

Aus der Klinik für Innere Medizin III
mit den Schwerpunkten Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin
(Direktor: Prof. Dr. Norbert Frey)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Das intestinale bakterielle Mikrobiom
in der Herzinsuffizienz:
eine vergleichende Untersuchung mittels
Sequenzierung des 16S rRNA Gens**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Thorben Winkler

aus

Flensburg

Kiel 2018

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Mark Lüdde

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Gramatzki

Tag der mündlichen Prüfung: 18.03.2019

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 18.12.2018

gez. Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung.....	III
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Herzinsuffizienz – eine medizinische Herausforderung	1
1.2 Das humane intestinale Mikrobiom	2
1.3 Wechselwirkungen zwischen Herz und Darm	2
1.4 Analyse des bakteriellen Mikrobioms: die 16S rRNA Methode	3
1.5 Zielsetzungen dieser Arbeit	4
2 Material und Methoden	5
2.1 Material	5
2.1.1 Bezugsquellen.....	5
2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Kits	5
2.1.3 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien.....	6
2.1.4 IT-Programme und Datenbanken	6
2.1.5 Primer	7
2.1.6 Studienprobanden	8
2.1.6.1 Herzinsuffizienzpatienten.....	8
2.1.6.2 Kontrollprobanden.....	9
2.1.7 Probenmaterial.....	10
2.2 Methoden	11
2.2.1 Klinische Datenerhebung und Untersuchungen	11
2.2.1.1 Herzinsuffizienzpatienten.....	11
2.2.1.2 Kontrollprobanden.....	12
2.2.2 Sequenzierung der V1-V2 Region des bakteriellen 16S rRNA Gens	12
2.2.2.1 Extraktion und Aufreinigung von DNA aus Stuhlproben	12
2.2.2.2 Amplifikation der V1-V2 Region des bakteriellen 16S rRNA Gens	12
2.2.2.3 Aufreinigung und Normalisierung der DNA aus den PCR-Produkten	14
2.2.2.4 Sequenzierung	14
2.2.3 Analyse der 16S rRNA Gensequenzen.....	15
2.2.3.1 Sortierung und Qualitätskontrolle	15
2.2.3.2 Sequenzanalyse, phylogenetische Untersuchung und taxonomische Zuordnung	16
2.2.3.3 Statistische Berechnungen.....	16
2.2.3.3.1 Alpha-Diversität.....	17

2.2.3.3.2	Beta-Diversität	17
2.2.3.3.3	Abundanz einzelner Taxa	18
3	Ergebnisse	20
3.1	Unterschiede in der Alpha-Diversität zwischen Herzinsuffizienzpatienten und Kontrollprobanden	20
3.2	Unterschiede in der Beta-Diversität zwischen Herzinsuffizienzpatienten und Kontrollprobanden	21
3.3	Unterschiede in der Abundanz einzelner Bakterien zwischen Herzinsuffizienzpatienten und Kontrollprobanden	24
3.4	Varianzanalyse innerhalb der Gruppe der Herzinsuffizienzpatienten	27
4	Diskussion	28
4.1	Ergebnisse	28
4.2	Einfluss- und Störfaktoren	29
4.3	Vergleich mit den Ergebnissen anderer Studien	31
4.4	Limitationen dieser Studie	31
4.5	Schlussfolgerungen und Aussicht	32
5	Zusammenfassung	33
6	Literaturverzeichnis	35
7	Anhang	40
8	Danksagung	41

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Thorben Winkler, dass ich die Dissertation mit dem Titel

**„Das intestinale bakterielle Mikrobiom in der Herzinsuffizienz:
eine vergleichende Untersuchung mittels Sequenzierung des 16S rRNA Gens“**

selbständig verfasst habe.

Bei der Anfertigung der Arbeit wurden folgende Hilfen Dritter in Anspruch genommen:

- Die Bereitstellung der Daten der Kontrollprobanden erfolgte durch das Institut für Epidemiologie (Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Lieb), Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, aus dem Bestand der popgen-Biobank. Für seine Hilfe bei der Zusammenstellung der Daten danke ich Herrn Lukas Tittmann.
- Die Sequenzierung der vorbereiteten DNA Proben erfolgte durch das Team des Sequenzierungslabors des Instituts für Klinische Molekularbiologie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Für seine Hilfe bei der Auswertung und statistischen Analyse der 16S rRNA Gensequenzierungsdaten danke ich Herrn Malte Christoph Rühlemann, Institut für Klinische Molekularbiologie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Ich habe keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und/oder Beratungsdiensten bei der Erstellung dieser Arbeit in Anspruch genommen. Es hat von mir niemand unmittelbar oder mittelbar entgeltliche Leistungen für Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht zum Zwecke einer Promotion oder anderweitigen Prüfung eingereicht. Es wurde kein vorheriger Promotionsantrag an einer anderen Fakultät gestellt.

Ich versichere, dass ich die vorstehenden Angaben nach bestem Wissen und Gewissen vollständig und der Wahrheit entsprechend gemacht habe.

Kiel, im März 2018

Thorben Winkler

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der verwendeten Primer i5-27F und i7-338R	13
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Analyse der Sequenzierungsdaten.....	15
Abbildung 3: Unterschiede in der Alpha-Diversität zwischen Herzinsuffizienzpatienten (HI) und Kontrollprobanden (Cntrl). A: Anzahl der beobachteten bakteriellen Gattungen ($p_{nom.}=0,021$). B: Shannon Index auf Basis der OTUs ($p_{nom.}=0,012$). C: Chao1 Index auf Basis der bakteriellen Gattungen ($p_{nom.}=0,041$).....	20
Abbildung 4: MDS Grafik der Bray-Curtis Indizes auf Basis der OTUs (Cntrl=Kontrollprobanden, HI=Herzinsuffizienzpatienten)	22
Abbildung 5: MDS Grafik der Bray-Curtis Indizes auf Basis der bakteriellen Gattungen (Cntrl=Kontrollprobanden, HI=Herzinsuffizienzpatienten).....	22
Abbildung 6: MDS Grafik der gewichteten UniFrac Distanzen (Cntrl=Kontrollprobanden, HI=Herzinsuffizienzpatienten)	23
Abbildung 7: Zusammensetzung aller Proben auf bakterieller Familienebene (CMM).....	24
Abbildung 8: Zusammensetzung aller Proben auf bakterieller Gattungsebene (CMM).....	25
Abbildung 9: Bakterielle Familien und Gattungen mit unterschiedlicher Abundanz zwischen Herzinsuffizienzpatienten (HI) und Kontrollprobanden (Cntrl). Ns: nicht signifikant ($p>0,05$), *: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$. P-Werte vor/nach Korrektur für multiples Testen.....	26

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Kits mit Angabe des Herstellers und der Katalognummer	5
Tabelle 2-2: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte mit Angabe des Herstellers und ggf. der Katalognummer	6
Tabelle 2-3: Verwendete Programme und Datenbanken mit Angabe der Quelle	6
Tabelle 2-4: Verwendete PCR-Primer.....	7
Tabelle 2-5: Charakteristika von Herzinsuffizienzpatienten (HI) und Kontrollen.....	10
Tabelle 2-6: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes zur Amplifikation der V1-V2 Region des 16S rRNA Gens	13
Tabelle 2-7: Temperaturzyklus der PCR zur Amplifikation der V1-V2 Region des 16S rRNA Gens.	14
Tabelle 3-1: Unterschiede in der Alpha-Diversität zwischen Herzinsuffizienzpatienten und Kontrollprobanden. Nominell signifikante Ergebnisse ($p_{\text{nom.}} < 0,05$) mit * markiert. Ergebnisse nach Bonferroni für multiples Testen korrigiert ($p_{\text{kor.}}$).	21
Tabelle 3-2: Berücksichtigte Variablen in den Redundanzanalysen (bd-RDA).....	24
Tabelle 3-3: Unterschiede in der Abundanz einzelner Bakterien auf Familien-, Gattungs- und OTU-Ebene zwischen Herzinsuffizienzpatienten (HI-Patienten) und Kontrollprobanden. Signifikante Ergebnisse nach Korrektur für multiples Testen ($p_{\text{kor.}} < 0,05$) mit * markiert.	26

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	<i>analysis of variance</i> , Varianzanalyse
BMI	<i>body mass index</i> , Körpermasseindex [kg/m ²]
bp	<i>base pairs</i> , Basenpaare
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
Cntrl	Kontrollprobanden
CRP	C-reaktives Protein
db-RDA	<i>distance-based redundancy analysis</i> , distanzbasierte Redundanzanalyse
DCM	<i>dilatative cardiomyopathy</i> , dilatative Kardiomyopathie
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ESC	<i>European Society of Cardiology</i>
GIT	Gastrointestinaltrakt
HF	<i>heart failure</i> , Herzinsuffizienz
HFpEF	<i>heart failure with preserved ejection fraction</i> , Herzinsuffizienz ohne Einschränkung der linksventrikulären Auswurfraction
HFrEF	<i>heart failure with reduced ejection fraction</i> , Herzinsuffizienz mit Einschränkung der linksventrikulären Auswurfraction
HI	Herzinsuffizienz
ICMP	<i>ischemic cardiomyopathy</i> , ischämische Kardiomyopathie
LV	linksventrikulär
LVEF	<i>left ventricular ejection fraction</i> , linksventrikuläre Auswurfraction
MSA	<i>multiple sequence alignment</i> , multiple Sequenzalignierung
NT-proBNP	<i>N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide</i> , N-terminales Prohormon des natriuretischen Peptids Typ B
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
OTU(s)	<i>operational taxonomic unit(s)</i> , taxonomische Einheit(en)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PerMANOVA	<i>permutational multivariate analysis of variance</i> , permutationelle Varianzanalyse

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz – eine medizinische Herausforderung

Nach Definition der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) bezeichnet der Begriff Herzinsuffizienz ein klinisches Syndrom, welches von einer strukturellen und/oder funktionellen Störung des Herzens verursacht wird. Dieses geht mit einer reduzierten kardialen Auswurfleistung und/oder erhöhten intrakardialen Drücken einher (Ponikowski et al., 2016). Die Unfähigkeit des Herzens das physiologisch benötigte Herzzeitvolumen zu fördern, führt zu typischen Symptomen bei den Patienten, wie z.B. einer progredienten Dyspnoe, peripheren Ödemen oder Fatigue.

Die Einteilung der Herzinsuffizienz nach dem Schema der ESC erfolgt anhand der linksventrikulären Auswurfleistung (LVEF, %) des Herzens. Eine Herzinsuffizienz kann sowohl mit einer normalen LVEF (definiert als $\geq 50\%$, HFpEF=*heart failure with preserved ejection fraction*) als auch einer verminderten Auswurfleistung (HFrEF=*heart failure with reduced ejection fraction*) einhergehen (Ponikowski et al., 2016). Zudem kann eine Herzinsuffizienz klinisch anhand der Schwere der Dyspnoe klassifiziert werden. Hierfür wird die Einteilung nach der *New York Heart Association* (NYHA I bis IV) verwendet.

In den westlichen Industrieländern beträgt die geschätzte Prävalenz der Herzinsuffizienz 1-2% in der erwachsenen Bevölkerung (Go et al., 2014). Da die Inzidenz mit dem Lebensalter stark ansteigt, erreicht die Prävalenz in der Gruppe der über 80-Jährigen bereits $\geq 10\%$ (Ponikowski et al., 2016). Das Lebenszeitrisiko für Herzinsuffizienz beträgt im Alter von 55 Jahren ca. 28% für Frauen und ca. 33% für Männer (Bleumink et al., 2004). Nach wie vor ist die chronische Herzinsuffizienz mit einer hohen Mortalität verbunden, die sich in einem kumulativen 5-Jahres-Überleben von nur 35% bei optimaler medikamentöser Therapie ausdrückt (Bleumink et al., 2004). In Hinblick auf das Gesamtüberleben und die Zahl der verlorenen Lebensjahre wurde Herzinsuffizienz bereits plakativ als „*as 'malignant' as many common types of cancer*“ (Stewart et al., 2001) bezeichnet. Eine chronische Herzinsuffizienz geht zudem mit einem großen Verlust an subjektiver Lebensqualität der Patienten einher (Stewart et al., 1989). In Deutschland war im Jahr 2006 die Herzinsuffizienz der häufigste Grund für einen stationären Krankenhausaufenthalt (Neumann et al., 2009).

Trotz moderner pharmakologischer und interventioneller Therapien werden innovative Therapieansätze daher dringlich benötigt. Hierfür ist ein genaueres Verständnis der

Pathomechanismen erforderlich, die zur Entwicklung und Aggravation des Syndroms Herzinsuffizienz beitragen.

1.2 Das humane intestinale Mikrobiom

Der Mensch lebt in Symbiose mit einer Vielzahl von Mikroorganismen, die sowohl in seiner Umgebung, wie auch auf und in seinem Körper zu finden sind. Prokaryoten sind die mit Abstand häufigste Lebensform auf der Erde (Whitman et al., 1998). Ihre Rolle bei Gesundheit und Krankheit des Menschen wurde dennoch lange Zeit unterschätzt (Zhang et al., 2015).

Im Gastrointestinaltrakt, insbesondere dem Dickdarm, finden sich die meisten kommensalen Mikroorganismen des menschlichen Körpers. Die Zahl der dort befindlichen Bakterien übersteigt mit 10^{14} die Gesamtanzahl der menschlichen Körperzellen um den Faktor zehn, die Anzahl ihrer Gene die Summe der humanen Gene sogar um den Faktor 100 (Hooper et al., 2001). Nur ein kleiner Teil dieser Bakterien ist kultivierbar (ca. 10-30%), die Zahl der vorhandenen bakteriellen Spezies wird anhand von 16S rRNA Sequenzierungsdaten jedoch auf mindestens 800 bis 1.000 geschätzt (Eckburg et al., 2005). Bei gesunden Menschen gehören die meisten Bakterien des intestinalen Mikrobioms zu vier Stämmen (Human Microbiome Project, 2012): den *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* und *Actinobacteria*.

1.3 Wechselwirkungen zwischen Herz und Darm

Herzinsuffizienz darf nicht als rein kardiale Erkrankung betrachtet werden, sondern sollte vielmehr als systemisches Multi-Organversagen aufgefasst werden (Warriner et al., 2015). In diesem Zusammenhang rückte die Beziehung zwischen Herz und Darm in den Fokus der Forschung. Die Wechselwirkungen der bakteriellen Darmbesiedlung mit der Mukosa der Darmwand scheinen von größerer Bedeutung zu sein, als dies bisher angenommen wurde.

