

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Charakterisierung von Patienten mit
funktionellen gastrointestinalen Erkrankungen
anhand von serologischen Biomarkern und der
Analyse des Darmmikrobioms

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Vorgelegt von Melanie Schweden
aus Neustadt an der Weinstraße
Magdeburg 2021

DOKUMENTATIONSBLATT

Bibliographische Beschreibung:

Schweden, Melanie

Charakterisierung von Patienten mit funktionellen gastrointestinalen Erkrankungen anhand von serologischen Biomarkern und der Analyse des Darmmikrobioms

2021 – 86 Bl. - 15 Abb. - 5 Tab. - 2 Anl.

Kurzreferat:

Durch die hohe Prävalenz funktioneller gastrointestinaler Erkrankungen besteht die Notwendigkeit einer eindeutigen schnellen Diagnostikmethode. Bislang konnten die in Studien beschriebenen Marker für IBS und FD nicht einheitlich durch nachfolgende Arbeiten bestätigt werden. Auch die zahlreichen Daten der Mikrobiomanalysen, liefern kein spezifisches Profil der verschiedenen Subgruppen. Unsere Studie war die erste, die eine kombinierte Betrachtung der serologischen Marker (Anti-CdtB- und Anti-Vinculin-Antikörper) und der Mikrobiotaveränderungen vorgenommen hat. Ziel war es zu untersuchen, ob subgruppenspezifische (IBS-D, IBS-C, FD und Gesunde) Unterschiede bei Anti-CdtB- und Anti-Vinculin-Titern, Mikrobiomprofilen sowie Dysbioseindizes vorliegen. Hierzu wurde eine ELISA gestützte Titerbestimmung der Antikörper, sowie eine Analyse der Mikrobiomprofile basierend auf der Sequenzierung der bakteriellen DNA zur Bestimmung der Mikrobiota und der Dysbioseindizes vorgenommen. Die Kernergebnisse, die unsere Studie liefert, sind 1), dass weder subgruppenspezifische Unterschiede in den fäkalen Mikrobiotaprofilen noch in den Anti-CdtB- und Anti-Vinculin-Titern vorliegen 2), dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen Dysbiose und erhöhten Anti-CdtB-Werten vorliegt, der auf eine neue ätiologische Verbindung der dysbiose-abhängigen Anti-CdtB Bildung hindeuten kann und 3), dass die höheren Dysbioseindizes der IBS-C Kohorte durch signifikant erhöhte proinflammatorische- und erniedrigte butyratbildende Bakterien getrieben werden. Diese Erkenntnisse liefern für zukünftige Studien neue Anhaltspunkte der Biomarkerforschung und bieten die Möglichkeit, durch gezieltes Ausgleichen der jeweils veränderten Mikrobiota, den dysbiotischen Veränderungen bei FGIDs entgegenwirken zu können.

INHALTSVERZEICHNIS

DOKUMENTATIONSBLATT.....	I
INHALTSVERZEICHNIS	II
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 Epidemiologie und Subtypen von funktionellen Gastrointestinalen Erkrankungen.....	1
1.2 Diagnostik und Rome-Kriterien	2
1.3 Risikofaktoren von IBS und der Funktionellen Dyspepsie.....	4
1.4 Pathophysiologie des Reizdarmsyndroms und von der Funktionellen Dyspepsie.....	5
1.4.1 Low-grade Entzündung der Mukosa	5
1.4.2 Erhöhte intestinale Permeabilität und Zytokinfreisetzung	6
1.4.3 Veränderungen der intestinalen Mikrobiota.....	7
1.5 Biomarker für funktionelle gastrointestinale Erkrankungen.....	9
1.6 Nutzung der Anti-CdtB und Anti-Vinculin Antikörper zur Diagnosestellung .	12
1.7 Nutzung der Mikrobiomanalysen zur Diagnosestellung.....	12
1.8 Zielsetzung.....	14
2 MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 Studiendesign EMGASTA	15
2.2 Patientenkollektiv und Ein- und Ausschlusskriterien.....	15
2.3 Stuhlgewinnung und -lagerung	16
2.4 DNA-Extraktion und Amplifikation	17
2.5 Single Base Extension, Hybridisierung und Nachweis	17
2.6 Plasmagewinnung und –Vorbereitung	18
2.7 ELISA Testing	18
2.8 Statistische Analyse	19

3	ERGEBNISSE	21
3.1	Patientenkollektiv und Charakteristika.....	21
3.2	Vergleich von Anti-CdtB- und Anti-Vinculin-Titern sowie -Positivitätsraten zwischen den Kohorten	22
3.2.1	Vergleich der Anti-CdtB-Titer sowie -Positivitätsraten.....	22
3.2.2	Vergleich der Anti-Vinculin-Titer sowie -Positivitätsraten	24
3.3	Analyse anderer Einflussgrößen auf die Anti-CdtB- und Anti-Vinculin-Antikörperhöhe	26
3.4	Mikrobiomvergleich von AK-Positiven und AK-Negativen.....	27
3.4.1	Vergleich von Dysbioseindizes von Anti-CdtB-/Anti-Vinculin- positiven sowie – negativen Probanden	27
3.4.2	Unterschiede in der Stuhl-Mikrobiomzusammensetzung der Ak-positiven- vs. Ak-negativen Probanden.....	30
3.5	Mikrobiomvergleich innerhalb der Kohorten	32
3.5.1	Dysbiosehäufigkeit und -Verteilung in den unterschiedlichen Kohorten	32
3.5.2	Unterschiede in der Stuhl-Mikrobiomzusammensetzung zwischen den 4 Kohorten	33
3.5.3	Vergleich der Mikrobiomkomposition von Ak-positiven- und Ak-negativen Probanden innerhalb der jeweiligen 4 Kohorten	35
3.5.4	Unterschiede in Bakterienprofilen der Kohorten durch „functional bacteria profiling“	37
4	DISKUSSION	42
4.1	Übersicht der Ergebnisse sowie Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse der Literatur	42
4.2	Vergleich der Mikrobiomprofile und Einfluss der Bakterien auf den Wirt	45
4.2.1	Butyrat produzierende Bakterien.....	45
4.2.2	Proinflammatorische Bakterien	46
4.3	Diversität	47
4.4	Dysbioseindex	47
4.5	Analyse der Anti-CdtB- und Anti-Vinculin-Antikörper Werte	48
4.6	Schlussfolgerung und Limitationen dieser Studie	50
5	ZUSAMMENFASSUNG	52
6	ANHANG	I
6.1	Sonstiges	i

6.2	Lebenslauf	viii
6.3	Eidesstattliche Erklärung	x
6.4	Erklärung zur strafrechtlichen Verurteilung	xi
6.5	Danksagung	xii

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
16S rRNA	16S ribosomale Ribonukleinsäure
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AK	Antikörper
ALAT	Alanin-Aminotransferase
AMPro	Altern und metabolische Programmierung
ANOVA	analysis of variance
AP	Alkalische Phosphatase
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
BB	Blutbild
BBS	borate buffered saline
BMI	Body mass index
But.	Butyrat
bzw.	beziehungsweise
C.asc.	Colon ascendens
C.des.	Colon descendens
CA	California
Cdt	cytotoxic distending toxin
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CRF	Case Report Form
CRP	c- reaktives Protein
ddCTP	Dideoxyribonukleosid-Triphosphate
DI	Dysbioseindex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Enterochromafine Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFRE	Europäischen Fond für regionale Entwicklung
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMGASTA	Bedeutung der Ernährung, des gastrointestinalen Mikrobioms und eines gesunden Gastrointestinaltraktes für die Autonomie des alternden Menschen
EPS	epigastric pain syndrome
F.prausnitzii	Faecalibacterium prausnitzii
Fc	fragment crystallisable

FD	Funktionelle Dyspepsie
FGID's	Funktionelle gastrointestinale Erkrankungen
FODMAPs	fermentable oligo-, di-, monosaccharides and polyols
g	Gramm
GA	Genetic Analysis, Oslo
GCP	good clinical practice
GERD	Gastroösophageale Refluxerkrankung
H ₂	Histamin
HDL	High Density Lipoprotein
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL	Illinois
IBS	Irritable bowel syndrome
IBS-C	Irritable bowel syndrome with predominant constipation
IBS-D	Irritable bowel syndrome with predominant diarrhea
IBS-M	Irritable bowel syndrome with mixed bowel habits
Inc.	incorporated
INF- γ	Interferon Gamma
kg	Kilogramm
LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysacharid
M.Chron	Morbus Chron
MA	Massachusetts
MCV	mean corpuscular volume
Min	Minute
ml	milliliter
mM	millimol
NC	North Carolina
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NJ	New Jersey
nm	nanometer
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
NY	New York
OD	optical density
OPLS-DA	Orthogonal partial least squares discriminant analysis
OTU	Operational Taxonomic Unit
PA	Pensylvania
PBS	phosphate buffered saline

PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase chain reaction
PDS	postprandial disstress syndrome
PI-IBS	Post infectious Irritable bowel syndrome
pos.	positiv
PPAR γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor-Gamma
PPI	Protonenpumpeninhibitoren
Prop.	Propionat
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
R.bromii	Ruminococcus bromii
rel.	relativ
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
SCFA	short chain fatty acids
SD	Standardabweichung
SERT	Serotonintransporter
SIBO	small intestine bacterial overgrowth
SNE	single-nucleotide-extension
SNP's	Single Nucleotide Polymorphism
sp(p).	Spezies
Tab.	Tabelle
TG	Triglyzeride
TNF- α	Tumornekrose Faktor α
TRPV1	transient receptor potential cation channel subfamily V member 1
TSH	Thyreotropin
u.a	unter anderem
USA	United States of America
v.a	vor allem
VOCs	volatile organic compounds
vs.	versus
VT	Vermont
z.B	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
γ -GT	Gamma-Glutamyltransferase
μ l	mikroliter

1 EINLEITUNG

1.1 Epidemiologie und Subtypen von funktionellen Gastrointestinalen Erkrankungen

Funktionelle gastrointestinale Erkrankungen sind häufig vorkommende Symptomkomplexe, die sich in Form von chronischen oder wiederkehrenden abdominellen Schmerzen und Missempfindungen äußern. Insgesamt unterscheidet man 6 Hauptgruppen, wobei die funktionelle Dyspepsie (FD), sowie das Reizdarmsyndrom (IBS) die überwiegend gestellten Diagnosen ausmachen [1, 2]. Rund 50% aller gastroenterologischen Arztbesuche sind aktuell auf diese beiden Störungen zurückzuführen [2–4]. Insgesamt leidet ca. 1/3 der Weltbevölkerung an funktionellen gastrointestinalen Erkrankungen. Dabei stellt die Gruppe mit funktioneller Dyspepsie mit 18 – 24 % den Hauptanteil, dicht gefolgt von einer Patientengruppe mit Reizdarmsyndrom von etwa 10-20 % , wobei sich in 37% aller Fälle beide Symptome überlappen [5, 6].

Die Krankheitsbilder des Reizdarmsyndroms (IBS) bzw. der funktionellen Dyspepsie (FD) werden im Wesentlichen aufgrund subjektiver Empfindungen diagnostiziert und in 7 Untergruppen unterteilt (siehe *Tabelle 1*). Dabei ist IBS durch Symptome wie abdominelles Unwohlsein, Meteorismus, Druckempfindung sowie wechselnde Stuhlfrequenz bzw. -form charakterisiert [7]. Basierend auf den Rome III, bzw. IV Kriterien, unter Berücksichtigung der Bristol-Stuhlformen-Skala, werden verschiedene Sub-Typen unterschieden: das Obstipations-dominierte IBS-C, das Diarrhö-dominierte IBS-D sowie eine Mischform zwischen IBS-C und -D, die als IBS-M bezeichnet wird [8]. Ein weiterer vorwiegend Diarrhoe-assoziiertes Subtyp ist das postinfektiöse Reizdarmsyndrom (PI-IBS). Dieses kann sich in 10-20% der Fälle nach einer akuten Gastroenteritis entwickeln, welche sich zuvor durch Fieber/Erbrechen und/oder einer positiven Stuhlkultur mit enteropathogenen Keimen (am häufigsten *Campylobacter jejuni*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Clostridium difficile*) manifestiert hat [3, 9–11].

Tabelle 1: Übersicht der Subtypen bei Reizdarmsyndrom und funktioneller Dyspepsie
 Prozentuale Verteilung der Reizdarmsyndrom-/Funktionelle Dyspepsie Subtypen innerhalb aller IBS/FD Betroffenen mit typischem Symptommuster

	Subtyp	Symptome	Vorkommen [12, 13]
Reizdarmsyndrom	IBS-C	Obstipation, Blähungen, > 25% der Zeit harter/klumpiger Stuhlgang (Bristol Typ 1 und 2)	~24%
	IBS-D	Diarrhoe, erhöhte Stuhlfrequenz > 25% der Zeit wässriger Stuhlgang (Bristol Typ 6 und 7)	~ 25%
	IBS-M	Diarrhoe und Obstipation, > 25% der Zeit harter oder wässriger Stuhlgang (Bristol Typ 1 &2 oder 6 &7)	~35%
	PI-IBS	Diarrhoe, erhöhte Stuhlfrequenz, > 25% der Zeit wässriger Stuhlgang (Bristol Typ 6 und 7)	~10-20%
Funktionelle Dyspepsie	PDS	Frühes Sättigungsgefühl/Völlegefühl	38-52%
	EPS	Brennen/Schmerzen im Oberbauch	27-32%
	Überlappend PDS/EPS	Kombinierte Symptome von PDS +EPS	16-35%

Unter dem Oberbegriff funktionelle Dyspepsie (FD) werden Funktionsstörungen mit einer im Epigastrium lokalisierten Symptomatik zusammengefasst. Als Subtypen werden das postprandiale Disstress Syndrom (PDS), charakterisiert durch ein frühzeitiges Sättigungsgefühl, das epigastrische Schmerzsyndrom (Epigastric Pain Syndrom, EPS) mit Schmerzen und Brennen im Oberbauch, sowie eine Mischform von PDS/EPS unterschieden. Bei vielen Patienten mit FD zeigen sich zusätzlich noch andere Symptome wie Übelkeit, Meteorismus und Sodbrennen [2] die eine eindeutige Zuordnung zu einem Subtypen erschweren. Zudem muss insbesondere die gastroösophageale Refluxkrankheit (GERD) wegen der sich ähnlich präsentierenden Symptomatik zu EPS durch sorgfältige Diagnostik abgegrenzt werden [14].

