

Aus der Klinik für
Dermatologie, Venerologie und Allergologie
(Direktor: Prof. Dr. T. Schwarz)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**EINFLUSS VON FUMARSÄUREESTERN AUF DAS
WACHSTUMSVERHALTEN VON BAKTERIEN
DES MENSCHLICHEN DARMES**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde einer Doktorin der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
JULIA BOTHMANN
aus Hildesheim

Kiel 2018

1. Berichtstatter: Prof. Dr. Ulrich Mrowietz

2. Berichtstatter: Prof. Dr. Alexander Arlt

Tag der mündlichen Prüfung: 22.03.2019

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 23.07.2018

gez.: Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

II Abbildungsverzeichnis	2
1. Einleitung	4
2. Material und Methoden	8
2.1 Allgemeines.....	8
2.2 Geräte	8
2.3 Materialien	8
2.4 Substanzen und Nährmedien	8
2.5 Bakterienstämme	9
2.6 Stammhaltung.....	10
2.6.1 Periodisches Überimpfen	10
2.6.2 Cryobank-Stammhaltungssystem.....	10
2.7 Übernachtkulturen	10
2.8 Keimzahlbestimmung und Wachstumskurven	10
2.9 Behandlung der Bakterien mit Fumarsäureestern	11
2.10 Statistik.....	12
3. Ergebnisse	13
3.1 Vorversuche zur Etablierung der Methode.....	13
3.1.1 Auswahl der Nährbouillon und Festlegung der Messzeiten	13
3.1.2 Reproduzierbarkeit des Wachstumsverhaltens und Ausschluss eines DMSO-Effekts	14
3.1.3 Festlegung der Testkonzentration und Übersichtsversuche mit DMF-, MMF- und GS-DMS- Effekt an vier repräsentativen Referenzstämmen	15
3.2 DMF-Untersuchungen.....	22
3.2.1 DMF-Effekt auf weitere <i>E.coli</i> -Stämme	22
3.2.3 DMF-Tests mit gramnegativen Nonfermentern	25
3.2.3 DMF-Untersuchungen im polymikrobiellen Umfeld	26
3.2.4 Konzentrationsabhängiger DMF-Effekt.....	27
4. Diskussion	28
5. Zusammenfassung	33
6. Literaturverzeichnis.....	34
7. Danksagung	38
8. Veröffentlichungen.....	39

I Abkürzungsverzeichnis

BHI	Brain Heart Infusion
DMF	Dimethylfumarat
DMSO	Dimethylsulfoxid
ESBL	Extended-Spectrum-Beta-Laktamasen
GS-DMS	Dimethyl-2-(S-Glutathionyl)-Succinat
HCA2	HCA2-Rezeptor
IL	Interleukin
IL-1RA	Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist
MEF	Monoethylfumarat
MH-2	Mueller Hinton II
MMF	Monomethylfumarat
MS	Multiple Sklerose
PASI	Psoriasis Area and Severity Index
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TSB	Tryptic Soy Broth
ZNS	Zentrales Nervensystem

II Abbildungsverzeichnis

Abb. I: Kompartimente des menschlichen Darmes mit deren physiologischen Bakteriengenera.....	7
Abb. 1: Wachstumskinetik von <i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 13311 über einen Zeitraum von acht Stunden (h). Wachstumskontrolle (growth control = GC) versus Lösungsmittelkontrolle (DMSO).....	14
Abb. 2A Wachstumskinetik von <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 28212 über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit GS-DMS.....	17
Abb. 2B Wachstumskinetik von <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 28212 über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit MMF.....	17
Abb. 2C Wachstumskinetik von <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 28212 über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit DMF.....	18
Abb. 3A: Wachstumskinetik von <i>Lactobacillus salivarius</i> ATCC 11741 über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit GS-DMS.....	18
Abb. 3B: Wachstumskinetik von <i>Lactobacillus salivarius</i> ATCC 11741 über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit MMF.....	19
Abb. 3C: Wachstumskinetik von <i>Lactobacillus salivarius</i> ATCC 11741 über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit DMF.....	19
Abb. 4A: Wachstumskinetik von <i>Streptococcus mitis</i> ATCC 49456 über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit GS-DMS.....	20
Abb. 4B: Wachstumskinetik von <i>Streptococcus mitis</i> ATCC 49456 über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit MMF.....	20
Abb. 4C: Wachstumskinetik von <i>Streptococcus mitis</i> ATCC 49456 über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit DMF.....	21
Abb. 5A: Wachstumskinetik von <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit GS-DMS.....	21
Abb. 5B: Wachstumskinetik von <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit MMF.....	22
Abb. 5C: Wachstumskinetik von <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit DMF.....	22
Abb. 6: Wachstumsverhältnisse von <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 (a), 11775 (b), 25922 (c) und RV-A1/2010 (d) über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit DMF.....	23
Abb. 7A: Wachstumsverhältnisse (DMF/DMSO) von <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 3442 (a), 3602 (b), und 13311 (c) über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit DMF.....	24
Abb. 7B: Wachstumsverhältnisse (DMF/DMSO) von <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 (a), 700603 ESBL (b) und CF1 ESBL (c). über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit DMF.....	25
Abb. 8: Wachstumsverhältnisse (DMF/DMSO) aller getesteten Enterobactericea über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit DMF.....	25

- Abb. 9:** Wachstumsverhältnisse (DMF/DMSO) von *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 , *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 und *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit DMF**26**
- Abb. 10:** Wachstumsverhältnisse (DMF/DMSO) in polymikrobiellen Umfeld von *E.coli* ATCC 25922 und *E.faecalis* ATCC 28212 über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit DMF**27**
- Abb. 11:** Wachstumsverhältnisse (DMF/DMSO) von *Salmonella Typhimuriumm* ATCC 13311 über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit DMF unter verschiedenen Testkonzentrationen**28**

1. Einleitung

Fumarsäureester werden in Deutschland seit langer Zeit erfolgreich zur Behandlung der Psoriasis angewendet. Bereits 1959 zeigte der selbst an Psoriasis erkrankte deutsche Chemiker Schwenckendiek im Selbstversuch erste Erfolge mit Fumarsäureestermixturen (Schweckendiek, 1959). Seit der offiziellen Medikamenteneinführung 1994 (Indikationserweiterung 2008) gilt Fumaderm® in Deutschland als "Goldstandard" der systemischen Behandlung der mittelschweren bis schweren Schuppenflechte, sofern eine rein äußerliche Behandlung keine klinische Besserung bringt (Meissner *et al.*, 2012). Mit LAS41008 (Skilarence®) wurde 2017 ein neues, nur Dimethylfumarat enthaltendes, Medikament zur Erstlinientherapie der mittelschweren bis schweren Psoriasis zugelassen, eine Vergleichsstudie gegenüber Fumaderm® zeigte nahezu identische Wirksamkeit und Sicherheit (Mrowietz *et al.* 2017). Fumarsäureester verfügen, bei Beachtung der in der Fachinformation und in der Leitlinie geforderten Maßnahmen zum Sicherheitsmonitoring, sowohl über eine adäquate Langzeitsicherheit (kein Malignom- oder Infektionsrisiko), sowie eine gute klinische Effektivität (Biogen GmbH, 2016; Hoefnagel *et al.*, 2003; Litjens *et al.*, 2003; Mrowietz und Ockenfels, 2011; Reich *et al.*, 2009).

Psoriasis wird heute als systemische Erkrankung angesehen, die neben charakteristischen Hautsymptomen auch mit Gelenkbeteiligung und Komorbidität einhergeht (Mrowietz *et al.*, 2012). Es handelt sich um eine erbliche Dispositionserkrankung, bei der Auto-Antigene T-Zellen im Sinne einer Abwehrreaktion aktivieren und in der Folge eine Hyperproliferation der Epidermis (Akanthose) sowie eine Entzündungsreaktion hervorrufen. Die Keratinozyten bei Psoriasis-Patienten sind gekennzeichnet durch eine irreguläre Reifung mit einem erheblich verkürzten Zellzyklus von nur etwa einer statt ca. vier Wochen. Die häufigste Form der Psoriasis ist die Psoriasis vulgaris (Christophers und Mrowietz, 2012).

Die Erkrankung ist multifaktoriell bedingt und zeigt einen chronischen und schubweisen Verlauf. Etwa 2-3% der Europäer sind davon betroffen. Auf der Haut manifestiert sich Psoriasis typischerweise durch scharf begrenzte erythemosquamöse Plaques an Prädilektionsstellen wie dem behaarten Kopf, den Streckseiten der Extremitäten oder in der Sakralregion mit variierender Herdgröße von punktförmigen bis hin zu großflächig betroffenen Arealen. Als Triggerfaktoren können Umwelteinflüsse wie Infektionen, Klima/Jahreszeit, mechanische Reizungen, psychische Faktoren, Rauchen oder die Einnahme bestimmter Medikamente (z.B. Beta-Blocker oder Interferone) fungieren. Eine Dysregulation der angeborenen Immunabwehr scheint eine entscheidende Rolle bei der Erstmanifestation sowie bei Exazerbationen zu spielen (Nickoloff, 1999).

Sowohl bakterielle Metabolite, Antigene und unbestimmte Auto-Antigene können eine Aktivierung von dendritischen Zellen und somit eine Immunantwort auslösen (Rostami-Yazdi, 2007). Tumornekrose-Faktor (TNF) α , Interferon α und γ , Interleukin (IL) 1b und IL-6 werden von angeborenen

Immunzellen sezerniert und regen myeloische dendritische Zellen an, ihre Aufgabe der Antigenpräsentation aufzunehmen sowie Mediatoren zu sezernieren (IL-12 und 23). Typ-1 und Typ-17 T-Helferzellen (Th-Zellen) wandern in die Haut ein und sezernieren mehr und mehr proinflammatorische Mediatoren wie Interleukin 17, 22 und TNF- α . Es findet eine Unterhaltung der inflammatorischen Reaktion statt, in welche verschiedene ansässige Zellen wie Keratinozyten, Endothelzellen etc. einbezogen werden. Durch die Expression von Adhäsionsmolekülen wird eine weitere T-Zell-Migration begünstigt (Nestle *et al.*, 2009).

Auch Multiple Sklerose ist, wie Psoriasis, eine inflammatorische Autoimmunerkrankung, die mit einer chronischen Demyelinisierung des Zentralen Nervensystems (ZNS) einhergeht. Beiden Autoimmunerkrankungen ist das Auftreten einer pathologischen übermäßigen Differenzierung von Th1- und Th17- Zellen gemeinsam, in deren Folge es zu einer überschießenden Ausschüttung entzündungsfördernder Zytokine wie IL-12, 17 und 23 kommt (Ghoreschi *et al.*, 2011). Im Frühjahr 2013 wurde Dimethylfumarat (Tecfidera®) daher auch zur Behandlung der Multiplen Sklerose (MS) von der amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen (2013). Die Anzahl der MS-Patienten wird auf mindestens 120.000 deutschlandweit (Hein und Hopfenmüller, 2000) und global auf etwa zwei Millionen geschätzt (Gold, 2012).

Fumaderm® besteht aus Dimethylfumarat (DMF) und 3 Salzen von Monoethylfumarat (MEF) (Biogen GmbH, 2016). Fumaderm® und Tecfidera® werden als magensaftresistente Tablette/Kapsel oral verabreicht. Erst im Dünndarm kommt es zu einem pH-abhängigen Zerfall (Rostami-Yazdi *et al.*, 2010). DMF fungiert als Prodrug und kann im systemischen Kreislauf nicht nachgewiesen werden. Bereits im Portalvenenblut ist nach oraler Gabe kein freies DMF mehr zu finden (Dibbert *et al.* 2013). Im Dünndarm findet eine rasche Hydrolyse des freigesetzten DMF zu seinem bioaktiven Metaboliten Monomethylfumarat (MMF) statt. Im alkalischen Milieu des späten *Duodenum* und *Jejunum* erfolgt neben einer raschen basischen Hydrolyse bei einem spezifischen pH-Wert von acht zeitgleich auch eine Hydrolyse durch ortsständige Esterasen im Lumen und der Darmmukosa (Litjens *et al.*, 2004). Zudem reagiert *in vitro* ein weiterer Teil der α , β - ungesättigten Carbonsäure DMF binnen kürzester Zeit mit dem ubiquitär vorkommenden Antioxidanz Glutathion im Rahmen einer sogenannten Michael-Addition. Es kommt zu einer spontanen Bindung dieser Reaktionspartner unter Bildung eines stabilen Addukts – dem GS-DMS Dimethyl-2-(S-Glutathionyl)-Succinat (GS-DMS) (Schmidt *et al.*, 2007). DMF ist durch die oben genannte Reaktion und durch den Abbau durch Esterasen außerhalb des Lumens bzw. der luminalen Mukosa nicht mehr nachweisbar (Dibbert *et al.*, 2013).

MMF ist ein bekannter Agonist eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors, dem Hydroxy-Carbonsäure-Rezeptor 2 (HCA2-Rezeptor), der beispielsweise auf neutrophilen Granulozyten vorkommt. In einem Tiermodell zur Simulation von MS an Labortieren (Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis) wurde gezeigt, dass nach DMF-Behandlung weniger neutrophile Granulozyten in das ZNS

einwanderten. Migration, Adhäsion und Rekrutierung der Entzündungszellen wurden durch die Behandlung der Versuchsmäuse mit DMF herabgesetzt (Chen *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2008). Diese Effekte waren von der Expression des HCA2-Rezeptors abhängig. Gentechnisch veränderte Mäuse, bei denen dieser Rezeptor nicht mehr exprimiert wurde („HCA2 knock-out Mäuse“), zeigten keine Reaktion mehr auf eine DMF-Behandlung (Chen *et al.*, 2014).

Was bleibt ist ein erheblicher Mangel an Wissen über die genauen Mechanismen, die sich auf molekularer Ebene abspielen. Wie diese zueinander in Beziehung stehenden, individuellen DMF-Metaboliten MMF und GS-DMS ihren Beitrag zur pharmakologischen und klinischen Wirksamkeit liefern, ist unbekannt. Durch den DMF-Metabolismus ist es bisher unmöglich die genauen Zielgewebe und deren lokale Gewebeexposition gegenüber den Wirkstoffen zu definieren. Es ist davon auszugehen, dass aufgrund der geringen Halbwertszeit von wenigen Minuten (Rostami-Yazdi, 2007) nur eine kleine Zellpopulation dem direkten und unmetabolisierten DMF ausgesetzt ist. Daraus ergibt sich, dass der therapeutische Effekt von seinem Hauptstoffwechselprodukt MMF verursacht wird (Gillard *et al.*, 2015). Wenn DMF als eigenständiger Metabolit eine Rolle spielt, dann aufgrund des Metabolismus lediglich im Lumen oder der luminalen Mukosa des Dünndarms (spätes *Duodenum*, *Jejunum*).

Neben positiven klinischen Effekten, die unter Therapie der Psoriasis, aber auch der schubförmig remittierenden MS zu beobachten sind, können Fumarsäureester neben Flush-Symptomen (anfallsartige Rötungen der Haut), Leukozytopenie, Lymphozytopenie und Eosinophilie auch diverse gastrointestinale Nebenwirkungen wie Diarrhoe, Blähungen, Oberbauchkrämpfe oder Übelkeit auslösen (Biogen GmbH, 2016; Mrowietz und Ockenfels, 2011). Bei der Behandlung kommt es bei bis zu 60% der Patienten zu Magen-Darm-Beschwerden und ca. 20% der Patienten müssen die Therapie mit Fumarsäureestern aufgrund dieser Beschwerden frühzeitig abbrechen (Mrowietz, 2017, Kiel, persönliche Mitteilung). Die Ursachen gastrointestinaler Nebenwirkungen sind ungeklärt. Zwar wurde die Pharmakokinetik in den letzten Jahren verstärkt untersucht, dennoch fehlen Informationen darüber, welche Effekte der Fumarsäureester auf das mit der Mukosa assoziierte bakterielle Kompartiment haben. Es stellt sich die Frage, ob eine Ursache intestinaler Dysbalancen möglicherweise in einer Modulation der kommensalen Mikroflora liegen könnte.

