

Redaktion

J. Hampe, Dresden
 S. Schreiber, Kiel



P. Rosenstiel

Institut für Klinische Molekularbiologie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel, Deutschland

Molekulare Darmmikrobiomdiagnostik

Einblick in unser anderes Genom

Hintergrund

Der menschliche Darm ist Sitz einer stabilen mikrobiellen Gemeinschaft (Mikrobiom) von mehr als 100 Billionen Bakterien, aber auch einer signifikanten Anzahl von Pilzen, Viren und Archaeen, die gemeinsam mit der Schleimhaut des menschlichen Wirts ein komplexes Ökosystem bilden [1–5]. Die Anzahl an Bakterien übertrifft (vor dem täglichen Stuhlgang) die Zahl der menschlichen Zellen um das 10-Fache. Durch Ausscheidung entsteht ein wichtiger Bio-rhythmus (Reduktion der Bakterienzahl um den Faktor 5–10), der zur ständigen Erneuerung und Stabilisierung des Mikrobioms beiträgt. Nur ein Bruchteil des Mikrobioms ist bisher kultivierbar [6]. Das Ökosystem konstituiert sich nach der Geburt. Man nimmt an, dass es hierbei zu Selektionsprozessen kommt, die bestimmte, von außen zugeführte Bakterien in ihrer Ansiedlung (Kolonisation) unterstützen, und sich so langsam des adulten Mikrobioms bildet. Nahrungs- und andere Umwelteinflüsse spielen eine wichtige Rolle. So wurde z. B. beobachtet, dass Kinder, die nicht gestillt werden oder durch einen Kaiserschnitt zur Welt kommen, andere bakterielle Muster aufweisen als solche, die einer vaginalen Geburt bzw. Muttermilch ausgesetzt waren [7, 8].

Trotz der Dichte der Besiedlung existiert eine Reihe von Mechanismen, die es ermöglichen, dass Mikroben und Immunsystem in friedlicher Koexistenz leben. Hierzu trägt eine strikte räumliche Trennung einen entscheidenden Teil bei. Die Trennung wird durch die Präsenz einer dichten spezialisierten Mukusschicht

bewerkstelligt, in die körpereigene antimikrobielle Prinzipien (z. B. antimikrobielle Peptide, Kathepsine, reaktive Sauerstoffspezies) in einem Gradient eingebunden sind [9, 10]. Hierdurch entsteht eine Art Niemandsland zwischen Wirt und Mikroben, das bei einer Reihe von entzündlichen Erkrankungen (z. B. bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, CED) durch die Bakterien überwunden werden kann. Ein weiteres Element der Koexistenz sind Toleranzmechanismen der mukosalen Immunzellen, die durch einen spezifischen Besatz an Rezeptoren oder akzessorischen Signalmolekülen, wie z. B. reduzierte Expression des MD2-Proteins, das einen Aktivator für den Lipopolysaccharid(LPS)-Rezeptor TLR4 darstellt [11], weniger reaktiv gegenüber mikrobiellen Signalen sind. Weiterhin senden kommensale Bakterien Signale aus, die in physiologischer Weise das Immunsystem dämpfen, oder sie tragen veränderte Oberflächenstrukturen, so dass sie weniger erkannt werden können [12, 13]. Dennoch ist klar, dass eine schnelle Reaktion des Immunsystems auf sich vermehrende und eindringende Pathogene ein essenzieller Bestandteil der Balance des Ökosystems ist.

» Die molekulare Prägung des mukosalen Immunsystems erfolgt früh in der Kindheit

Die molekulare Prägung des mukosalen Immunsystems erfolgt früh in der Kindheit. Erste Befunde deuten auf Zeitfenster hin, in denen bestimmte bakterielle Antigenkontakte wichtig sind, um eine phy-

siologische Differenzierung der Immunzellen (z. B. DNA-Methylierungsmuster natürlicher Killerzellen [14]) zu erlangen. Ebenso führen Auslenkungen des intestinalen Mikrobioms, z. B. nach Antibiotikatherapie, zu einer beständigen Veränderung des Antikörperrepertoires, wobei sich die sezernierenden B-Zellen nach kurzer Zeit auch in anderen epithelialen Barriereorganen (Lunge, Haut, Brustdrüse) wiederfinden [15]. Die Besiedlung des Darms ist somit für eine ganze Reihe von Immunreaktionen auch außerhalb des Intestinaltrakts instruierend. Diese Kenntnisse sind wichtig um zu verstehen, dass neben dem aktuellen Besatz an Mikroben auch die „Lebensgeschichte“ des Ökosystems einen entscheidenden Anteil an der Ätiologie von mikrobiomassoziierten Erkrankungen haben kann. Ebenso kann bei gleichem Bakterienbesatz z. B. durch einen Barriere-defekt ein ähnliches Mikrobiom durch eine andere räumliche Anordnung ein hohes proinflammatorisches Potenzial aufweisen. Es ist klar, dass viele dieser balancierenden Faktoren heute nicht durch direkte diagnostische Tests erfasst werden können. Dennoch wird in der Zukunft dem Wirtsaspekt neben der taxonomischen und funktionellen Betrachtung der Bakterienseite eine wichtigere Bedeutung zukommen müssen, um die volle Komplexität der Physiologie des symbiotischen Zusammenlebens abzubilden.

Der Umfang der genetischen Information der intestinalen bakteriellen Gemeinschaft beträgt das 100-Fache des menschlichen Genoms [4, 16–18]. Ein signifikanter Teil dieser Information wird benötigt, um die normale Physiologie des menschlichen Darms aufrechtzuer-

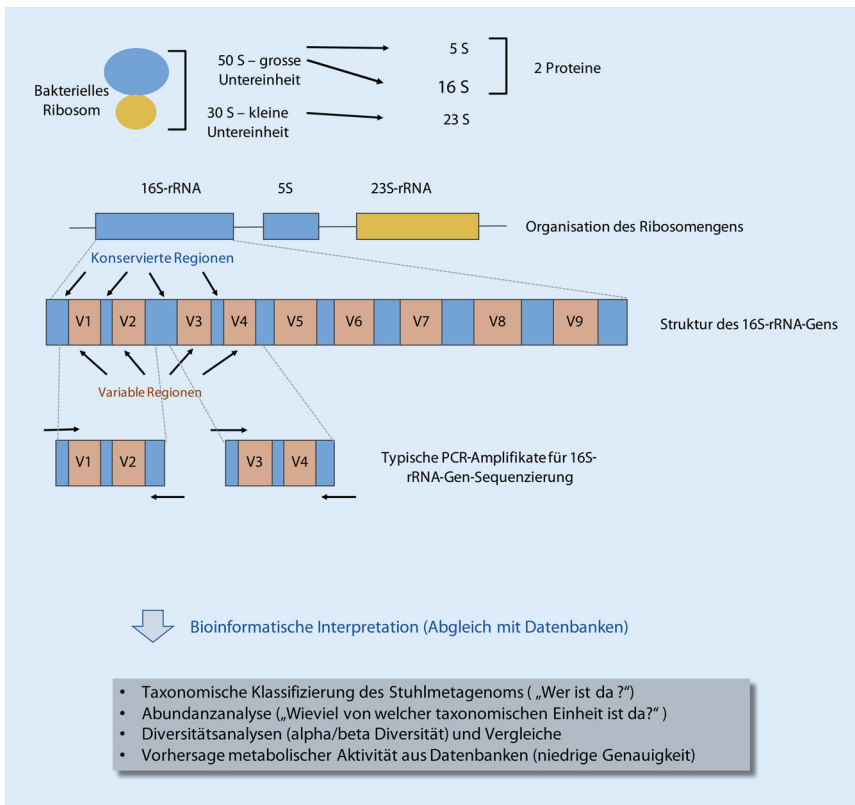


Abb. 1 ▲ Schema einer 16S-rRNA-Gen-basierenden Mikrobiomanalytik. PCR Polymerase-Kettenreaktion

halten. Die Muster der Bakterien sind interindividuell variabel, aber im einzelnen Individuum trotz zahlreicher Perturbationen (Infektionen, Antibiotika) über die Zeit bemerkenswert stabil [19–21]. Die Eigenschaft, trotz äußerer und innerer Einflüsse und signifikanter Auslenkungen die Zusammensetzung stabil zu halten, wird als Widerstandsfähigkeit (Resilienz) des Ökosystems bezeichnet. Es kann davon ausgegangen werden, dass das Darmmikrobiom mit der Wirtsseite ein koevolviertes symbiotisches System darstellt, das zur normalen Homöostase und Funktion des Darms beiträgt und damit eine Erhöhung der evolutionären Fitness beider Partner bedeutet. Die *Diversität des Systems* ist ein wesentliches Merkmal und trägt zur Widerstandsfähigkeit bei. Zahlreiche Eigenschaften belegen diese Hypothese. So sorgt der Mensch für die essenzielle Energiezufuhr; die mikrobielle Gemeinschaft ihrerseits trägt zum Nahrungsmittelaufschluss, zur Vitaminproduktion und zum Fettsäurestoffwechsel bei.

