

# Minimalismus: Wie uns einfache Modellsysteme helfen, Funktionen des Darmmikrobioms zu verstehen

Simone Herp und Bärbel Stecher-Letsch

## Zusammenfassung

Der Magen-Darm-Trakt eines gesunden Menschen ist von einer komplexen Gemeinschaft von Bakterien, die Mikrobiota, besiedelt. Diese ist essenziell für die Entwicklung eines intakten Immunsystems, die Synthese von Vitaminen und anderer Metaboliten sowie für den Aufschluss unverdaulicher Nahrungsbestandteile. Zusätzlich schützt uns die Mikrobiota vor bakteriellen Infektionen z. B. durch Salmonellen, *Clostridium difficile* oder pathogenen *E. coli* (Kolonisierungsresistenz). Durch vergleichende Mikrobiomstudien von gesunden Individuen und solchen, die anfällig für Infektionen sind, können Bakterien identifiziert werden, die mit Protektion assoziiert sind. Um einen kausalen Zusammenhang zwischen diesen Bakterienspezies und dem Infektionsschutz zu erforschen, haben wir ein gnotobiotisches Mausmodell entwickelt (»gnotos«, griech. = bekannt) und keimfreie Mäuse mit einem Konsortium aus 12 Bakterien besiedelt, welche die Zusammensetzung der Mausmikrobiota repräsentieren. Die einzelnen Bakterien sind kultivierbar und können in *in-vitro*-Studien genau charakterisiert werden. Diese »Modell-Mikrobiota« ermöglicht es, den Einfluss einzelner Organismen auf die unterschiedlichsten Krankheitsmodelle zu testen und protektive Mechanismen abzuleiten. So bietet *E. coli* im Zusammenspiel mit diesem Konsortium einen Schutz gegen *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Bei Infektionen mit *Clostridium difficile* wirkt *Clostridium scindens* protektiv, ein Bakterium, das sekundäre Gallensäuren bilden kann.

## Summary

### Minimalism: how simple model systems help us to understand the functions of the gut microbiome

A complex community of bacteria, the microbiota, colonizes the intestine of healthy individuals. These bacteria are essential for a balanced maturation of the immune system, synthesis of vitamins and other metabolites and the digestion of food. Our microbiota also protects us from invading pathogens, such as *Salmonella enterica*, *Clostridium difficile* or pathogenic *E. coli*. Although there is substantial variation among unrelated healthy individuals in the composition of their microbiota, human microbiome-wide association studies (MWAS) have revealed that protection against infectious diseases can be associated with the enrichment of particular microbial taxa. For most microorganisms of a gastrointestinal ecosystem, however, a causal relationship between presence and protection against disease remains to be shown. To address causation in colonization resistance, we established a gnotobiotic mouse model with 12 bacterial species that represent a normal murine gut microbiota. Each bacterium species can be cultivated, and thorough characterization is thus possible. This model microbiota can be used for studying the influence of individual bacterial species on a multitude of disease models and helps us to identify protective bacteria and mechanisms in the gut. For example, in interaction with these 12 species, *E. coli* protects against *Salmonella enterica* ser. Typhimurium. Further, *Clostridium scindens*, a species that produces secondary bile acids, protects against *Clostridium difficile*.

✉ Prof. Dr. Bärbel Stecher-Letsch, Ludwig-Maximilians-Universität München, Max-von-Pettenkofer-Institut, Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Pettenkoferstraße 9a, 80336 München; Stecher@mvp.uni-muenchen.de

## Einführung

Komplexität ist ein wichtiges Merkmal mikrobieller Ökosysteme und ist insbesondere für die Funktionalität der Mikrobiota im Darm wichtig. Diese Komplexität erschwert es uns jedoch, zu verstehen, wie einzelne Bakterien in einem Ökosystem die gesamte Funktionalität beeinflussen und wie Netzwerke einzelner Bakterien bestimmte Funktionen in dieses Ökosystem einbringen. Minimalkonsortien, also reduktionistische Modellsysteme, können dazu genutzt werden, grundlegende Mechanismen der Funktionalität der menschlichen Darmmikrobiota zu verstehen: Wie interagieren Bakterien miteinander und wie können sie die Funktionalität eines großen, diversen Ökosystems beeinflussen?

## Bedeutung der Mikrobiota für den Menschen

Der Darm jedes Menschen beherbergt in etwa 250–500 verschiedene Bakterienarten, welche eine mutualistische Interaktion mit ihrem Wirt eingehen. Unsere Darmmikrobiota ist essenziell für verschiedenste Prozesse: für den Aufschluss von Nahrung (komplexe pflanzliche Polysaccharide, Cellulose, Proteine), für die Produktion kurzkettiger Fettsäuren und bestimmter Metaboliten (sekundäre Gallensäuren, Aminosäuren, Vitamine, Hormone), für die Entwicklung des Immunsystems (angeborene und adaptive Immunantworten) und – als zentrale Funktion – für den natürlichen Schutz vor Infektionen (»Kolonisierungsresistenz«). Veränderungen des Mikrobioms können unsere Gesundheit schädigen. Dies kann zu Mangelerscheinungen (Vitamine oder Nährstoffe), Stoffwechselerkrankungen wie Typ-2-Diabetes, Allergien, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, aber auch Infektionen führen (Panda et al. 2014a).