In der wissenschaftlichen Literatur gibt es Hinweise darauf, dass DMF zum Beispiel das Wachstumsverhalten von *E. coli* beeinflusst. Untersuchungen ergaben, dass DMF neben sechs anderen getesteten Wirkstoffen den stärksten antibakteriellen Effekt gegenüber diesem Bakterium aufwies und das *E. coli*-Wachstum nahezu pH-unabhängig hemmte (Wang *et al.*, 2001).

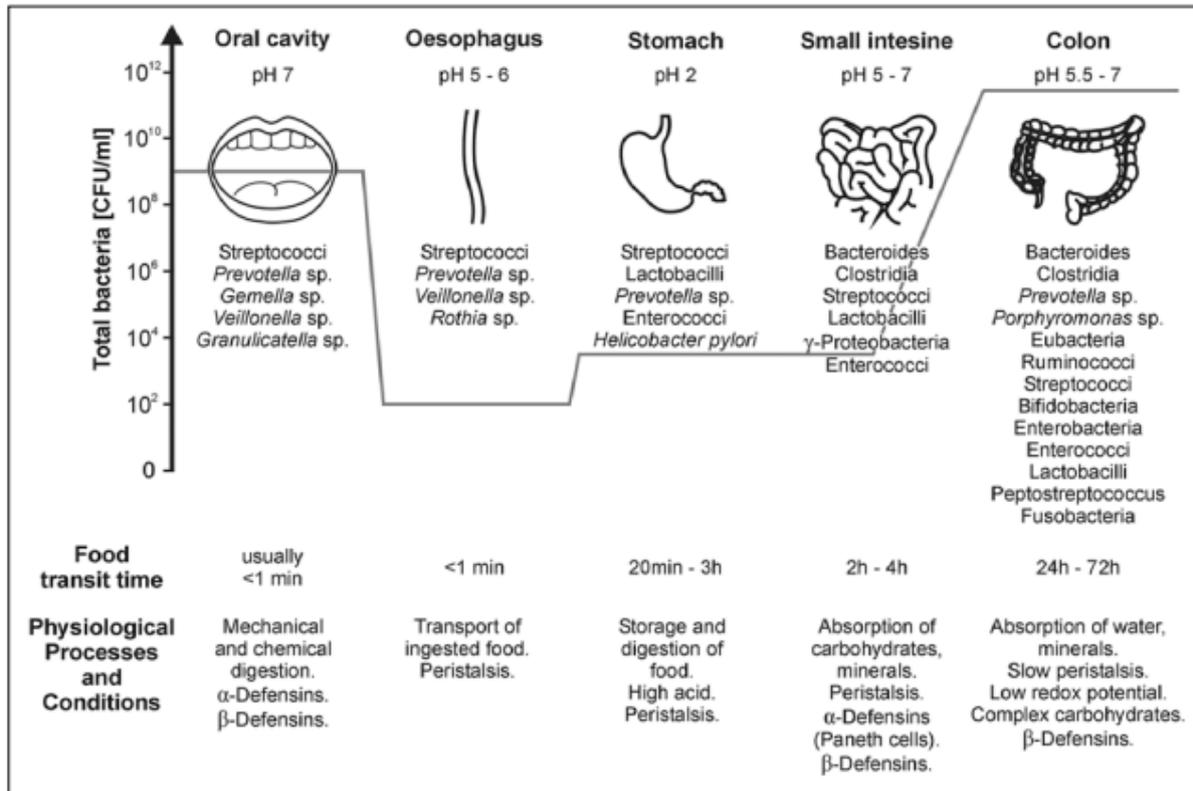


Abbildung I: Kompartimente des menschlichen Darmes mit deren physiologischen Bakteriengenera Anzahl der Bakterien in koloniebildenden Einheiten pro Milliliter (CFU = colony forming unitis/ml) und pH-Werte in den verschiedenen Kompartimenten des menschlichen Darmes sowie Passagezeiten der Nahrung und Aufgaben der jeweiligen Darmabschnitte (Manson *et al.*, 2008).

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde anhand von aeroben Referenzstämmen des menschlichen Darmes untersucht, ob DMF, dessen aktiver Metabolit MMF oder das Glutathionaddukt GS-DMS für den jeweiligen Abschnitt typische Keime des oberen und unteren Intestinaltraktes im Wachstumsverhalten beeinflussen können. Verglichen wurde das Bakteriumwachstum unter Fumarsäureesterinfluss mit dem Wachstum unter Zusatz des Lösungsmittels DMSO sowie im physiologischen Medium. Darüber hinaus wurde untersucht, ob sich antibakterielle Effekte der Fumarsäureester auch an pathologischen Keimen oder problematischen multiresistenten Extended-Spectrum-Beta-Laktamasen-produzierenden (ESBL) – Stämmen verifizieren lassen und somit neue Therapieoption gegenüber diesen darstellen könnten.

2. Material und Methoden

2.1 Allgemeines

Zur Beantwortung der Fragestellung wurden zunächst vier aerobe/fakultativ anaerobe Bakterienspezies ausgewählt, die physiologischer Weise im Mikrobiom des humanen Verdauungstraktes, vornehmlich dem Dünndarm, vorkommen (*Streptococcus mitis*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus salivarius* und *Escherichia coli*). An ihnen erfolgten exemplarisch Vorversuche zur Nährmedienauswahl und daraufhin Rasteruntersuchungen mit den verschiedenen Fumarsäureestern DMF, MMF und GS-DMS. Wurde eine Hemmung durch eine der Substanzen bei einer bestimmten Bakterienart festgestellt, so folgten zusätzliche Tests mit weiteren Stämmen dieser Spezies um zu untersuchen, ob die Wirkung nur stamm- oder speziesbezogen auftrat. Die Versuche wurden dabei jeweils mindestens sechsmal wiederholt (zur Versuchsreproduzierbarkeit an exemplarischen Stämmen bis zu zwölfmal). Zur Kultivierung und Versuchsdurchführung nach Standardbedingungen wurden die nachfolgend genannten Geräte und Materialien verwendet.

2.2 Geräte

- Rüttler, Heidolph Reax 2000
- CO₂ - Brutschrank, Heraeus
- Kühlschrank, Liebherr
- Brutschrank, Heraeus; Typ B6760, 37°C
- Tiefkühltruhe, GFL, - 80 °C

2.3 Materialien

- Eppendorfpipetten und zugehörige Spitzen
- Reagenzgläser, 10 ml
- Blutplatten, Columbia Agar, Oxoid
- Verdünnungsblöcke aus Plastik
- 96-well-Mikrotiterplatten, U-Boden, Nunc
- Sterile Plastikröhrchen mit Schraubverschluss, 12 ml
- Eppendorf-Röhrchen, 1,6 ml
- Quality Pipette Tips, Sarstedt
- Drigalskispatel, Glas
- Cryobank, Mast Diagnostica

2.4 Substanzen und Nährmedien

- Aqua dest.
- BHI-Bouillon, Fertignährmedium, Bacto Brain Heart Infusion, Becton-Dickinson
- TSB-Bouillon, Fertignährmedium, Tryptic Soy Broth, Fluka, Sigma-Aldrich

- MH Nr. 2-Bouillon, Fertignährmedium, BBLTM Mueller Hinton II
- Lurea- Bouillon
- Physiologisches NaCl 0,85%
- Dimethylsulfoxid, Roth
- Dimethylfumarat, Sigma
- Monomethylfumarat, Sigma
- GS-DMS, ChiroBloc GmbH, Wolfen

2.5 Bakterienstämme

Für die Untersuchungen wurden insgesamt 18 Stämme verschiedener Spezies getestet, die allesamt der Sammlung des Instituts der Infektionsmedizin des UKSH Campus Kiel entstammten.

Grampositive Stäbchen

Staphylococcus epidermidis ATCC 14990
Streptococcus mitis ATCC 49456
Enterococcus faecalis ATCC 28212
Lactobacillus salivarius ATCC 11741

Gramnegative Stäbchen

Enterobacteriaceae

Escherichia coli ATCC 25922
Escherichia coli ATCC 35218
Escherichia coli ATCC 11775
Escherichia coli A1/2010 RV
Klebsiella pneumoniae ATCC 13883
Klebsiella pneumoniae ATCC 700603 ESBL
Klebsiella pneumoniae CF1 ESBL
Salmonella Typhimurium ATCC 13311
Salmonella Typhimurium ATCC 3442
Salmonella Typhimurium ATCC 3630
Proteus mirabilis ATCC 2100

Nonfermenter

Burkholderia cepacia ATCC 25416
Pseudomonas aeruginosa ATCC 10145
Acinetobacter baumannii ATCC 19606

2.6 Stammhaltung

Für die Bakterienstammhaltung wurden zwei verschiedene Methoden angewandt:

- kurz- und mittelfristige Aufbewahrung: periodisches Überimpfen.
- längerfristige Lagerung: Cryobank-Stammhaltungssystem bei - 80 °C.

2.6.1 Periodisches Überimpfen

Bei dieser Art der Stammhaltung wurden die benötigten Kulturen wöchentlich auf Blutagar-Platten überimpft. Durch den geringen apparativen Aufwand und die Möglichkeit, die benötigten Bakterienkulturen schnell zu reaktivieren, war diese Methode für das Anlegen von Arbeitskulturen gut geeignet. Damit sich Stammeigenschaften nicht veränderten, wurde ein Stamm nicht mehr als zehnmal überimpft.

2.6.2 Cryobank-Stammhaltungssystem

Beim Cryobankssystem handelt es sich um ein Stammhaltungssystem zur Langzeitlagerung von Mikroorganismen. An chemisch behandelte Glasperlen mit zentraler Bohrung haften die Bakterienkulturen an. Eine Lagerung findet bei - 80 °C statt. Zur Rekultivierung eines Stammes wurde ein Kügelchen jeweils aufgetaut, auf einer Blutagar-Platte ausgerollt und anschließend den Wachstumsbedingungen entsprechend bebrütet.

2.7 Übernachtkulturen

Glasröhrchen mit jeweils 10 ml Bouillon wurden mit einigen Bakterienkolonien von der Blutplatte beimpft. Die Kulturen wurden anschließend für eine Minute auf dem Rüttler gemischt und über Nacht im CO₂-Brutschrank bei 36 ± 1°C als Standkultur inkubiert. Die Übernachtkultur diente als Vorkultur für den Versuchsansatz.

2.8 Keimzahlbestimmung und Wachstumskurven

Streptococcus mitis ATCC 49456, *Enterococcus faecalis* ATCC 28212, *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741 und *Escherichia coli* ATCC 25922 wurden als für die Dünndarmbesiedlung repräsentative aerobe/fakultativ anaerobe Bakterientaxa für die Aktivitätsbestimmungen der getesteten Substanzen verwendet.

Die Rahmenbedingungen für die späteren Fumarat-Substanztestungen wurden in Vorversuchen ermittelt. Zunächst wurde ein Nährmedium gesucht, in dem alle Teststämme ein möglichst gleich gutes Wachstum aufwiesen. Getestet wurden TSB-, Lurea-, MH-II- und BHI-Bouillon.

Durch die Bestimmung der Wachstumskurven mittels photometrischer Messung, sowie auch Lebendzellzahlauszählung konnte das Verhalten der Teststämme in den unterschiedlichen Nährmedien verglichen werden.

Für das Inokulum wurden 10 ml Bouillon mit ein bis zwei Kolonien der Bakterienkultur von der Blutagarplatte beimpft und über Nacht bebrütet.

Jeweils 10 ml Bouillon wurden mit der Vorkultur inokuliert und bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ als Standkultur bebrütet. Da *E. coli* und *E. faecalis* ein stärkeres Wachstum aufwiesen als *L. salivarius* und *S. mitis*, wurden von den beiden ersten beiden Bakterienstämmen jeweils 10 μl und bei den beiden anderen Stämmen jeweils 100 μl überimpft, um eine gleiche Ausgangskeimzahl des Testansatzes einzustellen.

Die Entwicklung der Lebendzellzahl wurde zunächst anhand der Teststämme über eine Zeitspanne von 24 Stunden verfolgt, um zu bestimmen, wann die stationäre Phase des bakteriellen Wachstums erreicht wurde. Dazu wurden den Testansätzen nach sorgfältiger Durchmischung zu den Zeitpunkten $t = 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24$ Stunden jeweils 100 μl entnommen. Mit Hilfe von Verdünnungsblöcken erfolgte anschließend eine Verdünnung in einer dezimalen Reihe in 0,85%-iger Natriumchloridlösung.

Hierzu wurden jeweils 100 μl entnommen und auf Blutagar-Platten pipettiert. Mit einem sterilen Drigalskispatel wurde die Bakteriensuspension so lange verspatelt, bis die Platte trocken war.

Nach Bebrütung der Blutagar-Platten über einen Zeitraum von 18-24 Stunden bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$, wurden die gewachsenen Bakterienkolonien gezählt und auf Zellen/ml Ausgangsuspension berechnet.

Die ermittelten Werte wurden in Zellzahl-Zeit-Diagrammen dargestellt.

2.9 Behandlung der Bakterien mit Fumarsäureestern

Um zu beurteilen wie sich das Wachstumsverhalten der oben genannten, für die Darmbesiedlung repräsentativen Bakterienstämme unter Fumarsäureester-Einfluss verhielt, wurden anschließend die Substanzen DMF, MMF und GS-DMS getestet. Wie in den oben genannten Versuchen zur Keimzahlbestimmung wurden auch hier Keimzahl-Zeit-Diagramme erstellt.

In einem Versuch wurden aus einer Bakterienkultur jeweils drei verschiedene Ansätze bestückt:

- 1) eine reine Wachstumskontrolle des Bakteriums ohne jegliche Zusätze
- 2) ein Ansatz dem nur das Fumarsäureester-Lösungsmittel DMSO zugesetzt war
- 3) ein Ansatz mit jeweils einer der drei Testsubstanzen

Da die Substanzen DMF, MMF und GS-DMS in DMSO gelöst waren, sollte mit der DMSO-Kontrolle ausgeschlossen werden, dass das Lösungsmittel selbst einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Bakterienstämme hatte.

Die für den Test benötigten Bakterienansätze wurden wie in Abschnitt 2.9 beschrieben inokuliert. Am Testtag wurden Mikrotiterplatten für die Zeitpunkte $t = 0, 2, 4, 6, 8$ Stunden bestückt.

Die jeweilige Testsubstanz sowie das Lösungsmittel DMSO wurden 1:10 verdünnt und eine definierte Anzahl an Testkavitäten wurde jeweils für jeden der Messpunkte mit 10 μl der verdünnten Substanz

(DMF, MMF, GS-DMS), dem verdünnten DMSO und der reinen Boullion befüllt. Anschließend wurden 100 µl der als Standkultur angesetzten Bakterienkultur zugegeben.

Zu den Messzeitpunkten wurden dann jeweils 100 µl aus den drei unterschiedlichen Ansätzen entnommen, in Zehner-Schritten mit Hilfe des Verdünnungsblocks verdünnt und anschließend auf einer Blutplatte ausplattiert. Nach Bebrütung der Blutagar-Platten über 18-24 Stunden bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$, wurden die Lebendkeimzahlen bestimmt.

