängigkeit von seiner Länge in der Form eines Scores an. Ein Score von 30 Punkten entspricht einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 0.001. Der Q30-Wert wurde bei den in dieser Arbeit sequenzierten Proben bei einer Readlänge von ca. 200bp unterschritten. Um für die weiteren Analysen nur Reads zu behalten, die mit der oben angegebenen Wahrscheinlichkeit nicht falsch sind, wurden alle sequenzierte Reads mit dem PRINSEQ Softwareskript (Schmieder R und Edwards R) auf eine Readlänge von 200bp gekürzt. Da aber FastQC und PRINSEQ nicht sicherstellen könnten, dass die Qualität des Reads innerhalb der ersten 200bp nicht den Q30-Wert unterschreitet, wurde weiter mit der Sickle Software (Joshi NA, Fass JN) eine Bearbeitung vorgenommen, bei der nur Reads behalten wurden, die einen Qualitätsscore-Wert von 25 nicht unterschreiten und gleichzeitig eine Länge von mindestens 175bp besitzen. So werden Reads herausgefiltert, die zwar eine gute Qualität haben, aber nicht eine für eine phylogenetische Zuordnung brauchbare Länge besitzen, da zu kurze Reads sehr unspezifisch sein können und beispielsweise keine Genus- oder Spezies-Zuordnung erlauben. Aus dem Datensatz an Reads müssten auch noch sog. chimäre Sequenzen entfernt werden. Chimäre Sequenzen sind Artefakte, die bei der Sequenzierung aus mindestens zwei unterschiedlichen, nicht zueinander gehörenden Muttersequenzen entstehen. Somit sind sie ein künstliches Nebenprodukt der Sequenzierung, gehören zum eigentlichen Ursprungsmaterial der Sequenzierung nicht dazu, können nicht oder nur fehlerhaft zu einer Datenbank zugeordnet werden und würden die Korrelationsanalyse verfälschen. Diese chimären Sequenzen wurden aus dem Datensatz mit Hilfe des Uchime Tools (Edgar et al.) nach der de-novo Methode und nicht mittels eines Abgleichs mit einer Sequenzdatenbank entfernt.

Im nächsten Schritt erfolgte die taxonomische Attributierung der Reads mit der MALT Software (MEGAN alignment Tool, Huson et al.) im Sinne eines Sequenzdatenbankabgleichs (SILVA Database, Quast et al.) zu der möglichst genauesten taxonomischen Bezeichnung, wobei eine Zuordnung auf Spezies-

Ebene bei der gelesenen Readslänge nur selten möglich sein könnte. Es wurden Dateien (CSV-Format) hergestellt, die für die Errechnung der oben beschriebenen „Relative Abundance“ mit der MEGAN Software (Huson et al.) und Microsoft Excel erfolgte. Für die Attributierung wurde die „semi global“ Einstellung mit ID90 verwendet. Das bedeutet, dass für eine Zuordnung eines Reads zu einer taxonomischen Klasse eine Sequenzübereinstimmung zwischen Sequenzierungsergebnis und Datenbank von mindestens 90% bestehen muss.

Die tatsächliche Analyse der Korrelation zwischen der *Pseudomonas aeruginosa* CFU-Anzahl auf Agarplatte und der durch Reads-Anzahl quantitativ identifizierten anderen Bakterien wurde dann aus den wie oben beschriebenen vorselektionierten Reads mit Hilfe von MEGAN und dem R Script (Ihaka R, Gentleman R) durchgeführt. Um eine einheitliche Konsistenz der Ergebnisse zu erreichen wurden nur die sequenzierten Taxa korreliert, die bei allen Versuchstieren zu allen Zeitpunkten des Experiments vorkamen. Bakterien, die nicht im Darmmikrobiom von allen Mäusen und/oder nur in sequenzierten Proben von bestimmten Tagen (und nicht an allen Zeitpunkten) vorkamen, wurden aus diesem Grund bei der Korrelationsanalyse nicht berücksichtigt. Anschließend wurde die „corrplot“ Funktion von R benutzt, um die Korrelationen zwischen der normalisierten Reads-Zählung aller diesen Bakterien und den manuell gezählten *P. aeruginosa*-CFU aus dem Stuhl zu kalkulieren. Mit dieser Funktion wurden sog. Heatmaps erstellt, auf denen die Korrelationsstärke (positiv oder negativ) der in Wechselbeziehung stehenden Faktoren farblich kodiert ist.

2.2 Modifikation des Kolonisationmodells mit Exposition gegenüber dem Antibiotikum Ciprofloxacin in der präexpositionellen Versuchsphase

Um die Effekte einer antibiotischen Exposition auf den Ausprägungsgrad der Kolonisation zu untersuchen, wurden anhand des bereits etablierten Kolonisationsmodells weitere Experimente konzipiert und durchgeführt. Bei

diesen Versuchen wurde nach der Akklimatisations- und vor der Expositionsphase eine zusätzliche Phase mit einer Dauer von sieben Tagen eingeführt, in welcher den Mäusen das Antibiotikum Ciprofloxacin oral verabreicht wurde. Damit sollte die Hypothese untersucht werden, dass die eventuell durch das Medikament verursachte Schädigung und Veränderung der intestinalen Mikrobiota zu einer Verminderung der Kolonisationsresistenz des Intestinums führt.

Im Speziellen wird Ciprofloxacin aufgefieberten, immunsupprimierten Patienten auf hämatonkologischen Stationen verordnet, um zeitnah und noch vor Keimnachweis eine breite Antibiose einzuleiten. Ciprofloxacin gehört zu der Gruppe der Flouorchinolone und hat einen zytotoxischen Effekt auf Bakterien. Dieser beruht auf einer Hemmung der Replikation. Diese wird erreicht indem spezifisch die bakterielle Gyrase gehemmt wird, sodass die Stränge der bakteriellen DNA für eine Transkription unzugänglich bleiben. Das Antibiotikum hat ein breites Wirkspektrum mit einem Fokus im Gram-negativen Bereich. Abgesehen von immer häufiger werdenden Resistenzen humanpathogener Keime, ist dieses Medikament i.d.R. noch gegen *Enterobacteriaceae* effektiv.

Wenn man von einer Kolonisationsresistenz ausgeht, die auf bakteriell-bakterieller Interaktion beruht, bei der also die Darmflora gegen potenzielle Eindringlinge schützt, sollte eine Eradikation der endogenen physiologischen *E. coli* und anderer *Enterobacteriaceae* mittels Ciprofloxacin die Kolonisationsresistenz senken und zum Beispiel durch das Freiwerden ökologischer Nischen im Mikrobiom eine stärker ausgeprägte Kolonisation durch *P. aeruginosa* erlauben. Wenn die Kolonisationsresistenz dagegen überwiegend durch das Immunsystem gewährleistet wird, so sollte in diesem Fall eine antibiotische Schädigung der intestinalen Mikrobiota keinen besonderen Einfluss auf das Ausmaß der Kolonisation haben.

Der zeitliche Ablauf dieser Versuchsreihe ist in der folgenden Abb. 3 dargestellt:

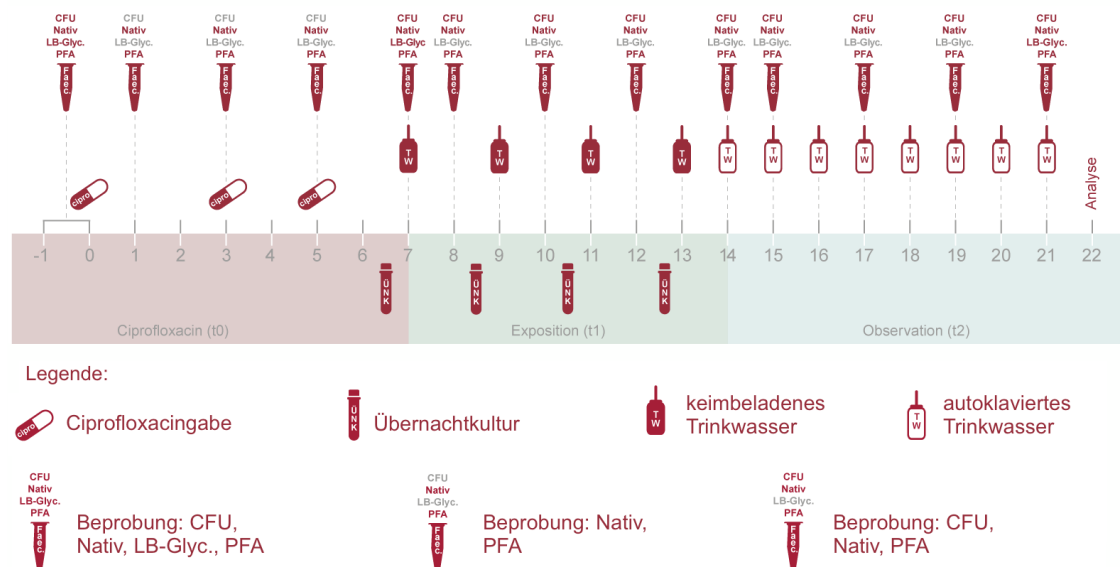


Abb. 3: Schematische Darstellung des Ablaufs der Versuchsreihe. In dieser Abbildung ist die durchgeführte Akklimatisationsphase von mind. 4 Tagen nicht dargestellt. Die dargestellte Zeitachse beginnt mit der sieben-tägigen Applikation von Ciprofloxacin (t0). Es folgen die bakterielle Expositionsphase (t1), wie in der vorherigen Versuchsreihe (siehe Abb. 1) und die konsekutive Observationsphase (t2). Die Gesamtdauer der Versuchsreihe dauert 22 Tage inklusive dem Analysetag. Die Applikation des Antibiotikums, das Ansetzen von Übernachtkulturen mit den Expositionsbakterien, das Anbringen von keimbeladenem Trinkwasser, der Tausch gegenüber autoklaviertem Trinkwasser und die Sammlung entsprechender Stuhlproben sind respektiv den Tagen ihrer Durchführung über der Zeit aufgetragen.

Nach Lieferung und Einschleusen der Mäuse in den Tierstall, folgte zunächst eine kurze Akklimatisationsphase von mind. vier Tagen, die in der obigen Abbildung nicht dargestellt ist. Nach Akklimatisierung aber vor Beginn der Interventionen (Tag -1 bzw. 0) erfolgte eine Stuhlbeprobung der Tiere (n = 10) vor der ersten Gabe von Ciprofloxacin. Das Antibiotikum wurde in einer Dosis von 1000 mg/70kg Körpergewicht den Mäusen mit dem Trinkwasser oral verabreicht. Diese Dosierung entspricht jener, die Patienten mit Fieber auf hämatoonkologische Stationen leitliniengerecht mit einer prophylaktischen Intention bekommen (DGHO-Leitlinien „Infektionen bei hämatoonkologischen Erkrankungen“ 8/2014). Die Gabe lief über 7 Tage und war auf drei Flaschen verteilt, wobei die erste für drei Tage und die nächsten beiden für je zwei Tage an den Käfigen verblieben. Die weiteren Beprobungszeitpunkte können dem obigen Schema entnommen werden. Im Anschluss an die Gabe des Antibiotikums (t0) folgte die Phase der bakteriellen Exposition, die in Ablauf und Aufbau den anderen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten bakteriellen

Expositionen identisch ist. Nach Ablauf der Expositionsphase folgte eine Observationsphase von 7 Tagen, in der parallel zu der Ermittlung des Kolonisationsverlaufs die üblichen (siehe Punkt 2.1) Maßnahmen zur Vermeidung einer autologen Reexposition mit *P. aeruginosa* berücksichtigt wurden. Wie die Proben behandelt und welche Informationen anhand der Proben gesammelt und analysiert wurden, ist in Punkt 2.1.6. näher beschrieben.

2.3 Modifikation des Kolonisationsmodells mit intragastral verabreichter Fäkaltransplantation in der postexpositionellen Phase

Die bereits in der Literatur als in bestimmten Settings erfolgreich beschriebene Transplantation von Stuhl [70, 71, 74, 76, 88, 89, 91] wurde auch als mögliche Methode zur Modifikation des Kolonisationsverhaltens von *P. aeruginosa* getestet. Der Aufbau dieser Versuchsreihe ist in Abb. 4 abgebildet:

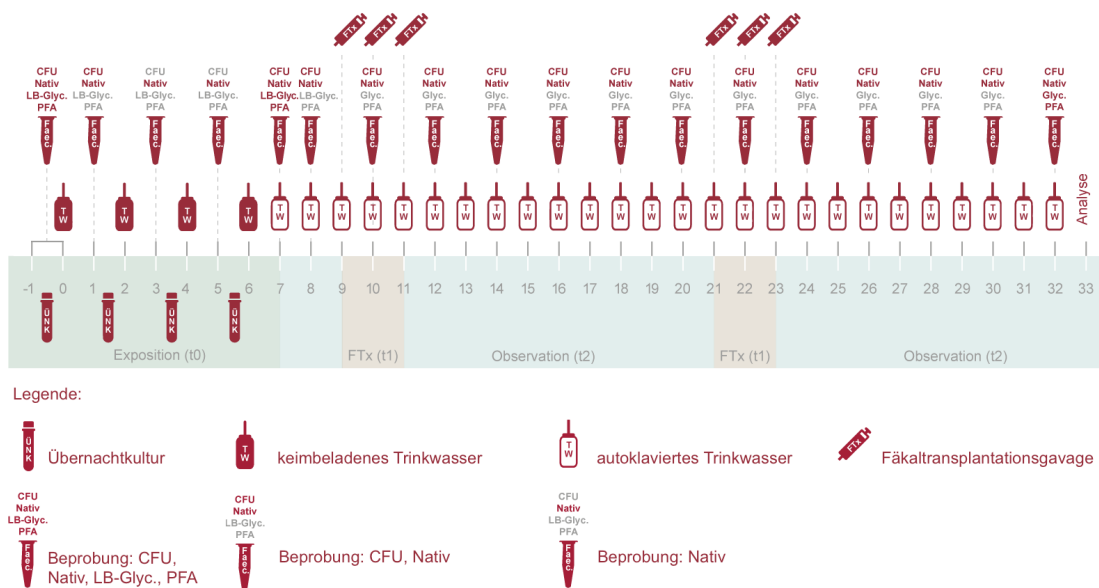


Abb. 4: Schematische Darstellung des Ablaufs der Versuchsreihe. Dem tatsächlichen Beginn der Versuchsreihe ist eine Akklimationsphase mit einer Dauer von mind. 4 Tagen vorgeschaltet, die in dieser Abbildung nicht dargestellt ist. Am Anfang der Zeitachse steht die bekannte Expositionsphase (t0) mit einer Zeitdauer von 7 Tagen. Auf die Expositionsphase folgte die Observationsphase (t2), innerhalb welcher zwei Fäkaltransplantationsserien (Tag 9, 10, 11 und Tag 21, 22, 23) stattfanden. Die Gesamtdauer der Versuchsreihe beträgt 33 Tage inklusive dem Analysetag. Die Stuhlgavagen, das Ansetzen von keimbeladenem Trinkwasser, der Austausch gegenüber autoklaviertes Trinkwasser und die Sammlung entsprechender Stuhlproben sind respektiv den Tagen ihrer Durchführung über der Zeit aufgetragen.

Vor dem Beginn der Versuchsreihe werden den Mäusen vier Tage zur Akklimatisation gegeben. An Tag 0 wird die Exposition mit *P. aeruginosa* begonnen. Diese Phase ist mit den Expositionsphasen der anderen Versuchsreihen identisch, i.e. eine Exposition mittels mit *P. aeruginosa* in einer Konzentration von 5×10^7 Bakterien/ml versetztem Trinkwasser findet über 7 Tage statt. Das Sammeln von Stuhlproben erfolgte zu den in Abb. 4 dargestellten Zeitpunkten. Zwei Tage nach dem Absetzen der keimbeladenen Wasserflaschen und ihrem Austausch durch autoklaviertes Trinkwasser (Tag 7) erfolgte die erste Stuhlstransplantation. Diese wurde durchgeführt, indem jeder Maus 200µl des FTx-Pools auf drei aufeinanderfolgenden Tagen per intragastraler Gavage zwangsgefüttert wurden. Diese erfolgte mit einem sterilen, 20 Gauge starken peripheren venösen Katheter (Vasofix® Safety, Firma Braun, Melsungen) und einer sterilen 1ml Feindosierungsspritze (Injekt®-F, Firma Braun, Melsungen), in welcher davor die zu gebenden 200µl Fäzes des FTx-Pools unter der Sterilbank aufgezogen wurden. Es wurden nur die flexiblen Plastikbestandteile der PVK benutzt (Plastikschlauch ohne die zur Schienenung dienende Metallkanüle). Das Aufziehen der Fäzes erfolgte so, dass jede Spritze einzeln mit der Hilfe eines neuen PVKs befüllt wurde. Danach wurden die für das Aufziehen verwendeten PVK entsorgt und neue, nur für die Gavage vorgesehene PVK auf die Spritzen aufgesetzt. Vor der Gavage wurde jede Maus in einem sauberen Plastikbeutel mit einem CO₂/O₂-Gasgemisch (Verhältnis 1:19) für etwa 20 Sekunden betäubt, aber mindestens so lange, bis die Schutzreflexe des Tieres erloschen waren (keine Bewegung bei leichtem Schütteln). Anschließend wurden die Tiere mit Daumen und Zeigefinger an der Nackenfalte und mit dem kleinen Finger und der gleichseitigen Handfläche am Schwanz fixiert und dann nach ventral gedreht. Nach der Fixierung mit diesem Handgriff folgte das intragastrale Einführen des PVKs. Das Einführen der Katheter erfolgte oral von der rechten Seite der oberen und unteren Schneidezähne der Mäuse, der anatomischen Krümmung des Ösophagus folgend, bis etwa der komplette Plastikschlauch des PVKs in den oberen Gastrointestinaltrakt der Mäuse gelangt. Zu dem Zeitpunkt sind die PVK mit den entsprechenden Fäzes enthaltenden Spritzen konnektiert. Nach Einführen bis zu der oben beschriebenen Tiefe erfolgte das Injizieren der Fäzes.

Die zweite Gavageserie von drei Stuhltransplantationen wurde am Tag 21 der Versuchsreihe begonnen, nachdem der erste Teil der Observationsphase abgelaufen war. Nach der dritten Gabe folgte der zweite Teil Observationsphase über eine Dauer von neun Tagen, während welcher erneut Veränderungen im Ausmaß der PAO1-Kolonisierung per CFU-Bestimmung ermittelt wurden.

Am Tag 33 (Analyse) wurden die Mäuse mit CO₂ anästhesiert und erstickt. Für die Sicherstellung eines definitiven Todes der Versuchstiere während der Präparation, erfolgte nach dem Ersticken die zervikale Dislokation. Im nächsten Schritt erfolgte die Präparation. Ziel der Präparation war die Entnahme der folgenden Organe: (Herz-)Blut, Lunge, Leber, Milz und mesenteriale Lymphknoten. Diese wurden anschließend homogenisiert und auf Columbia-Schafsblutagarplatten aufgetragen. Die Organe wurden gewogen, um ein eventuelles CFU-Auftreten auf ihr Gewicht relativieren zu können. Ein fehlendes Wachstum von bakteriellen Kolonien auf den Agarplatten wäre mit einer intestinalen Kolonisation ohne feststellbare Translokation von *P. aeruginosa* aus dem Darm ins Blut und andere Organe vereinbar.

Jede Maus wurde einzeln seziiert, um Kontaminationen zwischen den Kadavern zu vermeiden. Die entnommenen Organe und das Blut werden separat in sterile Eppendorfgefäße überführt. Dem Blut werden 1ml PBS-Lösung zugegeben, um ein Ausplattieren der verdünnten Probe zu erleichtern und eine den anderen Organen ähnliche Verdünnung zu erreichen. Im nächsten Schritt werden die soliden Organe aus den Eppendorfgefäße herausgenommen und auf Zellsiebe mit einer Porengröße von 45µm überführt. Die Zellsiebe werden jeweils in die Öffnung eines 50ml-Reaktionsgefäß eingesetzt. Sie werden mit 500µl PBS angefeuchtet. Die anschließend darauf gelegten Organe werden mit dem sterilen Stempel einer 10ml Spritze zerpresst und zerrieben. Nachdem eine homogene Masse entstanden ist, werden weitere 500µl PBS zugegeben, um eine möglichst große Menge der homogenisierten Probe durch das Sieb zu spülen. 100µl der entstandenen Flüssigkeit werden unverdünnt auf Columbia-plus-Agarplatten

aufgetragen und gleichmäßig ausplattiert. Die Platten werden für ca. 18-24h bei 37°C bebrütet.

2.3.1 Donorenmausgruppe

Der Stuhl für den Fäkaltransplantationspool stammte von einer Gruppe aus fünf weiblichen, gesunden C57BL/6JOlaHsd Mäusen. Die Tiere wurden täglich über einer Zeitdauer von 21 Tagen beprobt: Es wurde pro Tag und Maus mindestens ein Stuhlköttel in jeweils 1ml LB-Glycerol gesammelt. Der Stuhl wurde dann zeitnah unter sterilen Bedingungen mechanisch homogenisiert und bei -80°C aufbewahrt. An jedem zweiten Tag wurde auch Nativstuhl gesammelt und ebenfalls bei -80°C aufgehoben. Die genauen Beprobungsintervalle sind der folgenden Abbildung (Abb. 5) zu entnehmen:

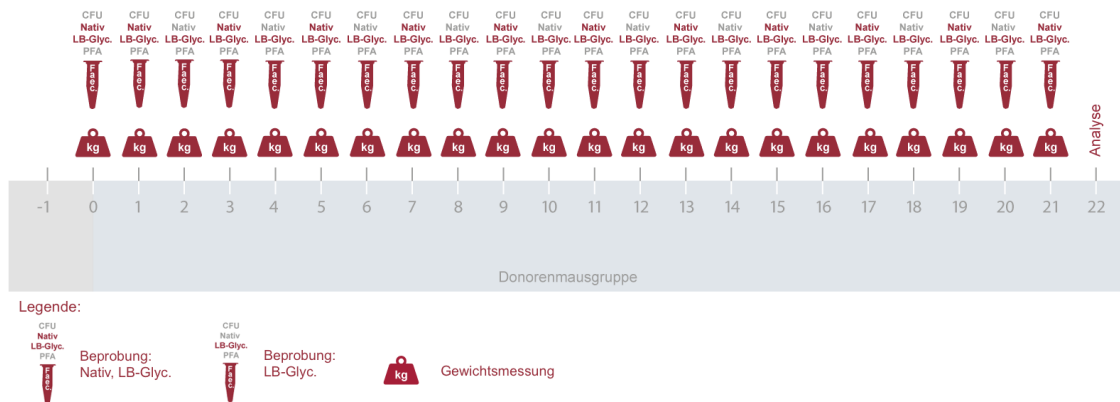


Abb. 5: Schematische Darstellung der Durchführung der Probenahme und Gewichtsmessung bei einer Donorenmausgruppe. Dem tatsächlichen Beginn der Versuchsreihe geht eine Akklimatisationsphase von mind 4 Tagen voraus, die in dieser Abbildung nicht dargestellt ist. Die Dauer der Versuchsreihe beträgt 22 Tage inklusive dem Analysetag. Die Sammlung entsprechender Proben sowie die Zeitpunkte der Gewichtsmessungen sind respektiv den Tagen ihrer Durchführung über der Zeit aufgetragen.