Kurzkettige Fettsäuren sind hierbei ein wichtiger Kometabolit, der von bestimmten Bakterien gebildet und von intestinalen Epithelzellen als wesentliche Energiequelle genutzt wird, die aber darüber hinaus auch weitere modulatorische Funktionen z. B. auf das Immunsystem ausüben [18].

Ein wichtiges Konzept für das Verständnis der Darmflora ist der Begriff des *Kernmikrobioms* („core gut microbiome“). Das Konzept ist in der Annahme geprägt worden, dass es eine gemeinsame Grundausstattung des menschlichen Mikrobioms gibt, die bei jedem Menschen zu finden ist. Mit zunehmender Studienzahl zeigt sich, dass dieser Begriff weniger auf Ebene der Organismen (Kern gleicher Bakterienarten) als auf der funktionellen Ebene (genetische Ausstattung von Stoffwechselwegen innerhalb der Bakteriengemeinschaft) zutrifft und das Kernmikrobiom auch hier einer Variabilität ausgesetzt ist, die höher ist als initial angenommen [5, 22].

Die langfristige Nahrungszusammensetzung ist ein wichtiger Faktor für die

individuelle Komposition der Darmflora. Wegweisende Arbeiten zeigten vor einigen Jahren, dass die Zusammensetzung des Mikrobioms nicht beliebig zustande kommt, sondern bestimmte wiederkehrende taxonomische Muster, die durch die Häufigkeit und Interaktion bestimmter Bakteriengruppen bestimmt werden, ein übergeordnetes Organisationsprinzip darstellen. Diese wurden als *Enterotypen* oder *Enterogradienten* bezeichnet [23–25]. Es konnte weiterhin herausgearbeitet werden, dass diese Muster mit der Nahrungsaufnahme und der Art der enthaltenden Energiequellen (Protein vs. Kohlenhydrate) assoziiert sind [25–27]. Auch wenn diese Stratifizierung eine wichtige konzeptionelle Erkenntnis darstellt, wurden Hinweise auf klare Krankheitszusammenhänge bisher nicht erbracht. Es muss daher betont werden, dass nach dem bisherigen Kenntnisstand weder Kernmikrobiom noch Enterotypen eine diagnostische Aussage (z. B. für das metabolische Syndrom) ermöglichen, auch wenn einige Diagnostiklabore derartige Tests anbieten.

» Wiederkehrende taxonomische Muster stellen ein übergeordnetes Organisationsprinzip dar

Wie lässt sich nun die Balance einer solchen Symbiose darstellen und möglicherweise diagnostisch interpretieren? Die folgenden Paragraphen sollen kurz und kritisch die Techniken beleuchten, die zur Darstellung des Darmmikrobioms verwendet werden.

Techniken

Polymerase-Kettenreaktion und arraybasierte Tests

Techniken zur Darstellung der Darmflora mittels gezielter Amplifikation oder Hybridisierung werden in der Forschung verbreitet eingesetzt. In der klinischen Diagnostik werden die Verfahren in Deutschland als Ergänzung zu kulturbasierten Verfahren v. a. bei

schwer kultivierbaren Bakterien (Mycobakterien, Chlamydien, bestimmte Anaerobier) verwendet. Sie haben ihren Stellenwert in der spezifischen Detektion von Bakterien (z. B. Pathogenen) oder Virulenzfaktoren bzw. Resistenzgenen, stehen aber noch weit hinter der klassischen Bakterienkultur zurück. Bei entsprechender Eichung des Tests kann eine absolute Quantifizierung der detektierten Kopienzahl erzielt werden, was in der Diagnostik eine wichtige Einschätzung der Relevanz des jeweiligen Befunds, z. B. in der Verlaufskontrolle einer Therapie, ermöglichen kann. Eine Vielzahl von Techniken kommt zum Einsatz. Sie reichen von der einfachen auf einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basierten Amplifikation mittels spezifischer Primer, über die Real-time-PCR bis zu PCR-basierten Arrayhybridisierungen [28–36]. Ein grundsätzliches Problem aller Techniken ist, dass das Ziel vorher bekannt sein muss und dass der Nachweis der Gegenwart der DNA z. B. eines bestimmten Resistenzmerkmals

mittels solcher hochsensitiver Verfahren keinesfalls die Präsenz lebender Bakterien oder den Ursprung der Resistenz in einem spezifischen bakteriellen Taxon beweist. Unvorhergesehene Bakterien oder Resistenzen bleiben solchen Verfahren unzugänglich. Ebenso ist eine Darstellung der vollen Diversität selbst mit parallelen Verfahren wie Chiparrays den sequenzbasierten Verfahren unterlegen.

» Genamplifikation und -hybridisierung dienen der spezifischen Detektion von Bakterien

In der klinischen Routinediagnostik kommt auch eine Kopplung von Multiplex-PCR-Verfahren an eine anschließende massenspektrometrische Identifikation, wie Elektrosprayionisation (ESI)/Massenspektrometrie (MS), zur Anwendung, die eine höhere parallele

Identifikation der enthaltenen Bakterien-DNA ermöglicht. Dieses System wird unter dem Namen IRIDICA (©Abbott Diagnostics, Abbott Park, Illinois USA) angeboten und wird als Schnelltest v. a. im amerikanischen Markt verwendet. Es ermöglicht die sensitive und spezifische Detektion von bestimmten Pathogenpanels aus Vollblut-, aber auch aus Stuhlproben. In klinischen Studien an Blut konnte gezeigt werden, dass diese Technik grundsätzlich als schnelle und wirtschaftliche Zusatzdiagnostik zum kulturbasierten Standardverfahren geeignet ist, um Infektionen bzw. antibiotische Resistenzen auszuschließen, da sie einen hohen negativen prädiktiven Wert besitzt [37–40]. Ob sich das Verfahren auch in der Stuhldiagnostik breit einsetzen lässt, um z. B. infektiöse Erregerpanels abzudecken, muss noch gezeigt werden. Es ist wahrscheinlich, dass in Zeiten von steigenden Antibiotikaresistenzen und Infektionen, die sich durch die Globalisierung und Mobilität rasch verbreiten können, PCR-

Hier steht eine Anzeige.

basierte Techniken in der Mikrobiologie auch für Stuhlproben und Darmbiopsien eine zunehmende Bedeutung erfahren werden, da sie klinisch relevante Fragen beantworten können. Ihr Vorteil liegt hierbei v. a. in der Schnelligkeit und Sensitivität. Ob sie für bestimmte Bedingungen kulturbasierte Verfahren ersetzen können, werden nur große klinisch-epidemiologische Studien zeigen können.