1.2 Diagnostik und Rome-Kriterien

Aufgrund der vielfältigen Symptomatik, der hohen Prävalenz und der teilweisen deutlichen Einschränkung der Lebensqualität, die bis zur Arbeitsunfähigkeit reichen kann [15], kommt der sicheren und schnellen Diagnose von IBS bzw. FD eine

entscheidende Bedeutung zu. Hierzu hat sich als weltweiter Standard die Anwendung der Rome- Kriterien etabliert, welche sich aus den Manning-Kriterien heraus entwickelt haben [16]. Ziel dieser Kriterien ist es, FGIDs anhand eines Symptom-basierten Klassifikationsschemas zu diagnostizieren, ohne interventionelle Verfahren anzuwenden [17]. Sie wurden 1994 erstmals veröffentlicht und seitdem stetig den neusten Forschungsergebnissen angepasst [9, 18–20].

Da die Rome-Kriterien, auch noch in der seit 2016 gültigen, aktualisierten und in Spezifität und Sensitivität verbesserten Variante (Rome-IV), immer noch vage und nicht ausreichend genau sind, gilt es zunächst, alle anderen organischen Erkrankungen, mit sich ähnlich präsentierenden Beschwerden, auszuschließen. So treffen die Rome-IV-IBS Kriterien (siehe *Abbildung 1*) ebenso auf über 70% der Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen zu. Auch im Falle von FD kommt es zu Überlappungen mit

Reizdarmsyndrom (IBS):

Abdominelle Schmerzen, welche mindestens einmal pro Woche in den letzten 3 Monaten aufgetreten sind und zusätzlich zusammen mit mindestens 2 der folgenden Gegebenheiten erscheinen: sie müssen in Zusammenhang mit dem Stuhlgang auftreten und/oder mit der Stuhlforn- bzw. der Stuhlfrequenz assoziiert sein.

Funktionelle Dyspepsie:

Abdominelle Schmerzen, welche vor mindestens 6 Monaten begonnen haben, mindestens dreimal pro Woche in den letzten 3 Monaten aufgetreten sind und mit mindestens einem der folgenden Symptome (Postprandiales Völlegefühl, vorzeitige Sättigung, Oberbauchschmerzen oder Oberbauchbrennen) in Zusammenhang stehen.

Abbildung 1: Definition gemäß Rom-Kriterien für IBS bzw. FD [1, 21]

anderen organischen oder funktionellen Krankheiten. Durch aufwändige Differentialdiagnostik müssen deshalb chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Zöliakie, das kolorektale Karzinom und Laktoseunverträglichkeit bei Verdacht auf IBS, sowie gastroösophageale Refluxkrankheit, peptische Ulzera, Ösophagitis und Magentumore bei Verdacht auf funktionelle Dyspepsie vorher sicher ausgeschlossen werden [2, 22, 23]. Trotz zeitlich aufwändiger Diagnostik, die sich teilweise über 6 Jahre

erstrecken kann und erhebliche Kosten verursacht (30 % aller gastroenterologischen Kosten) [24–26], führt die Anwendung der Rome-Kriterien mit einer Sensitivität von 61-75% und einer Spezifität von 69-79,5% [2, 27–29] zu keiner ausreichend exakten Diagnosestellung.

1.3 Risikofaktoren von IBS und der Funktionellen Dyspepsie

Die komplexe Pathophysiologie von funktionellen gastrointestinalen Erkrankungen ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Zunächst wurde eine rein psychisch bedingte Ursache angenommen, welche allein aufgrund einseitiger Interaktionen zwischen Gehirn und Darm, ohne biochemische und strukturelle Basis, begründet wurde [3]. Inzwischen weist die wissenschaftliche Evidenz jedoch auf multifaktorielle und heterogene Ursachen hin.

Als Risikofaktoren für IBS und FD wurden in den letzten Jahren erhöhte Angst-/Stresslevel, Rauchen, Depressionen und/oder ein junges Alter (<30 Jahre) identifiziert [30]. Hierbei korrelieren gesteigerte Angst/Stresslevel mit einer Erhöhung des Erkrankungsrisikos um den Faktor 3,4 bei IBS und bis 7,6 bei der funktionellen Dyspepsie [10, 30, 31]. Als zugrundeliegende Mechanismen werden Low-grade Entzündungsprozesse, Permeabilitätssteigerung der Mukosa und/oder Veränderung der Darm- und Magenmotilität diskutiert [10, 32]

Ein weiterer Risikofaktor für die Manifestierung eines IBS oder FD ist die infektiöse Gastroenteritis [33–35]. Meta-analysen über PI-IBS zeigen, dass nach bakteriellen Gastroenteritiden ein insgesamt 6-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko besteht, welches bis zu 2-3 Jahre nach Zurückgehen der Infektion bestehen bleibt [36]. Ebenso wurde bewiesen, dass die Erkrankungsgefahr bei bakteriellen Infektionen proportional zur Dauer sowie der Schwere der Infektion ansteigt und bei schweren Infekten (über 22 Tage) um ein 11-faches erhöht sein kann [37]. Ähnliche Korrelationen werden auch für die funktionelle Dyspepsie beschrieben, was die Tatsache nahelegt, dass PI-IBS und PI-FD verschiedene Aspekte der ähnlichen Pathophysiologie darstellen. Gemäß der Meta-Studie von Futagami et al. [38] steigt die Gefahr einer PI-FD nach akuter Gastroenteritis um das 2,5-fache an, wobei ein überlappendes Syndrom aus PI-IBS und PI-FD entstehen kann.

Auch *Helicobacter Pylori* (*H. pylori*) [39, 40] und virale Infektionen [41] werden inzwischen vereinzelt als potenzielle Risikofaktoren diskutiert.

1.4 Pathophysiologie des Reizdarmsyndroms und von der Funktionellen Dyspepsie

Auf der molekularen Seite lieferten die Studien der letzten Jahre zunehmend Hinweise auf die zugrundeliegenden pathophysiologischen Prozesse bei IBS und FD. Inzwischen wird, neben Faktoren wie einer genetischen Prädisposition, einer veränderten Darm-Gehirn-Interaktion sowie Gallensalzmetabolisierung und Ernährung (FODMAPs) vermehrt der Einfluss des Mikrobioms auf die Krankheitsentstehung und -aufrechterhaltung diskutiert. So wird angenommen, dass eine Dysbiose inflammatorische Prozesse induzieren kann, welche anschließend Konsequenzen auf die intestinale Permeabilität, Low-grade Entzündung der Mukosa und veränderte Magen-Darm-Motilität haben [42].

1.4.1 Low-grade Entzündung der Mukosa

Eine wesentliche Rolle bei der Manifestierung von IBS und FD kommt nach neueren Erkenntnissen der niedrigschwelligen, aber langanhaltenden Entzündung der Mukosa zu. Diese kann sowohl bei IBS [10, 43] als auch bei der Funktionellen Dyspepsie [44, 45] einer genetischen Prädisposition zugrunde liegen. Deutlich häufiger werden die mukosalen Entzündungen jedoch durch pathogene Bakterien ausgelöst, die aufgrund einer Gastroenteritis oder auch als Folge einer Antibiotikaeinnahme oder veränderten Ernährung, zu einer Imbalance der intestinalen Homöostase zugunsten der pathogenen Erreger führen. Diese Bakterien können nun direkt durch ihre Virulenzfaktoren oder indirekt durch ihre gebildeten Metaboliten inflammatorische Prozesse- und somit eine unterschwellige langanhaltende Aktivierung des Immunsystems induzieren.

In diesem Zusammenhang zeigen IBS-D Studien noch ein Jahr nach Remission einer *Campylobacter jejunii* Enteritis, erhöhte intraepitheliale T-Lymphozyten und enterochromafine Zellen in rektalen Biopsien [43]. Diese Befunde erklären neben den immunologischen Veränderungen auch die veränderten Serotoninspiegel (IBS-D erhöht, IBS-C erniedrigt) und die demzufolge veränderten Transitzeiten dieser beiden Subgruppen [46].

Zusätzlich wurde eine erhöhte Mastzellendichte bzw. – freisetzung von Mastzellmediatoren bei IBS (insbesondere Tryptase und Histamin) beschrieben [47]. Hierbei fördert die gesteigerte Degranulation die mukosale Entzündung und hält diese weiter aufrecht. Gleichzeitig kommt es durch die enge Assoziation zwischen Mastzellen und Nervenfasern zu viszeraler Hyperalgesie. Diesbezüglich haben Tiermodelle gezeigt,

dass der Ausprägungsgrad der mukosalen Entzündung mit der Schwere der viszeralen Hypersensitivität verknüpft ist [48].

Auch bei der funktionellen Dyspepsie triggern hauptsächlich Infekte, zusätzlich jedoch Rauchen, Stress, duodenale Magensäureexposition und Lebensmittelallergien mukosale duodenale Entzündungen. In diesem Zusammenhang wurde eine Anreicherung von eosinophilen Granulozyten im Duodenum beschrieben, dessen Granulationsprodukte neben der Stimulation sensorischer Schmerzfasern auch die Kontraktilität der Magenmuskulatur erhöhen [49]. Dies führt zu viszeraler Hypersensitivität sowie frühzeitigem Sättigungsgefühl der Betroffenen [50]. Die Studie von Li et al. [51] schlussfolgert, dass PI-FD mit einer erhöhten EC- sowie Mastzellzahl im Duodenum einhergeht, wobei eine andere Studie verminderte CD4+ Zellen [52] beschrieb. Diese Erkenntnisse lassen auf eine eingeschränkte Fähigkeit des Immunsystems in Hinblick auf die Beendigung der inflammatorischen Immunreaktionen nach einer Dysbiose schließen.

1.4.2 Erhöhte intestinale Permeabilität und Zytokinfreisetzung

Als Konsequenz der oben beschriebenen Entzündung der Mukosa kommt es anschließend zu einer nachgewiesenen Permeabilitätssteigerung des Epithels begleitet von einer erhöhten Freisetzung von Zytokinen. So wurde neben erhöhten Titern von aktivierten B-Lymphozyten mit Immunglobulinproduktion bei Patienten mit IBS-D [53], eine Imbalance zwischen proinflammatorischem TNF- α und anti-inflammatorischem IL-10 nachgewiesen [54]. Zudem wird diskutiert, ob TNF α -Induktion zusätzlich auch Ursache erhöhter intestinaler Permeabilität sein kann, da die Induktion und damit verbundene Apoptose Verletzungen der epithelialen Barriere verursacht [10]. In diesem Zusammenhang wird auch über eine Veränderung der epithelialen Spaltdichte berichtet, die durch eine Tryptase induzierte verminderte Expression von tight junctions Proteinen verursacht wird [3, 55, 56].

Erhöhte TNF α -, IL-10- sowie IL-1 β Konzentrationen wurden ebenfalls bei Patienten mit funktioneller Dyspepsie gemessen [57]. Zu diesen Zytokinfreisetzungen, welche nachweislich mit einer verzögerten Magenentleerung assoziiert sind, tragen neben erhöhten duodenalen Eosinophilen sowie Makrophagen auch dünn darm spe zifische T-Lymphozyten bei, deren Anzahl ebenso bei Patienten mit FD erhöht ist [57]. Dies deutet darauf hin, dass der Magen durch einen „Reflexbogen“ mit dem entzündeten Duodenum sowie Dünndarm in Verbindung steht.

Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei der anhaltenden Entzündung um einen sich selbst unterhaltenden Prozess handelt: Die verstärkte Aktivierung des

Immunsystems ist u.a Folge von Dysbiose und/oder der defekten epithelialen Barriere. Diese wiederum wird durch die erhöhten Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine weiter zerstört, was anschließend mit seinen Folgen auf Flüssigkeitsretention und Darm-Motilität wiederum zu einer weiteren Veränderung des Mikroklimas und damit des Mikrobioms im Darm führt.

1.4.3 Veränderungen der intestinalen Mikrobiota

Die beschriebenen Änderungen der Immunologie sowie der Permeabilität scheinen somit Ursache wie auch Folge des veränderten Mikrobioms zu sein. Durch diese Zusammenhänge wird die Bedeutung des Mikrobioms als wichtiger Parameter der IBS Pathophysiologie deutlich. Mit seiner insgesamt etwa 1,5 kg Gesamtmasse bestehend aus Bakterien, Pilzen, Viren, Eukaryoten und Archaeen, welche zusammen eine Anzahl von bis zu 100 Billionen Mikroorganismen ergeben, rückt das komplexe Mikrobiom immer mehr in den Fokus der IBS-Forschung [58].

Das Kolon weist mit 70% aller Mikroorganismen den größten Anteil der menschlichen Mikrobiota auf. Durch die Bildung von essenziellen Aminosäuren, Vitaminen sowie kurzkettigen Fettsäuren profitiert der Wirt in vielerlei Hinsicht von den unterschiedlichen Aufgaben des Mikrobioms [59]. Mechanismen wie antibakteriell wirkende Magensaft- und Gallensekretion, humorale und zelluläre Abwehrmechanismen, Muzin- und Defensinproduktion, aborale Darmperistaltik sowie die Bauhinklappe halten die Mikrobiota im Gleichgewicht. [60].

