

Aus der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Arndt Borkhardt

**Analyse des oralen Mikrobioms
stammzelltransplantierter Patienten im Verlauf**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Christin Albrecht

2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Arndt Borkhardt

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Guido Kobbe

Für meine Familie

Zusammenfassung

Der menschliche Organismus benötigt die mikrobielle Kolonisation für lebenswichtige physiologische Prozesse, wie Bildung und Funktion des Immunsystems. Änderungen innerhalb dieser Symbiose sind als Pathogenitätsfaktor komplexer Autoimmunreaktionen beschrieben und haben in diesem Zusammenhang Bedeutung für die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (alloHSZT).

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines molekulargenetischen Verfahrens unter Nutzung von zwei Sequenziermethoden zur Charakterisierung des oralen Mikrobioms von Patienten mit malignen hämatologischen Grunderkrankungen. Dafür wurde Material des lateralen Zungenrandes von zwei Patienten im Langzeitverlauf sowie das der entsprechenden Spender vor dem Hintergrund erhobener Metadaten analysiert.

Dabei entsprachen die im Spendermikrobiom nachgewiesenen Gattungen der physiologischen Komposition des oralen Mikrobioms der Zunge gesunder Probanden. Die Ergebnisse der Verlaufsuntersuchungen der beiden stammzelltransplantierten Patienten zeigten eine Regeneration des zuvor im Rahmen der Chemotherapie und Konditionierung reduzierten Mikrobioms. So erhöhte sich die initial zum Zeitpunkt vor alloHSZT bei beiden Patienten nachgewiesene geringe Anzahl an Gattungen 90 bzw. 120 Tage nach Transplantation auf maximale Werte. Hinsichtlich des Vergleichs beider Sequenziermethoden zeigten sich im Wesentlichen Gemeinsamkeiten aber auch Unterschiede in den Ergebnissen zu Vorkommen und Häufigkeit einzelner Gattungen.

Gegenwärtig werden diese Daten anhand größerer Patientenkohorten und mittels spezifischer bioinformatischer Diversitäts- und *cluster*-Analysen validiert, die differenziertere Aussagen zu Muster und Kinetik des oralen Mikrobioms unter alloHSZT und Rückschlüsse bezüglich typischer Komplikationen wie Sepsis, *graft versus host disease*, Mukositis und Abstoßung erlauben werden. Solche Untersuchungen sind notwendig, um die Relevanz der mikrobiellen Komposition als prognostischer und diagnostischer Marker genauer zu evaluieren.

Summary

For performing of life-essential physiological processes the human organism requires microbiological colonization – such as build up and functioning of the immune system. Any changes in this symbiosis are well known as pathogenic factors for complex immune reactions and have in this context crucial effects on the allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloHSCT).

The main goal of this dissertation has been to establish a molecular genetic procedure for a microbiome characterization of patients suffering from malignant hematopoietic disease during the course of alloHSCT. To this end two different next-generation-sequencing methods were compared. In a longitudinal study, bacterial swabs were taken and the microbiome analyzed from the lateral tongues of two patients and their corresponding healthy donors. The data were subsequently integrated with clinical metadata of the patients.

The identified genera in the donor's microbiome showed a similar physiological composition as previously described for healthy probands. The results from this laboratory survey of the two stem cell transplanted patients sustain previous studies that have shown a regeneration of a decreased microbiome previously treated with chemotherapy and conditioning regimen. Compared to the initial starting point prior to alloHSCT the two patients' low number of proven genera have been detected first raising to a maximum of the taxonomic order at day 90 respectively day 120 post alloHSCT. In a direct comparison of the two sequencing methods the occurrence and total number of certain genera in the same samples differed.

By using larger patient cohorts in current studies a validation of these data might be achieved. For this purpose bio-informatory diversity and cluster analyses will be applied. Possible conclusions may be drawn from differential analyses regarding patterns and kinetic of the lateral tongue oral microbiome under alloHSCT for typical complications such as sepsis, graft versus host disease, mucositis or graft rejection. With this the microbial composition would have a major impact as prognostic and diagnostic marker.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
ADP	Adenosindiphosphat
alloHSZT	allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Adenosinphosphosulphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar
C	Cytosin
CCD	engl. <i>charge-coupled device</i>
CSA	Ciclosporin A
dAp	Desoxyadenosinmonophosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
dNMP	Desoxynukleosidmonophosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxytyrosintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
emPCR	Emulsion-Polymerasekettenreaktion
G	Guanin
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (engl. <i>granulocyte-colony stimulating factor</i>)
GI GvHD	gastrointestinale Transplantat-gegen-Wirt-Krankheit (engl. <i>gastrointestinal graft versus host disease</i>)
GIT	Gastrointestinaltrakt
GvHD	Transplantat-gegen-Wirt-Krankheit (engl. <i>graft versus host disease</i>)
HEPA	Hochleistungs-Partikelfilter (engl. <i>high-efficiency particulate arrestance</i>)
HGP	Humangenomprojekt
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HMP	Humanmikrobiomprojekt
IgA	Immunglobulin A
KMT	Knochenmarktransplantation
MID	<i>multiplexing identifiers</i>
MMF	Mycofenolat-Mofetil
MSD	engl. <i>matched sibling donors</i>
MTX	Methotrexat
NOD1	engl. <i>nucleotide-binding oligomerization domain containing 1</i>
OTU	engl. <i>operational taxonomic unit</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
Pi	anorganisches Phosphat
PPi	anorganisches Pyrophosphat

PTP	PicoTiter Platte
QIIME	engl. <i>Quantitative Insights Into Microbial Ecology</i>
RNS	Ribonukleinsäure
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
SBS	engl. <i>sequencing by synthesis</i>
SFB	segmentierte filamentöse Bakterien
T	Tyrosin
TLRs	<i>toll-like</i> -Rezeptor
WHO	World Health Organisation

SI-Einheiten

°C	Grad Celsius
d	Tag
g	Gramm
GB	Gigabyte
Gy	Gray
kb	Kilobase
kg	Kilogramm
m²	Quadratmeter
MB	Megabyte
mg	Milligramm
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimol
mU	Milliunit
S	Sekunde
S	Svedberg
U	Unit
V	Volt

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary.....	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Vom Humangenomprojekt zum Humanmikrobiomprojekt.....	1
1.2 Entwicklung der Untersuchung des humanen Mikrobioms.....	3
1.3 Analyse des oralen Mikrobioms	6
1.4 Behandlung durch hämatopoetische Stammzelltransplantation – latrogene Störung der Mikroökologie	10
1.5 Zielsetzung der Arbeit	17
2 Material und Methoden.....	18
2.1 Material.....	18
2.1.1 Chemikalien und Enzyme	18
2.1.2 Laborgeräte	18
2.1.3 Oligonukleotide	18
2.2 Methode.....	19
2.2.1 Einverständniserklärung und Ethikvotum.....	19
2.2.2 Projektübersicht	19
2.2.3 Patientenkohorte und Charakterisierung	21
2.2.4 Studienart.....	21
2.2.5 Probengewinnung.....	21
2.2.6 DNS-Isolierung	23
2.3 Roche/454-Sequenzierung	23
2.3.1 Amplifikation und Erstellung der DNS-Bibliothek	23
2.3.2 Aufreinigung des PCR-Produkts.....	26
2.3.3 Agilent DNA 1000 Assay zur Analyse des PCR-Produkts	26
2.3.4 DNS-Quantifizierung	27
2.3.5 Emulsion-PCR-Amplifikation	27
2.3.6 Pyrosequenzierung	28
2.3.7 Bioinformatische Auswertung.....	31
2.4 Illumina-Sequenzierung	31
2.4.1 Amplifikation der 16S rRNS.....	31
2.4.2 Aufreinigung des PCR-Produkts.....	33
2.4.3 Agilent DNA 1000 Assay zur Analyse des PCR-Produkts	33
2.4.4 Index-PCR	33
2.4.5 DNS-Quantifizierung	34
2.4.6 <i>Bridge</i> -Amplifikation und SBS	34
2.4.7 Bioinformatische Auswertung.....	35
3 Ergebnisse	36
3.1 Überblick	36
3.1.1 Übersicht über die Darstellung der Ergebnisse	36
3.1.2 Charakterisierung des Probenausgangsmaterials	37
3.2 Ergebnisse der Roche/454-Sequenzierung mittels QIIME	39
3.3 Analyse der Illumina HiSeq 2500-Sequenzierungsergebnisse mittels QIIME.....	43
3.4 Vergleich der Sequenzierergebnisse mit Roche/454 FLX Titanium- sowie Illumina HiSeq 2500-Plattform.....	53

4	Diskussion.....	58
4.1	Wahl der Sequenzierungsplattform.....	58
4.2	Entwicklung des Mikrobioms bei Kindern.....	60
4.3	Das physiologische Mikrobiom der Zunge beim Erwachsenen	61
4.4	Vergleich der unterschiedlichen Sequenziermethoden	63
4.5	Iatrogene Störungen des oralen Mikrobioms	66
4.6	Schlussfolgerungen und Ausblick	72
	Literaturverzeichnis.....	73
	Abbildungsverzeichnis.....	82
	Tabellenverzeichnis	82
	Anhang.....	83

1 Einleitung

1.1 Vom Humangenomprojekt zum Humanmikrobiomprojekt

Das menschliche Genom bezeichnet die in der Abfolge der Basensequenz der Desoxyribonukleinsäure (DNS) gespeicherte Gesamtheit der genetischen Information eines Menschen und ermöglicht nach Ermittlung dieser die Aufschlüsselung der menschlichen Gene sowie anschließend der daraus entstehenden Genprodukte. Dadurch können wesentliche zellbiologische, biochemische und medizinische Erkenntnisse sowohl hinsichtlich physiologischer als auch pathophysiologischer Mechanismen gewonnen werden.

Um dies zu verwirklichen wurde das Humangenomprojekt (HGP) entwickelt, das die Sequenzierung und Bereitstellung des kompletten humanen Genoms als freie, wissenschaftliche Ressource zum Ziel hatte. Eng damit verbunden war auch das Streben nach einem kontinuierlichen Fortschritt der Sequenzieretechnologie und bioinformatischen Aufarbeitung. Weiterhin standen die Variationen des menschlichen Genoms – insbesondere der kodierenden Bereiche – im Fokus des Projekts sowie die Interpretation der Funktion der DNS auf Basis des vollständig bekannten humanen Genoms. Die kritische Auseinandersetzung mit der ethischen, rechtlichen und sozialen Tragweite der gewonnenen Erkenntnisse und Anwendungen stellte ebenfalls ein Kernthema des HGP dar (1).

Innerhalb einer Zeitspanne von 1990 bis 2003 konnte so das erste Beispiel eines kompletten menschlichen Genoms bestehend aus drei Milliarden Basenpaaren (bp) und ca. 20.000 bis 25.000 für Proteine kodierenden Gene sequenziert und die Genorte lokalisiert werden (2).

Das Wissen, dass die Funktionsweise des menschlichen Organismus nicht isoliert betrachtet werden kann und darf, sondern sich dieser vielmehr als menschlicher Supraorganismus darstellt, legte den Grundstein für das sich anschließende Großprojekt der Entschlüsselung des humanen Mikrobioms als Gesamtheit aller den Menschen besiedelnden Kommensalen (3).

Die Gesamtheit aller mikrobiellen Gene innerhalb des humanen Habitats – zusammengefasst unter dem Begriff Metagenom – liegt bei über zwei Millionen Genen (3). Dessen Erforschung sowie die darüber hinaus reichende funktionelle Untersuchung des Metaproteoms und Metaboloms als Summe aller Proteine und Stoffwechselprodukte kann weitere wichtige Forschungserkenntnisse liefern (4).

Die Myriade mikrobieller Zellen – vornehmlich im Gastrointestinaltrakt (GIT) lokalisiert (5) – die den menschlichen Körper besiedelt, ist Gegenstand des Humanmikrobiomprojekts (HMP) (6). Diese Vielfalt der Mikroben setzt sich dabei zu einem überwiegenden Bestandteil aus Bakterien, aber auch aus Eukaryonten, Archaeen und Viren zusammen (7). Dies legte den Grundstein für das internationale Summations-Projekt zur Aufarbeitung des humanen Metagenoms als Gesamtheit der mikrobiellen Geninformation der auf und innerhalb des menschlichen Organismus lebenden Mikrobiota (8). Das HMP soll Aufklärung über die Zusammensetzung und Funktion des humanen Mikrobioms sowie dessen Einfluss auf die Aufrechterhaltung der Gesundheit und die Entstehung von Krankheiten verschaffen (9).

Der Begriff des Mikrobioms wurde von Joshua Lederberg geprägt, der bereits früh den gesundheitsfördernden Aspekt der ungestörten Zusammensetzung des habitatspezifischen humanen Mikrobioms betonte und darüber hinaus auch die prädiktive Bedeutung krankheitsprädisponierender Variationen erkannte (10).

Das humane Mikrobiom zeigt dabei eine enorme interindividuelle sowie intraindividuelle Varianz der physiologischen Standortflora (11, 12).

Der menschliche Organismus benötigt die, überwiegend im GIT lokalisierte, bakterielle Kolonisation zur Durchführung lebenswichtiger physiologischer Prozesse. Hierzu gehören beispielsweise die Aufarbeitung der Nahrung (13), die Entwicklung und Aufrechterhaltung des Immunsystems (14), die Aufrechterhaltung der epithelialen Homöostase (15) und die Defensive vor Pathogenen (16). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein physiologisches, frühkindliches, gastrointestinales Mikrobiom über *second messenger pathways* und synaptische Langzeit-Potenzierung Einfluss zu haben scheint auf die Ausbildung neuronaler Schaltkreise, die die Entwicklung

einzelner Hirnregionen bestimmen und phänotypische Verhaltensmuster beeinflussen (17).

1.2 Entwicklung der Untersuchung des humanen Mikrobioms

Jahrhundertlang war die Identifikation von Mikroorganismen abhängig von der Kultivierung sowie Isolation einzelner Kolonien mit anschließender mikroskopischer Betrachtung der Morphologie, Aufarbeitung durch Verwendung verschiedener Färbemethoden und biochemischer Untersuchungen. Folglich bestand hinsichtlich der Beurteilung der Diversität eines Mikrobioms eine signifikante Verzerrung, da schwer kultivierbare Mikroorganismen, bei denen beispielsweise besondere Anforderungen an das jeweilige Habitat bestehen, nicht detektiert wurden. Dazu gehört das Angebot bestimmter Makroelemente wie Kohlenstoff, Stickstoff und Schwefel sowie Spurenelemente, die dem Nährmedium hinzugesetzt werden müssen. Energiequellen zur Synthese von Adenosintriphosphat (ATP) wie Licht oder andere chemische Reaktionen sind ebenfalls nötig. Die Reaktionen können dabei sauerstoffabhängig oder sauerstoffunabhängig ablaufen. Darüber hinaus sind Bebrütungstemperatur und Wasserstoffionenkonzentrationen im Nährmedium ebenfalls von grundlegender Bedeutung (18).

Die Kenntnisse über all diese Parameter bestimmen die anspruchsvolle Kultivierung von Mikroorganismen *in vitro* und begründen deren Schwierigkeiten. So beschrieben beispielsweise Dewhirst *et al.* bis zu ein Drittel der oralen Phylotypen als noch nicht kultivierbar (19). Phylotypen weisen eine Übereinstimmung von 97-98% hinsichtlich phylogenetischer Marker – wie die ribosomale Ribonukleinsäure (rRNS) – auf. Unter Verwendung von DNS-Sequenzierungsmethoden bestand damit innerhalb der Phylogenetik eine häufig angewandte Möglichkeit, entschlüsseltes Probenmaterial hinsichtlich übereinstimmender Basensequenzen gleichen Spezies oder monophyletischen Gruppen zuzuordnen. Die häufig nach bioinformatischer Analyse bestimmten *operational taxonomic units* (OTU) sind hierbei gleichzustellen mit den oben beschriebenen Phylotypen und entsprechen in ihrer gemeinsamen Zuordnung der Spezies-Zugehörigkeit (20, 21).

Die Etablierung kulturunabhängiger, molekularbiologischer Verfahren zur genetischen Identifizierung und Differenzierung, wie der Polymerasekettenreaktion (PCR) und ihrer Varianten, der *multiplex*-PCR und *real-time*-PCR, denaturierende Gradientengelelektrophorese, Hybridisierungsverfahren und *microarrays*, ermöglichte die Untersuchung komplexer mikroökologischer Habitate. Mit Etablierung und Fortschritt der Gensequenzierung für die 16S rRNS, deren Grundstein durch Woese *et al.* in den 1970er Jahren gelegt wurde (22, 23), gelang es ein genaueres Bild der Biogeographie der bakteriellen Gemeinschaft des menschlichen Körpers zu erhalten sowie Aufschluss über eine der großen Fragestellungen zu gewinnen: Gibt es ein zu definierendes interindividuelles humanes Kernmikrobiom, das sich für den Zustand des Gesunden beschreiben lässt (3)?

Am gebräuchlichsten stellte sich initial die Betrachtung der 5S und anschließend der 16S rRNS für die Erstellung von Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Prokaryoten dar (24).

Pace *et al.* schufen Mitte der 1980er Jahre mit ihren Studien zur Untersuchung der 5S rRNS zur mikrobiellen Detektion sowie deren anschließende phylogenetische Einordnung die Grundlage für derartige Untersuchungen (25-27). Allerdings erwies sich die Verwendung der 16S rRNS – erstmals etabliert durch Woese *et al.* – als besser geeignet sowohl zur molekularen Erregeridentifizierung als auch zur eindeutigen Zuordnung von Prokaryoten (28-31). Pace *et al.* beschrieben ebenfalls den deutlich geringeren Informationsgehalt der 5S rRNS und die daraus resultierende Unzulänglichkeit deren Verwendung zur Charakterisierung komplexerer Populationen (24).

Demnach bildet die Sequenzanalyse des 16S rRNS-Gens seit über 30 Jahren die Grundlage für die Identifikation und Differenzierung komplexer Mikrobiome.

Ribosomen – bestehend aus rRNS und Proteinen – stellen sowohl in eukaryotischen als auch prokaryotischen Lebensformen den Ort der Proteinbiosynthese dar. Beschrieben wird die rRNS nach ihren Sedimentationsraten in der Einheit Svedberg (S). Abb. 1 zeigt hierbei den schematischen Aufbau eines prokaryotischen 70S-Ribosoms und die Verwendung der 16S rRNS zur Gensequenzierung mit anschließender mikrobieller Identifikation und Differenzierung (32).

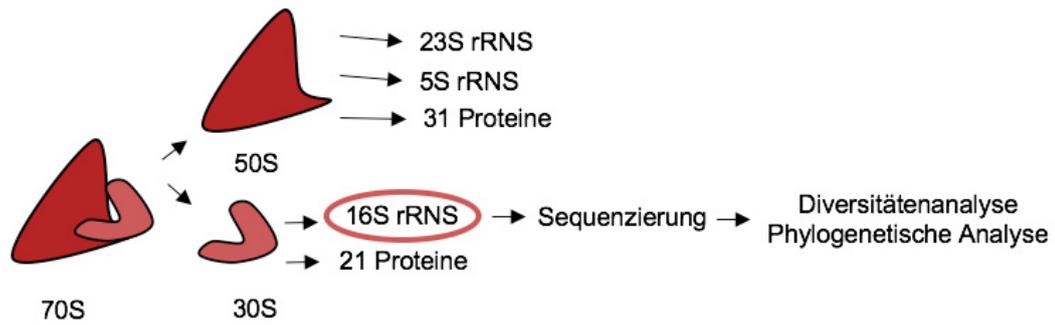


Abb. 1: Schematischer Aufbau des prokaryotischen 70S-Ribosoms und Darstellung der Verwendung der 16S rRNA-Gensequenzierung.

Prokaryotische 70S-Ribosomen bestehen aus jeweils einer 50S- und 30S-Untereinheit. Die 50S-Untereinheit setzt sich zusammen aus 23S und 5S rRNA sowie 31 ribosomalen Proteinen. Die 30S-Untereinheit wird gebildet von der 16S rRNA sowie 21 ribosomalen Proteinen. Die Sequenzierung des 16S rRNA-Gens ermöglicht unter anderem im Rahmen bioinformatischer Analysen Untersuchungen zur Phylogenetik und Diversität.

Abb. 2 zeigt den schematischen Aufbau des 16S rRNA-Gens am Beispiel von *Escherichia coli* (*E. coli*). Dieses besteht zum einen aus hoch konservierten Regionen, die essentiell für die Funktion der Ribosomen sind und in der Regel bei allen Prokaryoten eine sehr ähnliche Abfolge der Basensequenz enthalten. Zum anderen sind variable Regionen vorhanden, deren Varianz in der Basensequenz Ausdruck stattgefundenener Mutationen ist. Die Anzahl dieser Mutationen ist dabei proportional zum zeitlichen Abstand, der der entwicklungsgeschichtlichen Trennung verwandter Arten zugrunde liegt. Diese Annahme bildet die Grundlage für die Verwendung prokaryotischer 16S rRNA zur Detektion und phylogenetischen Untersuchung mikrobiotischer Gemeinschaften (24, 31).

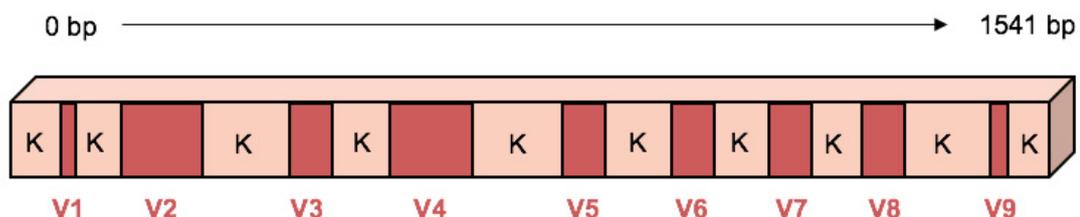


Abb. 2: Aufbau eines prokaryotischen 16S rRNA-Gens am Beispiel von *E. coli*.

Dies setzt sich aus 9 hypervariablen Regionen (V1-9) zusammen, jeweils flankiert von hochkonservierten Genabschnitten (K). Insgesamt besteht das 16S rRNA-Gen der bakteriellen Spezies *E. coli* aus 1541 bp.

Einhergehend mit der Entwicklung zeit- und kostensparender kulturunabhängiger DNS-Sequenzieretechniken sowie der schnelleren bioinformatischen Aufarbeitung der Ergebnisse – die auch schon die Basis für die Durchführung des HGP darstellten – war es möglich ein Studiendesign zu etablieren, welches erstmals innerhalb einer großangelegten klinischen Studie die Evaluierung des menschlichen Mikrobioms im Zentrum hatte (3, 7, 33, 34).

1.3 Analyse des oralen Mikrobioms

Leeuwenhoek beschrieb bereits 1683 mittels lichtmikroskopischer Untersuchung des eigenen Zahnbelags die kommensale Mundflora und schuf damit die erste dokumentierte Aufzeichnung zur Betrachtung des oralen Mikrobioms (zit. nach 35).

Im Zuge dynamischer Entwicklungen der Untersuchungsmethoden wurde es möglich, das humane orale Mikrobiom – im Vergleich zu anderen Habitaten wie Haut oder Vagina – mit einer der höchsten Diversitäten von mindestens 700 Spezies zu beschreiben (11, 12).

Costello *et al.* zeigten, dass die mikrobielle Gemeinschaft der Mundhöhle zwischen allen betrachteten Probanden und Habitaten die geringste intra- und interindividuelle Varianz besitzt. Dahingegen zeigt die gastrointestinale Flora eine hohe interindividuelle bei jedoch geringer intraindividuelle Varianz im zeitlichen Verlauf (12). Abb. 3 zeigt hierbei vergleichend die mikrobielle Diversität einzelner anatomischer Habitate auf Phylumebene.

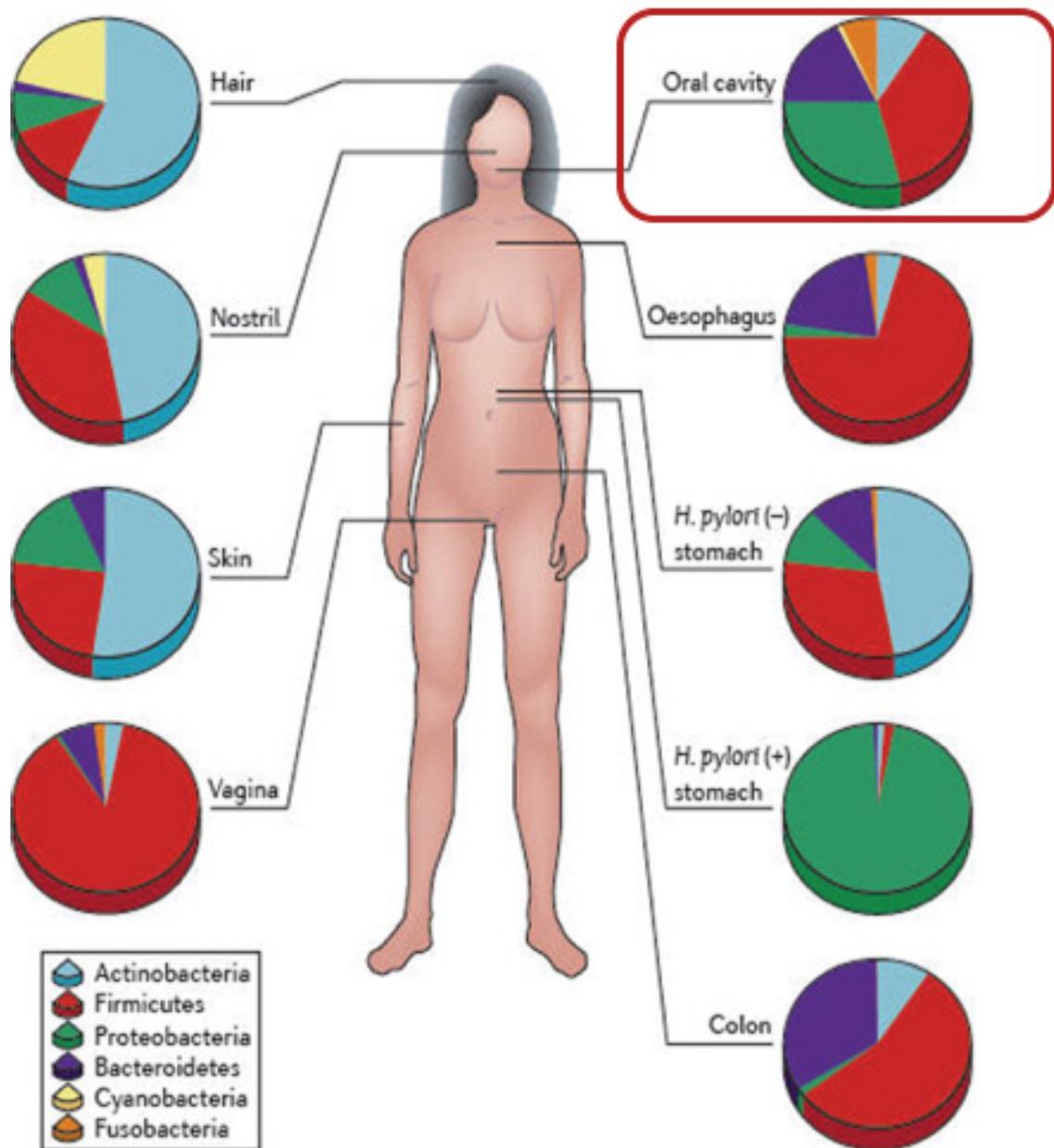


Abb. 3: Mikrobielle Diversität einzelner anatomischer Habitate auf Phylumebene.

Hervorgehoben ist die physiologische Zusammensetzung des Mikrobioms der Mundhöhle, die auf Phylumebene die größte Diversität aufweist, überwiegend bestehend aus *Firmicutes*, *Proteobacteriae* sowie je nach betrachteter oropharyngealer Oberfläche *Bacteroidetes*, *Actinobacteriae*, *Fusobacteriae* und *Cyanobacteriae*. Modifiziert nach (36).

Bestätigt wurden diese Analysen durch weitere Studien, die ergänzend dazu das orale Kern-Mikrobiom beschrieben. Die Aussagen basieren auf Untersuchungen zur Alpha- und Beta-Diversität. Dabei stellt die Alpha-Diversität, auch Punktdiversität genannt, die Vielfalt innerhalb einer Probe dar, ohne dabei die absolute Individuenanzahl zu berücksichtigen. Der durch Whittaker zuerst beschriebene Begriff der Beta-Diversität hingegen beschreibt die Vielfalt zwischen verschiedenen Lebensgemeinschaften, die räumlich innerhalb einer Region lokalisiert sind (37, 38). Im Rahmen dessen besitzen die analysierten Speichelproben die höchste Alpha-Diversität (11).

Segata *et al.* beschrieben innerhalb verschiedener untersuchter Habitate des Oropharynx, wie z.B. Wangenschleimhaut, Rachen, harter und weicher Gaumen, Zungenrücken, Speichel sowie Stuhlproben, eine Gesamtdominanz des Phylums *Firmicutes*/Genus *Streptococcus*. Bei der weiteren Differenzierung auf Gattungsebene zeigte sich jedoch innerhalb der oropharyngealen Loci eine unterschiedliche mikrobielle Zusammensetzung. So folgte beispielsweise innerhalb der Wangenschleimhaut/harter Gaumen/verhornte Gingiva dem überragenden *Streptococcus*-Anteil (Phylum *Firmicutes*) auf Phylumebene *Proteobacteriae* sowie *Bacteroidetes*. Bei der Untersuchung des Zungenrückens, Speichels sowie der Tonsillen und der Rachenrückwand ergab sich allerdings im Vergleich zur Gruppe der vorher genannten Loci eine deutliche Verminderung des Anteils der *Firmicutes* bei gleichzeitigem Anstieg der *Proteobacteriae*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteriae* sowie *Fusobacteriae* (39). Diese Analysen bestätigen und ergänzen vorangegangene Untersuchungen der Zusammensetzung des oralen Mikrobioms durch Mager *et al.*, welche ebenso Hinweise darauf lieferten, dass entsprechende Unterschiede in der Beschaffenheit der oralen Oberfläche – beispielsweise hartes versus weiches Gewebe – mit einem dementsprechenden mikrobiellen Tropismus einhergehen (40). Dieser beruht unter anderem, vorbeschrieben durch Gibbons *et al.*, auf der Ausbildung von Adhäsinen auf der mikrobiellen Oberfläche und bildet damit die Basis für die entsprechende Kolonisation durch Rezeptorbindung auf der Gewebeoberfläche (40, 41).

Eingehend auf das in allen oropharyngealen Habitaten dominierende Genus *Streptococcus* sind hierbei beispielsweise bei Untersuchungen durch Aas *et al.* bis zu elf verschiedene Spezies mit unterschiedlichen Häufigkeitsmustern

innerhalb der Abstriche des Zungenrückens detektiert worden (42). Weitere Analysen zeigen Stammes-spezifische Eigenschaften metabolischer Funktionen mit funktioneller Differenzierung. Diese können durch den herrschenden Selektionsdruck innerhalb einzelner Habitats erklärt werden, der diese Differenzierung erforderlich macht. Des Weiteren werden Anhaltspunkte für viele ubiquitäre Kern-Stoffwechselwege beschrieben, die auch unterschiedliche Habitats verschiedener Individuen miteinander teilen. Diese sind in grundlegende Prozesse involviert, wie Proteinbiosynthese, ATP-Synthese oder Glykolyse. Demgegenüber stehen hoch variable – insbesondere für den Bereich der Mundhöhle beschriebene – Stoffwechselwege.

So zeigen Phosphat-, Mono-, Disaccharid und Aminosäuretransporter sowie die Lipopolysaccharid-Biosynthese eine hohe inter- und intraindividuelle Streubreite (11). Die Arbeiten des HMP-Konsortiums haben, als Basis für alle folgenden Fragestellungen, die umfassende Beschreibung des gesunden Kern-Mikrobioms als Ziel formuliert und über weite Teile erfasst. Darauf aufbauend können im Zustand des Dysäquilibriums der oropharyngealen mikrobiellen Komposition Rückschlüsse auf die Pathogenese lokaler und systemischer Erkrankungen gezogen werden.

Das Vorhandensein einiger Spezies führt zum Ungleichgewicht mit krankheitsprädisponierender Wirkung. So löst *Streptococcus mutans* Caries und *Porphyromonas gingivalis* nicht nur Periodontitis (43) aus, sondern scheint Einfluss zu haben auf die Entwicklung chronischer Systemerkrankungen, wie beispielsweise der rheumatoiden Arthritis (44) oder maligner Erkrankungen des Verdauungssystems wie Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle (45) und Pankreas-Karzinomen (46). Des Weiteren korreliert das Leiden an Periodontitis mit der Initiation von Diabetes mellitus Typ 1 und 2 (47-49), dem Progress kardiovaskulärer Erkrankungen wie Atherosklerose (50), myokardialer (51, 52) und zerebraler Ischämien (53) sowie mit pulmonalen Erkrankungen (54). Darüber hinaus sind ebenfalls geburtshilfliche Komplikationen wie vorzeitige Entbindung und ein niedriges Geburtsgewicht (54) mit dieser Erkrankung assoziiert.