Gemäß der Infektionsstatistik des Robert-Koch-Instituts von 2016, in der die meldepflichtigen Erkrankungen gelistet sind, spielen Infektionen des Gastrointestinaltrakts eine wichtige Rolle. An erster Stelle stehen Infektionen mit Noroviren, gefolgt von *Campylobacter*, einem bakteriellen Erreger, welcher Durchfall verursacht (RKI 2017). Publikationen zeigen, dass die Mikrobiota protektiv gegen bakterielle Infektionen ist (Bohnhoff et al. 1954, Shedlofsky & Freter 1974,

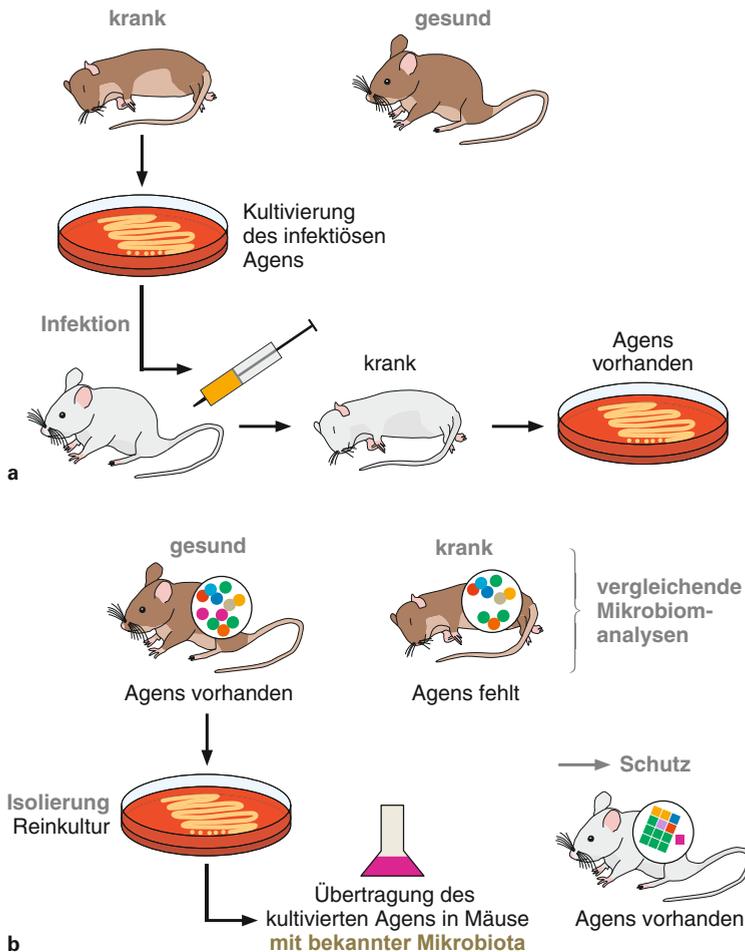
Bartlett et al. 1978, Bereswill et al. 2011, Fukuda et al. 2011).

Dieses Wissen ist schon relativ alt. Bereits Louis Pasteur (1822–1895) und Theodor Escherich (1857–1911) hatten erkannt, dass die Normalflora des Darms vor Besiedlung mit gesundheitsschädlichen Keimen schützt. Escherich forschte in München am von Hauner'schen Kinderspital an der Kolonisierung des Säuglingsdarms, d. h. an der Besiedlung frisch geborener Babys mit Bakterien (vgl. S. 11f., Beitrag Bauer [2019] in diesem Band). Er vermutete schon damals, dass es »gute« Keime im Darm gibt, die gegen »schlechte« Keime schützen können. Dieser Effekt der Mikrobiota wird auch als Kolonisierungsresistenz bezeichnet. Escherich zeigte zudem, dass Stillen das Wachstum »guter« Bakterien im Darm von Säuglingen fördern kann. Das große »E.« – *Escherichia* – im Namen des berühmtesten und mit Abstand am besten untersuchten Mikroorganismus *E. coli* erinnert an diesen Pionier der Kinderheilkunde und Bakteriologie.

Unser Darm beinhaltet sowohl nützliche wie schädliche Bakterien. Zu ersteren zählen z. B. *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp. und *E. coli*, zu letzteren *Helicobacter pylori* und Durchfallerreger wie *Clostridium difficile* und *Salmonella enterica*, von denen wir wissen, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen der Besiedlung durch diese Bakterien und einer bestimmten Erkrankung besteht. Im Fall der protektiven Bakterien ist jedoch kaum etwas über ihre Funktion für unsere Gesundheit bekannt.

## Die Koch-Postulate: Kausalität für infektiöse und protektive Bakterien

Um die nützliche Funktion eines Bakteriums zu beweisen, müssen letztendlich Experimente durchgeführt werden, wie sie Robert Koch (1834–1910), einer der Mitbegründer der modernen Infektionsbiologie, bereits postuliert hat. Koch hat als erster rigorose Kriterien gefordert, um einen kausalen Zusammenhang zwischen bestimmten Erregern und einer Erkrankung zu beweisen (Koch 1884). Sein erstes Postulat besagt, dass der Erreger in erkrankten Tieren nachweisbar sein muss, jedoch nicht in gesunden Tieren (Abb. 1a). Koch begann mit der Kultivierung der Erreger und konnte etliche in Reinkultur isolie-



**Abb. 1.** Schematische Darstellung der Koch-Postulate: **a**, für Infektionserreger; **b**, für protektive Bakterien; Erläuterungen siehe Text.

ren. Im nächsten Schritt wurden diese isolierten Erreger in ein Krankheitsmodell eingesetzt, d. h., gesunde Tiere wurden mit dem Erreger infiziert, woraufhin sie krank wurden. Damit war der kausale Zusammenhang bewiesen. Das letzte Postulat besagt, dass die Bakterien erneut aus den kranken Tieren isolierbar sein müssen.