Bereits seit langem war bekannt, dass eine chronische Herzinsuffizienz mit einer systemischen Entzündungsreaktion assoziiert ist, die mit erhöhten Serumspiegeln von proinflammatorischen Zytokinen wie Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- α), C-reaktivem Protein (CRP) und Interleukin-6 (IL-6) einhergeht (Anker et al., 1997; Levine et al., 1990; Peschel et al., 2003; Sato et al., 1999). Es wurde vermutet, dass Funktionseinschränkungen der intestinalen Mukosa die Translokationen von Bakterien und/oder Endotoxinen in die systemische Blutbahn begünstigen und auf diese Weise eine inflammatorische Reaktion des Körpers modulieren könnten. Bei Herzinsuffizienzpatienten konnten bereits morphologische und funktionelle

Korrelate für Veränderungen des Gastrointestinaltraktes, vor allem die Wanddicke, Permeabilität und Perfusion der Mukosa betreffend, beobachtet werden (Sandek et al., 2007; Sandek et al., 2012; Sandek et al., 2014).

Bemerkenswerterweise scheinen auch verschiedene akute und chronische Erkrankungen, die als Risikofaktoren für Herzerkrankungen gelten, wie z.B. das metabolische Syndrom, mit Veränderungen des intestinalen Mikrobioms assoziiert zu sein (Thompson, 2012; Zhang et al., 2015).

1.4 Analyse des bakteriellen Mikrobioms: die 16S rRNA Methode

Um die Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms kulturunabhängig untersuchen zu können, wird häufig das bakterielle 16S rRNA Gen genutzt. Dieses kodiert für die 30S Untereinheit des prokaryotischen 70S Ribosoms und ist in den Erbinformationen aller Bakterien (und Archaeen) enthalten. Es unterscheidet sich zudem von seinem eukaryotischen Pendant, dem 18S rRNA Gen, sodass eine präzise Selektion bakterieller DNA möglich ist.

Das 16S rRNA Gen besitzt eine Gesamtlänge von 1.542 bp (E. coli Referenzgenom) und lässt sich in mehrere hochgradig konservierte sowie neun weniger konservierte Abschnitte (V1-V9) einteilen (Baker et al., 2003). Da die gering konservierten Abschnitte nur einen kleinen Effekt auf die Formation und Funktion der 30S Untereinheit haben, sind diese Bereiche sehr variabel und zugleich spezifisch für einzelne bakterielle Spezies (Smit et al., 2007; Stern et al., 1989). Die Bereiche V1-V9 können somit als taxonomische Marker genutzt werden (Chakravorty et al., 2007). Primer können in den konservierten Abschnitten des Gens bei einer PCR direkt binden und die zwischenliegenden variablen Regionen selektiv amplifizieren.

Die anschließende Sequenzierung dieser DNA Abschnitte erfolgt in der Regel nach dem Prinzip der Pyrosequenzierung. In dieser Arbeit wurde ein MiSeq Gerät der Firma Illumina hierfür verwendet. Mit einer Luciferasereaktion wird die Freisetzung von Pyrophosphaten während der DNA Synthese durch die DNA-Polymerase als Lichtsignal detektiert (*Sequencing by Synthesis* Prinzip). Die einzelnen Nukleotide werden in wiederkehrender Reihenfolge der Polymerase einzeln bereitgestellt, sodass sich aus dem zeitlichen und örtlichen Muster sowie der Qualität der registrierten Lichtsignale die Sequenz des DNA Strangs ermitteln lässt.

Zur Analyse der Sequenzdaten werden sog. OTUs (*operational taxonomic units*) verwendet, die die Sequenzen nach Ihrer Homologie gruppieren. OTUs werden als Äquivalente traditioneller taxonomischer Einheiten (nach Gattungen, Spezies, etc.) für die Untersuchungen

der Zusammensetzung und Diversität verwendet. Die taxonomische Zuordnung der OTUs erfolgt über den Abgleich mit Referenzsequenzen großer Datenbanken, wie z.B. dem *Ribosomal Database Project* (Cole et al., 2014).

1.5 Zielsetzungen dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte die Zusammensetzung des intestinalen bakteriellen Mikrobioms von Herzinsuffizienzpatienten (HFrEF) sowie von Probanden ohne Herzinsuffizienz untersucht und verglichen werden.

Dabei sollte die Hypothese, dass sich das intestinale Mikrobiom der Herzinsuffizienzpatienten von dem intestinalen Mikrobiom der Probanden ohne Herzinsuffizienz unterscheidet, überprüft werden.

Zudem sollten folgende weiterführende Fragen beantwortet werden:

- Gibt es Unterschiede in der intraindividuellen bakteriellen Alpha-Diversität zwischen Probanden mit und ohne Herzinsuffizienz?
- Zeigen sich Differenzen in der interindividuellen bakteriellen Beta-Diversität zwischen diesen beiden Gruppen?
- Lassen sich bestimmte einzelne bakterielle Taxa im intestinalen Mikrobiom von Patienten mit Herzinsuffizienz vermehrt oder vermindert beobachten?
- Zeigen sich Assoziationen zwischen der Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms und klinischen Parametern bzw. Variablen bei Herzinsuffizienzpatienten?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bezugsquellen

Alphabetische Auflistung der Bezugsquellen von Laborausrüstung und Verbrauchsmaterialien (Ort, Land):

Analytik Jena AG (Jena, Deutschland); Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, Kalifornien, USA); Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland); Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland); Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland); Kleinfeld Labortechnik GmbH (Gehrden, Deutschland); Metabion International AG (Planegg/Steinkirchen, Deutschland); Qiagen N.V. (Venlo, Niederlande); Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland); Thermo Fischer Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA).

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Kits

Tabelle 2-1: Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Kits mit Angabe des Herstellers und der Katalognummer

Chemikalie/Reagenz/Kit (Katalognr.)	Hersteller
5x Phusion HF Buffer (Nr. F518L)	Thermo Fischer Scientific
Biozym LE Agarose (Nr. 840004)	Biozym Scientific
dNTP Set, 100 mM Solutions (Nr. R0182)	Thermo Fischer Scientific
Phusion Hot Start II DNA Polymerase (Nr. F549L)	Thermo Fischer Scientific
PowerBead Tubes, Garnet 0,70 mm (Nr. 13123-50)	Quiagen
QIAamp DNA Stool Mini Kit (Nr. 51504)	Quiagen
Rotiphorese 10x TAE-Puffer (Nr. T845.2)	Carl Roth
RT-PCR Grade Water (Nr. AM9935)	Thermo Fischer Scientific
SequalPrep Normalization Plate Kit (Nr. A1051001)	Thermo Fischer Scientific
SYBR Safe DNA Gel Stain (Nr. S33102)	Thermo Fischer Scientific

2.1.3 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-2: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte mit Angabe des Herstellers und ggf. der Katalognummer

Verbrauchsmaterial/Laborgerät (Katalognr.)	Hersteller
96 PCR-plate (Nr. 72.1979.102)	Sarstedt
Biosphere Filter Tips (div. Größen)	Sarstedt
Blockthermostat BT 100	Kleinfeld Labortechnik
Centrifuge 5424 R	Eppendorf
GeneAmp PCR System 9700	Thermo Fischer Scientific
QIAcube	Quiagen
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf
Research plus Pipetten (div. Größen)	Eppendorf
SpeedMill Plus	Analytik Jena
Sub-Cell GT System (Nr. 170-4401)	Bio-Rad Laboratories
ThermoMixer C	Eppendorf

2.1.4 IT-Programme und Datenbanken

Tabelle 2-3: Verwendete Programme und Datenbanken mit Angabe der Quelle

Software/Datenbank	Internetseite/Quelle
FastTree	http://microbesonline.org/fasttree/
Flash v.1.2.11	http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/
Mothur v.1.36.0	http://www.mothur.org/
MS Office 2016	Microsoft (Redmond, USA)
Mvabund Package v.3.11.5 für R	https://cran.r-project.org/web/packages/mvabund/
R	http://www.r-project.org/
RDP Classifier	http://rdp.cme.msu.edu/
Ribosomal Database Project (RDP)	http://rdp.cme.msu.edu/
Uchime	http://drive5.com/uchime/
Usearch v.7	http://drive5.com/usearch/
Vegan Package v.2.3 für R	http://cran.r-project.org/web/packages/vegan/

Im laufenden Text sind die Namen verwendeter Computerprogramme in Großbuchstaben und Programmbefehle kursiv geschrieben.

2.1.5 Primer

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion International AG (Planegg/Steinkirchen, Deutschland) bezogen.

Tabelle 2-4: Verwendete PCR-Primer

Name	DNA-Sequenz (5'-3')			
i5-27F	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC (MID) TATGGTAATT GTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG			
i7-338R	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT (MID) AGTCAGTCAGCCTG CTGCCTCCCGTAGGAGT			
Barcodes	<u>Name</u>	<u>MID-Barcode</u>	<u>Name</u>	<u>MID-Barcode</u>
	27F-MID-1	AACCGCAT	338R-MID-A	AACCGGAA
	27F-MID-2	AAGGCCTT	338R-MID-B	AGAGTGAC
	27F-MID-3	AGAGTGTG	338R-MID-C	CAACTGGT
	27F-MID-4	CACAAGTC	338R-MID-D	CGTTCGTT
	27F-MID-5	CGTTCCTA	338R-MID-E	CTGTTCAC
	27F-MID-6	GCTTGGAT	338R-MID-F	GCTTGCAA
	27F-MID-7	GTCAACAC	338R-MID-G	GTCAACTG
	27F-MID-8	GTCACTGA	338R-MID-H	TCCTCATG
	27F-MID-9	TCTCGTCA	338R-MID-I	TCGACTAG
	27F-MID-10	TTGGTACG	338R-MID-J	TTGCAAGC
	27F-MID-11	CGTTGGAT	338R-MID-K	ACACCTCT
	27F-MID-12	CGTTAAGC	338R-MID-L	ATCGTAGC
	27F-MID-13	ACAGCTCA	338R-MID-M	CTCTTGAC
	27F-MID-14	GACAAGTG	338R-MID-N	CCTACCAT
	27F-MID-15	GCATTAGC	338R-MID-O	CTGAAGTC
	27F-MID-16	TGTGGACT	338R-MID-P	ACGATCGT
			338R-MID-Q	ATATGGCC
			338R-MID-R	TTCGATGG
			338R-MID-S	TACGTACG
			338R-MID-T	GATCACGT
			338R-MID-U	GTGACAGA
			338R-MID-V	TGAGTGTC
			338R-MID-W	GAGAAGAG
			338R-MID-X	TCTGGACA

2.1.6 Studienprobanden

2.1.6.1 Herzinsuffizienzpatienten

Es wurden 20 Patientinnen und Patienten mit klinisch symptomatischer linksführender systolischer Herzinsuffizienz und hochgradig eingeschränkter linksventrikulärer Ejektionsfraktion (HFrEF, LVEF $\leq 35\%$) untersucht.

Alle Patientinnen und Patienten befanden sich in Behandlung der Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel und haben nach ärztlicher Aufklärung freiwillig und schriftlich in die unentgeltliche Teilnahme zu Forschungszwecken eingewilligt. Eine Bewilligung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel lag vor (Aktenzeichen 179/09).

Für die Studienteilnehmer galten folgende Ein- und Ausschlusskriterien:

Einschlusskriterien:

- linksführende systolische Herzinsuffizienz (HFrEF) als Folge einer ischämischen oder dilatativen Kardiomyopathie, ärztliche Diagnose
- linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) $\leq 35\%$, echokardiografisch gemessen
- Dyspnoe, NYHA Klasse \geq II

Ausschlusskriterien:

- antibiotische oder probiotische Behandlung innerhalb der letzten drei Monate vor dem Studienzeitpunkt
- akute Infektionen (pulmonal, urogenital, gastrointestinal)
- gastrointestinale Erkrankungen/Voroperationen (außer Appendektomie)
- Malignome jeglicher Art und Form
- Malassimilationsstörungen des GIT
- Stuhlgang nach Bristol-Stuhlformen-Skala Typ 1/2 oder 4/5/6/7
- vegetarische oder vegane Diät
- stationäre Krankenhausaufenthaltsdauer >24 Stunden bis zur Entnahme der Stuhlprobe

Es wurden neun weibliche und elf männliche Probanden mit Herzinsuffizienz unter Berücksichtigung der oben genannten Kriterien in die Studie eingeschlossen. 14 Probanden (70%) befanden sich im Stadium einer akuten kardialen Dekompensation, sechs Probanden (30%) befanden sich in einem stabilen, kompensierten Zustand der Herzinsuffizienz. Bei elf Patientinnen und Patienten (55%) war eine ischämische Kardiomyopathie (ICMP) ursächlich für das Auftreten einer Herzinsuffizienz, bei neun Patientinnen und Patienten (45%) eine dilatative Kardiomyopathie (DCM).

Tabelle 2-5 zeigt eine Übersicht der Charakteristika der untersuchten Patienten.

Alle Probanden wurden zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses nach den gültigen Leitlinien der *European Society of Cardiology* (ESC) medikamentös behandelt (McMurray et al., 2012). Dabei wurden ACE-Hemmer, Beta-Blocker, Diuretika, Aldosteron-Antagonisten und antiarrhythmische Medikamente nach Empfehlung und Erfordernis verwendet. Drei Probanden erhielten keine medikamentöse Therapie zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses.

2.1.6.2 Kontrollprobanden

Es wurden 20 Probandinnen und Probanden aus dem Bestand der popgen-Biobank des Institutes für Epidemiologie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, als Vergleichsgruppe in diese Studie eingeschlossen (Krawczak et al., 2006; Nothlings und Krawczak, 2012). Eine Genehmigung des zuständigen Aufsichtsgremiums sowie der Ethikkommission lagen vor (popgen Projekt Nr. 2015-088).