Daraus ergibt sich die Fragestellung, inwiefern die Dysbiose des oralen Mikrobioms in Zukunft als prognostischer Marker für Erkrankungen der Mundhöhle dienen kann und darüber hinaus Informationen über die

Entwicklung systemischer Erkrankungen liefert. Das Mikrobiom besitzt in veränderter Komposition nicht nur Bedeutung als Pathogenitätsfaktor bzw. Auslöser komplexer Autoimmunreaktionen, sondern ermöglicht die Bildung und Aufrechterhaltung des Immunsystems, mit besonderer Bedeutung für die hämatopoetische Stammzelltransplantation (55).

1.4 Behandlung durch hämatopoetische Stammzelltransplantation – Iatrogene Störung der Mikroökologie

Für unterschiedliche maligne Erkrankungen des hämatopoetischen Systems stellt die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (alloHSZT) nach initialer Chemo- oder Radiotherapie mit anschließendem Rezidiv oftmals den einzig kurativen Ansatz dar.

Im Vorfeld einer alloHSZT werden die Patienten – wie in Abb. 4 dargestellt – im Rahmen der Konditionierung mittels Hochdosis-Chemotherapie oder Kombination aus Ganzkörperbestrahlung und Chemotherapie behandelt. Das jeweilige Konditionierungsregime, dessen Intensität unter anderem abhängig ist von Alter, Mortalitätsrisiko, Komorbiditäten, Rezidiv-Risiko sowie Remissionsstatus vor Stammzelltransplantation hat zum Ziel, dass im Rahmen der Regenerationsphase zum einen eine erfolgreiche Immunsuppression des Empfängers stattfinden kann, die es den transplantierten Stammzellen ermöglicht, sich im Empfänger-Knochenmark anzusiedeln. Zum anderen wird durch die Myeloablation die komplette Ausbreitung der spendereigenen Hämatopoese ermöglicht, sowie die Eliminierung der malignen Zellen durch den antileukämischen Effekt (56).

Im zeitlichen Verlauf zeigt sich während der Konditionierung eine deutliche Suppression der Hämatopoese, die dann während der sog. Aplasie bis ca. 3 Wochen nach alloHSZT zum Erliegen kommt. Anschließend folgt die Regeneration der Hämatopoese, die je nach Therapieverlauf ab Tag +30 nach alloHSZT in die Rekonstitution übergeht (57).

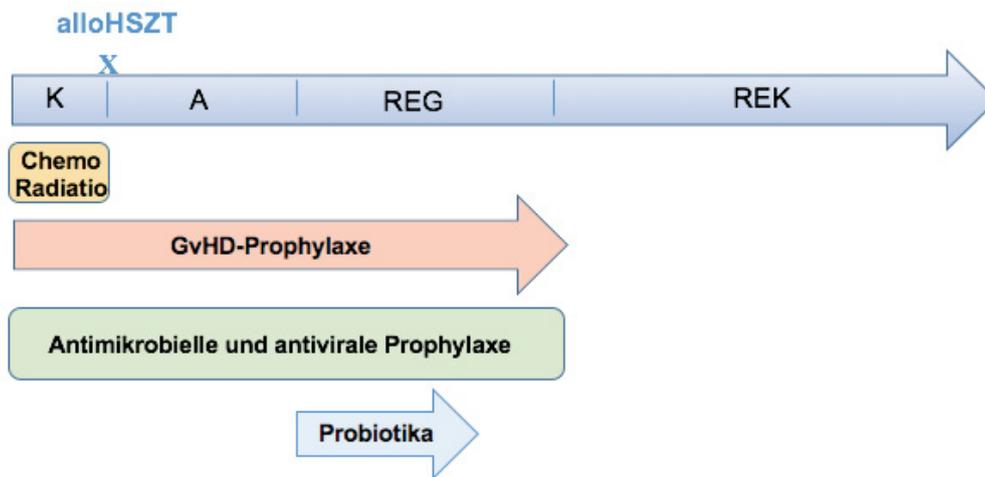


Abb. 4: Übersicht über den Therapieverlauf bei allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation (alloHSZT).

Dargestellt sind die Behandlungen während unterschiedlicher Phasen der alloHSZT. Die vier Phasen der Therapie umfassen Konditionierung (K), Aplasie (A), Regeneration (REG) und Rekonstitution (REK). Im Vorfeld der alloHSZT findet die Konditionierung mit Chemo- und/oder Strahlentherapie (gelber Kasten) statt. Ebenfalls findet die supportive Therapie mit antimikrobiellen sowie antiviralen (grüner Kasten) Medikamenten statt. Die Prophylaxe (roter Pfeil) der Transplantat-gegen-Wirt-Krankheit (engl. *graft versus host disease*, GvHD) wird ebenso wie die zuvor beschriebene medikamentöse Prophylaxe bis zur immunologischen Rekonstruktion gegeben.

Die supportive Behandlung der Patienten umfasst neben der Gabe von Blutprodukten und Antiemetika auch die antiinfektiöse Prophylaxe. Dazu gehört zum einen hinsichtlich der Vermeidung bakterieller Infektionen die Gabe von Metronidazol und Ciprofloxacin sowie die antivirale bzw. antimykotische medikamentöse Prophylaxe. In der Phase der Aplasie erfolgt die Unterbringung in sterilen Patientenzimmern. Initial nach alloHSZT erfolgt eine parenterale Ernährung, der sich ein langsamer Kostaufbau mit keimarmer Nahrung anschließt. Die Gabe der Immunsuppressiva erfolgt in Form von Ciclosporin A (CSA) und Methotrexat (MTX) bzw. Mycophenolat-Mofetil (MMF) in der Regel bis zur immunologischen Rekonstitution. Bis zu diesem Zeitpunkt wird auch die antivirale sowie antimikrobielle medikamentöse Prophylaxe fortgeführt.

Grundsätzlich kommen im Rahmen der alloHSZT sowohl verwandte als auch nichtverwandte Spender in Frage. Die Suchstrategie erfolgt anhand der Gewebetypisierung des Humanen Leukozyten-Antigen-Komplexes (HLA-Komplexes) des Empfängers mittels serologischer und molekularbiologischer Techniken. Die HLA-Merkmale umfassen Oberflächenstrukturen, die jede Körperzelle exprimiert und welche endo- oder exogene Peptidantigene

darstellen, die die körpereigene Abwehr aktivieren. Sie sind damit wesentlich an der Initiierung von Transplantatabstoßungsreaktionen und der Transplantat-gegen-Wirt-Krankheit (GvHD, *engl. graft versus host disease*) beteiligt. Die HLA-Allele befinden sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 und werden kodominant vererbt (58).

Hämatopoetische Stammzellen des Knochenmarks werden via steriler Beckenkammpunktion unter Vollnarkose beim Spender entnommen. Alternativ zur Knochenmarktransplantation (KMT) und inzwischen aufgrund der Vorteile weit verbreitet ist die Entnahme von in der Peripherie zirkulierenden Blutstammzellen. Dabei wird nach Gabe von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise dem Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF), die Mobilisierung der CD34⁺-Blutstammzellen innerhalb weniger Tage gefördert und im Rahmen der Stammzellapherese ähnlich dem Vorgang der ambulanten Blutspende über eine periphere Venenverweilkanüle entnommen. Hierdurch entfallen für den Spender die aufwendigere und potenziell komplikationsreichere stationäre Knochenmarkpunktion unter Narkose. Alternativ steht neben diesen beiden Verfahren mit der Verwendung von Nabelschnurblut noch eine dritte Möglichkeit zur Verfügung (59).

Die Konditionierung der Patienten greift mittels Radio-/Chemotherapie, Behandlung mit Immunsuppressiva, Veränderung der Umweltbedingungen durch Hospitalisierung bzw. Isolierung mit gefilterter Luft mittels Hochleistungs-Partikelfilter (*engl. high-efficiency particulate arrestance, HEPA*), Ernährungsrestriktion sowie der anschließenden Stammzelltransplantation grundlegend in die Funktionsweise des Immunsystems ein. Da das Immunsystem und das humane Mikrobiom vielfach in reziproker Interaktion stehen und sich gegenseitig formen und reifen lassen, hat diese Form der Behandlung sowie deren Nebenwirkungen auch Einfluss auf die kommensale mikrobielle Gemeinschaft sowie deren Metabolismus. Zusammen mit der additiven Infektionsprophylaxe mittels Antibiotika, Antimykotika und Virustatika kommt es zu einer Verschiebung des Mikrobioms und so zur nachgewiesenen kompositionellen Dysbiose mit metabolischem Ungleichgewicht des Gastrointestinaltrakts. Nach alloHSZT kann somit die Gesamt-Diversität halbiert sein, wobei einzelne Taxone überwiegen können (60). Dethlefsen *et al.*

beschrieben die Abnahme der gastrointestinalen Artenvielfalt nach Ciprofloxacin-Einnahme und eine überwiegende Wiederherstellung der ursprünglichen Zusammensetzung vier Wochen nach Beendigung der Therapie. Zum Teil bewirkte der Effekt des Antibiotikums für einige Taxone auch eine mehrmonatige Unterdrückung (61). Begründet ist diese in der Schädigung der Haut- und Schleimhautoberflächen, die sowohl das Habitat für die natürliche kommensale Mikroflora bilden, als auch als physiologische Barriere für fakultativ oder obligat pathogene Keime dienen. Die überwiegend aus der myeloablativen Chemotherapie resultierende gastrointestinale Mukositis führt ebenso zu einer Verschiebung der mikrobiellen Komposition sowie Änderungen im funktionellen Metabolismus (62). Van der Waaij *et al.* beschrieben dabei 1971 erstmals mit dem Begriff der Kolonisations-Resistenz den protektiven Effekt der kommensalen mikrobiellen Gesellschaft vor Pathogenen (63). Daneben schützen vor der Besiedlung mit Pathogenen auch intakte anatomische Strukturen, wie Epidermis und Mukosa, sowie Speichelproduktion, suffiziente Sekretion des Immunglobulin A (IgA) und physiologische Mechanismen der Zellerneuerung (64). All diese Schutzmechanismen werden, verbunden mit der Konditionierung und Begleitbehandlung, im Rahmen der alloHSZT beeinträchtigt. Dementsprechend ist eine der häufigsten Komplikationen der alloHSZT die oropharyngeal lokalisierte Mukositis, die grundsätzlich den gesamten GIT befallen und zusammen mit der während der Aplasie induzierten Neutropenie zu systemischen Infektionen führen kann. Dabei beeinflusst die physiologische mikrobielle Komposition des GIT sowie der Kontakt mit deren Metaboliten nicht nur die adäquate Reifung, Ausprägung und intakte Funktionsweise des – vorwiegend erworbenen – Immunsystems (65-67), sondern prägt reziprok die Zusammensetzung des residenziellen Mikrobioms (66).

Bouskra *et al.* konnten zeigen, dass Peptidoglykan als Metabolit gastrointestinaler gramnegativer Bakterien die Synthese von lokalen Lymphfollikeln über Interaktion mit dem intraepithelialen *nucleotide-binding oligomerization domain containing 1* (NOD1) -Rezeptor induziert und die Reifung dieses lymphatischen Gewebes wiederum durch bakterielle *toll-like*-Rezeptoren (TLRs) erkannt wird. Dabei zeigte sich im Mausmodell bei

Abwesenheit der Lymphfollikel auch ein verändertes gastrointestinales Mikrobiom (68).

Pathologien ergeben sich zum einen durch die Störung des physiologischen mikrobiellen Gleichgewichts – vornehmlich untersucht im GIT – aber auch innerhalb eines nicht intakten oder supprimierten Immunsystems. In Zusammenschau mit der Verletzung der epithelialen Mukosa sowie des gastrointestinal assoziierten lymphatischen Gewebes können sich typische Komplikationen der alloHSZT entwickeln, wie beispielsweise GvHD (69) und Bakteriämien bis hin zum septischen Zustand und *Clostridium difficile*-assoziierter Diarrhoe (70). Von besonderer Bedeutung im Rahmen der Transplantationsmedizin ist immer auch die Abstoßungsreaktion. Die akute Rejektion ist dabei maßgeblich durch körpereigene T-Lymphozyten induziert. Arbeiten von Atarashi *et al.* konnten zeigen, dass die Adhäsion aerober grampositiver segmentierter filamentöser Bakterien (SFB), *Citrobacter* und *enterohämorrhagischer E. coli* O165 die Reifung von T-Lymphozyten induziert. SFB bewirken ebenfalls die Reifung von Interleukin-22 produzierenden intestinalen lymphatischen Zellen und IgA. Weiterhin wurde die Induktion zur Th1-Differenzierung durch *Listerien* beschrieben (71, 72).

Zeissig *et al.* konnten zeigen, dass die Entwicklung und Differenzierung natürlicher Killerzellen, welche als Lymphozyten-Subtyp Bestandteil der angeborenen Abwehr sind, durch das gastrointestinale Mikrobiom beeinflusst wird. Gleichzeitig wird dessen Komposition durch *cluster of differentiation 1d*-Glykoprotein modifiziert, welches die natürlichen Killerzellen zur Zytokin-Produktion und damit Stimulation von Th1- und Th2-Helferzellen aktiviert (73).

Des Weiteren zeigten Hand *et al.*, dass es während systemischer Entzündungsvorgänge infolge oraler *Toxoplasma gondii*-Infektion zu einer intestinalen Th1-Immunantwort, Reduktion der regulatorischen T-Zellen und Anstieg der Interferon Gamma produzierenden CD4⁺-T-Zellen kommt. Diese sind nicht nur spezifisch für *Toxoplasma gondii*, sondern zu einem Großteil spezifisch für die kommensale intestinale Mikrobengemeinschaft, was die Hypothese stützt, dass während intestinaler Infektionen die Toleranz gegenüber dem physiologischen Mikrobiom sinkt und es zu einer entsprechenden T-Zell-Immunantwort kommt (74).

Hauptkomplikationen der alloHSZT sind wie oben beschrieben lokale Infektionen, Sepsis, GvHD, Rezidive sowie Zweitmalignome als Spätfolge der Konditionierung. Holler *et al.* zeigten in der Analyse von Stuhlproben stammzelltransplantierten Patienten eine Verschiebung des intestinalen Mikrobioms mit einem relativen Anstieg der Enterokokken – vornehmlich induziert durch die begleitende antimikrobielle Prophylaxe sowie Therapie neutropenischer Zustände. Besonders ausgeprägt stellt sich die Verschiebung im Zusammenhang mit dem Auftreten von gastrointestinaler Transplantat-gegen-Wirt-Krankheit (engl. *gastrointestinal graft versus host disease*, GI GvHD) dar. Hierbei ist der Enterokokken-Anteil auch vor Eintreten der GI GvHD deutlich erhöht (75). Ebenso zeigten Jenq *et al.* einen Zusammenhang zwischen dem Verlust der mikrobiellen Diversität und dem Auftreten von GI GvHD. Weiterhin sind insbesondere ein Anstieg der Häufigkeit des *Lactobacillus*-Genus sowie ein Abfall der des *Clostridium*-Genus mit einem protektiven Effekt verbunden. Ebenso sind zum einen starke Fluktuationen des gastrointestinalen Mikrobioms *post transplantationem* bei Patienten mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer GI GvHD verbunden, und zum anderen zeigt sich ein Zusammenhang zwischen der – durch Antibiotika induzierten – mikrobiellen Dysbiose und der Schwere der GI GvHD (76).

Der Einfluss des intestinalen Mikrobioms auf die Entwicklung von GvHD bzw. deren Ausbleiben in aseptischen Mausmodellen wurde in Arbeiten von Bekkum *et al.* schon Mitte der 1970er Jahre untersucht (77). Vossen *et al.* beschrieben weiterhin, dass im Rahmen einer prophylaktischen totalen Darmdekontamination mit der kompletten Unterdrückung der intestinalen Mikrobiota die Inzidenz von akuter GvHD signifikant verringert werden kann (78). Neue Studien von Rayes *et al.* zeigten ein Beispiel für den Zusammenhang zwischen dem menschlichen Geno- und Phänotyp sowie eine weitere interessante Schnittstelle zwischen Mikrobiom und Immunsystem (79). So reguliert das Fucosyltransferase-2-Gen die Expression von AB0- und Lewis-Antigenen in Körperflüssigkeiten und der Darmschleimhaut. Dabei kann es neben der funktionstüchtigen Genvariante auch zu einer *Nonsense*-Mutation kommen, die aufgrund der dadurch nicht funktionstüchtigen Fucosyltransferase-2 mit einer fehlenden Synthese von AB0-Antigenen in der Darmschleimhaut einhergeht und als nicht-sekretierender Phänotyp beschrieben wird. Die

Blutgruppenantigene stellen zum einen Rezeptoren zur Adhäsion von Mikroben dar (80), zum anderen dienen sie als Nahrungsquelle der mikrobiellen Gemeinschaft (81). Vorangegangene Arbeiten konnten bereits den Einfluss des Vorliegens des nicht-sekretierenden Phänotyps auf die Zusammensetzung des Mikrobioms zeigen. So ist beispielsweise eine Reduktion des Anteils der Gattung *Bifidobacterium* sowie geringerer Diversität der einzelnen Genera innerhalb dieser mit diesem Genotyp assoziiert (82). Ebenso lassen sich hinsichtlich der mikrobiellen Zusammensetzung Häufungen des jeweiligen Phänotyps nachweisen, wobei auf der Genera-Ebene die Diversität des gastrointestinalen Mikrobioms insgesamt abnimmt (83).

Rayas *et al.* zeigten, dass ein gleichzeitiges Vorhandensein einer nicht funktionierenden Genvariante mit einer erhöhten Inzidenz von akuter GI GvHD und Bakteriämie nach alloHSZT einhergeht (79).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung einer molekulargenetischen Methode zur Charakterisierung des oralen Mikrobioms des lateralen Zungenrandes von Patienten mit maligner hämatoonkologischer Grunderkrankung, für die eine hämatopoetische Stammzelltransplantation oftmals den einzig kurativen Ansatz darstellt.

Dabei stehen insbesondere die qualitative und quantitative Veränderung sowie die Dauer der Regeneration der mikrobiellen Komposition im Therapieverlauf im Fokus, verbunden mit dem Vergleich zum entsprechenden Spendermikrobiom. Sowohl das im Zuge der Konditionierung supprimierte Immunsystem als auch das Mikrobiom, welches auch durch Infektionsprophylaxe und -therapie sowie Hospitalisierung beeinflusst wird, gelangen während der Therapiezeit in eine starke Dysbalance. Aufgrund der reziproken – physiologisch stark symbiotischen – Verbindung und Prägung beider ergibt sich zum einen die Fragestellung, ob anhand von Veränderungen der Zusammensetzung des oralen Mikrobioms frühzeitig auf drohende schwerwiegende Komplikationen der alloHSZT geschlossen werden kann. Zum anderen soll es durch die Etablierung der Methodik, welche Gegenstand der Dissertation ist, langfristig in darauf aufbauenden Studien möglich sein, den Einfluss der unterschiedlichen Transplantationsmodalitäten, wie Konditionierungsregime und supportive Behandlungsschemata, auf Muster, Kinetik und Regeneration des oralen Mikrobioms des Zungenrandabstrichs zu analysieren. Dabei könnte dieses habitatspezifische Mikrobiom prädiktiven Charakter für die Entstehung von schwerwiegenden Komplikationen, wie Transplantatabstoßung, GvHD, Infektionen und Rezidive erlangen und entsprechend klinische Endergebnisse bessern.

Da eine verlässliche Methodik für die Generierung valider Daten erforderlich ist, sollen vergleichende Untersuchungen unter Nutzung zweier Sequenzier-Ansätze ebenfalls Inhalt dieser Dissertation sein.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Invitrogen/Life Technologies (Darmstadt, Deutschland), New England Biolabs (Hitchin, Vereinigtes Königreich) und Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet.

2.1.2 Laborgeräte

Alle verwendeten Laborgeräte, sofern nicht anders angegeben, wurden von Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland), Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika), Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika), Roche Diagnostics Deutschland GmbH (Mannheim, Deutschland) oder Illumina Inc. (San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika) verwendet.

2.1.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Eurofins Scientific, MWG Biotech AG (Köln, Deutschland) synthetisiert, gereinigt und lyophilisiert. Die nachfolgende Tabelle 1 beinhaltet die Bezeichnung der Oligonukleotide, deren Verwendungszweck sowie die Basensequenz.

Tabelle 1: Synthetisierte Oligonukleotide, Verwendungszweck und Basensequenz.

Bezeichnung	Verwendungszweck	Sequenz in 5´-3´-Richtung
27 <i>Forward-Primer</i>	Amplifikation V1/2-Region der 16S rRNS (Roche/454-Sequenzierung)	GCC TTG CCA GCC CGC TCA GTC AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG
338 <i>Reverse-Primer</i>	Amplifikation V1/2-Region der 16S rRNS (Roche/454-Sequenzierung)	GCC TCC CTC GCG CCA TCA GNN NNN NNN NNN NCA TGC TGC CTC CCG TAG GAG T
967 <i>Forward-Primer</i>	Amplifikation V6/7-Region der 16S rRNS (Illumina-Sequenzierung)	TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT ATA AGA GAC AGC AAC GCG AAG AAC CTT ACC
1238 <i>Reverse-Primer</i>	Amplifikation V6/7-Region der 16S rRNS (Illumina-Sequenzierung)	GTC TCG TGG GCT GGA GAT GTG TAT AAG AGA CAG GTA GCR CGT GTG TMG CCC

2.2 Methode

2.2.1 Einverständniserklärung und Ethikvotum

Im Rahmen der Untersuchung wurden die Vorgaben der Berufsordnung und der revidierten Deklaration von Helsinki sowie des Gendiagnostikgesetzes berücksichtigt. Letzteres kommt aufgrund der isolierten Charakterisierung bakterieller DNS sowie der rein zu Forschungszwecken durchgeführten Analyse nicht zum Tragen (Gendiagnostikgesetz, §2 Absatz 2).

Alle Patienten und gesunden Spender bzw. ihre Sorgeberechtigten haben schriftlich der Teilnahme an der Studie eingewilligt. Des Weiteren liegt ein positives Ethikvotum für die Projektdurchführung vor (Projektnummer: 3669).

2.2.2 Projektübersicht

Die folgende Abb. 5 zeigt den Projektablauf des experimentellen Teils der Dissertation. Die Schritte, angefangen von der Probengewinnung bis zur bioinformatischen Auswertung, werden in den anschließenden Kapiteln ausführlich erläutert.

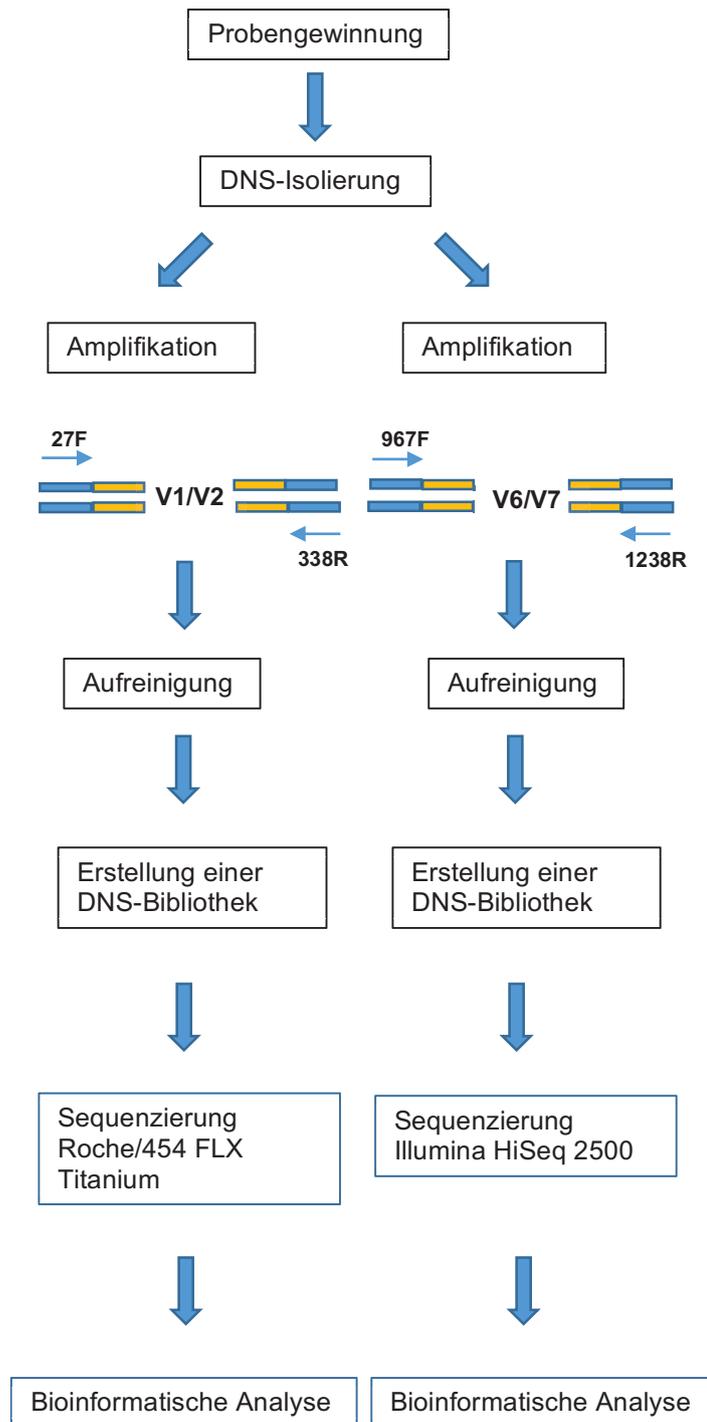


Abb. 5: Projektablauf.

Dargestellt sind die zwei unterschiedlichen Sequenziermethoden der Roche/454- und Illumina-Plattform. Beiden Methoden gemein ist die Probengewinnung als Abstrich des Zungenrandes mit anschließender Desoxyribonukleinsäure-Isolierung (DNS-Isolierung). Danach erfolgte die Amplifikation unterschiedlicher Bereiche der 16S rRNS. Hierfür lagen für die Roche/454-Plattform Amplicons der V1/V2-Region, für die Illumina-Plattform Amplicons der V6/V7-Region zugrunde. Im Anschluss erfolgte bei beiden Methoden die Aufreinigung des Polymerasekettenreaktion (PCR)-Produktes sowie die Erstellung einer DNS-Bibliothek. Nach Durchführung der beiden Sequenziervorgänge folgte die bioinformatische Analyse.

2.2.3 Patientenkohorte und Charakterisierung

Eingeschlossen in die Studie sind Patienten mit maligner hämatoonkologischer Grunderkrankung, die im Rahmen der Therapie eine alloHSZT erhielten und im Langzeitverlauf in der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie des Universitätsklinikums Düsseldorf weiter betreut werden konnten. Ebenfalls mit eingeschlossen wurden die freiwilligen, gesunden Spender. Zum Zeitpunkt der Erstellung der Dissertation lagen von zwei Patienten die Langzeitverläufe vor.

2.2.4 Studienart

Innerhalb der ärztlichen Versorgung der in die Studie eingeschlossenen Patienten in der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und Klinische Immunologie fand die nicht-invasive Probenentnahme in Form von oberflächlichen Bürstenabstrichen der Mundschleimhaut statt. Die Gewinnung des Probenmaterials beinhaltete kein erhöhtes Risiko für die Patienten und legte die Grundlage für einen Erkenntniszuwachs in der Charakterisierung des oralen Mikrobioms bei stammzelltransplantierten Kindern (Risiko-Nutzen-Abwägung). Innerhalb der prospektiven Untersuchung sollte die Zusammensetzung des oralen Mikrobioms vor alloHSZT sowie zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf charakterisiert werden. Es erfolgte zusätzlich eine Probenentnahme beim zugehörigen Spender.

2.2.5 Probengewinnung

Die Probenentnahme erfolgte nicht-invasiv mittels oberflächlicher Bürstenabstriche (siehe Abb. 6A: sterile Rovers Orcellex Brush von Rovers Medical Devices B.V., Oss, Niederlande) zu den Zeitpunkten vor Konditionierungsbeginn und in etwa 30-tägigem Abstand innerhalb der stationären Behandlung sowie ambulanten Nachkontrolle der Patienten. Dabei wurde – wie in Abb. 6B und 6C dargestellt – bei Patienten und zugehörigen Stammzellspendern die laterale Zungenpartie abgestrichen.

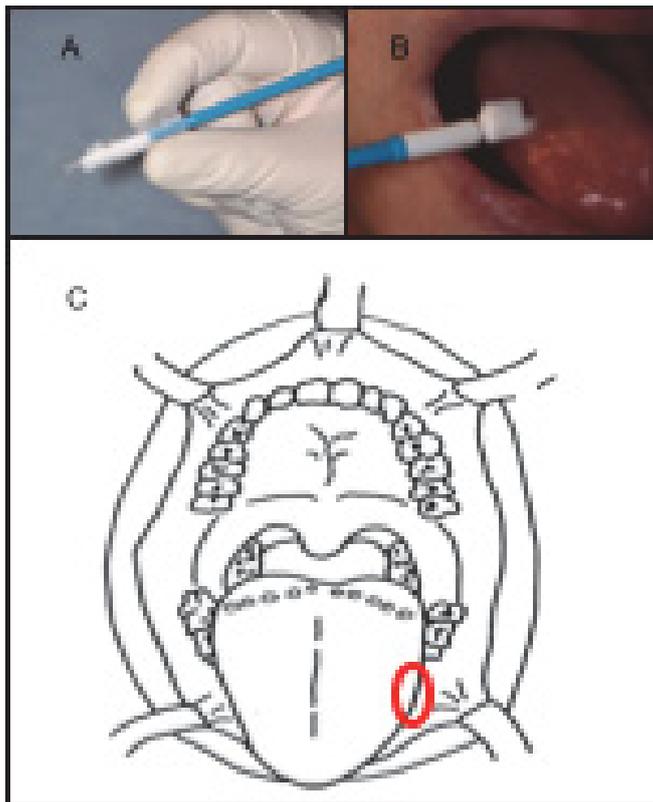


Abb. 6: Technik und Lokalisation der Probenentnahme.

6A - Sterile Bürste (Rovers Medical Devices B.V.);

6B - Nicht-invasive Probenentnahme mittels Bürstenabstrich vom Zungenrand;

6C - Übersicht der Mundhöhle mit Hervorhebung des Abstrichortes am linken Zungenrand.

Die Abbildungen wurden dankenswerterweise von Dr. med. Eunike Velleuer zur Verfügung gestellt.

Anschließend wurde der Bürstenkopf zur Konservierung in 500 µl Fixativ CytoLyt (Hologic, Bedford, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Die konservierten Bürstenköpfe mit dem Abstrichmaterial wurden für 15 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Hierfür und für alle weiteren Zentrifugationsschritte wurde eine Eppendorf Zentrifuge 5417 R verwendet.

Anschließend wurde der Bürstenkopf aus dem Reaktionsgefäß entfernt und der Überstand abgenommen. Das Pellet, welches sich aus bakteriellen und humanen Zellen der lateralen Zungenoberfläche zusammensetzt, wurde in 1 ml PBS (Dulbecco's PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Vereinigtes Königreich) resuspendiert und anschließend nochmals bei 20.000 x g für 5 min zentrifugiert. Nach erneuter Abnahme des Überstandes wurde das Pellet bei -20 °C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

2.2.6 DNS-Isolierung

Um die benötigte bakterielle DNS aus den Zellen zu extrahieren, erfolgte die im Anschluss beschriebene DNS-Isolierung. Diese wurde im Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Universität Düsseldorf durch die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. rer. nat. Henrich durchgeführt.

Zur DNS-Isolierung wurde das DNA Blood Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Durch 10-minütige Zentrifugation bei 20.000 x g aller in der Suspension enthaltenen Zellen (sowohl human als auch nicht-human) wurde ein Pellet gewonnen. Im Anschluss wurde dieses in einer Enzymlösung (20 mg/ml Lysozym; 20 mM Tris/HCl, pH 8; 2 mM EDTA; 1,2% Triton) resuspendiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Darauf folgte die Zugabe von 20 µl Proteinase K (>600 mU/ml) und 200 µl Puffer AL (QIAmp Blood Kit, Qiagen), gefolgt von weiteren Inkubationsschritten bei 56 °C für 30 min sowie bei 95 °C für 15 min. Entsprechend dem Standardprotokoll für DNS-Präparation aus Gewebeproben des Herstellers erfolgte die weitere DNS-Isolation sowie die Lagerung bei -20 °C bis zur weiteren Behandlung der Proben.