Das *bakterielle* intestinale Mikrobiom ist beim Gesunden äußerst divers und besteht nach heutigem Stand aus über 1000 Bakterienarten, wobei davon ausgegangen wird, dass zum jetzigen Zeitpunkt lediglich 1/3 des gesamten Mikrobioms identifiziert sowie charakterisiert ist [61–64]. Über 98% der Spezies können den 4 dominierenden Bakterienstämmen *Firmicutes* (64%), *Bacteroidetes* (23%), *Proteobacteria* (8%) und *Actinobacteria* (3%) zugeordnet werden [63, 65]. Die Häufigkeiten sowie Kompositionen der Mikrobiota unterscheiden sich interindividuell sehr stark (65). Lediglich 30% der Bakterienpopulationen, die sogenannte „Core Mikrobiota“ sind über Individuen hinweg gleich [66, 67]. Zusätzlich verändert sich diese sehr „persönliche“ Mikrobiomzusammensetzung über das Leben hinweg und hängt dabei deutlich von Essgewohnheiten, genetischer Disposition, Stress, Medikamenten, frühkindlichen Erfahrungen sowie der Entbindungsart ab [63, 68]. Durch die bidirektionale Kommunikation kommt es nicht nur zur einseitigen Beeinflussung des Mikrobioms durch Lebensstil-Faktoren, sondern auch zu einem breiten Einfluss des Mikrobioms auf die Darmphysiologie. Dies zeigt sich in Form von Veränderungen der viszeralen Sensitivität sowie GI-Motilität, Stimulation der Serotonin- und GABA-Bildung,

Permeabilitätssteigerungen, Einfluss auf die Darm-Gehirn-Achse sowie einer aus Dysbiose resultierenden Immunsystemaktivierung und anschließender low-grade Entzündung [68–70].

Durch die Analyse der verschiedenen bakteriellen 16S-rRNA wurden detaillierte Analysen der Mikrobiom Zusammensetzung bis auf Speziesebene möglich. Die Ergebnisse hierzu sind jedoch aufgrund der großen biologischen Variabilität sehr heterogen, wobei sich bestimmte Erkenntnisse in unterschiedlichen Publikationen wiederholt bestätigen. Somit zeigte sich in mehreren Studien eine erhöhte *Firmicutes*-, und eine erniedrigte *Bacteroides*abundanz sowie eine erhöhte *Firmicutes/Bacteroides* Ratio bei Probanden mit IBS. Diese resultiert hauptsächlich aus vermehrten *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Streptococci* und *Dorea* Spezies und einer verminderten Häufigkeit von *Lactobacilli*, *Bifidobacterium* und *Faecalibacterium* Spezies [71–75].

Auch die Mikrobiomanalysen der verschiedenen Subtypen erwiesen sich als sehr heterogen, einige Studien schilderten eine Erhöhung der methanbildenden Bakterien bei IBS-C [76], wobei andere Studien keine subgruppenspezifischen Mikrobiomunterschiede verzeichneten [72, 77, 78]. Die weitaus am intensivsten erforschte Gruppe IBS-D charakterisierte sich in einigen Studien durch erhöhte *Bacteroides*, sowie erniedrigte *Bifidobacterium* und *Faecalibacterium* [79], wobei andere Studien zu konträren Erkenntnissen kamen [80, 81]. Auch beim Vergleich der Profile von PI-IBS und IBS-D (ohne infektiöse Genese) wurde die Inhomogenität der bisherigen Ergebnisse deutlich. Hier wurde auf der einen Seite von ähnlichen Mikrobiotakompositionen von PI-IBS und Gesunden berichtet, wohingegen sich die Gruppe mit IBS-D deutlich unterschied [82]. Im Gegensatz hierzu wurden von Jalanka-Tuovinen et al. [83] ähnliche Profile von PI-IBS und IBS-D beschrieben, welche sich von den Gesunden abgrenzten.

Bezüglich der Bakteriendiversität (α -Diversität) bei Patienten mit IBS kommt es studienübergreifend ebenfalls zu sehr uneinheitlichen Ergebnissen. So zeigte sich jedoch in den meisten Arbeiten eine verminderte α -Diversität bei Patienten mit IBS [71, 84–86], wobei andere Studien keinen Unterschied zu gesunden Probanden beweisen konnten [84, 87, 88]. Außerdem gibt es Hinweise auf Abweichungen zwischen dem stuhlassoziierten Mikrobiom und der mukosa-assoziierten Bakterienpopulation bei IBS, wobei hier die Diversität der Faeces höher war, als die der mukosagebundenen Bakterien [89]. Die Bakterienanzahl in der Mukosa war bei Patienten mit IBS höher als bei gesunden Probanden, sodass durch die enge permanente Nachbarschaft der Mikroben zu den Immunzellen der Darmschleimhaut, Entzündungsreaktionen getriggert werden können [62, 90].

Darüber hinaus wurde bei 78% bis 84% der Patienten eine Dünndarmfehlbesiedelung (SIBO, small intestinal bacterial overgrowth) nachgewiesen, die ursächlich im Zusammenhang mit veränderter Darmmotilität, viszeraler Hypersensitivität und einer Steigerung der intestinalen Permeabilität diskutiert wird [91]. Im Gegensatz dazu stehen jedoch neuere Arbeiten von Choung et al., die basierend auf exakteren Nachweismethoden keine erhöhte SIBO Prävalenz bei IBS Betroffenen zeigen konnten [92]. Eine finale Klärung dieser gegensätzlichen Beobachtungen steht derzeit noch aus.

Bei Patienten mit funktioneller Dyspepsie wurden erhöhte Abundanzen von *Bifidobacterium*, *Clostridium* sowie *Prevotella* aufgezeigt, wobei die Häufigkeit von *Prevotella* umgekehrt mit der Symptomschwere bei PDS korreliert war [93]. Die Studie von Igarashi et. al [94] wies neben einer erhöhten *Bacteroidetes/Proteobacteria* Ratio, auch eine totale Abwesenheit von *Acidobacteria* bei Patienten mit FD nach. Außerdem stellen sich Unterschiede zwischen der Microbiota der duodenalen Schleimhaut von Gesunden und FD heraus, wobei unter anderem eine negative Korrelation zwischen Bakterienlast und Lebensqualitätsverlust zu verzeichnen war [95]. Aufgrund der geringen Studienanzahl und den unterschiedlichen Erkenntnissen kann daraus jedoch noch keine valide Aussage getroffen werden.

1.5 Biomarker für funktionelle gastrointestinale Erkrankungen

Aufbauend auf den ersten pathophysiologischen Erkenntnissen sowie den Änderungen im Mikrobiom wurden erste serologische, wie auch aus dem Mikrobiom abgeleitete Biomarker zu einer trennschärferen, sensitiveren und beschleunigten Diagnose von funktionellen gastrointestinalen Störungen gegenüber anderen organisch bedingten Krankheiten entwickelt.

Studien beschrieben zur Diagnostik primär das Analysieren von:

- a) Metaboliten, die als Folge einer modifizierten mikrobiellen Zusammensetzung des Darms entstehen, oder
- b) Proteinen, bei denen eine Konzentrationsveränderung als Folge einer Immunsystemaktivierung bzw. abnormen Eigenschaften des Darms zu beobachten ist, oder
- c) Mikrobiomprofilen, deren Abweichungsgrad von einem gesunden Normoprofil anhand eines numerischen Index ausgedrückt werden kann.

Nachfolgende *Tabelle 2* zeigt eine Auswahl der zurzeit publizierten Biomarker zur Diagnose des Reizdarmsyndroms mit jeweiliger Sensitivität sowie Spezifität und Referenzwertabweichungen der verschiedenen Marker.

Tabelle 2: Auswahl an Biomarkern für IBS und FD mit jeweiliger Sensitivität und Spezifität sowie Referenzwertabweichungen [14, 23, 96–104]

Vergleichsgruppe	Biomarker	Änderung bei Pathologie	Sensitivität	Spezifität
andere GI-Krankheiten (v.a. CED) vs. IBS	Fäkales Calprotectin	↑	93%	94%
	10-Marker-Panel	↑	50%	88%
IBS vs. Gesunde	Fäkale SCFA	(Differenz Prop-But) ↑	92%	72%
	Granine	CgA, SgII, SgIII ↑ CgB ↓	79%	72%
	VOCs	n-Hexan, n-Heptan 1,4-Cyklohexadien, Aziridin ↑	89%	73%
	Dysbioseindex	↑	-	-
IBS-D vs. CED	Anti-CdtB AK	↑	43%	92%
	Anti-Vinculin AK	↑	32%	84%
	Fäkale VOMs	Cyclohexancarbonsäure ↑	96%	80%
IBS-C vs. Gesunde	Methanproduktion	↑	91%	81%
FD vs. Gesunde	Aminosäuren und Phospholipide	Leucin / Isoleucin ↓ Phosphatidycholin ↑	-	-
	Mikro RNA	exosomale hsa-miR-933 ↓	-	-

Obwohl viele Einzelstudien vielversprechende Ergebnisse gegenüber den auf subjektiven Patientenbeobachtungen aufgebauten Rome-Kriterien liefern, bestehen noch immer verschiedene Schwachstellen bei der Marker-basierten Diagnostik.

- a) Für die funktionelle Dyspepsie sind bislang nur sehr wenige inkonsistente Ergebnisse dargestellt, die häufig aufgrund kleiner Stichprobengrößen weiter abklärungsbedürftig sind.
- b) Die beschriebenen Mikrobiomveränderungen von IBS und FD sind sehr heterogenen, sodass bislang noch kein eindeutiges reproduzierbares „Krankheits-Profil“ identifiziert werden konnte.

- c) Marker, die aus Metaboliten der Darmbakterien abgeleitet sind (SCFA, VOMs, VOCs), können nur in Anwesenheit der metabolisch aktiven Organismen gebildet werden und sind demnach nur bei Vorliegen einer Dysbiose verändert nachweisbar.
- d) Die Sensitivität der Anti-CdtB-, und Anti-Vinculin-Antikörper (43% und 32 %) ist zur Diagnosestellung nicht ausreichend hoch. Zudem konnten diese Marker nicht in allen Studien als Diagnostikmarker für IBS-D bestätigt werden.

Das Prinzip der Anti-CdtB- bzw. Anti-Vinculin-Antikörper als Biomarker, baut auf einem von Pimentel et al. [105] vermuteten Prozess der PI-IBS Entstehung auf. Das Cytolethal distending Toxin (Cdt) wird von Bakterien gebildet, die beim Menschen eine Gastroenteritis verursachen. Hierzu zählen vor allem die Gram negativen Bakterien *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*, *Escherichia coli* und *Shigella* [106–109]. Basierend auf Tierexperimenten in Ratten [4] wird folgende Pathophysiologie vermutet: Nach einer Gastroenteritis, bei der sich der Wirt mit CdtB bildenden Keimen infiziert hat, kommt es zur Antikörperbildung gegen das Toxin. Diese Antikörper erkennen durch Molecular Mimikry neben dem eigentlichen Antigen, dem Toxin CdtB, auch ähnliche Epitope im körpereigenen intestinalen Protein Vinculin. Hierdurch kommt es zu einer Aktivierung autoreaktiver B- und T-Zellen und letztendlich zur Produktion von Autoantikörpern gegen Vinculin. Dem Protein Vinculin kommt als Bindeglied von Integrinen und Cadherinen mit dem Aktinzytoskelett eine Schlüsselrolle bei der korrekten Funktionalität der epithelialen Barrierefunktion zu [110]. Des Weiteren kommt es in myenterischen Ganglien und Cajal-Zellen vor, die als spezialisierte Nervenzellen die Schrittmacherfunktion und somit die Peristaltik des Magen-Darm-Traktes kontrollieren. Durch Autoantikörper gegen Vinculin kommt es zu einer verminderten Anzahl an Cajal-Zellen und myenterischen Nerven, vor allem im tiefen muskulären Plexus, was zu einer verlangsamten Darmmotilität und damit ggf. zu SIBO führt [111].

Für Patienten mit FD wurde ein Zusammenhang zwischen erhöhten Anti-Vinculin Antikörpertitern und reduzierter Anzahl an Cajal-Zellen in der gastralen zirkularen Muskelschicht sowie dem myenterischen Plexus des Magens beschrieben [112]. Somit liegt es nahe, dass eine ähnliche Pathophysiologie für die Entwicklung der funktionellen Dyspepsie angenommen werden kann.

1.6 Nutzung der Anti-CdtB und Anti-Vinculin Antikörper zur Diagnosestellung

Nachfolgende Human-Studien wurden durchgeführt, um die Anwendbarkeit der Anti-CdtB- sowie Anti-Vinculin-Antikörper als serologische Diagnostikmarker zu prüfen.

- a) Die Pionierstudie aus dem Jahr 2015 [105] zeigte signifikant höhere Anti-CdtB- sowie Anti-Vinculin-titer bei IBS-D Patienten als bei den anderen Vergleichsgruppen mit Diarrhö (CED, Zöliakie) und Gesunden ($p < 0,001$).
- b) In einer ähnlichen Studie aus Mexiko [113] zeigte sich bei 50% der IBS-D Probanden, sowie bei 33% der IBS-M Probanden, ein positiver Biomarker Nachweis ($p < 0,05$), während bei funktioneller Diarrhoe und nicht klassifizierter funktioneller Darmerkrankung keine erhöhten Werte gemessen wurden. Jedoch wurden keine signifikanten Unterschiede bzgl. der AK-Positivität zwischen PI-IBS (71,4%) und nicht PI-IBS (41,7%) beobachtet.
- c) Eine weitere Studie untersuchte subgruppenspezifische Unterschiede der Anti-CdtB- und Anti-Vinculin Antikörpertiter [114]. Messungen zeigten sowohl bei beiden Antikörpertitern als auch bei den Positivraten, einen signifikanten negativen Gradienten von IBS-D und IBS-M über IBS-C hinzu den gesunden Kontrollen ($p < 0,001$).
- d) Die Studie von Talley et. al [115] konnte in einer australischen Kohorte die oben beschriebenen IBS-Ergebnisse nicht bestätigen. Hier wurden jedoch signifikant erhöhte Anti-CdtB Antikörpertiter beim Vergleich zwischen FD und Gesunden, sowie bei IBS/FD Overlap vs. Gesunde nachgewiesen.