2.10 Statistik

Zur statistischen Analyse wurden die Lebendkeimzahlen aus 6-12 Versuchswiederholungen eines jeden Experiments log 10-transformiert. Dies diente zur Normalisierung, Varianzstabilisierung und besseren Darstellung der schnell wachsenden Bakterienanzahlen. Zu jedem Zeitpunkt wurden Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle in Tabellen und Grafiken dargestellt. Zur Vergleichbarkeit der Substanzkurven wurden Verhältnisse gebildet (jeweilige Testsubstanz/Lösungsmittel DMSO), um natürliche Wachstumseffekte heraus zu rechnen.

Falls nicht gesondert angegeben, wurden alle statistischen Analysen in R (R Core Team 2016) durchgeführt (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>).

3. Ergebnisse

3.1 Vorversuche zur Etablierung der Methode

Die Rahmenbedingungen für die späteren Fumarat-Substanztestungen wurden in Vorversuchen ermittelt: Anhand von vier aeroben/fakultativ anaeroben Bakterienspezies, die physiologischer Weise im Mikrobiom des humanen Verdauungstraktes (vornehmlich im Dünndarm) vorkommen, erfolgten Vorversuche zur Auswahl eines für alle Testisolate geeigneten Nährmediums. In anschließenden Rasteruntersuchungen mit den drei verschiedenen Fumarsäureestern DMF, MMF und GS-DMS und deren Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO), sollte herausgefunden werden, welche der Substanzen einen Einfluss auf das bakterielle Wachstum aufwies. Wurde eine Hemmung durch eine der Substanzen bei einer bestimmten Bakterienart festgestellt, folgten zusätzliche Tests mit weiteren Stämmen dieser Spezies, um zu klären, ob die beobachtete Wirkung nur stamm- oder auch speziesspezifisch auftrat.

3.1.1 Auswahl der Nährbouillon und Festlegung der Messzeiten

Anhand verschiedener Referenzstämmen für grampositive und gramnegative Kokken und Stäbchen wurden Unterschiede des bakteriellen Wachstumsverhaltens in vier unterschiedlichen Bouillons (Lurea, MH-2, TSB und BHI) ermittelt. Durch Bestimmung der Wachstumskurven mittels photometrischer Messung und paralleler Lebendzellzahlauszählung konnte das Verhalten der Teststämmen in den unterschiedlichen Nährmedien verglichen werden.

Es zeigte sich, dass in der Lurea-Bouillon das beste und gleichmäßigste Wachstumsverhalten aller Teststämmen erzielt wurde. Die bakterielle Populationsökonomie wird in verschiedenen Phasen beschrieben, auf deren Grundlage die Festlegung der Messzeitpunkte bestimmt wurde. Die Messzeitpunkte wurden anhand der Vorversuche bis in die späte Phase des exponentiellen bakteriellen Wachstums (Log-Phase, 0-8 Stunden) gelegt. Die Anlaufphase (Lag-Phase) war in Vorversuchen mit der Lurea-Bouillon etwa zwei Stunden lang, während die Phase des exponentiellen Wachstums (Log-Phase) sich über weitere sechs Stunden der Lag-Phase anschloss. Nach achtstündiger Wachstumsdauer folgte schließlich eine Phase des stationären Wachstums. Daraus ergaben sich für die Hauptversuche folgende Messzeitpunkte (Stunden nach Inokulation): t_{0h} , t_{2h} , t_{4h} , t_{6h} und t_{8h} .

3.1.2 Reproduzierbarkeit des Wachstumsverhaltens und Ausschluss eines DMSO-Effekts

Salmonella Typhimurium ATCC 13311 diente als Kontrolle der Reproduzierbarkeit der Bestimmung des Wachstumsverhaltens und wurde in regelmäßigen Einzelversuchen mitgeführt (n=18). Es zeigte sich ein kontinuierliches Bakterienwachstum, sowie eine gute Reproduzierbarkeit der Messergebnisse. DMSO wurde in den Versuchsreihen immer mitgeführt und die Wachstumskinetiken zwischen Wachstumskontrolle und Lösungsmittelkontrolle somit verglichen. Abbildung 1 zeigt die Streuung der einzelnen Versuche. Da sich die Konfidenzintervalle überlappen, ist davon auszugehen, dass DMSO als Lösungsmittel keinen signifikanten wachstumshemmenden Einfluss auf das bakterielle Wachstumsverhalten über die Messzeit zeigte.

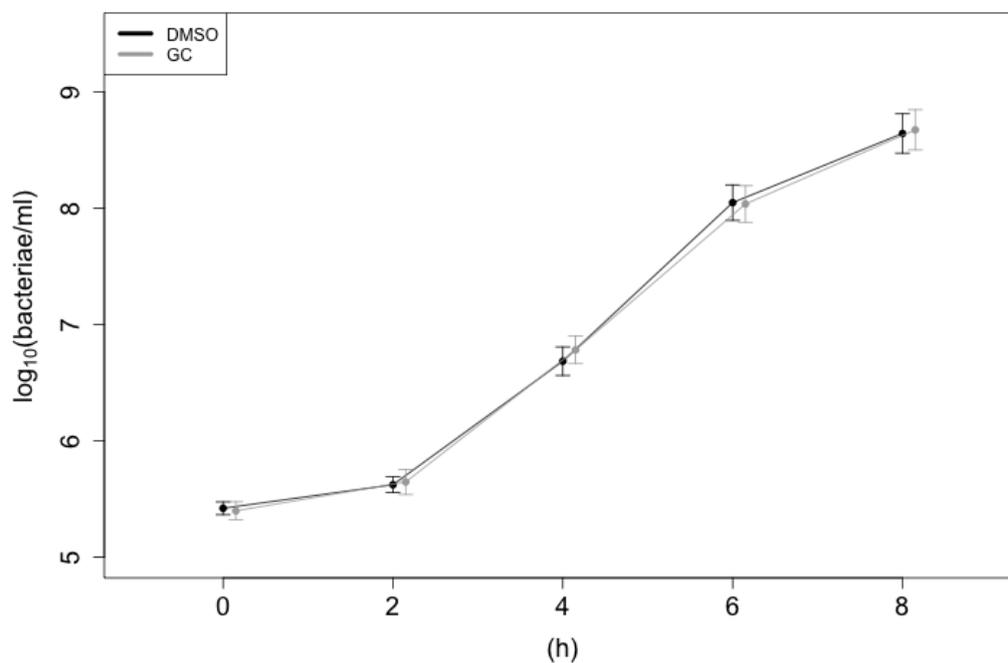


Abb. 1: Wachstumskinetik von *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311 über einen Zeitraum von acht Stunden (h). Wachstumskontrolle (growth control = GC) versus Lösungsmittelkontrolle (DMSO), n=18, Mittelwert und 95%-Konfidenzintervalle der log₁₀-transformierten Daten

3.1.3 Festlegung der Testkonzentration und Übersichtsversuche mit DMF-, MMF- und GS-DMS-Effekt an vier repräsentativen Referenzstämmen

Anhand von Übersichtstests mit den Fumarsäureestern DMF, MMF und dem GS-DMS wurde anhand der ausgewählten Referenzstämmen für grampositive und gramnegative Stäbchen und Kokken (*Streptococcus mitis* ATCC 49456, *Enterococcus faecalis* ATCC 28212, *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741 und *Escherichia coli* ATCC 25922) untersucht, welchen Einfluss die Substanzen auf das Wachstumsverhalten der Bakterien hatten. Es wurden Testkonzentrationen von 1:1000 (entspricht 100 μM im Testansatz) bis 1:100 (entspricht 1 mM im Testansatz) getestet. Bei höheren Konzentrationen von 1:10 war eine Testung nicht mehr möglich, da die Lösungsmittelkonzentration von DMSO in den toxischen Bereich geriet und sich hemmend auf das Bakterienwachstum auswirkte. Da sich bei einer Konzentration von 1:1000 keine wachstumshemmenden Effekte der Testsubstanzen zeigte, wurde die Testkonzentration auf 1:100 (entspricht 1 mM) erhöht. Es zeigte sich, dass MMF und GS-DMS keinerlei Beeinflussung des bakteriellen Wachstums bewirkten (siehe Abb. 2-4) – hier sind die 95%-Konfidenzintervalle der einzelnen Kurven vergleichbar. DMF, nicht jedoch MMF und GS-DMS (siehe Abb. 5), zeigte dagegen einen deutlichen wachstumshemmenden Effekt bei *Escherichia coli* ATCC 25922. In diesem Fall überlappen sich die 95%-Konfidenzintervalle der Substanzkurve weder mit den Kontrollkurven mit Lösungsmittel (DMSO), noch mit der Kurve der Wachstumskontrolle. Es kann daher von einer Signifikanz dieser Ergebnisse ausgegangen werden. Eine Inhibierung der Bakterienanzahl unter Einfluss von DMF war bei *E. coli* ab t_{2h} über die gesamte Messzeit erkennbar. Die Konfidenzintervalle der DMF-Kurve und der Kontrollkurven überlappten sich bereits nach zwei Stunden nicht mehr. Nach vier Stunden zeigte sich der stärkste DMF-Effekt mit einer Hemmung von über einer Log-Stufe im Vergleich zur Wachstumskontrolle. Auch bei t_{6h} blieb noch ein deutlicher Effekt erkennbar, die Hemmung zeigte jedoch eine abnehmende Tendenz. Nach acht Stunden näherte sich das Wachstum unter DMF wieder erkennbar der Wachstumskontrolle an. Da das Wachstum über die Zeit verlangsamt, aber nicht aufgehalten wurde und sich mit zunehmender Zeit wieder dem Niveau der Wachstumskontrolle anpasste, konnte hier von einem bakteriostatischen Effekt ausgegangen werden. Die grampositiven Referenzstämmen wurden nicht in ihrem Wachstum beeinflusst. Im späteren Verlauf wurde auch ein DMF-Test bei *Staphylococcus epidermidis* (physiologische Haut- und Schleimhautflora) durchgeführt. Wie bei den anderen getesteten grampositiven Stämmen ergab sich jedoch auch hier kein wachstumshemmender Effekt (Daten nicht abgebildet). In darauffolgende Untersuchungen wurden daher nur noch gramnegative Spezies mit einbezogen.

Da außer DMF weder MMF noch GS-DMS einen Effekt auf das bakteriellen Wachstums der Referenzstämmen zeigten, wurden weitere Untersuchungen lediglich mit DMF durchgeführt

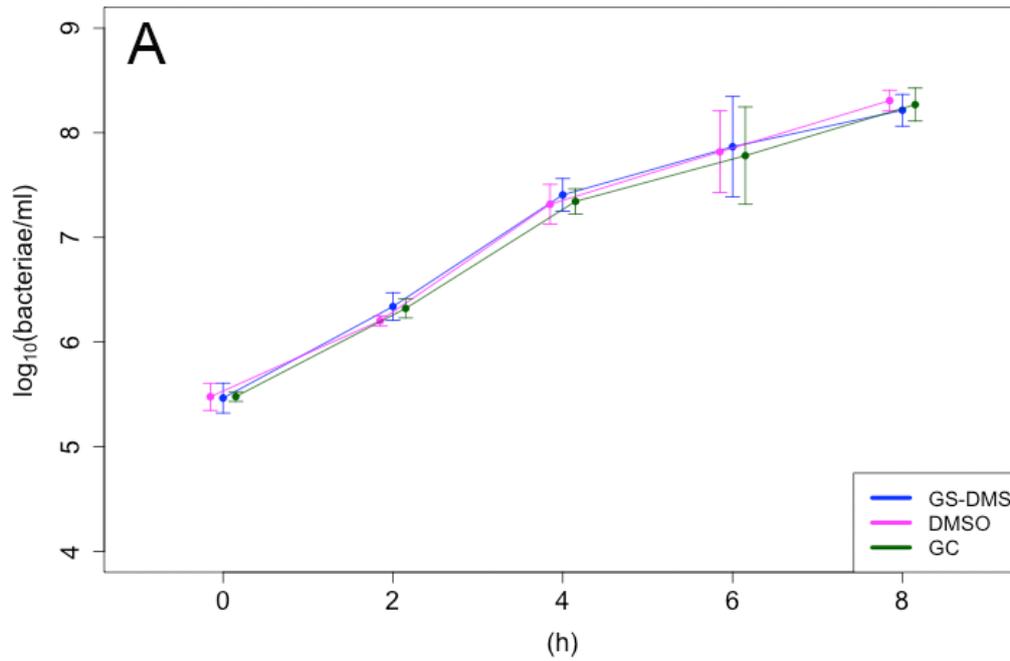


Abb. 2A: Wachstumskinetik von *Enterococcus faecalis* ATCC 28212 über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit GS-DMS. Wachstumskontrolle (growth control = GC) versus Lösungsmittelkontrolle (DMSO), (n=6, Mittelwert und 95%-Konfidenzintervalle der \log_{10} -transformierten Daten)

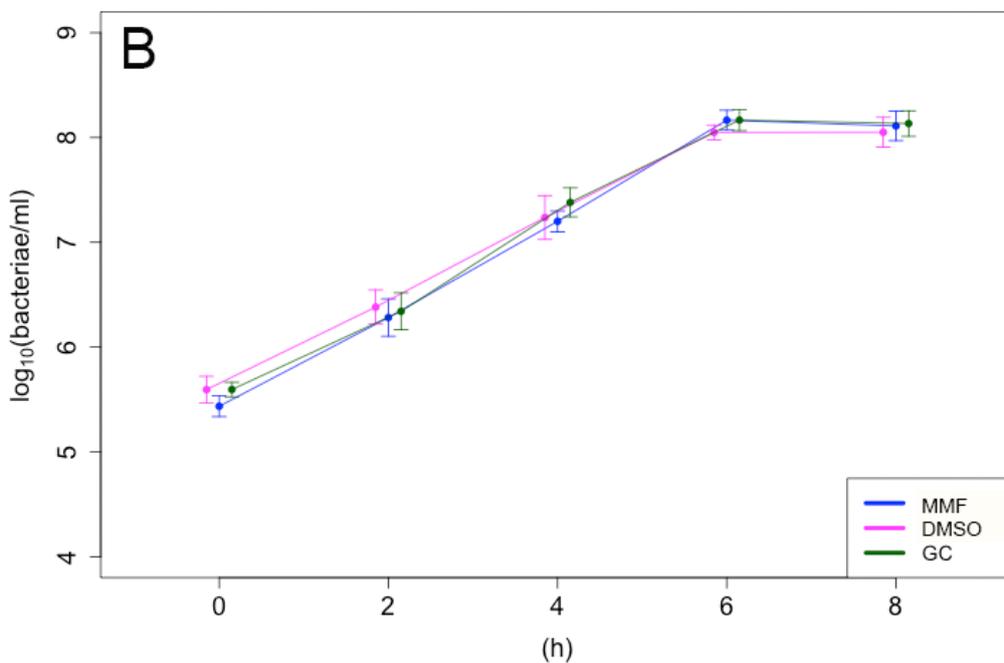


Abb. 2B: Wachstumskinetik von *Enterococcus faecalis* ATCC 28212 über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit MMF. Wachstumskontrolle (growth control = GC) versus Lösungsmittelkontrolle (DMSO), (n=6, Mittelwert und 95%-Konfidenzintervalle der \log_{10} -transformierten Daten)