2.3 Roche/454-Sequenzierung

2.3.1 Amplifikation und Erstellung der DNS-Bibliothek

Zur Vervielfältigung und Markierung der gewünschten mikrobiellen DNS-Fragmente wurden Reaktionsansätze mit einem Gesamtvolumen von 20 µl hergestellt, bestehend aus jeweils 1 µl DNS-Probe, 1 µl *Forward* Primer (100 µM), 1 µl *Reverse* Primer (100 µM), 7 µl H₂O_{dd} und 10 µl Platinum PCR SuperMix (22 U/ml rekombinante Taq DNS-Polymerase mit Platinum-Taq-Antikörpern, 22 mM Tris-HCl (pH 8,4), 55 mM KCl, 1,65 mM MgCl₂, je 220 mM dGTP, dATP, dTTP und dCTP sowie Stabilisatoren; Invitrogen/Life Technologies). Um den Einfluss von PCR-Fehlern auf das Ergebnis zu verringern, erfolgte der Ansatz biologischer Triplikate. Die verwendeten bakterienspezifischen Primer (27 *Forward* Primer: 5'-GCC TTG CCA GCC CGC

TCA GTC AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' und 338 *Reverse* Primer: 5'-GCC TCC CTC GCG CCA TCA GNN NNN NNN NNN NCA TGC TGC CTC CCG TAG GAG T-3') banden innerhalb einer konservierten Region des 16S rRNS-Gens, welche die hypervariable V1/V2-Region flankiert. Dabei setzte sich der Amplicon Fusion *Forward* Primer aus einer gerichteten GS FLX Titanium Roche/454-Primer-B-Sequenz („GCC TTG CCA GCC CGC“), einer Schlüsselsequenz („TCAG“), dem oben beschriebenen bakteriellen Primer 27F und einer aus zwei Basenpaaren bestehenden Linkersequenz („TC“) zusammen. Analog dazu beinhaltete der Amplicon Fusion *Reverse* Primer die GS FLX Titanium Roche/454-Primer-A Sequenz („GCC TCC CTC GCG CCA“), ebenfalls die Schlüsselsequenz („TCAG“), eine kurz-kettige Barcode-Basensequenz als *multiplexing indentifiers* (MIDs), welche die Zuordnung aus einem Probengemisch nach Sequenzierung erlaubte (dargestellt durch „NNN NNN NNN NNN“), den ebenfalls oben genannten bakteriellen Primer 338R und einem „CA“-Linker. Abb. 7 zeigt das Primerdesign für den gewünschten Genabschnitt des mikrobiellen 16S rRNS-Gens im Überblick.

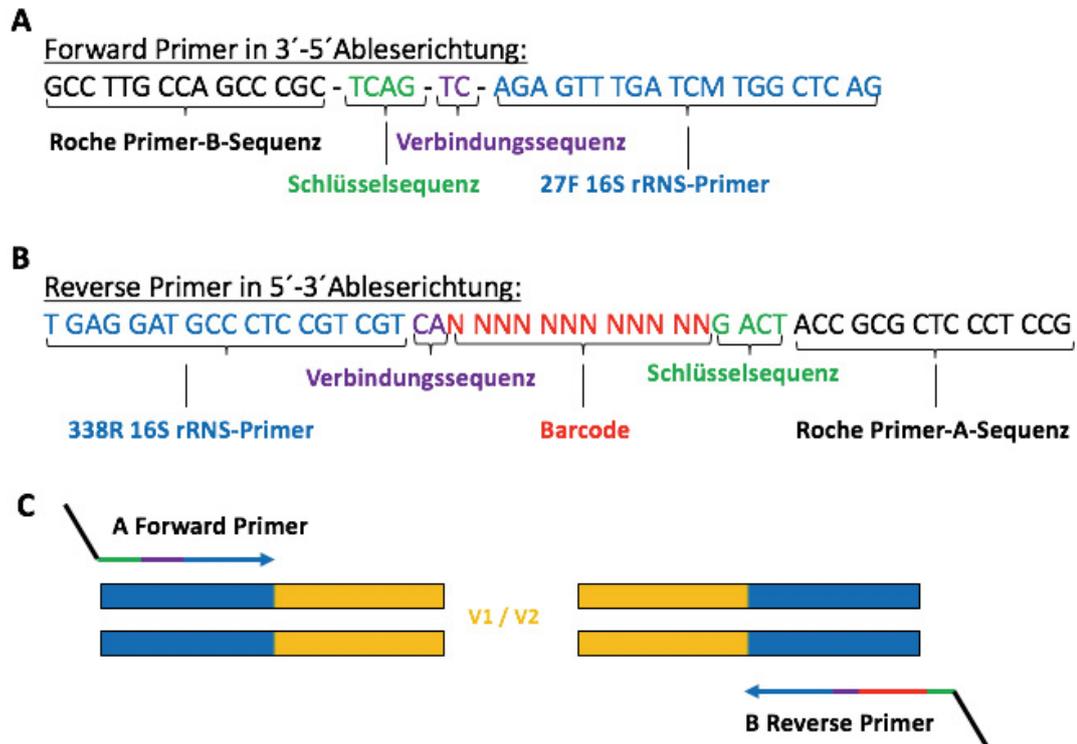


Abb. 7: Primerdesign für die Roche/454-Amplifikations-Bibliothek.

A: Zusammensetzung des *Forward* Primers; B: Zusammensetzung des *Reverse* Primers; C: Bindungsstelle der Primer an dem mikrobiellen 16S rRNS-Gen.

Die Abb. 7A zeigt die Zusammensetzung des *Forward* Primers bestehend aus der Roche/454-Primer-B-Sequenz, der Schlüsselsequenz, der Verbindungssequenz und dem 27F 16S rRNS-Primer. Analog dazu bildet die Abb. 7B den *Reverse* Primer ab, der sich aus der Roche/454-Primer-A-Sequenz, der Schlüsselsequenz, einem individuellen Barcode, der Verbindungssequenz sowie dem 338R 16S rRNS-Primer zusammensetzt. Die Abb. 7C stellt die Bindungsstellen der *Forward* und *Reverse* Primer an dem mikrobiellen 16S rRNS-Gen dar, die die variablen Genregionen V1/2 flankieren.

Der PCR-Prozess beinhaltete zunächst die Denaturierung der DNS bei 94°C über 3 min, gefolgt von 35 Zyklen bestehend aus 95°C für 45 s ebenfalls für die Denaturierung, 50°C für 30 s zur Hybridisierung der Primer und 72°C für weitere 90 s zur Amplifikation. Nach einem abschließenden 10-minütigen Syntheseschritt bei 72°C erfolgte die Lagerung bei 4°C. Insgesamt ergab sich daraus eine Gesamtlaufdauer von 2 h und 41 min unter Verwendung eines PCR-Thermocyclers (Eppendorf). Anschließend erfolgte eine Agarose-Gelelektrophorese zur Überprüfung der amplifizierten DNS-Produkte bei 120 mV über ca. 60 min. Hierfür wurde eine Agarosekonzentration (*Agarose for gel electrophoresis*, Biozym LE, Hessisch Oldendorf, Deutschland) von 1% in 1x TAE-Puffer (BIO-RAD, München, Deutschland) verwendet. Als

Elektrophoresepuffer fand ebenfalls 1x TAE Verwendung. Als Ladepuffer und Marker wurde 10x Coraload PCR Puffer (Qiagen) eingesetzt. GelPilot 1 kb Ladder (Qiagen) diente als Größenstandard. Die Visualisierung der DNS-Fragmente erfolgte mittels Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), welches in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zur Agarose-Lösung hinzugegeben wurde. Anschließend wurden die Agarose-Geltaschen mit einem 5 µl Mix bestehend aus einem 1:1 Gemisch aus amplifizierten DNS-Matrizen und Coraload PCR Puffer beladen. Abhängig von der Größe der Gel-Elektrophorese-Kammer erfolgte die Anlage einer Spannung von 60-150 V. Die gewünschte Fragmentgröße der 16S rDNS betrug zwischen 350-450 bp. Mittels eines UV-Transilluminators (Gel iX Imager, intas, Göttingen, Deutschland) wurden die aufgetrennten DNS-Fragmente detektiert und dokumentiert.

2.3.2 Aufreinigung des PCR-Produkts

Die PCR-Triplikate wurden zu einer Probe zusammengeführt und anschließend wurde das Gesamtvolumen gemessen, um das geeignete Mischverhältnis für den im Folgenden verwendeten Puffer zu ermitteln. Die Bearbeitung der Proben erfolgte mit dem MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) entsprechend des Protokolls des Herstellers. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde bis zur weiteren Verwendung anschließend bei -20°C gelagert.

2.3.3 Agilent DNA 1000 Assay zur Analyse des PCR-Produkts

Zur Bestätigung des Ergebnisses der Gelelektrophorese und exakteren Bestimmung der Größe der amplifizierten DNS-Fragmente erfolgte die Analyse entsprechend des Agilent DNA 1000 Assay-Protokolls mittels Agilent 2100 Bioanalytiker (Agilent Technologies). Es bestätigte sich durch den Nachweis der zu erwartenden Fragmentgrößen von 350 bis 450 Nukleotiden die erfolgreiche Amplifizierung der DNS-Templates. Die Fragmentgröße war ebenfalls entscheidend für die Berechnung der anschließend benötigten Ausgangskonzentration von 10^7 Moleküle/µl DNS-Matrize.

2.3.4 DNS-Quantifizierung

Die genauere Quantifizierung der DNS-Konzentration erfolgte mit Hilfe des Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kits und eines Qubit 2.0 Fluometer (Thermo Fisher Scientific Inc.) entsprechend der Herstelleranweisungen. Hierbei wurde ein DNS-spezifischer Fluoreszenzfarbstoff genutzt, der nach Interkalation in die DNS sein volles Fluoreszenzsignal entfaltetete. Die Menge an detektiertem Fluoreszenzsignal ist dabei proportional zur DNS-Konzentration in der Probe. So konnte das anschließende Zusammenführen der mittels Barcode markierten DNS-Proben in äquimolarer Konzentration zur Erstellung einer individuellen Sequenzier-Bibliothek gewährleistet werden. Aus den ausgewählten 32 Proben ergab sich demnach mit je 5 µl pro Probe und einer DNS-Konzentration von 10^7 Moleküle/µl ein Gesamtvolumen von 160 µl.

2.3.5 Emulsion-PCR-Amplifikation

Die Durchführung erfolgte entsprechend des emPCR-Lib-A SV Protokoll der GS FLX Titanium Series (Roche).

Die Emulsion-PCR (emPCR) umfasste die klonale Amplifizierung der zuvor erstellten DNS-Bibliothek innerhalb von – durch Mizellen gebildeten – Mikroreaktoren in einer PCR-Reaktionsmischung-in-Öl-Emulsion.

Die PCR erfolgte an der Oberfläche kleinster Kugeln – sog. *beads* – , die mit einer individuellen Primersequenz versehen waren, passend zu den Adaptoren, die im Rahmen der Erstellung der zu sequenzierenden DNS-Bibliothek an die DNS-Fragmente legiert wurden. Die Immobilisation der DNS-Matrizen in einem 1:1 Verhältnis an den *beads* gewährleistete die klonale Amplifizierung.

Zunächst wurde eine Suspension der PCR-Reagenzien mit Öl, Stabilisatoren, den mit Primern versehenen *beads* und der zu sequenzierenden DNS hergestellt. Alle weiteren Reaktionsschritte fanden innerhalb der – durch Mizellen gebildeten – Mikroreaktoren statt. Als nächster Schritt folgte die Denaturierung der doppelsträngigen DNS sowie die anschließende Primerhybridisierung. Dabei sollte je eine Adapter-legierte einzelsträngige DNS-Matrize an die entsprechend Primer-legierte Oberfläche eines *beads* binden, sodass die Basis für klonale Amplifikationsbedingungen innerhalb einer Mizelle

geschaffen wurde. Nach stattgefundenener DNS-Matrizen-Amplifikation waren bis zu 10^6 DNS-Fragment-Kopien an einem *bead* gebunden und standen zur nachfolgenden Pyrosequenzierung bereit. Damit ein 1:1 Verhältnis von DNS-Matrize und *bead* zustande kam, wurden letztere im Überschuss angeboten. Im Anschluss erfolgte das Aufbrechen der Wasser-in-Öl-Emulsion durch Waschvorgänge, Trennung der unbeladenen von den angereicherten *beads* sowie die Hybridisierung des Sequenzierprimers an die mit DNS-Klonen beladenen Einzelstrang-DNS-*beads*. Anschließend erfolgte die Übertragung dieser immobilisierten Sequenzier-Matrizen auf eine Glasfaseroptik. Diese sog. PicoTiter Platte (PTP) bestand aus einem Raster von $1,6 \times 10^6$ Ausbuchtungen, die als kleinste Sequenzierreaktionsräume fungierten und in eine Flusszelle integriert waren, durch deren 300 μm tiefen Kanal oberhalb der Vertiefungen die benötigten Reagenzien und Enzyme zum Ort der Pyrosequenzierreaktion gelangten. Die Grundfläche der PTP ermöglichte durch Übertragung auf eine weitere faseroptisch arbeitende Einheit, verbunden mit einer *Charge-coupled device* Kamera, die im Folgenden beschriebene Detektion und Zuordnung der Positionierung der Lichtreaktion jeder parallel ablaufenden Sequenzierreaktion. Anschließend sollte jede Vertiefung der PTP ein *bead* mit immobilisierter, klonal amplifizierter DNS zur exakten Sequenzierung beinhalten.

2.3.6 Pyrosequenzierung

Im Anschluss an die Beladung der PTP startete der eigentliche Vorgang der Pyrosequenzierung. Diese wurde im GS FLX Instrument (Roche) nach den Anweisungen des Herstellers gemäß GS FLX Titanium Sequencing Kit XL+ (Roche) durchgeführt. Die Methode stellt eine sog. Sequenzierung durch Synthese (engl. *sequencing by synthesis*; SBS) eines komplementären Stranges zur immobilisierten Sequenzier-Matrize dar. In diesem Experimentdesign stellte eine mit Sequenzier-Primern legierte DNS-Matrize den Ausgangspunkt für die sog. *liquid phase* Pyrosequenzierung dar. Dabei wurde ein Reaktionsansatz bestehend aus vier Enzymen verwendet. Dabei waren die Enzyme ebenso an kleinsten *beads* immobilisiert, wie auch die Sequenzier-DNS-Matrize, um die individuelle, parallele Sequenzierung innerhalb der

Vertiefungen der PTP ohne Störungen zu gewährleisten. Über die Flusszelle verteilt liefen so millionenfache Sequenzierreaktionen gleichzeitig ab. Dabei stieg mit zunehmender Intensität des Lichtsignals die Wahrscheinlichkeit der Detektion der richtigen Base. Sowohl die Stärke des emittierten Lichtsignals als auch die exakte Position dessen auf der Flusskammer wurden festgehalten und anschließend zu einem individuellen Pyrogramm verrechnet. Die folgende Abb. 8 zeigt die Reaktionsvorgänge bis zur Entstehung des Pyrogramms.

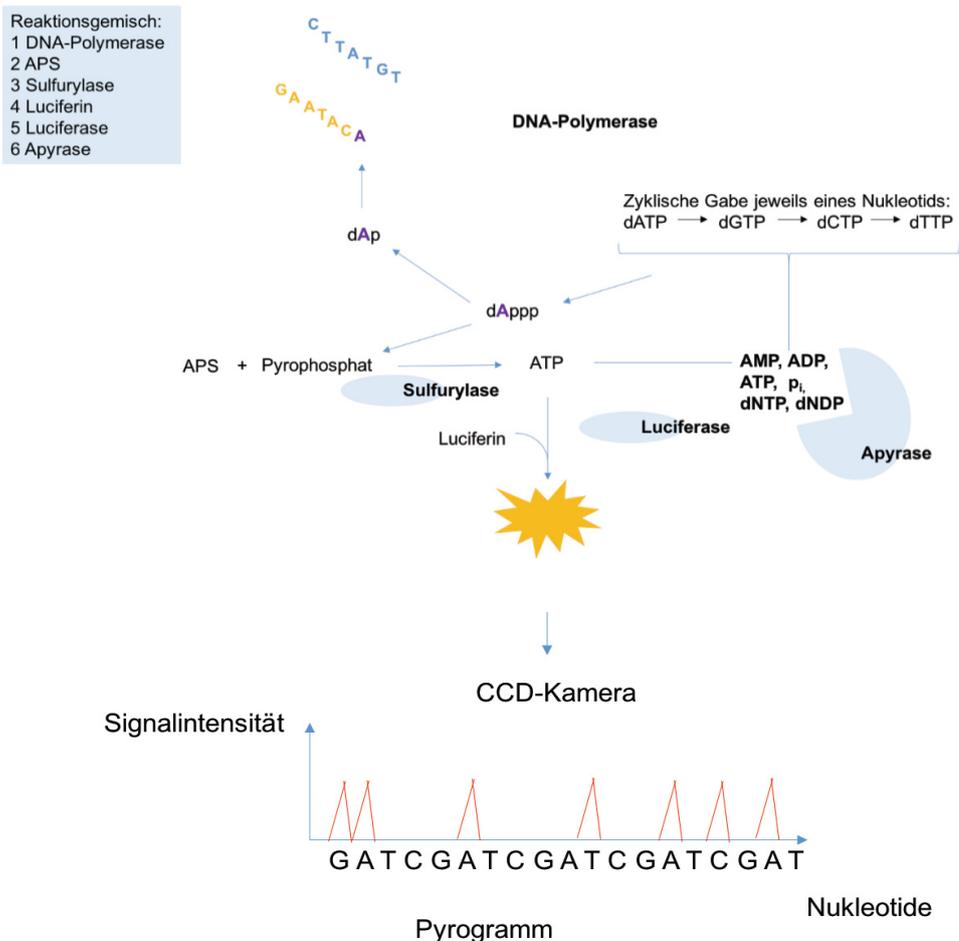


Abb. 8: Enzymkaskade der Pyrosequenzierung sowie Entstehung eines Pyrogramms.

Das Reaktionsgemisch – bestehend aus Polymerase, Sulfurylase, Adenosinphosphosulphat (APS), Luciferase, Luciferin und Apyrase – wurde neben der zyklischen Gabe jeweils eines Desoxynucleosidtriphosphats (dNTP) über die Flusskammer verteilt. Die dNTPs entsprachen dabei Desoxy-Adenosin/-Guanin/-Tyrosin- und -Cytosintriphosphat (dATP/dGTP/dTTP/dCTP). Beispielhaft ist hier der Einbau eines komplementären Desoxynucleosidmonophosphats (dNMP) nach Abspaltung von anorganischem Pyrophosphat (PPi) durch die Polymerase. Dementsprechend war die Menge an entstandenem PPi äquimolar zu der des eingebauten dNTPs. dATP entsprach dabei zur Veranschaulichung der Phosphatbestandteile dAppp. Anschließend konnte das Desoxyadenosinmonophosphat (dAp) in den komplementären Strang eingebaut werden. Das Enzym ATP-Sulfurylase wandelte unter Verwendung von APS PPi zu ATP um. Apyrase degradierte die nicht benötigten dNTPs, Desoxynucleosiddiphosphate (dNDPs), ATP, Adenosindiphosphat (ADP), Adenosinmonophosphat (AMP) sowie anorganisches Phosphat (Pi). Dies verhinderte zum einen die Verfälschung der Lichtsignale in folgenden Reaktionszyklen durch zu hohe Hintergrundstrahlung und beschleunigte dabei den Ablauf der Reaktionszyklen durch Minimierung der nötigen Waschvorgänge zwischen diesen. Luciferase katalysierte anschließend die ATP-abhängige Reaktion von Luciferin zu Oxyluciferin, bei der das frei werdende Lichtsignal optisch für die *Charge-coupled device* (CCD)–Kamera den Einbau der komplementären Base markierte. Dabei entsprach die Intensität des detektierten Lichtsignals der Menge der an dieser Stelle eingebauten Base. Das Pyrogramm zeigt die x-Achse mit immer fortlaufenden Zyklen der Nucleosid-Zugabe sowie die y-Achse mit der Signalintensität des von der CCD-Kamera detektierten Lichtsignals. Jedes Signal im Pyrogramm an entsprechender Basenstelle markierte den Einbau dieser in den komplementären Strang. Dabei entsprachen Guanin (G), Adenosin (A), Tyrosin (T) und Cytosin (C) den eingebauten Basen. Eigene Darstellung, Inhalt aus (84).

2.3.7 Bioinformatische Auswertung

Die bioinformatische Auswertung der generierten Sequenzierdaten erfolgte durch Dres. rer. nat. Maddis Ruming und Alexander Sczyrba, Centrum für Biotechnologie (CeBiTec) der Universität Bielefeld. Dazu wurde die Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) *open source pipeline* verwendet, für die ein vorgefertigter Arbeitsablauf zur Analyse Roche/454-sequenzierter mikrobieller 16S rRNS vorlag. Die via Pyrosequenzierung generierten Basensequenzen konnten durch die eindeutige Barcode-Sequenz den Ausgangsproben zugeordnet werden. Anschließend wurden im Rahmen des *demultiplexing* die Barcode-Sequenz, die Linker-Primer-Sequenz sowie die Reverse-Primer-Sequenz entfernt. Im Rahmen des *quality filtering* wurden qualitativ minderwertige und nicht eindeutig zuzuordnende Basensequenzen aussortiert. Anschließend wurden alle ermittelten Basensequenzen aufgrund ihres Anteils an übereinstimmenden Sequenzen in OTUs geordnet. Diese wurden anschließend, entsprechend ihres Grades an Übereinstimmung, in verschiedene taxonomische Ordnungen gruppiert (Phylum, Ordnung, Klasse, Familie und Gattung).

2.4 Illumina-Sequenzierung

2.4.1 Amplifikation der 16S rRNS

Aus isoliertem, mikrobiellem DNS-Abstrichmaterial des lateralen Zungenrandes wurde eine bakterielle 16S rDNS-Bibliothek der Genregion V6/V7 konstruiert. Dazu wurden im ersten PCR-Schritt folgende Primer verwendet:

967 Forward Primer 5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT ATA AGA GAC AGC AAC GCG AAG AAC CTT ACC-3' sowie 1236 Reverse-Primer 5'-GTC TCG TGG GCT GGA GAT GTG TAT AAG AGA CAG GTA GCR CGT GTG TMG CCC-3' (Eurofins, MWG Biotech AG). Die Lokus-spezifische Sequenz wurde dabei durch eine endständige Adapter-Sequenz ergänzt, die es

in einer weiteren Amplifikationsreaktion – Index-PCR – ermöglichte, verschiedene Proben in einem Ansatz zu sequenzieren.

Abb. 9 zeigt dabei vergleichend die Primer-Bindungsstellen dem mikrobiellen 16S rRNS-Gen zur Amplifikation der Genregionen V1/2 und V6/V7.

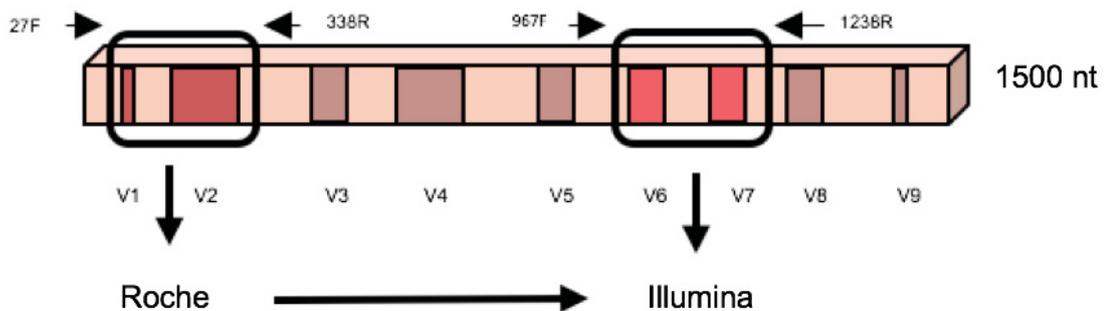


Abb. 9: Aufbau des prokaryotischen 16S rRNS-Gens und Lage der Primer-Bindungsstellen.

Das prokaryotische 16S rRNS-Gen besteht aus neun variablen Regionen (V1-V9) flankiert von konservierten Genabschnitten. Dargestellt sind die Primer-Bindungsstellen für die Sequenzierung mittels Roche/454-Plattform und Illumina-Plattform. Das Amplifikationsprodukt für die Roche/454-Sequenzierung beinhaltet die variable V1/V2-Region unter Verwendung des 27F und 338R Primers. Das Amplifikationsprodukt der Illumina-Plattform beinhaltet die V6/V7-Region unter Verwendung der 967F und 1238R Primer. Modifiziert nach (85).

Das Reaktionsvolumen des PCR-Ansatzes umfasste 25 µl. Dieses setzte sich zusammen aus 2,5 µl mikrobieller, isolierter DNS, 5 µl *Forward* Primer (1 µM), 5 µl *Reverse* Primer (1 µM) und 12,5 µl 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix (0,5 U DNS-Polymerase, je 0,3 mM dGTP, dATP, dTTP und dCTP sowie 2,5 mM MgCl₂, Kapa Biosystems Inc., Wilmington, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika).

Die PCR-Reaktion wurde in einem PCR-Thermozykler (Eppendorf) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Initiale Aktivierung und Denaturierung bei 95°C für 3 min gefolgt von 25 Zyklen auf 95°C für 30 s, 55°C für 30 s und 72°C für 30 s. Anschließend erfolgte die Elongation bei 72°C für weitere 5 min. Bei 4°C wurde das Amplifikationsprodukt bis zur Entnahme aus dem PCR-Thermozykler gelagert. Die anschließende Agarose-Gelelektrophorese zur Überprüfung des PCR-Produktes fand wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben statt.

2.4.2 Aufreinigung des PCR-Produkts

Zur Aufreinigung des PCR-Produktes wurde analog zur Generierung der DNS-Bibliothek der Roche/454-Sequenzierung das MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) entsprechend des Protokolls des Herstellers verwendet (Kapitel 2.3.2). Die Lagerung des aufgereinigten PCR-Produkts erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C.

2.4.3 Agilent DNA 1000 Assay zur Analyse des PCR-Produkts

Analog zur Roche/454-Sequenzierung wurde das PCR-Produkt zur genaueren Bestimmung der amplifizierten DNS-Fragmentgröße mittels des Agilent DNA 1000 Assay Protokolls unter Verwendung des Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) analysiert. Hierbei bestätigte sich durch Nachweis der zu erwartenden Fragmentgrößen von 250 bis 300 Nukleotiden die erfolgreiche Amplifizierung der DNS-Fragmente.

2.4.4 Index-PCR

Die Durchführung der Index-PCR erfolgte entsprechend des Illumina 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Protokolls unter Verwendung des Nextera XT Index Kits. Dieser Reaktionsschritt ermöglichte zum einen die spätere Zuordnung ermittelter Basensequenzen durch Verwendung bekannter Index-Oligonukleotide, die diese flankierten. Zum anderen wurden diese Index-Sequenzen ebenfalls von Oligonukleotiden ergänzt, die eine Hybridisierung der DNS-Fragmente auf der Flusszelle ermöglichten.

Das Reaktionsvolumen des PCR-Ansatzes umfasste 50 µl und setzte sich zusammen aus 5 µl mikrobiellem Amplifikationsprodukt der V6/7-Region aus dem vorangegangenen PCR-Schritt, 5 µl Nextera XT Index Primer 1, 5 µl Nextera XT Index Primer 2, 25 µl 2 x KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Zusammensetzung siehe Kapitel 2.4.1, Kapa Biosystems, Inc.) und 10 µl Nuklease-freiem H₂O_{dd}. Die PCR-Reaktion wurde in einem PCR-Thermozykler

(Eppendorf) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Initiale Aktivierung und Denaturierung bei 95°C für 3 min gefolgt von 8 Zyklen auf 95°C für 30 s, 55°C für 30 s und 72°C für 30 s. Anschließend erfolgte die Elongation bei 72°C für weitere 5 min. Bei 4°C wurde das Amplifikationsprodukt bis zur Entnahme aus dem PCR-Thermozykler gelagert.

2.4.5 DNS-Quantifizierung

Die Messung der DNS-Konzentration erfolgte analog zur Roche/454-Sequenzierung wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben mit Hilfe des Qubit dsDNA HS Assay Kits und eines Qubit 2.0 Fluometers (Thermo Fisher Scientific Inc.).

2.4.6 *Bridge*-Amplifikation und SBS

Durch kovalente Bindung der mit Adaptoren versehenen DNS-Matrizen an spezifische komplementäre, als Primer fungierende, Oligonukleotide auf einer Flusszelle erfolgte die Immobilisation. Durch eine *bridge*-Amplifikation der DNS bildeten sich millionenfache Anhäufungen (engl. *cluster*). Diese *cluster* stellten immobilisierte Anhäufungen von bis zu 1000 klonalen Kopien jeweils einer DNS-Matrize dar und ermöglichten die tausendfache parallele Sequenzierung. Die Generierung der DNS-Bibliothek erfolgte gemäß der Herstelleranweisung mit dem TruSeq DNA HT Sample Prep Kit (Illumina Inc., San Diego, California, Vereinigte Staaten von Amerika). Anschließend wurde entsprechend des Protokolls des TruSeq Rapid SBS HS Kits die *paired end*-Sequenzierung im *rapid mode* mit einer Leselänge von 2 x 150 bp auf einer dualen Flusszelle mittels Illumina HiSeq 2500-System durchgeführt.

In Abb. 10 ist das Prinzip der Illumina-Sequenzierung dargestellt.

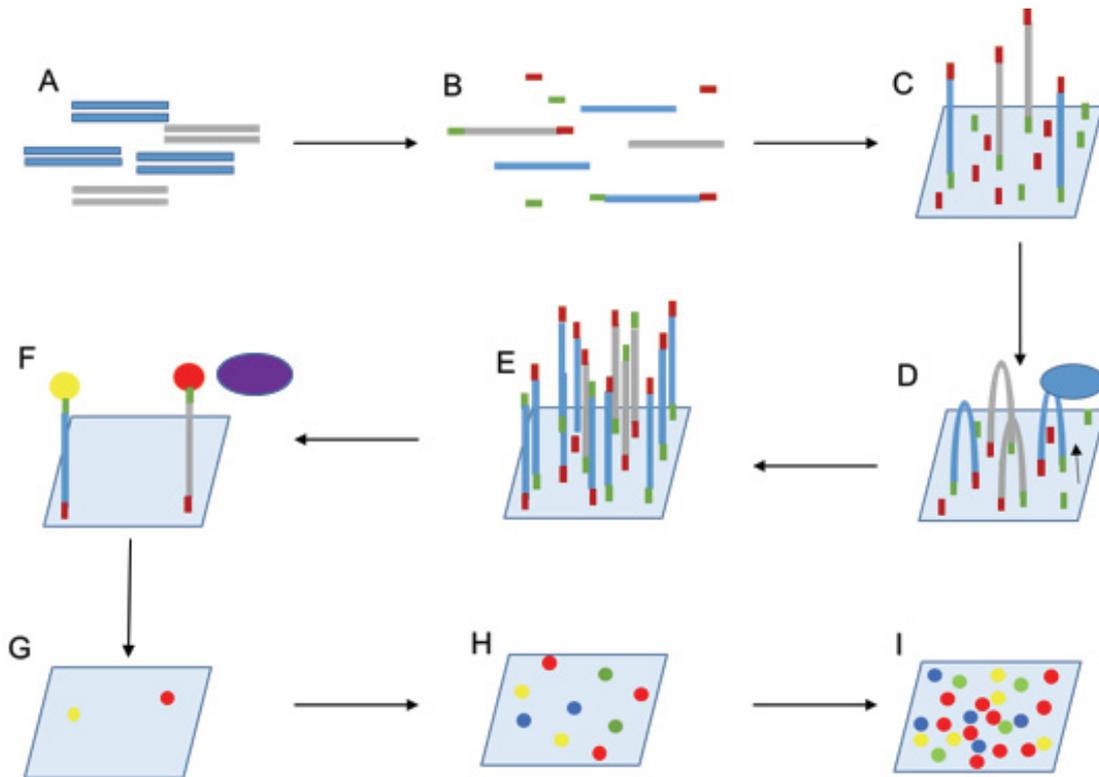


Abb. 10: Prinzip der *bridge*-Amplifikation und *sequence-by-synthesis* (SBS).

A - E: Prinzip der *bridge*-Amplifikation. F - I: SBS

Die DNS-Fragmente (A) lagen nach Denaturierung als Einzelstränge vor und wurden beidseitig mit Adaptoren (in rot bzw. grün gekennzeichnet) legiert (B). Die Adaptor-legierten Enden banden jeweils an korrespondierende Primer auf der Oberfläche der Flusszelle und wurden so immobilisiert (C). Das Reaktionsgemisch (blaue Elipse), welches neben dem Enzym Polymerase auch nicht-markierte Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) beinhaltete, wurde hinzugegeben, sodass komplementäre Stränge synthetisiert wurden (D). Anschließend wurde die neu synthetisierte doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (dsDNS) wieder in Einzelstränge denaturiert (E). Dieser Prozess wurde vielfach durchlaufen, sodass sich millionenfache *cluster* auf der Flusszelloberfläche bildeten, die jeweils identische klonal amplifizierte dsDNS beinhalteten. Das Reaktionsgemisch (violette Elipse), das nun bei der anschließenden SBS verwendet wurde, beinhaltete neben Primern und Polymerase die vier Desoxynukleosidtriphosphate – Desoxy-Adenosin/Guanin/Cytosin/Tyrosin-Triphosphat (dNTPs: dATP, dGTP, dCTP und dTTTP), an die einer von vier Fluoreszenz-markierten Terminatoren reversibel gebunden war (F). Dieser markierte das Ende der durch das Enzym Polymerase katalysierten Polymerisation. Der dabei frei gewordene Fluoreszenzfarbstoff wurde durch einen Laser detektiert und konnte dementsprechend einer bestimmten Base zugeordnet werden (G-I). Eigene Darstellung, Inhalt aus (86).

2.4.7 Bioinformatische Auswertung

Die bioinformatische Auswertung der generierten Illumina-Daten erfolgte analog zur Roche/454-Sequenzierung durch Dres. rer. nat. Maddis Rumming und Alexander Sczyrba, Centrum für Biotechnologie (CeBiTec) der Universität Bielefeld unter Verwendung der *open source pipeline* QIIME.