Die Mikrobiota gesunder Menschen enthält bereits alle gesundheitsfördernden Bakterien. Es können also keine einfachen Experimente im Menschen durchgeführt werden, bei denen bestimmte Bakterien entfernt werden, um zu sehen, ob daraufhin eine Krankheit entsteht. Im Falle der Kolonisierungsresistenz ist bereits bekannt, dass eine normale, komplexe Mikrobiota sehr gut gegen Infektionen schützt. Menschen,

die jedoch mit Antibiotika therapiert wurden, sich sehr fettreich ernähren oder bestimmte Erkrankungen haben, zeigen eine Veränderung der Mikrobiota (Dysbiose) und gleichzeitig eine erhöhte Suszeptibilität für bestimmte Infektionen (Buffie et al. 2012, Turnbaugh et al. 2009, Muller et al. 2005). Unser Ziel ist es, zu zeigen, welche Bakterien in einem normalen, gesunden Darm essenziell sind, um uns vor Infektionen zu schützen. Weiterhin möchten wir dazu beitragen, dass diese Bakterien zu Therapie Zwecken oder als Probiotika eingesetzt werden können. Neben der Identifizierung der protektiven Bakterien möchten wir letzten Endes dabei auch die Kausalität ihrer schützenden Wirkung beweisen.

- Actinobacteria
  - *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* YL2
- Bacteroidetes
  - *Bacteroides caecimuris* I48
  - *Muribaculum intestinale* YL27
- Verrucomicrobia
  - *Akkermansia muciniphila* YL44
- Proteobacteria
  - *Turicimonas muris* YL45
- Firmicutes
  - *Lactobacillus reuteri* I49
  - *Enterococcus faecalis* KB1
  - *Blautia coccoides* YL58
  - *Clostridium innocuum* I46
  - *Flavonifractor plautii* YL31
  - *Clostridium clostridioforme* YL32
  - *Acutalibacter muris* KB18

**Abb. 2.** Übersicht über die 12 Bakterienspezies (nach Phyla geordnet), die in der Oligo-Mausmikrobiota enthalten sind (Oligo-MM<sup>12</sup>). – Nach Brugiroux et al. (2016).

Vergleichende Mikrobiomstudien im Zusammenhang mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wurden bereits erwähnt (vgl. Haller [2019] in diesem Band). Das Mikrobiom von Patienten mit Infektionskrankheiten oder nach einer Antibiotikatherapie unterscheidet sich sehr deutlich von dem Mikrobiom der gesunden Kontrollgruppe (Panda et al. 2014b, Raymond et al. 2016). Von diesen Daten kann man sogenannte Signaturen ableiten – d. h. entweder Unterschiede in bestimmten Bakterienpopulationen oder in funktionellen Stoffwechselwegen, die in diesen Mikrobiomen vorhanden oder abwesend sind, oder bestimmte Metaboliten –, welche entweder mit einer Empfänglichkeit oder mit einem Schutz gegen die Infektion korrelieren. Dadurch kann die Hypothese aufgestellt werden, dass ein bestimmtes Bakterium, das nur in gesunden Menschen vorkommt, nicht aber in kranken, einen protektiven Effekt besitzt.

Es stellt sich nun die Frage, wie man eine Kausalität zwischen dem Vorliegen bestimmter Signaturen und Funktionen beweisen kann. Es könnte sich auch nur um eine Korrelation handeln, wenn dieses Bakterium in einem gesunden Ökosystem besser wächst. Analog zu den Koch-Postulaten können folgende Forderungen gestellt werden (Abb. 1b): (1) Das Agens (Bakterium) muss in den gesunden Mäusen vorkommen, aber nicht in den kranken. Dies kann durch ver-