Die Donorengruppe dient auch anderen Zwecken: Ab dem ersten Beprobungstag wurde täglich das Gewicht der Mäuse gemessen. Anhand der gewonnenen Werte ließe sich eine Gewichtszunahmekurve über den zeitlichen Verlauf aufzeichnen

und für den Vergleich mit Interventionsgruppen nutzen (z.B. Gewichtsentwicklung von Mäusen, die eine Keimexposition hatten, kolonisiert und/oder antibiotisch vorbehandelt wurden). Diese Information könnte einen Hinweis über mögliche Einflüsse auf die normale Entwicklung der Mäuse durch die verschiedenen Modifikationen des Kolonisationsmodells sowie des Kolonisationsmodells per se geben.

Auch aus den Nativstuhlproben, die von der Donorengruppe gesammelt wurden, können zusätzliche Informationen gewonnen werden. Nach einer anschließenden DNA-Extraktion und 16S rRNA-Analyse werden Daten darüber gesammelt, ob und wie sich die Zusammensetzung der Darmmikrobiota gesunder Mäuse bei Abwesenheit von experimentellen äußeren Einflüssen (im Sinne von gezielten Keimexpositionen oder sonstigen Interventionen wie z.B. antibiotischer Behandlung oder Fäkaltransplantation) verändert. Der eventuell vorhandene Einfluss auf die Mikrobiotakomposition sollte insbesondere dann in Betracht gezogen werden, wenn die Veränderungen des Mikrobioms der Tiere des Kolonisationsmodells analysiert werden. Gemeinsame Veränderungen der verschiedenen Gruppen (Donorengruppe und Mausgruppen des Kolonisationsmodells und deren Modifikationen) wären dann gegebenenfalls nicht auf die Interventionen im Kolonisationsmodells zurückzuführen bzw. nicht für eine bestimmte Art von Intervention spezifisch. Theoretisch ist es möglich, dass die Veränderungen alleine auf Grund von Einflüssen stattfinden wie z.B. dem Einführen der Tiere in den Tierstall, aber eben nicht auf Grund von einer speziellen Intervention. Diese sollten dann eher als eine Art „Normalverlauf“ der Entwicklung des intestinalen Mikrobioms gesehen werden, da sie sowieso – ohne konkreten und/oder gezielten externen Einflüsse – geschehen.

2.3.2 Fäkalpool

Bei der Fäkaltransplantation im Fäkaltransplantationsversuch wurde der Fäkalpool nicht weiter physikalisch oder chemisch bearbeitet, sondern genau in der Form verwendet und appliziert, in der er sich zum Zeitpunkt der Konservierung befand. Der Fäkalpool beinhaltete den gesammelten Stuhl und LB-Glycerol 25% in einem Verhältnis von durchschnittlich 1 Stuhlköttelchen pro 1ml LB-Glycerol-Lösung. Am Tag vor der ersten Transplantation wurde die notwendige Menge bei Zimmertemperatur aufgetaut. Nach dem Auftauen der Fäkalpoolaliquots wurden diese für 1min bei 3000rpm zentrifugiert, sodass der LB-Glyc.-Überstand entfernt und durch PBS ersetzt werden kann. Nach dem PBS-Zusatz entstanden Fäkalpoolaliquots von jeweils 1ml Volumen. Von diesem Pool bekam jede Maus 200µl an drei aufeinanderfolgenden Tagen, wie unter Punkt 2.3. beschrieben. Diese FTx wurde dann 10 Tage später nach dem gleichen Protokoll (200µl pro Maus für 4d) ein zweites Mal durchgeführt. Es ist bekannt, dass eine zweite Fäkaltransplantationsserie zu einem besseren Ansprechen führt, welches auch länger anhält, sodass ein Rezidiv der Kolonisation weniger wahrscheinlich ist [92]. Entsprechend wurde sie auch in diesem Versuch angewendet und untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 *Pseudomonas aeruginosa* kolonisiert das murine Intestinum

Im ursprünglich etablierten Kolonisierungsmodell mit *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* Stamm-Nissle-Referenz wurden Stuhlproben gesammelt. Die Beprobung (für diesen Punkt der Arbeit sind die sog. CFU-Proben von Bedeutung) erfolgte in definierten Zeitabständen im Verlauf des Experiments, wie im Punkt 2.1.0. beschrieben. Die Beprobungszeitpunkte umfassten Beginn und Ende einer Phase (i.e. Expositionsphase t₁, Observationsphase t₂). Darüber hinaus waren auch Beprobungszeitpunkte vorhanden, die in der Mitte der entsprechenden Phasen gelegen waren. Diese Planung der Beprobung ermöglichte es, aus den an den Beprobungstagen gewonnenen Daten Kurven zu erstellen, die die CFU-Zahl der keimexponierten Mäuse über die Zeit zeigen. Für die Anfertigung dieser Kurven wurden die CFU-Daten der Selektivmedien verwendet. Das waren entsprechend bei der *P. aeruginosa*-Gruppe das Cetrimidagar, auf dem das Wachstum von nicht-Pseudomonaden inhibiert wird. Bei der *EcN*-Referenzgruppe das Rifampicin-haltige Medium, auf dem nur Rifampicin-resistente Mikroorganismen wachsen, was auf den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Nissle Stamm zutrifft. Die Verwendung dieser Selektivmedien ist deshalb von Vorteil, da eine Auszählung der Kolonien, aufgrund der Selektivität des Agars vereinfacht ist: Das Wachstum von konkurrierenden verschiedenen Bakterien der Flora ist gehemmt, da auf dem Agar in diesem Fall nur bestimmte bakterielle Arten wachsen können. Das führt zu einem Wachstum von Kolonien, welches durch so ein Störfaktor nicht beeinflusst wird und deswegen repräsentativer für die tatsächliche Bakterienanzahl im Stuhl ist.

Nach der Vollendung der Versuchsreihen zur Untersuchung einer möglichen Kolonisierung der Maus mit *P. aeruginosa* ließ sich die folgende Kurve erstellen:

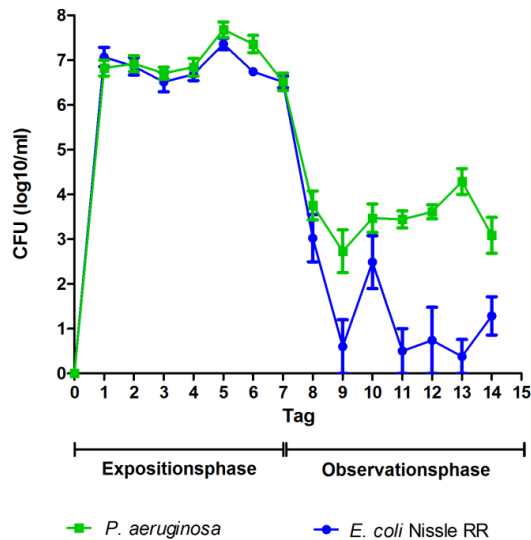


Abb. 6: Grafische Darstellung der Ergebnisse aus den Kolonisierungsversuchen mit *P. aeruginosa* (grün) und *E. coli* Nissle RR (blau). Am Tag 0 werden die beiden Mausgruppen mit dem entsprechenden Bakterium exponiert. In den sieben Tagen der Expositionsphase bildet sich ein stabiles Plateau von ca. 7 CFU (log₁₀/ml) in beiden Gruppen. Nach Beendigung der Exposition am Tag 7, nimmt die Bakterienmenge im Stuhl in beiden Gruppen ab. In der *EcN* RR Gruppe ist während der Observationsphase die Menge von *EcN* RR annähernd 0. In der *P. aeruginosa*-Gruppe dagegen bildet sich ein zweites Plateau von ca. 3,5 CFU (log₁₀/ml), das persistiert. Die *P. aeruginosa*-Mausgruppe bleibt nach einer Exposition kolonisiert.

Aus der Kurve wird der Verlauf der CFU-Anzahl der *P. aeruginosa*-Gruppe und der *EcN*-RR-Gruppe ersichtlich. Zu Beginn des Versuchs, nach der Akklimatisationsphase t₀ ist ein Anstieg der CFU-Anzahl in beiden Gruppen auf Werte von ca. 7 CFU log₁₀ pro ml zu erkennen. Da dieser Zeitpunkt den Anfang der Exposition darstellt, ist dieser CFU-Anstieg und das Vorkommen der verabreichten Bakterien im Stuhl ein logisches, erwartetes Ereignis. Im Verlauf der Expositionsphase t₁ bildet sich ein stabiles CFU-Plateau, welches sich zwischen Werten von 6,5 bis 7,8 CFU log₁₀ pro ml ausplattiertem Stuhl einpendelt. Die Gabe einer Konzentration von 5x10⁷ Bakterien/ml Trinkwasser der beiden Arten (*Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* Nissle) führt in beiden Gruppen, also Spezies-unabhängig, zu einem stark ausgeprägten Auftreten von den entsprechenden Bakterienarten im Darm in der Expositionsphase. Dies könnte bedeuten, dass beide Bakterienarten nicht wesentlich verschiedene initiales Kolonisierungsverhalten haben. Das liegt unter anderem daran, dass sie (in beiden Gruppen) den gleichen Wirt haben, in der gleichen Konzentration gegeben werden, und während dem Anfluten in den

Gastrointestinaltrakt wiederum eine ähnliche Konzentration erreichen. Die Unterschiede im Kolonisierungsverhalten der beiden Spezies werden nach Beendigung der Keimexposition durch den jeweiligen CFU-Verlauf in der anschließenden Observationsphase (t2) aufgezeigt. Hier sieht man das folgende Verhalten: Ab Tag 7 fällt die CFU-Anzahl in der *EcN*-Gruppe innerhalb eines Tages auf Werte von 3 CFU log₁₀/ml. Die *P. aeruginosa*-Gruppe zeigt am gleichen Tag ein identisches Verhalten, was bereits allein durch die Beendigung der Zufuhr von Bakterien erklärbar ist. Ab Tag 8 unterscheidet sich das CFU-Verhalten der Test- und der Referenzgruppe dagegen: In der *EcN*-Referenzgruppe fällt die CFU-Anzahl weiter. Das Auftreten von *Escherichia coli* Nissle Kolonien auf den Agarplatten vermindert sich, was einem sinkenden Vorkommen im Stuhl entspricht. In den acht Tagen der Exposition zeigt sich ein Auswaschen von *E. coli* Nissle aus dem murinen Intestinum. Die CFU-Werte dieser Gruppe zeigen über die Zeit der Observationsphase t2 ein annähernd konstantes Niveau von ca. 1 CFU log₁₀/ml, was sehr gering und extrem nah an der Nachweisgrenze dieser Methode ist (logarithmische Auftragung der Werte). Ein Niveau von 1 CFU log₁₀/ml lässt sich rechnerisch durch das Auftreten einer einzigen Kolonie auf einer Agarplatte zurückführen. Das Auftreten einer einzigen Kolonie kann wiederum als ein Zufallsereignis gedeutet werden. Somit ergibt sich der Schluss, dass nach Exposition mit *Escherichia coli* Nissle dieses Bakterium, welches als sehr potenter Kolonisator bekannt ist, aus dem Gastrointestinaltrakt der Versuchstiere im Durchschnitt nahezu ausgewaschen wird und seine Persistenz in geringsten Maßstäben stattfindet.

Im Unterschied dazu zeigt Abbildung 6 am Tag 8 ein CFU-Niveau der *P. aeruginosa*-Gruppe, welches ungefähr 1 Log-Stufe höher als das Niveau von der *EcN*-Gruppe liegt. Am Tag 9 nimmt die Diskrepanz zwischen der Test- und der Referenzgruppe weiter zu und beträgt ab dann ca. 2 Log-Stufen. Im Laufe der restlichen Observationsphase bleibt die CFU-Anzahl von *P. aeruginosa* weiterhin größtenteils konstant bei etwa 3,5 CFU log₁₀/ml, was zu einem zweiten, niedrigeren Plateau der Kurve führt. Wenn man die Werte der mit dem potenten Kolonisator *Escherichia coli* Nissle behandelten Referenzgruppe als Vergleichsbasis zur Testgruppe einsetzt, dann stellt man fest, dass das zu

testende Bakterium (*Pseudomonas aeruginosa*) im Darm der murinen Wirte in einer deutlich höheren Konzentration anhaltend, zumindest aber bis zum Ende des Experiments, persistiert. Somit ist die Annahme bestätigt, dass (a) *Pseudomonas aeruginosa* ein Bakterium ist, welches in der Lage ist die Kolonisierungsresistenz des Gastrointestinaltrakts der Maus zu durchbrechen und (b) dort in einer bedeutenden Anzahl persistieren und besser als *E. coli* Nissle kolonisieren kann.

Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Konzipierung dieses experimentellen Settings war es sicherzustellen, dass die Gabe von *Pseudomonas aeruginosa* zu einer Kolonisierung und nicht zu einer Infektion oder gar zu einer Bakteriämie führt. Der Ausschluss eines solchen Vorkommnisses fand bei jeder Versuchsreihe am letzten Tag statt (Analyse). Durch die Präparation der Tiere und der anschließenden Homogenisierung und Ausplattierung der entnommenen Organe konnte gezeigt werden, dass kein Wachstum der Zielkeime auftritt, weder von *P. aeruginosa* noch von *EcN*. Dies macht es im Rahmen der Limitationen durch die Keimnachweisgrenze sehr unwahrscheinlich, dass diese Bakterien in den Geweben der Mäuse vorhanden waren. Somit wird eine Translokation der Bakterien aus dem Darm in die Blutzirkulation und andere Organe ausgeschlossen. Eine Infektion durch oraler Aufnahme von *Pseudomonas aeruginosa* findet nicht statt.

3.2 Die Ausprägung der Kolonisation mit *P. aeruginosa* korreliert mit Variationen des Vorkommens von *Lactobacillus spp.* und *Clostridium spp.*

Im Anschluss der DNA-Extraktion aus den Nativstuhlproben wurde die Qualitätskontrolle der isolierten DNA-Fragmente in einer zeitlich nachgeschalteten Gelelektrophorese durchgeführt. Die Nativstuhlproben können in Abhängigkeit von der Lagerungstechnik und dem DNA-Extraktionsverfahren in unterschiedlichem Ausmaß Degradation des enthaltenen genetischen Materials aufweisen. Diese resultiert in Abbrüche der DNA-Stränge, welche durch Darstellung der Basenpaar-Länge der extrahierten DNA untersucht werden können. Zu diesem Zwecke wurden die Proben mit extrahierten DNA einer Agarosegelelektrophorese unterzogen und mit einer DNA-Leiter bekannter Fragmentenlänge verglichen. Mit Hilfe dieses Verfahrens sieht man auch, ob in den Proben überhaupt DNA vorhanden ist und durch Auftragung der Leerwertproben, ob bei der DNA-Isolierung es zu einer Kontamination mit genetischem Material, welches nicht aus dem gesammelten Stuhl stammt, gekommen ist.

Die adäquate taxonomische Zuordnung von den sequenzierten DNA-Proben erfordert eine ausreichende und einheitliche Länge der Reads und diese kann nur dann gegeben werden, wenn die isolierten DNA-Abschnitte an sich diese Eigenschaften aufweisen. Aus diesem Grund wurde dann die Qualitätskontrolle vorgenommen. Bildeten sich die isolierten DNA-Proben auf den Bildern der Agarosegelelektrophoresen als gut definierte, nicht verschmierte Banden im oberen Referenzbereich der DNA-Leiter, wurde von einer guten Qualität des isolierten Genmaterials ausgegangen und diese Proben wurden als sequenziertauglich eingestuft. Die mittels dieser Methode festgestellte Qualität der DNA aller gewonnenen Proben zeigte sich als sehr homogen und alle DNA-Proben wurden nach diesem Kontrollschritt als für eine Sequenzierung geeignet angesehen. Ein Bildbeispiel der durchgeführten Agarosegelelektrophorese ist in der folgenden Abbildung zu sehen:

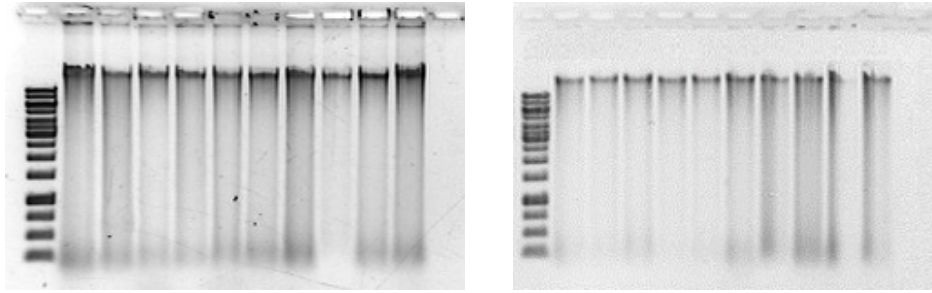


Abb. 7: Beispielhaftes Ergebnis zweier Agarosegelelektrophoresen. Linkes Bild: DNA-Isolationsqualitätskontrolle der Proben in den Geltaschen v.l.n.r.: DNA-Leiter, Proben: 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120 und der entsprechenden DNA-freien Isolationskontrollprobe 11K. Rechtes Bild: DNA-Isolationsqualitätskontrolle der Proben in den Geltaschen v.l.n.r.: DNA-Leiter, Proben: 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150 und der entsprechenden DNA-freien Isolationskontrollprobe 14K.

Nach der ersten qualitativen Kontrolle durch die Agarosegelelektrophorese erfolgte die Konzentrationsbestimmung (Punkt 2.1.9.) der isolierten DNA-Proben. Dieser Schritt stellt eine quantitative Kontrolle dar und prüft, ob die Voraussetzung für eine Next-Generation-Sequenzierung der ausführenden Firma Eurofins® von einer DNA-Konzentration von mehr als 50ng/µl getroffen wurde. Die Durchführung dieser Konzentrationsbestimmung erfolgte nach einer Fluoreszenzmessung-basierten Methode, wie unter Punkt 2.1.9. dieser Arbeit beschrieben.

Die Ergebnisse der DNA-Konzentrationsbestimmung von den Proben, die zur Sequenzierung gegeben werden sollten, sind in den folgenden Tabellen (1,2,3) aufgetragen. Aus diesen Tabellen wird noch ersichtlich, von welchem Tag des Kolonisationsversuchs, entsprechend auch aus welcher Phase des Versuchs, die Proben stammen und welche Werte die unter Punkt 2.1.9. beschriebene Fluoreszenzmessung ergeben hat. Der Sinn der doppelten Fluoreszenzmessung jeder Probe war es mögliche Pipettierfehlern aufzudecken. Wenn die Differenz der gemessenen Fluoreszenzwerte zweier Wells, in denen sich die gleiche Probe befand größer als 250 +/- 10 Einheiten war, wurde von einem Fehler beim Pipettieren ausgegangen. Die Proben bei denen dieses Problem aufgetreten ist, wurden dann in einer folgenden Messung auf neuen 96-Well-Platten aufgetragen

und gemessen, bis diese entweder einheitliche Fluoreszenzwerte geliefert haben (Differenz der Werte $< 250 \pm 10$ Einheiten), oder maximal drei Mal gemessen worden sind, wobei in diesem Fall für die Errechnung der DNA-Konzentration der Mittelwert aus den Ergebnissen aller Fluoreszenzmessungen genommen wurde. Die DNA-Proben, die drei Mal auf dieser Weise analysiert wurden sind in der Tabelle blau markiert.

Probe	Expositionskeim	Versuchstag	Versuchsphase	1. Fluoreszenzmessung	2. Fluoreszenzmessung	Konzentration in ng/µl
6	<i>P. aeruginosa</i>	0	t0	4504	4641	192,73
6/2	<i>P. aeruginosa</i>	1	t1	1001	1022	42,90
26	<i>P. aeruginosa</i>	3	t1	1693	1757	80,84
36	<i>P. aeruginosa</i>	7	t1	4164	4097	172,66
36ü	<i>P. aeruginosa</i>	8	t2	1452	1406	59,10
56	<i>P. aeruginosa</i>	10	t2	1174	1214	56,77
66	<i>P. aeruginosa</i>	14	t2	3080	2987	135,14
7	<i>P. aeruginosa</i>	0	t0	4851	4953	206,64
7/2	<i>P. aeruginosa</i>	1	t1	4070	3943	166,17
27	<i>P. aeruginosa</i>	3	t1	3166	3189	152,10
37	<i>P. aeruginosa</i>	7	t1	8299	8057	339,78
7ü	<i>P. aeruginosa</i>	8	t2	1783	1780	80,50
57	<i>P. aeruginosa</i>	10	t2	3101	3167	149,39
67	<i>P. aeruginosa</i>	14	t2	1863	1985	94,53
7	<i>P. aeruginosa</i>	0	t0	4851	4953	206,64
8/2	<i>P. aeruginosa</i>	1	t1	1556	1360	57,16
28	<i>P. aeruginosa</i>	3	t1	1920	1866	90,50
38	<i>P. aeruginosa</i>	7	t1	2068	2162	91,01
8ü	<i>P. aeruginosa</i>	8	t2	1934	1838	85,24
58	<i>P. aeruginosa</i>	10	t2	3049	3104	140,45
68	<i>P. aeruginosa</i>	14	t2	mehrere Werte		173,58
8	<i>P. aeruginosa</i>	0	t0	5578	5658	236,85
9/2	<i>P. aeruginosa</i>	1	t1	1764	1818	181,25
29	<i>P. aeruginosa</i>	3	t1	1797	1541	73,62
39	<i>P. aeruginosa</i>	7	t1	4000	3742	157,68
9ü	<i>P. aeruginosa</i>	8	t2	2299	2221	99,70
59	<i>P. aeruginosa</i>	10	t2	mehrere Werte		320,75
69	<i>P. aeruginosa</i>	14	t2	2767	2687	128,05
10	<i>P. aeruginosa</i>	0	t0	1199	1191	50,20
10/2	<i>P. aeruginosa</i>	1	t1	1720	1741	78,19
30	<i>P. aeruginosa</i>	3	t1	5187	5110	244,78
40	<i>P. aeruginosa</i>	7	t1	3028	3027	127,51

Tabelle 1.: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der DNA-Konzentrationsmessung. In der Tabelle sind folgende Informationen enthalten: Benennung der gewonnenen Probe, Expositionskeim, Beprobungszeitpunkt, Versuchsphase, Werte der Fluoreszenzmessung, errechneter DNA-Konzentrationswert. Für die Errechnung der blau markierten Werte wurden mehr Fluoreszenzmessungen als geplant nötig.