3 Ergebnisse

3.1 Überblick

3.1.1 Übersicht über die Darstellung der Ergebnisse

Die folgende Darstellung der Ergebnisse zeigt die Analyse des oralen Mikrobioms des Zungenrandes nach Sequenzierung der V1/2-Region der 16S rRNS mittels Roche/454-Plattform. Es schließen sich die Ergebnisse der Sequenzierung der V6/7-Region derselben Proben mittels Illumina HiSeq 2500-Plattform an. Angegeben ist jeweils der prozentuale Anteil der Sequenzierreads, die einer taxonomischen Ordnung zugerechnet werden können. Die Auswertung der Roche/454-Daten umfasst die bis zu 120 Tage nach alloHSZT entnommenen Proben des Patienten UKD1, dessen Abstrichmaterial über diesen Zeitpunkt hinaus bis zu 408 Tage nach alloHSZT ebenfalls mit der Illumina HiSeq 2500-Plattform sequenziert wurde. Des Weiteren erfolgte bei einem weiteren Patienten UKD2 die Analyse des Zungenrandmikrobioms, dessen Ergebnisse nach Durchlauf der Illumina HiSeq 2500-Plattform bis zum Tag 90 nach alloHSZT vorlagen. Nach Darstellung der Ergebnisse der beiden Sequenzier-Plattformen folgt der Vergleich der detektierten Gattungen bei Patient UKD1, aus dessen Abstrichmaterial sowohl die V1/2-Region (Roche/454-Plattform) als auch V6/7-Region (Illumina HiSeq 2500-Plattform) analysiert wurden. Weiterhin ist der interindividuelle Vergleich der jeweiligen Donoren der Patienten UKD1 und UKD2 auf Grundlage der Illumina-Ergebnisse dargestellt.

Als Grundlage der phylogenetischen Untersuchung diente initial die mehrere hundert Basenpaare umfassende V1/2-Region der 16S rRNS. Um die benötigte Leselänge zu erreichen, begann die Etablierung der Roche/454 FLX Titanium-Plattform. Diese ermöglichte es zu jenem Zeitpunkt, die ungefähr 350 bp umfassende oben genannte Region zu entschlüsseln. Der Fortschritt der Sequenzierleistung begründete die Umstellung der Sequenziermethodik auf die Illumina-Plattform. Ausschlaggebend hierfür war insbesondere die erweiterte

Leselänge der DNS-Fragmente und die Generierung deutlich größerer Datenmengen in kürzerer Laufzeit aufgrund eines höheren Durchsatzes an Probenmaterial.

3.1.2 Charakterisierung des Probenausgangsmaterials

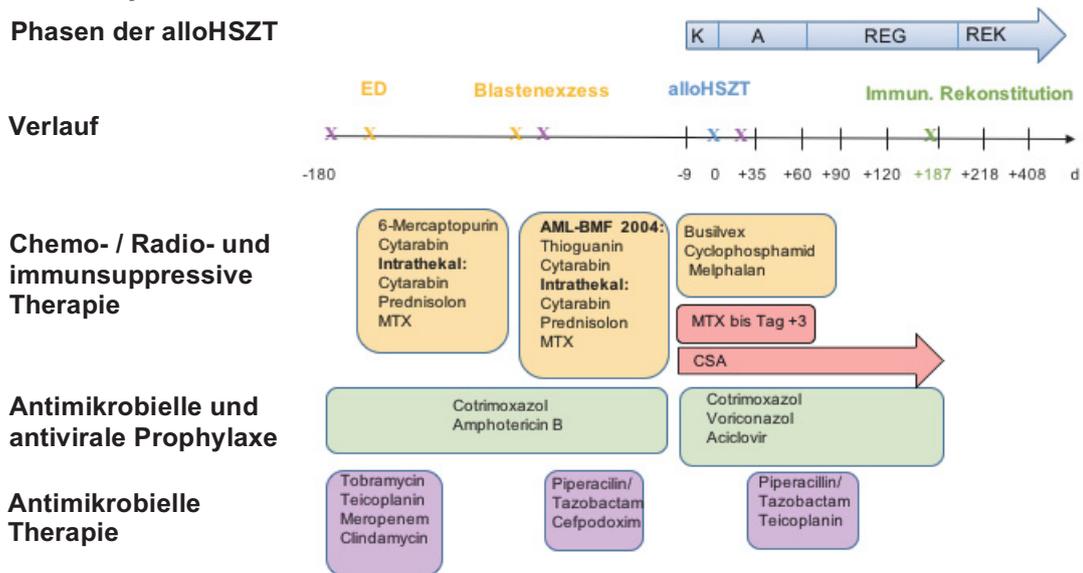
Die analysierten Proben stammen von 2 Patienten, UKD1 und UKD2, deren individuelle Therapien zu den entsprechenden Abstrichzeitpunkten für die Beurteilung des jeweiligen mikrobiellen Verteilungsmusters von Bedeutung ist. Abb. 11A zeigt Krankheits- und Therapieverlauf sowie Abstrichzeitpunkte des Patienten UKD1 mit Diagnose einer AML. Abb. 11B stellt dies analog dazu für den, ebenfalls mit einer AML diagnostizierten, Patienten UKD2 dar. Der Abstrichzeitpunkt der Spenderproben erfolgte parallel zu den vor alloHSZT gewonnenen Proben der Patienten.

Die beiden Spender der Patienten UKD1 und UKD2 sind jeweils gesunde, HLA-identische Geschwister (engl. *matched sibling donors*; MSD). Beide wiesen klinisch keinen Anhalt für Erkrankungen auf.

Die Probenentnahme erfolgte jeweils vor Beginn des Konditionierungsregimes des entsprechenden Patienten. Erhobene Metadaten umfassen Geschlecht und Alter bei alloHSZT beider Patienten und Donoren. Weiterhin sind die Grunderkrankung, deren initiale Therapie sowie die Art des Rezidivs, das zur anschließend notwendigen Transplantation führte, dargelegt. Im Detail sind ebenfalls prophylaktische medikamentöse Behandlungsstrategien aufgeführt. Komplikationen zu den Behandlungszeitpunkten sowie Parameter für den Erfolg der Transplantation, wie vollständiger Spenderchimärismus und komplette immunologische Rekonstitution, sind außerdem datiert (siehe Anhang I).

A Therapieverlauf Patient UKD1

Phasen der alloHSZT



B Therapieverlauf Patient UKD2

Phasen der alloHSZT

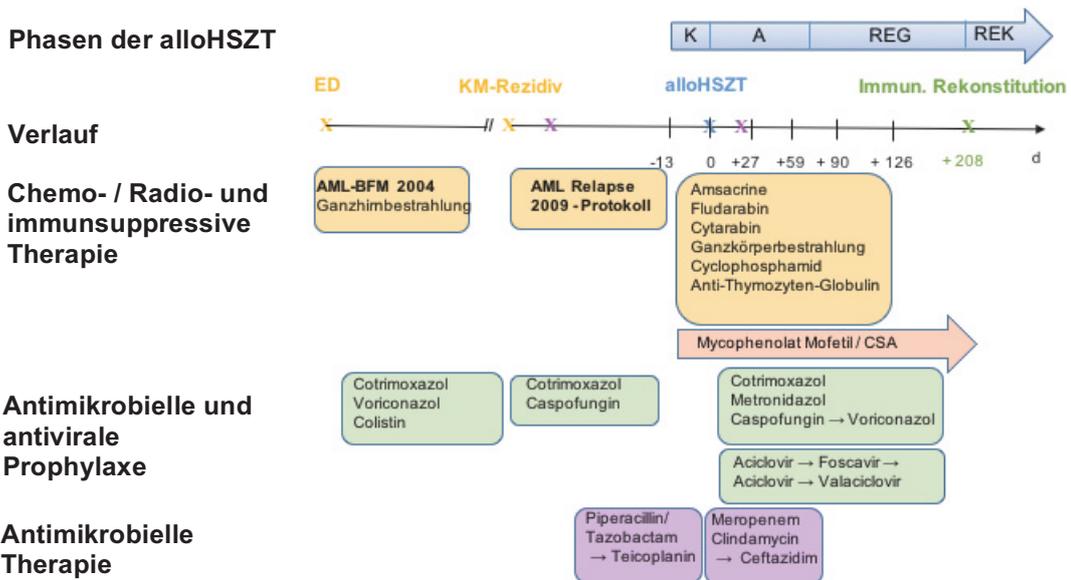


Abb. 11: Darstellung der Behandlungsanlässe, des medikamentösen Therapieverlaufs sowie der Abstrichzeitpunkte. A: Patient UKD1; B: Patient UKD2

Dargestellt sind die Zeitpunkte der Erstdiagnose (ED) und des Blastenexzesses bei Patient UKD1 sowie des späten KM-Rezidivs bei Patient UKD2. Weiterhin sind die Behandlung vor und während unterschiedlicher Phasen der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (alloHSZT) und der Zeitpunkt der immunologischen Rekonstitution gezeigt. Die vier Phasen der alloHSZT umfassen die Konditionierung (K), Aplasie (A), Regeneration (REG) und Rekonstitution (REK). Ebenfalls dargestellt ist der zeitliche Verlauf (schwarzer Pfeil) mit den entsprechenden Ereignissen (farbig markierte X), d.h. lokale/systemische Infekte (violett), Erstdiagnose und Diagnose (ED/D, gelb), Zeitpunkt der alloHSZT (blau) und Nachweis der immunologischen Rekonstitution (grün). Schwarze Teilstriche entsprechen dabei den Abstrichzeitpunkten mit der zugehörigen Anzahl an Tagen (d) vor (-) oder nach (+) alloHSZT, Chemotherapie bzw. Konditionierung im Vorfeld der alloHSZT (gelb-unterlegt), supportive Therapie mit antimikrobieller sowie antiviraler (grün unterlegt) medikamentöser Prophylaxe fanden statt. Immunsuppressiva (rot unterlegt) wurden ebenso wie die Prophylaxe bis zur immunologischen Rekonstruktion gegeben, parallel dazu erfolgte die individuelle antibiotische (violett unterlegt) sowie antivirale Therapie der jeweiligen lokalen/systemischen Infekte.

3.2 Ergebnisse der Roche/454-Sequenzierung mittels QIIME

Die Ergebnisse der insgesamt 5 Proben hinsichtlich der taxonomischen Ordnung auf Phylum- sowie Gattungsebene werden im Folgenden dargelegt. Die gesamten Ergebnisse der Analysen auf Phylum-, Klassen-, Ordnungs-, Familien- und Gattungsebene sind im Anhang tabellarisch dargestellt (siehe Anhang II).

Grundlage sind die Abstrichproben des Zungenrandes des Patienten UKD1 vor alloHSZT, sowie 35, 61 und 120 Tage danach. Das mikrobielle Muster des Zungenrandes des dazugehörigen Spenders ist ebenfalls dargestellt.

Die nachfolgende Abb. 12 zeigt die Ergebnisse der Roche/454-Sequenzierung auf Phylumebene.

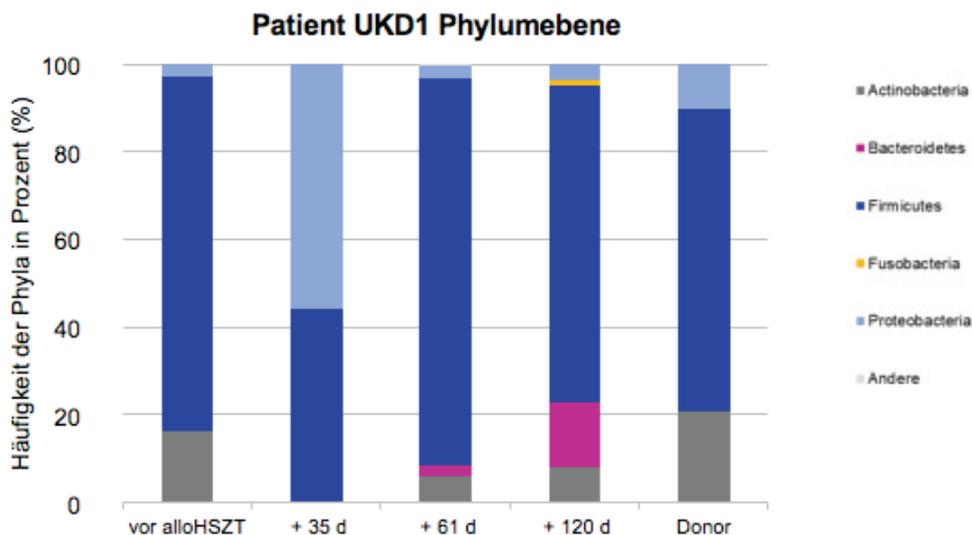


Abb. 12: Ergebnisse der Roche/454-Sequenzierung der Zungenrandabstriche des Patienten UKD1 und des entsprechenden Donors auf Phylumebene.

Dargestellt ist die Häufigkeit der Sequenzierreads in Prozent (%), die dem jeweiligen Phylum zu den vier Entnahmezeitpunkten vor, 35, 61 und 120 Tage (d) nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation (alloHSZT) sowie in der Abstrichprobe des Donors zugeordnet werden. Alle Phyla mit Nachweishäufigkeit <1% sind in der Kategorie „Andere“ zusammengefasst.

Die Auswertung der 4 Patientenproben zu den unterschiedlichen Therapiezeitpunkten ergibt nach der Roche/454-Sequenzierung das Vorkommen der folgenden fünf bakteriellen Phyla in unterschiedlicher

Häufigkeit: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* und *Fusobacteria*.

Die Ergebnisse der Analyse auf Gattungsebene sind analog dazu in Abb. 13 dargestellt.

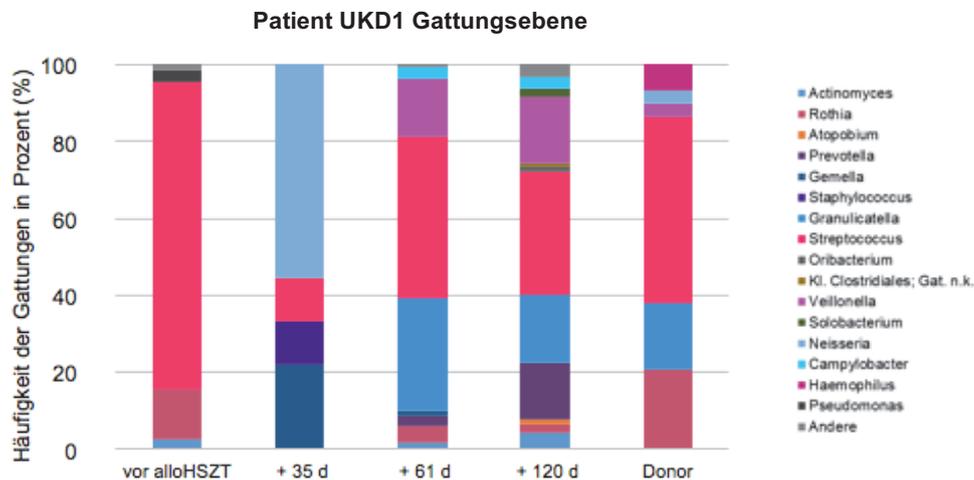


Abb. 13: Ergebnisse der Roche/454-Sequenzierung der Zungenrandabstriche des Patienten UKD1 und des entsprechenden Donors auf Gattungsebene.

Dargestellt ist die Häufigkeit der Sequenzierreads in Prozent (%), die der jeweiligen Gattung zu den vier Entnahmezeitpunkten vor, 35, 61 und 120 Tage (d) nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation (alloHSZT) sowie in der Probe des Donors zugeordnet werden. Bei nicht klassifizierter (n.k.) Gattung (Gat.) wurde die übergeordnete Klasse benannt. Alle Gattungen mit Nachweishäufigkeit <1% sind in der Kategorie „Andere“ zusammengefasst.

Zusammensetzung des Spendermikrobioms

Das Mikrobiom des Donors von Patient UKD1 weist eine Zusammensetzung aus 69,0% *Firmicutes*, 20,7% *Actinobacteria* und 10,3% *Proteobacteria* auf (Abb. 12). Auf Gattungsebene zeigen sich hierbei 6 Gattungen >1% Häufigkeit (Abb. 13). Den größten Anteil an der mikrobiellen Komposition des Zungenrandabstrichs hat dabei die Gattung *Streptococcus* mit 48,3%, gefolgt von 20,7% *Rothia*, 17,2% *Granulicatella* und 6,9% *Haemophilus*. Zu gleichen Anteilen mit je 3,4% liegen *Veillonella* und *Neisseria* vor.

Die Gattungen *Streptococcus*, *Rothia* und *Granulicatella* stimmen hinsichtlich ihres grampositiven Färbeverhaltens und fakultativ anaeroben Wachstumsverhaltens überein. *Haemophilus*-Stäbchen, *Veillonella*-Kokken und *Neisseria*-Diplokokken hingegen zeigen alle gramnegative Färbungseigenschaften. *Haemophilus* und *Neisseria* weisen hierbei ebenfalls

fakultativ anaerobe und aerobe Wachstumseigenschaften auf, wohingegen *Veillonella* das detektierte Spektrum im obligat anaeroben Bereich erweitert.

Dominanz grampositiver Bakteriengattungen vor alloHSZT

Betrachtet man die in Abb. 12 dargestellten Roche/454-Sequenzierungsanalysen des Patienten UKD1 vor alloHSZT auf Phylumebene, so zeigt sich eine Dominanz der *Firmicutes* mit 81,0%, gefolgt von 16,1% *Actinobacteria* sowie 2,9% *Proteobacteria*.

Auf Gattungsebene (Abb. 13) ist *Streptococcus* mit 80,0% am häufigsten zu detektieren. Daneben zeigt die Analyse des Phylums *Actinobacteria* eine Zusammensetzung aus den Gattungen *Rothia* mit 13,2% und *Actinomyces* mit 2,4 %. Weiterhin sind gramnegative Stäbchen der Gattung *Pseudomonas* mit 2,9% aus dem Phylum der *Proteobacteria* nachzuweisen.

Insgesamt wurden bei Patient UKD1 vor alloHSZT nur 4 Gattungen >1% Häufigkeit detektiert. Die Probenentnahme erfolgte unmittelbar vor Einleitung des Konditionierungsregimes.

Vorherrschen der Gattung *Neisseria* 35 Tage nach alloHSZT

Die 35 Tage nach alloHSZT entnommene Abstrichprobe setzt sich hauptsächlich aus *Proteobacteria* mit 55,6% und *Firmicutes* mit 44,4% zusammen. Hierbei präsentiert sich eine starke Dezimierung des *Firmicutes*-Anteils um 36,6% bei gleichzeitig deutlichem Anstieg der *Proteobacteriae* um 52,7% im Vergleich zum Abstrich vor alloHSZT (Abb.12). Auf Gattungsebene (Abb. 13) herrschen die gramnegativen Diplokokken *Neisseriae* mit 55,6% vor. Daneben ist transient die Gattung *Gemella* mit 22,2% nachzuweisen. Außerdem sind zu diesem Zeitpunkt jeweils zu gleichen Anteilen mit 11,1% die Gattungen Staphylo- und Streptokokken nachweisbar.

Zusammenfassend lässt sich damit neben den dominierenden gramnegativen Diplokokken *Neisseria* ein aus grampositiven, obligat aeroben (*Gemella*) bis fakultativ anaeroben (*Staphylo-* und *Streptokokken*) Gattungen bestehendes Mikrobiom des Zungenrandes beschreiben. Es sind 4 Gattungen >1% Häufigkeit zu detektieren.

Verdopplung der Anzahl der detektierten Gattungen mit Dominanz der Gattung *Streptococcus* zum Zeitpunkt 61 Tage nach alloHSZT

61 Tage nach alloHSZT werden mittels Roche/454-Sequenzierung die Phyla *Firmicutes* mit 88,3%, *Actinobacteria* mit 6,2%, *Proteobacteria* mit 3,1% sowie *Bacteroidetes* mit 2,3% nachgewiesen (Abb. 12).

Auffallend ist die Verdopplung der Anzahl der detektierten Gattungen >1% Häufigkeit von 4 in den beiden vorangegangenen Proben auf 8 (Abb. 13). Die Dominanz der *Firmicutes* ist auf einen erneuten Anstieg des *Streptococcus*-Anteils mit 41,9% und der erstmaligen Detektion von *Granulicatella* mit 29,2% sowie *Veillonella*-Kokken mit 15,2% zurückzuführen. Daneben lassen sich in der Analyse 4,5% *Rothia*, 3,0% *Campylobacter*, 1,7% *Actinomyces* sowie 1,5% *Gemella* nachweisen.

Das Spektrum der detektierten Gattungen ist deutlich vielfältiger im Vergleich zur 35 Tage nach alloHSZT entnommenen Probe. Es zeigt sich erneut mit den Gattungen *Streptococcus*, *Granulicatella*, *Rothia*, *Actinomyces* und *Gemella* eine Dominanz der grampositiven Gattungen mit insgesamt 78,8%.

Größte Anzahl detektierter Gattungen 120 Tage nach alloHSZT

120 Tage nach alloHSZT zeigt die Analyse des mikrobiellen Spektrums in der Roche/454-Sequenzierung *Firmicutes* mit 72,2%, *Bacteroidetes* mit 14,9%, *Actinobacteria* mit 7,9%, *Proteobacteria* mit 3,5% und *Fusobacteria* mit 1,4% (Abb. 12). Auf Gattungsebene zeigt sich mit 10 detektierten Gattungen >1% Häufigkeit die größte Anzahl innerhalb der betrachteten Zeitreihe (Abb. 13). Dabei sind *Streptococcus* mit 31,7% und *Granulicatella* mit 17,6% neben *Veillonella* mit 17,2% – wie auch bereits 61 Tage nach alloHSZT – am häufigsten vertreten. Hervorzuheben ist der starke Anstieg der Gattung *Prevotella* (14,8%) im Vergleich zu der 61 Tage nach alloHSZT entnommenen Probe. Erstmals wurde auch die Gattung *Atopobium* mit 1,5% aus dem Phylum der *Actinobacteria* nachgewiesen.

Zusammenfassend zeigt sich weiterhin ein Überwiegen grampositiver, fakultativ anaerober Gattungen mit deutlicher Zunahme der gramnegativen, obligat anaeroben Kommensalen mit insgesamt 35,2%. Letztere umfassen vor allem *Veillonella* und *Prevotella*.

3.3 Analyse der Illumina HiSeq 2500-Sequenzierungsergebnisse mittels QIIME

Die bioinformatische Auswertung der Sequenzen mittels der *open source* Pipeline QIIME zeigt die in Abb. 14 dargestellten Verteilungsmuster des Mikrobioms auf Phylumebene im Abstrich des Zungenrands der beiden Patienten UKD1 und UKD2 sowie der dazugehörigen Spenderproben.

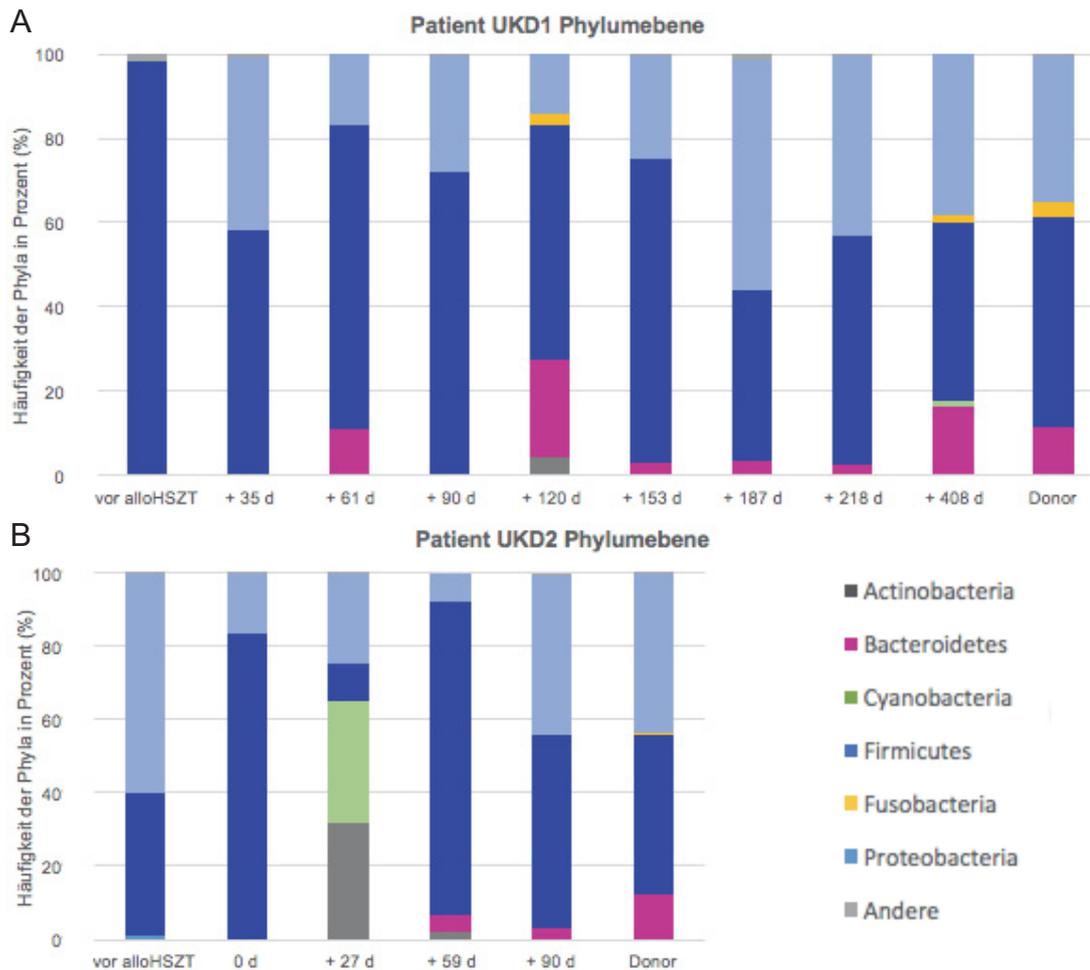


Abb. 14: Ergebnisse der Illumina HiSeq 2500-Sequenzierung der Zungenrandabstriche der Patienten UKD1 und UKD2 sowie der entsprechenden Donoren auf Phylumebene.

A: Patient UKD1 und entsprechender Donor; B: Patient UKD2 und entsprechender Donor. Dargestellt ist die Häufigkeit der Sequenzierreads, die dem jeweiligen Phylum zu den unterschiedlichen Abstrichzeitpunkten vor allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation (alloHSZT) und Anzahl der Tage (d) nach alloHSZT zugeordnet werden. Weiterhin ist zum Vergleich das mikrobielle Muster der entnommenen Spenderprobe (Donor) dargestellt. Alle Phyla mit Nachweishäufigkeit <1% sind in der Kategorie „Andere“ zusammengefasst.

Interindividueller Spendervergleich: Dominanz der Gattung *Haemophilus* in beiden Spenderabstrichen

Die beiden Spenderproben weisen auf Phylumebene *Proteobacteriae*, *Firmicutes* sowie *Bacteriodetes* auf. Bei dem zu Patient UKD2 zugehörigen Spender liegen *Proteobacteriae* und *Firmicutes* zu gleichen Anteilen mit jeweils 43,6% vor, während beim Spender von Patient UKD1 *Firmicutes* mit 50,3% neben *Proteobacteriae* mit 35,0% nachzuweisen waren (Abb. 14A und B).

Einen vergleichbaren Anteil in den Spenderproben der Patienten UKD1 und UKD2 nehmen *Bacteriodetes* mit 11,2% bzw. 12,4% ein.

Die folgende Abb. 15 zeigt das im Anschluss näher erläuterte mikrobielle Verteilungsmuster auf Gattungsebene. Die gesamten Ergebnisse zur Verteilung auf Phylum-, Klassen-, Ordnungs-, Familien- und Gattungsebene erfolgen tabellarisch im Anhang (siehe Anhang II).

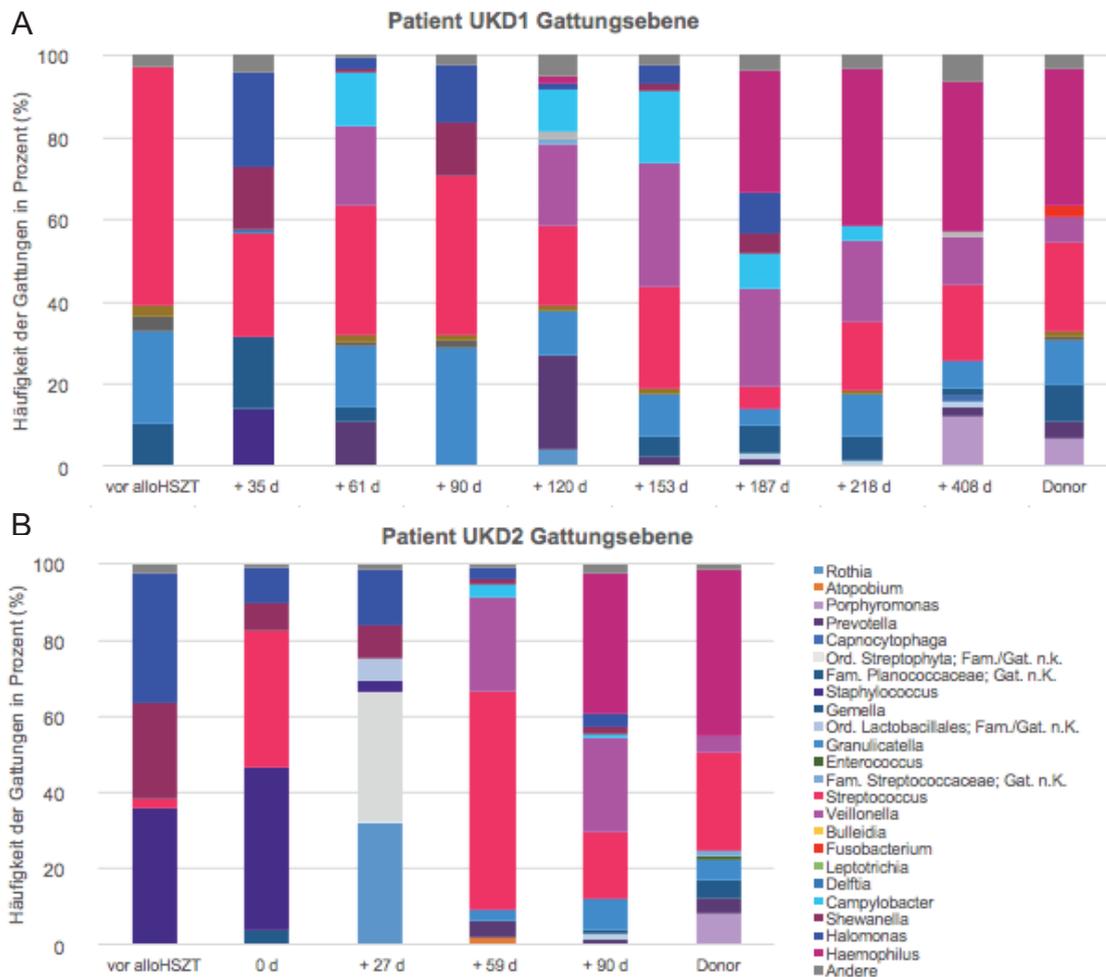


Abb. 15: Darstellung der Illumina HiSeq 2500-Sequenzierungsergebnisse auf Gattungsebene. A: Patient UKD1 und entsprechender Donor; B: Patient UKD2 und entsprechender Donor. Dargestellt ist die prozentuale Häufigkeit der Sequenzierreads, die der jeweiligen Gattungen zu den unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten vor, am jeweiligen Tag (d) nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation (alloHSZT) und der einmalig entnommenen Spenderprobe zugeordnet werden. Bei einigen Spezies konnte die Gattung (Gat.) oder auch die Familie (Fam.) nicht klassifiziert (n.k.) werden. In diesem Fall wurde die übergeordnete Hierarchie dargestellt. Alle Gattungen mit Nachweishäufigkeit <1% sind in der Kategorie „Andere“ zusammengefasst.

Auf Gattungsebene zeigt sich *Haemophilus* sowohl beim Spender von Patient UKD1 mit 33,2% als auch beim Spender von Patient UKD2 mit 42,9% am häufigsten vertreten (Abb. 15A und B). Im Abstrich des Spenders des Patienten UKD1 folgt *Streptococcus* mit 21,8% als zweithäufigste Gattung. Weiterhin sind *Granulicatella* mit 10,5%, *Gemella* mit 8,9%, *Porphyromonas* mit 6,6%, *Veillonella* mit 5,9% sowie *Prevotella* mit 4,3% nachweisbar. In geringeren Anteilen zeigen sich ebenfalls *Fusobacterium* und *Enterococcus* mit 2,9% bzw.

1,2% (Abb. 15A). Insgesamt zeigt die Probe eine Vielfalt von 9 detektierten Gattungen >1% Häufigkeit.

Bei dem zu Patient UKD2 zugehörigen Spender lässt sich ebenfalls als zweithäufigste Gattung *Streptococcus* mit 25,6% gefolgt von *Porphyromonas* mit 8,2% nachweisen. Weiterhin setzt sich die Spenderprobe in ähnlichen Anteilen aus *Granulicatella* mit 5,5%, *Gemella* mit 4,7%, *Veillonella* mit 4,5% und *Prevotella* mit 3,9% zusammen (Abb. 15B). Insgesamt ließen sich in dieser Probe 8 Gattungen >1% Häufigkeit detektieren.