Die Auswahl der Probanden erfolgte nach bestmöglicher Übereinstimmung mit den Herzinsuffizienzpatienten in Bezug auf das Alter, das Geschlecht, die Körpermassenzahl (BMI) und den Nikotinkonsum. Für die ausgewählten Probanden wurde eine Erkrankung des Herzens und des Gastrointestinaltraktes sowie das Vorliegen einer malignen Neoplasie auf Grundlage der dokumentierten ärztlichen Diagnosen ausgeschlossen. Das Vorliegen einer Herzinsuffizienz wurde anhand der im Blutserum gemessenen NT-proBNP Spiegel nach leitliniengerechten Referenzwerten ausgeschlossen (Ponikowski et al., 2016).

Tabelle 2-5 zeigt eine Übersicht der Charakteristika der Kontrollprobanden.

Tabelle 2-5: Charakteristika von Herzinsuffizienzpatienten (HI) und Kontrollen

Eigenschaft	HI-Patienten (n=20)	Kontrollen (n=20)	P-Wert
Alter, Jahre	65 ± 3,17	65 ± 3,07	0,941
Männer/Frauen, n	11/9	11/9	1,000
BMI, kg/m ²	29,7 ± 1,44	29,1 ± 1,33	0,768
<u>Nikotinkonsum</u>			
nie	11	11	1,000
in der Vergangenheit	7	7	
aktuell	2	2	
HI Ätiologie	ICMP 55% DCM 45%		
LVEF, %	22,3 ± 2,85		
CRP, mg/l	11,1 ± 2,06	4,22 ± 1,12 (n=15)	0,006
NT-proBNP, ng/l	6564,5 ± 1187,23	109,2 ± 45,91 (n=17)	<0,001
<u>NYHA Klasse</u>			
I	1		
II	4		
III	6		
IV	9		
<u>Medikation</u>			
Beta-Blocker	80%	15%	<0,001
Diuretika	70%	35%	0,027
ACE-Hem./ARB	70%	35%	0,027
Ald.-Antagonisten	40%	15%	0,081
<u>Ko-Morbiditäten</u>			
DM Typ II	35%	15%	0,152
art. HTN	70%	40%	0,059

BMI=Körpermassenzahl, HI=Herzinsuffizienz, ICMP=ischämische Kardiomyopathie, DCM=dilatative Kardiomyopathie, LVEF=linksventrikuläre Auswurfraction, CRP=C-reaktives Protein, NT-proBNP= N-terminales Prohormon des natriuretischen Peptids Typ B, NYHA=New York Heart Association, ACE-Hem.=ACE-Hemmer, ARB= Angiotensin-II-Rezeptor-Blocker, Ald.-Antagonisten=Aldosteron-Antagonisten, DM Typ II=Diabetes mellitus Typ II, art. HTN=arterielle Hypertonie. Werte absolut, % oder Mittel ± Standardfehler des arithmetischen Mittels.

2.1.7 Probenmaterial

Von allen Studienteilnehmern mit Herzinsuffizienz wurden Stuhlproben in nativen Stuhlprobenröhrchen innerhalb der ersten 24 Stunden nach Aufnahme in die Klinik gesammelt. Diese Proben wurden bei -80°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

Für die Probanden aus dem popgen-Kollektiv wurden die Sequenzierungsdaten des 16S rRNA Gens aus der popgen-Datenbank bereitgestellt. Im Zeitraum von 2010 bis 2015 wurden von diesen Probanden Stuhlproben in nativen Stuhlprobenröhrchen in häuslicher Umgebung

gesammelt und unverzüglich postalisch verschickt. Der Versand erfolgte innerhalb von 24 Stunden nach Entnahme bei Raumtemperatur, die anschließende Lagerung bei -80°C . Die Aufarbeitung und Sequenzierung der Proben erfolgte im Auftrag der popgen-Biobank durch das Institut für Klinische Molekularbiologie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, nach dem gleichen methodischen Vorgehen wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben.

2.2 Methoden

2.2.1 Klinische Datenerhebung und Untersuchungen

2.2.1.1 Herzinsuffizienzpatienten

Für alle Probanden mit Herzinsuffizienz wurden die Körpergröße, das Körpergewicht, die Körpertemperatur und der systolische/diastolische Blutdruck nach Riva-Rocci gemessen. Blutproben wurden aus einer Kubitalvene entnommen. Ärztliche Diagnosen und bekannte Vorerkrankungen wurden aus der medizinischen Dokumentation und der Krankenakte erfasst. Zudem fand eine standardisierte Befragung der Teilnehmer anhand des Anamnesebogens (siehe 7 Anhang A) statt.

Die zum Zeitpunkt der Stuhl- und Blutprobenentnahme verordnete Medikation wurde erfasst. Wirkstoffe, die zur leitliniengerechten Therapie der Herzinsuffizienz eingesetzt wurden, sind nach den oben genannten Wirkstoffgruppen sortiert worden (siehe 2.1.6.1 und Tabelle 3-2). Gegebenenfalls weitere verordnete Medikation wurde in Gruppen nach der jeweiligen Indikation erfasst (siehe Tabelle 3-2).

Alle Patienten wurden von einem erfahrenen Kardiologen, der nicht mit dem Studienprotokoll vertraut war, nach aktuellen Richtlinien mittels transthorakaler Echokardiographie untersucht. Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF, %) wurde biplan nach Simpson gemessen und alle Aufnahmen wurden digital archiviert.

Durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, wurden folgende Parameter aus dem Patientenblut im Rahmen der klinischen Routine gemessen: Serumkonzentration von C-reaktivem Protein (CRP, mg/l) und NT-proBNP (*N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide*, ng/l).

2.2.1.2 Kontrollprobanden

Alle Phänotyp-Daten der Kontrollprobanden wurden aus der popgen-Datenbank des Instituts für Epidemiologie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, bereitgestellt.

Die popgen-Probanden wurden nach standardisiertem Protokoll von ausgebildeten Studienassistentinnen und -assistenten befragt und untersucht. Die Körpergröße, das Körpergewicht, die Körpertemperatur und der systolische/diastolische Blutdruck nach Riva-Rocci wurden gemessen und Blutproben aus einer Kubitalvene entnommen.

Die aktuell verordnete Medikation der Probanden wurde erfasst und analog zu jener der Herzinsuffizienzpatienten gruppiert.

Die Messung der Blutserumkonzentrationen von CRP und NT-proBNP erfolgte ebenfalls durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, im Auftrag der popgen-Biobank.

2.2.2 **Sequenzierung der V1-V2 Region des bakteriellen 16S rRNA Gens**

2.2.2.1 Extraktion und Aufreinigung von DNA aus Stuhlproben

Zur Extraktion von DNA aus den Stuhlproben wurde das QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen) mit dem automatisierten Laborsystem QIAcube (Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Nach dem Auftauen der Proben wurde hierfür jeweils eine Spatelspitze Stuhl (ca. 180-220 mg) verwendet und in Bead-Beating-Röhrchen (PowerBead Tubes, Garnet, 0,7 mm) mit 1,1 ml ASL Puffer (aus: QIAamp DNA Stool Mini Kit, Quiagen) für 45 Sekunden bei 50 Hz homogenisiert (SpeedMill Plus, Analytik Jena).

Die gewonnene DNA Lösung wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.2.2 Amplifikation der V1-V2 Region des bakteriellen 16S rRNA Gens

Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde selektiv die V1-V2 Region des bakteriellen 16S rRNA Gens amplifiziert. Hierzu wurden die in Abschnitt 2.1.5 aufgeführten Primer genutzt. Um die PCR-Produkte später in einem gemeinsamen Ansatz sequenzieren zu können, wurde für jede Probe ein Primerpaar 27F/338R mit einer individuellen Kombination von zwei Barcodes aus jeweils acht Basen verwendet. Aus 16 unterschiedlichen *Forward*-Primern i5-27F (1 bis 16) und 24 unterschiedlichen *Reverse*-Primern i7-338R (A bis X) ergeben sich 384

mögliche Kombinationen. Jeder Primer enthielt neben seiner Barcode-Sequenz und dem genspezifischen Primersegment 27F bzw. 338R auch einen Startprimer für die Sequenzierung (Illumina Primer) sowie ein Primer Pad zur Prävention von intramolekularen Basenpaarungen (sog. *hairpin loops*) und ein Verbindungstück (*primer linker*). Der schematische Aufbau der verwendeten Primer ist in Abbildung 1 dargestellt (Barcodesequenz mit X markiert).

Illumina Primer	MID-Barcode	Primer Pad	Primer Linker	27F Primer
5'- AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC	XXXXXXXXXX	TATGGTAATT	GT	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'
Illumina Primer	MID-Barcode	Primer Pad	Primer Linker	338R Primer
5'- CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	XXXXXXXXXX	AGTCAGTCAG	CC	TGCTGCCTCCCGTAGGAGT -3'

Abbildung 1: Aufbau der verwendeten Primer i5-27F und i7-338R

Die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes ist in Tabelle 2-6 aufgeführt. Es wurde jeweils eine Negativ-Kontrolle durchgeführt.

Tabelle 2-6: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes zur Amplifikation der V1-V2 Region des 16S rRNA Gens

Komponente	Menge/Reaktion
H ₂ O	4,6 µl
5x Phusion HF Puffer	2,5 µl
dNTP Mix 10 mM (200 µM je dNTP)	0,25 µl
Phusion Hot Start II DNA Polymerase	0,15 µl
i5-27F Primer (2 µM)	2,0 µl
i7-338R Primer (2 µM)	2,0 µl
DNA Vorlage	1 µl
Σ	12,5 µl

Tabelle 2-7: Temperaturzyklus der PCR zur Amplifikation der V1-V2 Region des 16S rRNA

Gens		
Temperatur	Dauer	Wiederholungen
98°C	30 Sek.	30 Zyklen
98°C	9 Sek.	
50°C	60 Sek.	
72°C	90 Sek.	
72°C	10 Min.	
12°C	∞	

Die Kontrolle der PCR-Produkte erfolgte mittels Gelelektrophorese mit 2%-Agarosegel (4g Agarose, 200 ml TAE Puffer (1x) und 4 µl SYBR Safe (Thermo Fisher Scientific); 110V, 60 Minuten, Sub-Cell GT System). Die Zielgröße der PCR-Produkte betrug ca. 450 bp.

2.2.2.3 Aufreinigung und Normalisierung der DNA aus den PCR-Produkten

Zur Aufreinigung und Normalisierung der Konzentration der DNA aus den PCR-Produkten wurde das SequalPrep Normalization Plate Kit (Thermo Fischer Scientific) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.2.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung der vorbereiteten DNA-Lösung erfolgte durch das Institut für Klinische Molekularbiologie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, mit einem MiSeq Gerät der Firma Illumina und dem entsprechenden MiSeq Reagent Kit v3 (2x300bp, Illumina) nach Herstellervorgaben.

Zur effizienten Auslastung des Gerätes wurden dabei verschiedene Proben, auch Dritter, in einem gemeinsamen Ansatz sequenziert. Die einzelnen Proben wurden dazu äquimolar gemischt („gepoolt“). Die Konzentrationsmessung erfolgte mit einem Qubit Fluorometer (Thermo Fischer Scientific) und dem Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fischer Scientific) nach Herstellervorgaben.

2.2.3 Analyse der 16S rRNA Gensequenzen

Die Analyse der Sequenzierungsdaten erfolgte nach dem in Abbildung 2 dargestellten Schema.

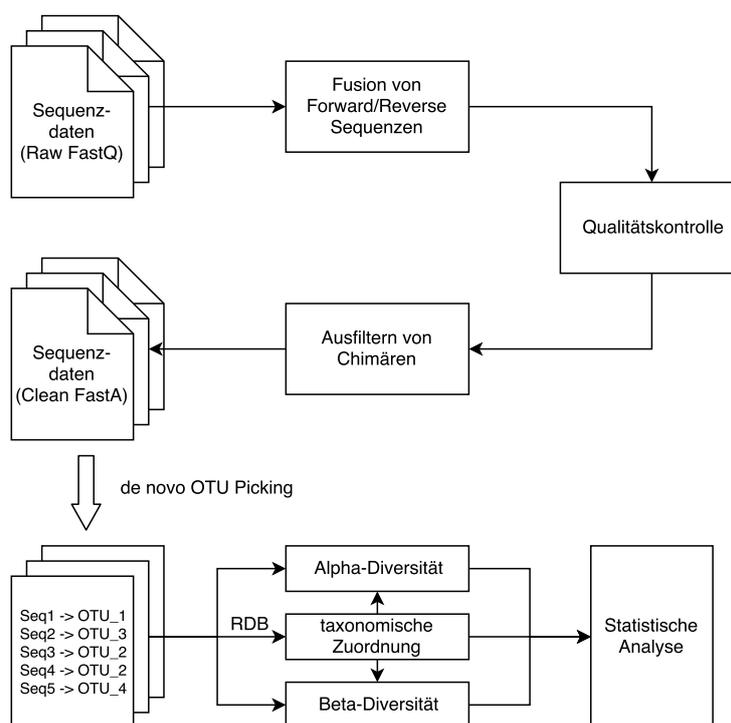


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Analyse der Sequenzierungsdaten

2.2.3.1 Sortierung und Qualitätskontrolle

Die generierten Sequenzen wurden bei fehlerfreier Übereinstimmung der Barcode-Sequenzen den entsprechenden Proben zugeordnet. Jeweils komplementäre Sequenzfragmente in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung mit einer Überschneidung von 250 bis 300 bp wurden mit dem Programm FLASH fusioniert (Magoc und Salzberg, 2011).

Die Qualitätskontrolle der Sequenzfragmente erfolgte auf Basis der mit den Sequenzdaten bereitgestellten Q Scores des MiSeq Gerätes (FastQ Format, Illumina). Dieser Qualitätsindex, angelehnt an den Phred Quality Score für Sanger-Sequenzierungen, bemisst die Wahrscheinlichkeit eines fehlerhaften Basenaufrufes während der Sequenzierung (Ewing et al., 1998). Bei einem Q Score unter 30 in mehr als 5% der Nukleotide wurden die entsprechenden Sequenzen aussortiert. Dies entspricht der Wahrscheinlichkeit eines fälschlichen Basenaufrufes in einem von 1.000 Fällen. Hierfür wurde die Software UCHIME verwendet (Edgar et al., 2011). Anschließend wurden chimäre Sequenzen, die durch Fusion von zwei oder mehr Genfragmenten unterschiedlicher Herkunft entstehen können, ebenfalls mit UCHIME entfernt.