Phylogenomische Methoden

Die Entwicklung der kulturunabhängigen Identifikation mittels 16S-rRNA-Genamplifikation war ein wesentlicher Meilenstein für das heutige Verständnis des Darmmikrobioms [41]. Hierbei werden bestimmte Genabschnitte der genetischen Information für die kleine Untereinheit des bakteriellen Ribosoms mittels PCR vervielfältigt und anschließend in ihrer Sequenz analysiert. Grundlage der Technik ist hierbei, dass 1) bestimmte Abschnitte des Gens bei (fast) allen Bakterien hochkonserviert vorliegen und 2) andere Bereiche zwischen bakteriellen Taxa hoch variabel und somit als „genetischer Fingerabdruck“ geeignet sind. Von diesen Bereiche liegen 9 (V1–V9) zwischen den hochkonservierten Abschnitten und können in unterschiedlichen Kombinationen mit universellen Primern amplifiziert werden. Als Sequenzanalyse kommen unterschiedliche Techniken zum Einsatz. In der klassischen Form wird die volle Länge des Gens aus einer Gesamt-Stuhl-DNA amplifiziert und in Vektoren kloniert. Entsprechende bakterielle Wirte werden nachfolgend mit der Bibliothek transformiert. Nach Vereinzelung der Klone wird die extrahierte DNA mittels Sanger-Kettenabbruchsequenzierung entschlüsselt. Da jeder Klon bei diesem Verfahren einzeln von einer Platte entnommen werden muss, ist die Herangehensweise sehr aufwendig. Resultat sind wenige (je nach Aufwand zumeist hunderte) Sequenzen, die aber alle Bereiche des Gens abdecken und somit eine sehr tiefe Identifikation des entsprechenden Bakteriums erlauben. Die erhaltene Sequenz wird mit Datenbanken abgeglichen und eine Wahrscheinlichkeit errechnet, mit

Gastroenterologie 2017 · 12:49–59 DOI 10.1007/s11377-016-0129-x
© Springer Medizin Verlag Berlin 2017

P. Rosenstiel

Molekulare Darmmikrobiomdiagnostik . Einblick in unser anderes Genom

Zusammenfassung

Fortschritte in der DNA-Sequenzier-technik und in anderen „Omics-Technologien“ ermöglichen einen neuen Blick auf die menschliche Darmflora als hochdiverse mikrobielle Gemeinschaft, die eine Vielzahl von physiologischen Funktionen erfüllt. Die Zusammensetzung der Flora ist interindividuell verschieden, folgt aber bestimmten Organisationsprinzipien und ist innerhalb eines Individuums über die Zeit bemerkenswert stabil. Es wurde daher vorgeschlagen, die Darmbakterien als zusätzliches Organ zu verstehen. Die Interaktionen von Wirt und Flora sind komplex und deuten auf eine koevolvierte Symbiose hin, in der beide Partner von dem stabilen metabolischen Zusammenspiel profitieren. Die „gespeicherte“ genetische Information ist 100-mal höher als die des menschlichen Genoms und beeinflusst eine Vielzahl von physiologischen Prozessen, von der Verdauung bis zur Prägung des

Immunsystems. Störungen dieses Ökosystems sind mit einer Vielzahl an chronischen Erkrankungen, wie Adipositas, Diabetes mellitus Typ I/II, Fettlebererkrankungen und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, assoziiert. Es ist daher eine wichtige Frage für die Entwicklung der inneren Medizin, wie das neue Wissen um die Darmflora diagnostisch und therapeutisch nutzbar gemacht werden kann. In der vorliegenden Übersicht werden Methoden der Mikrobiomdiagnostik kritisch beleuchtet und die Frage gestellt, welche Felder perspektivisch von einer rationalen Therapie des Darmmikrobioms (Bakteriotherapie/Ökobotika) profitieren werden.

Schlüsselwörter

Mikrobiom · Innere Medizin · Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen · Mikrobiologische Techniken · Metagenomik

Molecular diagnostic workup of the gut microbiome. Insight into our other genome

Abstract

Recent advances in high-throughput sequencing enabled a novel view at the gut microbiome and its diverse functions for normal human physiology. While the composition of the intestinal microbiota is highly variable between individuals, distinct organizational principles (e. g. enterogradients, core gut microbiome) have been identified. It has thus been suggested that the gut microbiome can be understood as an additional organ system with genetic information content 100-times higher than the genome size of its human host. It is perceived that disturbed host–microbial interactions and related inflammatory signaling play important roles in the etiology of a number of human diseases including metabolic disorders (e. g. obesity, types 1 and 2 diabetes,

non-alcoholic fatty liver disease), chronic inflammatory disorders (e. g. inflammatory bowel diseases, psoriasis), but also in certain forms of cancer affecting the gastrointestinal tract (e. g. colonic or hepatocellular cancer). In this review we will thus critically describe methods which have been developed to exploit the diagnostic potential of the gut microbiota. As a perspective, we will discuss the therapeutic potential of targeted bacteriotherapy/ecobiotics for selected fields of internal medicine.

Keywords

Microbiome · Internal medicine · Inflammatory bowel disease · Microbiological techniques · Metagenomics

der die Sequenz einem bereits bekannten Bakterium zuzuweisen ist (▣ Abb. 1).

Einen Durchbruch hat die Methode erfahren, als die sog. Next-Generation-Sequencing(NGS)-Verfahren entwickelt wurden. Hierbei handelt es sich um Verfahren, mit denen hochparallel in

einer Sequenzierreaktion bis zu Milliarden von DNA-Fragmenten gleichzeitig entschlüsselt werden. Bei der derzeit marktführenden Methode (Sequencing by Synthesis, Illumina, San Diego, CA, USA; [42]) werden die amplifizierten 16S-Fragmente hierzu auf einer

Glasoberfläche gebunden, das Signal nochmals mithilfe einer sog. Brücken-PCR verstärkt und anschließend die Sequenz durch die Inkorporierung von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden und mithilfe einer hochauflösenden Kamera dargestellt. Die so erhaltenen Sequenzen sind kürzer (etwa 2-mal 200 bp) und umfassen so zumeist nur 1–2 variable Bereiche. Die Identifizierung der jeweiligen Bakterien ist somit etwas weniger genau, aber die Darstellung der Diversität des Darmmikrobioms ist viel höher und NGS ermöglicht v. a. die relative Quantifizierung der jeweiligen Bakterientaxa bei einer hohen Probenanzahl in kurzer Zeit.

» Next Generation Sequencing ermöglicht die schnelle relative Quantifizierung von Bakterientaxa

Die geringere Genauigkeit führt dazu, dass Bakteriensequenzen als sog. *Operational Taxonomical Units* (OTU) beschrieben werden [43]. Dieser Begriff steht für den Vergleich der Ähnlichkeit der Sequenz mit hinterlegten Sequenzen bei einer Tolerierung geringfügiger Abweichungen (z. B. 3 %) und definiert so z. B. eine gegebene Sequenz, die als „OTU *Bacteroides*“ ausgegeben wird, als zu 97 % oder mehr übereinstimmend mit der 16S-rDNA-Sequenz, die in Bakterien der Gattung *Bacteroides* vorkommt. Eine Klassifizierung der genauen Bakterienart bzw. des Stamms ist mit der Methode üblicherweise nicht möglich. Wichtig ist, dass definierte Primerkombinationen und Regionen zu Schätzfehlern führen können, da sie bestimmte Bakteriengattungen weniger amplifizieren als andere [44–46]. Die Bereiche V1–2 und V3–4 haben sich in der Stuhlanalyse durchgesetzt, da sie die wichtigen bakteriellen Phyla *Bacteroidetes*, *Firmicutes* und *Proteobakterien* relativ gleichmäßig abdecken. Die 16S-rRNA kann auch aus RNA amplifiziert werden, hierbei werden v. a. die stoffwechselaktiven Bakterien erfasst und damit ein weiterer Rückschluss auf die Funktionalität der Darmflora ermög-

licht. Zur biostatistischen Beschreibung der bakteriellen Konsortien kommen klassische Methoden der Diversitätsanalyse zur Anwendung [44, 46]. Diese beschreiben mittels verschiedener Indizes (z. B. Shannon-Index oder Chao I Richness) die Diversität in der einzelnen Probe (α -Diversität) oder vergleichen die Diversität von Proben untereinander (β -Diversität). Es muss hierbei grundsätzlich unterschieden werden, ob es sich um gewichtete oder ungewichtete Analysen handelt. Bei gewichteten Analysen wird die Abundanz der einzelnen Sequenzen in Betracht gezogen, d. h. häufige Sequenzen werden stärker bei den Vergleichen berücksichtigt. Bei ungewichteten Analysen zählt lediglich die Anwesenheit oder Abwesenheit einer Sequenz; dadurch bekommen seltene Bakterientaxa eine höhere Bedeutung [47].