Für Europa liegen bislang noch keine fundierten Studien zur Bewertung der Antikörper als Biomarker für eine bessere Diagnosestellung vor. Eine Zusammenfassung der vorliegenden Studien zu Anti-CdtB und Anti-Vinculin Antikörpern zur Diagnosestellung bei Patienten mit FGIDs ist im Anhang D tabellarisch dargestellt.

1.7 Nutzung der Mikrobiomanalysen zur Diagnosestellung

Aufgrund der bedeutenden Rolle des Mikrobioms in der Pathophysiologie von FGID's, beschäftigten sich bereits zahlreiche Studien mit der Analyse von spezifischen

Mikrobiotaprofilen für die unterschiedlichen Krankheitsbilder. In bislang vorliegenden Studien konnten jedoch keine einheitlichen „Musterprofile“ für die verschiedenen (Sub-)gruppen erarbeitet werden, was möglicherweise auf verschiedene Analysemethoden, die große biologische Variabilität und unterschiedliche Stichprobengröße/ Studiendesign sowie -Einschlusskriterien zurückzuführen ist.

Außerdem wird vielfach darüber diskutiert, wie diese komplexen und zahlreichen Informationen der Mikrobiomanalysen klinisch genutzt werden können. Zur erleichterten Anwendung entwickelten Casén et.al [104] den GA-map®- Dysbiose Test, der auf folgendem Prinzip beruht: Die zu untersuchenden Stuhlproben werden mit zuvor berechneten normobiotischen Profilen, die als Referenzwert dienen, verglichen. Hierzu wurden zum Vergleich insgesamt 48 bakterielle Sonden identifiziert, welche die Bereiche V3 bis V9 auf der 16S-rRNA Sequenz abdecken. Es können insgesamt 300 verschiedene Bakterienstämme aus den 6 Phyla *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Tenericutes* und *Verrucomicrobia* detektiert werden. Die Unterschiede (in Bakterienabundanz und -profil) zu den normobiotischen Referenzprofilen werden je nach Abweichungsgrad anhand eines algorithmisch abgeleiteten Dysbioseindex klassifiziert, welcher abhängig vom Dysbiosegrad die Werte 1 bis 5 einnehmen kann, Werte >2 gelten hierbei als dysbiotisch (3=milde Dysbiose, 4-5=schwere Dysbiose). Somit können die großen „Datenmengen“ der Sequenzierung zu einem einfachen und klinisch verwendbaren Zahlenwert kondensiert werden.

1.8 Zielsetzung

Obwohl bereits viele Studien verschiedene Biomarker für funktionelle gastrointestinale Erkrankungen untersucht haben, wurden bislang noch keine reproduzierbaren und einheitlichen Ergebnisse, die eine breite klinische Anwendung erlauben würden, geliefert. In den weitaus meisten Studien wurden a) serologische Biomarker erforscht, die andere gastrointestinale Erkrankungen beweisen und IBS damit lediglich ausschließen können, sowie b) Biomarker untersucht, die nur in bestimmten Phasen der Erkrankung nachweisbar sind, sowie c) Mikrobiomprofile analysiert, die bislang vielversprechende jedoch sehr heterogene Ergebnisse lieferten.

Aufgrund der weltweit hohen Prävalenz an IBS und FD ist es jedoch dringend notwendig, ein Diagnostikverfahren mit ausreichender Sensitivität zur Erfassung möglichst aller Erkrankten, hoher Reproduzierbarkeit, sowie eindeutiger (Sub-)gruppen Zuordnung zu etablieren.

Daher war Ziel dieser Arbeit:

1. subgruppenspezifische Unterschiede in den Anti-CdtB -und Anti-Vinculin Antikörpertitern zu untersuchen,
2. durch Sequenzieren der bakteriellen DNA (anhand des GA-map®-Dysbiose Tests), subgruppenspezifische Mikrobiom-Abweichungen von gesunden Referenzprofilen (als Dysbioseindizes) zu vergleichen und
3. eine ggf. bestehende Abhängigkeit von mikrobiellen Veränderungen zu Antikörper-Titern zu untersuchen.

Hierzu wurden die Mikrobiotaabweichungen sowie Dysbioseindizes von Patienten mit IBS-D, IBS-C sowie FD und Gesunden, wie auch die Anti-CdtB- und Anti-Vinculin Antikörpertiter dieser Gruppen analysiert, um aufbauend auf eventuellen gruppenspezifischen Unterschieden, Grundlagen für die Entwicklung von neuen Diagnostikmarkern sowie verbesserten Therapieansätzen liefern zu können.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Studiendesign EMGASTA

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einer Subkohorte (IBS/FD) innerhalb der Studie EMGASTA („Bedeutung der Ernährung, des gastrointestinalen Mikrobioms und eines gesunden Gastrointestinaltraktes für die Autonomie des alternden Menschen“, DRKS-ID: DRKS00009737), welche in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg durchgeführt wurde. Die Studie wurde in der Forschungsgruppe „Autonomie im Alter“ in Sachsen-Anhalt realisiert und von der Europäischen Kommission durch den „Europäischen Fond für regionale Entwicklung“ (EFRE) sowie vom Regionalministerium für Wirtschaft, Wissenschaft und Digitalisierung mitfinanziert. Außerdem wurde sie ebenfalls in Kollaboration mit dem Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig durchgeführt und durch die Projekte der Helmholtz-Gemeinschaft iMed (Helmholtz Initiative on Personalized Medicine) und AMPro (Altern und metabolische Programmierung) unterstützt. EMGASTA, als monozentrische, explorative und prospektive Querschnittsstudie, hat neben gesunden alten Probanden (über 40 Jahren), Patienten mit funktionellen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, Magenkarzinom, Pankreaskarzinom, kolorektalem Karzinom oder neurodegenerativer Erkrankung untersucht. Primärer Endpunkt der Studie war es, Unterschiede im gastrointestinalen Mikrobiom in Hinblick auf dominante Genera zwischen gesunden alten Menschen und oben genannten Gruppen zu identifizieren. Die Studie wurde der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg vorgelegt und genehmigt (siehe Anlage B im Anhang). Die Studiendurchführung erfolgte unter Beachtung der GCP-Leitlinien sowie der Deklaration von Helsinki.

2.2 Patientenkollektiv und Ein- und Ausschlusskriterien

Patienten mit funktionellen gastrointestinalen Erkrankungen sowie gesunde Probanden wurden prospektiv im Rahmen der EMGASTA-Studie zwischen Oktober 2015 und März 2017 an der Universitätsklinik Magdeburg rekrutiert.

Die Studienkohorte umfasste insgesamt 65 Personen, darunter 15 Patienten mit IBS-D (männlich: 5, weiblich: 10, Durchschnittsalter $43,5 \pm \text{SD } 20,6$ Jahre), 13 Patienten mit IBS-C (männlich: 3, weiblich: 10, Durchschnittsalter $50,6 \pm \text{SD } 18,2$ Jahre), 15 Patienten mit FD (männlich: 7, weiblich: 8, Durchschnittsalter $48,7 \pm \text{SD } 17,6$ Jahre) and 22

gesunde Kontrollen (männlich: 10, weiblich: 12, Durchschnittsalter $54,8 \pm \text{SD } 11,2$ Jahre).

Der **Einschluss** für Patienten mit IBS in die Studie erfolgte, wenn folgende Kriterien erfüllt waren:

- Reizdarmsyndrom oder funktionelle Dyspepsie entsprechend der Rome-III-Kriterien
- Alter ≥ 18 Jahre

Der **Einschluss** für gesunde Patienten in die Studie erfolgte, wenn folgende Kriterien erfüllt waren:

- > 40 Jahre
- keine gastrointestinale Erkrankung, Tumorerkrankung in den letzten 5 Jahren, schwerwiegende therapiepflichtige Stoffwechsel- oder kardiovaskuläre Erkrankung oder neurodegenerative Erkrankungen

Der **Ausschluss** für Patienten mit IBS in die Studie erfolgte, wenn folgende Kriterien erfüllt waren:

- Antibiotische Therapie innerhalb der letzten 8 Wochen
- Zustand nach:
 - ausgedehnten abdominellen Operationen
 - Chemotherapie
 - Strahlentherapie
 - Immunsuppressiver Therapieinnerhalb der letzten 2 Jahre.

Der **Ausschluss** für gesunde Patienten in die Studie erfolgte, wenn folgende Kriterien erfüllt waren:

- Einnahme von Antibiotika innerhalb der letzten 8 Wochen
- regelmäßige Therapie mit PPI

2.3 Stuhlgewinnung und -lagerung

Die Stuhlproben (für die RNA Extraktion) wurden mit Hilfe eines sterilen Stuhl-Proben Sammelkit gesammelt (PT26.1; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland). Die Proben wurden innerhalb von 4-8 Stunden in das Labor transportiert, wo sie für mindestens 4 Stunden

(maximal 8 Stunden) bei Raumtemperatur belassen wurden, bevor sie bis zur weiteren Analyse bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden. Bei einer Teilmenge der Patientenkohorte (13 mit IBS-D, 11 mit IBS-C, 14 mit FD und 15 Gesunde) wurden die Stuhlproben anschließend zur Mikrobiomanalyse nach Oslo (GA Analysis) versandt. Der Schifftransport der Proben an das zuständige Analyselabor in Oslo wurde in einer Box zur ausreichenden Kühlung mit 5kg Trockeneis vorgenommen.

2.4 DNA-Extraktion und Amplifikation

Die Stuhlproben wurden in einem Verhältnis 1:3 mit „stool transport“ und Rückgewinnungspuffer (Roche, Basel, Schweiz) per Vortexen gemischt. Alle Proben wurden impulszentrifugiert und $600\text{ }\mu\text{l}$ wurden in eine 96-well Lysing Matrix E rack (MP Biomedicals Inc., Santa Ana, CA, USA) gegeben. Anschließend wurden die Proben zweimal in einem FastPrep-96™ (MP Biomedicals Inc.) bei 1800 rpm für 40 Sekunden mechanisch lysiert, zwischen den Schritten lag eine Pause von 40 Sekunden. Die lysierten Proben wurden daraufhin zentrifugiert (5 min, 1300 g , PlateSpin II Zentrifuge, Kubota, Tokyo, Japan) und anschließend wurden $250\text{ }\mu\text{l}$ mit $250\text{ }\mu\text{l}$ Lysepuffer BLM und $20\text{ }\mu\text{l}$ Protease 15 Minuten lang bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Eine $400\text{ }\mu\text{l}$ große Teilportion jeder Protease-behandelten Stuhlprobe wurde genutzt, um die gesamte genomische DNA entsprechend der mag™ maxi kit Anleitung (LGC Genomics, Berlin, Germany) zu extrahieren. Diese Schritte sind angepasst an den MagMAX™ express 96 DNA Extraktionsroboter (Life Technologies, Waltham, MA, USA). Die Primer der PCR (GA-map™ Vorwärts primer 5'-TCCTACGGGAGGCAGCAG-3', GA-map™ Rückwärts primer 5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3', welche durch US20110104692 A1 geschützt wurden, haben an Gen 8,9 der 16S rRNA gebunden. Sie wurden genutzt, um 1180 basenpaar große Fragmente zu amplifizieren, die aus 7 variablen Regionen (V3-V9) bestehen. Auf diesen Schritt folgte ein „reaction clean-up“.

2.5 Single Base Extension, Hybridisierung und Nachweis

Das PCR-Template ($> 75\text{ ng}$) wurde wie in der von Vebø et al.[116] beschriebenen Single-Nucleotide-Extension (SNE) -Reaktion verwendet, jedoch mit den folgenden Modifikationen: Ein Endvolumen von $25\text{ }\mu\text{l}$, welches $0,5\text{ }\mu\text{M}$ BIOTIN-11-ddCTP (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) enthielt, wurde in 5 Markierungszyklen verwendet, um einen Sondensatz von 49 Sonden ($0,01\text{ }\mu\text{M}$) (48 Bakterienzielsonden und eine

Universalkontrolle) zu markieren. Komplementäre Sonden, die an Carboxyl-markierte-Magnetkügelchen (BMBs, Applied BioCode, Santa Fe Springs, CA, USA) gekoppelt waren, wurden mit den SNE-Sonden hybridisiert und unter Verwendung eines BioCode 1000A-Analysators (Applied BioCode) quantifiziert. Es wurde eine 10 μl SNE Probe zu einem 40 μl Reaktionsvolumen gegeben, das 31,2 μl BMB Puffer, die Hybridisierungskontrolle und 1,8 μl gekoppelte BMBs enthielt. Die Proben wurden 3 min bei 700 $\frac{\text{U}}{\text{min}}$ und 95 °C inkubiert, gefolgt von 15 min bei 700 $\frac{\text{U}}{\text{min}}$ und 45 °C in einem Vortemp™ 56 (Labnet International Inc., Edison, NJ, USA). Eine 25 μl große Teilprobe BMB-Puffer, die 20 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Streptavidin-R-Phycoerythrin LumiGrade ultrasensitive Reagenz (Roche) enthielt, wurde jeder Probe vor 90 Minuten Inkubation bei 700 $\frac{\text{U}}{\text{min}}$ und 45 °C zugesetzt. Schließlich wurden die Proben gemäß den Empfehlungen von Applied Bio-Code gewaschen. Das Hybridisierungssignal wurde von der BioCode 1000A Analyser-Software (Applied BioCode) verarbeitet. Die Software identifizierte und quantifizierte Mediansignale, „bead count“ und „Flags“, die Rohdatendateien wurden zur weiteren Analyse exportiert.