Reduzierte Anzahl detektierter Gattungen bei Patienten vor alloHSZT

Die Untersuchung der Probe des Patienten UKD1 (Abb. 14A) vor alloHSZT ergibt auf der Phylumbene einen überwiegenden Anteil *Firmicutes* mit 98,4%. Die Zusammensetzung des Mikrobioms des Zungenrandes von Patient UKD2 zeigt dagegen nur 39,4% *Firmicutes* und 60,2% *Proteobacteriae* (Abb. 14B).

Auf Gattungsebene betrachtet setzt sich die bei Patient UKD1 unmittelbar vor Beginn der Konditionierung vor alloHSZT entnommene Probe zu einem überwiegenden Anteil aus 4 physiologischen Gattungen zusammen: 57,9% *Streptococcus*, 22,4% *Granulicatella*, 10,3% *Gemella* und 3,6% *Enterococcus* (Abb. 15A).

Patient UKD2 zeigt auf Gattungsebene folgendes Spektrum: beginnend mit der Analyse der Probe vor alloHSZT dominieren die 3 Bakteriengattungen *Staphylococcus* mit 35,6%, gefolgt von den *Gammaproteobacteriae Halomonas* mit 33,3% und 25,0% *Shewanella*. *Streptococcus* stellt mit 2,0% einen geringen Anteil in dieser Probe dar (Abb. 15B).

Dementsprechend zeigt sich – analog zu Patient UKD1 – auch eine verhältnismäßig geringe Breite des detektierten bakteriellen Spektrums mit lediglich 4 Gattungen >1% Häufigkeit. Die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft hingegen setzt sich sowohl aus grampositiven als auch gramnegativen fakultativ anaeroben Mitgliedern zusammen.

Verschiebung des mikrobiellen Spektrums des Patienten UKD1 vier Wochen nach alloHSZT

Die Probe von Patient UKD1 zeigt am Tag 35 nach alloHSZT mit 58,4% einen überwiegenden – wenn auch stark dezimierten – Anteil an *Firmicutes*. Dagegen – anteilmäßig deutlich angestiegen – sind die *Proteobacteriae* mit 41,0% (Abb. 14A).

Übertragen auf die Gattungsebene zeigt sich *Streptococcus* stark reduziert, stellt jedoch immer noch mit 24,6% den stärksten Anteil dar. Dahingegen deutlich zugenommen haben die gramnegativen Gattungen *Halomonas* und *Shewanella* mit 22,5% bzw. 15,1%. Außerdem wurden *Gemella* und *Staphylococcus* mit einem Anteil von 17,2% bzw. 13,9% nachgewiesen. (Abb. 15A).

Zusammenfassend wurden in der Probe 35 Tage nach alloHSZT 6 Gattungen >1% Häufigkeit nachgewiesen und dabei ca. ein Drittel Bakterien aus dem gramnegativem Spektrum.

Dominanz der *Firmicutes* mit den Gattungen *Strepto-* und *Staphylococcus* an Tag 0 nach alloHSZT bei Patient UKD2

Vom Patienten UKD2 liegt zusätzlich eine Probe am Tag 0 der alloHSZT nach 12-tägiger Konditionierung sowie gezielter antibiotischer Therapie vor. Darin überwiegen *Firmicutes* mit 83,3%, *Proteobacteriae* sind nur noch mit 16,5% vertreten (Abb. 15B). Auf Gattungsebene sind nun 42,8% *Staphylococcus* und 35,9% *Streptococcus* vertreten. Innerhalb der Klasse der *Gammaproteobacteriae* sind die Gattungen *Halomonas* und *Shewanella* mit 9,3% bzw. 6,8% deutlich dezimiert (Abb. 15B).

Insgesamt lässt sich bei der hauptsächlich 4 Gattungen umfassenden Probe eine deutliche Verschiebung in ein grampositives Spektrum verzeichnen.

Dominanz der Ordnung *Streptophyta* 27 Tage nach alloHSZT bei Patient UKD2

27 Tage nach alloHSZT weist Patient UKD2 ein deutlich verändertes mikrobielles Spektrum auf: *Cyanobacteriae* und *Actinobacteriae* dominieren mit jeweils 33,6% und 31,6%, gefolgt von *Proteobacteriae* mit 24,3% sowie *Firmicutes* mit 10,1% (Abb. 14B). Auf Gattungsebene zeigt sich unter bestehender GvHD-Prophylaxe mit Metronidazol der zuvor dominante *Staphylococcus*- und *Streptococcus*-Anteil deutlich reduziert auf 2,7% bzw. 0,8%. Dahingegen dominiert nun mit 33,6% das Bakterienspektrum des Phylums der *Cyanobacteria*, Klasse *Chloroplast* mit der Ordnung der *Streptophyta*. Familien- sowie Gattungszugehörigkeit konnten mittels QIIME-Analyse nicht zugeordnet werden. *Rothia* aus dem Phylum der *Actinobacteria* ist mit 31,5% vertreten. Wie auch in der Vorprobe zeigt sich der – im Vergleich zur Probe vor alloHSZT – deutlich dezimierte Anteil der *Gammaproteobacteriae* stabil. Die dem Phylum der *Firmicutes* zugehörige Ordnung der *Lactobacillales* ist ebenfalls einmalig mit 5,6% zu detektieren. Auch hier war eine Familien- bzw. Gattungszuordnung nicht möglich (Abb. 15B).

Transiente Verschiebung des Spektrums der *Proteobacteriae* 2 Monate nach alloHSZT bei Patienten UKD1

61 Tage nach alloHSZT zeigen sich bei Patient UKD1 ein erneuter Anstieg des zuvor gefallenen *Firmicutes*-Anteils auf 72,0% sowie ein gleichzeitiger Abfall der *Proteobacteriae* auf 16,8%. Zudem lässt sich mit 11,1% ein deutlicher Anstieg der *Bacteroidetes* nachweisen (Abb. 14A). Der Anteil der Gattung *Streptococcus* bleibt auch 61 Tage nach alloHSZT mit 31,6% verhältnismäßig hoch. Auffällig ist hingegen die transiente Verschiebung des Spektrums der *Proteobacteriae* von den *Gamma*- zu den *Epsilonproteobacteriae* mit 13,0% *Campylobacter*-Anteil. Ebenfalls zeigt sich eine deutliche Vermehrung innerhalb des Phylums *Clostridiae* mit 19,3% der Gattung *Veillonella* sowie 11,0% *Prevotella* aus dem Phylum der *Bacteroidetes* (Abb. 15A).

Zu diesem Zeitpunkt zeigt sich unter Reduktion der antibiotischen Therapie mit Absetzen der antimikrobiellen Cotrimoxazol-Prophylaxe eine Zunahme der >1% detektierten Gattungen auf eine Gesamtanzahl von 9.

Dominanz der Gattung *Streptococcus* 2 Monate nach alloHSZT des Patienten UKD2

In der Probe 59 Tage nach alloHSZT dominieren erneut *Firmicutes* mit 85,5%, gefolgt von *Proteobacteriae* und *Bacteroidetes* mit 7,8% bzw. 4,8%. Die zuvor vorherrschenden *Cyanobacteriae* sind zu diesem Zeitpunkt nicht mehr zu detektieren (Abb. 14B).

Auf Gattungsebene dominiert hierbei *Streptococcus* mit 56,2%, erstmalig gefolgt von *Veillonella* mit 24,6%. Hinsichtlich der *Proteobacteriae* zeigt sich eine weitere Reduktion der *Gammaproteobacteriae* *Shewanella* und *Halomonas* auf 1,3% bzw. 2,8%. Gleichzeitig zeigt sich unter den *Epsilonproteobacteriae* einmalig mit einem Anteil von 3,4% *Campylobacter*. Ebenfalls vorhandene Gattungen sind *Prevotella* mit 4,7% sowie *Granulicatella* mit 2,8% (Abb. 15B).

Zusammengefasst beinhaltet die am Tag 59 nach alloHSZT entnommenen Probe 8 detektierte Gattungen >1% Häufigkeit.

Reduzierte Vielfalt der detektierten Gattungen in der Abstrichprobe des Patienten UKD1 3 Monate nach alloHSZT

90 Tage nach alloHSZT des Patienten UKD1 erweist sich der Anteil *Firmicutes* mit 71,7% nahezu konstant zur Vorprobe. *Bacteroidetes* hingegen zeigen wieder eine Verminderung mit nur noch 0,3%, wohingegen der Anteil der *Proteobacteria* im Vergleich zur Vorprobe auf 27,9% ansteigt (Abb. 14A).

Auf Gattungsebene erreicht *Granulicatella* mit 28,9% zu diesem Zeitpunkt den höchsten Anteil an der mikrobiellen Flora des Zungenrandes. Zudem ändert sich die Zusammensetzung der *Proteobacteriae* mit 13,3% *Shewanella* und

13,9% *Halomonas*. *Streptococcus* lässt sich weiterhin als dominierender Bestandteil mit 38,1% nachweisen (Abb. 15A).

Das mikrobielle Spektrum zeigt zu diesem Abstrichzeitpunkt eine Reduktion auf 5 Gattungen >1% Häufigkeit.

Größte Anzahl detektierter Gattungen 3 Monate nach alloHSZT des Patienten UKD2 mit Dominanz der Gattung *Haemophilus*

In der Analyse der 90 Tage nach alloHSZT entnommenen Probe des Patienten UKD2 zeigen die vorher stark dominierenden *Firmicutes* einen deutlichen Rückgang auf 52,7%, verbunden mit einem starken Anstieg des Anteils der *Proteobacteriae* auf 43,7%. Der Anteil der *Bacterioidetes* sinkt auf 2,9% (Abb. 14B).

Auf Gattungsebene dominiert *Haemophilus* mit 36,7%, gefolgt von einem im Vergleich zur Vorprobe stabilen Anteil an *Veillonella* mit 24,4%. Deutlich reduziert auf 17,3% zeigt sich dahingegen der *Streptococcus*-Anteil. Innerhalb der *Proteobacteriae* bestehen Schwankungen hinsichtlich der Zusammensetzung mit einer Abnahme von *Campylobacter* auf 1,0% sowie einer leichten Zunahme von *Halomonas* und *Shewanella* auf 3,4% bzw. 1,8% (Abb. 15B).

Damit weist der Abstrichzeitpunkt 90 Tage nach alloHSZT bei Patient UKD2 eine leichte Verschiebung zu gramnegativen Gattungen auf mit insgesamt 10 Bakteriengattungen >1% Häufigkeit.

Erneuter Anstieg detektierter Gattungen 4 Monate nach alloHSZT bei Patient UKD1

120 Tage nach alloHSZT zeigt sich bei Patient UKD1 ein erneuter Abfall der *Firmicutes* auf 55,9% und *Proteobacteria* auf 14,3% verbunden mit einem starken Anstieg der *Bacterioidetes* auf 23,0%. Weiterhin lässt sich ein transienter Anstieg der *Actinobacteria* auf 4,3% und *Fusobacteriae* auf 2,5% detektieren (Abb. 14A).

Auf Gattungsebene zeigt sich eine starke Erhöhung von *Prevotella* mit 22,7% mit Verdrängung der bisher dominierenden *Streptococcus* mit 19,1%. Zudem zeigt sich eine deutliche Vermehrung von *Veillonella* mit 19,6% und *Campylobacter* mit 10,1% (Abb.15A).

Die Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft liegt damit deutlich im gramnegativen sowie obligat anaeroben Bereich und zeigt mit 10 detektierten Gattungen >1% ein breites Verteilungsmuster.

Vorherrschende Gattung *Veillonella* und Erhöhung von *Campylobacter* 153 Tage nach alloHSZT bei Patienten UKD1

In der Probe 153 Tage nach alloHSZT von UKD1 zeigt sich weiterhin eine deutliche Dominanz der *Firmicutes* mit 72,3%. Ebenfalls erneut zugenommen hat der Anteil der *Proteobacteria* mit 24,3%. Dahingegen zeigen sich *Bacteroidetes* deutlich reduziert auf 2,9% (Abb.14A).

Auf Gattungsebene zeigt die entnommene Abstrichprobe eine Vermehrung von *Veillonella* auf 29,9% sowie einen deutlichen Anstieg des *Campylobacter*-Anteils auf 17,5%. *Streptococcus* ist weiterhin mit 24,6% vertreten, sowie auch *Granulicatella* mit 10,3%. Der *Prevotella*-Anteil ist in dieser Probe mit 2,5% wieder reduziert, wohingegen *Gemella* mit 4,9% und *Halomonas* mit 4,5% angestiegen sind (Abb. 15A).

Insgesamt sind in dieser Probe 8 Gattungen mit einer Häufigkeit >1% vertreten.

Dominanz der Gattung *Haemophilus* 187 Tage nach alloHSZT bei Patient UKD1

Auffällig ist 187 Tage nach alloHSZT der dominierende Anteil der Klasse *Gammaproteobacteriae*, der sich hauptsächlich aus *Haemophilus* mit 29,7%, *Halomonas* mit 9,7% und *Shewanella* mit 4,8% zusammensetzt. Dahingegen ist die Klasse der *Epsilonproteobacteriae* mit der Gattung *Campylobacter* im Vergleich zur Vorprobe wieder deutlich dezimiert auf 8,7% (Abb. 15A und Klassenzuordnung Anhang III.II). Die initial vor alloHSZT sowie zum Zeitpunkt

35 und 90 Tage danach nicht detektierbare Gattung *Veillonella* weist – wie auch in den vorangegangenen Proben – mit 23,8% einen relativ hohen Anteil auf. Der an den vorherigen Entnahmezeitpunkten hohe *Streptococcus*-Anteil ist dahingegen deutlich auf 5,5% dezimiert. Die gleiche Entwicklung lässt sich auch für die Gattung *Granulicatella* mit einem Vorkommen von 4,1% beschreiben. Dahingegen zeigt *Gemella* einen weiteren Anstieg auf 6,3%, welcher auch 218 Tage nach alloHSZT zunächst mit 5,9% stabil bleibt (Abb. 15A).

Zusammengefasst zeigt sich auch in dieser Probe eine deutliche Dominanz der gramnegativen, fakultativ bis obligat anaeroben Bakteriengattungen. Erstmals in der Probe vom Tag 187 nach alloHSZT lässt sich mit 1,8% die Gattung *Capnocytophaga* detektieren, die sich auch an den weiteren zwei folgenden Untersuchungszeitpunkten 218 und 408 Tage nach alloHSZT mit 1,5% und 1,4% stabil zeigt.

Insgesamt zeigen sich erneut 10 detektierbare Gattungen >1% Häufigkeit.

Dominanz der Gattung *Haemophilus* im weiteren Verlauf bis Tag 408 nach alloHSZT bei Patient UKD1

Das mikrobielle Spektrum weist an den Tagen 218 mit 38,1% und 408 mit 36,1% eine deutliche Dominanz von *Haemophilus* auf. Annähernd stabil bleibt der *Streptococcus*-Anteil, der sich nach initial deutlicher Reduktion wieder 218 Tage nach alloHSZT auf 16,7% und 408 Tage nach alloHSZT auf 18,7% erhöht hat. Der vorher beschriebene relativ hohe Anteil an *Veillonella* verringert sich bis Tag 218 auf 19,9% und dann weiter bis Tag 408 nach alloHSZT auf 11,5%. Ebenso ist *Campylobacter* an Tag 218 mit 3,2% sowie an Tag 408 mit 0,6% weiter reduziert. Dezimiert ist auch *Gemella* mit 1,6% im Vergleich zur Vorprobe an Tag 218 Tage mit 5,9% Häufigkeit. Gleiches lässt sich für die Gattung *Granulicatella* mit 6,5% beschreiben. Auffällig ist zuletzt in diesem Zeitraum der einmalig gemessene Anteil von 12,3% *Porphyromonas* 408 Tage nach alloHSZT (Abb. 15A). Über den letzten Zeitraum sind 7 bzw. 9 Bakteriengattungen >1% Häufigkeit nachweisbar.

3.4 Vergleich der Sequenziererergebnisse mit Roche/454 FLX Titanium- sowie Illumina HiSeq 2500-Plattform

Im Folgenden ist der Vergleich der Sequenziererergebnisse der Roche/454- und Illumina-Plattform der identischen Ausgangsproben dargestellt. Zur phylogenetischen Analyse liegen unterschiedliche Bereiche der bakteriellen 16S rRNS zugrunde, für die Roche/454-Plattform die der V1/2-Region und für die Illumina-Plattform die der V6/7-Region.

In Abb. 16 sind die jeweils detektierten Phyla mit Häufigkeit >1% aus der identischen Ausgangsprobe nach Durchlauf beider Sequenziermethoden gegenübergestellt. Sowohl in der Roche/454- als auch der Illumina-Sequenzierung zeigen sich folgende 5 Phyla: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* und *Fusobacteria*.

Dabei stellt das Phylum *Firmicutes* nach Analyse mit beiden Sequenziermethoden den dominierenden Anteil dar. Ausnahme besteht nur nach Detektion der 35 Tage-Probe unter Nutzung der Roche/454-Sequenzierung, die einmalig einen überwiegenden Anteil an *Proteobacteriae* ergab. Auffällig sind die Unterschiede in der Detektion der Phyla *Actinobacteria* und *Bacteroidetes*. *Actinobacteria* werden entsprechend häufiger in der Roche/454-Sequenzierung nach Amplifikation der V1/2-Region detektiert, z.B. in der Patientenprobe vor alloHSZT 16,1% vs. 0,7% und in der Donorprobe 20,7% vs. 0,3%. Gegenläufig zeigt sich dies für *Bacteroidetes*, z.B. in der Probe Tag 61 2,3% vs. 11,1% und in der Donorprobe 0% vs. 11,2% (Abb. 16A und B).

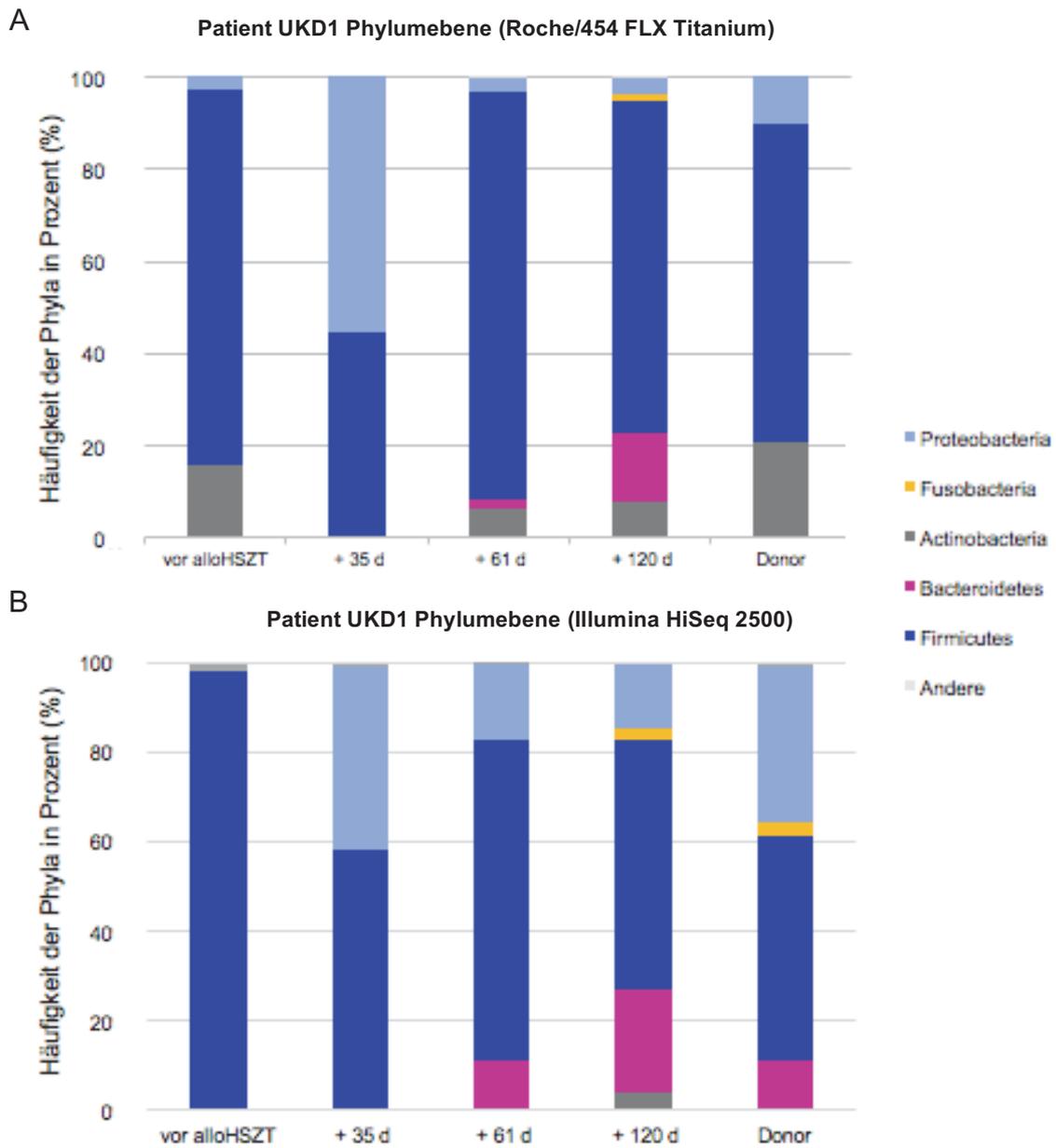


Abb. 16: Phylumvergleich des Zungenrandes des Patienten UKD1 und entsprechenden Donors nach Roche/454 FLX Titanium- und Illumina HiSeq 2500-Sequenzierung.

A: Phylumebene nach Roche/454 FLX Titanium-Sequenzierung; B: Phylumebene nach Illumina HiSeq 2500-Sequenzierung.

Dargestellt ist die Häufigkeit der Sequenzierreads, die dem jeweiligen Phylum zu den unterschiedlichen Abstrichzeitpunkten vor alloHSZT bzw. Anzahl der Tage (d) nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation (alloHSZT) zugeordnet werden können. Weiterhin ist zum Vergleich das mikrobielle Muster der jeweils einmalig entnommenen Spenderprobe (Donor) dargestellt. Alle Phyla mit Nachweishäufigkeit <1% sind in der Kategorie „Andere“ zusammengefasst.

In Abb. 17 sind die entsprechenden Daten auf Gattungsebene gegenübergestellt.

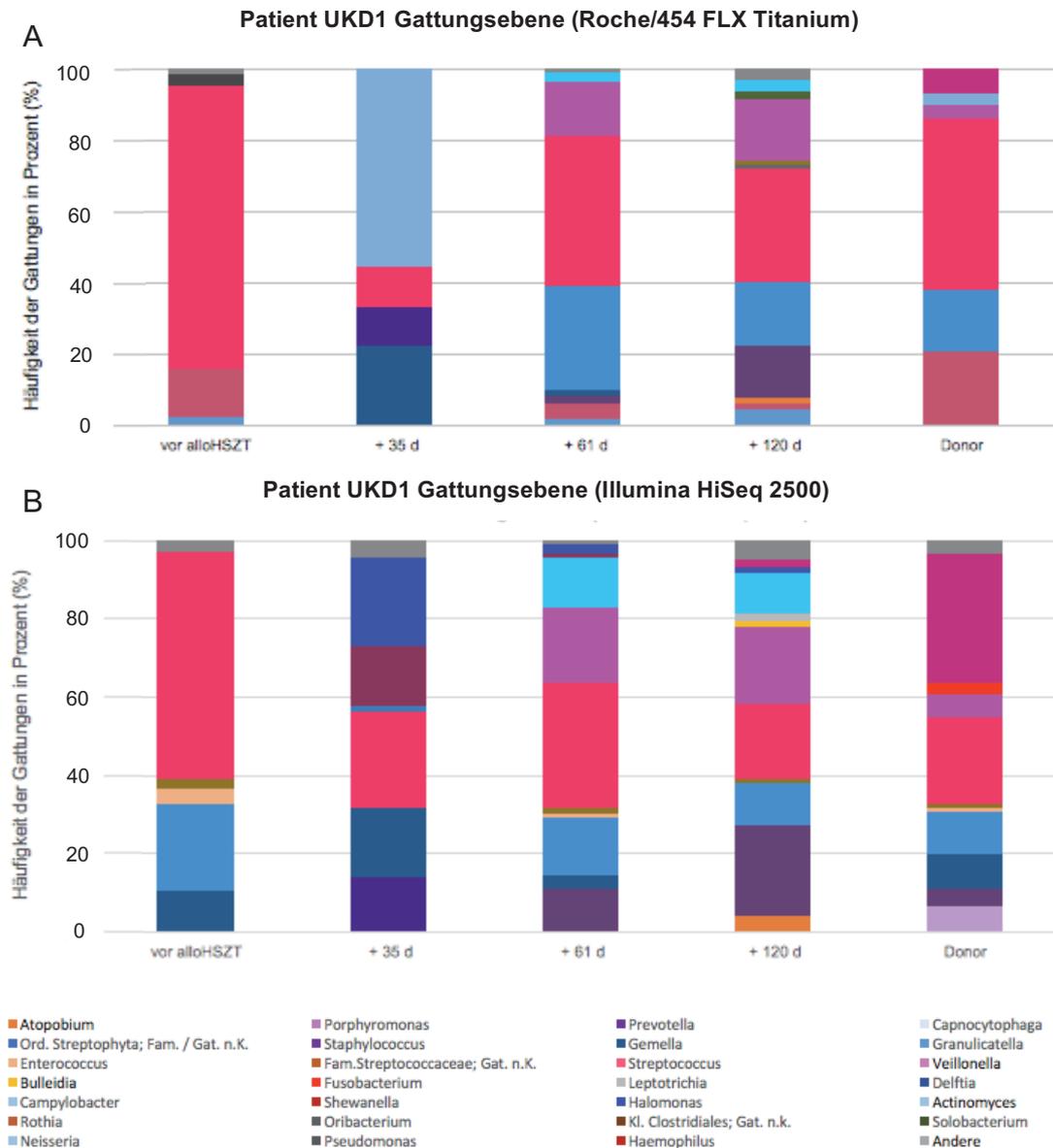


Abb. 17: Gattungsvergleich des Zungenrandes des Patienten UKD1 und entsprechenden Donors nach Roche/454 FLX Titanium- und Illumina HiSeq 2500-Sequenzierung.

A.: Gattungsebene nach Roche/454 FLX Titanium Sequenzierung; B.: Gattungsebene nach Illumina HiSeq 2500-Sequenzierung.

Dargestellt sind die den entsprechenden Sequenzierreads zugeordneten Häufigkeiten der Gattungen zu den unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten (Anzahl der Tage d nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation (alloHSZT)) sowie die einmalig entnommene Spenderprobe. Alle Gattungen mit Nachweishäufigkeit <1% sind in der Kategorie „Andere“ zusammengefasst.

Im übereinstimmenden Beobachtungszeitraum der Patientenprobe bis 120 Tage nach alloHSZT zeigt der Vergleich der Analysemethoden übereinstimmend eine zunehmende Anzahl detektierter Gattungen mit Häufigkeit >1% bis zu maximal 10 an Tag 120. Der Vergleich der Spenderprobe ergibt bzgl. der Häufigkeit detektierter Gattungen >1% nach Roche/454-Sequenzierung eine Anzahl von 6 und nach Illumina-Sequenzierung eine Anzahl von 9 (Abb. 17A und B).

Wie bereits zuvor auf Phylumebene beschrieben stellen sich die Unterschiede zwischen den beiden Sequenziermethoden auf Gattungsebene wie folgt dar: So lässt sich *Rothia* in 4 von 5 Proben mittels Roche/454-Sequenzierung der V1/2-Region in einer Häufigkeit deutlich >1% – bis zu 20,7% in der Spenderprobe – nachweisen, jedoch in keiner der Proben >1% Häufigkeit mittels Illumina-Sequenzierung der V6/7-Region. *Haemophilus* dagegen lässt sich mittels Illumina-Methode in der Spenderprobe mit 33,2% nachweisen, im Gegensatz zur Roche/454-Methode mit 6,9%. Auch die Gattung *Campylobacter* lässt sich mit Einsatz der Illumina-Methode deutlicher darstellen als mit der Roche/454-Methode, z.B. in den Abstrichproben 61 und 120 Tage nach alloHSZT mit 13,0% und 10,1% vs. 3,0% und 3,2%. *Streptococcus* ist mit beiden Methoden zu detektieren, mit Ausnahme der Probe am Tag 35 nach alloHSZT vermehrt mittels Roche/454. So wurde z.B. in der Probe vor alloHSZT mit der Roche-Methode 80,0% vs. 57,9% mit der Illumina-Methode detektiert. Auffällig sind ebenfalls Unterschiede in der Detektion der Gattung *Neisseria*, z.B. in der Probe 35 Tage nach alloHSZT mit einem Anteil von 55,6% mittels Roche/454-Plattform vs. 0,1% mittels der Illumina-Plattform. Dagegen lässt sich die Gattung *Prevotella* mittels Illumina-Plattform häufiger nachweisen als mit der Roche/454-Plattform. Für die Gattungen *Gemella* und *Granulicatella* lässt sich kein klarer Trend erkennen. So wurde z.B. in der Probe vor alloHSZT *Gemella* mit einer Häufigkeit von 10,3% mittels Illumina-Methode nachgewiesen vs. nicht detektierbar mittels Roche/454-Methode. In der Probe von Tag 35 nach alloHSZT wurde dagegen mittels Illumina-Methodik für *Gemella* nur eine Häufigkeit von 17,2% vs. 22,2% mittels Roche/454-Methodik gezeigt. Auch bei *Granulicatella* wurde in der Probe vor alloHSZT mittels Illumina-Plattform eine Häufigkeit von 22,4% vs. 0,5% mittels Roche/454-Methode nachgewiesen, bei

der Probe 61 Tage nach alloHSZT dagegen nur 15,0% mittels Illumina- vs. 29,2% mittels Roche/454-Methode.

Neben diesen zuvor genannten Differenzen ließen sich verschiedene Gattungen zu einzelnen Untersuchungszeitpunkten nur mit einer der beiden Methoden darstellen, so z.B. *Halomonas*, *Shewanella* und *Enterococcus* nur mit der Illumina-Methode und *Pseudomonas* nur mit der Roche/454-Methode. Vergleichbare Häufigkeiten lassen sich bei den Gattungen *Staphylococcus* und *Veillonellae* darstellen (Abb. 17A und B).

4 Diskussion

4.1 Wahl der Sequenzierungsplattform

Mit der Identifikation von Mikroorganismen und ihrer taxonomischen Zuordnung beschäftigt sich die Menschheit seit vielen Generationen. Die Entwicklung von Nachweismethoden erfolgte in einem fortwährenden dynamischen Prozess, anfänglich über mikroskopische Untersuchungen – vornehmlich des Phänotyps – und kulturabhängige Verfahren mit Bestimmung morphologischer, physiologischer und biochemischer Merkmale bis hin zu kulturunabhängigen Verfahren. Insbesondere der Kenntniszuwachs hinsichtlich komplexer mikrobieller Lebensgemeinschaften ist durch die Möglichkeiten der 16S rRNS-Gen-Analyse revolutioniert worden.

In der phylogenetischen RNS-Analytik besteht bzgl. der Anzahl der die Mundhöhle besiedelnden Mikroorganismen weitgehende Einigkeit: 770 Taxa auf Speziesebene sind bis zum aktuellen Zeitpunkt (Stand Oktober 2018) in der Human Oral Microbiome Database verzeichnet (19, 87).

Dagegen ist die Kultivierung von Mikroorganismen mit anschließender mikroskopischer und konventionell-biochemischer Spezifizierung ein kosten- und arbeitsintensives Verfahren, welches darüber hinaus nicht umfassend in der Lage ist, das komplette mikrobielle Spektrum eines Habitats zu erfassen. So bezifferten Dewhirst *et al.* den Anteil der nicht – oder noch nicht – kultivierbaren Spezies auf etwa ein Drittel (19).

Die Wahl der Sequenzierungsmethode richtete sich in diesem Studiendesign initial nach der Leseweite einer Sequenz unter der Annahme, dass die Entschlüsselung entsprechend langer DNS-Matrizen zu validen phylogenetischen Ergebnissen führt. Mit der Roche/454-Pyrosequenzierung war im Vergleich zu anderen Sequenzierungsmethoden die Entschlüsselung deutlich längerer DNS-Fragmente möglich. So konnte im Jahr 2004 die Roche/454-Plattform als erste kommerziell eingeführte Sequenzierungsmethode DNS-Matrizen mit bis zu 250 bp verarbeiten und dabei über 200.000 Sequenzierreads mit einem Output von 100 MB in einem ca. 7-stündigen Sequenzierlauf generieren (84).

Mit Einführung des Roche/454 GS FLX Titanium Systems 4 Jahre später wurde die Leseweite der Sequenzen auf bis zu 700 bp erweitert. Dabei konnten innerhalb eines ganztägigen Sequenzierlaufs etwa 1 Million Sequenzierreads mit einer Genauigkeit von bis zu 99,9% generiert werden. Die entsprechende Datenmenge betrug etwa 0,7 GB (88).