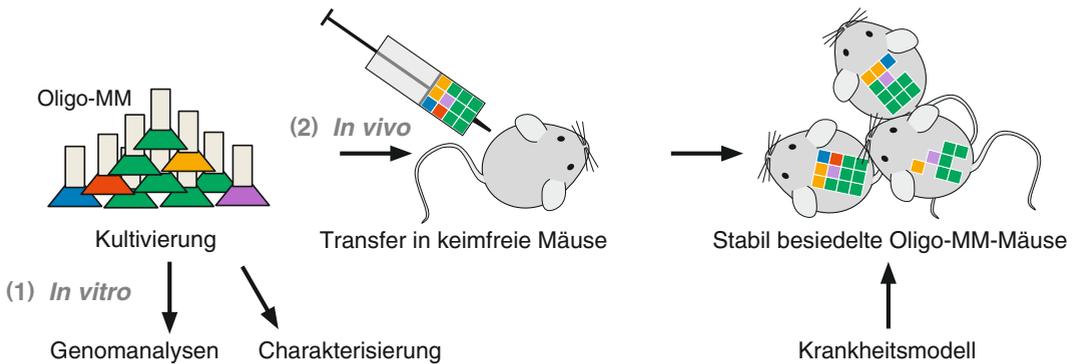
gleichende Mikrobiomstudien gezeigt werden. (2) Das Bakterium muss in Reinkultur isoliert werden, um es dann z. B. in eine Maus mit einer bekannten Mikrobiota, die das Bakterium noch nicht enthält, übertragen zu können. (3) Die notwendigen Experimente müssen durchgeführt werden, um zu zeigen, dass dieses Bakterium tatsächlich eine schützende Funktion ausübt. Derzeit werden dafür Tiermodelle verwendet, da es nur dort möglich ist, ein gnotobiotisches System zu etablieren, bei dem die genaue Zusammensetzung der Darmmikrobiota bekannt ist. Nur dadurch können wir die Funktionen einzelner Bakterien entschlüsseln.

### Eine Modelldarmflora: die Oligo-Mausmikrobiota

Keimfreie Mäuse zu erhalten ist ein aufwändiger Prozess. Reife Embryonen im Uterus sind steril und können über eine Hysterektomie, d. h. der Entnahme des Uterus mit den Embryonen kurz vor der Geburt, entnommen werden. Diese werden dann sterilisiert und unter keimfreien Bedingungen in einen Isolator transferiert. Dort werden sie einer keimfreien Mausamme untergeschoben, die sie dann wie ihre eigenen Jungen aufzieht.

In Isolatoren können keimfreie Mäuse weiter steril gezüchtet werden und in kleinen Mikroisolatoren erfolgen unterschiedliche Infektionen, wie dies in unserem Institut möglich ist. Unsere Arbeitsgruppe hat kürzlich eine Modellmikrobiota (Oligo-Mausmikrobiota) etabliert, welche aus zwölf Spezies besteht. Diese repräsentieren die fünf Hauptphyla (Actinobacteria, Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Proteobacteria und Firmicutes), die normalerweise im Darm von Labormäusen vertreten sind (Abb. 2; Li et al. 2015, Lagkouvardos et al. 2016, Brugiroux et al. 2016). Diese Bakterien sind abundant, d. h., sie kommen sehr häufig in gesunden Mäusen vor. Unsere Idee ist, dass wir mit ihnen eine Art Baukastenprinzip haben, bei dem wir einzelne Teile entfernen oder neue dazugeben können, um den Zusammenhang zwischen Anwesenheit und Abwesenheit eines bestimmten oder mehrerer Bakterien mit einer Erkrankung beweisen zu können.

Die Oligo-Mausmikrobiota bietet einige Vorteile, welche in Abbildung 3 schematisch dargestellt sind. Die Bakterien sind kultivierbar und



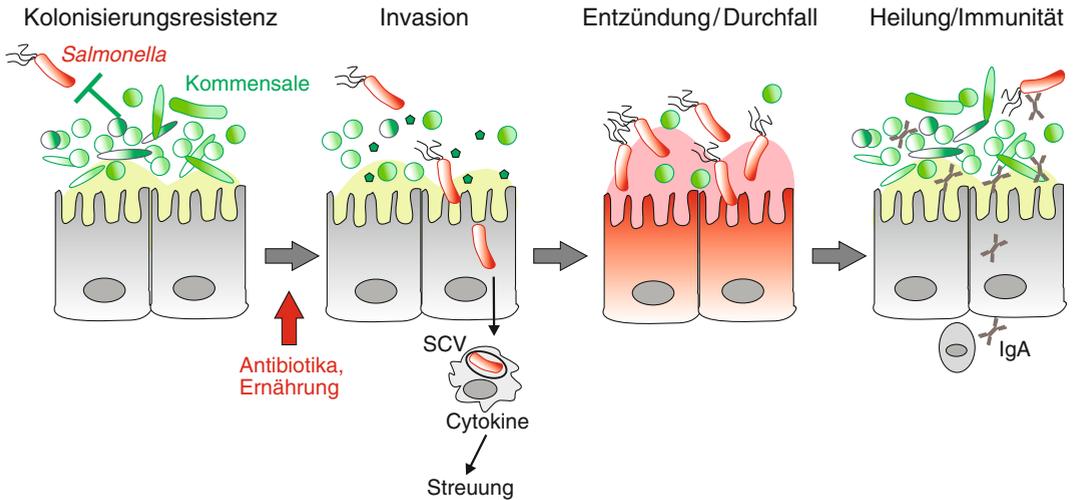
**Abb. 3.** Schematische Darstellung zur Anwendung der Oligo-Mausmikrobiota. Weitere Erläuterungen siehe Text.