2.6 Plasmagewinnung und –Vorbereitung

Jedem Patienten wurde venöses Blut in EDTA-Röhrchen (BD Vacutainer RST, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) abgenommen. Hiervon wurden bei Patienten mit IBS/FD und den gesunden Kontrollen mindestens 3 ml Blut zur Bestimmung der Anti-CdtB- und Anti-Vinculin-Antikörpertiter benötigt. Die Blutproben wurden zur Vorbereitung auf die ELISA-Testung 10 Minuten bei 3050 $\frac{\text{U}}{\text{min}}$ zentrifugiert, wovon anschließend Aliquoten von 1 ml EDTA-Plasma vorbereitet und bei –80 °C gelagert wurden. Zum Verschiffen wurden die gefrorenen Plasma-Röhrchen auf Trockeneis gelagert und versandt.

2.7 ELISA Testing

Der ELISA zum Nachweis von Anti-CdtB- sowie Anti-Vinculin Antikörpern wurde im Labor von Commonwealth Diagnostics International in Salem, Massachusetts durchgeführt.

Hierzu wurden komplett rekombinantes Campylobacter CdtB protein (Creative Biomart, Shirley, NY) sowie humanes Vinculin in Gesamtlänge (Novoprotein, Short Hills, NJ) mit einer Konzentration von 1,2 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ als Antigene verwendet. Die Antigene wurden in Borat

gepufferter Kochsalzlösung (BBS)* (Medicago, Uppsala, Sweden) bei einem pH-Wert von 8,2 sowie bei 4 °C über Nacht in den Vertiefungen einer 96-Mikrotiterplatte (Grenier Bio-One, Monroe, NC) immobilisiert. Die Vertiefungen wurden abwechselnd entweder mit Antigen beschichtet oder in Borat gepufferter Kochsalzlösung unbeschichtet gelassen, um das Ausmaß an nichtspezifischer Plasmabindung zu bestimmen. Anschließend wurden die Vertiefungen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 3%igem Rinderserumalbumin in Phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS)* geblockt. Die beschichteten sowie die unbeschichteten Vertiefungen wurden anschließend bei Raumtemperatur für eine Stunde mit 1:512 verdünntem Plasma für CdtB, sowie mit 1:32 verdünntem Plasma für Vinculin inkubiert. Antikörper gegen CdtB und Vinculin wurden als Positiv-, sowie Negativkontrollen verwendet. Anschließend folgte eine einstündige Inkubation mit Meerrettichperoxidase konjugierten sekundären Antikörpern (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) die an den Fc-Teil des humanen IgG gebunden haben. Nach jedem Schritt folgte eine Reihe an Waschvorgängen mit 0,05% Phosphatgepufferter Kochsalzlösung-Tween 20. Zum Schluss wurde zur Visualisierung eine 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine Substratlösung (Pierce, Rockford, IL) genutzt, welche nach Ablauf der Inkubationsdauer auf einem BioTek Epoch 2 Plattenleser (Winooski, VT) abgelesen wurde. Die Optischen Dichten wurden bei 370 nm und 90 Minuten abgelesen.

*Zusammensetzung PBS: NaCl:140,0 mM, Na₂HPO₄:10,0 mM, KCL: 2,7mM, KH₂PO₄: 1,8mM, auf PH 7,3-7,4 einstellen, *BBS: NaCl: 150,0 mM, Borat Puffer: 10,0 mM

2.8 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung wurde mit Unterstützung der Kollegen des Instituts für medizinische Biometrie und Informatik der Universitätsklinik Magdeburg durchgeführt. Die bioinformatischen Berechnungen sowie die Auswertungen der Mikrobiomdaten wurden in Kooperation mit Genetic analysis in Oslo vorgenommen.

Zur Analyse der deskriptiven Statistik sowie der Antikörpertiter wurden zunächst die Daten in einer Excel Tabelle zusammengetragen, um anschließend mit dem Statistikprogramm IBM SPSS Statistics 21.0.0 (IBM Corporation, New York, N.Y., USA) ausgewertet zu werden. Die Ergebnisse wurden durch die jeweiligen Mittelwerte ± Standardabweichungen angegeben. Um Geschlechtsunterschiede zwischen den Kohorten zu beurteilen, wurden Kreuztabellen errechnet und die Variablen mittels Chi-Quadrat Test und Fischer Test auf ihre Signifikanz hin überprüft. Zum Bewerten der Antikörper-Positivität kam entsprechendes Verfahren zum Einsatz. Zur Auswertung von Altersunterschieden, sowie zur Beurteilung der Antikörpertiter der verschiedenen

Kohorten, wurden die Stichproben zunächst mittels Shapiro-Wilk Test auf das Vorliegen einer Normalverteilung hin getestet. Um statistische Unterschiede zwischen zwei oder mehreren Gruppen zu bewerten, wurden der Mann-Whitney-U-Test und der Kruskal-Wallis-Test für nicht normalverteilte Daten durchgeführt, während normalverteilte Variablen mit Einweg-ANOVA und Dunnetts Post-Hoc über mehr als zwei Gruppen hinweg verglichen wurden. Des Weiteren wurden Einzelanalysen durchgeführt, die der Untersuchung möglicher Einflussfaktoren auf die Antikörperwerte dienten. Hierzu wurde mittels Rangkorrelation nach Spearman, ein Effekt verschiedener Parameter auf die Antikörperwerte getestet und anhand des Mann-Whitney-U-Tests auf ihre Signifikanz hin geprüft. Die Korrelation der in den Einzelanalysen als signifikant erwiesenen Variablen, wurde anhand linearer Regression analysiert. Zuvor konnte anhand einer Varianzanalyse (ANOVA) die Signifikanz des Modells bewiesen werden. Alle Tests wurden zweiseitig mit einem auf 0,05 eingestellten Signifikanzniveau durchgeführt.

Die Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA) wurde verwendet, um die Variation der Mikrobiota zwischen den Gruppen sowie zwischen antikörperpositiven und -negativen Probanden zu untersuchen. Die Analyse wurde an skalierten und logarithmisch transformierten GA-map®-Signalstärkedaten in R unter Verwendung des Stats-Pakets durchgeführt.

Orthogonal partial least squares-discrimination analysis (OPLS-DA) wurde an skalierten und logarithmisch transformierten GA-map®-Signalstärkedaten unter Verwendung des Bioconductor-Pakets in orthogonalen R-5-Komponenten durchgeführt. Bei der Analyse wurde eine „leave-one-out“ Kreuzvalidierung verwendet. Die Ergebnisse werden durch zwei Hauptparameter erklärt: R²Y und Q². R²Y beschreibt, wie gut das Modell die beiden Gruppen trennt (Anpassungsgüte), wobei Werte $\geq 0,5$ eine gute Unterscheidung definieren (bestmögliche Anpassung mit R²Y = 1). Q² zeigt die diskriminante Vorhersagefähigkeit des Modells (Vorhersagegüte), wobei Werte $\geq 0,5$ eine hohe Vorhersagefähigkeit definieren (eine gute Vorhersagefähigkeit wird durch einen Wert nahe R²Y angezeigt).

Um die Bakterienmarker mit signifikanten Unterschieden in der Signalstärke (zwischen gesunden und FGID-Untergruppen sowie zwischen antikörperpositiven und antikörpernegativen Individuen) zu identifizieren, wurden die p-Werte für jeweils 48 Bakterienmarker anhand der Wilcoxon-Rangsumme und des signierten Rangtests berechnet. Um dem Problem der Mehrfachvergleiche entgegenzuwirken, wurde eine Bonferroni-Korrektur auf die p-Werte angewendet, um zu entscheiden, ob es einen signifikanten Unterschied gab ($p_{adj} < 0,05$).

3 ERGEBNISSE

3.1 Patientenkollektiv und Charakteristika

Insgesamt wurden unter Berücksichtigung der Ausschlusskriterien 65 Patienten rekrutiert, hierunter fielen 22 gesunde Probanden, 15 Patienten mit funktioneller Dyspepsie, 15 Patienten mit IBS-D sowie 13 Patienten mit IBS-C (siehe *Tabelle 3*). Für die Analyse des Mikrobimprofils wurde von einer etwas kleineren Subkohorte der oben genannten Gesamtkohorte ausgegangen, welche insgesamt 53 Patienten einschloss (15 Gesunde, 14 Patienten mit Funktioneller Dyspepsie, 13 Patienten mit IBS-D sowie 11 Patienten mit IBS-C).

Tabelle 3: Patienten Demografie, Alter wird angegeben in Mittelwert \pm Standardabweichung, Mikrobiom-Subkohorte wird in Klammern angegeben

Kohorte	Patienten (Anzahl)	Alter (Spannweite in Jahren)	Geschlecht Weiblich		Geschlecht Männlich	
			Abs.	Rel.	Abs.	Rel.
Gesunde	22 (15)	54,8 \pm 11,2 (40-75) (58,6 \pm 11,0 (44-75))	12 (8)	54,5% (53,3%)	10 (7)	45,5% (46,7%)
Funktionelle Dyspepsie	15 (14)	48,7 \pm 17,6 (21-73) (49,1 \pm 18,2 (21-73))	8 (7)	53,3% (50,0%)	7 (7)	46,7% (50,0%)
IBS-Diarrhoe	15 (13)	43,5 \pm 20,6 (22-72) (43,38 \pm 21,5 (22-72))	10 (9)	66,7% (69,2%)	5 (4)	33,3% (30,8%)
IBS-Obstipation	13 (11)	50,6 \pm 18,2 (28-82) (51,3 \pm 17,8 (32-82))	10 (8)	76,9% (72,7%)	3 (3)	23,1% (27,3%)

Die gesunden Probanden erwiesen sich mit durchschnittlich 54,8 Jahren sowohl in der Gesamtkohorte als auch mit 58,6 Jahren in der Mikrobiom-Subkohorte, als älteste Vergleichsgruppe. Hier war der jüngste Proband der Gesamtkohorte (entsprechend der Einschlusskriterien) 40 Jahre-, der älteste 75 Jahre alt, in der Subkohorte entsprechend 44 sowie 75 Jahre alt. Patienten mit IBS-C und funktioneller Dyspepsie waren mit einem Durchschnittsalter von 50,6 Jahren (Subkohorte: 51,3 Jahre) bzw. 48,7 Jahren (Subkohorte: 49,1 Jahre) ähnlich alt, während die Gruppe mit IBS-D mit einem Durchschnittsalter von 43,5 Jahren (Subkohorte: 43,38 Jahre) nochmals deutlich jünger war. Trotz des markanten Altersunterschieds von bis zu 15 Jahren (bei Einzelpersonen) zwischen Kontrolle und IBS-D ergab sich hier jedoch für das Gesamtkollektiv kein statistisch signifikanter Altersunterschied zwischen den Gruppen (Gesamtkohorte $p =$

0,342, Subkohorte $p = 0,233$). Auffallend war jedoch die nicht normalverteilte Altersstreuung zu Gunsten jüngerer Probanden sowohl innerhalb der IBS-D Gruppe der Gesamtkohorte als auch innerhalb der IBS-D Gruppe der Subkohorte ($p = 0,005$).

In Hinblick auf die Geschlechtsverteilung konnte in der gesunden Kontrollgruppe und der Gruppe mit funktioneller Dyspepsie mit 50 % – 54,5 % weiblicher Probanden von einer ausgeglichenen Verteilung ausgegangen werden, bei der Gruppe mit IBS-D und IBS-C gab es einen deutlich höheren Anteil weiblicher Probanden, der jedoch ohne Signifikanz blieb (Gesamtkohorte $p = 0,503$, Subkohorte $p = 0,58$).

3.2 Vergleich von Anti-CdtB- und Anti-Vinculin-Titern sowie - Positivitätsraten zwischen den Kohorten

Um das Vorliegen von IBS nicht nur anhand der beim Einschluss genutzten Rom-III Kriterien, sondern durch Nutzung objektiv messbarer Parameter zu überprüfen, wurde die Höhe der Antikörper Titer gegen Vinculin und CdtB mittels eines indirekten ELISA's ermittelt.

3.2.1 Vergleich der Anti-CdtB-Titer sowie -Positivitätsraten

Beim Vergleich der so bestimmten Anti-CdtB-Antikörper-Titer ergaben Messungen mit $2,72 \pm 0,71$ die höchsten Anti-CdtB-AK Werte für IBS-C, gefolgt von funktioneller Dyspepsie ($2,62 \pm 0,66$), gesunden Kontrollen ($2,53 \pm 0,74$) und IBS-D ($2,35 \pm 0,81$) mit jeweils niedrigeren Titerwerten (siehe *Tabelle 4*).

Tabelle 4: Mittelwerte und Standardabweichung der OD von Anti-CdtB-AK und Anti-Vinculin-AK sowie Positivitätsraten (in Prozent angegeben).

	Kohorte	Anti-CdtB (Mittelwert+SD)	Anti-CdtB (Pos.rate, %)	Anti-Vinculin (Mittelwert+SD)	Anti-Vinculin (Pos.rate, %)
„Nicht IBS“	Gesund	$2,53 \pm 0,74$	40,9	$1,60 \pm 1,01$	36,4
	Funktionelle Dyspepsie	$2,62 \pm 0,66$	40,0	$1,30 \pm 0,84$	33,3
IBS	IBS-Diarrhoe	$2,35 \pm 0,81$	33,3	$0,86 \pm 0,85$	13,3
	IBS-Obstipation	$2,72 \pm 0,71$	53,8	$1,26 \pm 0,70$	30,8

Da die gemessenen Antikörpertiter nicht bei allen Gruppen einer Normalverteilung gleichen (keine Normalverteilung bei *Anti-Vinculin*-Werten von IBS-D und Gesunden), wurden die im Anhang (Anhang A) aufgeführten Originaldaten der Antikörpertiter jeweils zu Boxplots der unterschiedlichen Gruppenwerte zusammengefasst (siehe *Abbildung 2*).