Der Vorteil der Entschlüsselung langer Sequenzen von bis zu 700 bp kombiniert mit der Schnelligkeit der Durchführung begründeten zunächst die Etablierung der Roche/454-Pyrosequenzierung zur Analyse des oralen Mikrobioms stammzelltransplantierter pädiatrischer Patienten in diesem Studiendesign.

Zu diesem Zeitpunkt konnten mit dem neu auf den Markt eingeführten Solexa Genome Analyzer (später Übernahme durch Illumina Inc.) zunächst nur etwa 32-40 bp mit einer Datenmenge von 1300 MB innerhalb von 7 Tagen generiert werden (88). Mit der weiteren Optimierung stand dann in Form der Illumina HiSeq 2500-Plattform eine Methode zur Verfügung, die bis zu 100 *paired end reads* analysieren kann. Dabei werden bis zu 600 GB Daten generiert.

Zum Zeitpunkt des Studienbeginns überzeugten die Lesereichweite von bis zu 700 bp sowie die schnelle Durchführbarkeit der Roche/454-Sequenzierung. Dem gegenüber stehen jedoch relativ hohe Kosten und der verhältnismäßig geringe Datenumsatz des Systems. Aufgrund dessen wurde im Laufe der Studie auf die innovativere Illumina HiSeq 2500-Technologie umgestellt. Inzwischen existieren darüber hinaus – aufgrund der größeren generierten Datensätze – die 3fache Anzahl an Illumina-spezifischen Sequenzen im Vergleich zu Roche/454-spezifische Sequenzen (89).

4.2 Entwicklung des Mikrobioms bei Kindern

Mikrobiom von Mundhöhle und GIT entwickeln sich nicht – wie initial angenommen – von annähernder Sterilität mit der Geburt zu den am stärksten kolonisierten Habitaten des menschlichen Organismus (90), sondern scheinen auch durch das maternale intrauterine und plazentare Mikrobiom beeinflusst zu sein (91, 92). So konnte auch bei gesunden Neonaten gezeigt werden, dass Mekonium als erste Stuhlentleerung bereits Mikrobiota enthält und entscheidend an dem Ursprung der gastrointestinalen Flora beteiligt ist (93). Weiter vorangetrieben und beeinflusst wird dieser Aufbau beispielsweise auch durch den Geburtsmodus in Form der vaginalen Entbindung und die Zufuhr maternaler Brustmilch (94, 95).

Innerhalb der ersten 3 Lebensjahre ist das mikrobielle Profil dabei starken Fluktuationen unterlegen und weist eine große interindividuelle Variabilität auf. So zeigten Untersuchungen der mikrobiellen Zusammensetzung von Stuhlproben eine große Ähnlichkeit zur vaginalen und Brustmilch-Flora und unterstrichen den großen Einfluss der individuellen Umweltexposition auf die Entwicklung eines speziellen Mikrobioms. Häufiger Hautkontakt mit der maternalen Brust bei der Fütterung, Ernährungsaufbau, Krankheitsepisoden und häufiges Erkunden der Umgebung mit den Händen und Heranführen von Objekten an den Mund formen das orale Mikrobiom. Den bedeutenden Einfluss der Umwelt zeigte darüber hinaus auch die große Übereinstimmung des Mikrobioms bei zweieiigen Zwillingen (96, 97).

Koenig *et al.* postulierten ebenso wie Yatsunenکو *et al.*, dass im Alter von 2,5 bis 3 Jahren das gastrointestinale Mikrobiom funktionell annähernd dem des Erwachsenen entspricht (97, 98). Eine vergleichbare Kinetik ist auch für das orale Mikrobiom denkbar. Bei der Bewertung der Analysen der Patienten muss dies nur marginal berücksichtigen werden, da UKD1 zum Zeitpunkt der alloHSZT 2 Jahre und 9 Monate alt war und Patient UKD2 bereits 19 Jahre und 7 Monate. Somit waren bei beiden Patienten mögliche physiologische Entwicklungen wahrscheinlich nahezu oder komplett abgeschlossen.

4.3 Das physiologische Mikrobiom der Zunge beim Erwachsenen

Verschiedene Studien haben die physiologische Zusammensetzung des oralen Mikrobioms untersucht. Die Mundhöhle stellt dabei kein homogenes Milieu dar, sondern formt durch die heterogene Beschaffenheit der Oberflächen verschiedenste Habitate mit ebenso variierender mikrobieller Kolonisation (19, 99).

Mager *et al.* untersuchten bei 225 gesunden Probanden Weichgewebe-Abstriche von insgesamt 8 verschiedenen Lokalisationen innerhalb der Mundhöhle sowie Speichelproben. Diese wurden mittels Schachbrett-DNS-DNS-Hybridisierung auf 40 Test-Spezies untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Abstrichorte Zungenrücken, Zungenrand und Speichel eine Gruppe mit vergleichbarem mikrobiellen Profil bilden. So waren insbesondere gramnegative Spezies wie *Veillonella parvula* und *Prevotella*, aber auch *Capnocytophaga gingivalis*, *Eikenella corrodens*, *Neisseria mucosa*, *Actinomyces odontolyticus*, *Fusobacterium periodonticum*, *Fusobacterium nucleatum vincentii* und *Porphyromonas gingivalis* gehäuft vertreten. Dahingegen ließen sich verschiedene Streptokokken-Spezies sowie *Gemella morbillorum* innerhalb einer zweiten Habitatgruppe – bestehend aus Weichgewebe-Entnahmeorten wie Wangenschleimhaut und Gingiva – in höherer Prävalenz detektieren (40). Kazor *et al.* haben das mikrobielle Spektrum des Zungenrückens gesunder Spender mit dem von Probanden, die unter Halitosis litten, verglichen. Bei ersteren bildeten dabei *Streptococcus salivarius* und *Rothia mucilaginosa* den Großteil des bakteriellen Spektrums (100). Neben *Streptococcus salivarius* wiesen Riggio *et al.* auf dem Zungenrücken gesunder Probanden weiterhin *Lysobacter*-typische Spezies, *Veillonella dispar*, *Actinomyces odontolyticus*, *Atopobium parvulum* und *Veillonella atypica* nach (101). Darüber hinaus untersuchten Aas *et al.* die gesamte Bandbreite der oralen Mikroflora gesunder Probanden. Dabei entdeckten sie über 700 verschiedene Spezies bzw. Phylotypen, z.T. an spezifischen Lokalisationen innerhalb der Mundhöhle. Bei 5 gesunden Probanden wurden zwischen 8 und 20 prädominierende Spezies im Abstrich des lateralen Zungenrandes detektiert, darunter verschiedene Spezies *Streptococcus*, *Granulicatella* und *Veillonella* (42).

Im Mikrobiom des gesunden Donors von Patient UKD1 wurde mittels Roche/454-Pyrosequenzierung nach Analyse der V1/2-Region mit 48,3% hauptsächlich *Streptococcus*, gefolgt von 20,7% *Rothia* und 17,2% *Granulicatella* nachgewiesen. Weiterhin wurden 6,9% *Haemophilus* und je 3,4% *Veillonella* und *Neisseria* analysiert. Ein Vorherrschen der grampositiven Gattungen *Streptococcus* und *Rothia* zeichnete sich auch in den Untersuchungen von Kazor und Mitarbeitern als Hauptvertreter des Zungenrücken-Mikrobioms ab (100). Dahingegen differieren diese Ergebnisse zu der Analyse von Mager *et al.*, der hauptsächlich gramnegative Spezies als Zungenoberflächenmikrobiom beschrieb und die Dominanz grampositiver Gattungen wie *Streptococcus* anderen intraoralen Habitaten zuwies (40, 100). Nach Illumina HiSeq 2500-Sequenzierung der V6/7-Region der selben Ausgangsprobe zeigt sich beim Donor von Patient UKD1 eine Verteilung von 33,2% *Haemophilus*, 21,8% *Streptococcus*, 10,5% *Granulicatella*, 8,9% *Gemella*, 6,6% *Porphyromonas*, 4,3% *Prevotella* sowie in geringen Anteilen *Fusobacterium* und *Enterococcus*. Insbesondere die Dominanz von *Haemophilus* sowie der deutlich geringere Anteil an *Streptococcus* in diesem Nachweisverfahren sind hierbei hervorzuheben.

Die Analyse der V6/7-Region zeigt bei dem gesunden Donor von Patient UKD2 analog zum Donor von Patient UKD1 in der Illumina HiSeq 2500-Sequenzierung ebenfalls mit 42,9% eine deutliche Dominanz der Gattung *Haemophilus*, gefolgt von 25,6% *Streptococcus*. Neben den zuvor genannten ist auch die Gattung *Haemophilus* als physiologischer Bestandteil des gesunden oralen Mikrobioms beschrieben (102). Darüber hinaus analysierten Zaura *et al.* vor allem auch *Rothia* sowie *Granulicatella*, *Veillonella* und *Neisseria* als physiologische Bestandteile des oralen Mikrobioms in Zungenabstrichen (103). Für *Haemophilus* als dominierende Gattung in Analysen des gesunden Mikrobioms der Zungenoberfläche finden sich jedoch in der aktuellen Literatur keine Daten. In Zusammenschau der zugrunde liegenden Analysen des oralen Mikrobioms der Zungenrandabstriche sind alle bei den Donoren nachgewiesenen Gattungen Teil des schon in der Literatur vorbeschriebenen, gesunden oralen Mikrobioms der Zungenoberfläche (40, 101, 103, 104).

4.4 Vergleich der unterschiedlichen Sequenziermethoden

Die Anwendung beider Sequenzierverfahren an 5 identischen Ausgangsproben – 4 Verlaufspuren von UKD1 und die entsprechende Donorprobe – ermöglicht einen ersten Vergleich der Ergebnisse bezüglich der Zusammensetzung des oralen Mikrobioms des Zungenrandes. Auffällig waren neben vergleichbaren Ergebnissen auch teils deutliche Unterschiede im Nachweis einzelner Gattungen sowohl bezüglich des generellen Vorkommens als auch der prozentualen Häufigkeit. So war z.B. im übereinstimmenden Beobachtungszeitraum der Patientenprobe bis 120 Tage nach alloHSZT übereinstimmend eine zunehmende Anzahl detektierter Gattungen mit Häufigkeit >1% bis zu maximal 10 an Tag 120 nachzuweisen. Der Vergleich der gesunden Spenderprobe differiert allerdings bzgl. der Häufigkeit detektierter Gattungen >1% zwischen 6 und 9 in Abhängigkeit des Nachweisverfahrens, wobei generell mittels Illumina-Plattform eine größere Anzahl an Gattungen – z.T. auch nur mit marginalem Vorkommen – nachgewiesen werden konnte.

Bezüglich einzelner Gattungen konnte *Rothia* in 4 von 5 Proben unter Anwendung der Roche/454-Sequenzierung in einer Häufigkeit deutlich >1% nachgewiesen werden, jedoch in keiner der Proben >1% Häufigkeit mittels Illumina-Methode. Auch die Gattung *Neisseria* ließ sich in einer Probe mit einem Anteil von 55,6% mittels Roche/454-Plattform vs. 0,1% mittels der Illumina-Plattform darstellen. *Haemophilus* und auch *Campylobacter* lassen sich dagegen mittels Illumina-Methode mit größerer Häufigkeit nachweisen als mit der Roche/454-Methode, ebenso *Halomonas*, *Shewanella* und *Enterococcus*. Vergleichbare Häufigkeiten nach Anwendung beider Verfahren lassen sich bei den Gattungen *Staphylococcus* und *Veillonellae* darstellen.

Mehrere methodische Variablen können hierbei Erklärungsansätze liefern. Probenentnahme, Lagerung und DNS-Extraktion bilden die gemeinsame Grundlage beider Sequenzieransätze und können zwar Fehlerquellen für die Analyseergebnisse darstellen, erklären aber nicht die unterschiedlichen Ergebnisse nach Anwendung beider Sequenziermethoden.

Eine ungleiche Aufteilung der extrahierten DNS im Vorfeld der Amplifikation in verschiedene Aliquots kann ein erster möglicher Ansatzpunkt sein. Als ein

wesentlicher Unterschied im Ansatz beider Methoden ist zu beachten, dass die in dieser Studie eingesetzte Roche/454-Methode auf der Sequenzierung der V1/2-Region und die Illumina-Plattform auf der Sequenzierung der V6/7-Region der 16S rRNS basieren. Neben der anschließenden Amplifikation unterschiedlicher Bereiche der variablen 16S rRNS-Regionen mit entsprechend lokusspezifischen Primern verlief die PCR auch unter abweichenden Bedingungen.

Die initial bei der Roche/454-Sequenzierung verwendete Amplifikation der V1/2-Region wurde durch die Jumpstart Consortium Human Microbiome Project Data Generation Working Group zusammen mit der V3-V5-Region als diejenige Region beschrieben, die die höchste Qualität der generierten Daten ermöglicht (105). Auch Sundquist *et al.* beschrieben für kurze Fragmente der V1/2-Region die höchste Auflösung des mikrobiellen Spektrums (106). Untersuchungen von D'Amore *et al.* verwiesen dagegen bei der Analyse unbekannter mikrobieller Proben auf die Sequenzierung der V4-Region mittels Roche/454- oder Illumina MiSeq-Plattform (107). Yang *et al.* konnten die höchste Sensitivität phylogenetischer Untersuchungen in der Analyse der V4/5/6-Region zeigen. In dieser Studie wies die Analyse der V7-Region moderate Sensitivität auf, und entgegen vorher aufgeführter Literatur besitzt die V2-Region ebenso wie die V8-Region eine niedrige Auflösung für phylogenetische Untersuchungen (108). Hamady *et al.* postulierten, dass generell die Kombination variabler und konservierter Regionen am besten dazu geeignet ist, phylogenetische Analysen durchzuführen (33). Wang *et al.* zeigten in ihrem Studiendesign bei der Sequenzierung der V2- und V4-Region mittels Pyrosequenzierung die niedrigsten und für die V6-Region die höchsten Fehlerraten (109). Es kann in Zusammenschau der aktuellen Literatur also keine eindeutige Aussage getroffen werden, welche variable Region der mikrobiellen 16S rRNS die beste Grundlage für phylogenetische Untersuchungen bietet, wobei sich inzwischen Vorteile der V4-Region ableiten lassen.

Luo *et al.* analysierten identisches Probenausgangsmaterial einer planktonischen Frischwasser-Prokaryotengemeinschaft mittels Roche/454 FLX Titanium und Illumina Genome Analyzer II. Dabei zeigte sich eine ca. 90%ige Überlappung der Basensequenzen trotz Unterschieden in Leselänge und Protokoll. Damit bilanzieren die Autoren, dass beide

Sequenzierungsplattformen die gleichen Fraktionen der Gesamtdiversität der Probe lieferten. Ein Erklärungsansatz für die 10%ige Differenz der Sequenzen sehen sie in der Möglichkeit, dass die ursprüngliche DNS-Probe in 2 ungleichmäßige Aliquots aufgeteilt wurde (89).

Sowohl die Wahl der zu amplifizierenden Region der 16S rRNS als auch das entsprechende Primerdesign sind essentiell für die Analyse mikrobieller Gemeinschaften und erschweren den Vergleich zu vielen anderen Studienergebnissen, da teils sehr diverse Methoden zum Einsatz kommen. Einen weiteren wichtigen Aspekt bildet die Wahl der Sequenzierungsplattform. Neben den bereits weiter oben aufgezeigten unterschiedlichen Gründen, bedingt durch monetäre und arbeitszeitliche Ressourcen sowie generierte Datenmengen, können bei beiden Methoden auch individuelle Fehlerarten auftreten. So zeigte die Roche/454-Pyrosequenzierung eine hohe Fehlerrate bei homopolymeren Regionen mit mehr als 2 identischen Basen – insbesondere A- und T-reiche Homopolymere. Daraus entstand während der Pyrosequenzierung eine akkumulierte Lichtintensitätsvarianz (110, 111). Dagegen zeigte die Illumina-Plattform höhere Fehlerraten hinsichtlich repetitiver Sequenzen und Palindrome (89).

Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es keine endgültige Empfehlung, welche variablen Regionen der mikrobiellen 16S rRNS am besten zur taxonomischen Untersuchung und Diversitätenanalyse geeignet sind. Die Auswahl der Region und auch der Sequenzierungsplattform muss in Zusammenschau mit der zu untersuchenden Fragestellung getroffen werden (107).

4.5 Iatrogene Störungen des oralen Mikrobioms

Neben der Etablierung der Techniken, für die im Vergleich die Roche/454- und die Illumina-Methoden bei identischen Ausgangsproben eingesetzt wurden, war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, einen ersten Überblick über die Entwicklung des oralen Mikrobioms des Zungenrandes bei stammzelltransplantierten Patienten zu erlangen. Dafür wurde in Verlaufsprouben der Einfluss von Konditionierung, anschließender alloHSZT und supportiver antiinfektiver und immunsupprimierender Therapie analysiert.

Der erste Datensatz wurde von Verlaufsprouben des Patienten UKD1 und der dazugehörigen Probe des Spenders mittels Roche/454-Sequenzierung erhoben. Es erfolgte zunächst eine Probenentnahme unmittelbar vor Einleitung des Konditionierungsregimes und alloHSZT. Dabei wurden insgesamt nur 4 Gattungen mit einer Häufigkeit >1% detektiert: 80,0% *Streptococcus*, 13,2% *Rothia*, 2,4% *Actinomyces* und 2,9% *Pseudomonas*. Das Verteilungsmuster zeigt hierbei mit 95,6% eine deutliche Dominanz der grampositiven Bakteriengattungen. Im Vorfeld war aufgrund einer gramnegativen Sepsis eine breite antibiotische Therapie mit mehrfacher zielgerichteter Eskalation erforderlich. Bezüglich der Probenentnahmebedingungen vor alloHSZT ist ferner festzuhalten, dass diese eingeschränkte mikrobielle Diversität in den Abstrichen zudem auch auf die initiale Chemotherapie mit Remission und anschließendem Knochenmark-Rezidiv zurückgeführt werden kann.

Die 35 Tage nach alloHSZT entnommene Abstrichprobe setzt sich zu 55,6% aus *Proteobacteria* und 44,4% *Firmicutes* zusammen. Hierbei präsentiert sich eine starke Dezimierung des *Firmicutes*-Anteils um 36,6% bei gleichzeitig deutlichem Anstieg der *Proteobacteriae* um 52,7%. Auf Gattungsebene herrschen die gramnegativen Diplokokken *Neisseriae* mit 55,6% vor. Daneben ist zu diesem Zeitpunkt transient die Gattung *Gemella* mit 22,5% nachzuweisen, die vor alloHSZT nicht und 61 Tage danach nur noch mit 1,5% nachzuweisen war. Alle zuvor genannten Gattungen sind als Teil der physiologischen Mundflora beschrieben (19, 87). Zuletzt finden sich zu gleichen Anteilen mit jeweils 11,1% die sowohl als physiologische Kommensalen der Mundhöhle als auch als Pathogene beschriebenen Gattungen *Staphylococcus* und *Streptococcus*.

Im Zeitintervall zwischen den beiden Abstrichproben vor und 35 Tage nach alloHSZT erfolgte bei Patient UKD1 die Konditionierung mit Busulfan, Cyclophosphamid sowie Melphalan. Nach alloHSZT bekam der Patient zudem eine GvHD-Prophylaxe mit Ciclosporin A, Methotrexat sowie Metronidazol. Ciclosporin A wurde hierbei spiegeladaptiert bis zur vollständigen immunologischen Rekonstitution weiterverabreicht. Ebenfalls in diesem Zeitraum begonnen und auch bis zur kompletten immunologischen Rekonstitution weitergeführt wurde die antimikrobielle sowie antivirale Prophylaxe mittels Cotrimoxazol, Voriconazol und Aciclovir. Weiterhin ist zu beachten, dass erst ab Tag 20 nach alloHSZT der orale Kostaufbau begonnen wurde.

Einige Studien haben sich mit dem Einfluss von Chemotherapien und Konditionierungsregimen auf die Zusammensetzung des gastrointestinalen Mikrobioms beschäftigt. Montassier *et al.* zeigten hierbei nach Chemotherapie eine Verschiebung der mikrobiellen Zusammensetzung hin zu *Proteobacteriae*, insbesondere *Escherichia*-Spezies, sowie eine Reduktion der *Firmicutes*, insbesondere *Blautia*-Spezies (112). Auch in der vorliegenden Studie zeigte sich auf Phylumebene in der 35 Tage nach alloHSZT entnommenen Probe ein vergleichbares Bild. Allerdings waren die auch sonst im GIT fakultativ pathogenen *Escherichia* in der Mundhöhle nicht zu erwarten. Stattdessen liegt eine Dominanz der *Neisseriae* ohne weitere Spezieszuordnung vor.

Weiterhin ist eine Verminderung der *Clostridien* XI/Va und *Bifidobacteria* gepaart mit einer Vermehrung der Gattung *Enterococcus* während Hoch-Dosis-Chemotherapie und prophylaktischer systemischer Antibiotikatherapie beschrieben (75, 112, 113).

Auffallend ist die Verdopplung der Anzahl der detektierten Gattungen >1% Häufigkeit von 4 in den beiden vorangegangenen Proben auf 8 am Tag 61 nach alloHSZT. Die Dominanz der *Firmicutes* ist auf einen erneuten Anstieg des *Streptococcus*-Anteils mit 41,9% und der erstmaligen Detektion von *Granulicatella* und *Veillonella*-Kokken mit 29,2% bzw. 15,2% zurückzuführen. Daneben lassen sich in geringem Maß auch *Rothia*, *Campylobacter*, *Actinomyces* sowie *Gemella* nachweisen. Es kann festgehalten werden, dass alle zuvor genannten Gattungen physiologische Bestandteile des oralen Mikrobioms sind. *Veillonella* ist zugleich ein potentieller Erreger von Infektionen

im Mund-Kiefer-Bereich (114), für die es jedoch klinisch keine Anzeichen bei dem Patienten gab. 120 Tage nach alloHSZT beinhaltet die Analyse auf Gattungsebene mit 11 detektierten Gattungen >1% Häufigkeit die größte Vielfalt innerhalb der betrachteten Zeitreihe.

Montassier *et al.* beschrieben bei Patienten unter Chemotherapie eine Abnahme der Alpha-Diversität (112). Biagi *et al.* konnten in einer longitudinalen Studie pädiatrischer Patienten unter hämatologischer Stammzelltransplantation bereits nach 2 Monaten eine Rekonstitution des gastrointestinalen Mikrobioms hinsichtlich ursprünglicher Diversität und metabolischer Kapazität feststellen (113). Auch in dieser Studie konnte in den Proben vor alloHSZT ein schmales Spektrum an detektierten Mikroben und ein langsamer Aufbau im zeitlichen Verlauf mit dem zu erwartenden Maximum am letzten Probenentnahmetag 120 Tage nach alloHSZT beobachtet werden.

Dieser Verlust der Diversität des gastrointestinalen mikrobiellen Spektrums, häufig verbunden mit der oben beschriebenen Expansion einzelner Spezies wie *Enterococcus*, *Streptococcus* und verschiedenen *Proteobacteria*, wurde auch durch Taur *et al.* gezeigt (115). Dieser kann nach Ubeda *et al.* einer systemischen Infektion gleicher Spezies mit positivem Nachweis in Blutkulturen vorangehen (116). Taur *et al.* zeigten weiterhin, dass eine antimikrobielle Prophylaxe mit Metronidazol – welche auch bei beiden Patienten der vorliegenden Studie durchgeführt wurde – zu einem dreifach erhöhten Risiko einer Dominanz der Enterokokken führte, welche wiederum ein neunfach höheres Risiko für eine Vancomycin-resistente Enterokokken-Sepsis bedeutete. Analog dazu führte die antimikrobielle Prophylaxe mit Fluorchinolonen zu einer zehnfach geringeren Wahrscheinlichkeit für die Dominanz von *Proteobacteria* mit einem dementsprechend geringeren Risiko für eine gramnegative Sepsis. Auf diesen pathophysiologischen Annahmen aufbauend könnten Veränderungen der Zusammensetzung des gastrointestinalen – und eventuell auch oralen – Mikrobioms als Prädiktor für eine neutropenische Sepsis als eine mögliche Komplikation der HSZT-Therapie dienen (60, 115).

Im Vergleich wurden zuvor beschriebene Verlaufspalten des Patienten UKD1 sowie auch die Verlaufspalten von Patient UKD2 mittels Illumina HiSeq 2500-Plattform untersucht. Mittels dieser Methodik ließen sich zum unmittelbaren

Zeitpunkt vor alloHSZT und nach Chemo- und Antibiotikatherapie sowohl bei Patient UKD1 – analog zur Roche/454-Methode – wie auch bei Patient UKD2 4 Gattungen >1% Häufigkeit detektieren. Diese verhältnismäßig geringere Vielfalt – insbesondere auch im Vergleich zur parallel entnommenen Spenderprobe – wurde bereits von Montassier *et al.* mit einem Verlust der Alpha-Diversität nach KMT beschrieben (62).

Im zeitlichen Verlauf wurde bei Patient UKD1 zum Zeitpunkt 120 Tage nach alloHSZT mit 10 Gattungen >1% Häufigkeit das breiteste Spektrum detektiert und im weiteren Verlauf bis einschließlich Tag 408 auch zwischen 7 und 10 Gattungen. Bei Patient UKD2 entwickelte sich ausgehend von 4 Gattungen >1% Häufigkeit vor alloHSZT eine stetige Zunahme im zeitlichen Verlauf mit einem Maximum von 10 detektierten Gattungen >1% Häufigkeit zum letzten Probenentnahmezeitpunkt 90 Tage nach alloHSZT.

Von Patient UKD2 wurde zusätzlich eine Probe am Tag 0 unmittelbar vor alloHSZT nach Konditionierung sowie unter Metronidazol-, Cotrimoxazol- und Teicoplanin-Medikation gewonnen. In dieser Probe zeigte sich eine starke Dominanz der den *Firmicutes* zugeordneten Gattungen Staphylokokken und Streptokokken. Im Vergleich dazu dominieren in der Probe vor Konditionierung die zu den *Proteobacteria* zählenden Gattungen *Shewanella* und *Halomonas*. Taur *et al.* zeigten ebenfalls wie Montassier *et al.* eine Störung der gastrointestinalen mikrobiellen Vielfalt und Stabilität während alloHSZT (55, 62). Dabei beschrieben Taur *et al.* einen Zusammenhang zwischen der Metronidazol-Gabe und der Zunahme der *Proteobacteria* – insbesondere Enterokokken im GIT – welche wiederum mit erhöhter Morbidität und Mortalität einherging. Ebenso wurde die prophylaktische Gabe von Ciprofloxacin mit einer deutlichen Reduktion der Dominanz von *Proteobacteria* in Verbindung gebracht. Weiterhin waren Streptokokken neben Enterokokken auch als sog. „Expander“ bei der Abnahme der mikrobiellen Vielfalt beschrieben (60).

In der Literatur gibt es Hinweise, dass Änderungen im Mikrobiom mit typischen Komplikationen nach alloHSZT verbunden sind. So zeigten Ames *et al.* bei Patienten mit respiratorischen Komplikationen nach KMT vermehrt die Gattung

Campylobacter und eine Reduktion der Gattung *Streptococcus*, insbesondere der Spezies *Streptococcus oralis* (117).

Dieser Zusammenhang ließ sich in den untersuchten Verlaufsproben nicht darstellen, obgleich beide Patienten in der Phase der Aplasie eine Pneumonie ohne Erregernachweis entwickelten. Bei Patient UKD2 wurden zudem pulmonale Rundherde diagnostiziert. Bei Patient UKD1 lässt sich in der Analyse der Illumina HiSeq 2500-Sequenzierung bezüglich der Häufigkeit der Gattung *Streptococcus* eine Reduktion von 57,9% vor alloHSZT auf 24,5% an Tag 30 zeigen. Dahingegen lässt sich die Gattung *Campylobacter* im Zeitraum der Aplasie – repräsentiert mit der Probenentnahme an Tag 30 nach alloHSZT – nicht nachweisen. Im weiteren Verlauf lässt sich ab Tag 61 nach alloHSZT eine Häufigkeit der Gattung *Campylobacter* mit 13,0% zeigen, die nochmals an Tag 153 nach alloHSZT mit 17,0% auftritt. Dagegen zeigt die mikrobielle Komposition des lateralen Zungenrandes bei Patient UKD2 im Verlauf eine Erhöhung der Gattung *Streptococcus* während der Phase der Aplasie von initial 2,0% vor alloHSZT auf 35,9% 27 Tage nach alloHSZT. Im weiteren Verlauf fluktuiert das Vorkommen der Gattung *Streptococcus* weiterhin mit einer Häufigkeit von 56,2% an Tag 59 nach alloHSZT sowie von 17,3% an Tag 90 nach alloHSZT.

Ye *et al.* verglichen die Diversität des oralen Mikrobioms pädiatrischer Patienten unter Chemotherapie hinsichtlich der Entwicklung einer oralen Mukositis. Dabei zeigte sich, dass eine höhere mikrobielle Diversität und interindividuelle Variabilität zum Diagnosezeitpunkt bei Patienten vorlag, die eine Mukositis entwickelten. Weiterhin zeigte sich das orale Mikrobiom ebenso bei Erstdiagnose der malignen Grunderkrankung als heterogener und diverser im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne systemische Erkrankung (118). In künftigen Studien sollte zur weiteren Erhebung der Metadaten eine Erfassung des Diagnosezeitpunktes und der Lokalisation der Mukositis erfolgen, um bei künftigen Auswertungen der Sequenzierungsergebnisse auch diesen Zusammenhang zu untersuchen. Bei Patient UKD1 tritt im klinischen Verlauf eine Mukositis – nach World Health Organisation (WHO) Grad IV klassifiziert – auf. Darüber hinaus kann eine veränderte Zusammensetzung des oralen Mikrobioms auch einen vielversprechenden Ansatz als prognostischer Marker für die Entwicklung einer GvHD darstellen. Die GvHD stellt einen bedeutenden

Einflussfaktor für die Morbidität und Mortalität unter alloHSZT dar. So sind bis zu 25% der Patienten, die eine alloHSZT erhalten, von der akuten und bis zu 43% von der chronischen Verlaufsform betroffen. Letztere stellt dabei den zweithäufigsten Mortalitätsgrund dar (119). Golob *et al.* konnten anhand von Risiko für eine akute GvHD einhergeht. Darüber hinaus bestand eine höhere Korrelation zwischen dem Auftreten dieser Komplikation und dem Nachweis oraler *Actinobacteriae* und *Firmicutes* (120). Weitere Studien konnten einen Zusammenhang zwischen Antibiotika-Gaben und einer erhöhten Mortalität durch GvHD zeigen (75, 121).

Die Patienten UKD1 und UKD2 haben keine GvHD entwickelt. In weiteren Studien könnten mögliche Zusammenhänge zwischen dem Auftreten einer GvHD und Veränderungen des oralen Mikrobioms des lateralen Zungenrandes analysiert werden.

Die Ausprägung der mikrobiellen, gastrointestinalen Diversität im Zeitraum des *engraftments* korrelierte nach Taur *et al.* mit der Sterblichkeitsrate: Eine geringe Diversität ging mit einer Erhöhung der Mortalität von 8% auf 52% einher (115). Damit könnte die Diversitätenanalyse zukünftig als ein prognostischer Marker für das Überleben nach alloHSZT fungieren. Darüber hinaus könnten kosten- und zeitgünstigere Nachweisverfahren für Stoffwechselprodukte von Bakterienspezies, die mit einer höheren Überlebensrate assoziiert sind, etabliert werden, um ähnliche prognostisch relevante Aussagen treffen zu können.

4.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Im Rahmen dieser Dissertation wurde unter Nutzung der Roche/454- und Illumina-Sequenziermethode das orale Mikrobiom des lateralen Zungenrandes zweier stammzelltransplantierte Patienten im Verlauf sowie von deren Spendern charakterisiert.

Die im Spendermikrobiom nachgewiesenen Gattungen entsprachen der physiologischen Komposition des oralen Mikrobioms der Zunge gesunder Probanden.

Die Ergebnisse der Verlaufsuntersuchungen der beiden stammzelltransplantierten Patienten unterstützen vorangegangene Studien, die eine Regeneration des zuvor im Rahmen der Chemotherapie und Konditionierung reduzierten Mikrobioms zeigten.

Hinsichtlich des Vergleichs beider Sequenziermethoden differieren die Ergebnisse zu Vorkommen und Häufigkeit einzelner Gattungen in der selben Ausgangsprobe. Neben der Sequenziermethodik kann die Auswahl der variablen 16S rRNS-Region die Analyse des Mikrobioms beeinflussen. Diese Ergebnisse sollten anhand größerer Patientenkohorten unter Nutzung spezifischer bioinformatischer Diversitäts- und *cluster*-Analysen validiert werden.

Darüber hinaus könnte künftige Forschung der genaueren Analyse zu Muster und Kinetik der Entwicklung des oralen Mikrobioms des lateralen Zungenrandes unter alloHSZT dienen. Des Weiteren könnten Rückschlüsse aus entsprechenden Veränderungen bezüglich typischer Komplikationen wie Sepsis, GvHD, Mukositis und Abstoßung gezogen werden. Damit könnte die mikrobielle Komposition sowohl als diagnostischer sowie prognostischer Marker für potentielle Komplikationen herangezogen werden.