» In der Diagnostik beginnt sich die 16S-rDNA-basierte Sequenzanalyse zu etablieren

Durch diese mittlerweile sehr stark verbreitete Analysemethodik ist eine Vielzahl von Daten über das Ökosystem Darm erhoben worden. In der Diagnostik beginnt sich die 16S-rDNA-basierte Sequenzanalyse zu etablieren. So kommen sie z. B. in klinischen Studien zu neuen Antibiotika oder zur Stuhltransplantation zum Einsatz. Ob und wie sich 16S-rDNA-basierte Verfahren zur Abschätzung eines individuellen Mikrobiomdefizits einsetzen lassen, um die Spenderauswahl zu verbessern, wird die künftige Entwicklung zeigen. Ein weiterer interessanter Bereich könnte die longitudinale Verfolgung des individuellen Darmmikrobioms sein, da sich hier aus der zeitlichen Entwicklung zusätzliche Biomarker für bestimmte Darmerkrankungen (z. B. Schubentwicklung bei CED oder Vulnerabilität für *Clostridium-difficile*-Infektion) entwickeln lassen könnten.

Metagenomik

Eine grundsätzlich andere Herangehensweise ist die Metagenomik. Die Metho-

de wurde zuerst von Handelsman und Rondon verwandt [48, 49]. Diese prägten auch die Definition des Metagenoms als der „kollektiven genetischen Information eines gesamten Ökosystems“. Bei dieser Technik wird im Fall des gastrointestinalen Trakts die gesamte DNA der luminalen Mikroflora (z. B. Stuhl oder Mageninhalt) extrahiert, in gleichmäßige kleinere Stücke geschnitten und sequenziert. Hierbei kommt ebenfalls die NGS-Methode zum Einsatz, um kosten- und zeiteffizient diesen sehr großen Sequenzraum (fäkales Gesamtmetagenom: etwa 250 Gigabasen) darzustellen ([50]; **Abb. 2**).

Ein größeres Problem dieser Methode liegt in der bioinformatischen Verarbeitung der erhobenen Datenmengen, die allein in der benötigten Speicherkapazität die 16S-basierten Verfahren um mehrere Größenordnungen übertreffen. Mittels Annotationsalgorithmen werden z. B. alle potenziell kodierten Proteinbruchstücke von den einzelnen Fragmenten „übersetzt“ (in beide Richtungen und in 3 Leserahmen) und mit vorhandenen Proteinen aus Datenbanken abgeglichen. Die so erhaltenen Muster (z. B. Anwesenheit von bestimmten Enzymen wie Aminosäuresynthetasen) können quantifiziert und durch den Abgleich mit genetischer Variabilität auch taxonomisch untersucht werden („die identifizierte *Tryptophansynthetase* stammt aus *Lactobacillus* spp.“).

» Ein größeres Problem liegt in der bioinformatischen Verarbeitung der erhobenen Datenmengen

Durch diese Kartierung lassen sich Rückschlüsse auf die Stoffwechselausstattung des untersuchten Mikrobioms gewinnen und in einem definierten Rahmen auch Stoffwechselflüsse (Aktivität) des Systems vorhersagen [51–56]. Eine weitere Entwicklung der Technik ist, dass aus den Daten auch individuelle Genome rekonstruiert werden können. Hierzu wird die Nukleotidabfolge und die relative Häufigkeit von Purin- und Pyrimidinbasen sowie von überlappen-

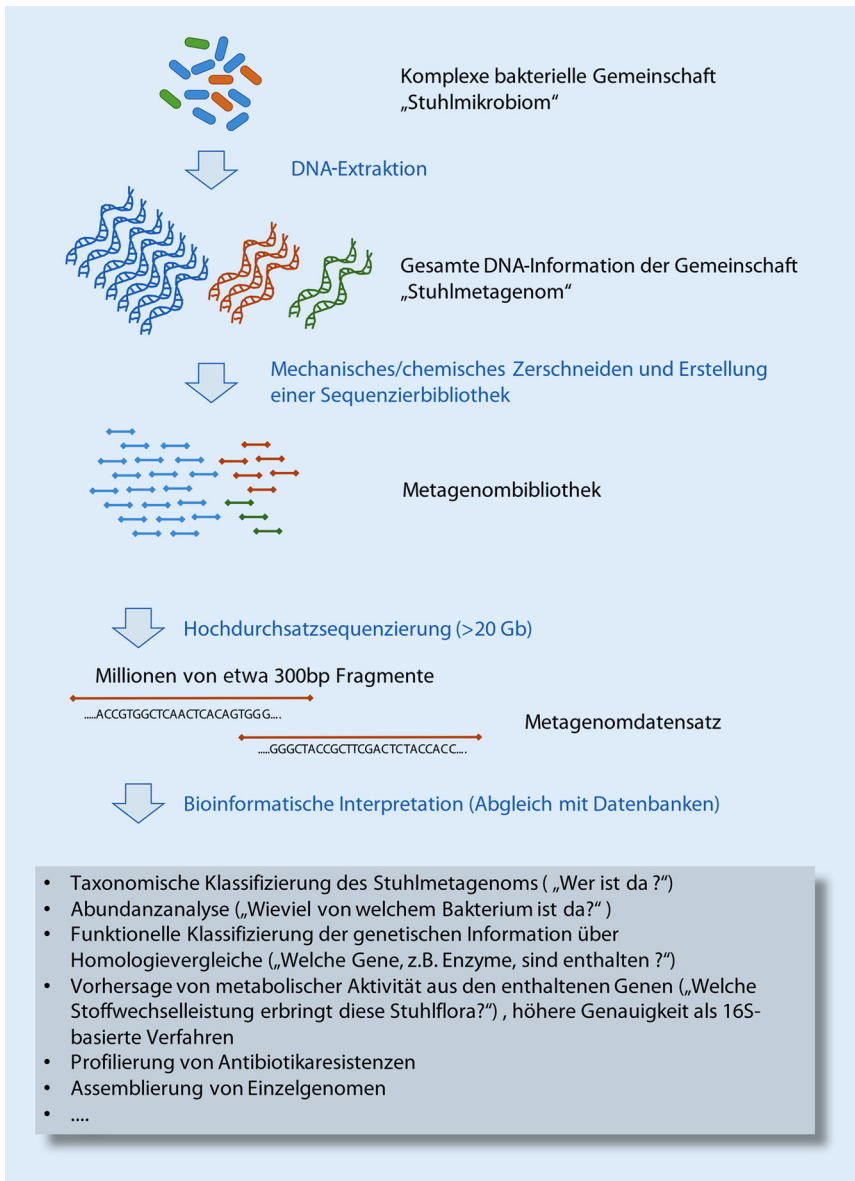


Abb. 2 ▲ Prinzip und Schritte der bakteriellen Metagenomanalyse (Flussdiagramm)

den Bruchstücken in Betracht gezogen [57, 58]. Mit diesem Filter werden die Stücke in kleinere Teilmengen („bins“) verbracht, die anschließend zusammengesetzt (assembliert) werden. Neben der grundsätzlichen Anwesenheit von Stoffwechselwegen kann so auch dargestellt werden, welche Schritte gemeinsam in einem Bakterium ablaufen oder welche Antibiotikaresistenzen zusammen in welchem bakteriellen Genom vorliegen.