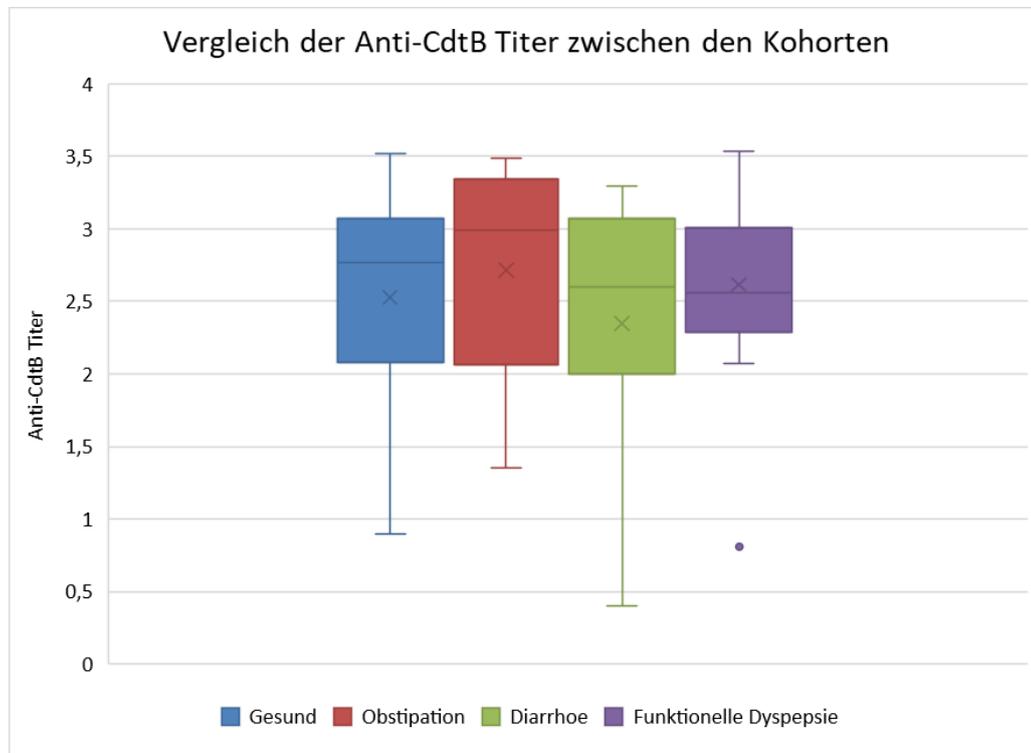


Abbildung 2: Vergleich der Anti-CdtB-Antikörpertiter zwischen den Gruppen. Keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den Kohorten. Punkte repräsentieren Ausreißer.

Die *Anti-CdtB*-Werte der 4 Gruppen folgten jedoch einer Normalverteilung, hier grenzte sich die Kohorte mit funktioneller Dyspepsie durch einen kleineren Interquartilabstand, eine geringere Spannweite sowie ein Ausreißer nach unten von den anderen Vergleichsgruppen ab. Nichtsdestotrotz zeigten sich beim Gesamttest ($p = 0,598$), wie auch bei den paarweisen Vergleichen (IBS-C vs. Gesund $p = 0,413$, FD vs. Gesund $p = 0,853$, IBS-C vs. IBS-D $p = 0,16$, IBS-D+IBS-C vs. Gesunde $p = 0,938$) keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

Auch beim Vergleich der Antikörpertiter der IBS-Gruppen (IBS-C und IBS-D) mit den „Nicht-IBS“ Gruppen (Gesunde und Funktionelle Dyspepsie) sind keine signifikanten Unterschiede erkennbar ($p = 0,947$).

Basierend auf den von Pimentel et al. [105] ermittelten optimalen Cut-off Werten für Positivität ($> 2,80$ für *Anti-CdtB*) wurde zusätzlich der prozentuale Anteil an antikörperpositiven Probanden (*Anti-CdtB* positiv) innerhalb der Kohorten verglichen (siehe *Abbildung 3*).

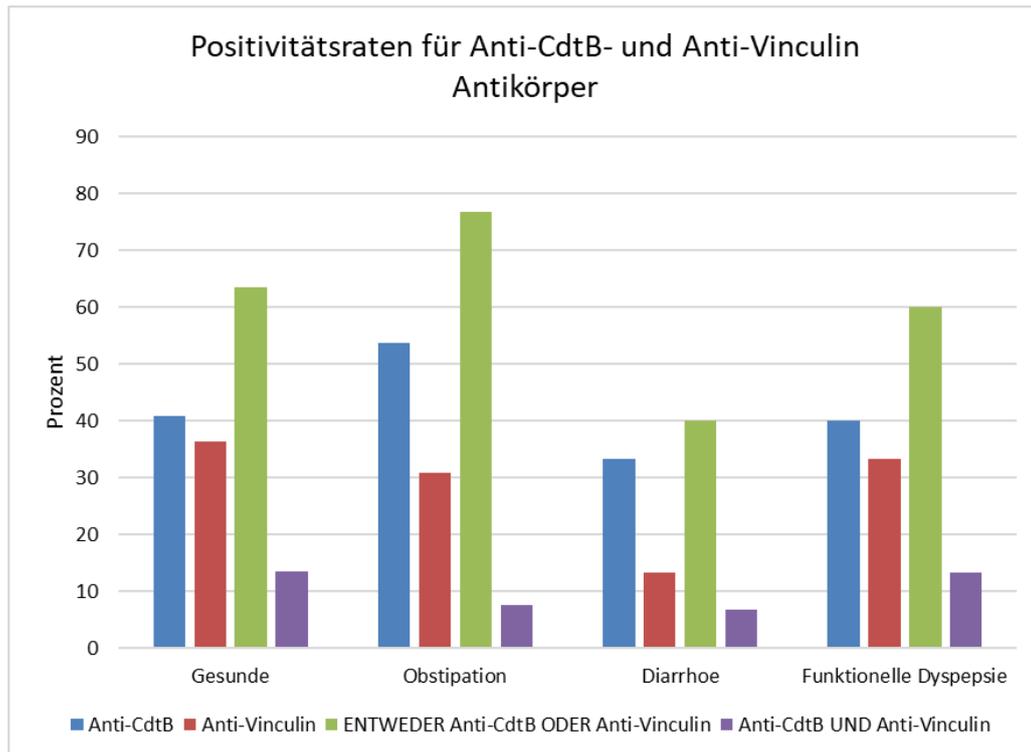


Abbildung 3: Positivitätsraten für Anti-CdtB- sowie Anti-Vinculin Antikörper. Keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Hierbei wiesen 53,8% der Patienten der IBS-C Kohorte positive Anti-CdtB Antikörperwerte auf, die restlichen Vergleichsgruppen folgten mit 40,9% (Gesunde), 40,0% (FD) und 33,3% (IBS-D). Bei der Gegenüberstellung der Patienten mit einem positiven Biomarkernachweis konnten weder zwischen den einzelnen Kohorten beim Gesamttest ($p = 0,742$), noch beim paarweisen Vergleich (IBS-C vs. Gesund $p = 0,458$, IBS-C vs. IBS-D $p = 0,274$) oder zwischen IBS und "Nicht IBS" Gruppen ($p = 0,851$), statistisch relevante Unterschiede aufgezeigt werden.

3.2.2 Vergleich der Anti-Vinculin-Titer sowie -Positivitätsraten

Im Vergleich zu den Anti-CdtB-Titern wurden bei den auf gleiche Weise gemessenen Anti-Vinculinwerten (siehe *Tabelle 4*) bei gesunden Probanden ($1,60 \pm 1,01$) die höchsten Titer nachgewiesen, Patienten mit funktioneller Dyspepsie ($1,30 \pm 0,84$) sowie IBS-C Patienten ($1,26 \pm 0,70$) zeigten ähnliche Werte auf als Patienten mit IBS-D ($0,84 \pm 0,85$).

Da die Antikörperwerte in der Kohorte IBS-D und bei den Gesunden nicht normalverteilt waren, stellt *Abbildung 4* den Vergleich der Anti-Vinculin Titer der vier untersuchten Kohorten in Boxplots dar.

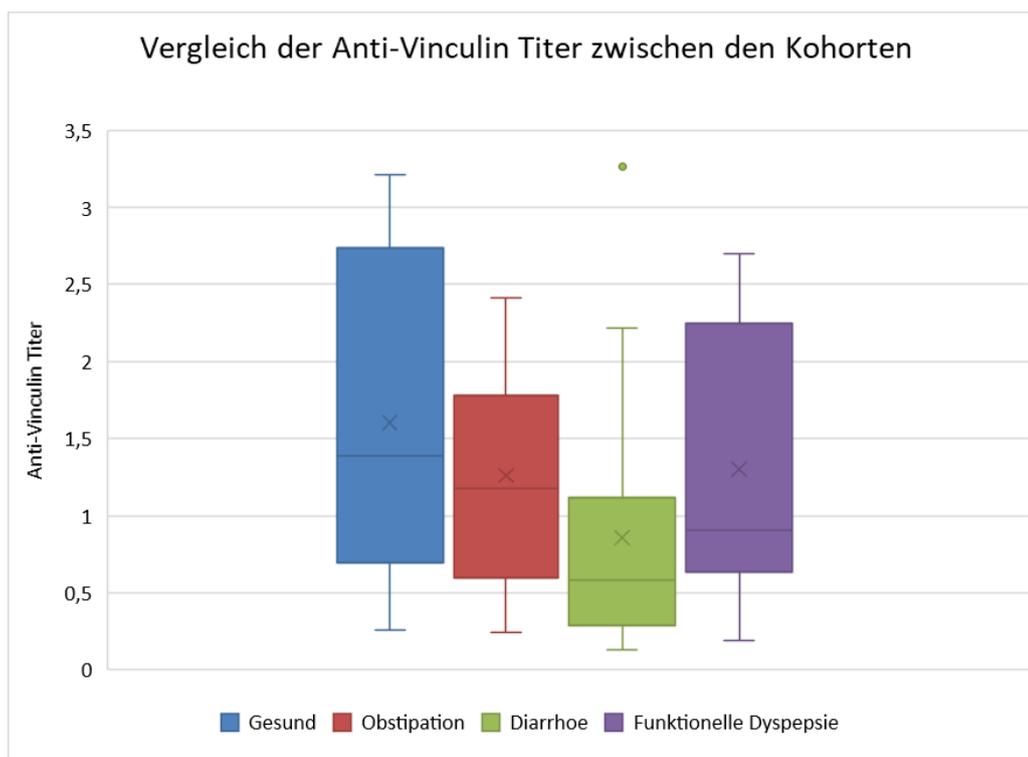


Abbildung 4: Vergleich der Anti-Vinculin-Antikörpertiter zwischen den Gruppen. Keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den Kohorten. Punkte repräsentieren Ausreißer.

Hierbei bildete die Kohorte der gesunden Probanden im Vergleich zu allen anderen Kohorten die größte Spannweite, sowie einen überdurchschnittlich großen Interquartilabstand ab. Die Gruppe IBS-D hingegen charakterisierte sich durch eine geringe Spannweite, sowie einen geringen Interquartilabstand mit einem Ausreißer nach oben.

Vergleicht man die Anti-Vinculin-Antikörper Titer der Kohorten untereinander, so zeigte sich im Gesamttest ein tendenziell signifikanter Zusammenhang ($p = 0,076$) zwischen den Gruppen. Beim paarweisen Vergleich konnte nach entsprechender P-Wert Korrektur ein tendenziell signifikanter Unterschied zwischen IBS-D und Gesunden ($p = 0,076$) hin zu erhöhten Werten bei Gesunden gezeigt werden. Auch beim Vergleich der an Reizdarmsyndrom erkrankten (IBS-D und IBS-C) und nicht an IBS-erkrankten (FD und Gesunde) Gruppen konnte ein tendenziell signifikanter Unterschied ($p = 0,068$) hin zu erhöhten Werten bei „Nicht IBS“ gezeigt werden.

In Bezug auf Antikörperpositivität wurden, basierend auf den Cut-off Werten für Anti-Vinculin ($> 1,68$), 36,4% der gesunden Probanden als positiv getestet, danach folgten mit 33,3%, 30,8% sowie 13,3% die Gruppen FD, IBS-C sowie IBS-D (siehe Abbildung 3). Hierbei konnten weder beim Gesamttest zwischen den einzelnen Gruppen untereinander ($p = 0,473$), noch beim paarweisen Vergleich (IBS-C vs. IBS-D $p = 0,262$)

sowie beim Vergleich IBS und „Nicht IBS“ ($p = 0,229$) signifikante Unterschiede gezeigt werden.

Möchte man wiederum untersuchen, wie viele Probanden generell einen positiven Antikörpernachweis haben, also *entweder* Anti-CdtB- oder Anti-Vinculin Antikörpertiter über den entsprechenden Cut-off Werten aufweisen, so ergaben sich für Patienten mit IBS-C Positivitätsraten von 76,9%, bei Gesunden 63,6%, FD 60,0% und bei IBS-D 40,0%, wobei sich hier im Gesamttest zwar kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Kohorten zeigte ($p = 0,48$), bei den paarweisen Vergleichen jedoch zwischen IBS-C und IBS-D ein Trend hin zu erhöhten Positivitätsraten bei IBS-C zu erkennen waren ($p = 0,098$). Deutlich weniger Probanden wiesen bei *beiden* Antikörpern jeweils Titerwerte über dem Cut-Off auf, es wurden 13,6% der Gesunden, 13,3% der Patienten mit FD, 7,7% der Patienten mit IBS-C und 6,7% der Patienten mit IBS-D als positiv getestet (siehe *Abbildung 3*).