Probe	Expositionskeim	Versuchstag	Versuchsphase	1. Fluoreszenzmessung	2. Fluoreszenzmessung	Konzentration in ng/µl
10ü	<i>P. aeruginosa</i>	8	12	2645	2487	122,27
60	<i>P. aeruginosa</i>	10	12	2539	2530	120,55
71	<i>E. coli</i> Nissle RR	0	10	2597	2477	112,03
91	<i>E. coli</i> Nissle RR	1	t1	1429	1381	63,65
101	<i>E. coli</i> Nissle RR	3	t1	2336	2339	111,89
111	<i>E. coli</i> Nissle RR	7	t1	mehrere Werte		192,46
121	<i>E. coli</i> Nissle RR	8	12	1535	1576	72,67
141	<i>E. coli</i> Nissle RR	13	12	1760	1853	87,41
81	<i>E. coli</i> Nissle RR	14	12	mehrere Werte		120,86
72	<i>E. coli</i> Nissle RR	0	10	3409	3526	159,57
92	<i>E. coli</i> Nissle RR	1	t1	1700	1882	86,83
102	<i>E. coli</i> Nissle RR	3	t1	1410	1381	65,94
112	<i>E. coli</i> Nissle RR	7	t1	3053	3111	148,91
122	<i>E. coli</i> Nissle RR	8	12	1039	1071	49,31
132	<i>E. coli</i> Nissle RR	10	12	1425	1370	65,87
142	<i>E. coli</i> Nissle RR	13	12	1481	1391	65,56
82	<i>E. coli</i> Nissle RR	14	12	1885	1800	84,91
73	<i>E. coli</i> Nissle RR	0	10	1299	1172	55,72
93	<i>E. coli</i> Nissle RR	1	t1	2009	1996	90,47
103	<i>E. coli</i> Nissle RR	3	t1	mehrere Werte		108,35
113	<i>E. coli</i> Nissle RR	7	t1	mehrere Werte		139,79
123	<i>E. coli</i> Nissle RR	8	12	1169	1088	50,10
133	<i>E. coli</i> Nissle RR	10	12	1273	1345	61,68
143	<i>E. coli</i> Nissle RR	13	12	1840	1943	88,14
74	<i>E. coli</i> Nissle RR	0	10	1776	1803	86,18
104	<i>E. coli</i> Nissle RR	3	t1	2408	2524	116,53
114	<i>E. coli</i> Nissle RR	7	t1	3302	3298	149,24
134	<i>E. coli</i> Nissle RR	10	12	1023	1121	52,79
84	<i>E. coli</i> Nissle RR	14	12	3166	3232	152,64
75	<i>E. coli</i> Nissle RR	0	10	2365	2555	122,25
95	<i>E. coli</i> Nissle RR	1	t1	2311	2177	100,48
105	<i>E. coli</i> Nissle RR	3	t1	4718	4588	219,75

Tabelle 2.: Fortsetzung der tabellarischen Darstellung der Ergebnisse der DNA-Konzentrationsmessung. In der Tabelle sind folgende Informationen enthalten: Benennung der gewonnenen Probe, Expositionskeim, Expositionszeitpunkt, Versuchsphase, Werte der Fluoreszenzmessung, errechneter DNA-Konzentrationswert. Für die Errechnung der blau markierten Werte wurden mehr Fluoreszenzmessungen als geplant nötig.

Probe	Expositionskeim	Versuchstag	Versuchsphase	1. Fluoreszenzmessung	2. Fluoreszenzmessung	Konzentration in ng/jul
115	<i>E. coli</i> Nissle RR	7	t1	1996	2035	93,91
125	<i>E. coli</i> Nissle RR	8	t2	3252	3130	144,56
145	<i>E. coli</i> Nissle RR	13	t2	1544	1395	65,75
85	<i>E. coli</i> Nissle RR	14	t2	2793	2818	133,06
96	<i>P. aeruginosa</i>	1	t1	1641	1551	71,52
106	<i>P. aeruginosa</i>	3	t1	mehrere Werte		169,52
116	<i>P. aeruginosa</i>	7	t1	2470	2340	108,02
86	<i>P. aeruginosa</i>	14	t2	1546	1656	78,09
77	<i>P. aeruginosa</i>	0	t0	1590	1675	75,67
97	<i>P. aeruginosa</i>	1	t1	1534	1632	77,98
107	<i>P. aeruginosa</i>	3	t1	1934	2011	92,80
117	<i>P. aeruginosa</i>	7	t1	6260	6083	291,45
127	<i>P. aeruginosa</i>	8	t2	2512	2666	120,71
147	<i>P. aeruginosa</i>	13	t2	5508	5731	259,52
87	<i>P. aeruginosa</i>	14	t2	2484	2471	111,75
78	<i>P. aeruginosa</i>	0	t0	3624	3456	163,53
108	<i>P. aeruginosa</i>	3	t1	2320	2348	108,39
118	<i>P. aeruginosa</i>	7	t1	1258	1066	50,84
128	<i>P. aeruginosa</i>	8	t2	2156	2138	101,32
138	<i>P. aeruginosa</i>	10	t2	995	1044	49,15
88	<i>P. aeruginosa</i>	14	t2	2920	2820	133,15
109	<i>P. aeruginosa</i>	3	t1	1570	1653	78,99
119	<i>P. aeruginosa</i>	7	t1	1709	1680	77,49
89	<i>P. aeruginosa</i>	14	t2	2343	2325	108,38
80	<i>P. aeruginosa</i>	0	t0	1243	1111	54,22
110	<i>P. aeruginosa</i>	3	t1	1573	1540	73,57
120	<i>P. aeruginosa</i>	7	t1	3901	4008	185,18
140	<i>P. aeruginosa</i>	10	t2	1250	1224	57,66
150	<i>P. aeruginosa</i>	13	t2	4639	4731	214,19
90	<i>P. aeruginosa</i>	14	t2	2387	2266	106,95
216	<i>P. aeruginosa</i>	0	t0	1291	1144	53,88
356	<i>P. aeruginosa</i>	13	t2	2952	2881	131,00

Tabelle 3.: Fortsetzung der tabellarischen Darstellung der Ergebnisse der DNA-Konzentrationsmessung. In der Tabelle sind folgende Informationen enthalten: Benennung der gewonnenen Probe, Expositionskeim, Beprobungszeitpunkt, Versuchsphase, Werte der Fluoreszenzmessung, errechneter DNA-Konzentrationswert. Für die Errechnung der blau markierten Werte wurden mehr Fluoreszenzmessungen als geplant nötig.

Eine wichtige Intention der 16S rRNA-Sequenzierung war es primär einen Überblick über die im murinen intestinalen Mikrobiom vorkommenden bakteriellen Vertreter zu erhalten. Nach oben beschriebenen Vorbereitungen und Durchführung von der tatsächlichen Sequenzierung (Punkte 2.1.7 – 2.1.10) erfolgte die taxonomische Zuordnung der daraus stammenden Readsergebnisse. Diese wurden nicht nur qualitativ identifiziert, sondern anhand der sog. „Relative Abundance“ dieser gelesenen DNA-Abschnitte wurde das Vorkommen taxonomisch zugeordneten Sequenzen auch quantitativ bestimmt. Auf dieser Art und Weise gewinnt man eine Erkenntnis darüber, welche Bakterien und wieviele von diesen Bakterien zu den verschiedenen Zeitpunkten der Kolonisationsversuchsreihe im murinen Stuhl, entsprechend Darmmikrobiom, repräsentiert sind. Das Ergebnis dieser Untersuchung war, dass *Firmicutes* über andere bakterielle Phyla vorherrschen (94,3% - 97,2%). An zweiter Stelle befinden sich die *Proteobacteria* (0,8% - 2,8%), gefolgt von *Bacteroidetes* (0,7% - 2,7%). *Actinobacteria* wurden nur in geringsten Maßen nachgewiesen (0,01 - 0,4%). Auf Ordnungsebene sind *Clostridiales* und *Lactobacillales* am stärksten vertreten (entsprechend 38,6% - 83,6% und 7,6% - 49%), gefolgt von *Bacteroidales* (1% - 4,0%), *Erysipelotrichales* (0,6% - 5,3%) und *Desulfovibrionales* (0,6% - 3,1%). Bezüglich des Genus-Niveaus dominieren *Lactobacillus* (27,9% - 84%), gefolgt von *Roseburia* (2,2% - 15,7%), *Mucispirillum* (0,7% - 8,7%) und *Desulfovibrio* (0,6% - 5,1%). Abb. 8, Abb. 9, und Abb. 10 zeigen die „Relative Abundance“-Werte aller detektierten Phyla, Ordnungen und Genera.

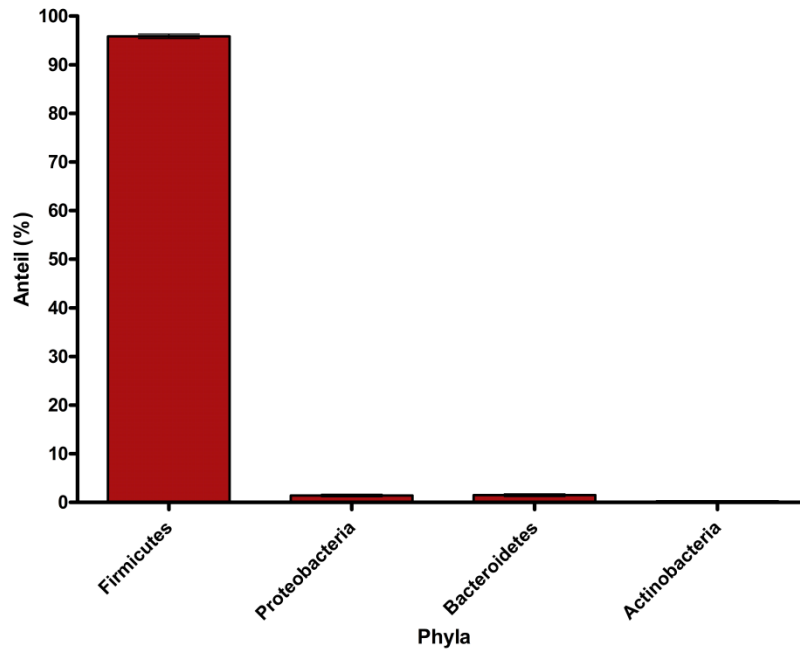


Abb 8: Anteilmäßige Verteilung aller taxonomisch identifizierten Phyla anhand ihrer „Relative Abundance“. Das Phylum *Firmicutes* war am stärksten repräsentiert. Die Phyla *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* kamen auch im murinen Intestinum vor, wobei ihr Anteil jeweils unter 10% lag. Das Phylum *Actinobacteria* machte weniger als 1% aller identifizierten Phyla aus. Die Fehlerbalken stellen die Streubreite der Ergebnisse in Abhängigkeit davon dar, von welchem Tag des Versuchsaufbaus die Probe stammt.

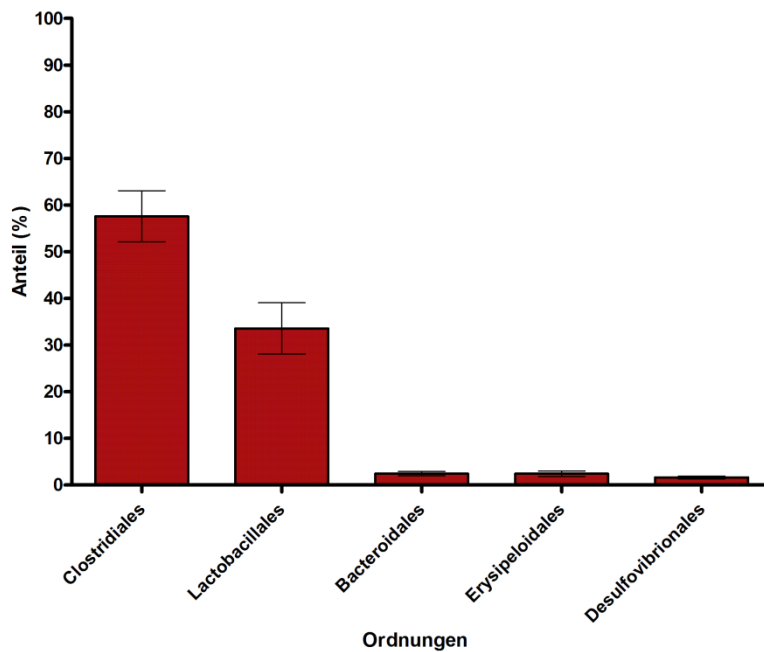


Abb. 9: Anteilmäßige Verteilung aller taxonomisch identifizierten Ordnungen anhand ihrer „Relative Abundance“. Die Ordnungen *Clostridiales* und *Lactobacillales* waren am stärksten repräsentiert. Die Ordnungen *Bacteroidales*, *Erysipeloidales* und *Desulfovibrionales* kamen auch im murinen Intestinum vor, wobei ihr Anteil jeweils unter 10% lag. Die Fehlerbalken stellen die Streubreite der Ergebnisse in Abhängigkeit davon dar, von welchem Tag des Versuchsaufbaus die Probe stammt.

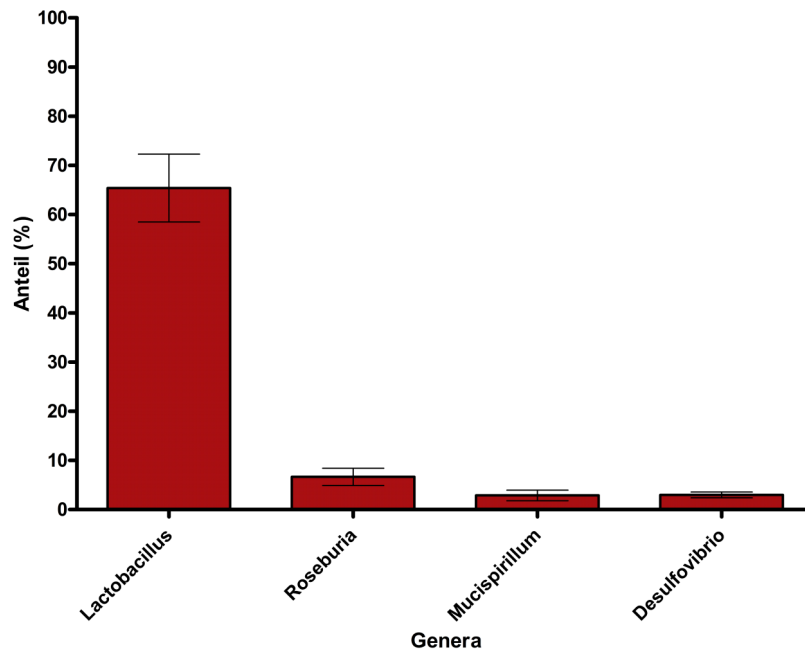


Abb. 10: Anteilmäßige Verteilung aller taxonomisch identifizierten Genera anhand ihrer „Relative Abundance“. Der Genus *Lactobacillales* war am stärksten repräsentiert. Die Ordnungen *Roseburia*, *Mucispirillum* und *Desulfovibrio* kamen auch im murinen Intestinum vor, wobei ihr Anteil jeweils unter 10% lag. Die Fehlerbalken stellen die Streubreite der Ergebnisse in Abhängigkeit davon dar, von welchem Tag des Versuchsaufbaus die Probe stammt.

Durch die mit der Sequenzanalyse gewonnenen Informationen lässt sich ebenfalls die Theorie einer potenten intestinalen Kolonisation der Maus mit *Pseudomonas aeruginosa* untersuchen. Da an den Versuchstagen, an denen Stuhlproben für CFU-Bestimmungen gewonnen und bearbeitet wurden, wurden auch simultan die entsprechende Nativstuhlproben gesammelt und konserviert und sich die letztgenannten hinsichtlich ihrer mikrobiellen Zusammensetzung nicht von den CFU-Stuhlproben unterscheiden sollten, sollte die bei ihnen angewandten *P. aeruginosa*-Detektionsmethode ähnliche Informationen über das qualitative und quantitative Auftreten vom untersuchten Bakterium liefern. Dies bedeutet, dass der CFU-Kurvenverlauf, aufgrund der anderen Auszählungsmethode (CFU vs. Reads) nicht identisch aber zumindest gleichsinnig zu dem Verlauf einer Kurve sein könnte, die aus der Readsanzahl von *Pseudomonas* bezogen auf den verschiedenen Versuchsphasen erstellt wurde. Diese neue quantitative Verlaufskurve ist aus der Abbildung 11 ersichtlich.

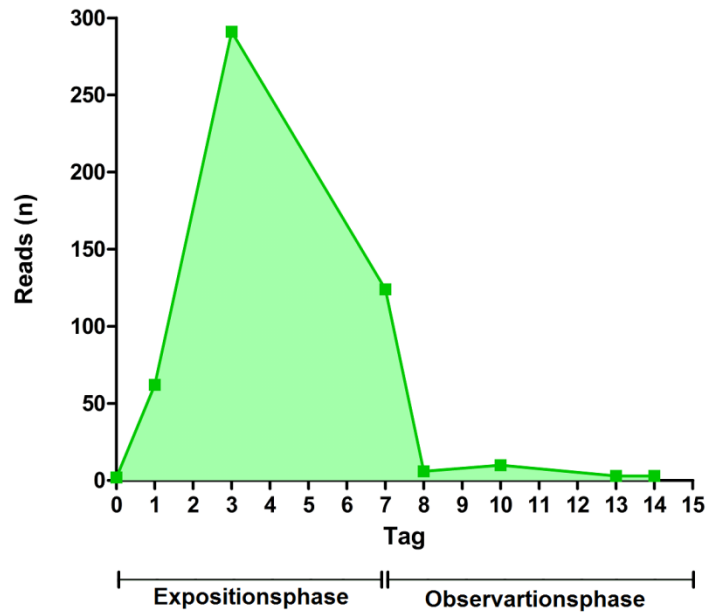


Abb. 11: Readsverlaufskurve der mit *P. aeruginosa* exponierten Versuchstiergruppe für den Genus *Pseudomonas*. Über die Zeit wurde die Anzahl aller zum Genus *Pseudomonas* taxonomisch zugeordneten Reads aufgetragen. An Tag 0 wurde die Exposition begonnen. Während der Dauer der Expositionsphase bis Tag 7 macht sich ein ausgeprägtes Vorkommen von zum Genus *Pseudomonas* zugeordneten Reads bemerkbar. Nach Absetzen des mit *P. aeruginosa* beladenem Trinkwasser an Tag 7, bis Ende der Versuchsreihe am Tag 14 ist während der Observationsphase der Genus *Pseudomonas* gentechnisch immernoch nachweisbar.

Die Grafik zeigt Veränderungen der Readanzahl für den Genus *Pseudomonas* vor, während und nach oraler Gabe mittels des Trinkwassers vom entsprechenden Bakterium (t_0 , t_1 = Kolonisationsphase, t_2 = Observationsphase). Es wird ersichtlich wie die Gabe auf die Readanzahl reflektiert. In den Proben zu Beginn der Versuchsreihe wurde keine *P. aeruginosa* 16S rRNA detektiert. Bereits am ersten Tag der Exposition mit kontaminiertem Wasser machte sich ein Anstieg der *P. aeruginosa* spezifischen Reads bemerkbar. Dieser nahm weiter zu und erreicht einen Spitzenpunkt an Tag 3. Bis zum Ende der Kolonisationsphase (Tag 7) blieb die Readsanzahl hoch, vor allem im Vergleich zum niedrigen Ausgangspunkt an Tag 0. An Tag 8, nachdem die Exposition mit *P. aeruginosa* aufgehoben wurde, kam es zu einem Abfall der untersuchten Reads, aber zu keinem Verschwinden von diesen. Während der gesamten Observationsphase (Tag 8 bis Tag 14) bildete sich ein stabiles Kurvenplateau aus der Readsanzahl. Dieses Verhalten des Verlaufs der Readskurve korrespondiert zu der Unterbrechung der Keimexposition und der konsekutiven Etablierung einer Kolonisation während der Observationsphase.

Das ist eine zweite Bestätigung der Annahme, dass *Pseudomonas aeruginosa* erfolgreich die Kolonisierungsresistenz des intestinalen Mikrobioms des murinen Wirts überwindet und zu einem Bestandteil von dessen Mikrobiom post expositionem wird.

Die Erstellung einer Readsverlaufskurve aus den analysierten DNA-Sequenzen der Proben der *E. coli* Nissle RR Kontrollgruppe war auch möglich und wurde durchgeführt. Ein Vergleich zwischen den zeitlichen Variationen der Readsanzahlen für die Genera *Pseudomonas* und *Escherichia* der beiden mit unterschiedlichen Bakterien exponierten Versuchstiergruppen sieht man in Abb. 12. Daraus lässt sich wieder eine Konsequenz darüber ziehen, wie hoch die Kolonisierungspotenz von *P. aeruginosa* bezogen auf derjenigen von *E. coli* Nissle ist.

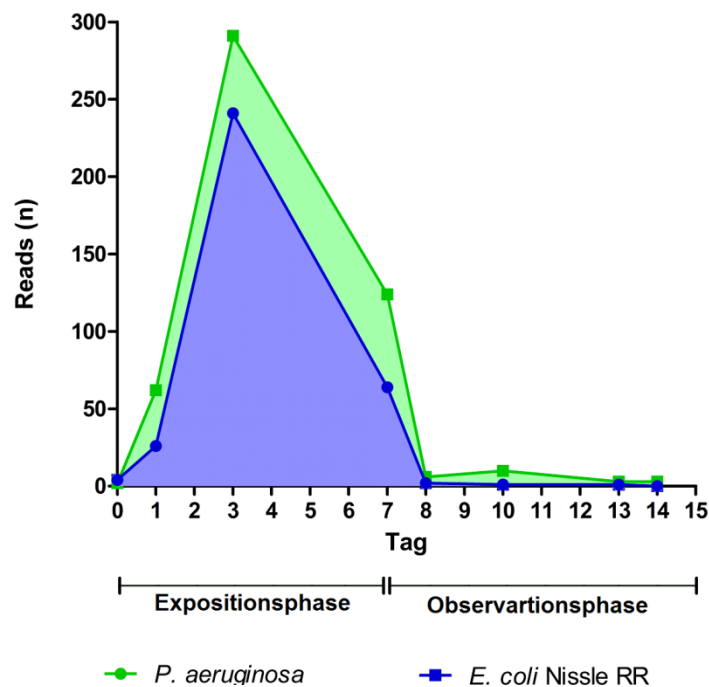


Abb. 12: Vergleich der Readsverlaufskurven der mit *P. aeruginosa* exponierten Versuchstiergruppe für den Genus *Pseudomonas* (grün) und der mit *E. coli* Nissle RR exponierten Referenzgruppe für den Genus *Escherichia* (blau). Über die Zeit wurde die Anzahl aller entsprechend auf Genusebene taxonomisch zugeordneten Reads aufgetragen. An Tag 0 wurde die Exposition begonnen. Während der Dauer der Expositionphase macht sich ein ausgeprägtes Vorkommen beider untersuchten Genera bemerkbar. Trotz der identischen bakteriellen Expositionsdosis übersteigt die Anzahl der *Pseudomonas*-Reads die Anzahl von *Escherichia*-Reads. Nach Beendigung der Exposition an Tag 7 fallen die Readsanzahlen beider Gruppen auf etwa das gleiche Niveau. Bis Ende der Versuchsreihe am Tag 14 ist während der Observationsphase der Genus *Pseudomonas* gentechnisch immernoch eindeutig nachweisbar, während der Genus *Escherichia* durch diese Methode gerade noch nachweisbar ist.