Literaturverzeichnis

1. Collins, F. S.; Patrinos, A.; Jordan, E.; Chakravarti, A.; Gesteland, R.; Walters, L., New goals for the U.S. Human Genome Project: 1998-2003. *Science* **1998**, *282*, 682-9.
2. International Human Genome Sequencing, C., Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **2004**, *431*, 931-45.
3. Turnbaugh, P. J.; Ley, R. E.; Hamady, M.; Fraser-Liggett, C. M.; Knight, R.; Gordon, J. I., The human microbiome project. *Nature* **2007**, *449*, 804-10.
4. Council, N. R., *The New Science of Metagenomics: Revealing the Secrets of Our Microbial Planet*. Washington (DC), 2007.
5. Savage, D. C., Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* **1977**, *31*, 107-33.
6. Group, N. H. W.; Peterson, J.; Garges, S.; Giovanni, M.; McInnes, P.; Wang, L.; Schloss, J. A.; Bonazzi, V.; McEwen, J. E.; Wetterstrand, K. A.; Deal, C.; Baker, C. C.; Di Francesco, V.; Howcroft, T. K.; Karp, R. W.; Lunsford, R. D.; Wellington, C. R.; Belachew, T.; Wright, M.; Giblin, C.; David, H.; Mills, M.; Salomon, R.; Mullins, C.; Akolkar, B.; Begg, L.; Davis, C.; Grandison, L.; Humble, M.; Khalsa, J.; Little, A. R.; Peavy, H.; Pontzer, C.; Portnoy, M.; Sayre, M. H.; Starke-Reed, P.; Zakhari, S.; Read, J.; Watson, B.; Guyer, M., The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res* **2009**, *19*, 2317-23.
7. Human Microbiome Project, C., A framework for human microbiome research. *Nature* **2012**, *486*, 215-21.
8. Gilbert, J. A.; Dupont, C. L., Microbial metagenomics: beyond the genome. *Ann Rev Mar Sci* **2011**, *3*, 347-71.
9. Grice, E. A.; Segre, J. A., The human microbiome: our second genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **2012**, *13*, 151-70.
10. Lederberg, J., Infectious history. *Science* **2000**, *288*, 287-93.
11. Human Microbiome Project, C., Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **2012**, *486*, 207-14.
12. Costello, E. K.; Lauber, C. L.; Hamady, M.; Fierer, N.; Gordon, J. I.; Knight, R., Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* **2009**, *326*, 1694-7.
13. Backhed, F.; Ley, R. E.; Sonnenburg, J. L.; Peterson, D. A.; Gordon, J. I., Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* **2005**, *307*, 1915-20.
14. Mazmanian, S. K.; Liu, C. H.; Tzianabos, A. O.; Kasper, D. L., An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* **2005**, *122*, 107-18.
15. Rakoff-Nahoum, S.; Paglino, J.; Eslami-Varzaneh, F.; Edberg, S.; Medzhitov, R., Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* **2004**, *118*, 229-41.
16. Comstock, L. E.; Kasper, D. L., Bacterial glycans: key mediators of diverse host immune responses. *Cell* **2006**, *126*, 847-50.
17. Diaz Heijtz, R.; Wang, S.; Anuar, F.; Qian, Y.; Bjorkholm, B.; Samuelsson, A.; Hibberd, M. L.; Forsberg, H.; Pettersson, S., Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108*, 3047-52.

18. Schink, B., Wachstum und Ernährung der Mikroorganismen. In *Allgemeine Mikrobiologie*, Fuchs, G., Ed. Georg Thieme Verlag KG: Stuttgart, **2006**; Vol. 8. Auflage, pp 157-190.
19. Dewhirst, F. E.; Chen, T.; Izard, J.; Paster, B. J.; Tanner, A. C.; Yu, W. H.; Lakshmanan, A.; Wade, W. G., The human oral microbiome. *J Bacteriol* **2010**, *192*, 5002-17.
20. Nguyen, N. P.; Warnow, T.; Pop, M.; White, B., A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. *NPJ Biofilms Microbiomes* **2016**, *2*, 16004.
21. Blaxter, M.; Mann, J.; Chapman, T.; Thomas, F.; Whitton, C.; Floyd, R.; Abebe, E., Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **2005**, *360*, 1935-43.
22. Fox, G. E.; Magrum, L. J.; Balch, W. E.; Wolfe, R. S.; Woese, C. R., Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1977**, *74*, 4537-41.
23. Gupta, R.; Lanter, J. M.; Woese, C. R., Sequence of the 16S Ribosomal RNA from Halobacterium volcanii, an Archaeobacterium. *Science* **1983**, *221*, 656-9.
24. Olsen, G. J.; Lane, D. J.; Giovannoni, S. J.; Pace, N. R.; Stahl, D. A., Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu Rev Microbiol* **1986**, *40*, 337-65.
25. Lane, D. J.; Stahl, D. A.; Olsen, G. J.; Heller, D. J.; Pace, N. R., Phylogenetic analysis of the genera Thiobacillus and Thiomicrospira by 5S rRNA sequences. *J Bacteriol* **1985**, *163*, 75-81.
26. Stahl, D. A.; Lane, D. J.; Olsen, G. J.; Pace, N. R., Analysis of hydrothermal vent-associated symbionts by ribosomal RNA sequences. *Science* **1984**, *224*, 409-11.
27. Stahl, D. A.; Lane, D. J.; Olsen, G. J.; Pace, N. R., Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol* **1985**, *49*, 1379-84.
28. Woese, C. R., Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **1987**, *51*, 221-71.
29. Fox, G. E.; Stackebrandt, E.; Hespell, R. B.; Gibson, J.; Maniloff, J.; Dyer, T. A.; Wolfe, R. S.; Balch, W. E.; Tanner, R. S.; Magrum, L. J.; Zablen, L. B.; Blakemore, R.; Gupta, R.; Bonen, L.; Lewis, B. J.; Stahl, D. A.; Luehrsen, K. R.; Chen, K. N.; Woese, C. R., The phylogeny of prokaryotes. *Science* **1980**, *209*, 457-63.
30. Woese, C. R.; Fox, G. E., Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1977**, *74*, 5088-90.
31. Woese, C.; Sogin, M.; Stahl, D.; Lewis, B. J.; Bonen, L., A comparison of the 16S ribosomal RNAs from mesophilic and thermophilic bacilli: some modifications in the Sanger method for RNA sequencing. *J Mol Evol* **1976**, *7*, 197-213.
32. Berg, J. M. T., J. L.; Stryer, L., Proteinbiosynthese. In *Stryer Biochemie*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Berlin Heidelberg, **2013**; Vol. 7. Auflage, p 910 ff.
33. Hamady, M.; Knight, R., Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. *Genome Res* **2009**, *19*, 1141-52.
34. Aagaard, K.; Petrosino, J.; Keitel, W.; Watson, M.; Katancik, J.; Garcia, N.; Patel, S.; Cutting, M.; Madden, T.; Hamilton, H.; Harris, E.; Gevers, D.; Simone, G.; McInnes, P.; Versalovic, J., The Human Microbiome Project strategy for comprehensive sampling of the human microbiome and why it matters. *FASEB J* **2013**, *27*, 1012-22.

35. He, X. S.; Shi, W. Y., Oral microbiology: past, present and future. *Int J Oral Sci* **2009**, *1*, 47-58.
36. Cho, I.; Blaser, M. J., The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet* **2012**, *13*, 260-70.
37. Whittaker, R. H., Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California. *Ecol Monogr* **1960**, *30*, 280-338.
38. Smith, T. M. S., R. L., Ökologie von Lebensgemeinschaften. In *Ökologie*, Pearson Studium: München, **2009**; Vol. 6. Auflage, pp 435-468.
39. Segata, N.; Haake, S. K.; Mannon, P.; Lemon, K. P.; Waldron, L.; Gevers, D.; Huttenhower, C.; Izard, J., Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome Biol* **2012**, *13*, R42.
40. Mager, D. L.; Ximenez-Fyvie, L. A.; Haffajee, A. D.; Socransky, S. S., Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J Clin Periodontol* **2003**, *30*, 644-54.
41. Gibbons, R. J., Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *J Dent Res* **1989**, *68*, 750-60.
42. Aas, J. A.; Paster, B. J.; Stokes, L. N.; Olsen, I.; Dewhirst, F. E., Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* **2005**, *43*, 5721-32.
43. Fitzgerald, R. J.; Keyes, P. H., Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. *J Am Dent Assoc* **1960**, *61*, 9-19.
44. Detert, J.; Pischon, N.; Burmester, G. R.; Buttgereit, F., The association between rheumatoid arthritis and periodontal disease. *Arthritis Res Ther* **2010**, *12*, 218.
45. Katz, J.; Onate, M. D.; Pauley, K. M.; Bhattacharyya, I.; Cha, S., Presence of Porphyromonas gingivalis in gingival squamous cell carcinoma. *Int J Oral Sci* **2011**, *3*, 209-15.
46. Michaud, D. S., Role of bacterial infections in pancreatic cancer. *Carcinogenesis* **2013**, *34*, 2193-7.
47. Negrato, C. A.; Tarzia, O.; Jovanovic, L.; Chinellato, L. E., Periodontal disease and diabetes mellitus. *J Appl Oral Sci* **2013**, *21*, 1-12.
48. Cianciola, L. J.; Park, B. H.; Bruck, E.; Mosovich, L.; Genco, R. J., Prevalence of periodontal disease in insulin-dependent diabetes mellitus (juvenile diabetes). *J Am Dent Assoc* **1982**, *104*, 653-60.
49. Emrich, L. J.; Shlossman, M.; Genco, R. J., Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* **1991**, *62*, 123-31.
50. Friedewald, V. E.; Kornman, K. S.; Beck, J. D.; Genco, R.; Goldfine, A.; Libby, P.; Offenbacher, S.; Ridker, P. M.; Van Dyke, T. E.; Roberts, W. C.; American Journal of, C.; Journal of, P., The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology Editors' Consensus: periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease. *Am J Cardiol* **2009**, *104*, 59-68.
51. Ott, S. J.; El Mokhtari, N. E.; Musfeldt, M.; Hellmig, S.; Freitag, S.; Rehman, A.; Kuhbacher, T.; Nikolaus, S.; Namsolleck, P.; Blaut, M.; Hampe, J.; Sahly, H.; Reinecke, A.; Haake, N.; Gunther, R.; Kruger, D.; Lins, M.; Herrmann, G.; Folsch, U. R.; Simon, R.; Schreiber, S., Detection of diverse bacterial signatures in atherosclerotic lesions of patients with coronary heart disease. *Circulation* **2006**, *113*, 929-37.
52. Cotti, E.; Mercuro, G., Apical periodontitis and cardiovascular diseases: previous findings and ongoing research. *Int Endod J* **2015**, *48*, 926-32.

53. Grau, A. J.; Buggle, F.; Ziegler, C.; Schwarz, W.; Meuser, J.; Tasman, A. J.; Buhler, A.; Benesch, C.; Becher, H.; Hacke, W., Association between acute cerebrovascular ischemia and chronic and recurrent infection. *Stroke* **1997**, *28*, 1724-9.
54. Raghavendran, K.; Mylotte, J. M.; Scannapieco, F. A., Nursing home-associated pneumonia, hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: the contribution of dental biofilms and periodontal inflammation. *Periodontol 2000* **2007**, *44*, 164-77.
55. Taur, Y.; Jenq, R. R.; Perales, M. A.; Littmann, E. R.; Morjaria, S.; Ling, L.; No, D.; Gobourne, A.; Viale, A.; Dahi, P. B.; Ponce, D. M.; Barker, J. N.; Giralt, S.; van den Brink, M.; Pamer, E. G., The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **2014**, *124*, 1174-82.
56. Ayuk, F., Konditionierung. In *Allogene Stammzelltherapie - Grundlagen, Indikationen und Perspektiven*, Kröger, N. Z., A. R., Ed. UNI-MED: Bremen, **2015**; pp 101-103.
57. Stübig, T., Immunologische Rekonstitution nach hämatologischer Stammzelltransplantation (HSCT). In *Allogene Stammzelltherapie - Grundlagen, Indikationen und Perspektiven*, Kröger, N. Z., A. R., Ed. UNI-MED: Bremen, **2015**; pp 149-155.
58. Binder, T. M. C. E., T. H., Humanes Leukozyten-Antigen (HLA). In *Allogene Stammzelltransplantation - Grundlagen, Indikationen und Perspektiven*, Zander, N. K. u. A. R., Ed. UNI-MED: Bremen, **2015**; Vol. 4. Auflage, pp 20-25.
59. C. R. Müller, J. M., H. Ottinger, R. Arnold, P. Bader, D. Beelen, M. Bornhäuser, P. Dreger, T. Eiermann, H. Einsele, I. Faé, G. Fischer, M. Füssel, E. Holler, G. Holzberger, P. A. Horn, N. Kröger, M. Lindemann, C. Seidl, B. Spriewald, C. Süsal, R. Blasczyk, J. Finke, Deutscher Konsensus 2013 zur immungenetischen Spenderauswahl für die allogene Stammzelltransplantation. *Thieme Transfusionsmedizin - Immunhämatologie, Hämotherapie, Immungenetik, Zelltherapie* **2014**.
60. Taur, Y.; Xavier, J. B.; Lipuma, L.; Ubeda, C.; Goldberg, J.; Gobourne, A.; Lee, Y. J.; Dubin, K. A.; Succi, N. D.; Viale, A.; Perales, M. A.; Jenq, R. R.; van den Brink, M. R.; Pamer, E. G., Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* **2012**, *55*, 905-14.
61. Dethlefsen, L.; Huse, S.; Sogin, M. L.; Relman, D. A., The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol* **2008**, *6*, e280.
62. Montassier, E.; Gastinne, T.; Vangay, P.; Al-Ghalith, G. A.; Bruley des Varannes, S.; Massart, S.; Moreau, P.; Potel, G.; de La Cochetiere, M. F.; Batard, E.; Knights, D., Chemotherapy-driven dysbiosis in the intestinal microbiome. *Aliment Pharmacol Ther* **2015**, *42*, 515-28.
63. van der Waaij, D.; Berghuis-de Vries, J. M.; Lekkerkerk, L.-v., Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *J Hyg (Lond)* **1971**, *69*, 405-11.
64. van der Waaij, D., Colonization pattern of the digestive tract by potentially pathogenic microorganisms: colonization-controlling mechanisms and consequences for antibiotic treatment. *Infection* **1983**, *11 Suppl 2*, S90-2.
65. Chung, H.; Pamp, S. J.; Hill, J. A.; Surana, N. K.; Edelman, S. M.; Troy, E. B.; Reading, N. C.; Villablanca, E. J.; Wang, S.; Mora, J. R.; Umesaki, Y.; Mathis, D.; Benoist,

- C.; Relman, D. A.; Kasper, D. L., Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell* **2012**, *149*, 1578-93.
66. Martin, R.; Nauta, A. J.; Ben Amor, K.; Knippels, L. M.; Knol, J.; Garssen, J., Early life: gut microbiota and immune development in infancy. *Benef Microbes* **2010**, *1*, 367-82.
67. Pollard, M.; Chang, C. F.; Srivastava, K. K., The role of microflora in development of graft-versus-host disease. *Transplant Proc* **1976**, *8*, 533-6.
68. Bouskra, D.; Brezillon, C.; Berard, M.; Werts, C.; Varona, R.; Boneca, I. G.; Eberl, G., Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature* **2008**, *456*, 507-10.
69. Hill, G. R.; Ferrara, J. L., The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **2000**, *95*, 2754-9.
70. Chang, J. Y.; Antonopoulos, D. A.; Kalra, A.; Tonelli, A.; Khalife, W. T.; Schmidt, T. M.; Young, V. B., Decreased diversity of the fecal Microbiome in recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Infect Dis* **2008**, *197*, 435-8.
71. Farkas, A. M.; Panea, C.; Goto, Y.; Nakato, G.; Galan-Diez, M.; Narushima, S.; Honda, K.; Ivanov, I., Induction of Th17 cells by segmented filamentous bacteria in the murine intestine. *J Immunol Methods* **2015**, *421*, 104-11.
72. Atarashi, K.; Tanoue, T.; Ando, M.; Kamada, N.; Nagano, Y.; Narushima, S.; Suda, W.; Imaoka, A.; Setoyama, H.; Nagamori, T.; Ishikawa, E.; Shima, T.; Hara, T.; Kado, S.; Jinnohara, T.; Ohno, H.; Kondo, T.; Toyooka, K.; Watanabe, E.; Yokoyama, S.; Tokoro, S.; Mori, H.; Noguchi, Y.; Morita, H.; Ivanov, I.; Sugiyama, T.; Nunez, G.; Camp, J. G.; Hattori, M.; Umesaki, Y.; Honda, K., Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. *Cell* **2015**, *163*, 367-80.
73. Zeissig, S.; Blumberg, R. S., Commensal microbial regulation of natural killer T cells at the frontiers of the mucosal immune system. *FEBS Lett* **2014**, *588*, 4188-94.
74. Hand, T. W.; Dos Santos, L. M.; Bouladoux, N.; Molloy, M. J.; Pagan, A. J.; Pepper, M.; Maynard, C. L.; Elson, C. O., 3rd; Belkaid, Y., Acute gastrointestinal infection induces long-lived microbiota-specific T cell responses. *Science* **2012**, *337*, 1553-6.
75. Holler, E.; Butzhammer, P.; Schmid, K.; Hundsrucker, C.; Koestler, J.; Peter, K.; Zhu, W.; Sporrer, D.; Hehlhans, T.; Kreutz, M.; Holler, B.; Wolff, D.; Etinger, M.; Andreesen, R.; Levine, J. E.; Ferrara, J. L.; Gessner, A.; Spang, R.; Oefner, P. J., Metagenomic analysis of the stool microbiome in patients receiving allogeneic stem cell transplantation: loss of diversity is associated with use of systemic antibiotics and more pronounced in gastrointestinal graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* **2014**, *20*, 640-5.
76. Jenq, R. R.; Ubeda, C.; Taur, Y.; Menezes, C. C.; Khanin, R.; Dudakov, J. A.; Liu, C.; West, M. L.; Singer, N. V.; Equinda, M. J.; Gobourne, A.; Lipuma, L.; Young, L. F.; Smith, O. M.; Ghosh, A.; Hanash, A. M.; Goldberg, J. D.; Aoyama, K.; Blazar, B. R.; Pamer, E. G.; van den Brink, M. R., Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* **2012**, *209*, 903-11.
77. van Bekkum, D. W.; Roodenburg, J.; Heidt, P. J.; van der Waaij, D., Mitigation of secondary disease of allogeneic mouse radiation chimeras by modification of the intestinal microflora. *J Natl Cancer Inst* **1974**, *52*, 401-4.
78. Vossen, J. M.; Guiot, H. F.; Lankester, A. C.; Vossen, A. C.; Bredius, R. G.; Wolterbeek, R.; Bakker, H. D.; Heidt, P. J., Complete suppression of the gut microbiome

prevents acute graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. *PLoS One* **2014**, *9*, e105706.

79. Rayes, A.; Morrow, A. L.; Payton, L. R.; Lake, K. E.; Lane, A.; Davies, S. M., A Genetic Modifier of the Gut Microbiome Influences the Risk of Graft-versus-Host Disease and Bacteremia After Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* **2016**, *22*, 418-22.

80. Moulds, J. M.; Nowicki, S.; Moulds, J. J.; Nowicki, B. J., Human blood groups: incidental receptors for viruses and bacteria. *Transfusion* **1996**, *36*, 362-74.

81. Variyam, E. P.; Hoskins, L. C., Mucin degradation in human colon ecosystems. Degradation of hog gastric mucin by fecal extracts and fecal cultures. *Gastroenterology* **1981**, *81*, 751-8.

82. Wacklin, P.; Makivuokko, H.; Alakulppi, N.; Nikkila, J.; Tenkanen, H.; Rabina, J.; Partanen, J.; Aranko, K.; Matto, J., Secretor genotype (FUT2 gene) is strongly associated with the composition of Bifidobacteria in the human intestine. *PLoS One* **2011**, *6*, e20113.

83. Wacklin, P.; Tuimala, J.; Nikkila, J.; Sebastian, T.; Makivuokko, H.; Alakulppi, N.; Laine, P.; Rajilic-Stojanovic, M.; Paulin, L.; de Vos, W. M.; Matto, J., Faecal microbiota composition in adults is associated with the FUT2 gene determining the secretor status. *PLoS One* **2014**, *9*, e94863.

84. Mardis, E. R., The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet* **2008**, *24*, 133-41.

85. O'Sullivan, D. M.; Laver, T.; Temisak, S.; Redshaw, N.; Harris, K. A.; Foy, C. A.; Studholme, D. J.; Huggett, J. F., Assessing the accuracy of quantitative molecular microbial profiling. *Int J Mol Sci* **2014**, *15*, 21476-91.

86. Illumina Sequencing Technology.

https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf Abrufdatum 26.10.2018

87. Chen, T.; Yu, W. H.; IZard, J.; Baranova, O. V.; Lakshmanan, A.; Dewhirst, F. E., The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database (Oxford)* **2010**, *2010*, baq013.

88. Liu, L.; Li, Y.; Li, S.; Hu, N.; He, Y.; Pong, R.; Lin, D.; Lu, L.; Law, M., Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol* **2012**, *2012*, 251364.

89. Luo, C.; Tsementzi, D.; Kyrpides, N.; Read, T.; Konstantinidis, K. T., Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample. *PLoS One* **2012**, *7*, e30087.

90. Kononen, E., Development of oral bacterial flora in young children. *Ann Med* **2000**, *32*, 107-12.

91. Gosalbes, M. J.; Llop, S.; Valles, Y.; Moya, A.; Ballester, F.; Francino, M. P., Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. *Clin Exp Allergy* **2013**, *43*, 198-211.

92. Aagaard, K.; Ma, J.; Antony, K. M.; Ganu, R.; Petrosino, J.; Versalovic, J., The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* **2014**, *6*, 237ra65.

93. Jimenez, E.; Marin, M. L.; Martin, R.; Odriozola, J. M.; Olivares, M.; Xaus, J.; Fernandez, L.; Rodriguez, J. M., Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol* **2008**, *159*, 187-93.

94. Martin, R.; Langa, S.; Reviriego, C.; Jiminez, E.; Marin, M. L.; Xaus, J.; Fernandez, L.; Rodriguez, J. M., Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr* **2003**, *143*, 754-8.
95. Backhed, F.; Roswall, J.; Peng, Y.; Feng, Q.; Jia, H.; Kovatcheva-Datchary, P.; Li, Y.; Xia, Y.; Xie, H.; Zhong, H.; Khan, M. T.; Zhang, J.; Li, J.; Xiao, L.; Al-Aama, J.; Zhang, D.; Lee, Y. S.; Kotowska, D.; Colding, C.; Tremaroli, V.; Yin, Y.; Bergman, S.; Xu, X.; Madsen, L.; Kristiansen, K.; Dahlgren, J.; Wang, J., Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe* **2015**, *17*, 852.
96. Palmer, C.; Bik, E. M.; DiGiulio, D. B.; Relman, D. A.; Brown, P. O., Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* **2007**, *5*, e177.
97. Koenig, J. E.; Spor, A.; Scalfone, N.; Fricker, A. D.; Stombaugh, J.; Knight, R.; Angenent, L. T.; Ley, R. E., Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108 Suppl 1*, 4578-85.
98. Yatsunencko, T.; Rey, F. E.; Manary, M. J.; Trehan, I.; Dominguez-Bello, M. G.; Contreras, M.; Magris, M.; Hidalgo, G.; Baldassano, R. N.; Anokhin, A. P.; Heath, A. C.; Warner, B.; Reeder, J.; Kuczynski, J.; Caporaso, J. G.; Lozupone, C. A.; Lauber, C.; Clemente, J. C.; Knights, D.; Knight, R.; Gordon, J. I., Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **2012**, *486*, 222-7.
99. Xu, X.; He, J.; Xue, J.; Wang, Y.; Li, K.; Zhang, K.; Guo, Q.; Liu, X.; Zhou, Y.; Cheng, L.; Li, M.; Li, Y.; Li, Y.; Shi, W.; Zhou, X., Oral cavity contains distinct niches with dynamic microbial communities. *Environ Microbiol* **2015**, *17*, 699-710.
100. Kazor, C. E.; Mitchell, P. M.; Lee, A. M.; Stokes, L. N.; Loesche, W. J.; Dewhirst, F. E.; Paster, B. J., Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *J Clin Microbiol* **2003**, *41*, 558-63.
101. Riggio, M. P.; Lennon, A.; Rolph, H. J.; Hodge, P. J.; Donaldson, A.; Maxwell, A. J.; Bagg, J., Molecular identification of bacteria on the tongue dorsum of subjects with and without halitosis. *Oral Dis* **2008**, *14*, 251-8.
102. Bik, E. M.; Long, C. D.; Armitage, G. C.; Loomer, P.; Emerson, J.; Mongodin, E. F.; Nelson, K. E.; Gill, S. R.; Fraser-Liggett, C. M.; Relman, D. A., Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *ISME J* **2010**, *4*, 962-74.
103. Zaura, E.; Keijsers, B. J.; Huse, S. M.; Crielaard, W., Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. *BMC Microbiol* **2009**, *9*, 259.
104. Sun, B.; Zhou, D.; Tu, J.; Lu, Z., Evaluation of the Bacterial Diversity in the Human Tongue Coating Based on Genus-Specific Primers for 16S rRNA Sequencing. *Biomed Res Int* **2017**, *2017*, 8184160.
105. Jumpstart Consortium Human Microbiome Project Data Generation Working, G., Evaluation of 16S rDNA-based community profiling for human microbiome research. *PLoS One* **2012**, *7*, e39315.
106. Sundquist, A.; Bigdeli, S.; Jalili, R.; Druzin, M. L.; Waller, S.; Pullen, K. M.; El-Sayed, Y. Y.; Taslimi, M. M.; Batzoglou, S.; Ronaghi, M., Bacterial flora-typing with targeted, chip-based Pyrosequencing. *BMC Microbiol* **2007**, *7*, 108.
107. D'Amore, R.; Ijaz, U. Z.; Schirmer, M.; Kenny, J. G.; Gregory, R.; Darby, A. C.; Shakya, M.; Podar, M.; Quince, C.; Hall, N., A comprehensive benchmarking study of protocols and sequencing platforms for 16S rRNA community profiling. *BMC Genomics* **2016**, *17*, 55.
108. Yang, B.; Wang, Y.; Qian, P. Y., Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics* **2016**, *17*, 135.

109. Wang, Q.; Garrity, G. M.; Tiedje, J. M.; Cole, J. R., Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* **2007**, *73*, 5261-7.
110. Quince, C.; Lanzen, A.; Curtis, T. P.; Davenport, R. J.; Hall, N.; Head, I. M.; Read, L. F.; Sloan, W. T., Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nat Methods* **2009**, *6*, 639-41.
111. Margulies, M.; Egholm, M.; Altman, W. E.; Attiya, S.; Bader, J. S.; Bemben, L. A.; Berka, J.; Braverman, M. S.; Chen, Y. J.; Chen, Z.; Dewell, S. B.; Du, L.; Fierro, J. M.; Gomes, X. V.; Godwin, B. C.; He, W.; Helgesen, S.; Ho, C. H.; Irzyk, G. P.; Jando, S. C.; Alenquer, M. L.; Jarvie, T. P.; Jirage, K. B.; Kim, J. B.; Knight, J. R.; Lanza, J. R.; Leamon, J. H.; Lefkowitz, S. M.; Lei, M.; Li, J.; Lohman, K. L.; Lu, H.; Makhijani, V. B.; McDade, K. E.; McKenna, M. P.; Myers, E. W.; Nickerson, E.; Nobile, J. R.; Plant, R.; Puc, B. P.; Ronan, M. T.; Roth, G. T.; Sarkis, G. J.; Simons, J. F.; Simpson, J. W.; Srinivasan, M.; Tartaro, K. R.; Tomasz, A.; Vogt, K. A.; Volkmer, G. A.; Wang, S. H.; Wang, Y.; Weiner, M. P.; Yu, P.; Begley, R. F.; Rothberg, J. M., Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **2005**, *437*, 376-80.
112. Montassier, E.; Batard, E.; Massart, S.; Gastinne, T.; Carton, T.; Caillon, J.; Le Fresne, S.; Caroff, N.; Hardouin, J. B.; Moreau, P.; Potel, G.; Le Vacon, F.; de La Cochetiere, M. F., 16S rRNA gene pyrosequencing reveals shift in patient faecal microbiota during high-dose chemotherapy as conditioning regimen for bone marrow transplantation. *Microb Ecol* **2014**, *67*, 690-9.
113. Biagi, E.; Zama, D.; Nastasi, C.; Consolandi, C.; Fiori, J.; Rampelli, S.; Turrone, S.; Centanni, M.; Severgnini, M.; Peano, C.; de Bellis, G.; Basaglia, G.; Gotti, R.; Masetti, R.; Pession, A.; Brigidi, P.; Candela, M., Gut microbiota trajectory in pediatric patients undergoing hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* **2015**, *50*, 992-8.
114. Mashima, I.; Kamaguchi, A.; Nakazawa, F., The distribution and frequency of oral veillonella spp. in the tongue biofilm of healthy young adults. *Curr Microbiol* **2011**, *63*, 403-7.
115. Taur, Y.; Jenq, R. R.; Ubeda, C.; van den Brink, M.; Pamer, E. G., Role of intestinal microbiota in transplantation outcomes. *Best Pract Res Clin Haematol* **2015**, *28*, 155-61.
116. Ubeda, C.; Taur, Y.; Jenq, R. R.; Equinda, M. J.; Son, T.; Samstein, M.; Viale, A.; Socci, N. D.; van den Brink, M. R.; Kamboj, M.; Pamer, E. G., Vancomycin-resistant Enterococcus domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *J Clin Invest* **2010**, *120*, 4332-41.
117. Ames, N. J.; Sulima, P.; Ngo, T.; Barb, J.; Munson, P. J.; Paster, B. J.; Hart, T. C., A characterization of the oral microbiome in allogeneic stem cell transplant patients. *PLoS One* **2012**, *7*, e47628.
118. Ye, Y.; Carlsson, G.; Agholme, M. B.; Wilson, J. A.; Roos, A.; Henriques-Normark, B.; Engstrand, L.; Modeer, T.; Putsep, K., Oral bacterial community dynamics in paediatric patients with malignancies in relation to chemotherapy-related oral mucositis: a prospective study. *Clin Microbiol Infect* **2013**, *19*, E559-67.
119. Socie, G.; Stone, J. V.; Wingard, J. R.; Weisdorf, D.; Henslee-Downey, P. J.; Bredeson, C.; Cahn, J. Y.; Passweg, J. R.; Rowlings, P. A.; Schouten, H. C.; Kolb, H. J.; Klein, J. P., Long-term survival and late deaths after allogeneic bone marrow transplantation. Late Effects Working Committee of the International Bone Marrow Transplant Registry. *N Engl J Med* **1999**, *341*, 14-21.

120. Golob, J. L.; Pergam, S. A.; Srinivasan, S.; Fiedler, T. L.; Liu, C.; Garcia, K.; Mielcarek, M.; Ko, D.; Aker, S.; Marquis, S.; Loeffelholz, T.; Plantinga, A.; Wu, M. C.; Celustka, K.; Morrison, A.; Woodfield, M.; Fredricks, D. N., Stool Microbiota at Neutrophil Recovery Is Predictive for Severe Acute Graft vs Host Disease After Hematopoietic Cell Transplantation. *Clin Infect Dis* **2017**, *65*, 1984-1991.
121. Weber, D.; Jenq, R. R.; Peled, J. U.; Taur, Y.; Hiergeist, A.; Koestler, J.; Dettmer, K.; Weber, M.; Wolff, D.; Hahn, J.; Pamer, E. G.; Herr, W.; Gessner, A.; Oefner, P. J.; van den Brink, M. R. M.; Holler, E., Microbiota Disruption Induced by Early Use of Broad-Spectrum Antibiotics Is an Independent Risk Factor of Outcome after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* **2017**, *23*, 845-852.