Grundsätzliche Schwierigkeiten liegen bisher in der Untersuchung von mukosaassoziierten bakteriellen Gemeinschaften, da z. B. in Biopsien die Menge der menschlichen DNA die der

Bakterien um ein Vielfaches übersteigt. Hier wird intensiv an Aufreinigungsmethoden gearbeitet, die zu einer Anreicherung der bakteriellen DNA verwendet werden können. In der Diagnostik ist auch mangels (noch) fehlender Standards in der Annotation und aufgrund der Sequenzierkosten (Minimum 300–500 € Materialkosten) ein Einsatz der Metagenomik eher perspektivisch zu betrachten. Durch die tieferen funktionellen Einblicke erscheint sie jedoch das derzeit geeignetste Verfahren, um metabolische Defizite der vorhandenen komplexen Gemeinschaften aufzuklären und den für die Rekonstitution notwendigen

Cocktail an Bakterien im Sinne einer gezielten Ökotherapie vorherzusagen.

„Dual shotgun metatranscriptomics“/Metaproteom

Viele sog. Omics-Verfahren, die die genaue Auflösung der Stoffwechsellräume des Darmmikrobioms zum Ziel haben, sind derzeit in der Entwicklung. Aus dieser Vielzahl seien hier 2 Techniken herausgegriffen, die eine interessante Ergänzung zu den bereits beschriebenen genomischen Verfahren darstellen. Bei der Analyse des Transkriptom (also der kollektiven Information der transkribierten RNA) sind Verfahren zur simultanen Darstellung des Wirts- und Bakterientranskriptom („dual shotgun transcriptomics“; [59, 60]) als besonders spannende Entwicklung zu betrachten. Hieraus kann möglicherweise der tatsächliche Kometabolismus des Systems abgelesen werden, da die Technik einen hochaufgelösten Schnappschuss der physiologischen Zustände beider Seiten der Symbiose ermöglichen. Ähnlich der Metagenomik wird bei dieser Analyse die (im Fall des Darms mukosale) Gesamt-RNA in chemisch kleine Stücke geschnitten, die anschließend in cDNA übersetzt und mittels NGS analysiert werden. Eine Annotation und Quantifizierung erfolgt analog zum Metagenom. Auch hier sind einige methodische Schwierigkeiten, wie die unterschiedliche Stabilität und Abundanz der menschlichen und Bakterien-DNA, die Abreicherung von ribosomaler RNA oder die unterschiedliche Extraktionseffizienz aus bestimmten bakteriellen Taxa, noch zu überwinden. Insgesamt erscheint aber das Verfahren durchaus als weiterer wichtiger Schritt, der ein übergeordnetes Verständnis des zeitlich und räumlich komplexen Ökosystems Darm ermöglicht.

» Die simultane Darstellung des Wirts- und Bakterientranskriptom ist eine spannende Entwicklung

Eine weitere wichtige Entwicklung ist von der massenspektrometrischen Untersu-

chung der aus dem Gesamtmikrobiom gewonnenen Proteinextrakte („*metaproteomics*“ [61]) zu erwarten. Hierbei werden komplexe Mischungen von Proteinen zunächst durch enzymatischen Verdau in kleine Peptide aufgeschlüsselt und mittels säulenchromatographischer Methoden in Fraktionen zergliedert, die anschließend durch massenspektrometrische Verfahren analysiert werden. Die Kopplung von verschiedenen MS-Analysen (Tandem-MS) erlaubt die Aminosäuresequenzidentifikation der Peptide durch Datenbankgleich der erhobenen Massen der Fragmente. Das Verfahren wird bei Proben, bei denen die Herkunft der Proteine klar definiert ist (z. B. menschliche Zellkultur), schon seit längerem und äußerst erfolgreich eingesetzt. Ein breiterer Einsatz in der molekularen Mikrobiomanalytik der Darmflora ist bisher an der komplexen Bioinformatik gescheitert, da die identifizierten Molekulargewichte der Peptide und deren Fragmente auf eine unbekannte Anzahl von Bakteriengenomen bezogen werden müssen. Mit wachsender Anzahl der in Datenbanken deponierten Genome aus Darmbakterien und der Kombination der Technik mit taxonomischer Klassifikation (über 16S-rDNA-Verfahren) wird jedoch die Bedeutung der proteomischen Analyse stark ansteigen, da sie den direkten Blick auf die funktionale Ebene ermöglicht. Dazu gehört auch die Entschlüsselung posttranslativaler Modifikationen (wie Phosphorylierung oder Glykosylierung). In Modellen (z. B. Entzündungs- oder Infektionsmodellen in der Maus) kann sie darüber hinaus mit Verfahren wie der stabilen Isotopmarkierung kombiniert werden [62, 63], die eine Erkenntnis und Quantifizierung von Stoffwechselflüssen erlaubt.

Langzeiteffekte von Stuhltransplantation

Auch wenn Fallbeispiele des therapeutischen Effekts von Stuhltransplantation (Fäkaltransplantation, FT) bei infektiöser-nekrotisierender Enterokolitis schon seit über 50 Jahren beschrieben worden sind [64], hat die Überlegenheit der FT bei rekurrierender Kolitis durch *Clostridium-difficile*-Infektion in einer

randomisierten Studie zu einer starken Zunahme der Beachtung dieser Therapie geführt [65]. In Deutschland ist dies z. B. durch die Gründung eines Registers dokumentiert, das den Großteil der Behandlungen dokumentiert [66]. Auch wenn bei klarer Indikationsstellung und korrekt durchgeführter Spenderauswahl die Risiken einer solchen Behandlung bisher vergleichsweise gering anzusetzen sind, ist jedoch klar zu betonen, dass ein Fremdstuhltransfer nie ein definiertes Arzneimittel, sondern immer eine relativ unstandardisierte therapeutische Prozedur bleiben wird.

» Fremdstuhltransfer wird immer eine relativ unstandardisierte therapeutische Prozedur sein

Die molekularen Methoden, die in den vorangegangenen Abschnitten diskutiert wurden, sind geeignet, grundsätzlich aufzuklären, welche Mechanismen hinter der Verdrängung des infektiösen Erregers stehen. Es ist wahrscheinlich, dass metabolische Konkurrenz oder andere kompetitive Ereignisse eine wichtige Rolle spielen. Interessante Arbeiten deuten daraufhin, dass auch aufbereiteter Eigenstuhl oder steril filtrierter Stuhl (d. h. FT ohne Bakterien) einen ähnlichen therapeutischen Effekt haben könnten [67, 68]. Diese Befunde könnten daraufhin deuten, dass die nötige Perturbation des unbalancierten Ökosystems im Fall von *Clostridium (C.) difficile* viel weniger gezielt ablaufen muss und dass es möglicherweise weniger um die „Verpflanzung“ eines Ökosystems geht, als um einen adäquaten Umweltreiz, der zur Reformatierung der vorhandenen Flora führt.

Es ist wahrscheinlich, dass dieser Effekt nur für den sehr spezifischen Fall *C. difficile* gilt, da es sich um eine opportunistische Infektion handelt, die nur unter ganz bestimmten Rahmenbedingungen wirksam werden kann. Derzeit wird FT für eine ganze Reihe von Krankheiten (z. B. metabolisches Syndrom, CED) als eine mögliche Behandlungsform diskutiert. Es zeichnet sich ab, dass hier

das Ansprechen stärker vom Spender abhängt [67] und möglicherweise Wiederholungsbehandlungen notwendig sind. Daher wird es wichtig sein, systematische diagnostische Studien durchzuführen, die den Einfluss von FT auf das Empfängermikrobiom untersuchen [69–72]. Phylogenomische Verfahren und Metagenomik werden einen wichtigen Beitrag für das Verständnis leisten, wie lange und in welcher Art Spenderorganismen nachzuweisen sind und wie die Besiedlungsgeschichte von derart veränderten Ökosystemen tatsächlich aussieht.

» Die Übertragung potenzieller nichtvorhersehbarer Risiken durch Fäkaltransfer ist ein relevantes Thema

Derzeit ist die Übertragung von potenziellen nichtvorhersehbaren Risiken durch wiederholte FT ein relevantes Thema. Letztlich kann aber auch nur ein molekulares Verständnis des Therapieerfolgs dazu führen, dass gezielte Ökotherapien entwickelt werden können. Begreift man das Darmmikrobiom und den Darm als kometabolisches System, das insgesamt erkrankt, kann es durch die Darstellung der Stoffwechsellustände/-ausstattung über die bereits genannten Verfahren zu einer diagnostischen Interpretation der komplexen Störung kommen, die eine rationale Therapie über definierte Mischungen von Bakterienstämmen mit den fehlenden Eigenschaften ermöglicht.