Zusammengefasst zeigte weder der Vergleich der Anti-CdtB-Titer und -Positivitätsraten noch der Vergleich der Anti-Vinculin-Titer und -Positivitätsraten statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Kohorten, wobei beim Vergleich der Anti-Vinculin-Titer (IBS-D vs. Gesunde, IBS-D+IBS-C vs. Gesunde+FD) ein Trend hin zu erhöhten Werten bei Gesunden und „Nicht IBS“ zu verzeichnen war. Ebenso konnte beim Vergleich der Positivitätsraten (Positivität für mindestens einen der beiden Antikörper) ein Trend hin zu erhöhter Antikörperpositivität bei IBS-C Probanden im Vergleich zu Patienten mit IBS-D gezeigt werden ($p = 0,098$). Insgesamt zeichnete sich die Gruppe mit IBS-C in Bezug auf Anti-CdtB bei den Titerwerten sowie bei den Positivitätsraten durch die höchsten Werte- und die Gruppe mit IBS-D durch die niedrigsten Werte aus. Bei Anti-Vinculin wiesen jeweils die gesunden Probanden die höchsten Titer und Positivitätswerte auf, wohingegen auch hier die IBS-D Kohorte die niedrigsten Werte aufzeigte.

3.3 Analyse anderer Einflussgrößen auf die Anti-CdtB- und Anti-Vinculin-Antikörperhöhe

Bei den oben beschriebenen Anti-CdtB-Antikörpertitern zeigte die IBS-C Kohorte die höchsten Werte auf, gefolgt von funktioneller Dyspepsie > Gesunden und > IBS-D.

Diese Rangfolge unterscheidet sich von der in der Literatur beschriebenen Reihenfolge [105, 114], in der die höchsten Werte für IBS-D > IBS-C > Gesunde beschrieben wurden.

Aus diesem Grund wurden mittels Einzelanalysen potentielle Einflussfaktoren (PPI, NSAR, Antibiotikaeinnahme in den letzten 3 Jahren, Alkohol, Nikotin, BMI, Allergien, IL-6, akuter- und chronischer Entzündungsgrad- sowie Lymphozyten-, Plasmazellen- und

Eosinophileninfiltrate von jeweils Duodenum, C.ascendens, C.descendens und terminalem Illium) auf ihre Signifikanz als einwirkende Größen auf die Anti-CdtB-Werte hin untersucht, um eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz der Titerwerte zur Literatur zu erhalten.

Mittels Regressionsanalysen konnte gezeigt werden, dass Anti-CdtB Werte bei Vorliegen von Eosinophileninfiltraten im C.descendens ($p < 0,05$), sowie bei Antibiotikaeinnahme innerhalb der letzten 3 Jahre ($p < 0,05$), signifikant ansteigen ($R^2 = 0,159$). Dies bedeutet, dass 15,9% der Anti-CdtB Variabilität durch die beiden oben genannten Einflussfaktoren erklärt werden kann, das Model hat nach Cohen somit eine mittlere Varianzaufklärung und damit auch eine mittlere Anpassungsgüte. Den größten Einfluss zeigten Eosinophileninfiltrate ($p = 0,038$), dicht gefolgt von Antibiotikaeinnahme innerhalb der letzten 3 Jahre ($p = 0,012$). Zu Anti-Vinculin Antikörpern erfolgte keine Regressionsanalyse, da sich hier bei den Einzelanalysen nur eine mögliche Einflussgröße (akuter Entzündungsgrad im C.ascendens) ergab. Die Signifikanz des Modells konnte zuvor mittels einer Varianzanalyse (ANOVA) gegen Zufall abgesichert werden $F(3,59) = 4,922$, $p = 0,004$.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass es neben dem Zusammenhang zwischen Eosinophileninfiltraten und der Anti-CdtB Bildung auch eine Verbindung zwischen der mikrobiotaverändernden Antibiotikaeinnahme und der Anti-CdtB Bildung gibt, die wahrscheinlich über den Zwischenschritt der Dysbiose abläuft.

Um dementsprechend die Verbindung von Mikrobiotaveränderungen zu den Antikörperwerten zu untersuchen und zusätzlich die einzelnen Bakterienprofile der Kohorten zu charakterisieren, wurden im Folgenden unterschiedliche Mikrobiomvergleiche vorgenommen.

3.4 Mikrobiomvergleich von AK-Positiven und AK-Negativen

Zur Analyse der Mikrobiomprofile wurden die Stuhlproben von insgesamt 53 Probanden der Gesamtkohorte anhand des GA-map®- Dysbiose Tests [104] untersucht (genauere Beschreibung des Tests siehe 1.7). Hierunter befanden sich 15 Gesunde, 11 Patienten mit IBS-C, 13 Patienten mit IBS-D sowie 14 Patienten mit funktioneller Dyspepsie.

3.4.1 Vergleich von Dysbioseindizes von Anti-CdtB-/Anti-Vinculin- positiven sowie – negativen Probanden

Anhand des Dysbioseindex kann die jeweilige Mikrobiom-Abweichung von der Mikrobiomstruktur einer gesunden Referenz-Kohorte [104] auf einer Skala von 1 bis 5

eingeorordnet werden, womit eine einfachere klinische Anwendung gewährleistet wird. In diesem Zusammenhang wiesen in unserer Kohorte 11 Antikörper negative Probanden einen nondysbiotischen Index (1-2) - und 10 Probanden eine dysbiotischen Index ($DI > 2$) auf (siehe *Abbildung 5*).

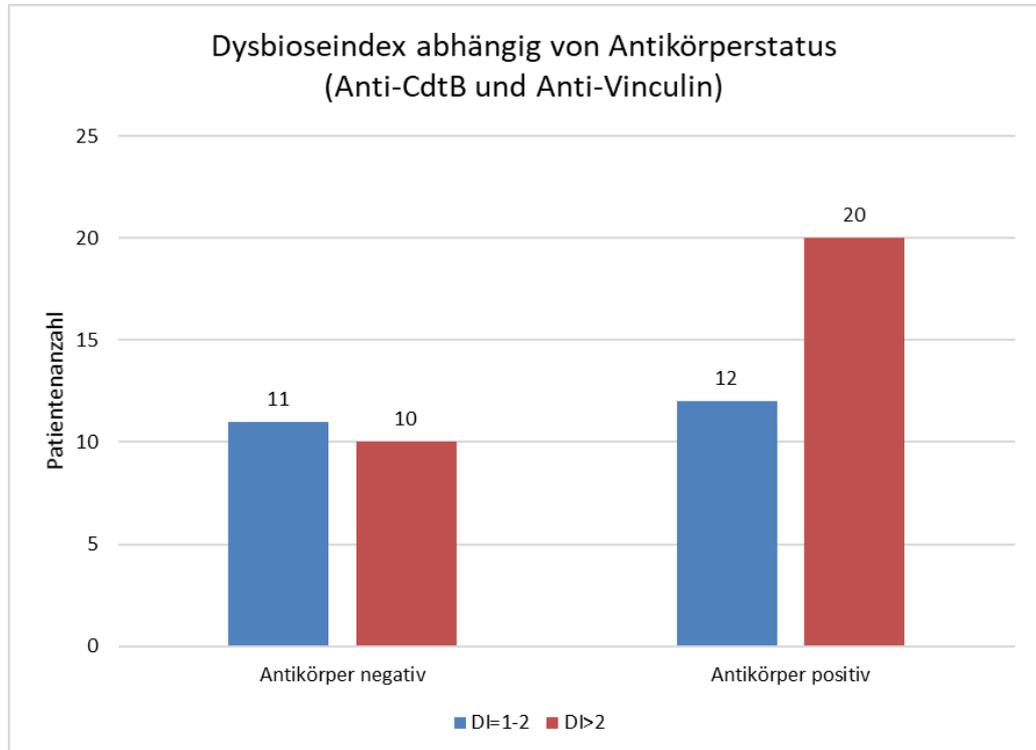


Abbildung 5: Anzahl der nicht dysbiotischen ($DI=1-2$), sowie der dysbiotischen ($DI > 2$) Patienten in Abhängigkeit des Antikörperstatus. Keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Betrachtet man hingegen die Studienteilnehmer, die mindestens einen der beiden Antikörper über dem Cut-off aufwiesen (Ak-positiv), so hatten fast doppelt so viele (20 Probanden) einen dysbiotischen Index im Vergleich zu 12 nondysbiotischen Probanden. Somit zeigten 63% der antikörperpositiven Teilnehmer eine Dysbiose auf, bei den antikörpernegativen Probanden waren es 48%. Beim statistischen Vergleich der Dysbioseindizes zwischen Antikörper negativen- sowie Antikörper positiven Probanden konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,285$) gezeigt werden.

Um die Gruppe der antikörperpositiven Probanden genauer zu untersuchen, wurde diese nochmals in die zwei Subgruppen ((1) einer der beiden Antikörper positiv und (2) beide Antikörper positiv) unterteilt. Hier wiesen bei der Gruppe mit *einem* positiven Antikörper 15 der 27 Probanden eine Dysbiose auf, bei den Probanden mit *beiden* positiven Antikörpern waren es 5 von 5 (siehe *Abbildung 6*). Beim Vergleich der

Antikörper negativen Probanden mit der Subgruppe mit beiden positiven Antikörpern zeigte sich ein tendenziell signifikanter Unterschied ($p = 0,053$), wobei eine Dysbiose häufiger bei Probanden mit 2 positiven Antikörpernachweisen vorliegt.

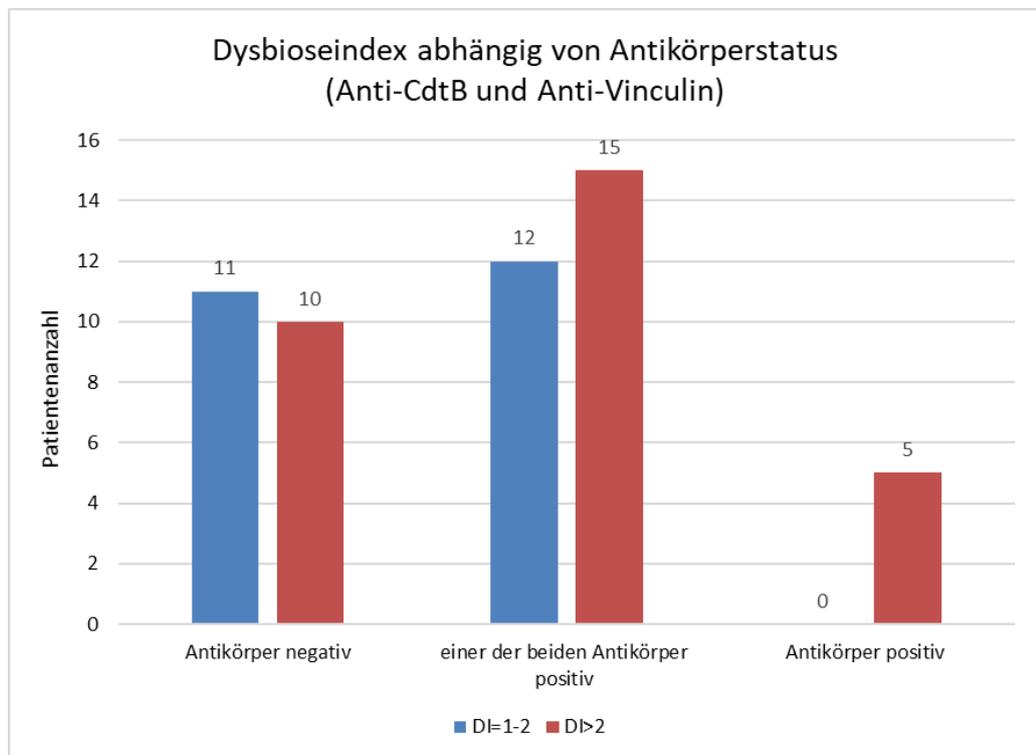


Abbildung 6: Anzahl der nicht dysbiotischen ($DI=1-2$), sowie der dysbiotischen ($DI>2$) Patienten in Abhängigkeit des Antikörperstatus untergliedert in Antikörper negative Probanden ($n=21$), Probanden mit einem positiven Antikörpernachweis ($n=27$) sowie Probanden mit beiden Antikörpern positiv ($n=5$). Tendenziell signifikanter Unterschied zwischen dysbiotischem DI und positivem Antikörperstatus für beide AK.

Um weiter zu differenzieren, ob einer der beiden Antikörper (Anti-CdtB/Anti-Vinculin) einen stärkeren Einfluss auf das Vorliegen einer Dysbiose aufweist, wurden im Folgenden beide Antikörper separat getestet (siehe *Abbildung 7*). Bei den Patienten mit positiven Anti-CdtB-Titern wiesen 16 Patienten eine Dysbiose auf, im Vergleich zu 6 Patienten ohne Dysbiose.