2.2.3.2 Sequenzanalyse, phylogenetische Untersuchung und taxonomische Zuordnung

Nach der Qualitätskontrolle wurden aus den Sequenzdaten aller Proben OTUs (*operational taxonomic units*) mit USEARCH (Edgar, 2010) gebildet. Sequenzen mit einer Ähnlichkeit von mindestens 97% wurden zu einer OTU zusammengefasst. Für jede untersuchte Probe wurden 10.000 zufällige Sequenzen ausgewählt, um die Abundanz der jeweiligen OTUs zu bestimmen (*OTU abundance table*).

Um die Homologie der einzelnen Nukleotidsequenzen zu untersuchen, erfolgte eine multiple Alignierung der OTU-Sequenzen (MSA, *multiple sequence alignment*) mit MUSCLE (Edgar, 2004a, b). Auf Basis dieser Alignierung wurde ein phylogenetischer Baum mit FASTTREE (Price et al., 2009, 2010) nach Maximum-Likelihood-Methode erstellt.

Aus den Verzweigungen dieses phylogenetischen Baumes und der Abundanz der OTUs (*OTU abundance table*) wurden sowohl die UniFrac Distanzen (Lozupone und Knight, 2005) als auch die phylogenetische Diversität (Faith, 1992) berechnet (siehe 2.2.3.3.1). Die jeweiligen Berechnungen erfolgten mit Befehlen *unifrac.weighted*, *unifrac.unweighted* und *phylo.diversity* in MOTHRUR (Schloss et al., 2009).

Die taxonomische Zuordnung der einzelnen OTUs erfolgte mittels der Datenbank des Ribosomale Database Projekt (RDP) (Cole et al., 2014) mit dem RDP CLASSIFIER (Wang et al., 2007) unter Verwendung des aktuellsten 16S rRNA Training Sets (v.14, <https://rdp.cme.msu.edu/>).

Aus den taxonomischen Informationen wurden die Abundanzen der jeweiligen Bakterien auf drei verschiedenen taxonomischen Rangstufen ermittelt: Stamm (eng. *phylum*), Familie (eng. *family*) und Gattung (eng. *genus*). Bei einem Klassifikationsscore <0,8 auf Gattungsebene wurde die Bezeichnung ‘unkl._[Familie]’ für das entsprechende Bakterium verwendet.

2.2.3.3 Statistische Berechnungen

Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm R (Team, 2008) sowie den Erweiterungspaketen VEGAN PACKAGE (Oksanen et al., 2015) und MVABUND PACKAGE (Wang et al., 2012) für R durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde als $\alpha=0,05$ festgesetzt.

2.2.3.3.1 Alpha-Diversität

Als Maß der intraindividuellen Alpha-Diversität wurde die Anzahl der beobachteten Gattungen und OTUs benutzt, sowie die Indizes Chao1, Simpson und Shannon H' (jeweils mit den entsprechenden Befehlen des VEGAN PACKAGE berechnet).

Der Chao1 Index (Chao, 1984) schätzt die Anzahl der unterschiedlichen Taxa, die in einer Gemeinschaft enthalten sind, unter der Annahme, dass bei der Untersuchung von weiteren Stichproben desselben Individuums keine zusätzlichen neuen Taxa entdeckt werden würden. Dabei berücksichtigt der Schätzer sowohl die Gesamtanzahl der verschiedenen Taxa, als auch die Anzahl jener Taxa, die nur ein- oder zweimal in der Stichprobe auftauchen. Der Simpson Index (Simpson, 1949) basiert auf den summierten Wahrscheinlichkeiten, dass zwei jeweils zufällig ausgewählte Taxa nicht der gleichen Art angehören. Der Shannon Index H' (Shannon, 1948) bezieht bei seiner Berechnung die Anzahl der verschiedenen Taxa in einer Gemeinschaft und deren jeweilige Abundanz ein. Er kann somit als Maß der Gleichheit (eng. *evenness*) bzw. Ungleichheit in der Gemeinschaft genutzt werden.

Die untersuchten Alphadiversitätsmaße wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft und ggf. mit einem zweiseitigen T-Test (normalverteilt) bzw. einem Wilcoxon-Rangsummentest (nicht normalverteilt) auf signifikante Unterschiede gegeneinander getestet.

2.2.3.3.2 Beta-Diversität

Als Maße der interindividuellen Beta-Diversität wurden die Bray-Curtis Indizes mit dem VEGAN PACKAGE in R und die UniFrac Distanzen mit MOTHUR berechnet.

Der Bray-Curtis Index, auch *Bray-Curtis dissimilarity*, (Bray und Curtis, 1957) beschreibt die Ähnlichkeit zweier Gemeinschaften, indem er das Vorkommen der unterschiedlichen Taxa und deren jeweilige Abundanz vergleicht. Ein Betrag zwischen 0 und 1 spiegelt dabei entweder eine absolut identische (=0) oder eine vollkommen unterschiedliche Zusammensetzung (=1) wieder.

Die *unique fraction* Distanz, kurz UniFrac, ergänzt diese Angabe um phylogenetische Informationen, indem sie die entwicklungsgeschichtliche Nähe der jeweils betrachteten Taxa einbezieht. Auf Grundlage eines phylogenetischen Baumes, der alle Taxa beider Gemeinschaften enthält, werden die jeweils geteilten (*shared*) und nicht geteilten (*unshared*) Astlängen ermittelt. Der Quotient aus der Summe der nicht geteilten Astlängen und der Gesamtsumme aller Astlängen ergibt die ungewichtete (*unweighted*) UniFrac Distanz zwischen

zwei Taxa. Auf diese Weise werden Unterschiede, die durch näher verwandte Taxa entstehen, weniger stark gewichtet als solche, die durch entfernter verwandte Taxa bedingt sind. Wird zusätzlich die Abundanz der jeweiligen Gattungen in die Wichtung mit einbezogen, so spricht man von der gewichteten (*weighted*) UniFrac Distanz. Analog zum Bray-Curtis Index hat auch die UniFrac Distanz jeweils einen Betrag zwischen 0 und 1 (Stallmach et al., 2016).

Zur Darstellung der Bray-Curtis Indices und UniFrac Distanzen wurden MDS Grafiken (*multidimensional scaling*, multidimensionale Skalierung) mit zwei Achsen verwendet (*cmdscale* Funktion, R).

Um auf Unterschiede in der Beta-Diversität zu testen, wurden permutationale Varianzanalysen (*permutational multivariate analysis of variance*, PerMANOVA) mit jeweils 10.000 Permutationen durchgeführt (*adonis* Funktion, VEGAN PACKAGE).

Das jeweils beste Modell für das verwendete Distanzmaß wurde mittels distanzbasierter Redundanzanalyse (*distance-based redundancy analysis*, db-RDA; *capscale* Funktion, VEGAN PACKAGE) bestimmt. Alle getesteten Modelle wurden für das Alter, das Geschlecht, die Körpermassenzahl (BMI) und den Nikotinkonsum (unterschieden in Nichtraucher, ehemalige Raucher (>6 Monate Nikotinabstinenz) und aktuelle Raucher) der Probanden korrigiert. Anschließend wurden Schritt für Schritt weitere Variablen zu den Modellen ergänzt (siehe Tabelle 3-2, Auflistung der Variablen). Mit der Funktion *anova.cca* in R wurden F-Statistiken und P-Werte jeweils vor und nach dem Hinzufügen einer weiteren Variable berechnet. Das jeweils bestmögliche Modell wurde anhand des AIC Schätzers (*akaike information criterion*) gewählt, der die Qualität zweier Modelle unter Berücksichtigung der Zahl der verwendeten Variablen verglich.

2.2.3.3.3 Abundanz einzelner Taxa

Alle Bakterien, die eine durchschnittlichen Abundanz von mindestens 1% in der Gruppe der Herzinsuffizienzpatienten und/oder Kontrollprobanden aufwiesen, wurden bei der Analyse der Zusammensetzung des bakteriellen Mikrobioms berücksichtigt (*core-measurable microbiota*, CMM). OTUs wurden bei einer durchschnittlichen Abundanz von mindestens 0,5% in einer der beiden Gruppen sowie dem Vorkommen in mindestens 40% der untersuchten Proben als CMM berücksichtigt.

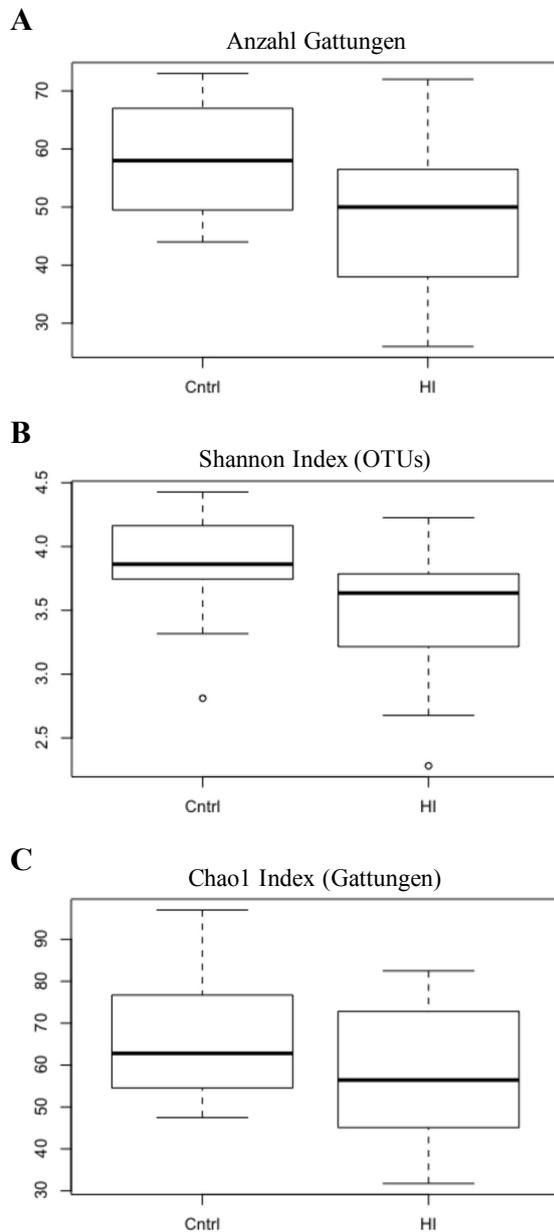
Für diese bakteriellen Taxa/OTUs wurde geprüft, ob sie in einer der beiden Gruppen signifikant gehäuft oder vermindert vorkamen. Hierfür wurde eine lineare Regressionsanalyse (*generalized linear model*, GLM) verwendet.

Eine Varianzanalyse (PerMANOVA) mit 10.000 Permutationen wurde für Analysen innerhalb der Gruppe der Herzinsuffizienzpatienten verwendet. Als Ko-Variablen wurden das Alter, das Geschlecht, die Körpermassenzahl (BMI) und der Nikotinkonsum der Probanden berücksichtigt.

Für die Berechnung wurden die Funktionen *manyglm* und *anova.manyglm* des MVABUND PACKAGE für R verwendet. Eine Korrektur für multiples Testen erfolgte nach Benjamini-Hochberg (Benjamini und Hochberg, 1995).

3 Ergebnisse

3.1 Unterschiede in der Alpha-Diversität zwischen Herzinsuffizienzpatienten und Kontrollprobanden



Für alle untersuchten Proben wurden verschiedene Alpha-Diversitätsmaße auf Grundlage der vorkommenden bakteriellen Gattungen oder OTUs berechnet und die jeweiligen Ergebnisse von Herzinsuffizienzpatienten und Kontrollprobanden verglichen. Tabelle 3-1 fasst die Ergebnisse zusammen.

In der Gruppe der Herzinsuffizienzpatienten waren nominell signifikant weniger unterschiedliche bakterielle Gattungen vorhanden (Abbildung 3A, $p_{\text{nom.}}=0,021$).

Bei der Betrachtung der errechneten Diversitätsindizes zeigte sich für die Gruppe der Herzinsuffizienzpatienten ein nominell signifikant geringerer Shannon Index auf Basis der OTUs (Abbildung 3B, $p_{\text{nom.}}=0,012$) sowie ein geringerer Chao1 Index auf Basis der vorhandenen Gattungen (Abbildung 3C, $p_{\text{nom.}}=0,041$).

Abbildung 3: Unterschiede in der Alpha-Diversität zwischen Herzinsuffizienzpatienten (HI) und Kontrollprobanden (Cntrl). A: Anzahl der beobachteten bakteriellen Gattungen ($p_{\text{nom.}}=0,021$). B: Shannon Index auf Basis der OTUs ($p_{\text{nom.}}=0,012$). C: Chao1 Index auf Basis der bakteriellen Gattungen ($p_{\text{nom.}}=0,041$).

Tabelle 3-1: Unterschiede in der Alpha-Diversität zwischen Herzinsuffizienzpatienten und Kontrollprobanden. Nominell signifikante Ergebnisse ($p_{\text{nom.}} < 0,05$) mit * markiert. Ergebnisse nach Bonferroni für multiples Testen korrigiert ($p_{\text{kor.}}$).

Grundlage	Maß der Alpha-Diversität	Signifikanztest	$p_{\text{nom.}}$	$p_{\text{kor.}}$
Gattungen	Anzahl der Gattungen	T-Test, zweiseitig	0,021*	0,168
	Chao1 Index	T-Test, zweiseitig	0,041*	0,328
	Simpson Index	Wilcoxon-Rangsummentest	0,165	>1
	Shannon Index	Wilcoxon-Rangsummentest	0,153	>1
	Phylogenetische Distanz	T-Test, zweiseitig	0,072	0,576
OTUs	Anzahl der OTUs	T-Test, zweiseitig	0,070	0,560
	Chao1 Index	T-Test, zweiseitig	0,170	0,560
	Shannon Index	T-Test, zweiseitig	0,012*	0,096

Nach Korrektur für multiples Testen nach Bonferroni lagen alle Ergebnisse über dem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$.