Beispiel der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Die CED werden als Erkrankungsgruppe mit einer klaren ätiologischen Beteiligung des Darmmikrobioms betrachtet [73, 74]. Bei gleichzeitig höherer Gesamtzahl der Bakterien kommt es zu einem Verlust der natürlichen Barrierefunktion des Epithels, zu einer Reduktion der Dicke der Schleimschicht und zu einer vermehrten Präsenz von Bakterien in Epithelzellen und Immunzellen in der Mukosa [75], die die aberrante Immunreaktion mitverursachen. Klinisch zeigt sich dies z. B. durch das Abklingen entzünd-

licher Symptome nach der Diversion des Fäkalstroms durch Stomaanlage im aboralen Schenkel, wodurch die Bakterienzahl drastisch reduziert wird. Zahlreiche 16S-rDNA-basierte Untersuchungen haben gezeigt, dass es bei CED zu einer Reduktion der Diversität der fäkalen, aber auch des mukosaassoziierten Mikrobioms kommt [76–80]. Auf tieferer phylogenetischer Ebene findet sich insbesondere beim Morbus Crohn eine relative Verminderung von γ -Proteobakterien, Roseburia, Ruminococcaceae und *Faecalibacterium prausnitzii*. Bei der Colitis ulcerosa wurde wiederholt ein Anstieg von sulfatreduzierenden δ -Proteobakterien gezeigt, der auch von der entzündlichen Aktivität abhängig war. Diese Merkmale finden sich jedoch keineswegs in allen Patienten und hängen ebenfalls von der geographischen Herkunft bzw. Ernährung der Probanden/Patienten ab [81]. Als Biomarker sind daher bisher diese Verfahren nicht geeignet, um z. B. die Diagnose CED zu untermauern. Ebenso ist es wichtig, dass in keiner dieser Untersuchungen ein echtes Pathogen im Sinne der Koch-Postulate gezeigt werden konnte. Auch in metagenomischen Untersuchungen zeigte sich eine Reduktion der nichtredundanten genetischen Informationsmenge („gene count“) des Darmmikrobioms [82–84]. Hier muss jedoch betont werden, dass tiefergehende metagenomische Analysen in großen Fallzahlen noch fehlen und somit über das tatsächliche metabolische Defizit wenige Aussagen getroffen werden können. Es besteht die Hoffnung, dass hierdurch ein besseres Verständnis des tatsächlichen funktionellen Beitrags der intestinalen Mikroflora zum aktiven Entzündungsprozess erreicht werden kann.

Die Veränderung der Diversität findet sich auch – wenn in geringeren Ausmaß – bei erstgradigen Verwandten und stärker bei dem gesunden Geschwisterteil diskordanter eineiigen Zwillinge, aber nicht bei Menschen, die im gleichen Haushalt wie CED-Patienten leben [85]. Dies deutet daraufhin, dass ein Teil der Mikrobiomveränderungen genetisch determiniert sein könnte. Somit wäre die Veränderung der Darmflora zumindest teilweise bereits vor Ausbruch der Erkrankung vorhanden und könnte so auf eine

mögliche Manifestation der Erkrankung ursächlich einwirken. In verschiedenen Experimenten, die auf Mauslinien mit veränderten Genen, die Risikofaktoren für CED darstellen, beruhen, konnte gezeigt werden, dass durch diese Manipulation die Zusammensetzung des Darmmikrobioms gestört wird. Für Schlüsselgene, wie das NOD2-Rezeptor-Gen oder das Autophagiegen *ATG16L1* (beides Risikogene für Morbus Crohn), konnte nachgewiesen werden, dass die Veränderungen zu einem erhöhten proentzündlichen Potenzial der intestinalen Flora führen. Dies kann unter definierten Bedingungen sogar auf normale (genetisch unveränderte) Mäuse durch das gemeinsame Halten in einem Käfig („co-housing“) übertragen werden [86, 87]. Bestimmte Verhaltensweisen von Mäusen (habituelle Koprophagie, damit permanenter Keimtransfer) mögen diese Transmissibilität stark begünstigen, jedoch zeigen die Experimente, dass „entzündliche“ Information grundsätzlich im Mikrobiom gespeichert sein kann und somit die Veränderungen nicht nur Ausdruck eines entzündeten Ökosystems sind, sondern die Entzündung ursächlich mitbedingen können.

Ausblick

Weitere Studien, die sich integrativ der Elemente molekularer Mikrobiomdiagnostik bedienen und den Übergang von Gesundheit zu Krankheit z. B. in humanen „kindred cohorts“ oder in longitudinalen Verläufen analysieren, könnten daher wegweisende Erkenntnisse liefern, welche Veränderungen des Mikrobioms früh und daher möglicherweise noch beeinflussbar vorliegen und welche geteilten Stoffwechselwege der Symbiose im Darm hierbei gestört werden. Erste Analysen in Biopsien von CED-Patienten, die mit infektiös-entzündeten Patienten verglichen wurden, deuten auf einen Verlust von koordiniertem Aminosäuremetabolismus [88], Fettsäureoxidation und auf eine Entkopplung des Kometaabolismus zwischen Wirt und Mikroben hin [89]. Ähnliche Veränderungen könnten sich auch bei anderen mikrobiomassoziierten Erkrankungen finden. Die Komplexität der für diese Untersuchungen notwendigen Kombi-

nation von Datenqualitäten ist hoch. Letztlich wird sich aber nur mit einer derartigen Analysemethodik zeigen, ob tatsächlich Biomarker identifiziert werden können, die den spezifischen Bedarf der Rekonstitution des gestörten Ökosystems aufzeigen. Aus bisherigen klinischen Studien zu FT bei CED oder metabolischem Syndrom ist offensichtlich, dass – anders als bei *C. difficile* – eine hohe Spenderabhängigkeit des therapeutischen Erfolgs existiert.

» Mögliche individuelle Mikrobiomstörungen müssen personalisiert behandelt werden

Dies deutet möglicherweise auf individuelle Störungen der metabolischen Eigenschaften des jeweiligen Mikrobioms hin, die personalisiert und präzise behandelt werden müssen. Ein nachhaltiger Erfolg einer Bakteriotherapie bei komplexeren Krankheitsbildern wie CED kann daher wohl nur durch eine stammbasierte Rekonstitution von komplexen Gemeinschaften (Ökobiota) erfolgen, bei der klare molekulare Eigenschaften übertragen werden. Weder die diagnostischen noch die mikrobiologischen Voraussetzungen für eine solche Therapie sind derzeit vorhanden. Mit der kommerziell angebotenen Dysbiosediagnostik und konventionellen Probiotika hat ein solcher Ansatz keine nennenswerte Ähnlichkeit. Der derzeitige „Mikrobiomhype“ wird sich daran messen lassen müssen, ob sich das gewonnene Wissen über ein komplexes System derart in klinisch-relevante Algorithmen übersetzen lässt.

Fazit für die Praxis

- Das Darmmikrobiom setzt sich aus einer Vielzahl von Mikroorganismen zusammen, die gemeinsam mit der menschlichen Schleimhaut ein komplexes Ökosystem bilden.
- Zur nukleinsäurebasierten Analyse stehen Hochdurchsatztechnologien, wie Arrayhybridisierungen und Next Generation Sequencing, teilweise gekoppelt an eine Massenspektrometrie, zur Verfügung. Diese finden auch bei phylogénomischen Me-

thoden wie z. B. bei der 16S-rDNA-/rRNA-Amplifikation ihre Anwendung. Mithilfe massenspektrometrischer Analysen von Proteinextrakten können Aussagen zum Metaproteom getroffen werden.