ihre Genomsequenzen sind bekannt, wodurch es möglich ist, sie experimentell genau zu charakterisieren. Durch Wachstumsexperimente kann festgestellt werden, welcher Zucker von welchen Bakterien verstoffwechselt wird und welche Nährstoffpräferenzen es gibt. Weiterhin kann getestet werden, welches Resistenzprofil gegen bestimmte toxische Substanzen oder Antibiotika in den Bakterien vorhanden ist. Diese Informationen können dazu verwendet werden, um Phänotypen, die in klinischen Mausmodellen beobachtet wurden, besser zu verstehen. Die Bakterien können entweder als komplettes Konsortium oder in unterschiedlicher Zusammensetzung in keimfreie Mäuse transferiert werden. Dazu wurde eine eigene Technik etabliert. Die meisten Darmbakterien, sowohl im Mensch als auch in der Maus, sind obligat anaerob, was dazu führt, dass die Kultivierung der einzelnen Bakterien und die Zusammenstellung des Konsortiums unter anaeroben Bedingungen erfolgen muss. Die Besiedlung keimfreier Mäuse mit dem Konsortium muss schnell erfolgen, um zu verhindern, dass die Bakterien für eine längere Zeit Sauerstoff ausgesetzt sind. Dies funktioniert sehr zuverlässig und jedes individuelle Bakterium kann in den Mäusen wachsen und ist dort über Generationen hinweg nachweisbar. Die Mäuse mit der Oligo-Mausmikrobiota können nun genutzt werden, um die unterschiedlichsten Krankheitsmodelle zu untersuchen.

### Infektion mit *Salmonella* Typhimurium im Oligo-MM-Modell

Der Fokus unserer Arbeitsgruppe liegt darin, Bakterien zu identifizieren und zu charakterisieren, welche im Mausmodell protektiv sind gegenüber einer Infektion des humanpathogenen Durchfallerregers *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Gammaproteobacteria). *Salmonella* ist ein zoonotischer Erreger, d. h., Menschen infizieren sich über die Aufnahme kontaminierter Milchprodukte und tierischer Erzeugnisse von Schweinen oder Hühnern. Nach der Passage durch den Magen und den Dünndarm gelangen die Bakterien letztlich in das Kolon (Abb. 4). Der erste Schritt in der *Salmonella*-Pathogenese ist es, die Kolonisierungsresistenz zu überwinden. Durch epidemiologische Studien ist bekannt, dass die meisten Menschen, die Salmonellen mit der Nahrung aufnehmen, nicht effizient besiedelt werden und somit keine Krankheitssymptome entwickeln. Dieser Effekt ist unserer Mikrobiota zuzuschreiben. Vermutlich gibt es einzelne Bakterien, die toxische Substanzen produzieren oder die bestimmte Nährstoffe verbrauchen, welche die Salmonellen für ihr Wachstum benötigen. Zusätzlich können Bakterien das Immunsystem des Wirts stimulieren, sodass eine Infektion unterdrückt wird.

Wenn es die Salmonellen dennoch schaffen, zu höheren Titern anzuwachsen, können sie ins Darmepithel invadieren und in tiefere Gewebeschichten vordringen. Dieser Prozess wird vom angeborenen Immunsystem erkannt und es wird eine Entzündungsantwort hochgefahren, was sich durch Bauchschmerzen und Durchfall



**Abb. 4.** Schematische Darstellung einer Infektion mit *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. SCV: *Salmonella* containing vacuole.

bemerkbar macht. Nach einer Weile reagiert das adaptive Immunsystem gegen die Salmonellen und bildet spezifische Antikörper, wodurch sich die Entzündung zurückbildet. Zu diesem Prozess leistet die Mikrobiota ebenfalls einen sehr wichtigen Beitrag.

Wir haben uns vor allem mit der Kolonisierungsresistenz im Mausmodell beschäftigt, da diese für den weiteren Verlauf der Infektion entscheidend ist. Dafür wurden Mäuse oral mit *Salmonella* Typhimurium infiziert und zwei Tage später die Salmonellentiter im Darm bestimmt. Keimfreie Mäuse weisen sehr hohe Titer an Salmonellen auf ( $10^9$ – $10^{10}$  cfu/g Darminhalt); sie sterben nach etwa 24 Stunden an einer systemischen Infektion, die infolge der Darmbesiedlung stattfindet. In infizierten konventionellen Mäusen mit einer komplexen, natürlichen Darmmikrobiota von ca. 250 Spezies sind die Salmonellentiter sehr niedrig ( $10^3$ – $10^4$  cfu/g Darminhalt); die meisten von ihnen erkranken überhaupt nicht. Werden konventionelle Mäuse mit Antibiotika vorbehandelt, wachsen die Salmonellen ebenfalls zu sehr hohen Titern von  $10^8$ – $10^9$  cfu/g Darminhalt an – unabhängig davon welches Antibiotikum verwendet wird. Die ursprünglich keimfreien Mäuse, welche mit der Oligo-Mikrobiota aus 12 Spezies stabil besiedelt sind, weisen Titer im Bereich von  $10^7$ – $10^8$  cfu/g Darminhalt auf. Sie sind somit besser geschützt als keimfreie Mäuse,

jedoch nicht vergleichbar zu den konventionellen Mäusen mit einer normalen Darmflora.

Um eine Modellmikrobiota zu generieren, die eine ähnliche Kolonisierungsresistenz aufweist wie eine komplexe, normale Mikrobiota, wurden weitere Bakterien aus der konventionellen Mausmikrobiota identifiziert. Diese Bakterien können zu der Oligo-Mikrobiota hinzugefügt werden, um so den vollständigen Schutz herzustellen. Dazu mussten wir zuerst der Frage nachgehen, welche Bakterien möglicherweise protektiv sind und in der Oligo-Mausmikrobiota noch fehlen.