3.2 Unterschiede in der Beta-Diversität zwischen Herzinsuffizienzpatienten und Kontrollprobanden

Auf Grundlage der Abundanz der unterschiedlichen OTUs und Gattungen sowie des phylogenetischen Baums wurden die Bray-Curtis Indizes auf OTU- und Gattungsebene, sowie die ungewichteten und gewichteten UniFrac Distanzen berechnet, um die interindividuelle Diversität der Proben zu untersuchen. Hierfür wurde eine permutationale Varianzanalyse (PerMANOVA) verwendet, die jeweils als Nullmodell für das Alter, das Geschlecht, die Körpermassenzahl (BMI) und den Nikotinkonsum der Probanden korrigiert wurde (siehe Abschnitt 2.2.3.3.2).

Die Bray-Curtis Indizes zeigten eine signifikante Separation von Herzinsuffizienzpatienten und Kontrollprobanden, sowohl auf Basis der OTUs ($p=0,0099$, Bestimmtheitsmaß $R^2=3,9\%$; Abbildung 4) als auch auf Gattungsebene ($p=0,0124$, $R^2=5,5\%$; Abbildung 5).

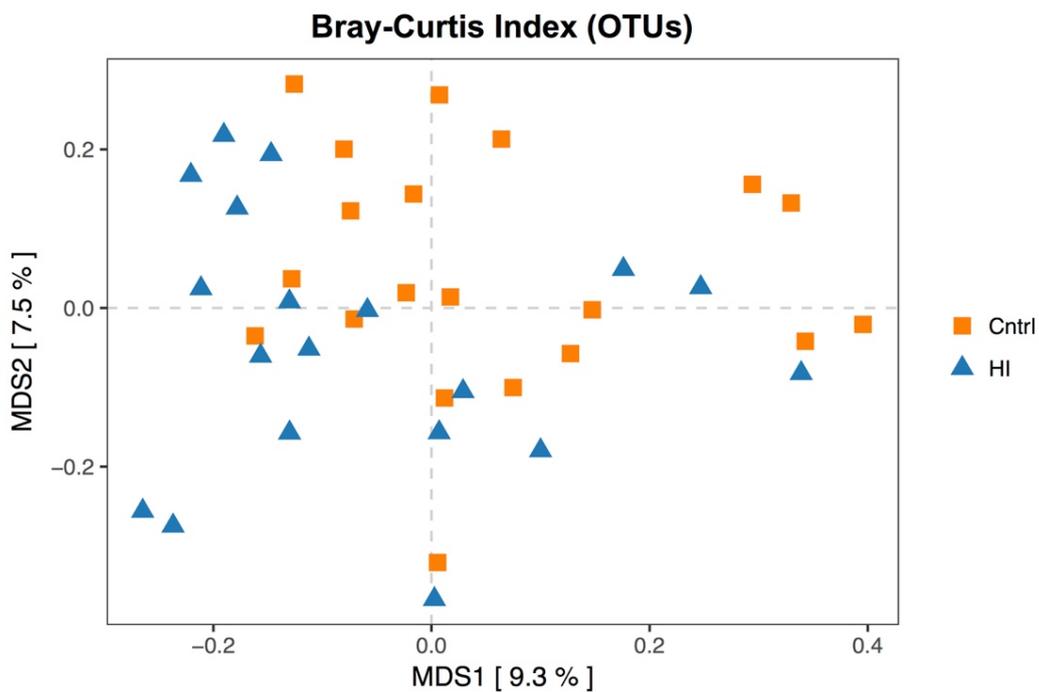


Abbildung 4: MDS Grafik der Bray-Curtis Indizes auf Basis der OTUs
(Cntrl=Kontrollprobanden, HI=Herzinsuffizienzpatienten)

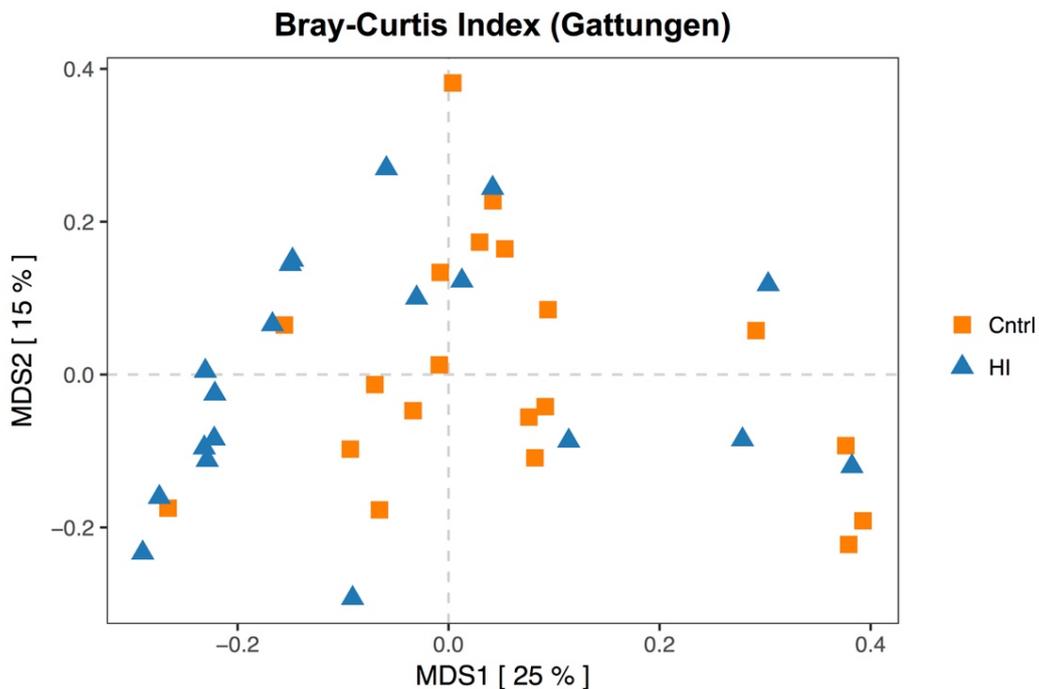


Abbildung 5: MDS Grafik der Bray-Curtis Indizes auf Basis der bakteriellen Gattungen
(Cntrl=Kontrollprobanden, HI=Herzinsuffizienzpatienten)

Die Analyse der gewichteten UniFrac Distanzen (*weighted* UniFrac) zeigte ebenfalls eine signifikante Separation dieser beiden Gruppen ($p=0,0043$, $R^2=8,3\%$; Abbildung 6). Für die ungewichteten UniFrac Distanzen (*unweighted* UniFrac) zeigte sich hingegen kein signifikantes Ergebnis in dieser Analyse.

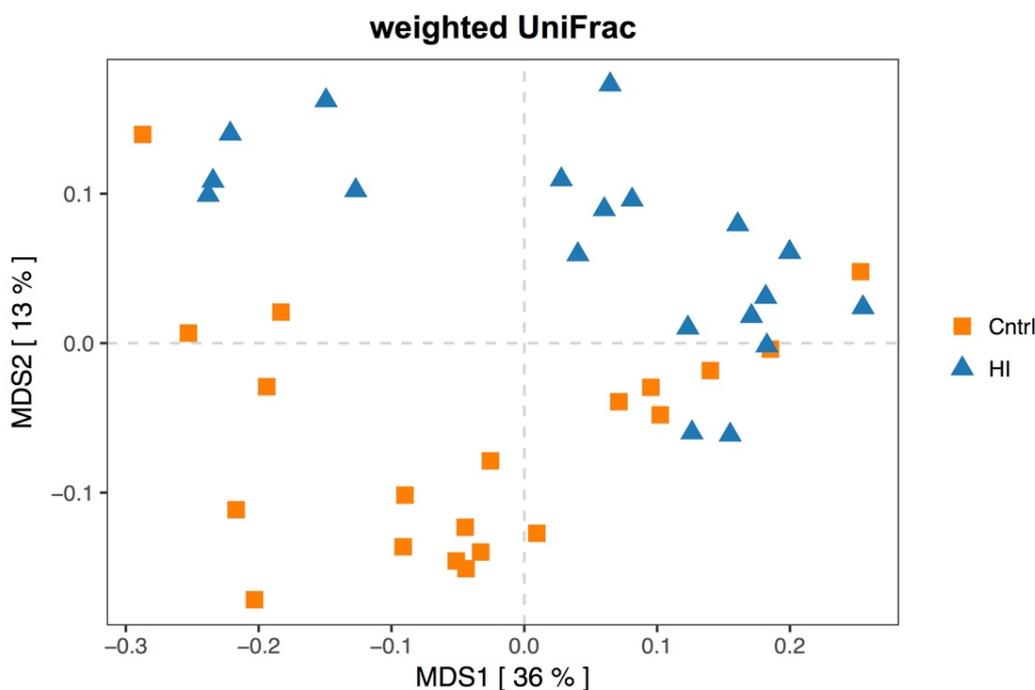


Abbildung 6: MDS Grafik der gewichteten UniFrac Distanzen (Cntrl=Kontrollprobanden, HI=Herzinsuffizienzpatienten)

Das jeweils bestmögliche Modell unter Einbezug der Variablen aus Tabelle 3-2 für die untersuchten Beta-Diversitätsmaße wurde mittels Redundanz- (bd-RDA) und Varianzanalyse (ANOVA) durch schrittweises Hinzufügen von Variablen bestimmt. Keines der getesteten Modelle zeigte bessere Ergebnissen, als das Nullmodell ergänzt um die Unterscheidung zwischen Herzinsuffizienzpatienten und Kontrollprobanden.

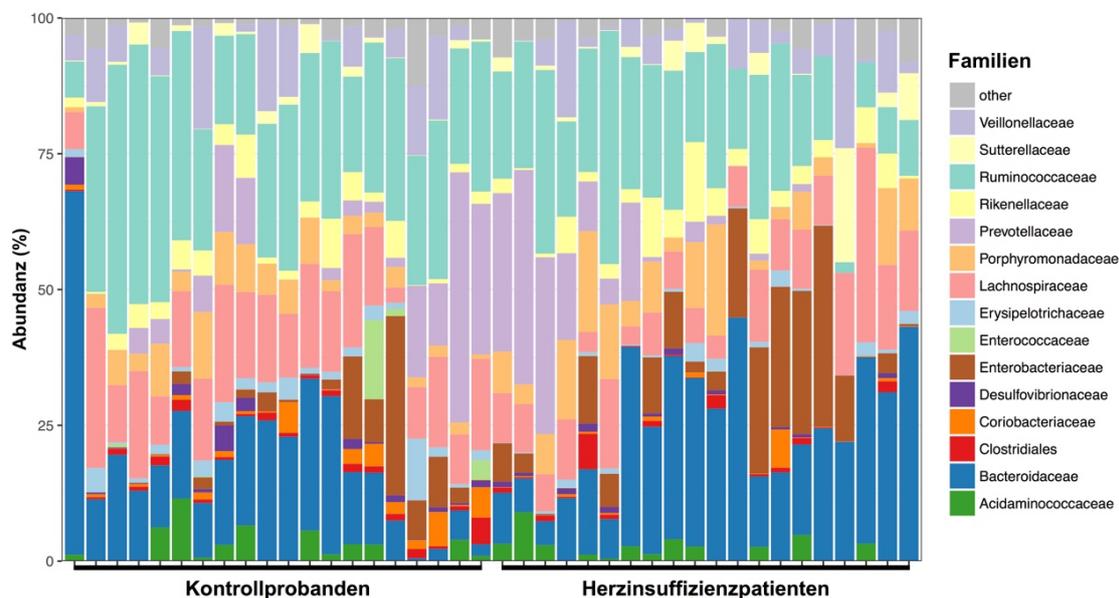
ANOVA Modell: $p_{\text{Bray-Curtis(OTUs)}}=0,021$; $p_{\text{Bray-Curtis(Gattungen)}}=0,006$; $p_{\text{weightedUniFrac}}=0,021$

Tabelle 3-2: Berücksichtigte Variablen in den Redundanzanalysen (bd-RDA)

Variable	Wert, Einheit	Variable (Medikation)	Wert
Alter	Betrag, Jahre	Beta-Blocker	ja/nein
Geschlecht	männlich/weiblich	Diuretika	ja/nein
Körpermassenzahl	Betrag, kg/m ²	ACE-Hemmer	ja/nein
Nikotinkonsum	nie/jemals/aktuell	Aldosteron-Antagonisten	ja/nein
Gruppe	HI/Cntrl	Gichtmedikamente	ja/nein
Ätiologie der HI	Ø/ICMP/DCM	Antiarrhythmika	ja/nein
diastolischer Blutdruck	Betrag, mmHg	Antihypertensiva	ja/nein
systolischer Blutdruck	Betrag, mmHg	Protonenpumpeninhibitoren	ja/nein
Serumspiegel CRP	Betrag, mg/l	Antidiabetika	ja/nein
Serumspiegel NT-proBNP	Betrag, ng/l		

3.3 Unterschiede in der Abundanz einzelner Bakterien zwischen Herzinsuffizienzpatienten und Kontrollprobanden

Die taxonomische Zuordnung der einzelnen OTUs zu den taxonomischen Gruppen erfolgte mit Hilfe der Datenbank des Ribosomale Database Project (siehe Abschnitt 2.2.3.2). Abbildung 7 zeigt eine Übersicht der Zusammensetzung aller Proben auf Familienebene.

**Abbildung 7:** Zusammensetzung aller Proben auf bakterieller Familienebene (CMM)

Eine Übersicht der Zusammensetzung aller Proben auf bakterieller Gattungsebene zeigt Abbildung 8.