- Der Mikrobiomtransfer durch Spenderstuhl wurde bisher erfolgreich bei Infektionen mit *Clostridium difficile* angewendet. Weitere Erkrankungen, wie z. B. metabolisches Syndrom und CED, werden als Indikation diskutiert.
- Es ist zu erwarten, dass das molekulare Verständnis des Mikrobioms zukünftig sowohl die diagnostischen als auch die therapeutischen Möglichkeiten verschiedener Erkrankungen signifikant verbessern wird.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. med. P. Rosenstiel

Institut für Klinische Molekularbiologie,
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Rosalind-Franklin Straße 12, 24105 Kiel,
Deutschland
p.rosenstiel@mucosa.de

Danksagung. Das Feld der Mikrobiomforschung ist mittlerweile sehr groß; eine solche Übersicht, die eine Perspektive beschreibt und kein systematischer Übersichtsartikel ist, muss daher unvollständig bleiben. Der Autor möchte sich bei allen Wissenschaftlern des Felds bedanken, die durch ihre Arbeiten das Wissen vorangebracht haben, die aber in den Zitaten unerwähnt geblieben sind.

Förderung. Die Arbeiten des Labors werden unterstützt vom Exzellenzcluster Inflammation at Interfaces, dem SFB 1182, dem EU-Antrag H2020 SysCID und dem BMBF Konsortium SysINFLAME.

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. P. Rosenstiel gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Dieser Beitrag beinhaltet keine vom Autor durchgeführten Studien an Menschen oder Tieren.

Literatur

1. Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307:1915–1920. doi:10.1126/science.1104816
2. Hooper LV, Gordon JI (2001) Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 292:1115–1118. doi:10.1126/science.1058709

3. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI (2006) Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 124(4):837–848. doi:10.1016/j.cell.2006.02.017
4. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R (2012) Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489:220–230. doi:10.1038/nature11550
5. Turnbaugh PJ, Gordon JI (2009) The core gut microbiome, energy balance and obesity. *J Physiol* 587(2009):4153–4158. doi:10.1113/jphysiol.2009.174136
6. Marotz C, Knight R (2016) Culturing: looking it up in our gut. *Nat Microbiol* 1:16169. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.169
7. Dominguez-Bello MG et al (2016) Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. *Nat Med* 22:250–253. doi:10.1038/nm.4039
8. Planer JD et al (2016) Development of the gut microbiota and mucosal IgA responses in twins and gnotobiotic mice. *Nature* 534:263–266. doi:10.1038/nature17940
9. Johansson ME, Hansson GC (2011) Microbiology. Keeping bacteria at a distance. *Science* 334:182–183. doi:10.1126/science.1213909
10. Johansson ME, Larsson JM, Hansson GC (2011) The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(Suppl 1):4659–4665. doi:10.1073/pnas.1006451107
11. Cario E et al (2006) Trypsin-sensitive modulation of intestinal epithelial MD-2 as mechanism of lipopolysaccharide tolerance. *J Immunol* 176:4258–4266
12. Rescigno M (2009) Gut commensal flora: tolerance and homeostasis. *F1000 Biol Rep* 1:9. doi:10.3410/B1-9
13. Swiatczak B, Rescigno M (2012) How the interplay between antigen presenting cells and microbiota tunes host immune responses in the gut. *Semin Immunol* 24:43–49. doi:10.1016/j.smim.2011.11.004
14. Olszak T et al (2012) Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science* 336:489–493. doi:10.1126/science.1219328
15. Lindner C et al (2015) Diversification of memory B cells drives the continuous adaptation of secretory antibodies to gut microbiota. *Nat Immunol* 16:880–888. doi:10.1038/ni.3213
16. Turnbaugh PJ et al (2007) The human microbiome project. *Nature* 449:804–810. doi:10.1038/nature06244
17. Yatsunenkov T et al (2012) Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486:222–227. doi:10.1038/nature11053
18. Sommer F, Backhed F (2013) The gut microbiota – masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* 11:227–238. doi:10.1038/nrmicro2974
19. Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA (2008) The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol* 6:e280. doi:10.1371/journal.pbio.0060280
20. Dethlefsen L, Relman DA (2011) Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(Suppl 1):4554–4561. doi:10.1073/pnas.1000087107
21. Relman DA (2012) The human microbiome: ecosystem resilience and health. *Nutr Rev* 70(Suppl 1):S2–S9. doi:10.1111/j.1753-4887.2012.00489.x
22. Turnbaugh PJ et al (2009) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457:480–484. doi:10.1038/nature07540
23. Arumugam M et al (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473:174–180. doi:10.1038/nature09944
24. Cotillard A et al (2013) Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* 500:585–588. doi:10.1038/nature12480
25. Wu GD et al (2011) Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 334:105–108. doi:10.1126/science.1208344
26. Hildebrand F et al (2013) Inflammation-associated enterotypes, host genotype, cage and inter-individual effects drive gut microbiota variation in common laboratory mice. *Genome Biol* 14:R4. doi:10.1186/gb-2013-14-1-r4
27. Wang J et al (2014) Dietary history contributes to enterotype-like clustering and functional metagenomic content in the intestinal microbiome of wild mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:E2703–E2710. doi:10.1073/pnas.1402342111
28. Dierkes C et al (2009) Clinical impact of a commercially available multiplex PCR system for rapid detection of pathogens in patients with presumed sepsis. *BMC Infect Dis* 9:126. doi:10.1186/1471-2334-9-126
29. Millar BC, Xu J, Moore JE (2007) Molecular diagnostics of medically important bacterial infections. *Curr Issues Mol Biol* 9:21–39
30. Maurer JJ (2011) Rapid detection and limitations of molecular techniques. *Annu Rev Food Sci Technol* 2:259–279. doi:10.1146/annurev.food.080708.100730
31. McLoughlin KS (2011) Microarrays for pathogen detection and analysis. *Brief Funct Genomics* 10:342–353. doi:10.1093/bfgp/elfr027
32. Wolk DM, Kaleta EJ, Wysocki VH (2012) PCR-electrospray ionization mass spectrometry: the potential to change infectious disease diagnostics in clinical and public health laboratories. *J Mol Diagn* 14:295–304. doi:10.1016/j.jmoldx.2012.02.005
33. Collins DA, Elliott B, Riley TV (2015) Molecular methods for detecting and typing of *Clostridium difficile*. *Pathology* 47:211–218. doi:10.1097/PAT.0000000000000238
34. Su G et al (2015) 16S ribosomal ribonucleic acid gene polymerase chain reaction in the diagnosis of bloodstream infections: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 10:e0127195. doi:10.1371/journal.pone.0127195
35. Zhang H, Morrison S, Tang YW (2015) Multiplex polymerase chain reaction tests for detection of pathogens associated with gastroenteritis. *Clin Lab Med* 35:461–486. doi:10.1016/j.cll.2015.02.006
36. Haas CT, Roe JK, Pollara G, Mehta M, Noursadeghi M (2016) Diagnostic ‘omics’ for active tuberculosis. *BMC Med* 14:37. doi:10.1186/s12916-016-0583-9
37. Jordana-Lluch E et al (2015) Evaluation of the broad-range PCR/ESI-MS technology in blood specimens for the molecular diagnosis of bloodstream infections. *PLoS ONE* 10:e0140865. doi:10.1371/journal.pone.0140865
38. Desmet S, Maertens J, Bueselink K, Lagrou K (2016) Broad-range PCR coupled with electrospray ionization time of flight mass spectrometry for detection of bacteremia and fungemia in patients with neutropenic fever. *J Clin Microbiol* 54:2513–2520. doi:10.1128/JCM.01066-16