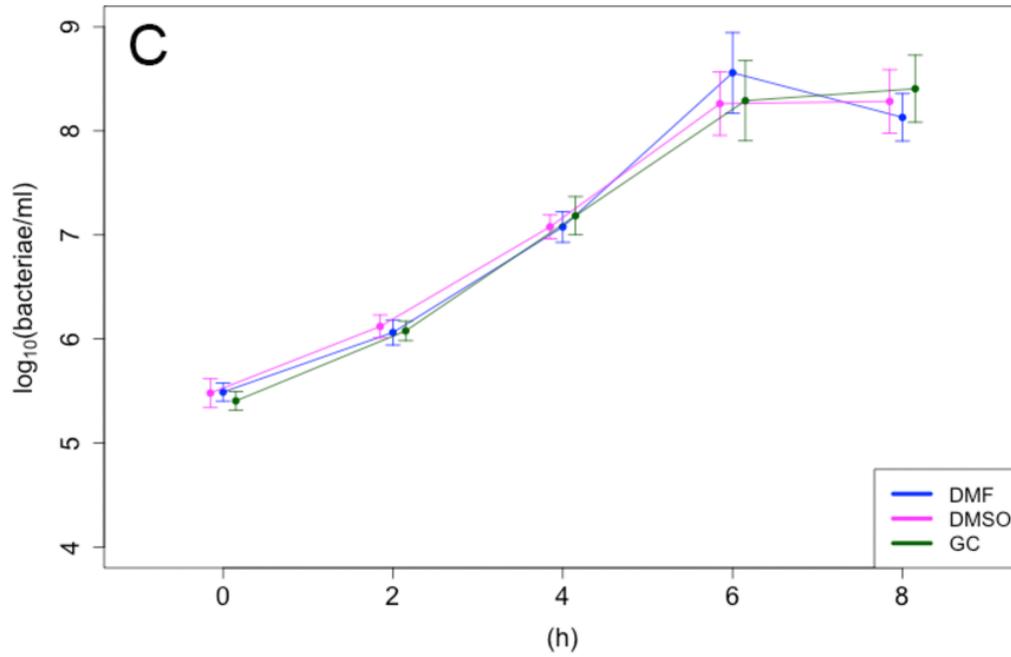


Abb. 2C: Wachstumskinetik von *Enterococcus faecalis* ATCC 28212 über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit DMF. Wachstumskontrolle (growth control = GC) versus Lösungsmittelkontrolle (DMSO), (n=6, Mittelwert und 95%-Konfidenzintervalle der log₁₀-transformierten Daten)

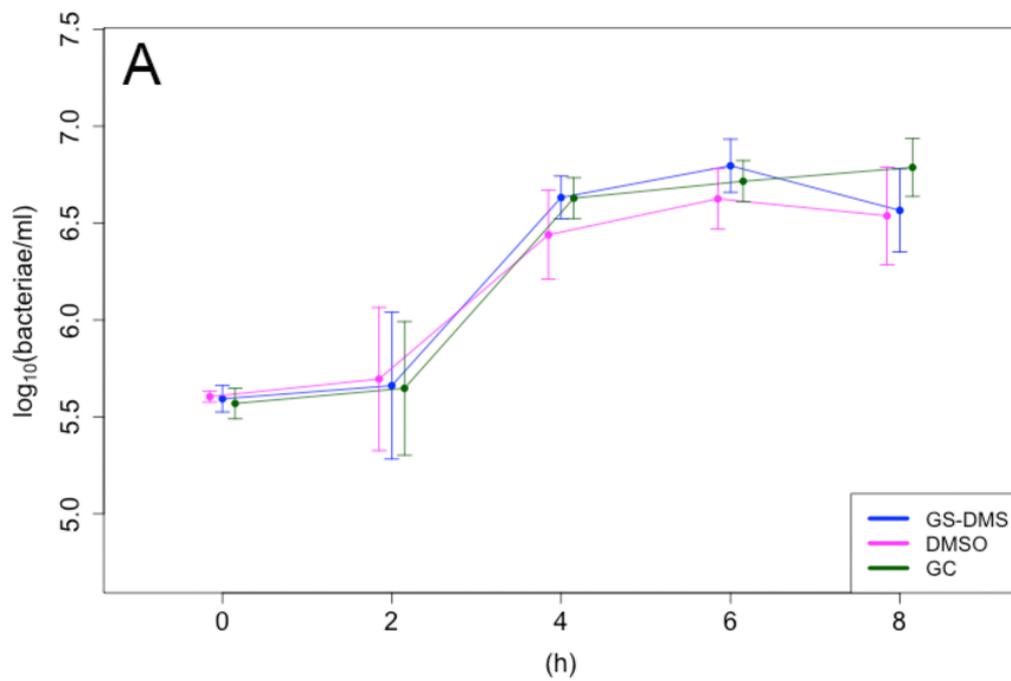


Abb. 3A: Wachstumskinetik von *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741 über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit GS-DMS. Wachstumskontrolle (growth control = GC) versus Lösungsmittelkontrolle (DMSO), (n=6, Mittelwert und 95%-Konfidenzintervalle der log₁₀-transformierten Daten)

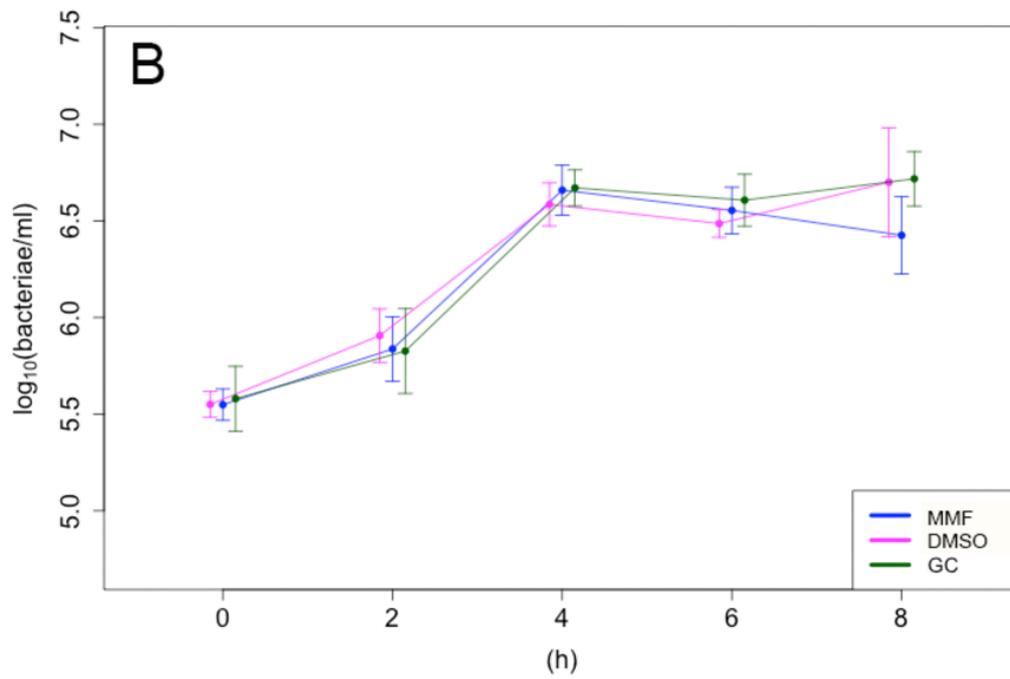


Abb. 3B: Wachstumskinetik von *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741 über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit MMF. Wachstumskontrolle (growth control = GC) versus Lösungsmittelkontrolle (DMSO), (n=6, Mittelwert und 95%-Konfidenzintervalle der log₁₀-transformierten Daten)

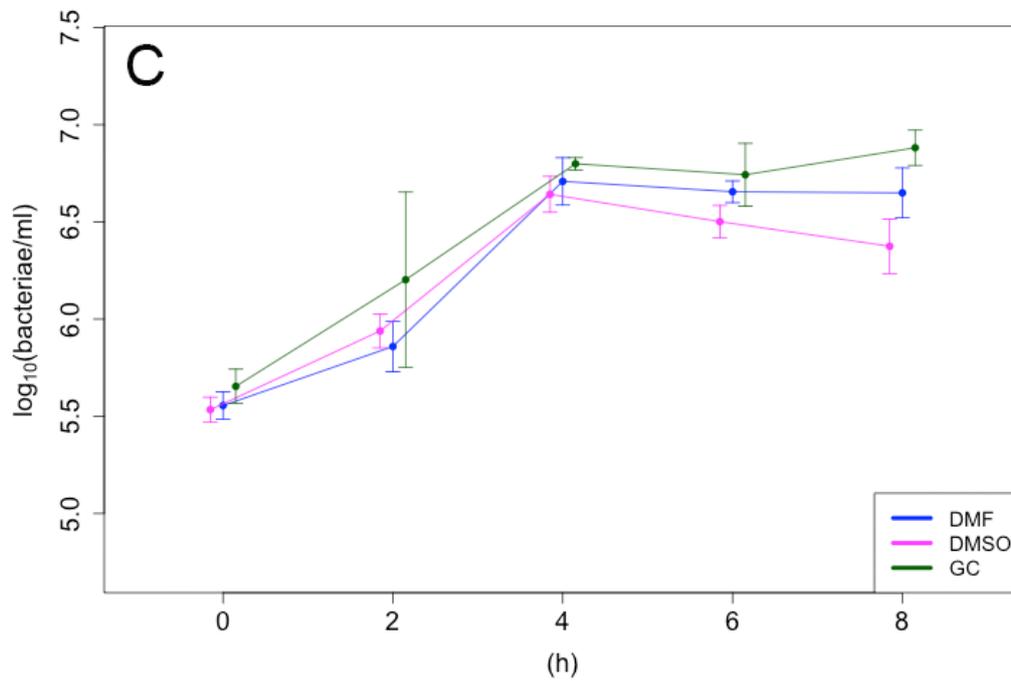


Abb. 3C: Wachstumskinetik von *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741 über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit DMF. Wachstumskontrolle (growth control = GC) versus Lösungsmittelkontrolle (DMSO), (n=6, Mittelwert und 95%-Konfidenzintervalle der log₁₀-transformierten Daten)

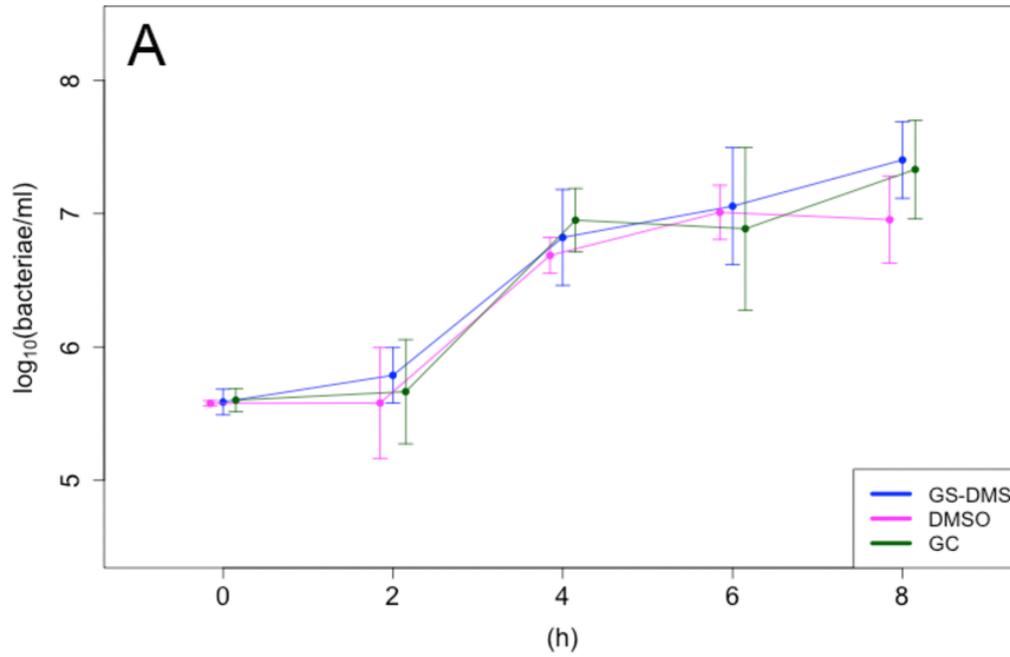


Abb. 4A: Wachstumskinetik von *Streptococcus mitis* ATCC 49456 über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit GS-DMS. Wachstumskontrolle (growth control = GC) versus Lösungsmittelkontrolle (DMSO), (n=6, Mittelwert und 95%-Konfidenzintervalle der log₁₀-transformierten Daten)

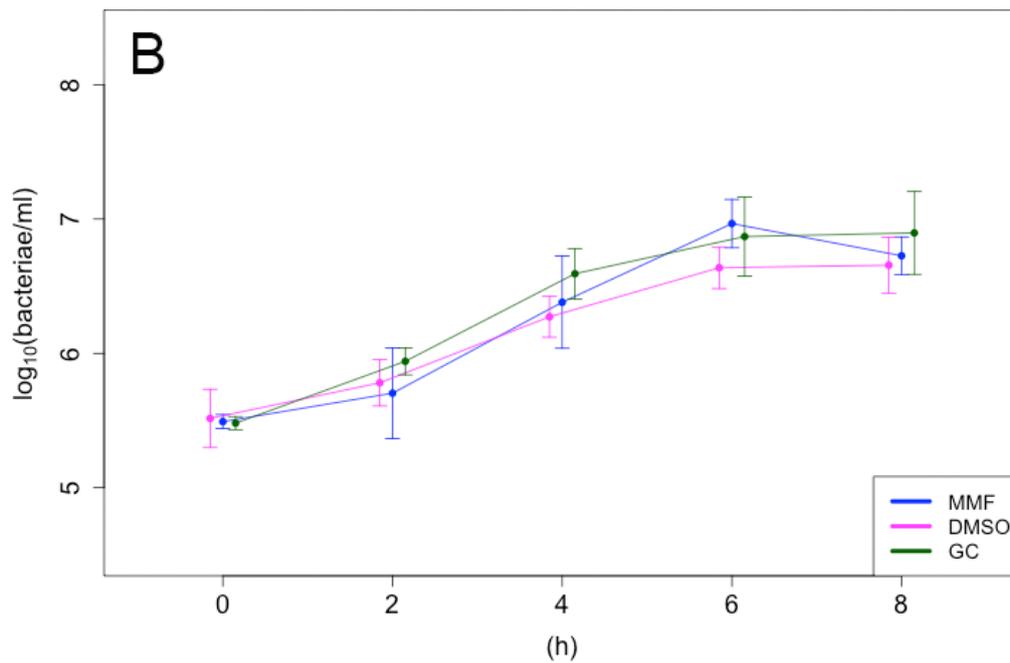


Abb. 4B: Wachstumskinetik von *Streptococcus mitis* ATCC 49456 über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit MMF. Wachstumskontrolle (growth control = GC) versus Lösungsmittelkontrolle (DMSO), (n=6, Mittelwert und 95%-Konfidenzintervalle der log₁₀-transformierten Daten)

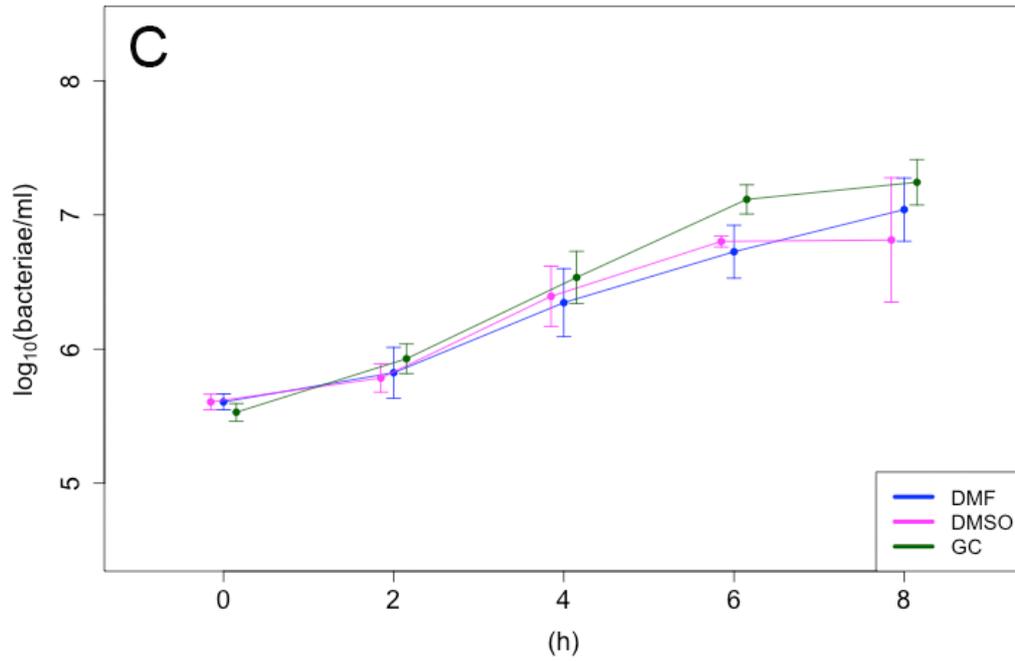


Abb. 4C: Wachstumskinetik von *Streptococcus mitis* ATCC 49456 über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit DMF. Wachstumskontrolle (growth control = GC) versus Lösungsmittelkontrolle (DMSO), (n=6, Mittelwert und 95%-Konfidenzintervalle der \log_{10} -transformierten Daten)