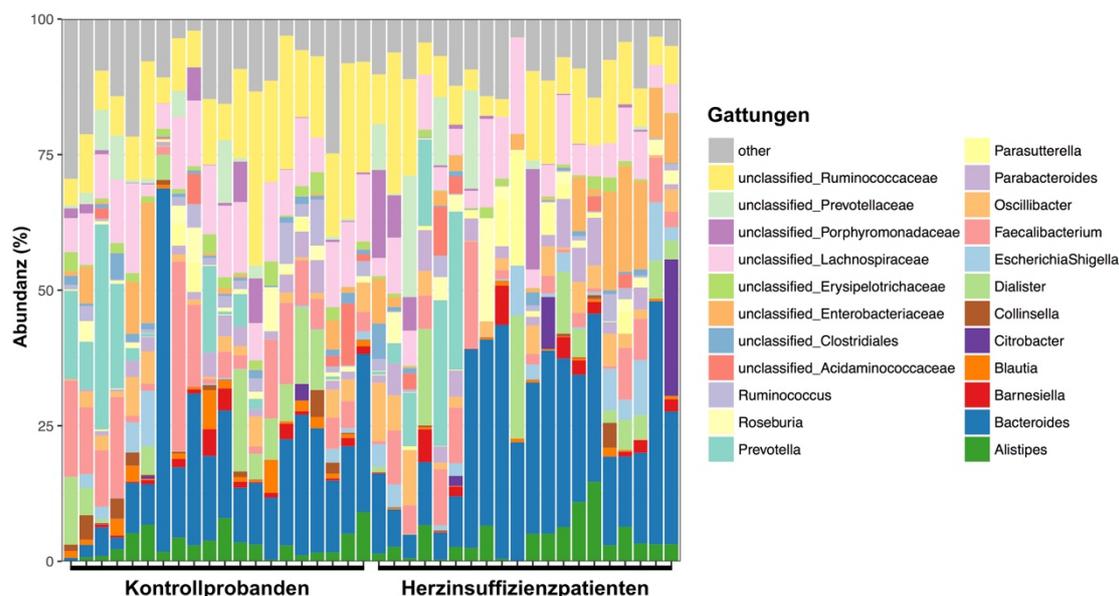


Abbildung 8: Zusammensetzung aller Proben auf bakterieller Gattungsebene (CMM)

Mittels linearer Regressionsanalyse (GLM) wurde auf Familien-, Gattungs- und OTU-Ebene geprüft, ob einzelne CMM-Taxa in den Proben der Herzinsuffizienzpatienten gegenüber den Proben der Kontrollprobanden signifikant gehäuft oder vermindert vorkamen.

Die Auswertung zeigte, dass die bakteriellen Familien *Coriobacteriaceae*, *Erysipelotrichaceae* und *Ruminococcaceae* in den Proben der Herzinsuffizienzpatienten signifikant weniger häufig vorkamen (Tabelle 3-3, Abbildung 9).

Auf Gattungsebene kamen *Blautia* und *Collinsella*, sowie zwei nicht klassifizierte Taxa der Familien *Erysipelotrichaceae* und *Ruminococcaceae* signifikant weniger häufig bei den Herzinsuffizienzpatienten vor. Bakterien der Gattung *Escherichia/Shigella* kamen nominell signifikant gehäuft in der Gruppe der Herzinsuffizienzpatienten vor, jedoch erwies sich diese Beobachtung als nicht signifikant nach der Korrektur für multiples Testen (Tabelle 3-3, Abbildung 9).

Auf OTU-Ebene zeigten sich nur nominell signifikant verminderte Abundanzen einzelner Taxa bei den Herzinsuffizienzpatienten gegenüber den Kontrollen (Tabelle 3-3).

Tabelle 3-3: Unterschiede in der Abundanz einzelner Bakterien auf Familien-, Gattungs- und OTU-Ebene zwischen Herzinsuffizienzpatienten (HI-Patienten) und Kontrollprobanden. Signifikante Ergebnisse nach Korrektur für multiples Testen ($p_{\text{korr.}} < 0,05$) mit * markiert.

	Bakterium	$P_{\text{nom.}}$	$P_{\text{korr.}}$	% HI-Patienten	% Kontrollen
Familien	Coriobacteriaceae	0,0002	0,0030*	0,59	1,77
	Erysipelotrichaceae	0,0006	0,0045*	1,06	2,38
	Ruminococcaceae	0,0054	0,0270*	20,37	28,38
Gattungen	Blautia	9,99e-05	0,0023*	0,40	1,70
	Collinsella	0,0082	0,0472*	0,33	1,14
	Escherichia/Shigella	0,0137	0,0630	3,19	1,34
	Faecalibacterium	0,0460	0,1780	5,08	9,02
	unkl. Erysipelotrichaceae	0,0017	0,0196*	0,72	1,71
	unkl. Ruminococcaceae	0,0081	0,0472*	9,60	14,17
OTUs (Nr.)	Bacteroides (1)	0,0430	0,2311	5,38	2,66
	unkl. Enterobacteriaceae (4)	0,0357	0,2311	2,74	0,99
	Lachnospiraceae inc. Sedis (14)	0,0031	0,0666	0,43	1,85
	Faecalibacterium (24)	0,0106	0,1040	0,87	2,36
	Collinsella (33)	0,0021	0,0666	0,05	0,99
	unkl. Erysipelotrichaceae (62)	0,0121	0,1040	0,22	0,56
unkl. Ruminococcaceae (65)	0,0411	0,2311	0,21	0,65	
	Faecalibacterium (1490)	0,0072	0,1032	0,90	2,15

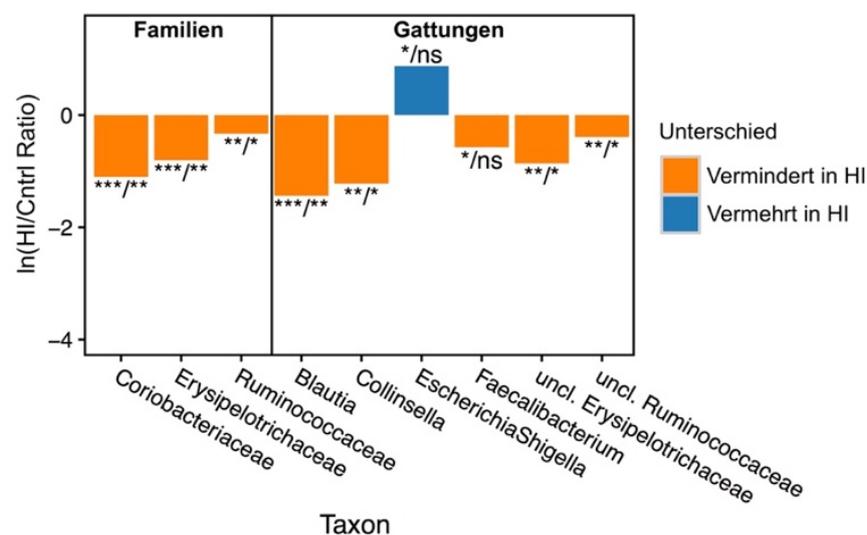


Abbildung 9: Bakterielle Familien und Gattungen mit unterschiedlicher Abundanz zwischen Herzinsuffizienzpatienten (HI) und Kontrollprobanden (Cntrl). Ns: nicht signifikant ($p > 0,05$),

*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$. P-Werte vor/nach Korrektur für multiples Testen.

3.4 Varianzanalyse innerhalb der Gruppe der Herzinsuffizienzpatienten

Mit Hilfe von Varianzanalysen (PerMANOVA) wurde der Einfluss klinischer Variablen auf die interindividuelle Varianz der Proben innerhalb der Herzinsuffizienzpatienten untersucht. Dabei wurde geprüft, ob eine der folgenden Variablen mit signifikanten Änderungen der bakteriellen Zusammensetzung auf Gattungs- oder OTU-Ebene assoziiert ist:

- Alter
- Geschlecht
- Körpermassenzahl (BMI)
- Nikotinkonsum (nie/ehemals/aktuell)
- systolischer/diastolischer Blutdruck
- Ätiologie der Herzinsuffizienz (ischämische oder dilatative Kardiomyopathie)
- linksventrikuläre Auswurfraction (LVEF): $\leq 20\%$ oder 21-35%
- NYHA Klasse
- Blutserumspiegel von CRP und NT-proBNP
- Medikation (entsprechend der Gruppenklassifikation in Tabelle 3-2)

Es zeigte sich keine signifikante Assoziation einer dieser Variablen mit der Beta-Diversität des bakteriellen Mikrobioms bei den untersuchten Patienten mit Herzinsuffizienz auf OTU- und Gattungsebene.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zusammensetzung des intestinalen bakteriellen Mikrobioms von Patientinnen und Patienten mit Herzinsuffizienz anhand von nicht-invasiv gewonnenen Stuhlproben untersucht. Die Ergebnisse wurden mit Proben von Kontrollprobanden aus demselben geografischen Umfeld, die nach bestmöglicher Übereinstimmung in Bezug auf Alter, Geschlecht, Körpermassenzahl (BMI) und Nikotinkonsum ausgewählt wurden, verglichen.

4.1 Ergebnisse

Die Auswertung der Proben zeigte, dass sich die Zusammensetzung des Mikrobioms der Herzinsuffizienzpatienten gegenüber den Kontrollprobanden in der Abundanz einzelner Bakterien auf Familien- und Gattungsebene unterschied. Es zeigten sich signifikante Differenzen in der bakteriellen Beta-Diversität zwischen diesen beiden Gruppen und ein Trend zu einer reduzierten bakteriellen Alpha-Diversität bei Patientinnen und Patienten mit Herzinsuffizienz.

Die Unterschiede in der Beta-Diversität waren hauptsächlich durch das signifikant verminderte Vorkommen der bakteriellen Gattungen *Blautia* und *Collinsella* sowie zwei nicht klassifizierbarer Taxa der Familien *Erysipelotrichaceae* und *Ruminococcaceae* geprägt. Bisher wurden Veränderungen in dieser Konstellation für keine andere Krankheitsentität beschrieben, sodass diese spezifisch für Herzinsuffizienzpatienten sein könnten.

Es scheint denkbar, dass das verminderte Vorkommen dieser Gattungen eine Rolle in der Pathogenese der Herzinsuffizienz spielt.

Für *Collinsella* Bakterien wurde eine Assoziation mit dem Auftreten von systemischer Atherosklerose (Karlsson et al., 2012) sowie Diabetes mellitus Typ II (Lambeth et al., 2015) beschrieben. Bakterien dieser Gattung scheinen bei Patienten mit Atherosklerose oder Diabetes mellitus Typ II vermehrt im intestinalen Mikrobiom vorzukommen. In dieser Arbeit konnte bei Herzinsuffizienzpatienten eine verminderte Abundanz von *Collinsella* gezeigt werden. Diese Depletion von *Collinsella* war bemerkenswerterweise auch bei Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie und/oder Diabetes mellitus Typ II als Ko-Morbidität zu beobachten. Es scheint also die Präsenz einer Herzinsuffizienz einen stärkeren Effekt auf die Abundanz von *Collinsella* auszuüben, als die Präsenz dieser Ko-Morbiditäten. Die Depletion der Gattung *Collinsella* könnte somit höchst spezifisch für die Herzinsuffizienz sein.

Für Bakterien der Gattung *Blautia* wurde ein Zusammenhang mit immunmodulativen und antiinflammatorischen Effekten vermutet. Ihre intestinale Abundanz ist mit einer reduzierten Sterblichkeit bei Transplantat-gegen-Wirt-Reaktionen nach allogener Transplantation von Knochenmark assoziiert (Jenq et al., 2015). In der Herzinsuffizienz könnte eine Depletion von *Blautia* möglicherweise auch einen Einfluss auf entzündliche Prozesse haben.

Zudem zeigte sich in der Gruppe der Herzinsuffizienzpatienten nominell signifikant das verminderte Vorkommen der Gattung *Faecalibacterium*. Für eine reduzierte Abundanz von *Faecalibacterium prausnitzii*, eine der häufigsten Spezies im humanen intestinalen Mikrobiom, wurde ein Zusammenhang mit einer gesteigerten Permeabilität der intestinalen Mukosa sowie Entzündungsreaktionen beschrieben (Martin et al., 2015).

Eine Infektion mit einzelnen intestinalen Pathogenen konnte in der Gruppe der Herzinsuffizienzpatienten wie auch der Kontrollprobanden auf OTU-Ebene ausgeschlossen werden. Dies spricht gegen die Theorie einer infektiösen Genese der Herzinsuffizienz durch ein einzelnes (evtl. pathogenes) Bakterium. Die beobachteten Veränderungen deuten vielmehr auf eine Anpassung des intestinalen bakteriellen Mikrobioms an veränderte Umweltbedingungen hin.

4.2 Einfluss- und Störfaktoren

Vielfältige interne und externe Faktoren könnten einen Einfluss auf das intestinale Mikrobiom ausüben und sollten daher bei der Diskussion der Beobachtungen berücksichtigt werden.

Mit der Manifestation einer Herzinsuffizienz geht eine geringfügige chronische Entzündungsreaktion einher (Dick und Epelman, 2016; Thierer et al., 2010). Diese könnte einerseits Einfluss auf das Mikrobiom an sich nehmen, andererseits aber auch selbst (direkt oder indirekt) durch mikrobielle Induktoren bedingt sein. Ein solches Konzept der gegenseitigen Beeinflussung von Mikrobiom und Wirt wurde bereits bei einigen anderen inflammatorischen Erkrankungen, wie z.B. der rheumatoiden Arthritis vermutet (Scher et al., 2016). Störungen der intestinalen epithelialen Barriere als Folge einer initialen Entzündungsreaktion könnten über eine vermehrte Präsentation von immunogenen Epitopen aus dem Mikrobiom zu einer Gravierung eben dieser Störung führen (Lerner und Matthias, 2015). Auch in der Herzinsuffizienz wäre ein solcher Mechanismus als Circulus vitiosus für eine systemische Inflammationsreaktion denkbar. Die myokardiale Funktion könnte über diesen Mechanismus beeinträchtigt werden. Bei Patienten mit akut dekompensierter

Herzinsuffizienz wurden erhöhte Konzentrationen inflammatorischer Zytokine und bakterieller Endotoxine in hepatischen Venen gemessen, welche die intestinale Translokation von Bakterien mit konsekutiver immunologischer Reaktion vermuten lassen (Peschel et al., 2003).

Zudem sind bei Herzinsuffizienzpatienten Störungen des Flüssigkeitshaushalts zu beobachten, die auch mit Veränderungen der intestinalen Durchblutung einhergehen (Sandek et al., 2007). Hierdurch könnte das intraluminale Sauerstoffangebot für die Bakterien beeinträchtigt werden. Die Zunahme von anaeroben Bakterien im juxtamukosalen Biofilm in Korrelation mit einer Entzündungsreaktion konnte bereits bei kompensierten Herzinsuffizienzpatienten nachgewiesen werden (Sandek et al., 2014). In diesem Zusammenhang kann auch ein Einfluss diuretischer Medikamente nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund ihres Stellenwertes in der leitliniengerechten Therapie der Herzinsuffizienz konnte auf den Einsatz von Diuretika in dieser Studie nicht verzichtet werden. In der statistischen Analyse zeigte sich jedoch kein signifikanter Einfluss von Diuretika auf die Zusammensetzung des Mikrobioms.