39. Metzgar D et al (2016) The IRIDICA BAC BSI assay: rapid, sensitive and culture-independent identification of bacteria and candida in blood. *PLoS ONE* 11:e0158186. doi:10.1371/journal.pone.0158186
40. Stralin K et al (2016) The IRIDICA PCR/Electrospray ionization-mass spectrometry assay on bronchoalveolar lavage for bacterial etiology in mechanically ventilated patients with suspected pneumonia. *PLoS ONE* 11:e0159694. doi:10.1371/journal.pone.0159694
41. Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51:221–271
42. Bentley DR et al (2008) Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 456:53–59. doi:10.1038/nature07517
43. Blaxter M et al (2005) Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* 360:1935–1943. doi:10.1098/rstb.2005.1725
44. Schloss PD et al (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 75:7537–7541. doi:10.1128/AEM.01541-09
45. Schloss PD, Gevers D, Westcott SL (2011) Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *PLoS ONE* 6:e27310. doi:10.1371/journal.pone.0027310
46. Gevers D, Pop M, Schloss PD, Huttenhower C (2012) Bioinformatics for the Human Microbiome Project. *PLoS Comput Biol* 8:e1002779. doi:10.1371/journal.pcbi.1002779
47. Whittaker RW, Willis KJ, Field R (1991) Scale and species richness: towards a general, hierarchical theory of species diversity. *J Biogeogr* 28(4):453–470
48. Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM (1998) Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol* 5:R245–R249
49. Rondon MR et al (2000) Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 66:2541–2547
50. Qin J et al (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464:59–65. doi:10.1038/nature08821
51. Gilbert JA et al (2010) Meeting report: the terabase metagenomics workshop and the vision of an Earth microbiome project. *Stand Genomic Sci* 3:243–248. doi:10.4056/sigs.1433550
52. Glass EM, Wilkening J, Wilke A, Antonopoulos D, Meyer F (2010) Using the metagenomics RAST server (MG-RAST) for analyzing shotgun metagenomes. *Cold Spring Harb Protoc* 2010:pdb.prot5368. doi:10.1101/pdb.prot5368
53. Lax S et al (2014) Longitudinal analysis of microbial interaction between humans and the indoor environment. *Science* 345:1048–1052. doi:10.1126/science.1254529
54. Maccaferri S, Biagi E, Brigidi P (2011) Metagenomics: key to human gut microbiota. *Dig Dis* 29:525–530. doi:10.1159/000332966
55. Moore AM, Munck C, Sommer MO, Dantas G (2011) Functional metagenomic investigations of the human intestinal microbiota. *Front Microbiol* 2:188. doi:10.3389/fmicb.2011.00188
56. Tasse L et al (2010) Functional metagenomics to mine the human gut microbiome for dietary fiber catabolic enzymes. *Genome Res* 20:1605–1612. doi:10.1101/gr.108332.110
57. Li J et al (2014) An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol* 32:834–841. doi:10.1038/nbt.2942
58. Nielsen HB et al (2014) Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes. *Nat Biotechnol* 32:822–828. doi:10.1038/nbt.2939
59. Westermann AJ et al (2016) Dual RNA-seq unveils noncoding RNA functions in host-pathogen interactions. *Nature* 529:496–501. doi:10.1038/nature16547
60. Westermann AJ, Gorski SA, Vogel J (2012) Dual RNA-seq of pathogen and host. *Nat Rev Microbiol* 10:618–630. doi:10.1038/nrmicro2852
61. Verberkmoes NC et al (2009) Shotgun metaproteomics of the human distal gut microbiota. *ISME J* 3:179–189. doi:10.1038/ismej.2008.108
62. Ong SE et al (2002) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 1:376–386
63. Prokhorova TA et al (2009) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) and quantitative comparison of the membrane proteomes of self-renewing and differentiating human embryonic stem cells. *Mol Cell Proteomics* 8:959–970. doi:10.1074/mcp.M800287-MCP200
64. Eiseman B, Silen W, Bascom GS, Kauvar AJ (1958) Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery* 44:854–859
65. van Nood E et al (2013) Duodenal infusion of donor feces for recurrent Clostridium difficile. *N Engl J Med* 368:407–415. doi:10.1056/NEJMoa1205037
66. Hagel S et al (2016) Fecal microbiota transplant in patients with recurrent Clostridium difficile infection. *Dtsch Arztebl Int* 113:583–589. doi:10.3238/arztebl.2016.0583
67. Kelly CR et al (2016) Effect of fecal microbiota transplantation on recurrence in multiply recurrent Clostridium difficile infection: a randomized trial. *Ann Intern Med* 165:609–616. doi:10.7326/M16-0271
68. Ott SJ, Waetzig GH, Rehman A, Moltzau-Anderson J, Bharti R, Grasis JA, Cassidy L, Tholey A, Fickenscher H, Seeger D, Rosenstiel P, Schreiber S (2016) Efficacy of Sterile Fecal Filtrate Transfer for Treating Patients With Clostridium difficile Infection. *Gastroenterology*. pii:S0016-5085(16):35354–35359. doi:10.1053/j.gastro.2016.11.010
69. Borody TJ, Khoruts A (2011) Fecal microbiota transplantation and emerging applications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9:88–96. doi:10.1038/nrgastro.2011.244
70. Colman RJ, Rubin DT (2014) Fecal microbiota transplantation as therapy for inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *J Crohns Colitis* 8:1569–1581. doi:10.1016/j.crohns.2014.08.006
71. Moayyedi P et al (2015) Fecal microbiota transplantation induces remission in patients with active ulcerative colitis in a randomized controlled trial. *Gastroenterology* 149(1):102–109.e6. doi:10.1053/j.gastro.2015.04.001
72. Smits LP, Bouter KE, de Vos WM, Borody TJ, Nieuwdorp M (2013) Therapeutic potential of fecal microbiota transplantation. *Gastroenterology* 145:946–953. doi:10.1053/j.gastro.2013.08.058
73. Schreiber S, Rosenstiel P, Albrecht M, Hampe J, Krawczak M (2005) Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease. *Nat Rev Genet* 6:376–388. doi:10.1038/nrg1607
74. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS (2010) Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol* 28:573–621. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101225
75. Swidsinski A et al (2002) Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122:44–54
76. Ott SJ, Musfeldt M, Ullmann U, Hampe J, Schreiber S (2004) Quantification of intestinal bacterial populations by real-time PCR with a universal primer set and minor groove binder probes: a global approach to the enteric flora. *J Clin Microbiol* 42:2566–2572. doi:10.1128/JCM.42.6.2566-2572.2004
77. Ott SJ et al (2004) Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* 53:685–693
78. Ott SJ et al (2008) Dynamics of the mucosa-associated flora in ulcerative colitis patients during remission and clinical relapse. *J Clin Microbiol* 46:3510–3513. doi:10.1128/JCM.01512-08
79. Sokol H et al (2006) Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 12:106–111
80. Gevers D et al (2014) The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell Host Microbe* 15:382–392. doi:10.1016/j.chom.2014.02.005
81. Rehman A et al (2015) Geographical patterns of the standing and active human gut microbiome in health and IBD. *Gut* 65(2):238–248. doi:10.1136/gutjnl-2014-308341
82. Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D (2014) The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology* 146:1489–1499. doi:10.1053/j.gastro.2014.02.009
83. Wang W et al (2015) Metagenomic analysis of microbiome in colon tissue from subjects with inflammatory bowel diseases reveals interplay of viruses and bacteria. *Inflamm Bowel Dis* 21:1419–1427. doi:10.1097/MIB.0000000000000344
84. Lepage P et al (2013) A metagenomic insight into our gut's microbiome. *Gut* 62:146–158. doi:10.1136/gutjnl-2011-301805
85. Greenblum S, Turnbaugh PJ, Borenstein E (2012) Metagenomic systems biology of the human gut microbiome reveals topological shifts associated with obesity and inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:594–599. doi:10.1073/pnas.1116053109
86. Adolph TE et al (2013) Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation. *Nature* 503:272–276. doi:10.1038/nature12599 (<http://www.nature.com/nature/journal/v503/n7475/abs/nature12599.html> – supplementary information)
87. Couturier-Maillard A et al (2013) NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer. *J Clin Invest* 123:700–711. doi:10.1172/JCI62236
88. Hashimoto T et al (2012) ACE2 links amino acid malnutrition to microbial ecology and intestinal inflammation. *Nature* 487:477–481. doi:10.1038/nature11228
89. Hasler R et al (2016) Uncoupling of mucosal gene regulation, mRNA splicing and adherent microbiota signatures in inflammatory bowel disease. *Gut*. doi:10.1136/gutjnl-2016-311651

Hier steht eine Anzeige.