### Oligo-MM<sup>12</sup> als Plattform zur Identifizierung protektiver Bakterien

Vergleichende Metagenomanalysen zwischen den 12 Spezies der Oligo-Mausmikrobiota und aller Bakterienspezies aus konventionellen Mäusen führten dazu, dass mithilfe von Datenbankabgleichen die vorhandenen Gene, ihre Funktionen und die beteiligten Stoffwechselwege identifiziert werden konnten. Dadurch fiel auf, dass im Vergleich zur komplexen natürlichen Mikrobiota in der Oligo-Mausmikrobiota spezielle Gene fehlten. Diese Gene sind nur in den Genomen fakultativ anaerober Bakterien vorhanden, d. h. in Bakterien, die sowohl mit Sauerstoff als auch in Abwesenheit von Sauerstoff wachsen können. Zu dieser Gruppe gehört auch das bekannteste

Darmbakterium, *Escherichia coli* (Gammaproteobacteria).

Wurde zusätzlich zu der Oligo-Mausmikrobiota *E. coli* zugegeben, führte dieser *E. coli* im Zusammenspiel mit den anderen 12 Bakterien zu einem vollständigen Schutz vor einer Infektion mit Salmonellen, mit Titer im Bereich von  $10^4$  cfu/g Darminhalt (Brugiroux et al. 2016). *E. coli* allein oder in Verbindung mit einer anderen Mikrobiota bietet dagegen keinen Schutz in keimfreien Mäusen.

Obwohl das Oligo-Mausmikrobiota-Modell hoch artifiziert ist, kann auf diese Weise der Beitrag einzelner Bakterien zur Kolonisierungsresistenz gegen Darmpathogene untersucht werden. Neben der protektiven Wirkung von *E. coli* gegen *Salmonella* Typhimurium (Brugiroux et al. 2016) wurde ein weiteres Bakterium identifiziert, *Mucispirillum schaedleri* (Deferribacteres), welches nur in Mäusen vorkommt und ebenfalls vor *Salmonella*-Infektionen schützt (*Salmonella* Kolitis), allerdings mit einem anderen Mechanismus. Bei Infektionen mit *Clostridium difficile* wirkt *Clostridium scindens* (Firmicutes) protektiv, ein Bakterium, das sekundäre Gallensäuren bilden kann (Studer et al. 2016). Im Deutschen Zentrum für Infektionsforschung (DZIF) wird das Oligo-Mausmikrobiota-Modell derzeit verwendet, um Bakterien zu identifizieren, welche vor der Infektion mit enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) schützen.

Das Oligo-MM<sup>12</sup>-Mausmodell hat sich somit als nützlich erwiesen, Mechanismen der Protektion zu identifizieren und genauer zu untersuchen. Das Konsortium der 12 Bakterien ist veröffentlicht und damit frei verfügbar, d.h., jeder Wissenschaftler kann es in seiner keimfreien Tierhaltung verwenden. Mittlerweile gibt es weltweit elf keimfreie Maushaltungen, die dieses Bakterienkonsortium für funktionelle Mikrobiomforschung aller Art verwenden. Neben den Infektionen werden auch die Immunregulierung und andere erst sehr wenig verstandene Prozesse untersucht.

## Literatur

- Bartlett, J. G., T. E. Wen Chang, M. Gurwith, S. L. Gorbach & A. B. Onderdonk. 1978. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing Clostridia. – *The New England Journal of Medicine*, 298(10): 531–534.
- Bauer, J. 2019. Die unbekannt Welt der Mikrobiome. Einführung in das Rundgespräch. – In: Bayer. Akademie der Wissenschaften (Hrsg.): Die unbekannt Welt der Mikrobiome. Pfeil, München: 11–15.
- Bereswill, S., A. Fischer, R. Plickert, L.-M. Haag, B. Otto, A. A. Kühl, J. I. Dashti, A. E. Zautner, M. Muñoz, C. Loddenkemper, U. Groß, U. B. Göbel & M. M. Heimesaat. 2011. Novel murine infection models provide deep insights into the “ménage à trois” of *Campylobacter jejuni*, microbiota and host innate immunity. – *PLoS ONE*, 6(6): e20953, doi: 10.1371/journal.pone.0020953.
- Bohnhoff, M., B. L. Drake & C. P. Miller. 1954. Effect of streptomycin on susceptibility of intestinal tract to experimental *Salmonella* infection. – *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 86(1): 132–137.
- Brugiroux, S., M. Beutler, C. Pfann, D. Garzetti, H. J. Ruscheweyh, D. Ring, M. Diehl, S. Herp, Y. Lötscher, S. Hussain, B. Bunk, R. Pukall, D. H. Huson, P. C. Münch, A. C. McHardy, K. D. McCoy, A. J. Macpherson, A. Loy, T. Clavel, D. Berry & B. Stecher. 2016. Genome-guided design of a defined mouse microbiota that confers colonization resistance against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. – *Nature Microbiology*, 2: 16215, doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.215.
- Buffie, C. G., I. Jarchum, M. Equinda, L. Lipuma, A. Gbourne, A. Viale, C. Ubeda, J. Xavier & E. G. Pamer. 2012. Profound alterations of intestinal microbiota following a single dose of Clindamycin results in sustained susceptibility to *Clostridium difficile*-induced Colitis. – *Infection and Immunity*, 80(1): 62–73.
- Fukuda, S., H. Toh, K. Hase, K. Oshima, Y. Nakaniishi, K. Yoshimura, T. Tobe, J. M. Clarke, D. L. Topping, T. Suzuki, T. D. Taylor, K. Itoh, J. Kikuchi, H. Morita, M. Hattori & H. Ohno. 2011. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. – *Nature*, 469(7331): 543–547.
- Haller, D. 2019. Mikrobiom-Signaturen und ihre funktionale Bedeutung in der Medizin. – In: Bayer. Akademie der Wissenschaften (Hrsg.): Die unbekannt Welt der Mikrobiome. Pfeil, München: 101–108.
- Koch, R. 1884. Die Aetiologie der Tuberculose. – *Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte*, 2: 1–88.
- Lagkouvardos, I., R. Pukall, B. Abt, B. U. Foessel, J. P. Meier-Kolthoff, N. Kumar, A. Bresciani, I. Martínez, S. Just, C. Ziegler, S. Brugiroux, M. Wenning, T. P. N. Bui, J. Wang, F. Hugenholtz, C. M. Plugge, D. Peterson, M. W. Hornef, J. F. Baines, H. Smidt, J. Walter, K. Kristiansen, H. B. Nielsen, D. Haller, J. Overmann, B. Stecher & T. Clavel. 2016. The mouse intestinal Bacterial Collection (miBC) provides host-specific insight into cultured diversity and functional potential of the