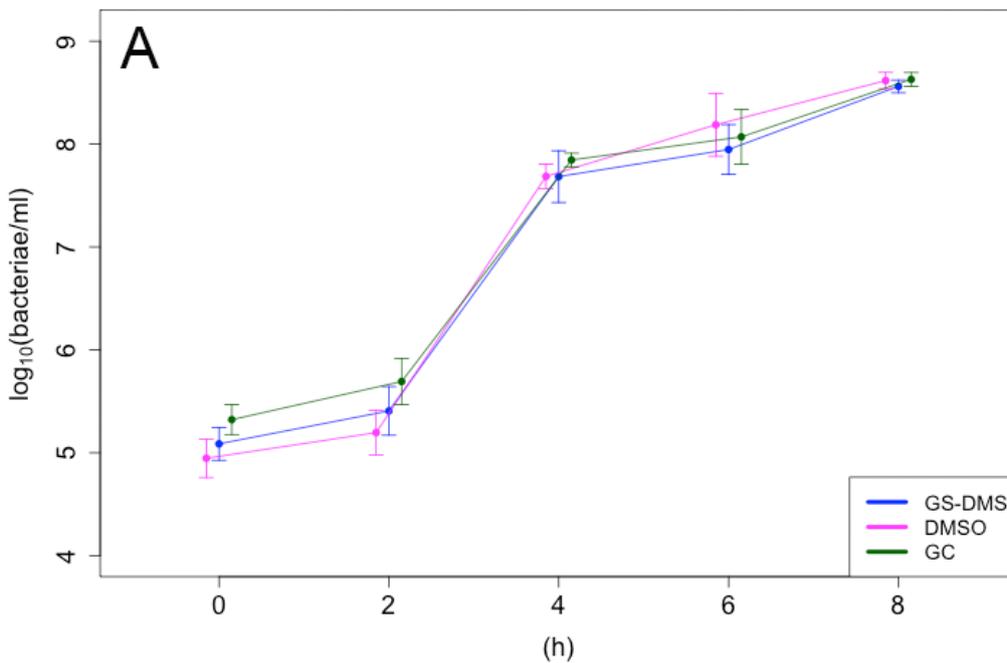


Abb. 5A: Wachstumskinetik von *Escherichia coli* ATCC 25922 über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit GS-DMS. Wachstumskontrolle (growth control = GC) versus Lösungsmittelkontrolle (DMSO), (n=6, Mittelwert und 95%-Konfidenzintervalle der \log_{10} -transformierten Daten)

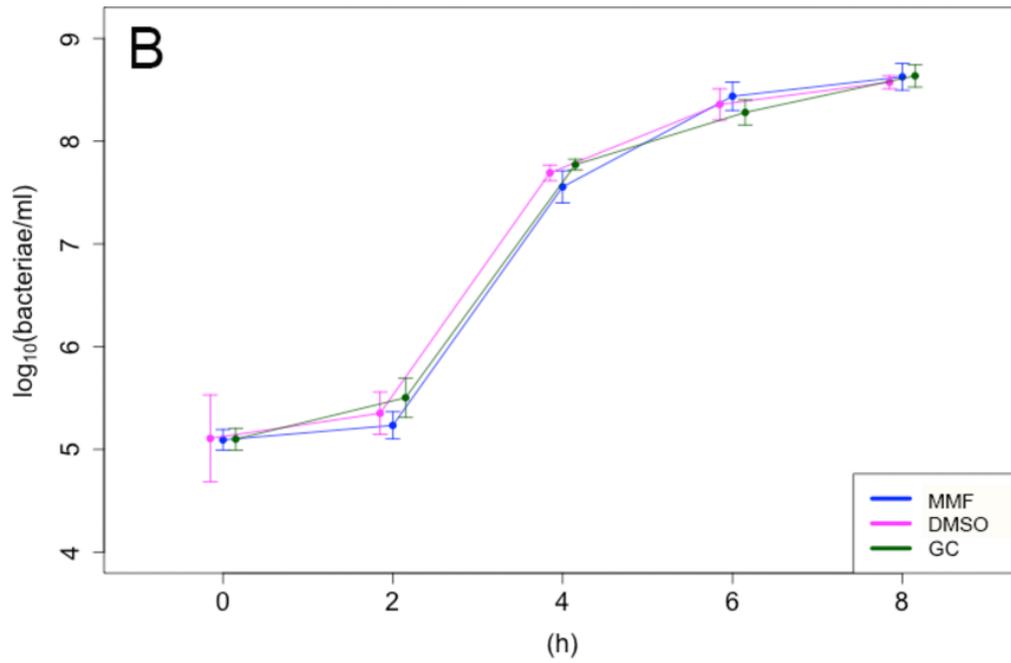


Abb. 5B: Wachstumskinetik von *Escherichia coli* ATCC 25922 über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit MMF. Wachstumskontrolle (growth control = GC) versus Lösungsmittelkontrolle (DMSO), (n=6, Mittelwert und 95%-Konfidenzintervalle der log₁₀-transformierten Daten)

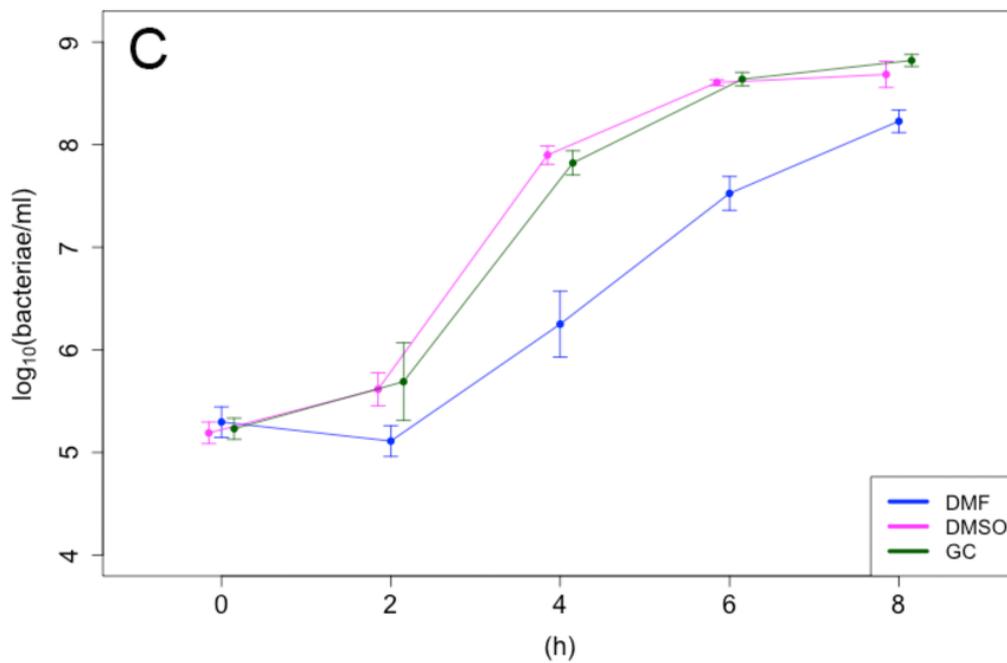


Abb. 5C: Wachstumskinetik von *Escherichia coli* ATCC 25922 über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit DMF. Wachstumskontrolle (growth control = GC) versus Lösungsmittelkontrolle (DMSO), (n=6, Mittelwert und 95%-Konfidenzintervalle der log₁₀-transformierten Daten)

3.2 DMF-Untersuchungen

3.2.1 DMF-Effekt auf weitere *E.coli*-Stämme

Anhand der Übersichtstests stellte sich ein bakteriostatischer Effekt der Testsubstanz DMF beim Stamm *Escherichia coli* ATCC 25922 heraus. Um zu klären, ob der vorliegende Effekt rein stammspezifisch war oder die gesamte Spezies betraf, wurden drei weitere *E. coli*-Stämme getestet. Es stellte sich ein spezies-spezifischer wachstumshemmender Effekt von DMF heraus, der zwar unterschiedlich ausgeprägt war, aber ab t_{2h} für alle Teststämme eintrat (siehe Abbildung 6).

In den folgenden Abbildungen sind die Wachstumsdaten als Verhältnisse zwischen Wachstumskontrolle und DMF dargestellt; dass heißt je größer die negativen Werte, desto ausgeprägter die Wachstumshemmung durch DMF.

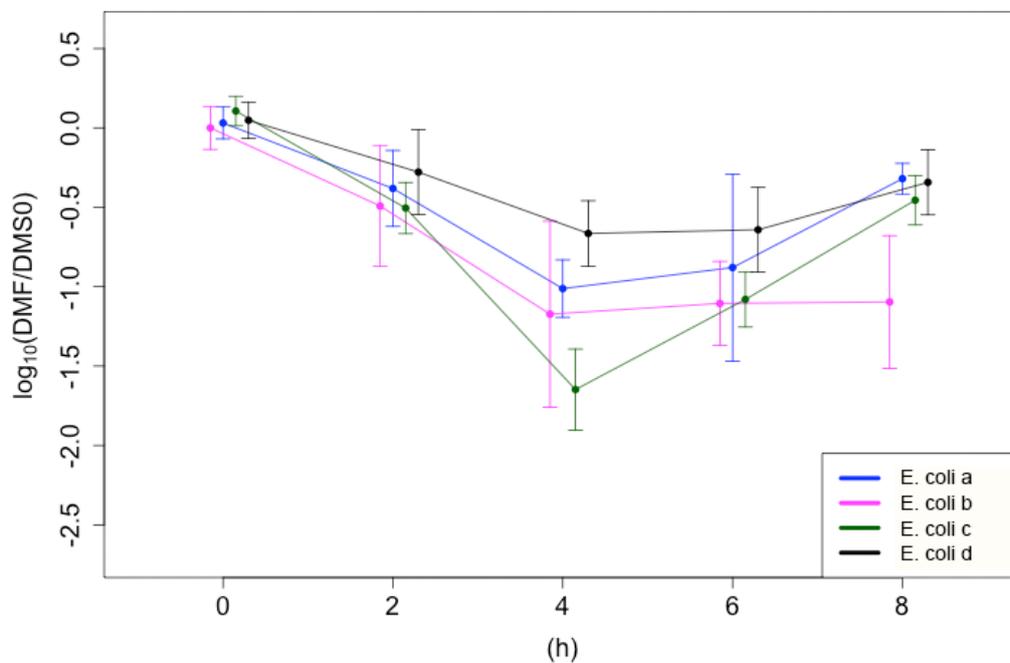


Abb. 6: Wachstumsverhältnisse (DMF/DMSO) von *Escherichia coli* ATCC 35218 (a), 11775 (b), 25922 (c) und RV-A1/2010 (d) über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit DMF. ATCC25922 n=8, ATCC 35218 und 11775 n=6, Mittelwert und 95%-Konfidenzintervalle der log10-transformierten Daten)

3.2.2 DMF- Tests mit weiteren Enterobacteriaceae-Gattungen

Aufgrund der signifikanten Wachstumshemmung unter DMF bei der Bakterienspezies *Escherichia coli* sollte anschließend geklärt werden, ob sich ein Hemmeffekt auf weitere Gattungen der Familie Enterobacteriaceae beobachten ließ.

Wie in Abbildung 7A und B dargestellt, zeigte sich einen deutlicher DMF-Effekt sowohl bei der Klebsiellen- als auch bei der Salmonellenspezies. Insgesamt kam es bei allen getesteten Enterobacteriaceae zu einer Hemmung des bakteriellen Wachstums, welches jedoch je nach Stamm unterschiedlich ausgeprägt war. Abbildung 8 zeigt eine Übersicht aller getesteten Enterobacteriaceae geordnet nach jeweiliger Spezies (Daten aus Abb. 6, 7A und 7B zusammengefasst).

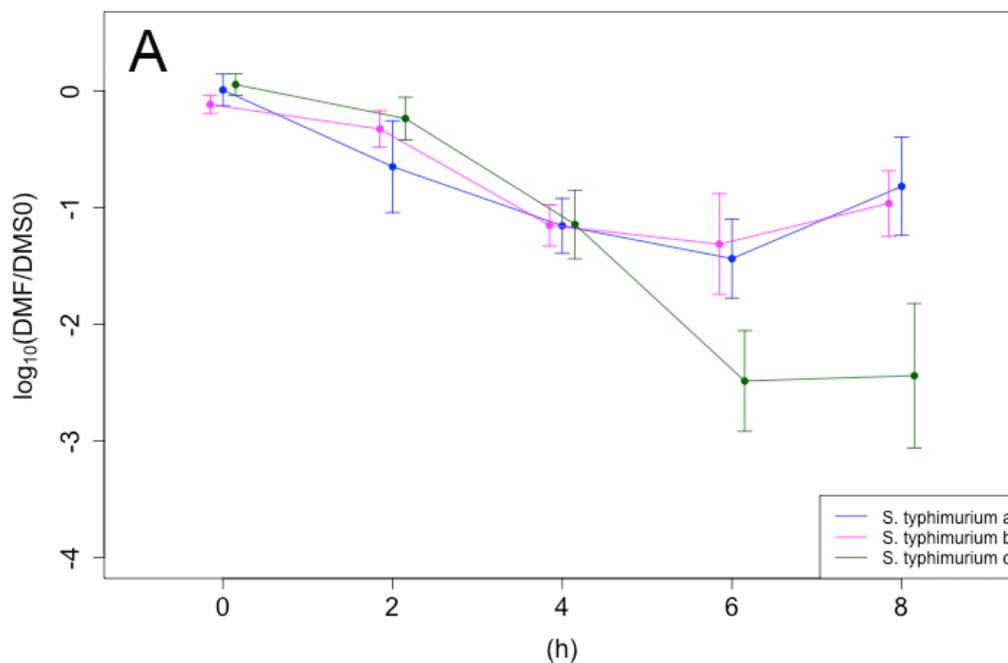


Abb. 7A: Wachstumsverhältnisse (DMF/DMSO) von *Salmonella typhimurium* ATCC 3442 (a), 3602 (b), und 13311 (c) über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit DMF. *Salmonella typhimurium* ATCC 3442 n=8, 3602 n=10, und 13311 n=6, Mittelwert und 95%-Konfidenzintervalle der log₁₀-transformierten Daten)