An Tag 0 zeigen beide Gruppen ein Fehlen von Reads für die entsprechenden Genera. Nach dem Beginn der Keimexposition macht sich an Tag 1 in beiden Gruppen einen Anstieg der gelesenen Readszahl bemerkbar. An diesem Tag wird auch die erste Diskrepanz ersichtlich: die Reads von *Pseudomonas* nehmen stärker als die Reads von *Escherichia* trotz der gleichen Keimexpositionslast von 5×10^7 Bakterien/ml Trinkwasser zu. Das Readsniveau aus den DNA-Proben der *P. aeruginosa*-Gruppe bleibt über den gesamten Kurvenverlauf höher als das Niveau von *Escherichia*-Reads der *Escherichia coli* Nissle RR Gruppe. Das am 3. Tag erreichte Maximum von ca. 240 Reads ist ebenfalls geringer als die ca. 290 Reads der *P. aeruginosa* Gruppe. An Tag 7 besteht ein Unterschied von ca. 60 Reads zugunsten des *Pseudomonas* Genus. Am Anfang der Observationsphase sinken die Reads beider Genera auf etwa das gleiche Niveau, wobei *Pseudomonas* 3-fach stärker in ihrer Anzahl als *Escherichia* vertreten sind. Dieses Verhältnis bleibt stabil und nicht unterschritten bis zur Beendigung der Beprobung an Tag 14. Hierbei ist der Vermerk von Bedeutung, dass während die *P. aeruginosa*-Gruppe vor Beginn der Keimexposition kulturtechnisch (CFU) und gentechnisch (*Pseudomonas* spezifische Reads) den Genus *Pseudomonas* nicht enthielt, so war das entsprechende Expositionskeim bei der *E. coli* Nissle RR Gruppe nachweisbar, da diese Gruppe den physiologischerweise im murinen Intestinum vorkommenden *Escherichia coli* trägt, der auf dem relativ unselektiven Endoagar immer gesehen wurde. Bei der Interpretation dieses Ergebnisabschnitts soll berücksichtigt werden, dass trotz dem physiologischem Vorkommen von *Escherichia coli* im murinen Mikrobiom und der Unmöglichkeit der 16S rRNA-Analyse zwischen dem gegebenen Rifampicin-resistentem *E. coli* Nissle und dem sich bereits im Darm befindenten *E. coli* zu differenzieren und im Endeffekt in dieser Arbeit gentschisch den Genus *Escherichia* und nicht konkreter die zu *Escherichia* gehörenden Spezies nachgewiesen wurden, der Genus *Pseudomonas* eine viel höhere Readsanzahl generiert hat als der Genus *Escherichia*.

Die Antwort der Frage der Wechselwirkung zwischen *P. aeruginosa* und den restlichen Vertretern des murinen intestinalen Mikrobioms gab die Durchführung

und Interpretation der Korrelationsanalyse zwischen zahlenmäßiger Veränderung der *P. aeruginosa* CFUs und mittels sequenzbasierter taxonomischer Zuordnung identifizierten Fluktuationen der bakteriellen Mikrobiomzusammensetzung. Die Korrelationen wurden kalkuliert aus der normalisierten Anzahl von Reads die zu einem Phylum, einer Ordnung oder einem Genus taxonomisch zugeordnet wurden und den simultan stattgefundenen CFU-Veränderungen. Das wurde für die Versuchszeitpunkte vor, während und nach der Exposition mit *P. aeruginosa* durchgeführt und es wurden nur die Werte der fünf Mäuse berücksichtigt, für die Daten von allen diesen Beprobungszeitpunkten vorlagen. Die Korrelationen wurden nur dann als korrekt betrachtet, wenn diese für alle Versuchstiere jeweils die gleiche Richtung der Korrelationskoeffizienten gezeigt haben (positiv oder negativ). Während der Expositionsphase des Kolonisationsmodells korrelierten *Actinobacteria* und *Cyanobacteria* auf Phylumebene negativ zu *P. aeruginosa* (Abb. 13).

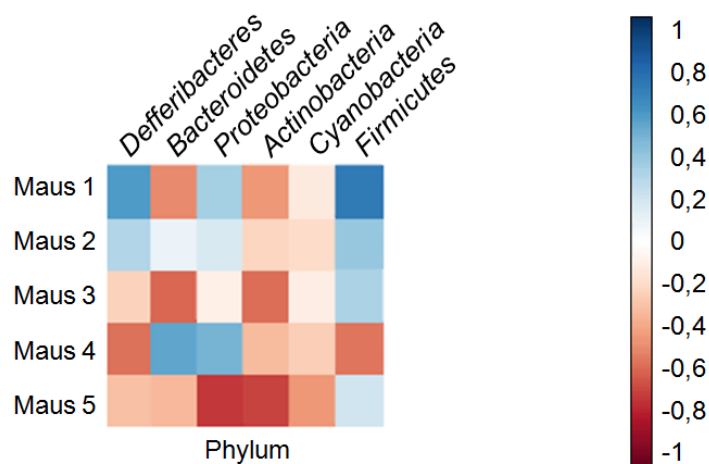


Abb. 13: Ergebnis der Korrelationsanalyse taxonomisch zugeordneter Sequenzen auf Phylumebene. Links: farblich kodierte Übersicht der Korrelationsstärke der *P. aeruginosa* CFU-Anzahl aller in die Korrelationsanalyse eingeschlossener Mäuse zu allen in den DNA-Proben der jeweiligen Mäuse taxonomisch zugeordneten Phyla. Rechts: Farbskala der Korrelationsstärke. Die Werte aus dem blauen Skalabereich entsprechen einem positiven Korrelationstrend und die Werte aus dem roten Skalabereich entsprechen einem negativen Korrelationstrend.

Bei der Korrelationsanalyse auf Ordnungsebene ergab sich für *Eggerthellales* und *Clostridiales* ein negativer Korrelationstrend, während dieser für keine andere bakterielle Ordnung als *Lactobacillales* positiv war (Abb. 14).

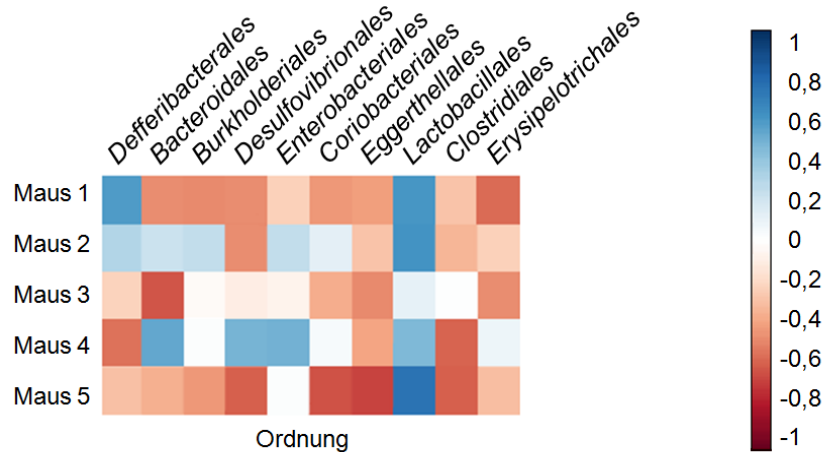


Abb. 14: Ergebnis der Korrelationsanalyse taxonomisch zugeordneter Sequenzen auf Ordnungsebene. Links: farblich kodierte Übersicht der Korrelationsstärke der *P. aeruginosa* CFU-Anzahl aller in die Korrelationsanalyse eingeschlossener Mäuse zu allen in den DNA-Proben der jeweiligen Mäuse taxonomisch zugeordneten Ordnungen. Rechts: Farbskala der Korrelationsstärke. Die Werte aus dem blauen Skalabereich entsprechen einem positiven Korrelationsstrend und die Werte aus dem roten Skalabereich entsprechen einem negativen Korrelationsstrend.

Wenn die Analyse auf die im Rahmen dieser Arbeit möglichst spezifischste taxonomische Zuordnungsebene gebracht wurde – Genus – konnte gesehen werden, dass *Lactobacillus* der einzige positiv korrelierende Genus war. Die negativ korrelierenden Genera waren insb. *Blautia*, *Christensenella*, *Roseburia* und *Enterorhabdus* (Abb. 15).

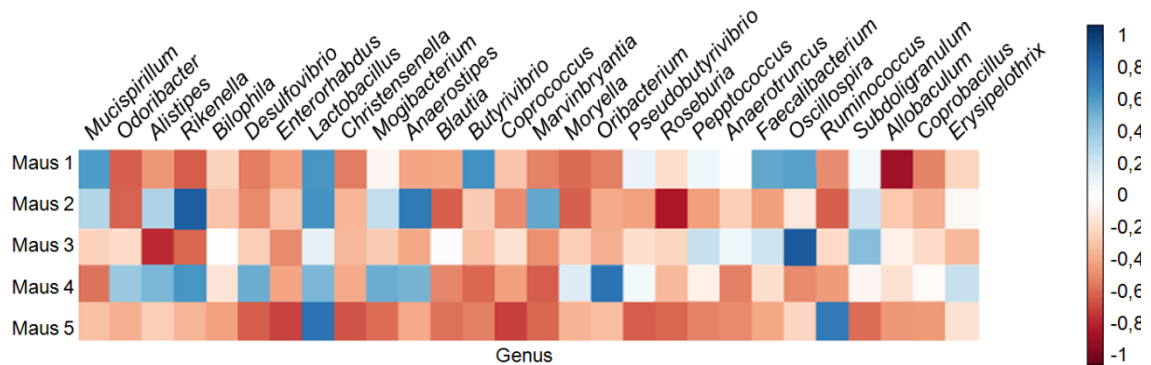


Abb. 15: Ergebnis der Korrelationsanalyse taxonomisch zugeordneter Sequenzen auf Genusebene. Links: farblich kodierte Übersicht der Korrelationsstärke der *P. aeruginosa* CFU-Anzahl aller in die Korrelationsanalyse eingeschlossener Mäuse zu allen in den DNA-Proben der jeweiligen Mäuse taxonomisch zugeordneten Genera. Rechts: Farbskala der Korrelationsstärke. Die Werte aus dem blauen Skalabereich entsprechen einem positiven Korrelationsstrend und die Werte aus dem roten Skalabereich entsprechen einem negativen Korrelationsstrend.

3.3 Die Vorbehandlung mit dem Antibiotikum Ciprofloxacin hat keinen Einfluss auf das Kolonisierungsverhalten von *Pseudomonas aeruginosa*

In einem modifizierten Modellaufbau sollte die These überprüft werden, dass die Einnahme von Antibiotika zu einer Disruption des intestinalen Mikrobioms und diese Veränderung wiederum zu einer Verminderung der Kolonisierungsresistenz führt. Bei einer geringeren Kolonisierungsbarriere sollte in der Theorie das Vorkommen von *Pseudomonas aeruginosa* im Stuhl der exponierten Tiere höher sein, als in Tieren, die keine Antibiotikagaben erhielten. Die genaue Planung, Struktur und Durchführung dieser Versuchsreihe sind im Punkt 2.2. näher beschrieben. Identisch zu den vorigen Punkten der Arbeit, wurden aus den bei diesem Experiment gesammelten CFU-Stuhlproben Kurven erstellt, aus denen das Ausmaß an Vorkommen von *P. aeruginosa* im Stuhl ersichtlich wird. Für die Anfertigung dieser Kurven wurde wieder das *Pseudomonas*-selektive Cetrimidagar verwendet mit den gleichen Argumenten wie in Punkt 3.1. Die Wirkung der Antibiose wurde anhand des CFU-Wachstumverhaltens auf nicht-selektivem Endo-Agar gezeigt. Nach der Phase der Antibiotikagabe war bei Ausplattierung von CFU-Stuhlproben auf Endo-Agar kein Wachstum von Kolonien von *Enterobacteriaceae* mehr nachweisbar. Vor der Antibiose wurde entsprechendes Wachstum auf Endo-Agarplatten regelhaft beobachtet und ließ sich insbesondere durch den physiologisch im Darmmikrobiom vorkommenden Bakterium *E. coli* erklären. Die beobachtete Keimwachstumshemmung ist mit dem Wirkspektrum und Wirkung von Ciprofloxacin vereinbar und darauf zurückzuführen. Große Teile der physiologischen Flora, insbesondere anaerobe Keime, dürften entsprechend intrinsischer Resistenzen durch die Ciprofloxacin-Gabe nicht negativ beeinflusst werden.

Die abschließend gesammelten Daten sind in der folgenden Abb. 16 dargestellt:

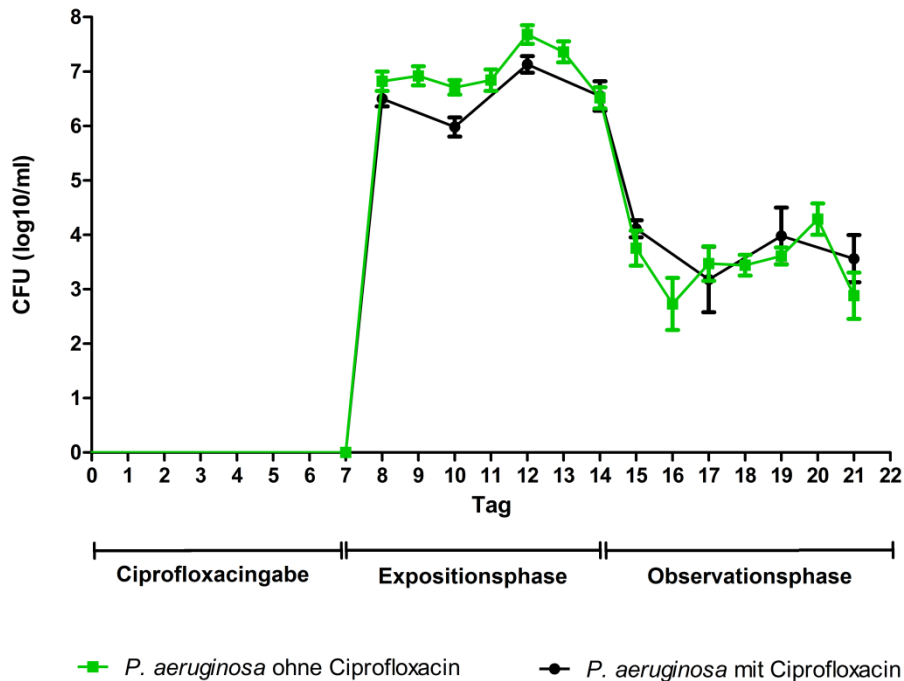


Abb. 16: Grafische Darstellung der Ergebnisse aus den Kolonisierungsversuchen mit antibiotischer Vorbehandlung verglichen mit den *P. aeruginosa*-Kolonisationsergebnissen ohne Antibiose. In der Vorbehandlungsphase von Tag 0 bis Tag 5 wird eine Mausgruppe (n=5) mit dem Antibiotikum Ciprofloxacin vorbehandelt. In den sieben Tagen der Expositionsphase bildet sich ein stabiles Plateau von ca. 7 CFU (log₁₀/ml) in beiden Gruppen. Nach Beendigung der Exposition am Tag 14 nimmt die Bakterienmenge im Stuhl in beiden Gruppen ab. Es bildet sich jeweils ein zweites Plateau von ca. 3,5 CFU (log₁₀/ml), welches persistiert. *P. aeruginosa* wird aus dem Intestinum nicht beseitigt und zwischen den Höhen der Plateaus aus der Observationsphase besteht kein Unterschied. Eine Vorbehandlung mit Ciprofloxacin verändert das Kolonisationsniveau von *P. aeruginosa* nicht

Zu Beginn der Versuchsreihe, genauer betrachtet – während der ersten sieben Tage des Versuchs – haben die Mäuse mittels des Trinkwassers das Antibiotikum Ciprofloxacin aufgenommen. Die Tiere erfuhren zu diesem Zeitpunkt keine sonstigen Interventionen z.B. im Sinne einer Keimexposition. Dementsprechend blieb die CFU-Zahl von *P. aeruginosa* während der Ciprofloxacingabe auf Null. Am Tag 7 fing die Keimexposition an und das Niveau von *P. aeruginosa* stieg rasch auf ca. 7 CFU log₁₀/ml an, gleich wie in der Mausgruppe ohne Ciprofloxacin-Gabe. Während der Expositionsphase t1 bildete sich ein Plateau der CFU-Werte, welches auch keine Differenz zu der unbehandelten Gruppe zeigte. Mit Ciprofloxacin antibiotisch vorbehandelte

Mäuse erschienen somit nicht als suszeptibler einer Kolonisation mit *P. aeruginosa* während der Expositionsphase gegenüber. Ob nach Beendigung der Exposition der Ausprägungsgrad an Persistenz von *P. aeruginosa* im Darm höher ist, als in antibiotisch unbehandelten Mäusen, macht die CFU-Kurve im Abschnitt der Observationsphase t2 ersichtlich. Die Referenzgruppe bei der Versuchsreihe (Keimexposition aber keine Antibiotikaexposition) zeigt das bekannte Plateau von ca. 3,5 CFU log₁₀/ml. Der Verlauf der Kurve der mit Ciprofloxacin behandelten Gruppe überschneidet sich mit dem Verlauf der Referenzgruppe an mehreren Stellen und ist somit fast deckungsgleich. Da die Diskrepanz zwischen den Verläufen beider Gruppen sehr gering ist und sich in einer Schwankungsbreite von weniger als einer Logstufe bewegt, kann man schließen, dass die antibiotisch vobehandelte Gruppe nicht mehr *Pseudomonas aeruginosa* ausscheidet als die Referenzgruppe. Somit ist im Stuhl und auch im Darm der Ciprofloxacingruppe nicht mehr *Pseudomonas aeruginosa* nachweisbar als in der Referenzgruppe. Diese Beobachtung spricht dafür, dass *P. aeruginosa* zu keiner höheren Kolonisation bei einem mit Ciprofloxacin vorbehandelten murinen Wirt führt.

3.4 Die Fäkaltransplantation kann *P. aeruginosa* aus dem murinen Intestinum eliminieren

In der letzten Modifikation des Kolonisationsmodells wurde die Fäkaltransplantation als Methode zur Wiederherstellung eines gesunden intestinalen Mikrobioms untersucht. In den vorausgehenden Versuchsreihen wurde bereits gezeigt, dass *Pseudomonas aeruginosa* den murinen Wirt gastrointestinal kolonisieren kann. Da eine solche Kolonisation wie oben beschrieben insbesondere bei Komorbiditäten negative und sehr kritische, sogar letale Konsequenzen haben kann, wäre die Möglichkeit der Dekolonisation im Sinne einer Sanierung klinisch äußerst wertvoll. Die FTx stellt eine potentielle Möglichkeit dar. Der Versuch wurde wie unter Punkt 2.3 beschrieben

durchgeführt. Als Nachweis der Wirksamkeit der Fäkaltransplantation wäre im Anschluss an die FTx ein Absinken der CFU-Anzahl von *P. aeruginosa* zu erwarten, ggfs. sogar unterhalb die Nachweisgrenze. Der CFU-Verlauf des Experiments ist in der folgenden Abbildung zu sehen:

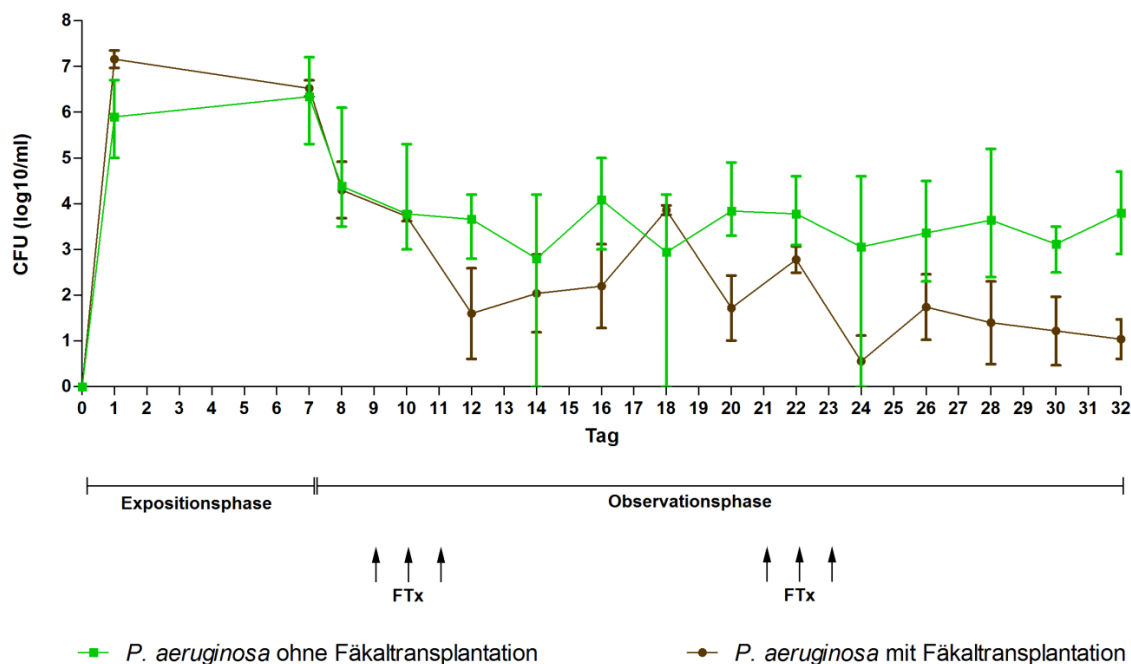


Abb. 17: Grafische Darstellung der Ergebnisse aus den Fäkaltransplantationsversuchen. Die grüne Kurve zeigt einen Kolonisationsversuch mit *P. aeruginosa*. Die braune Kurve zeigt den CFU-Verlauf einer Gruppe (n=5), die nach Kolonisierung mit *P. aeruginosa* eine FTx erhielt. Während der Expositionsphase von Tag 0 bis Tag 7 bildet sich bei beiden Gruppen ein Plateau von ca. 7 CFU (log₁₀/ml). Nach Ende der Exposition beginnt die Observations- bzw. Fäkaltransplantationsphase. Bei der nicht-transplantierten Gruppe bildet sich in der Observationsphase ein stabiles Plateau von ca. 3,5 CFU (log₁₀/ml) für den restlichen Verlauf des Experiments aus. Bei der transplantierten Gruppe macht sich ein Absinken der CFU-Zahl nach dem Beginn der FTx-Interventionen (Tag 9 und Tag 21) bemerkbar. Am Ende des Versuches (Tag 32) zeigt sich ein deutlicher Unterschied im Kolonisationsniveau von ca. 3 Logarithmusstufen.

In den ersten sieben Tagen des Experiments (Expositionsphase t1) sieht man die aus Vorversuchen bekannte Etablierung eines Plateaus von *P. aeruginosa* CFU im Stuhl. Die CFU-Anzahl sowohl in der zu behandelnden Gruppe, als auch in der Referenzgruppe ohne anschließender FTx sind hoch (7 bis 6,5 CFU log₁₀/ml und entsprechend 6 bis 6,5 CFU log₁₀/ml). Nach Beendigung der Expositionsphase kommt es wie in den bisherigen Versuchen zu einem Absinken der CFU-Zahl. Bis zum Ende der Versuchsreihe ist der CFU-Verlauf unauffällig, stabil und verhält sich wie in allen bisherigen Gruppen, die nach dem identischen

Protokoll behandelt wurden (Absetzen des keimbeladenen Trinkwassers und anschließender Beobachtung unter Berücksichtigung und Sicherstellung von möglichst sauberen Wohnbedingungen). Die Ausscheidung von *Pseudomonas aeruginosa* persistiert und der ausplattierte Stuhl zeigt ein sehr konstantes Vorhandensein von *P. aeruginosa* von etwa 3,5 CFU log₁₀/ml. Die Kolonisation mit *Pseudomonas aeruginosa* entwickelt sich zu Beginn dieser Versuchsreihe wie in den ursprünglichen Versuchsreihen bereits gezeigt.