- mouse gut microbiota. – *Nature Microbiology*, 1(10): 16131, doi 10.1038/nmicrobiol.2016.13.
- Li, H., J. P. Limenitakis, T. Fuhrer, M. B. Geuking, M. A. Lawson, M. Wyss, S. Brugiroux, I. Keller, J. A. Macpherson, S. Rupp, B. Stolp, J. V. Stein, B. Stecher, U. Sauer, K. D. McCoy & A. J. Macpherson. 2015. The outer mucus layer hosts a distinct intestinal microbial niche. – *Nature Communications*, 6: 8292, doi: 10.1038/ncomms9292.
- Muller, L. M., K. J. Gorter, E. Hak, W. L. Goudzwaard, F. G. Schellevis, A. I. Hoepelman & G. E. Rutten. 2005. Increased risk of common infections in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. – *Clinical Infectious Diseases*, 41(3): 281–288.
- Panda, S., F. Guarner & C. Manichanh. 2014a. Structure and functions of the gut microbiome. – *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders – Drug Targets*, 14(4): 290–299.
- Panda, S., I. El khader, F. Casellas, J. López Vivancos, M. García Cors, A. Santiago, S. Cuenca, F. Guarner & C. Manichanh. 2014b. Short-term effect of antibiotics on human gut microbiota. – *PLoS ONE*, 9(4): e95476, doi:10.1371/journal.pone.0095476.
- Raymond, F., A. A. Ouameur, M. Déraspe, N. Iqbal, H. Gingras, B. Dridi, P. Leprohon, P.-L. Plante, R. Giroux, E. Bérubé, J. Frenette, D. K. Boudreau, J.-L. Simard, I. Chabot, M.-C. Domingo, S. Trottier, M. Boissinot, A. Huletsky, P. H. Roy, M. Ouellette, M. G. Bergeron & J. Corbeil. 2016. The initial state of the human gut microbiome determines its reshaping by antibiotics. – *The ISME Journal*, 10(3): 707–720.
- RKI (Robert Koch-Institut). 2017. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2016. – Berlin, 241 S.
- Shedlofsky, S. & R. Freter. 1974. Synergism between ecologic and immunologic control mechanisms of intestinal flora. – *The Journal of Infectious Diseases*, 129(3): 296–303.
- Studer, N., L. Desharnais, M. Beutler, S. Brugiroux, M. A. Terrazos, L. Menin, C. M. Schürch, K. D. McCoy, S. A. Kuehne, N. P. Minton, B. Stecher, R. Bernier-Latmani & S. Hapfelmeier. 2016. Functional intestinal bile acid 7 $\alpha$ -dehydroxylation by *Clostridium scindens* associated with protection from *Clostridium difficile* infection in a gnotobiotic mouse model. – *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6: 191, doi: 10.3389/fcimb.2016.00191.
- Turnbaugh, P. J., M. Hamady, T. Yatsunencko, B. L. Cantarel, A. Duncan, R. E. Ley, M. L. Sogin, W. J. Jones, B. A. Roe, J. P. Affourtit, M. Egholm, B. Henrissat, A. C. Heath, R. Knight & J. I. Gordon. 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. – *Nature*, 457(7228): 480–484.

## Diskussion

**E. von Mutius:** Eigentlich müsste man doch davon absehen, diesen Bakterien Namen zu geben, sondern sie nur über ihre Funktion charakterisieren. Die Bakterien haben einen bestimmten Strauß an Funktionen und wenn das eine fehlt, deckt die Funktion ein anderes Bakterium ab.