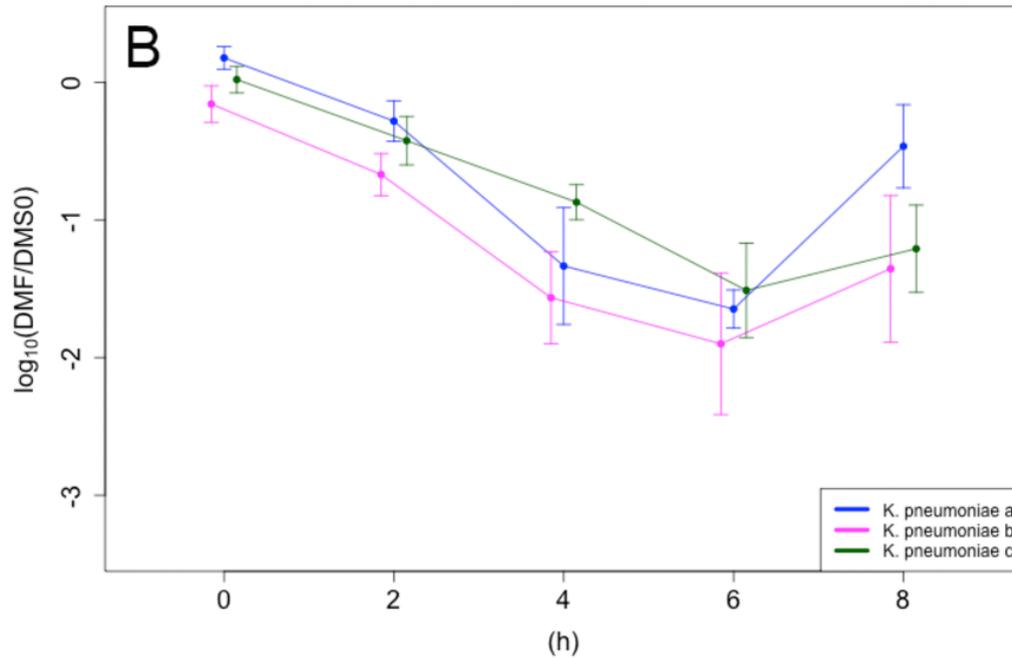


Abb. 7B: Wachstumsverhältnisse (DMF/DMSO) von *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 (a), 700603 ESBL (b) und CF1 ESBL (c) über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit DMF. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 n=6, 700603 ESBL n=8 und CF1 ESBL n=8, Mittelwert und 95%-Konfidenzintervalle der log10-transformierten Daten

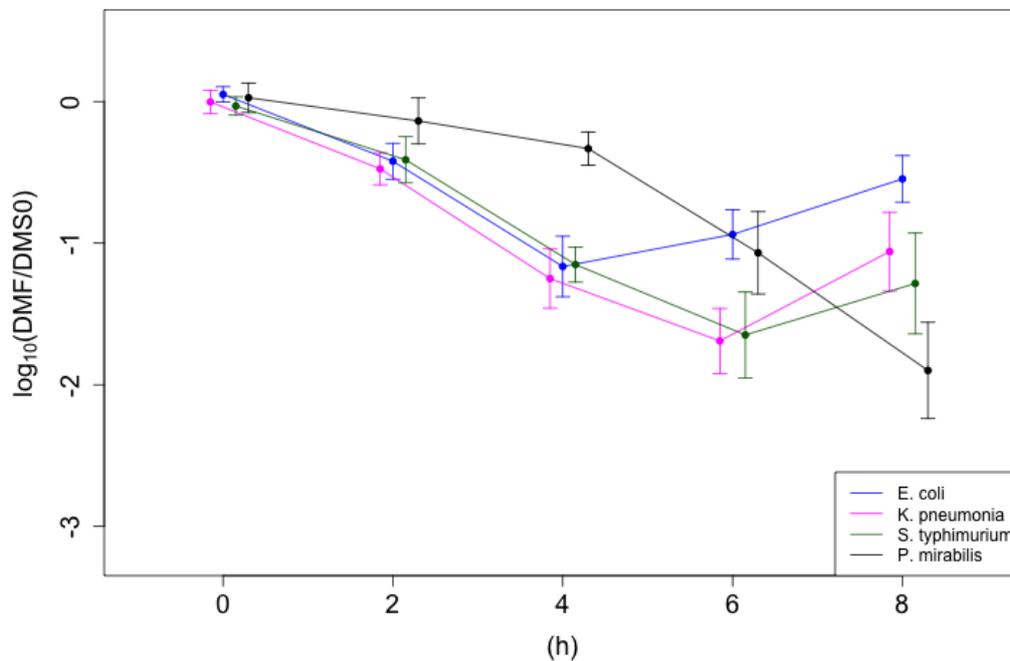


Abbildung 8: Wachstumsverhältnisse (DMF/DMSO) aller getesteten Enterobacteriaceae über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit DMF. Zusammenfassung der getesteten Enterobacteriaceae, $n_{\text{total E.coli}} = 26$, $n_{\text{total K.pneumonia}} = 22$, $n_{\text{total S.typhimurium}} = 24$, $n_{\text{total P.mirabilis}} = 6$, Mittelwert und 95%-Konfidenzintervalle der log10-transformierten Daten

3.2.3 DMF-Tests mit gramnegativen Nonfermentern

Über das Spektrum der Enterobacteriaceae hinaus wurden als weitere gramnegative Stäbchenbakterien Nonfermenter-Isolate getestet. Auch hier zeigte sich eine Wachstumshemmung unter DMF, die jedoch im Vergleich zur Wachstumshemmung bei den Enterobacteriaceae weniger ausgeprägt war. Den stärksten Effekt zeigte *Acinetobacter baumannii*. (vgl. Abbildung 9).

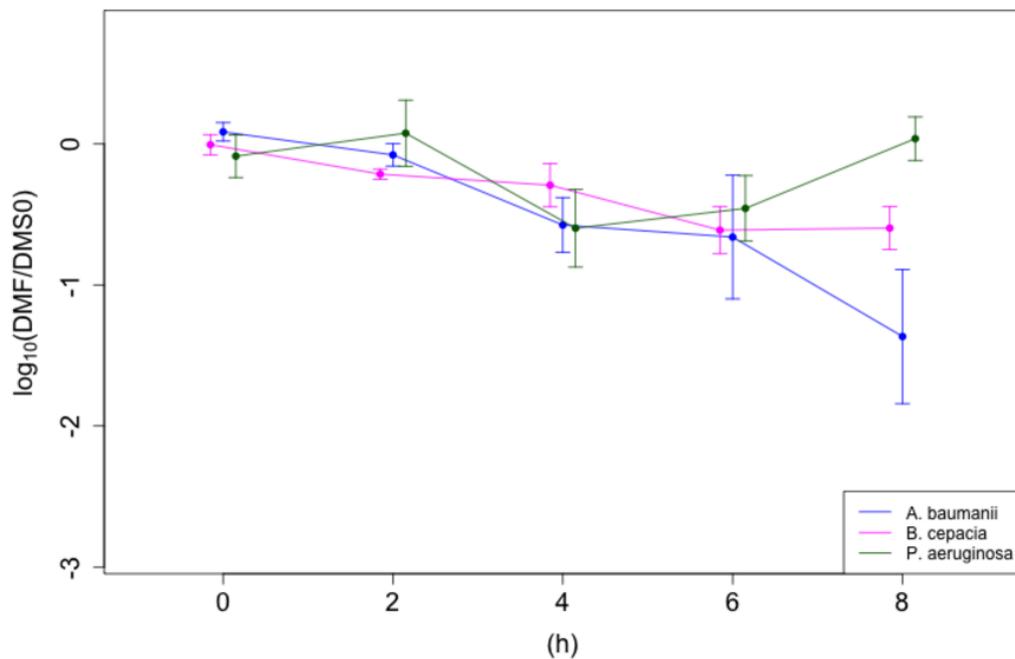


Abb. 9: Wachstumsverhältnisse (DMF/DMSO) von *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 und *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit DMF. *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 n=10, *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 und *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 n=6, Mittelwert und 95%-Konfidenzintervalle der log10-transformierten Daten

3.2.3 DMF-Untersuchungen im polymikrobiellen Umfeld

Um mögliche synergistische oder antagonistische Effekte durch polymikrobielle Bakterien- Populationen, wie sie üblicherweise im Habitat Darm anzutreffen sind, ansatzweise zu prüfen, wurde exemplarisch ein gramnegativer (*Escherichia coli* ATCC 25922) und ein grampositiver (*Enterococcus faecalis* ATCC 28212) Bakterienstamm im gleichen Versuchsansatz auf DMF-Empfindlichkeit getestet. Unter DMF bestätigte sich erneut der in Abbildung 5C gezeigte hemmende Effekt auf das bakterielle Wachstum von *E.coli*, während *E. faecalis* auch hier keine Wachstumshemmung unter DMF aufwies. Damit konnte weder ein synergistischer noch ein antagonistischer Effekt beobachtet werden.

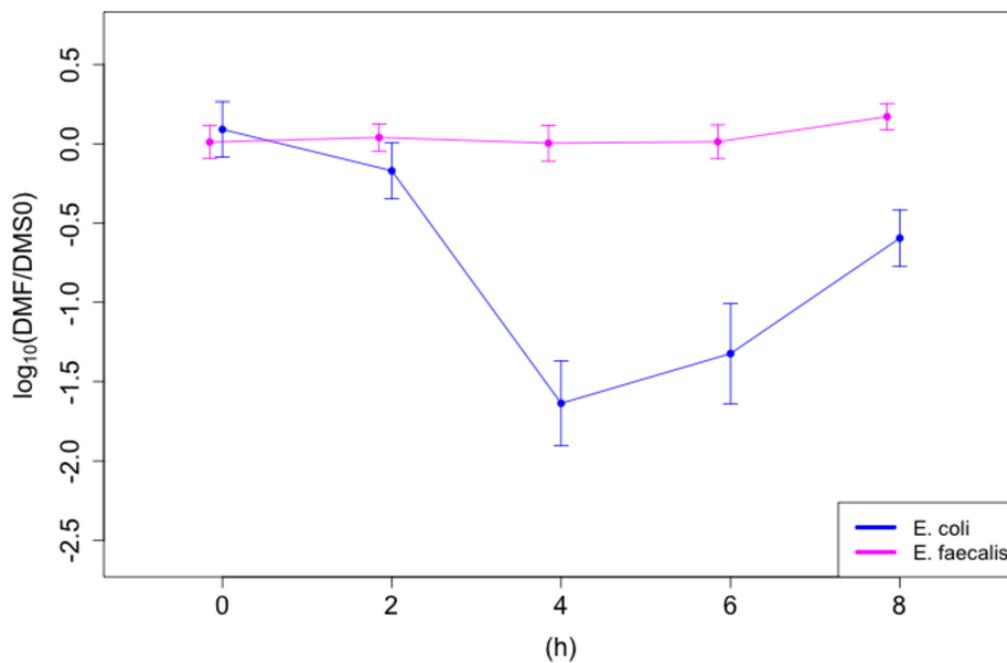


Abb. 10: Wachstumsverhältnisse (DMF/DMSO) im polymikrobiellen Umfeld von *E.coli* ATCC 25922 und *E.faecalis* ATCC 28212 über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit DMF. *E.coli* ATCC 25922 und *E.faecalis* ATCC 28212 n=12, Mittelwert und 95%-Konfidenzintervalle der log10-transformierten Daten

3.2.4 Konzentrationsabhängiger DMF-Effekt

Anhand eines Stammes mit einer ausgeprägten Wachstumshemmung sollte die minimale Konzentration herausgefunden werden, bei der in unserem Testsystem eine beobachtbare Wachstumshemmung auftrat. Am Beispiel von *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311 wurden DMF Endkonzentrationen von 1 mM, 300 μ M, 100 μ M, 30 μ M und 10 μ M eingesetzt. Eine signifikante Wachstumshemmung wurde nur bei einer Konzentration von 1 mM festgestellt. Eine niedrigere DMF Dosis führte nicht zu bakteriostatischen Effekten (siehe Abbildung 11)

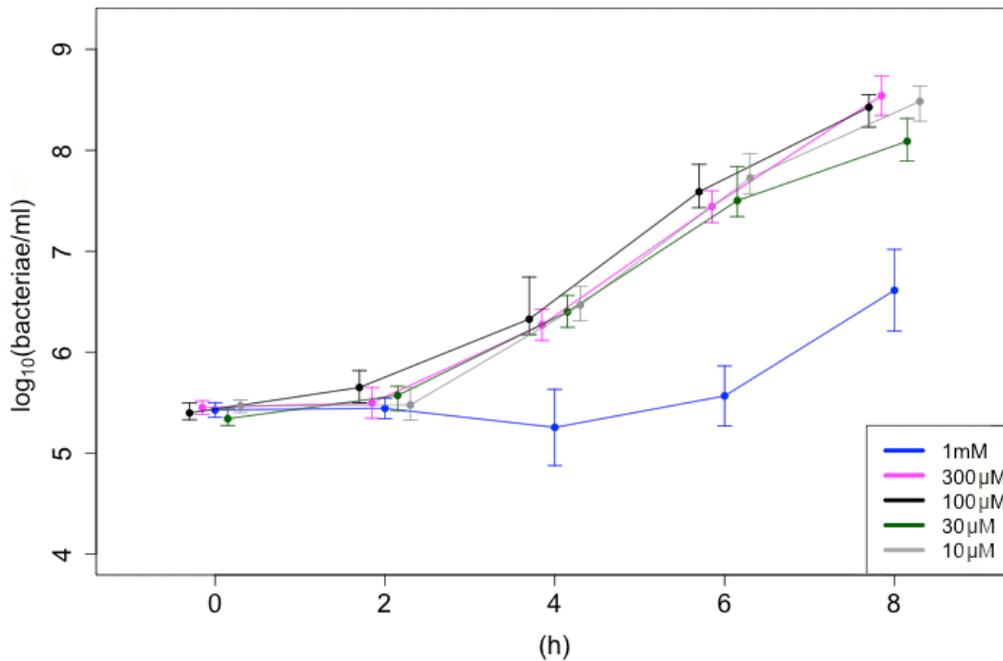


Abb. 11: Wachstumsverhältnisse (DMF/DMSO) von *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311 über einen Zeitraum von acht Stunden (h) mit DMF unter verschiedenen Testkonzentrationen. Konzentrationen 1 mM, 300 μ M, 100 μ M, 30 μ M, 10 μ M jeweils n=10, Mittelwert und 95%-Konfidenzintervalle der log10-transformierten Daten

4. Diskussion

Fumarsäureester haben sich in Deutschland als Basisbehandlung der inflammatorischen Autoimmunerkrankung Psoriasis etabliert (Meissner *et al.*, 2012; Rostami-Yazdi und Mrowietz, 2008). Durch anti-inflammatorische und immunmodulatorische Effekte ergibt sich unter Anwendung von Fumarsäureestern eine Symptomverbesserung (Ghoreschi *et al.*, 2011).

Fumarsäureester werden in Deutschland bereits seit über 20 Jahren zur Behandlung der Psoriasis eingesetzt und verfügen über ein adäquates Sicherheitsprofil. Neben einer guten klinischen Effektivität kommt es weder zu einer Erhöhung des Malignom- noch des Infektionsrisikos, was eine Langzeitanwendung ermöglicht (Hoefnagel *et al.*, 2003; Litjens *et al.*, 2003; Reich *et al.*, 2009).

Bei über 60% der behandelten Patienten zeigen sich jedoch besonders zu Beginn der Behandlung unerwünschte Nebenwirkungen, die einen Therapieabbruch bedingen können (Reich *et al.*, 2009).