Dieses Plateau von 3,5 CFU log₁₀/ml bildet sich anfangs auch in der mit FTx behandelten Gruppe bis zu dem Zeitpunkt, an dem die erste Stuhlgavage stattfindet. Die Durchführung dieser Gavagen begann am Tag 9 und dauerte jeweils 3 Tage an. Im Verlauf der Kurve der behandelten Gruppe sieht man ein Absinken der *P. aeruginosa*-Anzahl ab Tag 10, welches für weitere 3 Tage anhält. Dieses Absinken findet direkt im Anschluss an die durchgeführten ersten FTx statt und spiegelt den erwarteten Effekt dieser Intervention wider. Nach dem 16. Tag machte sich wieder ein Anstieg der CFU-Anzahl bemerkbar, welcher mit einer erneuten Vermehrung von im Darm verbliebenen *Pseudomonas aeruginosa* vereinbar ist. Da zu diesem Zeitpunkt keine erneute FTx stattfand, schwankt das Niveau von den *P. aeruginosa*-CFUs um ca. 3,5 CFU log₁₀/ml entsprechend hochbleibend. Die zweite und auch letzte geplante FTx-Intervention wurde an Tag 21 geplant und an diesem Tag und den nächsten 3 Tagen durchgeführt. Im Anschluss an die zweite Fäkaltransplantationsserie findet wieder ein rapides Absinken der mit dem Stuhl ausgeschiedenen *Pseudomonas aeruginosa* statt. Ein Tiefpunkt von weniger als 1 CFU log₁₀/ml wird erreicht. Der weitere Verlauf der Kurve der fäkaltransplantierten Gruppe verbleibt allerdings nicht bei diesem niedrigen Niveau, sondern steigt bei der nächsten Beprobung erneut an. Dieser Anstieg erreicht aber nicht die hohen Werte, die nach der ersten FTx wieder erreicht wurden, denn der maximal erreichte Anstieg nach der zweiten Transplantation beträgt nur ca. 1,5 CFU log₁₀/ml. Dieser Wert liegt deutlich unterhalb des Kolonisierungszustands der nichtbehandelten Gruppe. Positiv ist auch, dass nach dem Erreichen von diesem Maximalwert bis zu der Beendigung dieses Experiments ein konstantes Absinken der *P. aeruginosa*-

Kolonien stattfindet. Am Tag 32, was auch das Ende des Versuchs ist, wird einen Tiefpunkt von ca. 1 CFU \log_{10} /ml erreicht. Ein Wert dieser Größenordnung, wie bereits unter Punkt 3.1. beschrieben, ergibt sich auch durch das Vorkommen einer alleinigen Kolonie auf einer Agarplatte. Dieses Fehlen von Wachstum wurde in den bisherigen Versuchen in Abwesenheit einer FTx nur selten beobachtet und ist demzufolge am wahrscheinlichsten auf die FTx zurückzuführen. Das spricht für die Effektivität der Fäkaltransplantation in der Unterdrückung und Reduktion der *P. aeruginosa* CFU. Die Wirkung macht sich auch in den Unterschieden bemerkbar, die bei der Betrachtung der Kurve der Referenzgruppe ersichtlich werden. Alleine die sich aus diesem Versuch ergebenden Beobachtung, dass eine FTx den Verlauf der CFU-Kurve einer davor keimexponierten Mausgruppe so beeinflusst, dass sich nicht mehr das für die vorausgegangenen Versuche übliche Kolonisierungsplateau bildet, spricht für ihre positive und erfolgreiche Wirkung im Sinne einer tendenziellen Sanierung von *Pseudomonas aeruginosa* aus dem intestinalen Mikrobiom der Maus.

Eine zweite wichtige Beobachtung macht sich dank dem längeren zeitlichen Experimentaufbau dieser Versuchsreihe bemerkbar: Bei der nicht-fäkaltransplantierten Gruppe bleibt das Niveau der *P. aeruginosa*-Kolonisation mit Fortschreiten der Versuchsdauer stabil. Während die Observationsphase bei dem primären Kolonisationsmodell 7 Tage dauerte, wurde bei dem aktuellen Tierversuchsmodell die Kolonisationsbeobachtung der Referenzgruppe (sowie der FTx-Gruppe) über einen Zeitrahmen von 25 Tagen verfolgt. Auch im Rahmen dieser längeren Observationsphase sinkt die *P. aeruginosa*-CFU-Anzahl im Stuhl der mit *Pseudomonas* kolonisierten Mäuse nicht. Das spricht für eine anhaltendere Kolonisation, als es durch die ersten Versuchsmodelle gezeigt werden konnte, was wiederum die These einer dauerhaften Durchbrechung der Kolonisierungsresistenz des intestinalen Mikrobioms seitens *P. aeruginosa* bestätigt.

4 Diskussion

4.1 Implikationen des Durchbrechens der intestinalen Kolonisierungsresistenz durch *P. aeruginosa*

Die grundlegende Voraussetzung für die Durchführung von Untersuchungen der Kolonisierungsresistenz des murinen intestinalen Mikrobioms, ihr Durchbrechen durch *Pseudomonas aeruginosa*, modulierender Faktoren wie einer antibiotischen Behandlung und der Analyse von Veränderungen der Mikrobiotakomposition während einer Kolonisation mit *P. aeruginosa*, war zunächst die Etablierung eines entsprechenden murinen Kolonisationsmodells. Das Konzept, die Methodologie und die praktische Realisierung dieses Modells wurden im Punkt 2.1. erläutert. Nach der Analyse der Ergebnisse aus diesem Abschnitt des Experiments konnte gezeigt werden, dass *Pseudomonas aeruginosa* erfolgreich den murinen Wirt intestinal kolonisieren kann. Diese Beobachtung wird bei dem Vergleich der CFU-Verlaufskurven vom Stuhl der mit *P. aeruginosa* exponierten und mit *EcN* RR exponierten Mäusen ersichtlich. Dieser Vergleich bietet sich aus dem folgenden Grund an: *P. aeruginosa* ist der bakterielle Organismus von Interesse für diese Arbeit, bedingt durch seine hohe klinische Relevanz insbesondere im hämatoonkologischen Setting und/oder während Immunsuppression. Auf der anderen Seite wurde *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917 als Referenzbakterium gewählt, da seine Kolonisierungspotenz seit mehreren Dekaden sehr gut untersucht und bekannt ist, er häufig als Probiotikum auch therapeutisch eingesetzt wird und bezüglich seiner Anwendung und daraus resultierender Effekte große Erfahrung existiert und wenig Risiken für unerwartete Ergebnisse bestehen. Demzufolge bietet *EcN* eine optimale Vergleichsbasis, auf die das Kolonisierungsverhalten von *P. aeruginosa* bezogen werden kann. Da Mäuse bereits intestinal mit *Enterobacteriaceae* besiedelt sind, unter anderem auch mit *E. coli*, und sich die Morphologie der Kolonien von *EcN* nicht von der Morphologie der Kolonien vom physiologisch im Darm vorkommenden *E. coli* unterscheidet, musste eine Lösung zur Differenzierung zwischen den Kolonien dieser zwei verschiedenen Stämmen

gesucht werden, sodass das Expositionsbakterium von dem bereits im Darm vorhandenen Bakterium unterschieden werden kann. Deswegen wurde in dieser Arbeit ein genetisch modifizierter *E. coli* Stamm Nissle verwendet, der ein Gen für antibiotische Resistenz gegen Rifampicin trug (*EcN* RR). Diese Resistenz bietet zwei Vorteile: Zum einen ermöglicht sie das Wachstum von *EcN* RR auf Rifampicin-haltigem Agar und auf diese Weise eine Auszählung von Kolonien, die ausschließlich von *EcN* RR gebildet werden und nicht von dem physiologischen *E. coli*, der Rifampicin sensibel ist. Zum anderen, da dieses Resistenzgen chromosomal getragen wird und nicht auf einem Plasmid besteht keine große Wahrscheinlichkeit, dass das Gen im Laufe der Versuchsreihen und/oder bei Subkultivierungen verloren wird - mit der Konsequenz der Unmöglichkeit einer adäquaten Auszählung der Kolonien des Expositionsbakteriums.

Während der postexpositionellen Observationsphase dieser Versuchsreihe lag die CFU-Anzahl von *EcN* dauerhaft zwischen 0 und 1 CFU \log_{10} /ml. Dieser Wert entsteht dadurch, dass, während bei den meisten Mäusen keine CFUs von *EcN* RR mehr in der Observationsphase nachweisbar waren, wenige Versuchstiere noch 1 – 2 CFU pro Agarplatte pro Beprobungstag aufwiesen, was rechnerisch zu einem \log_{10} CFU-Wert von ca. 1 führt. Unter Berücksichtigung der logarithmischen Skalierung der Werte und des CFU-Verlaufgraphens und der Tatsache, dass nur wenige Mäuse nicht komplett vom Bakterium zu Ende des Versuchs nachweistechisch befreit waren, während nur wenige sporadisch einzelne *EcN*-Kolonien lieferten, kann man davon ausgehen, dass *E. coli* Nissle 1917 den murinen Wirt nicht vollständig und dauerhaft kolonisieren konnte, obwohl das Bakterium gerade für diese Eigenschaft bekannt ist.

Im Gegensatz dazu zeigte *P. aeruginosa* bezüglich des CFU–Verlaufs postexpositionell ein anderes Verhalten: Bereits zu Beginn der Observationsphase sistierte der Abfall der *P. aeruginosa* CFU-Anzahl im Stuhl auf einer deutlich höheren Logstufe als in der Referenzgruppe. Es etablierte sich ein Plateau mit einem durchschnittlichen CFU-Wert von ca. 3,5 CFU \log_{10} /ml,

welcher dauerhaft bis zur Beendigung des Versuchs sieben Tage lang persistierte. Das bedeutet, dass nach der Keimexposition bei der *P. aeruginosa*-Gruppe im murinen Gastrointestinaltrakt über 3100Mal mehr CFU des Expositionskeims zu finden sind als dies bei der *EcN*-Gruppe der Fall war. Aus diesem Ergebnis lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass *Pseudomonas aeruginosa* in der Lage ist, erfolgreich das murine Intestinum zu kolonisieren. Somit besteht die Grundlage für die weitere Erforschung der Durchbrechung der Kolonisierungsresistenz, ihrer Modulation und der Ansätze für ihre Wiederherstellung.

Eine Limitation der alleinigen Auszählung von CFUs ist es, dass die Anzahl von bakteriellen Kolonien nur eine Aussage darüber liefert, wieviele von den oral verabreichten Bakterien im Darm und folglich im Stuhl vorkommen. Informationen, ob die Expositionskeime in die Blutbahn und andere Gewebe übergehen, fehlen dagegen. Um dieses Ereignis auszuschließen, wurden das Blut und andere Organe der Versuchstiere auf diese Bakterien hin untersucht, wie im Punkt 2.1.0. beschrieben. Zusätzlich dazu wurden die Mäuse regelmäßig klinisch auf Infektionssymptome untersucht (siehe Punkt 2.1.5). Eine Invasion von *P. aeruginosa* in die Blutbahn und andere Organe (mesenterialer Lymphknoten, Lunge, Leber, Milz) konnte zum Ende der Versuchsreihe nicht detektiert werden. Infektionssymptomatik fehlte bei allen untersuchten Mäusen ebenfalls. Das Auftreten transienter Bakteriämien vor dem Zeitpunkt der Präparation der Versuchstiere und eine subklinische Organbesiedlung und/oder Infektion konnten ebenfalls nicht erfasst werden. Entsprechend ist davon auszugehen, dass es allein zu einer Kolonisation ohne Infektion oder anhaltende nachweisbare Bakteriämie bei dem konkreten experimentellen Aufbau gekommen ist. Das ist von großer Bedeutung, da ein weiteres Versuchsvorhaben, welches auf eine Erforschung der Kolonisation mit *P. aeruginosa* zielt, mit Hilfe dieses Modells realisiert werden kann, ohne dass das Risiko einer bei der Versuchskonzipierung nicht berücksichtigten Infektionskomponente besteht. Um der dieser Arbeit zugrundeliegenden Fragestellungen näher zu kommen, würde sich die experimentelle Abwandlung dieses Kolonisationsmodells und seiner Durchführung anbieten. Für solch ein

neues Projekt ist es von essentieller Bedeutung zu wissen, ob die Kolonisierung mit *P. aeruginosa* einer Immunschwäche zu schulden ist, oder ob diese auch ohne diesen fördernden Faktor an sich, wie hier gezeigt, auftreten kann.

4.2 Veränderungen der Komposition der intestinalen Mikrobiota während einer Periode der Kolonisation und ihrer Relevanz

Ziel der Identifikation der Veränderungen, die bei einer Invasion der intestinalen Mikrobiota durch *P. aeruginosa* auftreten war es, zu untersuchen mit welchen Zunahmen und Abnahmen der Anzahl welcher Vertreter der Mikrobiota die Etablierung von *P. aeruginosa* im murinen intestinalen Mikrobiom zusammenhängt. Ein solcher Zusammenhang hat primär den Charakter einer Korrelation ohne eindeutige Kausalität. Beobachtete Korrelationen sprächen aber basierend auf den Definitionen der Kolonisierungsresistenz als bakteriell-bakterielle Interaktionen und Bakterien-Wirt-Interaktion dafür, dass die Invasion neuer oder in ihrer Anzahl bisher minderrepräsentierten Bakterien von Veränderungen des Vorkommens residenter Mikrobiota abhängig ist. Folglich würde die Identifikation eines solchen Zusammenhangs als Basis für die Erforschung einer tatsächlichen Interdependenz dienen. Die Vorstellung dahinter ist, dass wenn man die Mikrobiota identifiziert, die bei Zunahme der *P. aeruginosa* Kolonisation in ihrer Anzahl abfallen, man diese therapeutisch supplementieren könnte, um ihren Abfall entgegenzuwirken. Wenn eine solche Intervention in therapeutischer oder präventiver Absicht tatsächlich zu einer ausbleibenden Kolonisation seitens *P. aeruginosa* führen würde, spräche das für eine wirkliche und nicht nur statistisch-deskriptive Interaktion zwischen den zwei Mikroorganismen, wobei der Mechanismus der Interaktion unidentifiziert bleiben würde. Das gleiche gilt auch für die Mikrobiota, die simultan zum *P. aeruginosa* Anstieg im murinen Gastrointestinaltrakt selber in ihrer Anzahl steigen. Für diese könnte eine agonistische oder eine synergistische Abhängigkeit von und für *P. aeruginosa* vermutet werden. Dies könnte dann durch die Gabe dieser Bakterien

in der präexpositionellen und/oder expositionellen Phase einer Variation des Kolonisationsmodells untersucht werden, wobei dann ein höheres Kolonisierungsplateau von *P. aeruginosa* zu erwarten wäre. Dies sollte einem Detektionsversuch gestellt werden.

Das Ergebnis der DNA-Sequenzierung und der Korrelationsanalyse der „Relative Abundance“ taxonomisch zugeordneten DNA-Sequenzen zu dem *P. aeruginosa*-Kolonisationsniveau lieferte Aussagen, die für oben beschriebene Wechselwirkungen sprechen könnten. Die in der Arbeit ermittelten Korrelationen bezogen sich auf Bestandteile der Mikrobiota auf der Phylum-, Ordnungs- und Genusebene. Die primär angestrebte taxonomische Zuordnung und Korrelation auf Speziesebene war nicht möglich. Dieser Ergebnispunkt wird im Abschnitt 4.5.3 dieser Arbeit näher diskutiert. Die Korrelationsergebnisse auf Ordnungs- und Genusebene waren diese: Auf Ordnungsebene ergab sich für *Eggerthellales* und *Clostridiales* ein negativer Korrelationstrend, während dieser ausschließlich für die Ordnung der *Lactobacillales* positiv war. Auf Genusebene konnte nur für *Lactobacillus* eine positive Korrelation beobachtet werden. Die negativ korrelierenden Genera waren u.a. *Blautia*, *Christensenella*, *Roseburia* und *Enterorhabdus*.

Auf Phylumebene korrelierten *Actinobacteria* und *Cyanobacteria* negativ zu *P. aeruginosa*. Auf diese Beobachtung wird an dieser Stelle nicht näher eingegangen, da Phyla definitionsgemäß zu breit gefasst sind und demzufolge dieses Ergebnis in Hinsicht auf seiner weiteren Anwendbarkeit marginalerer Relevanz ist, da sich aus Phyla keine für therapeutische oder präventive Interventionen anwendbare Oligoflora ableiten lässt.

Der Logik des obigen Abschnitts folgend, ergibt sich aus diesem Versuch die folgende Theorie: Da das mengenmäßige Vorkommen von *Eggerthellales* und *Clostridiales* während der Etablierung der Kolonisation mit *P. aeruginosa* abnimmt, werden diese zwei Ordnungen vermutlich direkt oder indirekt verdrängt durch *Pseudomonas*. Diese Verdrängung, wenn kausal verursacht, lässt sich

beispielsweise durch eine Konkurrenz mit *P. aeruginosa* um Nährstoffe, durch direkte bakterizide Effekte von *P. aeruginosa* auf diese Mikrobiota und andere negative Interaktionen erklären. Ausgehend von dieser Kompetition wäre es möglich zu schließen, dass diese zwei Ordnungen in ihrer Unterhaltung der Kolonisationsresistenz unterstützt werden sollen – z.B. wie oben genannt durch ihre Supplementierung, angenommen ihr Vorkommen im Intestinum führt dazu, dass sich *P. aeruginosa* nicht vermehren kann. So könnte die Wahrscheinlichkeit einer *P. aeruginosa*-Kolonisation verringert werden oder diese könnte sich dann nicht so erfolgreich etablieren. Die gleiche Schlussfolgerung, diesmal auf Genusebene gezeichnet, gilt für die während der Kolonisation abnehmenden Mikrobiota *Blautia*, *Christensenella*, *Roseburia* und *Enterorhabdus*, etc. Somit besteht die Basis für die Durchführung einer dieser Hypothesen untersuchenden Modellaufbaus, bei dem die separaten oder kombinierten Gaben der Ordnungen *Eggerthellales* und *Clostridiales* und/oder der Genera *Blautia*, *Christensenella*, *Roseburia* und *Enterorhabdus* und ihre Konsequenz auf die *P. aeruginosa* Kolonisationsausprägung unter der Arbeitshypothese einer Minderung dieser Ausprägung erforscht werden könnten. Natürlich soll hier klar erwähnt werden, dass sehr wahrscheinlich nicht alle Vertreter einer Ordnung oder eines Genus gleichermaßen fähig sind die Kolonisationsresistenz zu beeinflussen. Da sich diese mikrobiellen Vertreter genetisch unterscheiden, wenn auch relativ marginal in den Rahmen ihrer Genera und wesentlicher in den Definitionen ihrer Ordnungen, besitzen diese verschiedene metabolische und insgesamt physiologische Eigenschaften. Das führt dazu, dass nicht alle diese Mikroorganismen gleich potent die Kolonisationsresistenz und respektiv die Kolonisationsausprägung mit *P. aeruginosa* beeinflussen können und nicht alle für die Komposition einer in therapeutischer Intervention zu applizierender Oligoflora geeignet sind. Es wird die weitere Durchführung von Experimenten notwendig sein, um die potenteren mikrobiellen Determinatoren der Kolonisationsresistenz konkreter zu identifizieren.

Für den positiv korrelierenden Genus *Lactobacillus*, gehörend zu der ebenfalls positiv korrelierenden Ordnung *Lactobacillales*, ergibt sich der bisherigen Logik

folgend die Vermutung, dass, wenn diese Mikrobiota in ihrer Anzahl simultan zu der *P. aeruginosa* Anzahl ansteigen, es möglicherweise ein Zusammenspiel im Sinne eines Agonismus oder Synergismus zwischen den beiden Mikroorganismen gibt. Da vor dem Auftreten von *P. aeruginosa* in der Höhe, die in der Expositionsphase der Versuchsreihe gegeben wurde, im murinen Intestinum *Lactobacillales*, respektiv *Lactobacillus* geringer vertreten waren, kann es sein, dass diese sich in der Anwesenheit von *P. aeruginosa* besser entwickeln können. Entweder fördert *P. aeruginosa* ihr Wachstum direkt, oder bewirkt das indirekt, indem beispielsweise Konkurrenten von *Lactobacillales/Lactobacillus* durch *P. aeruginosa* oder von ihm sezernierte Metabolite verdrängt werden. Das wäre eine mögliche förderliche Interaktion seitens *Pseudomonas* zugunsten dieser Ordnung und diesem Genus. Wenn eine synergistische Wechselwirkung zwischen diesen Mikroorganismen existieren würde, bedeutete dies, dass nicht nur *Lactobacillus* von dem Auftreten von *Pseudomonas* profitiert, sondern dass *Pseudomonas* auch einen Vorteil für seine Persistenz im Gastrointestinaltrakt daraus zieht, wenn dort *Lactobacillus* vorhanden ist, ergo handelt es sich hier um eine bilateral nutzbringende Beziehung. Insofern würde bei einer rein agonistischen Abhängigkeit die Wachstumshemmung oder Eradikation von *Lactobacillus* keinen Effekt auf *P. aeruginosa* haben, da das Wachstum dieses Genus nur die Folge und keine Ursache des Vorkommens von *P. aeruginosa* ist. Wenn es sich aber um eine synergistische Verbindung handeln würde, sollte eine Inhibition oder Eradikation von *Lactobacillales/Lactobacillus* einen negativen Effekt auf die Kolonisationspotenz von *P. aeruginosa* haben, da dieser dann auch von dem o.g. Genus/Ordnung zumindest teilweise abhängig ist. Generell lässt sich aber durch den aktuellen Versuchsaufbau keine konkrete Aussage über die Art der Wechselwirkung zwischen den negativ korrelierenden Mikrobiota und *P. aeruginosa* machen. Um näher zu untersuchen, ob diese wirklich miteinander biologisch wechselwirken und die hier beschriebene Beobachtung einen kausalen Zusammenhang besitzt, und weiterhin ob es sich ggfs. um einen Agonismus oder Synergismus handelt, sollte die Konzipierung weiterer Versuche folgender Art erfolgen: Durch einen gezielten, negativen Einfluss inhibitorischer

oder eradizierender Art auf die positiv korrelierenden Bakterien (z.B. durch auf *Lactobacillales/Lactobacillus* gerichtete Antibiose, wobei durch dieses Mittel keine richtige Selektivität auf diese Bakterien erreicht werden kann und möglicherweise andere mikrobielle Vertreter dadurch beeinflusst werden und somit evtl. ein Effekt via *Lactobacillales/Lactobacillus* vorgetäuscht wird. Ein geeigneteres Verfahren zur gezielten *Lactobacillales/Lactobacillus* Reduktion könnte auf selektive Antikörper basiert werden), sollte das Vorkommen von *Pseudomonas* im murinen intestinalen Mikrobiom vermindert oder der Keim komplett beseitigt werden. Wenn im Anschluss diese Versuchstiere, deren Intestinum *Lacobacillales/Lactobacillus* nur geringgradig oder gar nicht enthält, einer Exposition mit *P. aeruginosa* wie im Punkt 2.1 ausgesetzt werden, sollte dabei wieder der Verlauf der Kolonisation mit *P. aeruginosa* verfolgt werden. Das Ausbleiben des Auftretens einer weniger ausgeprägten Kolonisation könnte dann zwei Ursachen haben. Entweder gibt es kein biologisches Wechselspiel zwischen *P. aeruginosa* und *Lactobacillales/Lactobacillus* oder dieses Wechselspiel ist nur ein agonistisches – *P. aeruginosa* begünstigt das Wachstum von *Lactobacillales/Lactobacillus*, ohne von diesem abhängig zu sein. Wenn die Wechselbeziehung zwischen den beiden Mikroorganismen vorhanden ist und im Sinne eines Synergismus erfolgt, wäre das folgende Ergebnis zu erwarten: Bei einem Absinken der Konzentration von *Lactobacillales/Lactobacillus* sollte es zu einer Minimierung ihrer synergistischen Effekte kommen. Da somit nicht nur der positive Einfluss von *Pseudomonas* auf die *Lactobacillales/Lactobacillus* ausfällt, sondern auch die *P. aeruginosa*-Kolonisierung begünstigenden Effekte von *Lactobacillales/Lactobacillus* nicht vorhanden sind, sollte *P. aeruginosa* die Kolonisationsresistenz des murinen intestinalen Mikrobioms entweder nicht durchbrechen können oder wenn doch müsste die dann entstehende Kolonisation zumindest weniger ausgeprägt sein.