Zu den externen Faktoren, die die Zusammensetzung des Mikrobioms beeinflussen könnten, zählen u.a. die Ernährung der Probanden, die verabreichte Medikation, bestehende Ko-Morbiditäten und die Umgebung der Patienten.

Da die untersuchten Probanden keine standardisierte Diät erhalten haben, sind Effekte der individuellen Ernährung in dieser Studie nicht auszuschließen. Probanden, die keine europäische Mischdiät konsumierten (z.B. vegetarische Diät), wurden im Vorfeld ausgeschlossen. Die Medikation der Studienprobanden wurde in der statistischen Auswertung berücksichtigt. Eine antibiotische Therapie innerhalb der letzten drei Monate wurde ausgeschlossen. Als relevante Ko-Morbiditäten traten in dem untersuchten Kollektiv Diabetes mellitus Typ II und arterielle Hypertonie auf (Prävalenzen siehe Tabelle 2-5). Ein Einfluss dieser Entitäten auf die Studienergebnisse kann nicht sicher ausgeschlossen werden, jedoch sind in bisherigen Studien für diese Erkrankungen andersartige Veränderungen beschrieben worden (Zhang et al., 2015). Um den Einfluss der stationären Krankenhausumgebung zu begrenzen, wurden die Stuhlproben der Patienten schnellstmöglich innerhalb von 24 Stunden nach Aufnahme gewonnen.

Es erscheint wahrscheinlich, dass die Gesamtheit der funktionalen und strukturellen Veränderungen in der Herzinsuffizienz zu einer Anpassung des intestinalen Mikrobioms führt und der Effekt einzelner Faktoren somit nur im Gesamtzusammenhang bewertet werden sollte.

4.3 Vergleich mit den Ergebnissen anderer Studien

In einer Studie aus dem Jahr 2016 (60 Fälle, 20 Kontrollen), die auf kulturellen Anzuchtmethoden basierte, wurde eine Zunahme von potentiell pathogenen Bakterien wie *Campylobacter*, *Shigella*, *Salmonella* und *Yersinia enterocolitica* sowie einigen *Candida* Spezies bei italienischen Herzinsuffizienzpatienten beschrieben (Pasini et al., 2016). In Übereinstimmung hiermit konnte in der vorliegenden Arbeit das nominell signifikant vermehrte Vorkommen der Gattung *Escherichia/Shigella* beobachtet werden, jedoch war dieses Ergebnis nach Korrektur für multiples Testen nicht signifikant. Ebenso konnte insgesamt keine signifikante Zunahme von Bakterien der Familie *Enterobacteriaceae* (z.B. *Salmonella* oder *Yersinia*) beobachtet werden.

Eine andere Studie aus dem Jahr 2017 (12 Fälle, 12 Kontrollen) zeigte auf Grundlage von 16S rRNA Sequenzierungsdaten deutliche Unterschiede in der bakteriellen Beta-Diversität (ungewichtete und gewichtete UniFrac Distanzen) zwischen japanischen Herzinsuffizienzpatienten und gesunden Kontrollen (Kamo et al., 2017). Des Weiteren wurde eine verminderte Abundanz von *Eubacterium rectale* und *Dorea longicatena* bei den Patienten mit Herzinsuffizienz beschrieben. In Übereinstimmung hiermit konnten in der vorliegenden Studie ebenfalls deutliche Unterschiede in der bakteriellen Beta-Diversität zwischen Herzinsuffizienzpatienten und Kontrollen gezeigt werden, jedoch konnte eine reduzierte Abundanz der genannten *Firmicutes* Bakterien nicht bestätigt werden.

Die zum Teil uneinheitlichen Ergebnisse der drei Studien könnten durch multiple Einflussfaktoren bedingt sein, jedoch können insbesondere die relativ kleinen Gruppengrößen (12/12, 60/20 und 20/20) und die unterschiedlichen Herkunftsländer der Studienprobanden (Japan, Italien und Deutschland) zu den Differenzen beigetragen haben. Es lässt sich jedoch aus allen drei Studien folgern, dass das intestinale Mikrobiom in der Herzinsuffizienz gegenüber Kontrollprobanden deutlich verändert ist.

4.4 Limitationen dieser Studie

Aufgrund der relativ kleinen Gruppengrößen von je 20 Patienten und Kontrollprobanden sollten größere Studien die Ergebnisse dieser Studie bestätigen, insbesondere auch um die Aussagekraft von Subgruppenanalysen zu Einflussfaktoren zu steigern. Longitudinalstudien könnten eine genauere Differenzierung von Effekten der Herzinsuffizienz im Krankheitsverlauf und von möglichen Störfaktoren ermöglichen.

Die verwendeten nicht-invasiv gewonnenen Stuhlproben enthalten vornehmlich lumenale intestinale Bakterien. Bakterien aus der juxtamukosalen Zone wurden jedoch wahrscheinlich nur zu einem begrenzten Teil erfasst. Es lassen sich somit keine verlässlichen Aussagen zu Veränderungen der bakteriellen Besiedlung in diesem Bereich treffen. Hierzu wäre die Untersuchung geeigneter (z.B. biopsisch gewonnener) Proben notwendig.

4.5 Schlussfolgerungen und Aussicht

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei Herzinsuffizienzpatienten signifikante Unterschiede des intestinalen bakteriellen Mikrobioms beobachtet werden können. Diese könnten sowohl eine Folge der kardialen Dysfunktion, als auch ein Risikofaktor für das initiale Auftreten und den Verlauf einer Herzinsuffizienz sein. In diesem Kontext ist denkbar, dass das intestinale Mikrobiom als Krankheitsmarker der Herzinsuffizienz fungieren könnte.

Die beobachtete Depletion umschriebener bakterieller Gattungen in der Herzinsuffizienz sollte Anlass sein die funktionelle Relevanz dieser Bakterien in der Pathophysiologie weitergehend zu erforschen. Die gezielte Beeinflussung des intestinalen Mikrobioms könnte in Zukunft ein Bestandteil des Therapiekonzepts bei Herzinsuffizienz sein. Denkbar wäre hierzu sowohl der Einsatz von spezifischen Nahrungszusätzen (Präbiotika) oder die Substitution einzelner Bakterien (Probiotika) sowie therapeutische Stuhltransplantationen (Bindels und Delzenne, 2013; Pasini et al., 2015).

5 Zusammenfassung

Das intestinale bakterielle Mikrobiom in der Herzinsuffizienz: eine vergleichende Untersuchung mittels Sequenzierung des 16S rRNA Gens

Fragestellung:

Die Mortalität der chronischen Herzinsuffizienz ist trotz moderner Behandlungsansätze hoch. Neue Therapiekonzepte werden daher dringend benötigt. Jüngste Forschungsergebnisse legen einen Einfluss des intestinalen bakteriellen Mikrobioms auf die Inzidenz und den klinischen Verlauf der Herzinsuffizienz nahe. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Veränderungen des intestinalen bakteriellen Mikrobioms bei Herzinsuffizienzpatienten nachgewiesen werden können.

Methoden und Ergebnisse:

Es wurden Stuhlproben von 20 Herzinsuffizienzpatienten mit reduzierter linksventrikulärer Ejektionsfraktion aufgrund einer ischämischen oder dilatativen Kardiomyopathie untersucht. Die V1-V2 Region des bakteriellen 16S rRNA Gens wurde mittels Pyrosequenzierung analysiert. Die bakteriellen Profile der Patienten wurden mit denen von Kontrollprobanden ohne Herzinsuffizienz (n=20) verglichen. Die Auswahl der Kontrollen erfolgte nach bestmöglich Übereinstimmung mit den Herzinsuffizienzpatienten in Bezug auf das Alter, das Geschlecht, die Körpermassenzahl (BMI) und den Nikotinkonsum.

Es zeigte sich ein Trend zu einer verminderten intraindividuellen Alpha-Diversität bei den Herzinsuffizienzpatienten (Anzahl der beobachteten Gattungen: $p_{\text{nom.}}=0,021$; Shannon-Index (OTUs): $p_{\text{nom.}}=0,012$; Chao1 Index (Gattungen): $p_{\text{nom.}}=0,041$). Die Analyse verschiedener Beta-Diversitätsmaße (interindividuelle Diversität) zeigte eine signifikante Separation von Herzinsuffizienzpatienten und Kontrollprobanden (Bray-Curtis Index (OTUs): $p=0,0099$; Bray-Curtis Index (Gattungen): $p=0,0124$; *weighted UniFrac* Distanzen: $p=0,004$). Bei den Herzinsuffizienzpatienten war zudem die Abundanz der bakteriellen Familien *Coriobacteriaceae*, *Erysipelotrichaceae* und *Ruminococcaceae* signifikant geringer. Auf Gattungsebene waren *Blautia* und *Collinsella* sowie zwei nicht klassifizierbare Taxa der Familien *Erysipelotrichaceae* und *Ruminococcaceae* bei den Patienten signifikant weniger häufig vorhanden.

Schlussfolgerungen:

Bei Patienten mit Herzinsuffizienz können Unterschiede in der Zusammensetzung des intestinalen bakteriellen Mikrobioms beobachtet werden. Die Erkrankung scheint mit einer verminderten bakteriellen Diversität und der verminderten intestinalen Abundanz umschriebener bakterieller Familien und Gattungen einherzugehen.

Eine Relevanz des intestinalen Mikrobioms in der Pathogenese und Progression der Herzinsuffizienz scheinen denkbar. In Zukunft könnte die gezielte Beeinflussung des intestinalen Mikrobioms ein Bestandteil des Therapiekonzepts bei Herzinsuffizienz sein.

6 Literaturverzeichnis

- ANKER, S. D., EGERER, K. R., VOLK, H. D., KOX, W. J., POOLE-WILSON, P. A. & COATS, A. J. (1997): Elevated soluble CD14 receptors and altered cytokines in chronic heart failure. *Am J Cardiol*, 79, 1426-30.
- BAKER, G. C., SMITH, J. J. & COWAN, D. A. (2003): Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods*, 55, 541-55.
- BENJAMINI, Y. & HOCHBERG, Y. (1995): Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 57, 289-300.
- BINDELS, L. B. & DELZENNE, N. M. (2013): Muscle wasting: the gut microbiota as a new therapeutic target? *Int J Biochem Cell Biol*, 45, 2186-90.
- BLEUMINK, G. S., KNETSCH, A. M., STURKENBOOM, M. C., STRAUS, S. M., HOFMAN, A., DECKERS, J. W., WITTEMAN, J. C. & STRICKER, B. H. (2004): Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure The Rotterdam Study. *Eur Heart J*, 25, 1614-9.
- BRAY, J. R. & CURTIS, J. T. (1957): An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 27, 325-349.
- CHAKRAVORTY, S., HELB, D., BURDAY, M., CONNELL, N. & ALLAND, D. (2007): A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods*, 69, 330-9.
- CHAO, A. (1984): Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. *Scandinavian Journal of Statistics*, 11, 265-270.
- COLE, J. R., WANG, Q., FISH, J. A., CHAI, B., MCGARRELL, D. M., SUN, Y., BROWN, C. T., PORRAS-ALFARO, A., KUSKE, C. R. & TIEDJE, J. M. (2014): Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*, 42, D633-42.
- DICK, S. A. & EPELMAN, S. (2016): Chronic Heart Failure and Inflammation: What Do We Really Know? *Circ Res*, 119, 159-76.
- ECKBURG, P. B., BIK, E. M., BERNSTEIN, C. N., PURDOM, E., DETHLEFSEN, L., SARGENT, M., GILL, S. R., NELSON, K. E. & RELMAN, D. A. (2005): Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308, 1635-8.
- EDGAR, R. C. (2004a): MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 5, 113.
- EDGAR, R. C. (2004b): MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, 32, 1792-7.
- EDGAR, R. C. (2010): Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26, 2460-1.
- EDGAR, R. C., HAAS, B. J., CLEMENTE, J. C., QUINCE, C. & KNIGHT, R. (2011): UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27, 2194-200.
- EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M. C. & GREEN, P. (1998): Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res*, 8, 175-85.

- FAITH, D. P. (1992): Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation*, 61, 1-10.
- GO, A. S., MOZAFFARIAN, D., ROGER, V. L., BENJAMIN, E. J., BERRY, J. D., BLAHA, M. J., DAI, S., FORD, E. S., FOX, C. S., FRANCO, S., FULLERTON, H. J., GILLESPIE, C., HAILPERN, S. M., HEIT, J. A., HOWARD, V. J., HUFFMAN, M. D., JUDD, S. E., KISSELA, B. M., KITTNER, S. J., LACKLAND, D. T., LICHTMAN, J. H., LISABETH, L. D., MACKEY, R. H., MAGID, D. J., MARCUS, G. M., MARELLI, A., MATCHAR, D. B., MCGUIRE, D. K., MOHLER, E. R., 3RD, MOY, C. S., MUSSOLINO, M. E., NEUMAR, R. W., NICHOL, G., PANDEY, D. K., PAYNTER, N. P., REEVES, M. J., SORLIE, P. D., STEIN, J., TOWFIGHI, A., TURAN, T. N., VIRANI, S. S., WONG, N. D., WOO, D., TURNER, M. B., AMERICAN HEART ASSOCIATION STATISTICS, C. & STROKE STATISTICS, S. (2014): Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 129, e28-e292.
- HOOPER, L. V., WONG, M. H., THELIN, A., HANSSON, L., FALK, P. G. & GORDON, J. I. (2001): Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*, 291, 881-4.
- HUMAN MICROBIOME PROJECT, C. (2012): Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486, 207-14.
- JENQ, R. R., TAUR, Y., DEVLIN, S. M., PONCE, D. M., GOLDBERG, J. D., AHR, K. F., LITTMANN, E. R., LING, L., GOBOURNE, A. C., MILLER, L. C., DOCAMPO, M. D., PELED, J. U., ARPAIA, N., CROSS, J. R., PEETS, T. K., LUMISH, M. A., SHONO, Y., DUDAKOV, J. A., POECK, H., HANASH, A. M., BARKER, J. N., PERALES, M. A., GIRALT, S. A., PAMER, E. G. & VAN DEN BRINK, M. R. (2015): Intestinal *Blautia* Is Associated with Reduced Death from Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*, 21, 1373-83.
- KAMO, T., AKAZAWA, H., SUDA, W., SAGA-KAMO, A., SHIMIZU, Y., YAGI, H., LIU, Q., NOMURA, S., NAITO, A. T., TAKEDA, N., HARADA, M., TOKO, H., KUMAGAI, H., IKEDA, Y., TAKIMOTO, E., SUZUKI, J. I., HONDA, K., MORITA, H., HATTORI, M. & KOMURO, I. (2017): Dysbiosis and compositional alterations with aging in the gut microbiota of patients with heart failure. *PLoS One*, 12, e0174099.
- KARLSSON, F. H., FAK, F., NOOKAEW, I., TREMAROLI, V., FAGERBERG, B., PETRANOVIC, D., BACKHED, F. & NIELSEN, J. (2012): Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat Commun*, 3, 1245.
- KRAWCZAK, M., NIKOLAUS, S., VON EBERSTEIN, H., CROUCHER, P. J., EL MOKHTARI, N. E. & SCHREIBER, S. (2006): PopGen: population-based recruitment of patients and controls for the analysis of complex genotype-phenotype relationships. *Community Genet*, 9, 55-61.
- LAMBETH, S. M., CARSON, T., LOWE, J., RAMARAJ, T., LEFF, J. W., LUO, L., BELL, C. J. & SHAH, V. O. (2015): Composition, Diversity and Abundance of Gut Microbiome in Prediabetes and Type 2 Diabetes. *J Diabetes Obes*, 2, 1-7.
- LERNER, A. & MATTHIAS, T. (2015): Rheumatoid arthritis-celiac disease relationship: joints get that gut feeling. *Autoimmun Rev*, 14, 1038-47.
- LEVINE, B., KALMAN, J., MAYER, L., FILLIT, H. M. & PACKER, M. (1990): Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med*, 323, 236-41.