Patienten leiden unter Flush-Symptomatik wie Hitzewallungen und Gesichtserythemem und unter gastrointestinalen Beschwerden, deren Ausprägungen von milden Magenverstimmungen bis hin zu Übelkeit, Magenkrämpfen, erhöhter Stuhlfrequenz und Durchfällen reichen (Pathirana *et al.* 2009, Mrowietz und Ockenfels, 2011). Meistens treten die genannten Nebenwirkungen zwischen der vierten und der zwölften Woche nach Behandlungsbeginn auf (Mrowietz *et al.*, 1999) Zwar kann die Medikamentenverträglichkeit beispielsweise durch eine Tabletteneinnahme mit Milch oder die zusätzliche Einnahme von Protonenpumpenhemmern erhöht werden, dennoch müssen 20% der Patienten die Therapie mit Fumaderm® aufgrund von Nebenwirkungen frühzeitig abbrechen. Gastrointestinale Nebenwirkungen scheinen die Patienten dabei häufiger zum Therapieabbruch zu bewegen als Flush-Symptome. Eine optimale Wirkdosis könnte schneller erreicht werden, wenn es gelänge, Fumarsäureester-induzierte unerwünschte Nebenwirkungen zu minimieren. Resultierend käme es vermutlich ebenso zu einer verbesserten Patientenzufriedenheit (Balak *et al.*, 2015).

Auch wenn in der Literatur verschiedene Hypothesen aufgestellt wurden, konnten die Ursachen der Therapie-limitierenden gastrointestinalen Beschwerden bisher nicht abschließend geklärt werden.

Aufgrund der Tatsache, dass gastrointestinale Beschwerden wie Bauchschmerzen, Diarrhö und Koliken ebenso als Leitsymptom einer Histaminintoleranz gelten (Maintz und Novak, 2007) und somit den Fumarsäureester-induzierten Nebenwirkungen ähneln, wurde vermutet, dass eine Blockade der Histaminfreisetzung einen mildernden Einfluss auf Nebenwirkungen unter Fumarsäureester-Behandlung besitzen könnte. Pestelli *et al.* (2003) regten an, dass die Behandlung mit dem Histaminantagonisten Cetirizin eine Reduktion von Adhäsionsmolekülen begünstigen könnte und somit einen anti-inflammatorischen Effekt unterstützen würde. Balak *et al.* (2015) konnten dies allerdings nicht bestätigen: hinsichtlich der Fumarsäureester-induzierten Nebenwirkungen konnte bei einer einmaligen Cetirizindosis von 10 mg pro Tag keine Reduktion unerwünschter Nebenwirkungen

erkannt werden. Sie kamen zu dem Schluss, dass für Flushing und gastrointestinale-Beschwerden wahrscheinlich andere Mediatoren als Histamin verantwortlich sein müssten.

Bereits 1997 untersuchten Asadullah *et al.* einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Hauptmetaboliten von Fumaderm® MMF und der Produktion pro-inflammatorisch wirksamer Zytokine wie TNF- α und IL-12 sowie der Produktion antientzündlich wirksamer Signalstoffe wie IL-10 und IL-1RA (Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist). Untersuchungen ergaben, dass es vor allem zu Behandlungsbeginn (innerhalb der ersten drei Wochen) mit Fumaderm® zu einer Monozytenaktivierung und damit verbunden zu einer hyperinflammatorischen Reaktion mit einem TNF- α -Anstieg kam. Erst im weiteren Behandlungsverlauf setzte ein Rückgang der TNF- α -Bildung ein und es kam hingegen zu einem Anstieg der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-1RA. Diese Ergebnisse bieten eine mögliche Erklärung für die erst relativ spät einsetzende klinische Wirkung unter der Behandlung mit Fumarsäureestern und der vor allem anfänglich gehäuft auftretenden Nebenwirkungen. Es ist voraussichtlich eine durch die Induktion von IL-10 herbeigeführte Veränderung in der IL-10/IL-12 Balance, die einen anti-psoriatischen Effekt bewirkt. Dabei kommt es neben einer Hochregulation von IL-1RA zur Verminderung pro-inflammatorischer Enzyme und der Antigenpräsentation durch Monozyten (Asadullah *et al.*, 1997).

Friedrich *et al.* stützen diese Hypothese: In einer klinischen Studie wurde eine Gruppe von Psoriasis-Patienten mit Fumaderm® behandelt, während in einer zweiten Patientengruppe neben dieser Standardbehandlung zusätzlich Pentoxifyllin verabreicht wurde. Pentoxifyllin ist ein TNF- α -Antagonist und somit in der Lage, dessen Freisetzung zu supprimieren. Es zeigte sich, dass in der zweiten Gruppe die Nebenwirkungen reduziert werden konnten (Friedrich *et al.*, 2001). Da bei dieser klinischen Studie jedoch den Studienteilnehmern und dem -organisator sowohl Medikamentenwirkstoff als auch Dosierung bekannt waren, kann eine subjektive Beeinflussung der Studiendaten nicht sicher ausgeschlossen werden.

Eine dritte Hypothese beschäftigt sich mit einer durch die systemische Anwendung von DMF hervorgerufen Sensibilisierung bei Patienten, die aufgrund gastrointestinaler Nebenwirkungen unter Fumarsäureesterbehandlung die Therapie abbrechen mussten. Drei der acht getesteten Patienten reagierten bei einer DMF-Konzentration von 0,1% mit einem positiven Epikutantest (Patch-Test). Möglicherweise wurde unter systemischer DMF Anwendung eine allergische Kontaktmukositis ausgelöst, die das Auftreten gastrointestinaler Nebenwirkungen erklären könnte (Hessam *et al.* 2013).

In der Forschung bisher unbeachtet blieb die Rolle einer möglichen Verschiebung des Darmmikrobioms auf die entstehenden Nebenwirkungen. Durch den Freisetzungsmechanismus könnte neben den genannten Ursachen möglicherweise auch eine Beeinflussung der kommensalen Mikrobiota das Auftreten von Nebenwirkungen begünstigen.

Fumaderm® und Skilarence® werden oral in Tablettenform verabreicht und lösen sich pH-abhängig erst im Dünndarm (Biogen GmbH, 2016; Almirall, 2017). Der Hauptbestandteil DMF fungiert als Prodrug und ist aufgrund von Hydrolysereaktionen und dem Abbau durch Esterasen im Lumen und der luminalen Mukosa selbst nicht mehr nachweisbar (Dibbert *et al.* 2013). Durch die rasche Hydrolyse entsteht zum einen der bioaktive Hauptmetabolit MMF und ein weiterer Teil des DMF reagiert mit extra- und intrazellulärem Glutathion, sodass GS-DMS entsteht (Schmidt *et al.*, 2007). Auch wenn DMF das Kreislaufsystem nicht erreicht, ist davon auszugehen, dass im Darmlumen DMF, MMF und GS-DMS, wenn auch nur kurzzeitig, vorkommen und in Kontakt mit dem mukosalen Kompartiment treten. Möglicherweise wird auch das mit der Mukosa assoziierte bakterielle Kompartiment des Darms beeinflusst.

In der wissenschaftlichen Literatur aus dem Bereich der Lebensmittelforschung gibt es bereits seit 2001 Hinweise darauf, dass DMF neben anti-mykotischer (Islam, 1982) und einer hemmenden Wirkung gegenüber *C. botulinum* (Ž. Huhtanen, 1983) über weitere antimikrobielle Eigenschaften verfügt. Untersuchungen ergaben, dass DMF neben sechs anderen getesteten Wirkstoffen einen ausgeprägten antibakteriellen Effekt gegenüber *Escherichia coli* (Stamm K12) aufwies und dessen Wachstum nahezu pH-unabhängig hemmte (Wang *et al.*, 2001).

Bezüglich der Fragestellung, inwieweit Fumarsäureester das Wachstum der für die Darmbesiedlung relevanten Bakterien beeinflussen, lassen die zugrundeliegenden Hinweise die Vermutung aufkommen, dass gastrointestinale Nebenwirkungen möglicherweise durch eine Veränderung der Mikrobiota im Dünndarm entstehen könnten.

Das Bakterienwachstum unter dem Einfluss von Fumarsäureestern wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst am Beispiel von Referenzstämmen für grampositive und gramnegative Kokken und Stäbchen untersucht, die physiologischer Weise im Mikrobiom des humanen Verdauungstraktes (vornehmlich dem Dünndarm) vorkommen. Verglichen wurde das Wachstum nach Zugabe von Fumarsäureestern mit dem Wachstum unter alleinigem Zusatz des Lösungsmittels DMSO sowie im Nährmedium. Darüber hinaus wurden auch fakultativ pathogene (setzen Immundefizite des Wirts voraus um Krankheiten zu verursachen), obligat pathogene Stämme (führen auch bei immunkompetenten Wirten zu einem Krankheitsausbruch) und problematische multiresistente ESBL-Stämme mit in die Untersuchungen einbezogen um zu klären, ob eine mögliche Wachstumshemmung durch Fumarsäureester zu neuen Therapieoptionen bei entsprechenden Infektionen führen könnten.

Die Konzentration der Fumarsäureester wurde mit 1 mM ähnlich der von Wang *et al.* gewählt. Daten zu lokalen DMF-Konzentrationen während der Freisetzung aus der Tablette sind nicht bekannt. Da jedoch mit 120 mg pro Tablette eine vergleichsweise sehr hohe Wirkstoffmenge verfügbar ist, sind entsprechend hohe Konzentrationen von DMF im Darmlumen und in der angrenzenden Mukosa anzunehmen.

Die Versuche mit den Fumarsäureestern MMF, DMF und GS-DMS ergaben, dass sich ein wachstumshemmender Effekt lediglich bei DMF nicht aber bei MMF und GS-DMS zeigte. Die vorher beschriebenen Hinweise auf eine Beeinflussung des *E.coli*-Wachstums konnten in dieser Arbeit erstmalig bestätigt werden. DMF ist der einzige Wirkstoff, der nach Tabletteneinnahmen direkt lokal freigesetzt wird. DMF ist aufgrund seines schnellen Umbaus nicht im Blut nachweisbar. Lokal sind jedoch hohe DMF-Konzentrationen direkt nach der Freisetzung an dem der Mukosa aufsitzenden bakteriellen Kompartiment anzunehmen. Zwar wäre ein kurzzeitiger Mukosakontakt von MMF und GS-DMS ebenso denkbar, beide sind als Metaboliten bisher aber sicher nur im Blut und der Mukosa nachgewiesen worden (Dibbert *et al.*, 2013). Sie spielen daher wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle bei der Beeinflussung der Bakterienflora.

Darüber hinaus kam es unter DMF zu einem spezieumfassenden bakteriostatischen Effekt bei anderen *E.coli*-Stämmen. Grampositive Bakterien dagegen schienen im Wachstum nicht beeinflusst zu werden. Weder *Lactobacillus salivarius* noch *Streptococcus mitis* reagierten in Anwesenheit der verschiedenen Fumarsäureester mit veränderten Wachstumskurven. Auch *Staphylococcus epidermidis*, der physiologisch Teil der Haut- und Schleimhautflora ist (Gatermann, 2012), zeigte keine Wachstumshemmung. Zusätzliche Untersuchungen schlossen das Spektrum weiterer Enterobactericea inklusive pathogener Stämme mit ein, um weitere gramnegative Bakterien zu untersuchen. Nahezu alle getesteten Stämme dieser Familie zeigten, wenn auch in unterschiedlicher Ausprägung, einen bakteriostatischen Effekt von DMF. Besonders ausgeprägt war dieses Phänomen bei den getesteten Salmonellen- und Klebsiellen-Stämmen. Gramnegative Nonfermenter zeigten im Vergleich zu den Enterobactericeae ebenso einen wachstumshemmenden Effekt, der in seiner Ausprägung allerdings schwächer war. Im polymikrobiellen Umfeld wurden Anhand eines Zweieransatzes mit dem grampositiven *E.faecalis* und dem gramnegativen *E.coli* weder antagonistische noch synergistische Effekte gezeigt.

Es ist bekannt, dass im menschlichen Gastrointestinaltrakt ein komplexes Mikrobiom aus einem Zusammenschluss vielzähliger Bakterien vorzufinden ist. Die ansässige kommensale Flora ist an vielen physiologischen Prozessen wie beispielsweise der Bildung einer Kolonisationsresistenz gegenüber pathogenen Bakterien sowie der Verdauung von Polysacchariden beteiligt (Okeke *et al.*, 2014). Bei der Verstoffwechslung dieser Nahrungsbestandteile entstehen kurzkettige Fettsäuren. Es ist beschrieben, dass vor allem β -Hydroxybutyrat (β -HB) einen anti-inflammatorischen Effekt auf die wirtseigene Immunabwehr ausübt. In intestinalen Makrophagen in der *Lamina propria* kommt es zu einer herab regulierten Mediatorausschüttung sowie zu einer Unterstützung der Ausbildung regulatorischer und IL-10 produzierender Th-Zellen (Chang *et al.*, 2014; Nastasi *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2014).

Entsteht ein Missverhältnis in der Zusammensetzung des Mikrobioms zwischen pro- und anti-inflammatorischen Bakterien und eine Verminderung deren Diversität, kann es zu pathologischen

Veränderungen der Immunhomöostase kommen. Eine Dysbiose kann durch verschiedene Faktoren wie beispielsweise Medikamente, Diät oder Probiotika hervorgerufen werden. Es bestehen Zusammenhänge zwischen einer Verschiebung des Mikrobioms und zahlreichen Erkrankungen wie Adipositas, Diabetes 2, chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa, Allergien, kolorektalen Krebsarten und vielen mehr (Conway und Cohen, 2015; Okeke *et al.*, 2014; Schulberg und Cruz, 2016; Stecher, 2015)

In Bezug auf entstehende Nebenwirkungen unter der Therapie mit Fumarsäureestern ist denkbar, dass auch eine nur kurzfristige Veränderung der kommensalen Flora, wie beispielsweise von kommensalen *E.coli*-Stämme, durch DMF eine Verschiebung des Darmmikrobioms zur Folge haben und damit gastrointestinalen Nebenwirkungen durch eine veränderte Immunhomöostase begünstigen könnte. Da sich der in dieser Arbeit gezeigte mögliche Effekt von DMF nur auf gramnegative Bakterien bezog, wäre eine mögliche Verschiebung hin zu einem grampositiveren Spektrum des Mikrobioms denkbar, da gramnegative Vertreter der Darmflora einen Populationsnachteil erlangen könnten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben zudem Anlass, die in der Fachinformation angegebenen Kontraindikation zur Verwendung von Fumaraten unter chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Biogen GmbH, 2016) zu hinterfragen. Aufgrund der durch die Einnahme von Fumaderm® beobachteten gastrointestinalen Nebenwirkungen (Diarrhö, Krämpfe, Übelkeit, erhöhte Stuhlfrequenzen etc.) (Mrowietz und Ockenfels, 2011), wurde vermutlich davon ausgegangen, dass eine Behandlung bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen kontraindiziert sei. Es ist beschrieben, dass es unter den genannten Krankheiten zu einem Anstieg von Bakterien beispielsweise aus der Familie der Enterobacteriaceae kommt (Agus *et al.*, 2016; Cho und Blaser, 2012). Möglicherweise könnte DMF allerdings gerade in diesem Fall aufgrund des hemmenden Einflusses auf das Wachstumsverhalten von darmpathogenen Enterobacteriaceae neue Therapieoptionen darstellen.

Während in der vorliegenden Dissertation das Spektrum aerober/fakultativ anaerober Bakterien untersucht wurde, könnten weitere Versuche zeigen, ob auch im Milieu strikt anaerober Vertreter des Mikrobioms ein DMF-Effekt gezeigt werden kann.

5. Zusammenfassung

Fumarsäureester haben sich zur systemischen Behandlung der Autoimmunerkrankungen Psoriasis und Multiple Sklerose etabliert. Neben einer guten klinischen Effektivität verfügen sie über ein adäquates Sicherheitsprofil auch in der Langzeitanwendung.

Therapielimitationen stellen allerdings unerwünschte gastrointestinale Nebenwirkungen dar. Unter Behandlung mit oral verabreichten Fumarsäureestern treten bei bis zu 60% der Patienten Beschwerden wie Diarrhoe, erhöhte Stuhlfrequenz und Krämpfe auf. Etwa 20% der Patienten müssen die Therapie deshalb abbrechen.