Entsprechend der Zielsetzung dieser Arbeit wurde hier ein richtungweisendes Ergebnis erreicht, auf Grundlage dessen die angestrebte Identifikation von Mikroorganismen für die gezielte kolonisationsresistenzunterstützende Modulation des Mikrobioms konstitutiv basiert werden kann. Eine exaktere

Definition einer therapeutisch oder präventiv einsetzbaren Oligoflora müsste noch anhand anderer Methoden phylogenetischer Zuordnung erreicht werden, wie z.B. mittels Shotgun Sequencing. Die tatsächliche positive Wirkung von bakteriellen Genera und Ordnungen, die eine solche Oligoflora bilden muss noch, wie in diesem Punkt beschrieben, wissenschaftlich bestätigt werden. Hinweise für Kandidaten für diese weiteren Untersuchungen stehen aber fest. Als die Kolonisierungsresistenz potenziell positiv beeinflussende Bakterien gelten die negativ korrelierende Ordnungen *Eggerthellales* und *Clostridiales* und die negativ korrelierenden Genera *Blautia*, *Christensenella*, *Roseburia* und *Enterorhabdus* und sollten genauer als probiotische Supplementationskandidaten untersucht werden. Eine indirekte, positive Beeinflussung der Kolonisierungsresistenz könnte erreicht werden durch die Supprimierung oder Eradikation der Ordnung der *Lactobacillales* oder des Genus *Lactobacillus*, welche die Kolonisation von *Pseudomonas aeruginosa* möglicherweise fördern.

4.3 Folgen der fehlenden Effekte der Applikation des Antibiotikums Ciprofloxacin auf den Ausprägungsgrad intestinaler Kolonisierung mit *P. aeruginosa*

Im Punkt 3.3. des Ergebnisteils dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich bei präexpositioneller Applikation von Ciprofloxacin in einer Dosierung von 1000mg/70kg KG mittels Trinkwasser kein Einfluss auf den Ausprägungsgrad der Kolonisation bei Exposition mit *Pseudomonas aeruginosa* zeigt. Diese Untersuchung wurde durchgeführt, weil antibiotische Interventionen u. a. zu einer Disruption der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota führen können und die Suszeptibilität dieser Artengemeinschaft für neue, evtl. pathogene Mikroorganismen steigern. Die Erklärungen dieses Phänomens sind vielfältig, wobei die bedeutendste das Auftreten oder Freiwerden neuer oder bisher belegten ökologischen Nischen ist. Dieses entsteht durch das von dem Antibiotikum hervorgerufene Eradikation mancher intestinalen Mikrobiota und

deren minimierten Anzahl. Das resultiert nicht nur in der o.g. Nischenfreilegung, sondern auch in einer geringeren Konkurrenz gegenüber den und Bekämpfung der neu kolonisierenden Bakterien seitens der bereits etablierten Mikrobiomvertreter (siehe Punkt 1.2).

Ein solcher Effekt auf das Kolonisationsverhalten von *P. aeruginosa* wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet. Das könnte auf verschiedene Ursachen zurückzuführen sein.

Eine Möglichkeit ist, dass die Versuchstiere keine für eine bakterizide Wirkung ausreichende intestinal-luminale Antibiotikakonzentration bei der angewendeten Applikationsmethode erreicht haben. Diese Erklärungsmöglichkeit ist unwahrscheinlich, da ein zeitlich zusammenhängender Effekt der Ciprofloxacingabe auf den für die Versuchsmäuse physiologischen *E. coli* nachgewiesen wurde. Das spricht für eine Wirksamkeit des Antibiotikums bei der gewählten Dosierung und bei der gewählten Applikationsweise. Die Dosierungen von Antibiotika unterliegen in der Regel keiner Anpassung in Abhängigkeit von dem die Infektion-, bakteriämie- und kolonisationsverursachende Bakterium. Die Dosis ist vom Zielkeim unabhängig. Das bedeutet, dass wenn Ciprofloxacin in dieser Dosierung einen Effekt auf den im murinen Intestinum physiologisch vorkommenden *E. coli* hatte, sollte es auch einen Effekt auf die anderen zu seinem Wirkspektrum gehörenden Bakterien haben. Der auf dem physiologischen *E. coli* beobachtete Effekt spricht auch dafür, dass die Versuchstiere tatsächlich aus dem gegebenen Wasser ausreichend getrunken haben. Die Möglichkeit eines reduzierten und für die antibiotische Wirkeffizienz nicht ausreichenden Trinkverhaltens kann somit nicht belegt werden.

Bei der Resistenztestung des eingesetzten *P. aeruginosa* PAO1 Stammes zeigte sich in Mikrodilution (Vitek® 2.0) Suszeptibilität gegenüber Ciprofloxacin. Dies könnte nahelegen, dass eventuell die präexpositionelle Antibiotikumgabe dafür verantwortlich ist, dass die *P. aeruginosa* CFU-Anzahl bei Vorschädigung der intestinalen Mikrobiota nicht übermäßig ansteigt. Darum sei an dieser Stelle noch

einmal darauf hingewiesen, dass die Antibiotikaexposition einen Tag vor der Keimexposition mit *P. aeruginosa* eingestellt wurde. Selbst wenn das vom Organismus der Mäuse nicht ausgeschiedene oder nicht metabolisierte Fluorochinolon noch einen gewissen Effekt auf den verabreichten *P. aeruginosa* gehabt haben sollte, so erscheint in Anbetracht der biologischen Halbwertszeit von nur ca. 3-5h (beim Menschen) [93] im Vergleich zur siebentägigen Dauer der Keimexposition ein ausgeprägter Einfluss auf die in der Observationsphase festgestellten *P. aeruginosa*-CFU unwahrscheinlich.

Wird der Effekt der Antibiose in Form einer möglichen Hemmung der Kolonisierungsresistenz und der Eröffnung ökologischer Nischen durch Abtöten konkurrierender Mikrobiota in Betracht gezogen, so sollte die posttherapeutische Phase günstige Bedingungen für eine Kolonisation bieten. Eine autogene Restauration des Mikrobioms bzw. Rückkehr zur Eubiose ist nur mit Verzögerung nach Absetzen der Antibiose zu erwarten. Da die *P. aeruginosa*-CFU Anzahl dennoch nicht stärker ausgeprägt als bei dem unter Punkt 3.1 beschriebenen Versuchsaufbau war, kann man konkludieren, dass eine Ciprofloxacin-Prophylaxe in der genannten Dosierung keinen für *Pseudomonas aeruginosa* kolonisationsbegünstigenden Effekt aufweist und zumindest für den murinen Wirt kein erhöhtes Kolonisations- und Infektionsrisiko mit sich bringt. Diese Schlussfolgerung gilt für gesunde, immunkompetente, Wildtyp Black 6 Mäuse wie in diesem Experiment. Das bedeutet, dass das Ergebnis logischerweise für den konkreten Versuchsaufbau mit den hier konkret verwendeten Versuchstieren spezifisch ist. Andere Mäuse mit anderer Komposition ihrer intestinalen Mikrobiota, anderem genetischen Hintergrund oder angeborenem Immundefekt könnten ein Ergebnis liefern, welches von dem hier beobachteten abweicht. Nicht ausgeschlossen ist auch die Möglichkeit, dass das murine Intestinum generell und nicht nur der C57BL/JOlaHsd Mäuse keine Kolonisierungsresistenz gegenüber *P. aeruginosa* gewährt. Deswegen würde sich die Erstellung eines analogen Versuchsaufbaus anbieten, bei den keimfreien Mäusen, der eine humane Darmmikrobiota transplantiert und in denen stabil etabliert wurde, mit *P. aeruginosa* auf der gleichen Art und Weise exponiert werden. Somit läge eine

Vergleichsbasis für die Untersuchung des Kolonisationsverhaltens von *P. aeruginosa* in der Maus mit murinen Darmmikrobiota und der Maus mit humanen intestinalem Mikrobiom vor, um eine differenzierende Aussage treffen zu können, ob das hier beobachtete Kolonisationsverhalten auch unter der Antibiotiose mit Ciprofloxacin an dem murinen Wirt an sich zu schulden ist oder der murinen Mikrobiota.

Zuallerletzt lässt sich die abschließende Schlussfolgerung aufstellen, dass nicht die Gabe von jedem beliebigen Antibiotikum für die Kolonisation durch jedes beliebige Bakterium gleichermaßen prädisponiert. Ein begünstigender Effekt von Ciprofloxacin für das Kolonisationsausmaß von *P. aeruginosa* konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Das bedeutet allerdings nicht, dass Antibiotika generell keinen Einfluss auf die Kolonisierungsresistenz des intestinalen Mikrobioms oder auf die Durchbrechung derselben durch eindringende und sich erfolgreich etablierende Keime hätten. Aller Voraussicht nach gilt die These, dass die Kolonisationschancen für ein konkretes Bakterium nicht durch die Gabe verschiedener beliebigen Antibiotika in gleichem Maße verbessert werden. Dafür sprechen auch die in der klinischen Medizin für eine *C. difficile* Infektion bekannten prädisponierenden Faktoren. Als ein solcher Faktor gilt natürlich eine antibiotische Therapie. Dabei ist jedoch bekannt, dass genauer die Gabe von Clindamycin die Wahrscheinlichkeit für eine Überwucherung des Darms mit *C. difficile* mit der Folge einer infektiösen Diarrhoe am ehesten erhöht [94]. Folglich lässt sich schließen, dass die Antibiotika, die zu einer ausgeprägten *P. aeruginosa* Kolonisation des murinen Intestinums führen können nicht Ciprofloxacin oder Ciprofloxacin-ähnlich sind in Bezug auf ihren Wirkmechanismus und Wirkspektrum. Als Ziel der Arbeit wurde unter anderem die Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen einer Ciprofloxacin-Prophylaxe und einem möglicherweise gesteigerten Ausmaß der *P. aeruginosa* Kolonisation gesetzt. Ein solcher Zusammenhang konnte nicht bestätigt werden. Von Untersuchungen der Effekte weiterer Antibiotika auf die Ergebnisse des Kolonisierungsmodells wurde abgesehen, da die Arbeit auf der Nachbildung eines konkreten klinischen Settings basierte. Eine Erforschung

solcher hier nicht untersuchten Wechselwirkungen zwischen dem Einsatz anderer Antibiotika bzw. Antibiotikaklassen und der Kolonisierungsresistenz ist aber sinnvoll und wird als notwendig angesehen.

4.4 Die Einflüsse der Fäkaltransplantation auf die intestinale Kolonisierung mit *P. aeruginosa* und ihrer potenziellen Anwendbarkeit

Bei der letzten in dieser Arbeit behandelten Modifikation des Kolonisationsmodells wurde eine perorale Fäkaltransplantation bei zuvor mit *P. aeruginosa* kolonisierten Mäusen durchgeführt. Ziel dieses Experiments war die Untersuchung der Effekte der Fäkaltransplantation auf die gemessene *P. aeruginosa* CFU, insbesondere im Hinblick auf eine mögliche Sanierung der Kolonisation oder einer Reduktion der Ausscheidung von *P. aeruginosa* als Marker für das Ausmaß der Besiedlung.

Diese Versuchsreihe war so geplant und durchgeführt wie die bisherigen. Es wurden 2 Gruppen mit jeweils 5 Versuchstieren eingesetzt. Unterschiede bestanden in Hinsicht der Intervention im Sinne von FTx bei der Testgruppe und der längeren Zeit der Observationsphase bis zum 32. Tag beider Gruppen. Wie erwartet kam es nach Beendigung der Expositionsphase wie in den bisherigen Versuchen zu einem Absinken der CFU-Zahl. Die Ausscheidung von *Pseudomonas aeruginosa* persistierte in der Form eines Plateaus der CFU-Zahl und der ausplattierte Stuhl zeigte ein sehr stabiles Vorhandensein von *P. aeruginosa* von etwa 3,5 CFU log₁₀/ml. Dieses Plateau von 3,5 CFU log₁₀/ml bildete sich anfangs bei beiden Gruppen bis zu dem Zeitpunkt, an dem die erste Stuhlgavage stattfand. Direkt im Anschluss der Gavage am nächsten Beprobungstag divergierte die CFU-Kurve der fäkaltransplantierten Versuchstiergruppe in absinkender Richtung bezogen auf den CFU-Verlauf der nichttransplantierten Kontrollgruppe. Die Diskrepanz im CFU-Niveau beider Gruppen betrug ca. 2 CFU log₁₀/ml an diesem Tag. Das war auch der Tag der

höchsten Ausprägung dieser Diskrepanz nach der ersten FTx, wobei diese insgesamt 5 Tage anhielt. Da sich beide Mäusegruppen abgesehen von der FTx-Gavage unter identischen Bedingungen gehalten wurden und ein eindeutiger zeitlicher Zusammenhang zwischen Fäkaltransplantation und Reduktion des Vorkommens von *P. aeruginosa* im Stuhl bestand, ist dieses Ergebnis als Resultat der Fäkaltransplantation anzusehen. Ab dem 18. Tag der Versuchsreihe stiegen die *P. aeruginosa* CFU-Werte für die fäkaltransplantierte Gruppe wieder so weit an, dass sie wieder das Niveau der nichttransplantierten Gruppe erreichten. Dieses Ereignis spricht für eine Rekonstitution der Kolonisation mit *P. aeruginosa*. Daraufhin schwankte der Verlauf der CFU-Kurve der FTx-Gruppe um ein Niveau, welches höher war als das unmittelbar post-FTx beobachtete, aber niedriger als das Niveau der nichttransplantierten Gruppe. Das spricht dafür, dass nach der ersten Gavageserie von intestinalen Mikrobiota in Form von Fäkaltransplantation es zu einer Reduktion von *P. aeruginosa* in der davor kolonisierten Maus kommt, aber nicht zu einer kompletten Sanierung der ursprünglich *Pseudomonas aeruginosa*-freien Komposition der Darmmikrobiota. Diese Reduktion ist auch bei der im Rahmen dieser Arbeit gewählten Methodik der Applikation von FTx nach der erstmaligen Stuhlgabe temporär und nicht definitiv gewesen, da es zu einem erneuten Anstieg der CFU-Anzahl von *P. aeruginosa* auf etwa das ursprüngliche Kolonisationsniveau kam.

Da bereits bei der Konzipierung dieses Versuchsaufbaus davon ausgegangen wurde, dass der Effekt der Fäkaltransplantation nach einer einzigen Serie von Gavagen möglicherweise nicht für eine nachweisbare bzw. dauerhafte Reduktion der *P. aeruginosa* CFU-Anzahl ausreichend sein könnte, wurde eine zweite, im Ablauf identische Serie von Gavagen ab Tag 21 vorbereitet und durchgeführt. Das Ergebnis der zweiten FTx war, anders als bei der ersten Serie, ein dauerhaftes bzw. bis zum Ende der Observationsphase anhaltendes Absinken des Auftretens von *P. aeruginosa*. Auch die zweite Fäkaltransplantation führte über die verbliebene Beobachtungszeit von weiteren 10 Tagen nicht zu einer kompletten Sanierung. Das Kolonisierungsniveau, welches bei der zweiten FTx erreicht wurde war nicht nur länger anhaltend, sondern auch niedriger als bei der

ersten Serie (max. um ca. 2,7 CFU log₁₀/ml. Da sowohl der gavagierte Fäzes, welcher dafür benutzt wurde, als auch der Ablauf die gleichen waren, könnte das bessere Ansprechen auf die zweite FTx-Serie einem kumulativen Effekt geschuldet sein.

Somit wurde gezeigt, dass sich mittels einer FTx die Kolonisierung des Wirtes mit *P. aeruginosa* generell reduzieren lässt. Bei der in dieser Arbeit angewendeten Methode wurden insgesamt zwei Serien von Fäkaltransplantationen benötigt, um die Anzahl von *P. aeruginosa* dauerhaft zu reduzieren. Nach Abschluss der zweiten Serie kam es innerhalb der Dauer der durchgeführten Observationsphase nicht mehr zu einem Wiederanstieg der *P. aeruginosa* CFU. Für eine vollständige Sanierung der Kolonisation mit *P. aeruginosa* in diesem Setting waren zwei Transplantationsserien mit den in Punkt 2.3 beschriebenen Gavageintervallen und -konzentrationen nicht ausreichend. Ob zusätzliche Gavagen oder eine höhere Mikrobiotamenge bzw. Mikrobiotakonzentration in Hinsicht der Dosierungen der einzelnen Gaben die zweite Fäkaltransplantationserie erübrigen oder gar eine Sanierung erreicht werden kann, bleibt hier unbeantwortet. Zur Klärung dieser Frage müssen weitere Versuche durchgeführt werden, deren Protokolle entsprechend adaptiert sind. Der Effekt der Fäkaltransplantation zeigt sich in dieser Arbeit jedoch klar – die Fäkaltransplantation kann das kolonisierende Bakterium *P. aeruginosa* reduzierend beeinflussen. Die Beobachtung dieses Resultats stellt eine orientierende Grundlage dar für die Konzeption der Erforschung und späteren Anwendung einer Transplantation definierter Mikrobiotavertreter (Oligoflora) bei *P. aeruginosa* Kolonisation im humanen Wirt. Eine Empfehlung für weitere Adaptationen des hier angewendeten Applikationsverfahrens (Zugang, Intervall, Dosierung) und ihre experimentelle Erforschung mit dem Ziel des Erreichens einer höheren Effizienz und Akzeptanz seitens des Rezipientens wird hier gegeben.

4.5 Limitationen

4.5.1 Limitationen des murinen Kolonisationsmodells und ihre Folgen

Trotz der sorgfältigen Konzipierung des Kolonisationsmodells ist der Ausschluss von eventuell vorhandenen Validitätseinschränkungen der von ihm gelieferten Ergebnisse nicht sicher möglich. Darüber hinaus liegen mögliche interpretatorische Fehlerquellen für das Verhalten von *Pseudomonas aeruginosa* im murinen Intestinum vor. Diese bestehen in Bezug auf eine induktive Generalisierung des im Rahmen der Arbeit gezeigten Verhaltens für andere Faktoren des Versuchsaufbaus, die anders als bei dem hier beschriebenen Experiment sind. Solche vom konkreten Versuchskonzept abweichende Versuchskomponenten können folgende sein: Andere murine Stämme bzw. genetische Varianten, Mäuse mit modifizierter oder ohne Darmmikrobiota, andere Tierhaltungsbedingungen, andere Expositionsvarianten (*P. aeruginosa* Stamm: multidrug-resistent, extensivelydrug-resistent, konkrete nosokomiale Isolate, oder Varianten mit gentechnischer Knockouts virulenzfaktordeterminierender DNA-Sequenzen, Expositionsmedium, Expositions dosis und -intervalle etc.). Von Interpretationen im Sinne von Übertragungen von Faktoren, die wie die oben aufgezählten von den konkret erforschten Faktoren differieren, sollte aufgrund ihrer Fehlerhaftigkeit abgesehen werden. Die Ergebnisse der hier dargestellten Versuchsreihen basieren ausschließlich konkret auf diesem Versuchsaufbau und dürfen samt deren Diskussion als in sich konsistent erachtet werden. Von weiteren Annahmen, die nicht die Exaktheit des oben beschriebenen Kolonisationsmodells berücksichtigen, sollte abgesehen werden oder diese sollten nicht mehr als eine Hypothesenbildung, u. a. für Folgeversuche darstellen. Eine solche Limitation ist aber untersucherabhängig und nicht der Untersuchung an sich zu schulden.