- LOZUPONE, C. & KNIGHT, R. (2005): UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, 71, 8228-35.
- MAGOC, T. & SALZBERG, S. L. (2011): FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 27, 2957-63.
- MARTIN, R., MIQUEL, S., CHAIN, F., NATIVIDAD, J. M., JURY, J., LU, J., SOKOL, H., THEODOROU, V., BERCIK, P., VERDU, E. F., LANGELLA, P. & BERMUDEZ-HUMARAN, L. G. (2015): Faecalibacterium prausnitzii prevents physiological damages in a chronic low-grade inflammation murine model. *BMC Microbiol*, 15, 67.
- MCMURRAY, J. J., ADAMOPOULOS, S., ANKER, S. D., AURICCHIO, A., BOHM, M., DICKSTEIN, K., FALK, V., FILIPPATOS, G., FONSECA, C., GOMEZ-SANCHEZ, M. A., JAARSMA, T., KOBER, L., LIP, G. Y., MAGGIONI, A. P., PARKHOMENKO, A., PIESKE, B. M., POPESCU, B. A., RONNEVIK, P. K., RUTTEN, F. H., SCHWITTER, J., SEFEROVIC, P., STEPINSKA, J., TRINDADE, P. T., VOORS, A. A., ZANNAD, F., ZEIHNER, A. & GUIDELINES, E. S. C. C. F. P. (2012): ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*, 33, 1787-847.
- NEUMANN, T., BIERMANN, J., ERBEL, R., NEUMANN, A., WASEM, J., ERTL, G. & DIETZ, R. (2009): Heart failure: the commonest reason for hospital admission in Germany: medical and economic perspectives. *Dtsch Arztebl Int*, 106, 269-75.
- NOTHLINGS, U. & KRAWCZAK, M. (2012): PopGen. A population-based biobank with prospective follow-up of a control group. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 55, 831-5.
- OKSANEN, J., BLANCHET, F., KINDT, R., LEGENDRE, P., MINCHIN, P., O'HARA, R., SIMPSON, G., SOLYMOS, P., STEVENS, H. & WAGNER, H. 2015. vegan: Community Ecology Package. R package version 2.3-0.
- PASINI, E., AQUILANI, R., CORSETTI, G. & DIOGUARDI, F. S. (2015): Malnutrition and Gut Flora Dysbiosis: Specific Therapies for Emerging Comorbidities in Heart Failure. *Biomed Res Int*, 2015, 382585.
- PASINI, E., AQUILANI, R., TESTA, C., BAIARDI, P., ANGIOLETTI, S., BOSCHI, F., VERRI, M. & DIOGUARDI, F. (2016): Pathogenic Gut Flora in Patients With Chronic Heart Failure. *JACC Heart Fail*, 4, 220-7.
- PESCHEL, T., SCHONAUER, M., THIELE, H., ANKER, S. D., SCHULER, G. & NIEBAUER, J. (2003): Invasive assessment of bacterial endotoxin and inflammatory cytokines in patients with acute heart failure. *Eur J Heart Fail*, 5, 609-14.
- PONIKOWSKI, P., VOORS, A. A., ANKER, S. D., BUENO, H., CLELAND, J. G., COATS, A. J., FALK, V., GONZALEZ-JUANATEY, J. R., HARJOLA, V. P., JANKOWSKA, E. A., JESSUP, M., LINDE, C., NIHOYANNOPOULOS, P., PARISSIS, J. T., PIESKE, B., RILEY, J. P., ROSANO, G. M., RUILOPE, L. M., RUSCHITZKA, F., RUTTEN, F. H., VAN DER MEER, P., AUTHORS/TASK FORCE, M. & DOCUMENT, R. (2016): 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur J Heart Fail*, 18, 891-975.

- PRICE, M. N., DEHAL, P. S. & ARKIN, A. P. (2009): FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Mol Biol Evol*, 26, 1641-50.
- PRICE, M. N., DEHAL, P. S. & ARKIN, A. P. (2010): FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One*, 5, e9490.
- SANDEK, A., BAUDITZ, J., SWIDSINSKI, A., BUHNER, S., WEBER-EIBEL, J., VON HAEHLING, S., SCHROEDL, W., KARHAUSEN, T., DOEHNER, W., RAUCHHAUS, M., POOLE-WILSON, P., VOLK, H. D., LOCHS, H. & ANKER, S. D. (2007): Altered intestinal function in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 50, 1561-9.
- SANDEK, A., BJARNASON, I., VOLK, H. D., CRANE, R., MEDDINGS, J. B., NIEBAUER, J., KALRA, P. R., BUHNER, S., HERRMANN, R., SPRINGER, J., DOEHNER, W., VON HAEHLING, S., ANKER, S. D. & RAUCHHAUS, M. (2012): Studies on bacterial endotoxin and intestinal absorption function in patients with chronic heart failure. *Int J Cardiol*, 157, 80-5.
- SANDEK, A., SWIDSINSKI, A., SCHROEDL, W., WATSON, A., VALENTOVA, M., HERRMANN, R., SCHERBAKOV, N., CRAMER, L., RAUCHHAUS, M., GROSSE-HERRENTHEY, A., KRUEGER, M., VON HAEHLING, S., DOEHNER, W., ANKER, S. D. & BAUDITZ, J. (2014): Intestinal blood flow in patients with chronic heart failure: a link with bacterial growth, gastrointestinal symptoms, and cachexia. *J Am Coll Cardiol*, 64, 1092-102.
- SATO, Y., TAKATSU, Y., KATAOKA, K., YAMADA, T., TANIGUCHI, R., SASAYAMA, S. & MATSUMORI, A. (1999): Serial circulating concentrations of C-reactive protein, interleukin (IL)-4, and IL-6 in patients with acute left heart decompensation. *Clin Cardiol*, 22, 811-3.
- SCHER, J. U., LITTMAN, D. R. & ABRAMSON, S. B. (2016): Microbiome in Inflammatory Arthritis and Human Rheumatic Diseases. *Arthritis Rheumatol*, 68, 35-45.
- SCHLOSS, P. D., WESTCOTT, S. L., RYABIN, T., HALL, J. R., HARTMANN, M., HOLLISTER, E. B., LESNIEWSKI, R. A., OAKLEY, B. B., PARKS, D. H., ROBINSON, C. J., SAHL, J. W., STRES, B., THALLINGER, G. G., VAN HORN, D. J. & WEBER, C. F. (2009): Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, 75, 7537-41.
- SHANNON, C. E. (1948): A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal*, 27, 379-423.
- SIMPSON, E. H. (1949): Measurement of Diversity. *Nature*, 163, 688-688.
- SMIT, S., WIDMANN, J. & KNIGHT, R. (2007): Evolutionary rates vary among rRNA structural elements. *Nucleic Acids Res*, 35, 3339-54.
- STALLMACH, A., VEHRESCHILD, M. J. G. T., FAROWSKI, F., BACHMANN, O., BRUNS, T., GOESER, F., HÖGENAUER, C., HOLLER, E., HOLTMEIER, W. & KELLER, J. (2016): *Mikrobiom: Wissensstand und Perspektiven*, De Gruyter.
- STERN, S., POWERS, T., CHANGCHIEN, L. M. & NOLLER, H. F. (1989): RNA-protein interactions in 30S ribosomal subunits: folding and function of 16S rRNA. *Science*, 244, 783-90.
- STEWART, A. L., GREENFIELD, S., HAYS, R. D., WELLS, K., ROGERS, W. H., BERRY, S. D., MCGLYNN, E. A. & WARE, J. E., JR. (1989): Functional status and well-being

- of patients with chronic conditions. Results from the Medical Outcomes Study. *JAMA*, 262, 907-13.
- STEWART, S., MACINTYRE, K., HOLE, D. J., CAPEWELL, S. & MCMURRAY, J. J. (2001): More 'malignant' than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. *Eur J Heart Fail*, 3, 315-22.
- TEAM, R. D. C. 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.: ISBN 3-900051-07-0.
- THIERER, J., ACOSTA, A., VAINSTEIN, N., SULTAN, M., FRANCESIA, A., MARINO, J., PRADO, A. H., GUGLIELMONE, R., TRIVI, M., BOERO, L., BRITES, F. & ANKER, S. (2010): Relation of left ventricular ejection fraction and functional capacity with metabolism and inflammation in chronic heart failure with reduced ejection fraction (from the MIMICA Study). *Am J Cardiol*, 105, 977-83.
- THOMPSON, A. L. (2012): Developmental origins of obesity: early feeding environments, infant growth, and the intestinal microbiome. *American journal of human biology : the official journal of the Human Biology Council*, 24, 350-60.
- WANG, Q., GARRITY, G. M., TIEDJE, J. M. & COLE, J. R. (2007): Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol*, 73, 5261-7.
- WANG, Y., NAUMANN, U., WRIGHT, S. T. & WARTON, D. I. (2012): mvabund-anRpackage for model-based analysis of multivariate abundance data. *Methods in Ecology and Evolution*, 3, 471-474.
- WARRINER, D., SHERIDAN, P. & LAWFORD, P. (2015): Heart failure: not a single organ disease but a multisystem syndrome. *Br J Hosp Med (Lond)*, 76, 330-6.
- WHITMAN, W. B., COLEMAN, D. C. & WIEBE, W. J. (1998): Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 6578-83.
- ZHANG, Y. J., LI, S., GAN, R. Y., ZHOU, T., XU, D. P. & LI, H. B. (2015): Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *Int J Mol Sci*, 16, 7493-519.

7 Anhang

Anamnesebogen für Herzinsuffizienzpatienten:

Anamnesebogen

Pat.-ID:

Datum:

Einverständniserklärung: ja / nein

Name	
Vorname	
Geburtsdatum	
Geschlecht	männlich / weiblich
Datum d. Hospitalisierung	
Körpermaße	kg cm
Blutdruck (RR)	mmHg
Anitbiotika-Therapie letzte 3 Monate	ja / nein
Darmerkrankungen / CED / Darm-OPs	
Darm-Polypen bekannt	ja / nein letzte Koloskopie:
Stuhlgang: Beschaffenheit, Regelmäßigkeit	Bristol-Stool-Scale:
akute / chronische Verdauungsbeschwerden	
vollwertige Ernährung	ja / nein
Lebensmittel-unverträglichkeiten, Allergien	
Nikotinkonsum akutell	ja / nein falls nein, jemals?
Auslandsreisen im letzten Jahr	
alltägliche körperliche Betätigung	
kardiale Diagnose(n)	
sonstige Diagnosen	
akutelle Medikation	

8 Danksagung

Ich möchte mich bei allen Menschen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, herzlich bedanken.

Meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. Mark Lüdde, danke ich für seine engagierte, freundliche und konstruktive Betreuung sowie die vertrauensvolle Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Norbert Frey danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, die Möglichkeit in seiner Klinik zu forschen und die Förderung meiner wissenschaftlichen Karriere.

Herrn Prof. Dr. Andre Franke und Frau Dr. Femke-Anouska Heinsen danke ich für Ihre Hilfe bei der Konzeption dieser Studie und der Auswertung der Ergebnisse.

Für seine Hilfe bei der Auswertung der 16S Sequenzierungsdaten sowie für die Einführung in diese Thematik danke ich Herrn Malte Christoph Rühlemann.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Lieb und Herrn Lukas Tittmann danke ich für die Bereitstellung der Daten aus der popgen-Biobank.

Frau Ilona Urbach und Herrn Tonio Hauptmann danke ich für Ihre Hilfe beim Erlernen der Methoden im Labor und der praktischen Umsetzung dieser. Dem weiteren Team des Instituts für Klinische Molekularbiologie, Kiel, danke ich für die Sequenzierung meiner Proben.

Frau Dr. Martina E. Spehlmann und Herrn Amer Bajrovic danke ich für Ihre Unterstützung bei der Rekrutierung und Aufklärung von Studienpatienten.

Der Deutschen Herzstiftung e.V. danke ich für die Förderung meiner Arbeit mit einem Kaltenbach-Doktorandenstipendium (K/11/15). Dem Kieler Ärzteverein e.V., der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin e.V. und dem Deutschen Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung e.V. danke ich für die finanzielle Unterstützung von Kongressreisen.

Meinen Freunden und Kommilitonen danke ich für Ihre Unterstützung und Aufmunterung während der Entstehung dieser Arbeit. Für seine Hilfe beim Korrekturlesen meines Manuskripts danke ich Herrn Timo Sabelhaus.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie, ohne deren Rat und Unterstützung weder mein Studium noch diese Arbeit möglich gewesen wäre.