Die Ursachen dieser Nebenwirkungen sind ungeklärt. Gegenwärtige Hypothesen beschäftigen sich vor allem mit einer möglichen erhöhten Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie Tumor-Nekrose-Faktor-alpha und Interleukin-1 oder einer durch Dimethylfumarat hervorgerufenen Kontaktmukositis. Weitgehend unbeachtet blieb bisher eine möglicherweise durch Fumarsäureester hervorgerufene Dysbiose der Darmflora als weitere mögliche Ursache von gastrointestinalen Beschwerden.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Dimethylfumarat und seiner Metaboliten Monomethylfumarat und Dimethyl-2-(S-Glutathionyl)-Succinat auf das bakterielle Wachstum aerober/fakultativ anaerober Bakterien der Darmflora untersucht.

Gegenüber verschiedenen *E.coli*-Stämmen, weiteren gramnegativen Enterobacteriaceae und gramnegativen Nonfermentern konnte ein, im Vergleich zur Mediumkontrolle, deutlich erkennbarer bakteriostatischer Effekt von Dimethylfumarat gezeigt werden. Grampositive Vertreter der Darmflora blieben unbeeinflusst. Die Metaboliten Monomethylfumarat und Dimethyl-2-(S-Glutathionyl)-Succinat riefen keine Wachstumsbeeinflussung hervor. Zusammenfassend liefert diese Arbeit Hinweise darauf, dass Dimethylfumarat einen selektiven bakteriostatischen Effekt auf eine Vielzahl aerober/fakultativ anaerober gramnegativer Bakterien ausübt.

Die Gründe für eine solch spezifische Wachstumshemmung von Dimethylfumarat gegenüber diesen Stämmen bleiben unklar. Eine durch diesen Effekt hervorgerufene Verschiebung des Mikrobioms könnte allerdings eine Erklärung für das Auftreten von Dysbiose und gastrointestinalen Nebenwirkungen darstellen, da gramnegative Vertreter dadurch einen Populationsnachteil erlangen könnten.

Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob sich ein wachstumshemmender Effekt von Dimethylfumarat auch unter strikt anaeroben Bedingungen und somit an anaeroben kommensalen Vertretern des Mikrobioms zeigt.

6. Literaturverzeichnis

- Almirall, 2017. Skilarence : EPAR - Product Information, 1-40
- Agus, A., Denizot, J., Thevenot, J., Martinez-Medina, M., Massier, S., Sauvanet, P., Bernalier-Donadille, A., Denis, S., Hofman, P., Bonnet, R., Billard, E., Barnich, N., 2016. Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive *E. coli* infection and intestinal inflammation. *Sci Rep* 6 (19032), 1-14.
- Asadullah, K., Schmid, H., Friedrich, M., Randow, F., Volk, H.-D., Sterry, W., Döcke, W.-D., 1997. Influence of monomethylfumarate on monocytic cytokine formation - explanation for adverse and therapeutic effects in psoriasis? *Arch Dermatol Res* 289 (11), 623–630.
- Balak, D., Fallah-Arani, S., Venema, C.M., Neumann, H., Thio, H.B., 2015. Addition of an oral histamine antagonist to reduce adverse events associated with fumaric acid esters in the treatment of psoriasis: A randomized double-blind placebo-controlled trial. *Br J Dermatol* 172 (3), 754–759.
- Biogen GmbH, 2016. Fachinformation Fumaderm®/Fumaderm® initial, 1-4
- Chang, P.V., Hao, L., Offermanns, S., Medzhitov, R., 2014. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 111 (6), 2247–2252.
- Chen, H., Assmann, J.C., Krenz, A., Rahman, M., Grimm, M., Karsten, C.M., Köhl, J., Offermanns, S., Wettschureck, N., Schwaninger, M., 2014. Hydroxycarboxylic acid receptor 2 mediates dimethyl fumarate's protective effect in EAE. *J Clin Invest* 124 (5), 2188–2192.
- Cho, I., Blaser, M.J., 2012. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet* 13 (4), 260–270.
- Christophers, E., Mrowietz, U., 2012. Psoriasis, in: Plewig, G., Braun-Falco, O. (Eds.), *Braun-Falco's Dermatologie, Venerologie und Allergologie. Mit 341 Tabellen*, 6., überarb. und erw. Aufl. ed. Springer, Berlin, 476–497.
- Conway, T., Cohen, P.S. (Eds.), 2015. *Metabolism and bacterial pathogenesis*. ASM Press, Washington, DC, 1-17.
- Dibbert, S., Clement, B., Skak-Nielsen, T., Mrowietz, U., Rostami-Yazdi, M., 2013. Detection of fumarate-glutathione adducts in the portal vein blood of rats: evidence for rapid dimethylfumarate metabolism. *Arch Dermatol Res* 305 (5), 447–451.
- Friedrich, M., Sterry, W., Klein, A., Ruckert, R., Docke, W.D., Asadullah, K., 2001. Addition of pentoxifylline could reduce the side effects of fumaric acid esters in the treatment of psoriasis. *Acta Derm-Venereol* 81 (6), 429–430.
- Gatermann, S., 2012. Staphylokokken, in: Suerbaum, S., Hahn, H., Burchard, G.D., Kaufmann, S.H., Schulz, T.F. (Eds.), *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer Berlin Heidelberg, 187–197.

- Ghoreschi, K., Brück, J., Kellerer, C., Deng, C., Peng, H., Rothfuss, O., Hussain, R.Z., Gocke, A.R., Respa, A., Glocova, I., Valtcheva, N., Alexander, E., Feil, S., Feil, R., Schulze-Osthoff, K., Rupec, R.A., Lovett-Racke, A.E., Dringen, R., Racke, M.K., Röcken, M., 2011. Fumarates improve psoriasis and multiple sclerosis by inducing type II dendritic cells. *J Exp Med* 208 (11), 2291–2303.
- Gillard, G.O., Collette, B., Anderson, J., Chao, J., Scannevin, R.H., Huss, D.J., Fontenot, J.D., 2015. DMF, but not other fumarates, inhibits NF- κ B activity in vitro in an Nrf2-independent manner. *J Neuroimmunol* 283, 74–85.
- Gold, R., 2012; Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose, Entwicklungsstufe: S2e, 430-475, in: Diener, H. C., Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, 5., Thieme, Stuttgart, Deutsche Gesellschaft für Neurologie.
- Hein, T., Hopfenmüller, W., 2000. Hochrechnung der Zahl an Multiple Sklerose erkrankten Patienten in Deutschland. *Nervenarzt* 71 (4), 288–294.
- Hessam S., Altmeyer P., Stucker M., Dickel H., 2013. Dimethylfumarate in the treatment of psoriasis - A hitherto unnoticed source of sensitization? A case series and review of the literature. *Allergology*, 19–27.
- Hoefnagel, J.J., Thio, H.B., Willemze, R., Bouwes Bavinck, J.N., 2003. Long-term safety aspects of systemic therapy with fumaric acid esters in severe psoriasis. *Br J Dermatol* 149 (2), 363–369.
- Litjens, N.H.R., Nibbering, P.H., Barrois, A.J., Zomerdijs, T.P.L., van den Oudenrijn, A. C., Noz, K.C., Rademaker, M., van de Meide, P. H., van Dissel, J.T., Thio, B., 2003. Cutaneous Biology: Beneficial effect of fumarate therapy in psoriasis vulgaris patients coincide with downregulation of type 1 cytokines. *Br J Dermatol* (148), 444–451.
- Litjens, N.H.R., van Strijen, E., van Gulpen, C., Mattie, H., van Dissel, J.T., Thio, H.B., Nibbering, P.H., 2004. In vitro pharmacokinetics of anti-psoriatic fumaric acid esters. *BMC Pharmacol* 4, 1–22.
- Maintz, L., Novak, N., 2007. Histamine and histamine intolerance. *Am J Clin Nutr* 85 (5), 1185–1196.
- Manson, J.M., Rauch, M., Gilmore, M.S., 2008. The commensal microbiology of the gastrointestinal tract, in: Huffnagel, G.B. (Ed.), *GI Microbiota and Regulation of the Immune System*, vol. 635. *Advances in experimental medicine and biology*. Springer Science and Business Media, New York, 15–28.
- Meissner, M., Valesky, E.M., Kippenberger, S., Kaufmann, R., 2012. Dimethyl fumarate - only an anti-psoriatic medication? *J Dtsch Dermatol Ges* (11), 793–801.
- Mrowietz U, Szepietowski JC, Loewe R, van de Kerkhof P, Lamarca R, Ocker WG, Tebbs VM, Pau-Charles I. Efficacy and safety of LAS41008 (dimethyl fumarate) in adults with moderate-to-severe chronic plaque psoriasis: a randomized, double-blind, Fumaderm[®] - and placebo-controlled trial (BRIDGE). 2017, *Br J Dermatol*. 176(3), 615-623.

- Mrowietz, U., Altmeyer, P., Augustin, M., Boehncke, W.-H., Bonnekoh, B., Frambach, Y., Gambichler, T., Ghoreschi, K., Hertl, M., Hund, A.-C., Jacobi, A., Kuhn, A., Ludwig, R.J., Luger, T., Martin, S.F., Merk, H., Norgauer, J., Reich, K., Rostami-Yazdi, M., Sabat, R., Schäkel, K., Scharffetter-Kochanek, K., Schön, M.P., Scola, N., Sticherling, M., Thaci, D., Wilsmann-Theis, D., Viehweg, A., Wozel, G., Zouboulis, C.C., Neureither, M., 2012. Neue Erkenntnisse zu Fumarsäureestern (Fumaderm®): Ergebnisse des 2. Experten-Workshops. *J Dtsch Dermatol Ges* 10 Suppl 8, 1–15.
- Mrowietz, U., Ockenfels, H.-M., 2011. Fumarsäureester, in: Nast, A. (Ed.), S3-Leitlinie zur Therapie der Psoriasis vulgaris. Update 2011. *J Dtsch Dermatol Ges* 9.2011, Suppl. 2. Wiley-Blackwell, Berlin, 112–118.
- Mrowietz, U., Christophers, E., Altmeyer, P., 1999. Treatment of severe psoriasis with fumaric acid esters: Scientific background and guidelines for therapeutic use. *Br J Dermatol* 141 (3), 424–429.
- Nastasi, C., Candela, M., Bonfeld, C.M., Geisler, C., Hansen, M., Krejsgaard, T., Biagi, E., Andersen, M.H., Brigidi, P., Ødum, N., Litman, T., Woetmann, A., 2015. The effect of short-chain fatty acids on human monocyte-derived dendritic cells. *Sci Rep* 5, 16148 EP.
- Nestle, F.O., Kaplan, D.H., Barker, J., 2009. Psoriasis. *N Engl J Med* 361 (5), 496–509.
- Nickoloff, B.J., 1999. Skin innate immune system in psoriasis: friend or foe? *J Clin Invest* 104 (9), 1161–1164.
- Okeke, F., Roland, B.C., Mullin, G.E., 2014. The role of the gut microbiome in the pathogenesis and treatment of obesity. *Global advances in health and medicine : improving healthcare outcomes worldwide* 3 (3), 44–57.
- Pestelli, E., Floriani, I., Fabbri, P., Caproni, M., 2003. Cetirizine modulates adhesion molecule expression in a double-blind controlled study conducted in psoriatic patients. *Int J Tissue React* 25 (1), 1–8.
- Press Announcements - FDA approves new multiple sclerosis treatment: Tecfidera, 2013. <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm345528.htm>.
- Reich, K., Thaci, D., Mrowietz, U., Kamps, A., Neureither, M., Luger, T., 2009. Efficacy and safety of fumaric acid esters in the long-term treatment of psoriasis - a retrospective study (FUTURE). *J Dtsch Dermatol Ges* (7), 603–611.
- Rostami-Yazdi, M., 2007. Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Fumarsäureestern: Nat. Diss., Kiel, 1-209.
- Rostami-Yazdi, M., Mrowietz, U., 2008. Fumaric acid esters. *Clin Dermatol* 26 (5), 522–526.
- Rostami-Yazdi, M., Clement, B., Mrowietz, U., 2010. Pharmacokinetics of anti-psoriatic fumaric acid esters in psoriasis patients. *Arch Dermatol Res* 302 (7), 531–538.
- Schmidt, T.J., Ak, M., Mrowietz, U., 2007. Reactivity of dimethyl fumarate and methylhydrogen fumarate towards glutathione and N-acetyl-l-cysteine—Preparation of S-substituted thiosuccinic acid esters. *Bioorgan Med Chem* 15 (1), 333–342.

- Schulberg, J., Cruz, P. de, 2016. Characterisation and therapeutic manipulation of the gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Intern Med* 46 (3), 266–273.
- Schwenckendiek, E., 1959. Heilung von Psoriasis. *Medizinische Monatsschrift* (13), 103–104.
- Singh, N., Gurav, A., Sivaprakasam, S., Brady, E., Padia, R., Shi, H., Thangaraju, M., Prasad, P.D., Manicassamy, S., Munn, D.H., Lee, J.R., Offermanns, S., Ganapathy, V., 2014. Activation of the receptor (Gpr109a) for niacin and the commensal metabolite butyrate suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity* 40 (1), 128–139.
- Stecher, B., 2015. The Roles of Inflammation, Nutrient Availability and the Commensal Microbiota in Enteric Pathogen Infection. *Microbiol Spectr* 3 (3), 1-17
- Tang, H., Lu, J.Y.-L., Zheng, X., Yang, Y., Reagan, J.D., 2008. The psoriasis drug monomethylfumarate is a potent nicotinic acid receptor agonist. *Biochem Biophys Res Commun* 375 (4), 562–565.
- Wang, H.-H., Sun, D.-W., Kuang, R., 2001. Inhibition of *Escherichia coli* by dimethyl fumarate. *Int J Food Microbiol* 65 (1-2), 125–130.

7. Danksagung

Eine Dissertation ist nie das Werk eines Einzelnen. Hiermit möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich während der Phase meiner wissenschaftlichen Arbeit unterstützt und motiviert haben und die Entstehung meiner Dissertation überhaupt ermöglichten.

Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Mrowietz danke ich besonders für die Überlassung des spannenden Themas und für die vielen persönlichen Gespräche und die motivierenden Worte. Bei Fragen war ich stets sicher, einen kompetenten Rat zu erhalten.

Eine fundierte statistische Betreuung und viele gute Hinweise und Erklärungen erhielt ich von Herrn Hansjörg Baurecht, bei dem ich mich für seine geduldige Unterstützung bedanken möchte.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. Thomas Schwarz, der mir als Direktor der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel ermöglichte, meine Doktorarbeit an der von Ihm geleiteten Klinik durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Fickenscher danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in der Mikrobiologie zur Ausführung meiner Versuche.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. rer. nat. Rainer Podschun, der mir bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit die wegweisende sachkundige und wertvolle Unterstützung bot. Mit seinem fachkundigen Wissen trug er zu einer funktionierenden Methodik und letztlich zu den Ergebnissen bei.

Für die unermüdliche und professionelle Einführung in das mikrobiologische Arbeiten und die ausführliche Einweisung in das Labor gilt mein besonderer Dank Frau Silvia Voss. Für die Zeit, die sie in meine Einarbeitung investierte, für viele Gespräche während langer Labortage und für Ihre Geduld bin ich sehr dankbar. Mit ihr hat die Zeit des praktischen Arbeitens viel Spaß gemacht.

Zu guter Letzt gilt ein herausragender Dank meiner Familie und meinem Partner sowie meinen Freunden. Sie haben mich in meinem Vorhaben von Anfang bis Ende bestärkt und unterstützt.

8. Veröffentlichungen

09/2017

Poster P174826. EADV (European Academy of Dermatology and Venereology), Genf, Schweiz