Neben den grundlegenden Limitationen präklinischer Modellen können auch Einschränkungen im Versuchsaufbau von Bedeutung sein, die das Kolonisationsmodell konkret selber bietet. So muss zum Beispiel beachtet

werden, dass beide Mäusegruppen (*P. aeruginosa* und *EcN*) möglichst zeitgleich exponiert, beprobt und untersucht wurden, um Umweltfaktoren wie z.B. die zum Versuchszeitpunkt im Tierstall prävalente Umweltflora oder den Einfluss durch die Experimentatoren gleich zu halten. Innerhalb einer Beprobung wurden jedoch beide Gruppen stets getrennt voneinander versorgt. Das hat den Vorteil, dass eine mögliche Kontamination zwischen den Gruppen vermieden wird. Der Nachteil dieses Verfahrens besteht in der Nacheinanderschaltung der Gruppen bei der Beprobung (*P. aeruginosa* vor *EcN*) und der relativ langen Zeit, die für die Sammlung von Stuhl notwendig war (ca. 20 - 40 min pro Gruppe), die dazu führen, dass die Zeitspanne zwischen Stuhlgewinnung (*in vivo* Bedingungen) und Stuhlkonservierung/-bearbeitung (*in vitro* Bedingungen) beider Gruppen unterschiedlich lang sind. Trotz sofortiger Kühlung der gesammelten Proben auf Eis könnte dies möglicherweise zu einer Verschiebung in der Komposition der Mikrobiota bis zum Zeitpunkt der Konservierung bzw. des Ausplattierens der *P. aeruginosa* Gruppe nach unten im Vergleich zu der *EcN* Gruppe führen. Dieses Risiko wird theoretisch durch den Wasserkeimcharakter von *Pseudomonas* verstärkt, da ein Überleben des Bakteriums im Trockenen schwieriger ist. Im Kolonisationsmodell wurde gezeigt, dass *P. aeruginosa* im Vergleich zu *E. coli* Nissle viel stärker den murinen Wirt kolonisiert. Basierend auf diesem methodologischen Aspekt könnte es folglich sein, dass bei einer simultanen Beprobung und Bearbeitung der CFU-Stuhlproben die *Pseudomonas aeruginosa* Kolonisation noch ausgeprägter nachweisbar gewesen wäre als in dieser Arbeit gezeigt. Um diese Suggestionen aufzuheben empfiehlt sich die Durchführung eines Experiments, bei dem untersucht wird, welchen Einfluss auf die Überlebensdauer der Zielbakterien die Länge der *in vitro* Verbleibdauer der Stuhlproben hat. Dieser könnte so gestaltet werden, dass aus wenigen Mäusen (um interindividuelle Variationen zu vermeiden) die mit den beiden Zielkeimen auf der gleichen Art und Weise exponiert werden mehrmals Stuhlköttel gesammelt werden. Diese Stuhlköttel werden dann geteilt (um evtl. vorhandene Variationen in der quantitativen Mikrobiotazusammensetzung der verschiedenen Kötteln zu vermeiden) und die einzelnen Teile für unterschiedliche Dauer unter den bisher angewandten *in vitro* Bedingungen gehalten werden (z.B. vier

Teilungen jedes Kottels mit anschließender getrennter Konservierung der Teile in Eppendorfgefäße auf Eis für entsprechend 10 min, 20 min, 30 min und 40 min). Nach Ablauf der jeweiligen *in vitro* Konservierungszeit sollen die Stuhlteile auf für die entsprechenden Zielkeime selektiven Agarplatten ausplattiert werden. Der letzte Schritt des Versuchs sollte eine für alle Agarplatten gleichdauernde Bebrütung sein mit anschließender Auszählung der Zielkeim-CFUs und statistischer Auswertung der Ergebnisse. So könnte man eine Aussage darüber treffen, ob der im Rahmen dieser experimentellen Arbeit verwendete *P. aeruginosa* oder *E. coli* Nissle Stamm unter den im Rahmen dieser Arbeit vorkommenden *in vitro* Bedingungen länger überleben und demzufolge mehrere CFUs bilden kann.

Als weitere mögliche Einschränkung muss die Versuchstierkollektivgröße erachtet werden. Diese ist mit insgesamt 35 Mäusen (20 *P. aeruginosa* Stamm PAO1 und 15 *E. coli* Nissle 1917 mit Rifampicin-Resistenz) relativ klein. Das könnte die statistische Aussagekraft der Ergebnisse bei einer Analyse möglicherweise begrenzen und macht solidere Interpretationsannahmen weniger wahrscheinlich. Trotzdem war die beobachtete Verhaltenstendenz der Werte eindeutig und bietet eine suffiziente Basis für Diskussionen.

4.5.2 Limitationen der Interpretation der Ergebnisse aus dem Versuchsaufbau mit Ciprofloxacin-Vorbehandlung

Im Zusammenhang mit dem klinischen Hintergrund der Fragestellungen und Zielsetzungen dieser Arbeit ist der ausbleibende Einfluss einer Ciprofloxacin-Vorbehandlung auf das Kolonisierungsverhalten von *P. aeruginosa* eine positive Feststellung. Diese bietet als solche ein weiteres Motiv für die Durchführung von Studien, die diese mögliche Wechselbeziehung beim Menschen untersuchen, da sich diese auch im humanen Wirt dann wahrscheinlich nicht negativ auf der residenten Mikrobiota auswirken wird.

Ein wichtiger Punkt, in dem sich das murine Kolonisationsmodell mit seiner antibiotischen Modifikation von der klinischen Realität unterscheidet, besteht in der strikten Monotherapie der Versuchstiere. Während diese ausschließlich Ciprofloxacin bekommen haben (gleiche gewichtsbezogene Dosierung wie beim Menschen), bekommen die Patienten in der Klinik häufig Kombinationstherapien, die nicht nur aus Antiinfektiva bestehen, sondern auch die Grunderkrankung dieser Patienten oder ihre Symptome bzw. Nebenwirkungen sonstiger Medikamente beeinflussen sollen. Diese weitere medikamente können auch einen Effekt auf das intestinale Mikrobiom haben, welcher wiederum seine Kolonisierungsresistenz stören könnte. Das Patientenkollektiv, welches diese Arbeit motiviert besteht häufig wie im Punkt 1.5 beschrieben aus immungeschwächten Individuen, die an einer hämatoonkologischen Erkrankung leiden bzw. iatrogen immunsupprimiert sind. Aufgrund ihrer Immunschwäche erhalten diese Patienten eine der hier untersuchten Ciprofloxacin-Vorbehandlung ähnliche Prophylaxe. Was diese Patienten aber nicht selten zusätzlich an medikamentösen Therapien/Prophylaxen erhalten sind Antimykotika und weitere Antibiotika – i.d.R. Cotrimoxazol. Cotrimoxazol ist ein bakteriostatisch wirkendes Antibiotikum, welches aus einem festen Dosisverhältnis von 1:5 Trimetoprim und Sulfomethoxazol besteht. Sein Wirkmechanismus beruht auf der Hemmung zweier für die bakterielle Folsäuresynthese essentieller Enzyme [95]. Die häufigste Indikationsstellung, welche die Gabe dieses Antibiotikums rechtfertigt, ist die *Pneumocystis-jirovecii*-Pneumonie-Prophylaxe. Die PjP ist eine gefährliche Form einer atypischen, interstitiellen Pneumonie, für die insbesondere immunkompromittierte Patienten anfällig und dadurch vital bedroht sind. Die prophylaktische Medikation der Wahl ist die perorale Gabe von 960mg Cotrimoxazol 3 Mal wöchentlich während eines stationären Aufenthalts [95]. Da das Wirkspektrum dieses Antibiotikums sehr breit ist und vom Gram-positiven bis zum Gram-negativen Bereich reicht, kann man bei einer Kombination mit dem ebenfalls im Gram-negativen Bereich wirksamen Fluorochinolon Ciprofloxacin von einer potenten antibakteriellen Kombination ausgehen. Eine Limitation dieser Studie ist, dass dieser evtl. vorhandene Kombinationseffekt, der möglicherweise einen Vorteil für *Pseudomonas aeruginosa* bei der Durchbrechung der

Kolonisationsresistenz bietet, nicht berücksichtigt wurde. Die Effekte einer vollständigen Medikation eines realen hämatoonkologischen/immunsupprimierten Patienten wurden auch aufgrund ihrer hohen Komplexität bei einer experimentellen Simulation nicht untersucht. Der Aufbau von präklinischen und klinischen Studienmodellen, welche zumindest die Zweifachtherapie aus Ciprofloxacin und Cotrimoxazol als Faktor für eine ausgeprägtere *P. aeruginosa*-Kolonisierung erforschen, wäre sinnvoll. Die Eliminierung von Ciprofloxacin als alleiniger solcher Faktor im hier etablierten präklinischen Setting bietet eine Grundlage dafür.

Ein weiterer wichtiger Faktor, der berücksichtigt werden sollte, ist, dass es sich bei dem im Kolonisationsmodell eingesetzten Versuchstieren um gesunde und nicht um immunsupprimierte Mäuse handelte. Die Erforschung der Effekte einer Ciprofloxacinantibiose bzw. -vorbehandlung war kein primäres Ziel dieser Arbeit. Allerdings sei hier betont, dass bei einem immunkompromittierten murinen Wirt nicht unbedingt vom gleichen Effekt dieses Antibiotikums wie beim gesunden Wirt ausgegangen werden darf. Um Kenntnis über den Einfluss einer Immunsuppression auf die *P. aeruginosa* Kolonisation zu gewinnen und auch um näher dem diese Arbeit motivierende klinische Problem zu kommen wird hier die Konzeption einer solchen Studie vorgeschlagen. Für diese könnten Mäuse eingesetzt werden, die medikamentös chemotherapeutisch immunsupprimiert wurden oder einen entsprechenden genetischen Defekt tragen, wobei die erste Variante stärker dem klinischen Setting ähneln würde, dessen Simulation angestrebt wird.

4.5.3 Limitationen der DNA-Bearbeitung und der Sequenzieranalyse

Wie im Punkt 2.1.7 beschrieben ließ sich DNA aus den gewonnenen Stuhlproben der Mäuse extrahieren. Diese für die Sequenzierung eingesetzte DNA musste der Voraussetzung für eine adäquate NGS seitens der ausführenden Firma

Eurofins® entsprechend einer minimalen Konzentration von 50 ng/µl aufweisen. Erst ab diesem Schwellenwert kann davon ausgegangen werden, dass das Sequenzierungoutput adäquat hoch sein wird und aus allen in der Probe vorhandenen Zielsequenzen Reads generiert werden können. Obwohl das Extraktionsverfahren sehr effizient war, konnten einige wenige Proben diesen Zielwert von 50 ng/µl nicht erreichen oder nur knapp überschreiten. Das hat zur Folge, dass die aus diesen Proben generierten Reads eventuell ein verzerrtes Verhältnis untereinander aufweisen, da höher konzentrierte DNA-Abschnitte besser im Sequence-by-Synthesis Verfahren multipliziert und gelesen werden können als solche, die aufgrund der niedrigen Konzentration nur minimal in der Probe vertreten sind. Das Auftreten dieser Problematik kann zu einem verzerrten Ergebnis der Korrelationsanalyse führen – ein nicht authentisches Reads-Verhältnis resultiert in einer identifizierten Mikrobiotakomposition, welche die realen Verhältnisse in der Probe nicht adäquat widerspiegelt. Um diese Limitation zu meiden, wurde bei der Arbeit generell gemieden Proben mit niedriger (<50 ng/µl) Konzentration zu sequenzieren. Diese Strategie minimiert die Ausprägung des o.g. Problems, kann allerdings eventuell in einem Selektionsbias resultieren.

Ein Punkt wichtiger Bedeutung für die Korrelationsanalyse ist, ob die Sequenzspezifität eines Phylums, einer Ordnung, eines Genus oder einer Spezies bei der NGS erreicht wurde. Wie im Punkt 2.1.10 bereits näher erläutert wurde, muss ein Kompromiss zwischen der Spezifität und Qualität der Reads eingegangen werden. Je mehr einzelne Basen der Gensequenz richtig gelesen werden, desto höher ist die Qualität der Reads. Je länger eine gelesene Basensequenz wird, desto wahrscheinlicher ist es aber, dass diese fehlerhaft sequenzierten Basen enthält – dann würden diese Sequenzen möglicherweise falsch zu einem Organismus taxonomisch zugeordnet werden. Kurze DNA-Sequenzen sind aber weniger spezifisch, da sie wenig genetische Informationen enthalten – dann können diese, trotz richtig gelesener Basensequenz nicht konkret genug zu einem Organismus taxonomisch zugeordnet werden und die in der jeweiligen DNA-Probe enthaltenen Mikrobiotavertreter können nicht spezifisch genug identifiziert werden. Das wurde auch im Rahmen dieser Studie

beobachtet: Eine taxonomische Zuordnung auf Speziesebene war nicht möglich. Entsprechend war eine Korrelationsanalyse auf der Speziesebene ebenfalls nicht durchführbar. Die spezifischste taxonomische Attribution im Rahmen des Vergleichs zur SILVA-Sequenzdatenbank war die Genusebene. Für diese konnten aber, genau aus der bewussten Priorisierung der Richtigkeit des Reads als einer hohen Länge des Reads ergebend nur wenige Mikrobiotavertreter identifiziert und später zum *P. aeruginosa* Verhalten korreliert werden. Das bedeutet, dass es misslang, konkrete Spezies mit der Kolonisation zu korrelieren und diese als protektiv oder begünstigend zu definieren. Die Identifikation der Mikrobiota und ihre Evaluation als positiv oder negativ mit *P. aeruginosa* korrelierend, zielte auf Folgeexperimente zur Erforschung von Interventionen mit ausgewählten Stämmen der Mikrobiota auf mit *P. aeruginosa* kolonisierten Mäusen ab. Dies würde einerseits die Definition des protektiven oder schädigenden Charakters dieser Mikrobiota untermauern oder widerlegen. Bei einer Bestätigung solcher positiven Effekte hätte man somit potentiell einen neuen therapeutischen oder sogar prophylaktischen Ansatz für eine Kolonisation, beispielsweise durch die probiotische Gabe der als protektiv identifizierten Spezies oder Speziesmischung (Oligoflora). Da bei der vorliegenden Arbeit aber verlässlich nur Genera und Ordnungen aus der murinen intestinalen Mikrobiota identifiziert und korreliert werden konnten, sind dementsprechend mit den vorliegenden Daten mögliche Bestandteile eines solchen Probiotikums bestenfalls nur auf Genus- oder Ordnungsebene definierbar. Dieses Ergebnis ist allerdings nicht konkret genug, insbesondere wenn man bedenkt, dass es sogar auf Speziesebene große Unterschiede zwischen den Eigenschaften verschiedener Organismen (z.B. *E. coli* Nissle vs. EHEC) geben kann, und geht mit einem nahezu nicht vertretbarem praktischem Aufwand einher, weil es bedeuten würde mehrere Genera/Ordnungen zu applizieren, die aus hunderten Spezies bestehen, und nicht die Eleganz und Wirtschaftlichkeit der Gabe von wenigen konkreten Spezies besitzt. Eine Überarbeitung des Studienmodellbaus in Bezug auf den Ablauf der Beprobung (Zielsetzung: Optimierung der qualitativen und quantitativen Konservierung von Bakterien und bakterieller DNA in den Stuhlproben), der DNA-Extraktion (Zielsetzung: höhere

Konzentration und Stabilität der Länge isolierter Fragmente) und der bioinformatischen Analyse (Zielsetzung: Verbesserung der Spezifität bei bleibender hoher Readsqualität, Verwendung alternativer Sequenzdatenbanken, Erprobung leistungsfähiger Korrelationskripte) erscheint äußerst sinnvoll und wird hier für die weitere Erforschung empfohlen.

Für die Sequenzier- und Korrelationsanalyse gilt die niedrige Anzahl an sequenziertem Probenkollektiv von insgesamt 11 mit *P. aeruginosa* und fünf mit *E. coli* Nissle RR kolonisierten Mäusen auch als mögliche Einschränkung. Das hat den unter Punkt 4.5.1 beschriebenen Aspekt der statistischen Auswertbarkeit als Konsequenz. Zusätzliche Limitationen bestehen darin, dass die Anzahl an sequenzierten DNA-Proben und die Anzahl an Mäusen, von denen Proben zur Sequenzierung geschickt wurden niedriger ist als die Gesamtzahl an isolierten DNA-Proben und Gesamtzahl an Proben von Mäusen die zur Sequenzierung bereitstanden. Auf diese Art kommt es möglicherweise zu einer Präselektion, die das Sequenzierungs- und demzufolge Korrelationsanalysergebnis verzerren könnte, obwohl die Auswahl der zur Sequenzierung verschickten Proben nicht nach Kriterien erfolgte, die mit dem Kolonisationsniveau zusammenhängen, sondern ausschließlich von ihrer DNA-Konzentration abhängig war. Ein weiteres Hindernis, welches durch die niedrige Anzahl an sequenzierten Proben und Versuchstiere entsteht, besteht für die bioinformatische Auswertung der Ergebnisse, da eine höhere Anzahl analysierter Proben evtl. die schon beobachtete Korrelationstrends deutlicher hervorheben oder auch im Gegenteil diese relativieren könnte.

Trotz dieser Schwachstellen erbrachten die Versuche richtungsweisende Ergebnisse, die eine adäquate Grundlage für weitere Forschungsansätze schaffen.

4.5.4 Limitationen des Fäkaltransplantationsversuchs

Eine Limitation speziell des Fäkaltransplantationsversuchs betrifft die Durchführung des Experiments: Hierbei wurde einer Mausgruppe aus 5 Tieren Stuhl aus dem vorbereiteten Fäkaltransplantationspool via oraler Gavage verabreicht. Bestandteil der gleichen Untersuchung war eine Kontrollgruppe bestehend aus 5 Mäusen, die unter den gleichen Bedingungen gehalten wurden (siehe Punkt 2.1.0.), aber keine FTx oder andere Intervention erhielten. Diese Kontrollgruppe wurde auch keiner intragastralen Gavage von PBS, der Trägerlösung des Stuhls aus dem Transplantationspool, ausgesetzt. Demzufolge ist die Validität der Kontrollgruppe als eingeschränkt zu erachten. Obwohl eine Kontrolle in der Form eines Vergleichs zwischen Fäkaltransplantation und fehlender Fäkaltransplantation durchgeführt wurde, erreicht diese im Endeffekt nicht den Standard einer Kontrolle mit Scheinintervention. Insbesondere könnte die orale Gabe von aufgelöstem Stuhl als FTx evtl. einen kurzzeitigen Spüleffekt gehabt haben, der ein vorübergehendes Auswaschen von *P. aeruginosa* aus dem Intestinum bewirkt und so eine Reduktion der messbaren CFU-Anzahl und davon abgeleitet der intestinalen Kolonisation als Konsequenz der FTx mit entsprechender Einnistung der Donormikrobiota nachahmt. Eine Intervention in Form einer Gavage von PBS mit dem gleichen Volumen bei der Kontrollgruppe hätte besser gegen diesen möglichen Spüleffekt kontrolliert: Tritt auch bei der Kontrollgruppe eine Reduktion der CFU-Anzahl auf, so wäre der Effekt ggfs. auf die mechanische Spülung im Rahmen der Gavage zurückzuführen gewesen. Wäre dagegen eine ähnlich deutliche Differenz in der CFU-Anzahl zu beobachten wie im angewandten Versuchsaufbau, so wäre diese mit deutlich höherer Wahrscheinlichkeit tatsächlich dem Mikrobiotatransfer geschuldet gewesen.

Ob ein solcher Spüleffekt tatsächlich für den beobachteten Verlauf der CFU-Anzahl verantwortlich ist, sollte an dieser Stelle dennoch hinterfragt werden. Wenn so ein Phänomen im Anschluss einer intragastralen Gabe von einer beliebigen Flüssigkeit/Flüssigkeitsmischung (auch Donorstuhl) zustande kommen kann, dann wäre eher ein temporärer als ein anhaltender Effekt zu

erwarten, da das Mikrobiom die Fähigkeit besitzt, sich zu einem gewissen Grad zu rekonstituieren, insbesondere nach dem Vorübergehen von ihm beeinflussenden Faktoren [96]. Dass aber nach der zweiten Stuhltransplantationsserie die *P. aeruginosa* CFU-Anzahl längerfristig und bis zum Ende der Versuchsreihe absank, ist nicht ganz mit einem reinen Spüleffekt vereinbar. Ein erneutes Ansteigen der *P. aeruginosa* CFU-Anzahl entsprechend der ersten Serie von Gavagen wäre bei einem reinen Spüleffekt zu erwarten gewesen. Dies spricht eher für eine Etablierung des transplantierten, *P. aeruginosa*-freien Donormikrobioms im Gastrointestinaltrakt der Empfängertiere und einer Suppression des kolonisierenden *P. aeruginosa*.

Trotzdem sollte bei ggfs. durchzuführenden Folgeexperimenten die Kontrollgruppe entsprechend optimiert werden.

5 Zusammenfassung

P. aeruginosa ist einer der häufigsten nosokomialen Erreger. Die Infektionen, die durch ihn verursacht werden, sind nur schwer therapierbar und resultieren in einer überproportional hohen Letalität [63]. Dieses Bakterium ist deswegen sehr gefürchtet und, obwohl es fast nur bei immunsupprimierten Personen eine Infektion verursacht, ist es von großer klinischer Relevanz, Ansätze zu finden, wie die Entstehung solcher Infektionen verhindert werden kann [80,81]. Da sich ein Großteil dieser Infektionen auf der Grundlage einer intestinalen Kolonisation entwickeln und unter anderem gesunde Personen primär keine *P. aeruginosa* Infektionen erleiden, sondern erst im Rahmen einer Immunsuppression unabhängig ihrer Genese an dem Bakterium erkranken, ist es umso wichtiger an erster Stelle das Auftreten einer Kolonisation entweder präventiv zu inhibieren oder sekundär therapeutisch rückgängig zu machen, sodass die Wahrscheinlichkeit für eine Infektion auf ein Minimum gesenkt wird.

Die Kolonisationsentstehung an sich ist von bestimmten Faktoren abhängig. Ein solcher ist die Virulenz des Bakteriums, was ein patientenunabhängiger Faktor ist. Von Seiten des Patienten könnten nur Kolonisationsentstehungskomponenten beeinflusst werden, die wirtseigen sind. Das sind z.B. die Komposition des intestinalen Mikrobioms und die unter anderem dadurch bedingte Kolonisierungsresistenz. Um diese zu erforschen, eignet sich die Konzipierung und Durchführung eines murinen Tiermodells intestinaler Kolonisation mit *P. aeruginosa*.

Nach Etablierung des Modells, in dem gezeigt werden konnte, dass *P. aeruginosa* den immunkompetenten murinen Wirt kolonisiert, konnten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Diese wurden aus dem klinischen Hintergrund der Zielsetzung dieser Arbeit motiviert und umfassten zusätzlich zur Entwicklung des Kolonisationsmodells folgende Punkte:

(i) Eine Simulation der in konkreten Settings klinisch gängigen Antibiotikaphylaxe mittels Ciprofloxacin im Rahmen des Kolonisationsmodells, einschließlich der Analyse ihrer Auswirkung auf die Kolonisationsausprägung mit *P. aeruginosa*.

(ii) Eine Identifikation der bakteriellen Kompositionsveränderungen des intestinalen Mikrobioms, die bei einer Kolonisation mit *P. aeruginosa* stattfinden und konsekutive Definition von Mikrobiotavertretern als kolonisationsinhibierend oder kolonisationsfördernd.

(iii) Einen Versuch der Wiederherstellung eines gesunden, *P. aeruginosa*-freien Mikrobioms mittels Fäkaltransplantation.

Zu diesen Zwecken wurde das entsprechende Kolonisationsmodell entwickelt und dann modifiziert. Sein Aufbau bestand aus zwei Gruppen von Mäusen. Die eine Gruppe wurde mit dem Zielkeim *P. aeruginosa* mittels Trinkwasser exponiert. Als Referenz und Kontrolle diente die zweite Versuchstiergruppe, die

einem anderen Bakterium in der gleichen Konzentration und mittels des gleichen Expositionsverfahrens kolonisiert werden sollte. Während des Verlaufs der Versuchsreihe wurden Stuhlproben gesammelt und mit Hilfe verschiedener Methoden auf ihren quantitativen Gehalt an Expositionskeimen und auf ihre mikrobielle Komposition hin untersucht. Nachdem gezeigt werden konnte, dass *P. aeruginosa* die Versuchstiere intestinal kolonisierte, wurden die entsprechenden Veränderungen des Modells vorgenommen, sodass die Untersuchungen der Ciprofloxacinexposition und der Fäkaltransplantation durchgeführt werden konnten. Weiterhin wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt, die den repräsentativen Anstieg an *P. aeruginosa* im murinen Gastrointestinaltrakt im Zusammenhang mit den Veränderungen in der Anzahl der restlichen, durch Sequenzierung mit anschließender taxonomischer Zuordnung identifizierten Mikrobiotavertreter erforschte.