Abbildungsverzeichnis

ABB. 1: SCHEMATISCHER AUFBAU DES PROKARYOTISCHEN 70S-RIBOSOMS UND DARSTELLUNG DER VERWENDUNG DER 16S RRNS-GENSEQUENZIERUNG.....	5
ABB. 2: AUFBAU EINES PROKARYOTISCHEN 16S RNS-GENS AM BEISPIEL VON E. COLI.	5
ABB. 3: MIKROBIELLE DIVERSITÄT EINZELNER ANATOMISCHER HABITATE AUF PHYLUMBEBENE.....	7
ABB. 4: ÜBERSICHT ÜBER DEN THERAPIEVERLAUF BEI ALLOGENER HÄMATOPOETISCHER STAMMZELLTRANSPLANTATION (ALLOHSZT).	11
ABB. 5: PROJEKTABLAUF.....	20
ABB. 6: TECHNIK UND LOKALISATION DER PROBENTNAHME.....	22
ABB. 7: PRIMERDESIGN FÜR DIE ROCHE/454-AMPLIFIKATIONSbibliothek.....	25
ABB. 8: ENZYMKASKADE DER PYROSEQUENZIERUNG SOWIE ENTSTEHUNG EINES PYROGRAMMS.....	30
ABB. 9: AUFBAU DES PROKARYOTISCHEN 16S RRNS-GENS UND LAGE DER PRIMER-BINDUNGSSTELLEN.....	32
ABB. 10: PRINZIP DER BRIDGE-AMPLIFIKATION UND SEQUENCE-BY-SYNTHESIS (SBS).	35
ABB. 11: DARSTELLUNG DER BEHANDLUNGSANLÄSSE, DES MEDIKAMENTÖSEN THERAPIEVERLAUFS SOWIE DER ABSTRICHZEITPUNKTE. A: PATIENT UKD1; B: PATIENT UKD2	38
ABB. 12: ERGEBNISSE DER ROCHE/454-SEQUENZIERUNG DER ZUNGENRANDABSTRICHE DES PATIENTEN UKD1 UND DES ENTSPRECHENDEN DONORS AUF PHYLUMBEBENE.....	39
ABB. 13: ERGEBNISSE DER ROCHE/454-SEQUENZIERUNG DER ZUNGENRANDABSTRICHE DES PATIENTEN UKD1 UND DES ENTSPRECHENDEN DONORS AUF GATTUNGSEBENE.	40
ABB. 14: ERGEBNISSE DER ILLUMINA HISEQ 2500-SEQUENZIERUNG DER ZUNGENRANDABSTRICHE DER PATIENTEN UKD1 UND UKD2 SOWIE DER ENTSPRECHENDEN DONOREN AUF PHYLUMBEBENE.....	43
ABB. 15: DARSTELLUNG DER ILLUMINA HISEQ 2500-SEQUENZIERERGEBNISSE AUF GATTUNGSEBENE.....	45
ABB. 16: PHYLUMVERGLEICH DES ZUNGENRANDES DES PATIENTEN UKD1 UND ENTSPRECHENDEN DONORS NACH ROCHE/454 FLX TITANIUM- UND ILLUMINA HISEQ 2500-SEQUENZIERUNG.....	54
ABB. 17: GATTUNGSVERGLEICH DES ZUNGENRANDES DES PATIENTEN UKD1 UND ENTSPRECHENDEN DONORS NACH ROCHE/454 FLX TITANIUM- UND ILLUMINA HISEQ 2500-SEQUENZIERUNG.....	55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: SYNTHETISIERTE OLIGONUKLEOTIDE, VERWENDUNGSZWECK UND BASENSEQUENZ.....	19
-----------------------------------------------------------------------------------	----

Anhang

- I **Metadaten der Patienten UKD1 und UKD2**
- II **Ergebnisse der Roche/454-Sequenzierung in tabellarischer Form**
- III **Ergebnisse der Illumina-Sequenzierung in tabellarischer Form**

Anhang I

Metadaten des Patienten UKD1

Geschlecht Patient UKD1	männlich
Alter Patienten bei alloHSZT	2 Jahre und 9 Monate
Geschlecht Donor	männlich
Alter Donors bei alloHSZT	6 Jahre und 1 Monat
Grunderkrankung	Myeloische Neoplasie mit Nachweis einer Monosomie 7
Vorherige Therapie	Chemotherapie mit Cytarabin und 6-Mercaptopurin sowie nach Blastenexzess Chemotherapie nach AML-BFM 2004-Protokoll
Art der Transplantation	Allogen-verwandte KMT vom HLA-identen (HLA-Match: 10/10) und blutgruppenident. (A Rhesus positiv) Spender
Konditionierungsregime	1. Busulfan [4 x 48 mg/kg] an Tag -8 bis -5 2. Cyclophosphamid [2 x 60 mg/kg] an Tag -3 bis -2 3. Melphalan [1 x 140 mg/m ²] an Tag -1
GvHD-Prophylaxe	Ciclosporin A ab Tag -1 [2 x 2,5 mg/kg/d] ab Tag 0 [2 x 1,5 mg/kg/d] ab Tag +5 spiegeladaptiert Methotrexat an Tag +1, +3, +5 [10 mg/m ² /d]
Antibakterielle Therapie	Prophylaxe mit Ciprofloxacin (Tag -8 bis +7), Metronidazol (Tag -8 bis +40) und Cotrimoxazol (vor alloHSZT bis mind. Tag +100) Piperacillin und Tazobactam ab Tag +7 bis Tag +14 sowie Eskalation mit Teicoplanin ab Tag +8 bis Tag +15 bei Pneumonie in Aplasie
Antivirale Therapie	Prophylaxe mit Aciclovir (Tag -8 bis mind. +100)
Antimykotische Therapie	Prophylaxe mit Amphotericin B (vor alloHSZT) Prophylaxe mit Fluconazol (Tag +1 bis +23) Voriconazol (Tag +23 bis mindestens +100)
Immunglobulingabe	IgG 2 x 10 g an Tag -4 und Tag -2
Spenderchimärismus	vollst. Spenderchimärismus im periph. Blut an Tag + 13
Engraftment	Neutrophil seit Tag + 14

GvHD	Grad 0 (Haut 0, Leber 0, Darm 0)
Mukositis	WHO Grad 4
Komplikationen der alloHSZT	Pneumonie in Aplasie ohne Erregernachweis
Probenentnahmezeitpunkte	vor alloHSZT, Tag +35, Tag +61, Tag +90, Tag +120, Tag +153, Tag +187, Tag +218 und Tag +408

Metadaten des Patienten UKD2

Geschlecht Patient UKD2	weiblich
Alter Patienten bei alloHSZT	19 Jahre und 7 Monate
Geschlecht Donor	männlich
Alter Donors bei alloHSZT	27 Jahre und 2 Monate
Grunderkrankung	AML M1 mit spätem isolierten KM-Rezidiv
Vorherige Therapie	Chemotherapie der Erstdiagnose AML M1 nach AML-BFM 2004-Protokoll der Standardrisikogruppe Perkutane, fraktionierte Bestrahlung des Ganzhirns bis 12 Gy Chemotherapie des Rezidivs nach AML Relapse 2009-Protokoll
Art der Transplantation	Allogen-verwandte KMT vom HLA-identen (HLA-Match: 10/10) und blutgruppenident. (A Rhesus positiv) Spender
Konditionierungsregime	1. Amsacrine [100 mg/ m ² /d] an Tag -12 bis -9 2. Fludarabin [30 mg/ m ² /d] an Tag -12 bis -9 3. Cytarabin [2 mg/ m ² /d] an Tag -12 bis -9 4. TBI [2 x 2 Gy] an Tag -5 5. Cyclophosphamid [4 mg/kg/d] an Tag -4 bis -3 6. ATG [10 mg/kg/d] an Tag -4 bis -2
GvHD-Prophylaxe	Ciclosporin A ab Tag -1 [2 x 2,5 mg/kg/d] ab Tag 0 [2 x 1,5 mg/kg/d] ab Tag +5 spiegeladaptiert MMF ab Tag 0 [2 x 15 mg/kg]

Antibakterielle Therapie	Prophylaxe mit Ciprofloxacin (Tag -13 bis -9), Metronidazol (Tag -13 bis +30) sowie Cotrimoxazol (Tag -13 bis Tag +208) Piperacillin und Tazobactam ab Tag -9 bis Tag +6 sowie Eskalation mit Teicoplanin ab Tag -3 bis Tag +6 Umstellung auf Meropenem ab Tag +6 bis +20 Erweiterung um Clindamycin ab Tag +8 bis +9 und Eskalation auf Ceftazidim von Tag +9 bis Tag + 23
Antivirale Therapie	Prophylaxe mit Aciclovir von Tag -13 bis +7 Umstellung auf Foscavir von Tag +7 bis +14 bei erhöhter HHV6-Viruslast im peripheren Blut Erneute Gabe von Aciclovir von Tag +14 bis +29 Valaciclovir von Tag +29 bis +208
Antimykotische Therapie	Prophylaxe mit Caspofungin ab Tag -13 bis +29, Erweiterung um Voriconazol bei disseminierter Pneumonie mit mult. Rundherden von Tag +10 bis +208
Immunglobulingabe	IgG 2 x 10 g an Tag -4 und Tag -2
Spenderchimärismus	vollständiger Spenderchimärismus im peripheren Blut ab Tag +15 und im KM ab Tag +27
Engraftment	Leukozytär und neutrophil an Tag + 17
GvHD	Grad 0 (Haut 0, Leber 0, Darm 0)
Mukositis	WHO Grad 0
Komplikationen der alloHSZT	Infektion in Aplasie ohne Erregernachweis
Probenentnahmezeitpunkte	vor alloHSZT, Tag 0, Tag +27, Tag +59, Tag +90

Anhang II Ergebnisse der Roche/454-Sequenzierung in tabellarischer Form

Anhang II.I Roche/454: Taxonomische Verteilung auf Phylumebene

	vor alloHSZT (%)	Tage nach alloHSZT			Donor (%)
		+ 35 d (%)	+ 61 d (%)	+ 120 d (%)	
Actinobacteria	16,1	0,0	6,2	7,9	20,7
Bacteroidetes	0,0	0,0	2,3	14,9	0,0
Firmicutes	81,0	44,4	88,3	72,2	69,0
Fusobacteria	0,0	0,0	0,0	1,4	0,0
Proteobacteria	2,9	55,6	3,1	3,5	10,3
Bacteria n.k.	0,0	0,0	0,2	0,1	0,0

Anhang II.II Roche/454: Taxonomische Verteilung auf Klassenebene

	vor alloHSZT (%)	Tage nach alloHSZT			Donor (%)
		+ 35 d (%)	+ 61 d (%)	+ 120 d (%)	
Actinobacteria	16,1	0,0	6,2	7,9	20,7
Bacteroidia	0,0	0,0	2,3	14,9	0,0
Bacilli	81,0	44,4	72,8	50,1	65,5
Clostridia	0,0	0,0	15,2	20,0	3,4
Erysipelotrichi	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0
Fusobacteria	0,0	0,0	0,0	1,4	0,0
Betaproteobacteria	0,0	55,6	0,0	0,0	3,4
Epsilonproteobacteria	0,0	0,0	3,1	3,2	0,0
Gammaproteobacteria	2,9	0,0	0,0	0,2	6,9
Klasse n.k.	0,0	0,0	0,4	0,2	0,0

Anhang II.III Roche/454: Taxonomische Verteilung auf Ordnungsebene

	vor alloHSZT (%)	Tage nach alloHSZT			Donor (%)
		+ 35 d (%)	+ 61 d (%)	+ 120 d (%)	
Actinomycetales	16,1	0,0	6,2	6,4	20,7
Coriobacteriales	0,0	0,0	0,0	1,5	0,0
Bacteroidales	0,0	0,0	2,3	14,9	0,0
Bacillales	0,5	33,3	1,5	0,6	0,0
Lactobacillales	80,5	11,1	71,3	49,5	65,5
Clostridiales	0,0	0,0	15,2	20,0	3,4
Erysipelotrichales	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0
Fusobacteriales	0,0	0,0	0,0	1,4	0,0
Neisseriales	0,0	55,6	0,0	0,0	3,4
Campylobacterales	0,0	0,0	3,0	3,2	0,0
Pasteurellales	0,0	0,0	0,0	0,2	6,9
Pseudomonadales	2,9	0,0	0,0	0,0	0,0
Ordnung n.k.	0,0	0,0	0,5	0,2	0,0

Anhang II.IV Roche/454: Taxonomische Verteilung auf Familienebene

	vor alloHSZT (%)	Tage nach alloHSZT			Donor (%)
		+ 35 d (%)	+ 61 d (%)	+ 120 d (%)	
Actinomycetaceae	2,4	0,0	1,7	4,5	0,0
Micrococaceae	13,2	0,0	4,5	1,9	20,7
Coriobacteriaceae	0,0	0,0	0,0	1,5	0,0
Prevotellaceae	0,0	0,0	2,3	14,8	0,0
Staphylococcaceae	0,5	33,3	1,5	0,6	0,0
Carnobacteriaceae	0,5	0,0	29,2	17,6	17,2
Lactobacillaceae	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
Streptococcaceae	80,0	11,1	41,9	31,7	48,3
Lachnospiraceae	0,0	0,0	0,0	1,5	0,0
Veillonellaceae	0,0	0,0	15,2	17,3	3,4
Erysipelotrichaceae	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0
Fusobacteriaceae	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0
Leptotrichiaceae	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0
Neisseriaceae	0,0	55,6	0,0	0,0	3,4
Campylobacteraceae	0,0	0,0	3,0	3,2	0,0
Pasteurellaceae	0,0	0,0	0,0	0,2	6,9
Pseudomonadaceae	2,9	0,0	0,0	0,0	0,0
Familie n.k.	0,5	0,0	0,6	1,6	0,0

Anhang II.V. Roche/454: Taxonomische Verteilung auf Gattungsebene

	vor alloHSZT (%)	Tage nach alloHSZT			Donor (%)
		+ 35 d (%)	+ 61 d (%)	+ 120 d (%)	
Actinomyces	2,4	0,0	1,7	4,4	0,0
Rothia	13,2	0,0	4,5	1,9	20,7
Atopobium	0,0	0,0	0,0	1,5	0,0
Prevotella	0,0	0,0	2,2	14,8	0,0
Gemella	0,0	22,2	1,5	0,0	0,0
Staphylococcus	0,5	11,1	0,0	0,0	0,0
Granulicatella	0,5	0,0	29,2	17,6	17,2
Lactobacillus	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
Streptococcus	80,0	11,1	41,9	31,7	48,3
Catonella	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
Oribacterium	0,0	0,0	0,0	1,4	0,0
Megasphaera	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
Veillonella	0,0	0,0	15,2	17,2	3,4
Solobacterium	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0
Fusobacterium	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0
Leptotrichia	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0
Neisseria	0,0	55,6	0,0	0,0	3,4
Campylobacter	0,0	0,0	3,0	3,2	0,0
Haemophilus	0,0	0,0	0,0	0,2	6,9
Pseudomonas	2,9	0,0	0,0	0,0	0,0
Gattung n.k.	0,5	0,0	0,6	1,9	0,0

Anhang III Ergebnisse der Illumina-Sequenzierung in tabellarischer Form

Anhang III.I Illumina UKD1: Taxonomische Verteilung auf Phylumebene

	vor alloHSZT (%)	Tage nach alloHSZT										Donor (%)
		+ 35 d (%)	+ 61 d (%)	+ 90 d (%)	+ 120 d (%)	+ 153 d (%)	+ 187 d (%)	+ 218 d (%)	+ 408 d (%)			
Actinobacteria	0,7	0,1	0,1	0,0	4,3	0,1	0,6	0,0	0,1	0,3		
Bacteroidetes	0,0	0,3	11,1	0,3	23,0	2,9	3,4	2,3	16,2	11,2		
Cyanobacteria	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,4	0,1	0,0	1,4	0,0		
Firmicutes	98,4	58,4	72,0	71,7	55,9	72,3	40,4	54,6	42,5	50,3		
Fusobacteria	0,3	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	0,6	0,4	1,8	3,2		
Proteobacteria	0,7	41,0	16,8	27,9	14,3	24,3	54,9	42,7	38,1	35,0		

Anhang III.II Illumina UKD1: Taxonomische Verteilung auf Klassenebene

	vor alloHSZT (%)	Tage nach alloHSZT										Donor (%)
		+ 35 d (%)	+ 61 d (%)	+ 90 d (%)	+ 120 d (%)	+ 153 d (%)	+ 187 d (%)	+ 218 d (%)	+ 408 d (%)			
Actinobacteria	0,7	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,6	0,0	0,0	0,0	0,3	
Coriobacteria	0,0	0,0	0,0	0,0	4,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Bacteroidia	0,0	0,2	11,1	0,3	22,9	2,5	1,7	0,8	14,8	11,1		
Cytophagia	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		
Flavobacteria	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	1,7	1,5	1,4	0,1		
Chloroplast	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,4	0,1	0,0	1,4	0,0		
Bacilli	98,3	57,8	52,6	70,9	32,6	41,8	16,4	34,6	28,5	44,2		
Clostridia	0,1	0,6	19,4	0,6	21,8	30,5	24,0	20,0	13,9	6,0		
Erysipelotrichi	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0		
Fusobacteria	0,3	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	0,6	0,4	1,8	3,2		
Alphaproteobacteria	0,0	0,3	0,0	0,1	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0		
Betaproteobacteria	0,0	2,2	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1		
Epsilonproteobacteria	0,0	0,0	13,0	0,0	10,1	17,5	8,7	3,2	0,6	0,1		
Gammaproteobacteria	0,6	38,5	3,7	27,7	4,2	6,8	45,9	39,5	37,5	34,8		

Anhang III.III Illumina UKD1: Taxonomische Verteilung auf Ordnungsebene

	vor alloHSZT (%)	Tage nach alloHSZT										Donor (%)
		+ 35 d (%)	+ 61 d (%)	+ 90 d (%)	+ 120 d (%)	+ 153 d (%)	+ 187 d (%)	+ 218 d (%)	+ 408 d (%)			
Actinomycetales	0,7	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,6	0,0	0,0	0,0	0,3	
Coriobacteriales	0,0	0,0	0,0	0,0	4,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Bacteroidales	0,0	0,2	11,1	0,3	22,9	2,5	1,7	0,8	14,8	11,1	11,1	
Flavobacteriales	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	1,7	1,5	1,4	0,1	0,1	
Streptophyta	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,4	0,1	0,0	1,4	0,0	0,0	
Bacillales	0,0	14,8	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,1	
Gemellales	11,2	17,6	3,4	0,0	0,9	5,1	6,4	6,4	1,7	9,5	9,5	
Lactobacillales	87,1	25,4	49,2	70,8	31,6	36,6	9,9	28,2	26,6	34,6	34,6	
Clostridiales	0,1	0,6	19,4	0,8	21,8	30,5	24,0	20,0	13,9	6,0	6,0	
Erysipelotrichales	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	
Fusobacteriales	0,3	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	0,6	0,4	1,8	3,2	3,2	
Rhizobiales	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	
Burkholderiales	0,0	2,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	
Neisseriales	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	
Campylobacteriales	0,0	0,0	13,0	0,0	10,1	17,5	8,7	3,2	0,6	0,1	0,1	
Alteromonadales	0,2	15,1	1,2	13,4	0,6	2,1	4,8	0,3	0,3	0,2	0,2	
Cardiobacteriales	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	
Enterobacteriales	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,1	0,1	0,6	0,6	
Oceanospirillales	0,4	22,7	2,4	14,1	1,5	4,6	10,5	0,7	0,7	0,4	0,4	
Pasteurellales	0,0	0,2	0,1	0,1	2,0	0,0	29,9	38,2	36,3	33,4	33,4	
Pseudomonadales	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	
Xanthomonadales	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	

Anhang III.IV Illumina UKD1: Taxonomische Verteilung auf Familienebene

	vor alloHSZT (%)	Tage nach alloHSZT										Donor (%)		
		+ 35 d (%)	+ 61 d (%)	+ 90 d (%)	+ 120 d (%)	+ 153 d (%)	+ 187 d (%)	+ 218 d (%)	+ 408 d (%)					
Actinomycetaceae	0,4	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1
Micrococcaceae	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2
Coriobacteriaceae	0,0	0,0	0,0	0,0	4,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Bacteroidaceae	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Porphyromonadaceae	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	12,3	6,6
Prevotellaceae	0,0	0,0	11,0	0,2	22,7	0,0	0,0	0,0	2,5	0,0	1,7	0,7	2,1	4,3
[Paraprevotellaceae]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,1
Cytophagaceae	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Flavobacteriaceae	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	1,7	1,5	1,4	0,1
Planococcaceae	0,0	0,9	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
Staphylococcaceae	0,0	13,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
Gemellaceae	11,2	17,6	3,4	0,0	0,9	0,0	0,0	0,0	5,1	0,0	6,4	6,4	1,7	9,5
Aerococcaceae	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Carnobacteriaceae	22,7	0,4	15,1	29,0	10,8	0,0	0,0	0,0	10,3	0,0	4,1	9,9	6,5	10,6
Enterococcaceae	3,6	0,0	1,1	1,6	0,3	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,1	0,6	0,7	1,2
Lactobacillaceae	0,0	0,0	0,0	0,5	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
Streptococcaceae	60,6	24,9	33,0	39,6	20,4	0,0	0,0	0,0	25,7	0,0	5,6	17,7	19,3	22,8
Clostridiaceae	0,0	0,3	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,4	0,1
Lachnospiraceae	0,0	0,1	0,0	0,1	1,2	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0
Ruminococcaceae	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	0,0
Veillonellaceae	0,0	0,1	19,3	0,4	19,7	0,0	0,0	0,0	29,9	0,0	23,9	19,9	11,5	5,9
Erysipelotrichaceae	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
Fusobacteriaceae	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,6	2,9
Leptotrichiaceae	0,3	0,0	0,0	0,0	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,1	1,2	0,2
Rhizobiaceae	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
Comamonadaceae	0,0	2,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
Neisseriaceae	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
Campylobacteraceae	0,0	0,0	13,0	0,0	10,1	0,0	0,0	0,0	17,5	0,0	8,7	3,2	0,6	0,1
Shewanellaceae	0,2	15,1	1,2	13,4	0,6	0,0	0,0	0,0	2,1	0,0	4,8	0,3	0,3	0,2
Cardiobacteriaceae	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
Enterobacteriaceae	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,1	0,1	0,6
Halomonadaceae	0,4	22,7	2,4	14,1	1,5	0,0	0,0	0,0	4,6	0,0	10,5	0,7	0,7	0,4

Pasteurellaceae	0,0	0,2	0,1	0,1	2,0	0,0	29,9	38,2	36,3	33,4
Moraxellaceae	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
Pseudomonadaceae	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
Xanthomonadaceae	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Familie n.k.	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0	0,4	0,1	0,0	1,4	0,0

Anhang III.V Illumina UKD1: Taxonomische Verteilung auf Gattungsebene

	vor alloHSZT (%)	Tage nach alloHSZT							Donor (%)		
		+ 35 d (%)	+ 61 d (%)	+ 90 d (%)	+ 120 d (%)	+ 153 d (%)	+ 187 d (%)	+ 218 d (%)		+ 408 d (%)	
Actinomyces	0,4	0,0	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1
Rothia	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2
Atopobium	0,0	0,0	0,0	0,0	4,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Bacteroides	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Porphyromonas	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,6
Prevotella	0,0	0,0	11,0	0,2	22,7	2,5	1,7	0,7	1,5	1,4	4,3
Capnocytophaga	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	1,7	0,0	0,0	0,0	0,1
Staphylococcus	0,0	13,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
Gemella	10,3	17,2	3,2	0,0	0,8	4,9	6,3	5,9	1,6	1,6	8,9
Aerococcus	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Carnobacterium	0,3	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
Granulicatella	22,4	0,4	15,0	28,9	10,8	10,3	4,1	9,9	6,5	10,5	10,5
Enterococcus	3,6	0,0	1,1	1,6	0,3	0,5	0,1	0,6	0,7	1,2	1,2
Lactobacillus	0,0	0,0	0,0	0,5	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
Lactococcus	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1
Streptococcus	57,9	24,6	31,6	38,1	19,1	24,6	5,5	16,7	18,7	21,8	21,8
Epulopiscium	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Oribacterium	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Faecalibacterium	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Selenomonas	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
Veillonella	0,0	0,1	19,3	0,4	19,6	29,9	23,8	19,9	11,5	5,9	5,9
Bulleidia	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Fusobacterium	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,1	0,2	0,6	2,9	2,9
Leptotrichia	0,3	0,0	0,0	0,0	1,8	0,0	0,5	0,1	1,2	0,2	0,2
Acidovorax	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Comamonas	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Delftia	0,0	1,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
Neisseria	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
Campylobacter	0,0	0,0	13,0	0,0	10,1	17,5	8,7	3,2	0,6	0,1	0,1
Shewanella	0,2	15,1	1,1	13,3	0,6	2,1	4,8	0,3	0,3	0,2	0,2
Morganella	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
Halomonas	0,4	22,5	2,4	13,9	1,5	4,5	9,7	0,6	0,6	0,4	0,4

Actinobacillus	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Aggregatibacter	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1
Haemophilus	0,0	0,2	0,1	0,1	2,0	29,7	38,1	36,1	33,2	33,2
Moraxella	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
Stenotrophomonas	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Gattung n.k.	3,5	2,7	1,7	1,9	3,3	2,2	1,8	1,6	4,1	2,2

Anhang III.VI Illumina UKD2: Taxonomische Verteilung auf Phylumebene

	vor alloHSZT (%)	0 d (%)	Tage nach alloHSZT			Donor (%)
			+ 27 d (%)	+ 59 d (%)	+ 90 d (%)	
Actinobacteria	0,0	0,1	31,6	1,9	0,3	0,0
Bacteroidetes	0,2	0,1	0,4	4,8	2,9	12,4
Cyanobacteria	0,2	0,0	33,6	0,0	0,0	0,0
Firmicutes	39,4	83,3	10,1	85,5	52,7	43,6
Fusobacteria	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,3
Proteobacteria	60,2	16,5	24,3	7,8	43,7	43,6

Anhang III.VII Illumina UKD2: Taxonomische Verteilung auf Klassenebene

	vor alloHSZT (%)	0 d (%)	Tage nach alloHSZT			Donor (%)
			+ 27 d (%)	+ 59 d (%)	+ 90 d (%)	
Actinobacteria	0,0	0,1	31,6	0,0	0,1	0,0
Coriobacteria	0,0	0,0	0,0	1,8	0,2	0,0
Bacteroidia	0,1	0,1	0,3	4,8	1,6	12,4
Cytophagia	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
Flavobacteria	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0
Chloroplast	0,2	0,0	33,6	0,0	0,0	0,0
Bacilli	38,2	82,9	9,6	60,2	27,8	38,6
Clostridia	1,1	0,4	0,5	25,3	24,9	5,0
Alphaproteobacteria	0,2	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
Betaproteobacteria	0,4	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
Epsilonproteobacteria	0,0	0,0	0,0	3,4	1,0	0,4
Gammaproteobacteria	59,6	16,4	24,1	4,3	42,7	43,2

Anhang III.VIII Illumina UKD2: Taxonomische Verteilung auf Ordnungsebene

	vor alloHSZT (%)	Tage nach alloHSZT				Donor (%)
		0 d (%)	+ 27 d (%)	+ 59 d (%)	+ 90 d (%)	
Actinomycetales	0,0	0,0	31,6	0,0	0,1	0,0
Coriobacteriales	0,0	0,0	0,0	1,8	0,2	0,0
Bacteroidales	0,1	0,1	0,3	4,8	1,6	12,4
Cytophagales	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
Flavobacteriales	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0
Streptophyta	0,2	0,0	33,6	0,0	0,0	0,0
Bacillales	35,7	46,5	2,7	0,0	0,0	0,0
Gemellales	0,1	0,0	0,0	0,1	1,2	5,1
Lactobacillales	2,5	36,4	6,9	60,1	26,5	33,5
Clostridiales	1,1	0,4	0,5	25,3	24,9	5,0
Fusobacteriales	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,3
Rhizobiales	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Campylobacterales	0,0	0,0	0,0	3,4	1,0	0,4
Alteromonadales	25,0	6,8	8,7	1,3	1,8	0,0
Enterobacteriales	0,1	0,1	0,4	0,0	0,3	0,1
Oceanospirillales	33,7	9,4	14,3	2,8	3,7	0,0
Pasteurellales	0,1	0,0	0,0	0,1	36,7	42,9
Pseudomonadales	0,3	0,1	0,2	0,0	0,1	0,0
Vibrionales	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0
Xanthomonadales	0,3	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0
Ordnung n. k.	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Anhang III.IX Illumina UKD2: Taxonomische Verteilung auf Familienebene

	vor alloHSZT (%)	Tage nach alloHSZT				Donor (%)
		0 d (%)	+ 27 d (%)	+ 59 d (%)	+ 90 d (%)	
Micrococcaceae	0,0	0,0	31,5	0,0	0,0	0,0
Coriobacteriaceae	0,0	0,0	0,0	1,8	0,2	0,0
Porphyromonadaceae	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	8,2
Prevotellaceae	0,1	0,0	0,1	4,7	1,5	3,9
Cytophagaceae	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
Flavobacteriaceae	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0
Planococcaceae	0,1	3,7	0,0	0,0	0,0	0,0
Staphylococcaceae	35,6	42,8	2,7	0,0	0,0	0,0
Gemellaceae	0,1	0,0	0,0	0,1	1,2	5,1
Carnobacteriaceae	0,2	0,4	0,1	2,8	8,1	5,6
Enterococcaceae	0,0	0,1	0,1	0,4	0,6	1,0
Lactobacillaceae	0,3	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
Streptococcaceae	2,1	35,9	0,9	56,9	17,7	26,9
Clostridiaceae	0,9	0,3	0,4	0,0	0,4	0,3
Lachnospiraceae	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,1
Veillonellaceae	0,1	0,0	0,0	25,0	24,4	4,5
Fusobacteriaceae	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,1
Leptotrichiaceae	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2
Caulobacteraceae	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Rhizobiaceae	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Comamonadaceae	0,4	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
Campylobacteraceae	0,0	0,0	0,0	3,4	1,0	0,4
Shewanellaceae	25,0	6,8	8,7	1,3	1,8	0,0
Enterobacteriaceae	0,1	0,1	0,4	0,0	0,3	0,1

Halomonadaceae	33,7	9,4	14,3	2,8	3,7	0,0
Pasteurellaceae	0,1	0,0	0,0	0,1	36,7	42,9
Moraxellaceae	0,3	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
Pseudomonadaceae	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
Vibrionaceae	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0
Xanthomonadaceae	0,3	0,1	0,2	0,0	0,0	0,0
Familie n.k.	0,2	0,1	39,2	0,0	0,0	0,0

Anhang III.X Illumina UKD2: Taxonomische Verteilung auf Gattungsebene

	vor alloHSZT (%)	Tage nach alloHSZT				Donor (%)
		0 d (%)	+ 27 d (%)	+ 59 d (%)	+ 90 d (%)	
Rothia	0,0	0,0	31,5	0,0	0,0	0,0
Atopobium	0,0	0,0	0,0	1,8	0,2	0,0
Porphyromonas	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,2
Prevotella	0,1	0,0	0,1	4,7	1,5	3,9
Capnocytophaga	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0
Staphylococcus	35,6	42,8	2,7	0,0	0,0	0,0
Gemella	0,0	0,0	0,0	0,1	1,2	4,7
Carnobacterium	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
Granulicatella	0,2	0,4	0,1	2,8	8,1	5,5
Enterococcus	0,0	0,1	0,1	0,4	0,6	1,0
Lactobacillus	0,3	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
Lactococcus	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1
Streptococcus	2,0	35,9	0,8	56,2	17,3	25,6
Sarcina	0,9	0,3	0,4	0,0	0,0	0,0
Veillonella	0,1	0,0	0,0	24,6	24,4	4,5
Fusobacterium	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,1
Leptotrichia	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2
Mycoplana	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Deflvia	0,2	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
Campylobacter	0,0	0,0	0,0	3,4	1,0	0,4
Shewanella	25,0	6,8	8,6	1,3	1,8	0,0
Pantoea	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
Halomonas	33,3	9,3	14,1	2,8	3,4	0,0
Haemophilus	0,1	0,0	0,0	0,1	36,7	42,9

Stenotrophomonas	0,3	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0
Gattung n.k.	0,4	3,9	39,5	0,6	1,1	1,9	0,0

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Arndt Borkhardt für die Bereitstellung des aktuellen interessanten Themas, die Möglichkeit der Bearbeitung in seinem Labor sowie die Begutachtung der vorliegenden Promotionsschrift bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Ute Fischer für die enge Betreuung und zielführende Unterstützung sowohl bei der Planung und Durchführung der Experimente, bei der Diskussion der Daten als auch Fertigstellung der Arbeit. Mit der herzlichen Aufnahme ins Team wurde mir die produktive Bearbeitung im Labor nicht nur ermöglicht, sondern auch in Semesterferien und an Wochenenden sehr erleichtert.

Weiterhin bedanke ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Roland Meisel und Herrn Dr. med. Meinolf Siepermann für die konstruktive Diskussion der klinischen Grundlagen und Aspekte der vorliegenden Arbeit.

Herrn Dr. rer. nat. Michael Gombert danke ich sehr herzlich für die enge Betreuung bei der Einführung in die Methodik und bei der Durchführung der experimentellen Untersuchungen.

Des Weiteren gilt mein Dank Frau Prof. rer. nat. Birgit Henrich sowohl für die Bereitstellung der isolierten Mikrobiomproben als auch für die zielführende Diskussion bezüglich eingesetzter Methoden.

Frau Olga Felda hat mit ihrer engagierten Einarbeitung in die Labormethoden sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Dafür gilt ihr mein besonderer Dank.

Den Herren Dres. rer. nat. Alexander Sczyrba und Maddis Rumming danke ich für die bioinformatische Aufarbeitung der Sequenzierungsergebnisse und die Diskussion der Daten.

Außerdem möchte ich mich bei all meinen Mitstreitern im Labor für die gute Zusammenarbeit bedanken. Vielen Dank an Euch alle für das tolle Arbeitsklima und für die unvergessliche Doktorandenzeit!

Abschließend gilt mein ganz besonderer Dank meiner Familie und meinem Lebenspartner für ihre uneingeschränkte Unterstützung, Ermutigung und Geduld während der gesamten Promotionszeit und darüber hinaus. Vor allem ohne Dich, Mama, wäre ein erfolgreicher Abschluss dieser Arbeit niemals möglich gewesen!