**B. Stecher:** So einfach ist das denke ich nicht. Es könnte zum Beispiel durchaus sein, dass eine bestimmte Funktion eines Bakteriums nur im Kontext mit anderen Bakterien möglich ist. Aber es ist durchaus wertvoll, Bakterien nach ihrer Funktion in bestimmte Gruppen einzuteilen, zum einen, um auch durch einfache Analysen funktionelle Zusammenhänge aufzudröseln, und zum anderen, um z. B. zu zeigen, ob alle *E.-coli*-Typen protektiv sind. Wir haben schon mehrere Stämme auf ihre protektiven Eigenschaften hin analysiert und bereits Unterschiede festgestellt.

**J. Bauer:** Müssen die *E. coli* leben, um ihre Schutzwirkung zu entfalten? Haben Sie diese auch einmal abgetötet und dann die Wirkung getestet? Ich denke da an die Entwicklung oraler Impfstoffe. Und haben Sie die Fimbrien von *E. coli* charakterisiert?

**B. Stecher:** Nein, beides haben wir bisher noch nicht gemacht. Wir gehen aber auch davon aus, dass die Schutzwirkung nicht auf einer Immunreaktion des Körpers beruht, sondern der Schutz vor allem auf das Wachstum von *E. coli* im Gastrointestinaltrakt zurückzuführen ist.

**M. Wagner:** Das Modellsystem ist sehr praktisch, um herauszufinden, wer z. B. vor einer Kolonisierung schützen kann. Wie abhängig ist der Schutz aber von dem Modellsystem? Würde derselbe *E. coli* mit 12 anderen Bakterien im Modellsystem auch schützen? Die Genexpression von Stämmen ist ja auch sehr abhängig von den Stämmen, die mit ihnen leben.

**B. Stecher:** Wir haben das noch nicht in allzu vielen Modellsystemen getestet, weil es derzeit noch nicht so viele gibt. Wir haben aber in den nächsten Jahren eine Weiterentwicklung dieser

12 Spezies vor, um letzten Endes noch mehr Funktionalität abbilden zu können. Was wir jetzt schon wissen, ist, dass der *E. coli* nicht schützen kann, wenn wir ihn im Kontext mit der sog. »Altered Schaedler Flora«, einem etablierten Modellsystem, zugeben. *E. coli* braucht mindestens einen Partner aus unserem Konsortium, um den Schutz zu vermitteln. Das ist sehr interessant, weil es z. B. erklären könnte, warum manche Bakterien eine Krankheit nur im Kontext mit einem bestimmten Ökosystem induzieren können. Welche Mechanismen bei diesem grundlegenden Prinzip eine Rolle spielen, verstehen wir überhaupt noch nicht. Ob und, wenn ja, wie sich die Bakterien gegenseitig beeinflussen und miteinander interagieren, ist noch komplett unklar.

**B. Hoppe:** Sie haben eingangs die betrachteten Bakterien in »gute« und in »schädliche« eingeteilt. Das dürfte aber nicht absolut stimmen, auch nicht für die einzelnen von Ihnen aufgeführten Arten. Ich habe schon oft erlebt, dass *E. coli*, die Sie unter die sogenannten »guten« gezählt haben, auch sehr negativ wirken können. Es scheint auch auf die Quantität der jeweils vorhandenen Bakterien anzukommen. Oder wird ein Infekt durch verschiedenen Varietäten verursacht?

**B. Stecher:** Das ist eine sehr spannende Frage. Im Fall von *E. coli* wissen wir, dass ein *E. coli* nie einem anderen gleicht. Vertreter von *E. coli* haben ein sehr großes sogenanntes Pan-Genom, das heißt, sie haben sehr viele Gene, die sie nicht miteinander teilen, sondern die nur in bestimmten Pathotypen vorkommen. Es gibt *E. coli*, die Blaseninfektionen verursachen (UPEC), *E. coli*, die Durchfall erregen (EHEC, EPEC), und *E. coli*, die in der Pathogenese von Morbus Crohn wichtig sind (AIEC). Es deutet viel darauf hin, dass es bei *E. coli* durchaus auch »gute« Stämme gibt, die letztendlich schützen, aber auch »schädliche«, die krank machen können. Bei anderen Bakterien wissen wir das jedoch nicht. Es kann tatsächlich sein, dass ein Bakterium in einem mikrobiellen Kontext eine gesundheitsfördernde Rolle für uns spielt, aber in einem anderen Kontext eine krankmachende.

**K. Freier:** Sie hatten erwähnt, dass die Behandlungseffekte der Mäuse mit Antibiotika unabhängig von der Art des Antibiotikums waren. Waren das alles Breitbandantibiotika oder solche, die spezifische Bakteriengruppen ausschalten?

**B. Stecher:** Wir haben beispielsweise  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (Ampicillin, Cephalosporin), Ciprofloxacin und Metronidazol getestet, die alle dazu geführt haben, dass Salmonellen die Mäuse besiedeln können. Wahrscheinlich haben nicht

alle denselben starken Effekt und es ist auch unklar, welche Bakterien aus der Mikrobiota letztendlich wirklich ausgeschaltet werden müssen, um die Kolonisationsresistenz aufzuheben. Man geht davon aus, dass es wichtig ist, Clostridien (Firmicutes) auszuschalten, weil sie Buttersäure produzieren. Buttersäure beeinflusst den Metabolismus der Epithelzellen in einer Weise, dass weniger Sauerstoff für die Salmonellen zur Verfügung steht. Daher fördert eine reduzierte Bildung von Buttersäure die Infektion.