An erster Stelle ließ sich feststellen, dass *P. aeruginosa* den murinen Wirt stabil intestinal kolonisieren kann. Das Vorkommen von *P. aeruginosa* im Stuhl der Versuchstiere war um ein Vielfaches höher als das des verwendeten Referenzbakteriums *E. coli* Nissle, auch nachdem die Exposition mit den jeweiligen Bakterien aufgehoben worden war. Die Persistenz des untersuchten Bakteriums im Darm ließ sich nicht nur kulturtechnisch, sondern auch mittels Sequenzierung und anschließender taxonomischer Zuordnung nachweisen. Unabhängig von der Dauer und der Art der Versuchsreihe, hatte das Kolonisationsniveau mit *P. aeruginosa* in allen durchgeführten Studien einen stabilen Verlauf und die hohe Ausprägung, die im ersten Versuch erreicht wurde. Die Etablierung von *P. aeruginosa* im murinen Intestinum korrelierte mit einer Vermehrung des Genus *Lactobacillus* und einer Reduktion der Genera *Blautia*, *Christensenella*, *Roseburia* und *Enterorhabdus*. Diese Wechselwirkungen wurden auch für die Phylum- und Ordnungsebene identifiziert. Auf dieser Grundlage konnte die Hypothesenbildung hinsichtlich der Rolle dieser Mikrobiota für die Kolonisationsentstehung (protektiv vs. fördernd) stattfinden. Sehr bedeutend war die Erkenntnis, dass eine vorausgegangene Applikation von Ciprofloxacin bei den Versuchstieren das Kolonisationsniveau weder

ausgeprägter macht, noch minimiert. Im Gegensatz dazu hatte die Fäkaltransplantation einen reduzierenden Einfluss auf der Kolonisationsausprägung. Dieser tendenziell sanierende Effekt erreichte eine höhere Effizienz bei Wiederholung der Donorstuhlgavagen, wobei unter dem ausgewählten Versuchsaufbau keine komplette Sanierung aller Versuchstiere erreicht werden konnte.

Anhand dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass *P. aeruginosa* ein potenter gastrointestinaler Kolonisator ist und beim immunkompetenten Wirt keine Infektion, allerdings eine für eine Infektion prädisponierende Kolonisation verursachen kann. Somit wurde das Vorliegen dieses Problems großer klinischer Relevanz bestätigt. Die Ordnung der *Lactobacillales* und der Genus *Lactobacillus* schienen eine agonistische oder synergistische Wechselwirkung mit *P. aeruginosa* zu haben. Negative Einflüsse auf das Vorkommen oder die Vermehrung dieser Mikrobiota sollten im Sinne einer Protektion oder Therapie von *P. aeruginosa*-Kolonisation getestet werden. Die während einer *P. aeruginosa*-Kolonisation verdrängten Genera *Blautia*, *Christensenella*, *Roseburia* und *Enterorhabdus* und Ordnung *Clostridiales* sollten durch eine Förderung ihrer Persistenz im Intestinum ebenso auf einen kolonisationshemmenden oder -therapierenden Effekt hin untersucht werden. Das Ausbleiben einer Änderung der Kolonisationsausprägung nach der Simulation einer Antibiotikaprophylaxe ist im Anbetracht der gängigen Annahme, dass Antibiotika per se die Homöostase des Mikrobioms stören und demzufolge für Infektionserkrankungen prädisponieren, als positiv und klinisch relevant zu sehen. In Zusammenschau der Versuchsdaten sollte die Annahme eines dysbiontischen Charakters jeglicher Antiinfektiva hinterfragt und differenzierter betrachtet werden, wobei die Limitationen der hier angewandten Untersuchungsmethodik nicht außer Acht gelassen werden sollten. Hervorzuheben ist auch die Bedeutung, die eine Fäkaltransplantation haben kann. Für diese wurde ein schnellerer kolonisationsreduzierender Effekt gezeigt. Es müssten jedoch die potenziellen Nebenwirkungen einer solchen therapeutischen Intervention bedacht werden und auch an einer Optimierung im Zusammenhang

mit der praktischen Applizierbarkeit gearbeitet werden. Trotz der genannten Einschränkungen liegt durch den eindeutig positiven Effekt dieser Intervention, der sogar tendenziell sanierend sein könnte, eine Legitimation für weitere Anstrengungen zur Erforschung und Erprobung neuer, optimierter Adaptationen dieses Ansatzes mit dem Ziel einer adäquaten Praxistauglichkeit in Forschung und Klinik zu erreichen. In Anbetracht der schlechten Prognose einer *P. aeruginosa*-Infektion und der Resistenzlage dieses Bakteriums gegenüber Antibiotika ist dies dringend zu fordern.

6 Literaturverzeichnis

1. Savage, D.C., *Microbial ecology of the gastrointestinal tract*. Annu Rev Microbiol, 1977. **31**: p. 107-33.
2. Li, J., et al., *An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome*. Nat Biotechnol, 2014. **32**(8): p. 834-41.
3. Dethlefsen, L., M. McFall-Ngai, and D.A. Relman, *An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 811-8.
4. Qin, J., et al., *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing*. Nature, 2010. **464**(7285): p. 59-65.
5. Whitman, W.B., D.C. Coleman, and W.J. Wiebe, *Prokaryotes: the unseen majority*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6578-83.
6. Hugenholtz, P., B.M. Goebel, and N.R. Pace, *Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity*. J Bacteriol, 1998. **180**(18): p. 4765-74.
7. Gevers, D., et al., *The Human Microbiome Project: a community resource for the healthy human microbiome*. PLoS Biol, 2012. **10**(8): p. e1001377.
8. Backhed, F., et al., *Host-bacterial mutualism in the human intestine*. Science, 2005. **307**(5717): p. 1915-20.
9. Jimenez, E., et al., *Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section*. Curr Microbiol, 2005. **51**(4): p. 270-4.
10. Steel, J.H., et al., *Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor*. Pediatr Res, 2005. **57**(3): p. 404-11.
11. Rautava, S., et al., *Probiotics modulate host-microbe interaction in the placenta and fetal gut: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. Neonatology, 2012. **102**(3): p. 178-84.
12. Gonzales-Marin, C., D.A. Spratt, and R.P. Allaker, *Maternal oral origin of *Fusobacterium nucleatum* in adverse pregnancy outcomes as determined using the 16S-23S rRNA gene intergenic transcribed spacer region*. J Med Microbiol, 2013. **62**(Pt 1): p. 133-44.
13. Jimenez, E., et al., *Is meconium from healthy newborns actually sterile?* Res Microbiol, 2008. **159**(3): p. 187-93.
14. Palmer, C., et al., *Development of the human infant intestinal microbiota*. PLoS Biol, 2007. **5**(7): p. e177.
15. Koenig, J.E., et al., *Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108** Suppl 1: p. 4578-85.
16. Faith, J.J., et al., *The long-term stability of the human gut microbiota*. Science, 2013. **341**(6141): p. 1237439.
17. Lozupone, C.A., et al., *Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota*. Nature, 2012. **489**(7415): p. 220-30.
18. Franzosa, E.A., et al., *Identifying personal microbiomes using metagenomic codes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(22): p. E2930-8.
19. Claesson, M.J., et al., *Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108** Suppl 1: p. 4586-91.

20. Yatsuneneko, T., et al., *Human gut microbiome viewed across age and geography*. Nature, 2012. **486**(7402): p. 222-7.
21. Duca, F., et al., *Metabolic interplay between gut bacteria and their host*. Front Horm Res, 2014. **42**: p. 73-82.
22. Hooper, L.V., T. Midtvedt, and J.I. Gordon, *How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine*. Annu Rev Nutr, 2002. **22**: p. 283-307.
23. Yamanaka, M., T. Nomura, and M. Kametaka, *Influence of intestinal microbes on heat production in germ-free, gnotobiotic and conventional mice*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 1977. **23**(3): p. 221-6.
24. Backhed, F., et al., *Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications*. Cell Host Microbe, 2012. **12**(5): p. 611-22.
25. Mayer, E.A., K. Tillisch, and A. Gupta, *Gut/brain axis and the microbiota*. J Clin Invest, 2015. **125**(3): p. 926-38.
26. Le Roy, T., et al., *Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice*. Gut, 2013. **62**(12): p. 1787-94.
27. Hayashi, H., et al., *Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism*. J Med Microbiol, 2005. **54**(Pt 11): p. 1093-101.
28. Lawley, T.D. and A.W. Walker, *Intestinal colonization resistance*. Immunology, 2013. **138**(1): p. 1-11.
29. Kamada, N., et al., *Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota*. Nat Immunol, 2013. **14**(7): p. 685-90.
30. Freter, R., et al., *Mechanisms that control bacterial populations in continuous-flow culture models of mouse large intestinal flora*. Infect Immun, 1983. **39**(2): p. 676-85.
31. Hammami, R., et al., *Anti-infective properties of bacteriocins: an update*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(16): p. 2947-67.
32. Schamberger, G.P. and F. Diez-Gonzalez, *Selection of recently isolated colicinogenic Escherichia coli strains inhibitory to Escherichia coli O157:H7*. J Food Prot, 2002. **65**(9): p. 1381-7.
33. Turovskiy, Y., K. Sutyak Noll, and M.L. Chikindas, *The aetiology of bacterial vaginosis*. J Appl Microbiol, 2011. **110**(5): p. 1105-28.
34. Momose, Y., K. Hirayama, and K. Itoh, *Competition for proline between indigenous Escherichia coli and E. coli O157:H7 in gnotobiotic mice associated with infant intestinal microbiota and its contribution to the colonization resistance against E. coli O157:H7*. Antonie Van Leeuwenhoek, 2008. **94**(2): p. 165-71.
35. Gantois, I., et al., *Butyrate specifically down-regulates salmonella pathogenicity island 1 gene expression*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(1): p. 946-9.
36. Shin, R., M. Suzuki, and Y. Morishita, *Influence of intestinal anaerobes and organic acids on the growth of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7*. J Med Microbiol, 2002. **51**(3): p. 201-6.
37. Cherrington, C.A., et al., *Short-chain organic acids at pH 5.0 kill Escherichia coli and Salmonella spp. without causing membrane perturbation*. J Appl Bacteriol, 1991. **70**(2): p. 161-5.
38. Marteyn, B., et al., *Modulation of Shigella virulence in response to available oxygen in vivo*. Nature, 2010. **465**(7296): p. 355-8.
39. Kobayashi, K.S., et al., *Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract*. Science, 2005. **307**(5710): p. 731-4.
40. Osawa, N. and S. Mitsuhashi, *Infection of Germfree Mice with Shigella Flexneri 3a*. Jpn J Exp Med, 1964. **34**: p. 77-80.

41. Vaishnava, S., et al., *Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(52): p. 20858-63.
42. Suzuki, K., et al., *The sensing of environmental stimuli by follicular dendritic cells promotes immunoglobulin A generation in the gut*. Immunity, 2010. **33**(1): p. 71-83.
43. Fagarasan, S., et al., *Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 243-73.
44. Lee, Y.K. and S.K. Mazmanian, *Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system?* Science, 2010. **330**(6012): p. 1768-73.
45. Round, J.L. and S.K. Mazmanian, *Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(27): p. 12204-9.
46. Round, J.L. and S.K. Mazmanian, *The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(5): p. 313-23.
47. Bohnhoff, M. and C.P. Miller, *Enhanced susceptibility to Salmonella infection in streptomycin-treated mice*. J Infect Dis, 1962. **111**: p. 117-27.
48. Ayres, J.S., N.J. Trinidad, and R.E. Vance, *Lethal inflammasome activation by a multidrug-resistant pathobiont upon antibiotic disruption of the microbiota*. Nat Med, 2012. **18**(5): p. 799-806.
49. Williams, P.A. and M.J. Worsey, *Ubiquity of plasmids in coding for toluene and xylene metabolism in soil bacteria: evidence for the existence of new TOL plasmids*. J Bacteriol, 1976. **125**(3): p. 818-28.
50. Green, S.K., et al., *Agricultural plants and soil as a reservoir for Pseudomonas aeruginosa*. Appl Microbiol, 1974. **28**(6): p. 987-91.
51. Hardalo, C. and S.C. Edberg, *Pseudomonas aeruginosa: assessment of risk from drinking water*. Crit Rev Microbiol, 1997. **23**(1): p. 47-75.
52. Costerton, J.W., P.S. Stewart, and E.P. Greenberg, *Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections*. Science, 1999. **284**(5418): p. 1318-22.
53. Ahearn, D.G., et al., *Primary adhesion of Pseudomonas aeruginosa to inanimate surfaces including biomaterials*. Methods Enzymol, 1999. **310**: p. 551-7.
54. Bodey, G.P., et al., *Infections caused by Pseudomonas aeruginosa*. Rev Infect Dis, 1983. **5**(2): p. 279-313.
55. Franzetti, F., et al., *Pseudomonas infections in patients with AIDS and AIDS-related complex*. J Intern Med, 1992. **231**(4): p. 437-43.
56. Kielhofner, M., et al., *Life-threatening Pseudomonas aeruginosa infections in patients with human immunodeficiency virus infection*. Clin Infect Dis, 1992. **14**(2): p. 403-11.
57. Bendig, J.W., et al., *Two neutropenic patients with multiple resistant Pseudomonas aeruginosa septicaemia treated with ciprofloxacin*. J R Soc Med, 1987. **80**(5): p. 316-7.
58. Okuda, J., et al., *Translocation of Pseudomonas aeruginosa from the intestinal tract is mediated by the binding of ExoS to an Na,K-ATPase regulator, FXYD3*. Infect Immun, 2010. **78**(11): p. 4511-22.
59. Alvarez-Ortega, C., et al., *Genetic determinants involved in the susceptibility of Pseudomonas aeruginosa to beta-lactam antibiotics*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(10): p. 4159-67.
60. Fajardo, A., et al., *The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens*. PLoS One, 2008. **3**(2): p. e1619.
61. Livermore, D.M., *Carbapenemases*. J Antimicrob Chemother, 1992. **29**(6): p. 609-13.
62. Cabot, G., et al., *Overexpression of AmpC and efflux pumps in Pseudomonas aeruginosa isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(5): p. 1906-11.

63. Solomon, S.L. and K.B. Oliver, *Antibiotic resistance threats in the United States: stepping back from the brink*. Am Fam Physician, 2014. **89**(12): p. 938-41.
64. Nicas, T.I. and R.E. Hancock, *Pseudomonas aeruginosa outer membrane permeability: isolation of a porin protein F-deficient mutant*. J Bacteriol, 1983. **153**(1): p. 281-5.
65. Sawa, T., et al., *In vitro cellular toxicity predicts Pseudomonas aeruginosa virulence in lung infections*. Infect Immun, 1998. **66**(7): p. 3242-9.
66. Fleiszig, S.M., et al., *Relationship between cytotoxicity and corneal epithelial cell invasion by clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun, 1996. **64**(6): p. 2288-94.
67. Zhang, F., et al., *Should we standardize the 1,700-year-old fecal microbiota transplantation?* Am J Gastroenterol, 2012. **107**(11): p. 1755; author reply p 1755-6.
68. Eiseman, B., et al., *Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis*. Surgery, 1958. **44**(5): p. 854-9.
69. Malnick, S. and E. Melzer, *Human microbiome: From the bathroom to the bedside*. World J Gastrointest Pathophysiol, 2015. **6**(3): p. 79-85.
70. van Nood, E., et al., *Duodenal infusion of donor feces for recurrent Clostridium difficile*. N Engl J Med, 2013. **368**(5): p. 407-15.
71. Brandt, L.J., et al., *Long-term follow-up of colonoscopic fecal microbiota transplant for recurrent Clostridium difficile infection*. Am J Gastroenterol, 2012. **107**(7): p. 1079-87.
72. Kelly, C.P. and J.T. LaMont, *Clostridium difficile--more difficult than ever*. N Engl J Med, 2008. **359**(18): p. 1932-40.
73. Gerding, D.N. and S. Johnson, *Management of Clostridium difficile infection: thinking inside and outside the box*. Clin Infect Dis, 2010. **51**(11): p. 1306-13.
74. Bakken, J.S., et al., *Treating Clostridium difficile infection with fecal microbiota transplantation*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2011. **9**(12): p. 1044-9.
75. Brandt, L.J. and O.C. Aroniadis, *An overview of fecal microbiota transplantation: techniques, indications, and outcomes*. Gastrointest Endosc, 2013. **78**(2): p. 240-9.
76. Ubeda, C., et al., *Intestinal microbiota containing Barnesiella species cures vancomycin-resistant Enterococcus faecium colonization*. Infect Immun, 2013. **81**(3): p. 965-73.
77. Pendleton, J.N., S.P. Gorman, and B.F. Gilmore, *Clinical relevance of the ESKAPE pathogens*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2013. **11**(3): p. 297-308.
78. Treca Ricci, E.M., et al., *Current epidemiology and antimicrobial resistance data for bacterial bloodstream infections in patients with hematologic malignancies: an Italian multicentre prospective survey*. Clin Microbiol Infect, 2015. **21**(4): p. 337-43.
79. Almyroudis, N.G., et al., *Pre- and post-engraftment bloodstream infection rates and associated mortality in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients*. Transpl Infect Dis, 2005. **7**(1): p. 11-7.
80. Wang, L., et al., *Prevalence of Resistant Gram-Negative Bacilli in Bloodstream Infection in Febrile Neutropenia Patients Undergoing Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Single Center Retrospective Cohort Study*. Medicine (Baltimore), 2015. **94**(45): p. e1931.
81. Ortega, M., et al., *Epidemiology and outcome of bacteraemia in neutropenic patients in a single institution from 1991-2012*. Epidemiol Infect, 2015. **143**(4): p. 734-40.
82. Buhl, M., S. Peter, and M. Willmann, *Prevalence and risk factors associated with colonization and infection of extensively drug-resistant Pseudomonas aeruginosa: a systematic review*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2015. **13**(9): p. 1159-70.
83. Spees, A.M., et al., *Colonization resistance: battle of the bugs or Menage a Trois with the host?* PLoS Pathog, 2013. **9**(11): p. e1003730.
84. Faber, J., et al., *Bacterial translocation is reduced by a specific nutritional combination in mice with chemotherapy-induced neutropenia*. J Nutr, 2011. **141**(7): p. 1292-8.

85. Weiss, G., *Intestinal irony: how probiotic bacteria outcompete bad bugs*. Cell Host Microbe, 2013. **14**(1): p. 3-4.
86. Adediran, J., et al., *An Escherichia coli Nissle 1917 missense mutant colonizes the streptomycin-treated mouse intestine better than the wild type but is not a better probiotic*. Infect Immun, 2014. **82**(2): p. 670-82.
87. Ubeda, C. and E.G. Pamer, *Antibiotics, microbiota, and immune defense*. Trends Immunol, 2012. **33**(9): p. 459-66.
88. Smits, L.P., et al., *Therapeutic potential of fecal microbiota transplantation*. Gastroenterology, 2013. **145**(5): p. 946-53.
89. Patel, N.C., et al., *Fecal microbiota transplant for recurrent Clostridium difficile infection: Mayo Clinic in Arizona experience*. Mayo Clin Proc, 2013. **88**(8): p. 799-805.
90. Hedrich, H.J., *The laboratory mouse*. 2nd ed. 2012, Amsterdam ; London: Academic Press/Elsevier. xxi, 845 p.
91. Pamer, E.G., *Fecal microbiota transplantation: effectiveness, complexities, and lingering concerns*. Mucosal Immunol, 2014. **7**(2): p. 210-4.
92. Hirsch, B.E., et al., *Effectiveness of fecal-derived microbiota transfer using orally administered capsules for recurrent Clostridium difficile infection*. BMC Infect Dis, 2015. **15**: p. 191.
93. Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H.K., Menzel, S., Ruth, P., *MUTSCHLER ARZNEIMITTELWIRKUNGEN*. 2012.
94. Thomas, C., M. Stevenson, and T.V. Riley, *Antibiotics and hospital-acquired Clostridium difficile-associated diarrhoea: a systematic review*. J Antimicrob Chemother, 2003. **51**(6): p. 1339-50.
95. Cooley, L., et al., *Consensus guidelines for diagnosis, prophylaxis and management of Pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with haematological and solid malignancies, 2014*. Intern Med J, 2014. **44**(12b): p. 1350-63.
96. Greenhalgh, K., et al., *The human gut microbiome in health: establishment and resilience of microbiota over a lifetime*. Environ Microbiol, 2016. **18**(7): p. 2103-16.

Erklärung zum Eigenanteil

Die Konzeption und Betreuung der Studie erfolgten durch Prof. Dr. J.-S. Frick und Dr. Florian Hölzl.

Nach einer Einarbeitung durch Dr. Florian Hölzl wurden die Kolonisationsversuche und ihre entsprechenden Vorbereitungen, die Beprobung und Beobachtung der Mäuse inkl. Gewichtsmessung, die Bearbeitung der Stuhlproben, die CFU-Auszählungen inkl. Erstellung von den entsprechenden Grafiken eigenständig von mir durchgeführt.

Die Präparation der Versuchstiere wurde von mir mit der Unterstützung von Fr. Andrea Schäfer, Fr. Annika Bender und Dr. Florian Hölzl durchgeführt.

Die Konzeption für die Durchführung der Fäkaltransplantation wurde durch mich optimiert und von mir eigenständig durchgeführt.

Die DNA-Extraktion aus Stuhlproben, die Qualitätskontrolle der DNA und die DNA-Konzentrationsmessung wurden nach Einarbeitung durch Fr. Anna Lange von mir eigenständig durchgeführt. Die Konzeption des DNA-Extraktionsprotokolls wurde an der Universität Kopenhagen etabliert.

Die Next-Generation-Sequencing wurde extern von Fa. Eurofins Genomics® (Ebersberg) realisiert.

Die bioinformatische Auswertung der sequenzierten DNA-Proben wurde von Hr. Mohamed El Hadidi (Algorithms in Bioinformatics, Tübingen) mit der Unterstützung von Dr. Florian Hölzl durchgeführt.

Ich versichere das Manuskript selbständig verfasst zu haben. Es wurden keine weitere als die in dieser Schrift zitierten Quellen verwendet.

Tübingen den 15.01.2017

Doktorand: Hristian Georgiev Hinkov

Danksagung

Zunächst gilt mein Dank Dr. med. Florian Hölzl, ohne dessen Geduld, Bereitwilligkeit, Erklärungskunst und Professionalismus die praktische Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank geht an Prof. Dr. med. Julia-Stefanie Frick, die mich auf diesen Weg gebracht und bis zu seinem Ende konstruktiv geleitet und geführt hat.

Des Weiteren möchte ich allen Mitgliedern der AG Frick am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Tübingen für ihre kompetente Unterstützung und praktische Hilfe danken, insbesondere Fr. Andrea Schäfer, Fr. Anna Lange, Fr. Annika Bender und Dr. Sarah Menz.

Für ihre Hilfe bei der Erstellung und Optimierung der grafischen Konzeption der Versuchsreihenschemata bedanke ich mich bei Fr. Dora Petrova.

Nicht an letzter Stelle möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir das Studium der Humanmedizin und somit meinen professionellen Werdegang ermöglicht hat.