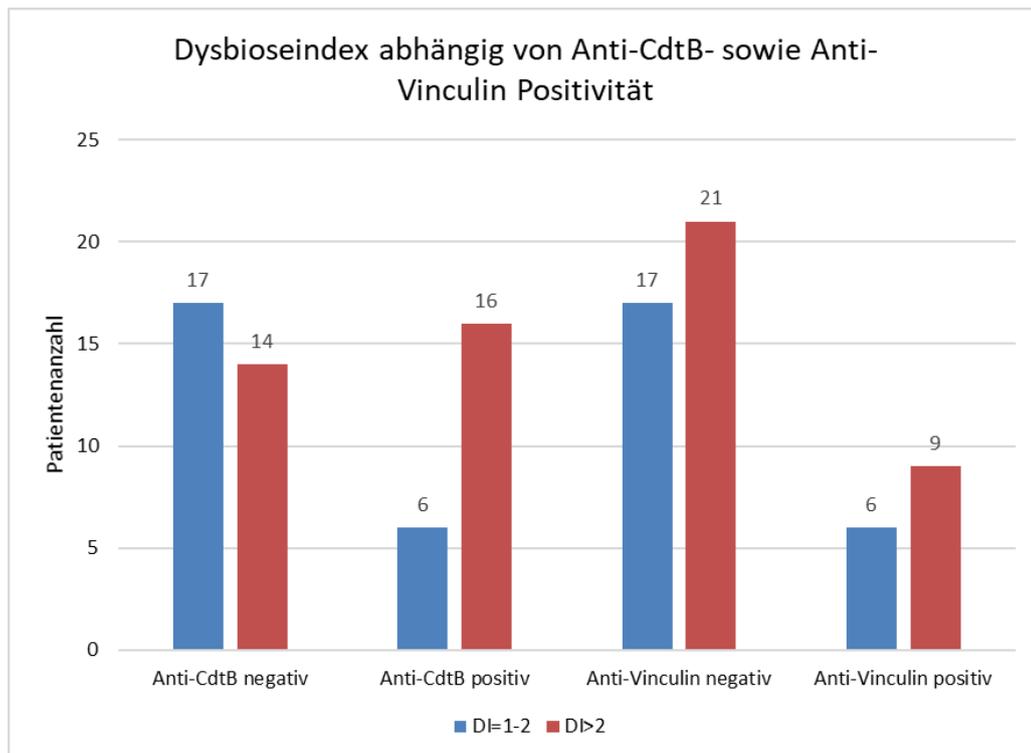


Abbildung 7: Anzahl der nicht dysbiotischen (DI=1-2), sowie der dysbiotischen (DI>2) Patienten in Abhängigkeit der Anti-CdtB- sowie Anti-Vinculin Positivität. Signifikanter Unterschied zwischen dysbiotischem DI und positiven Anti-CdtB Titern.

Von den Probanden ohne erhöhte Anti-CdtB Titer hingegen hatten 14 Teilnehmer eine Dysbiose und 17 Probanden keine Dysbiose. In diesem Fall konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dysbiotischen Indizes und erhöhten Anti-CdtB Werten ($p = 0,046$) bewiesen werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass eine Dysbiose häufiger bei Probanden mit positiven Anti-CdtB-Titern vorliegt und somit eine eindeutige Assoziation dieser beiden Parameter besteht.

Oben genannte Zusammenhänge konnten für die Anti-Vinculin Antikörper jedoch nicht nachgewiesen werden, hier wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen einer Dysbiose und Anti-Vinculin positiven Probanden gezeigt ($p = 0,754$) was verdeutlicht, dass von beiden Antikörpern lediglich die Anti-CdtB Antikörper als Faktor mit einer Dysbiose in Verbindung gebracht werden können.

3.4.2 Unterschiede in der Stuhl-Mikrobiomzusammensetzung der Ak-positiven- vs. Ak-negativen Probanden

Neben der Betrachtung des Ausmaßes von Mikrobiomveränderungen anhand des Dysbioseindex, können Unterschiede in der Mikrobiotakomposition der Stuhlproben strukturiert und vereinfacht mittels einer Hauptkomponentenanalyse (PCA: Principal Component Analysis) dargestellt werden. Hierzu wurden die bakteriellen GA-map®-

Signalstärkedaten der Stuhlproben von Ak-positiven- sowie Ak-negativen Probanden in *Abbildung 8* veranschaulicht.

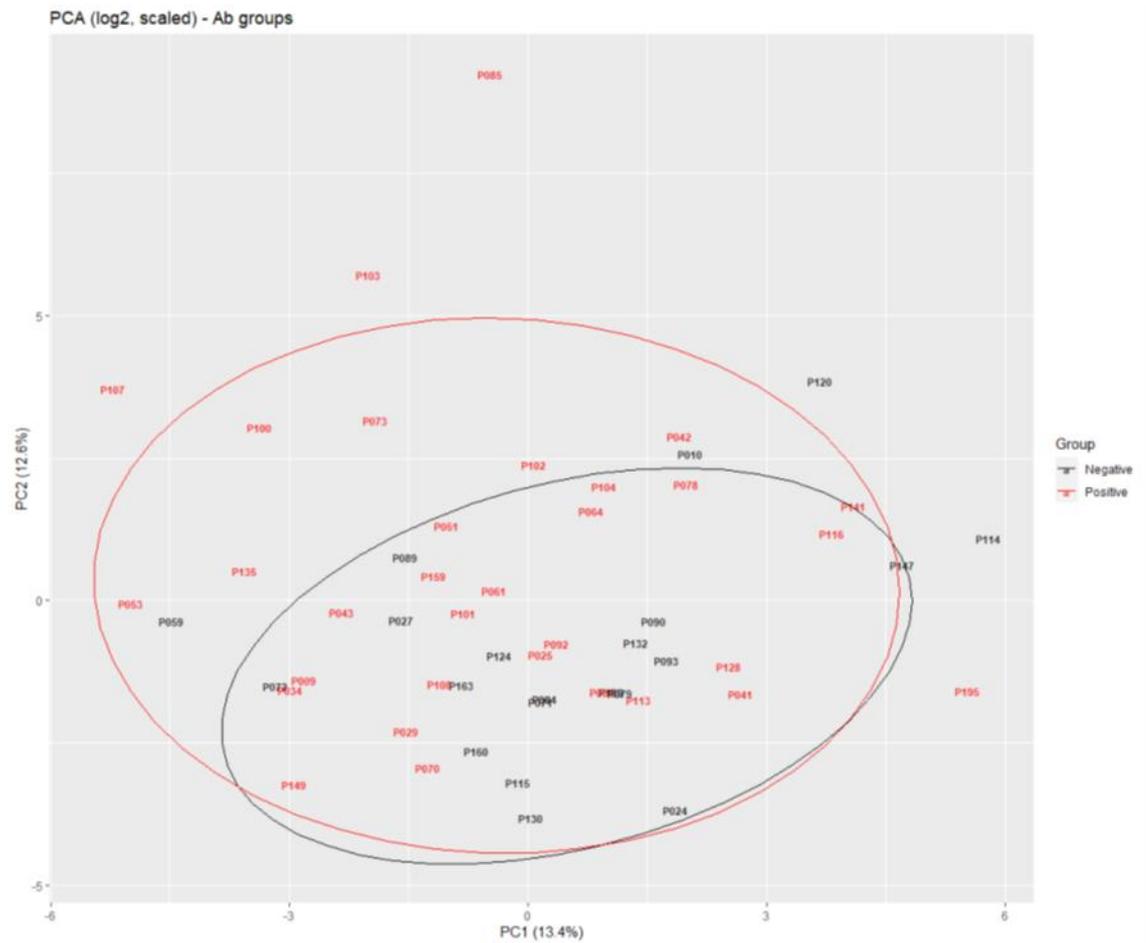


Abbildung 8: Unterschiede in der Stuhl-Mikrobiomzusammensetzung der Ak-positiven- vs. Ak-negativen Probanden dargestellt als PCA: Ak-negativ (schwarz, n=21), Ak-positiv (rot, n=32).

Auffällig war, dass die Gruppe der antikörperpositiven Probanden einen größeren Bereich der PCA abdeckten und somit auch eine größere Variation im Mikrobiomprofil im Vergleich zu antikörpernegativen Studienteilnehmern aufwiesen. Bei beiden Gruppen lag jedoch ebenso ein hoher Überlappungsgrad vor, sodass sich ein großer Anteil der Probanden im Mikrobiomprofil ähneln. Diese Darstellung ermöglicht es ebenfalls, Ausreißer, die sich außerhalb des 95% Intervalls befinden, zu erkennen, dies waren 4 AK-positiv- sowie und 2 AK-negativ Probanden.

Um Unterschiede in der bakteriellen Zusammensetzung der Ak-pos. und Ak-neg. Probanden weiter zu untersuchen, wurde eine orthogonale partielle Diskriminanzanalyse der kleinsten Quadrate (OPLS-DA) durchgeführt. Das OPLS-DA-Modell zeigte keine klare Trennung zwischen den beiden Gruppen AK-positiv und AK-negativ, sowie eine unzureichende prädiktive Genauigkeit des Modells ($R^2Y = 0,199$, $Q^2 = -0,146$).

Mit diesem Modell konnten ebenfalls jene Bakterien identifiziert werden, die den größten Effekt auf Antikörper positive Individuen und auf hohe Dysbioseindizes aufwiesen, dies waren *Proteobacteria*, sowie *Phascolarctobacterium sp.* und *R. albus & R. bromii*, welche jeweils häufiger in Patienten mit Dysbiose sowie positivem Antikörperstatus gemessen wurden. Dieser Effekt wird durch den DI-Algorithmus erklärt, bei dem die verschiedenen Bakterienmarker unterschiedliche Auswirkungen auf den DI-Score haben.

3.5 Mikrobiomvergleich innerhalb der Kohorten

Neben der Betrachtung der Mikrobiomprofile von antikörperpositiven sowie -negativen Probanden wurden Mikrobiomvergleiche ebenfalls zwischen den 4 Kohorten Gesunde, IBS-C, IBS-D sowie funktioneller Dyspepsie vorgenommen, um gruppenspezifische Unterschiede zu untersuchen.

3.5.1 Dysbiosehäufigkeit und -Verteilung in den unterschiedlichen Kohorten

Zunächst wurde hierzu die Verteilung der einzelnen Dysbioseindizes 1-5 innerhalb der jeweiligen Kohorte (siehe *Abbildung 9*) untersucht, wobei sich hier kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zeigte ($p = 0,247$).

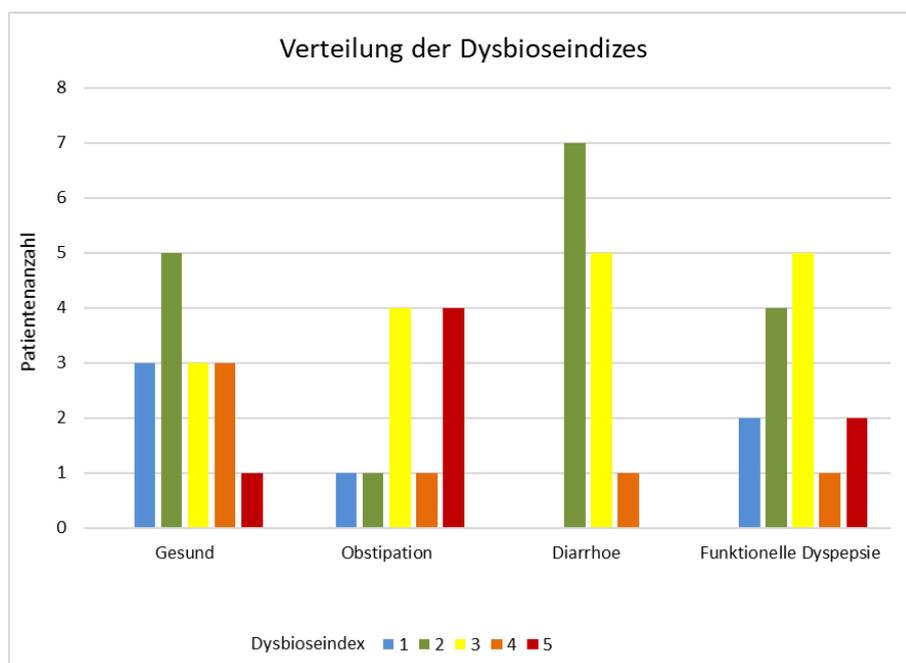


Abbildung 9: Verteilung der DI innerhalb der Kohorten. Keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Fasst man nun der Übersicht halber die Patienten mit einem Dysbioseindex von 1-2 zu „nicht dysbiotischen“ und die Patienten mit einem Dysbioseindex 3-5 zu „dysbiotischen“ Patienten zusammen, so wird deutlich, dass die IBS-C Kohorte den höchsten Anteil an dysbiotischen Probanden aufwies. Hier hatten 81,1% der Patienten eine Dysbiose (Abbildung 10).

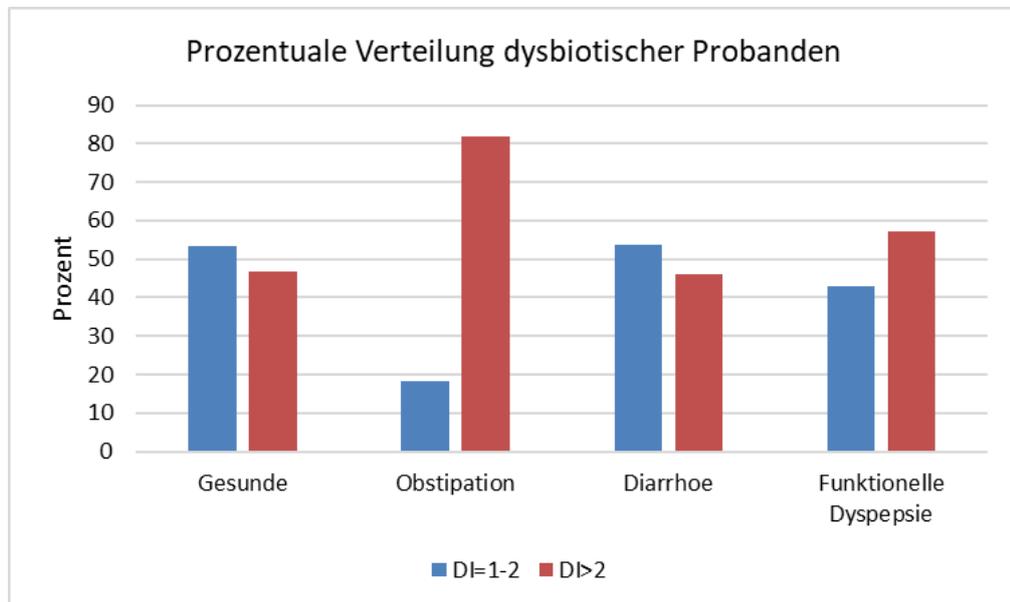


Abbildung 10: Darstellung der Verteilung der nicht dysbiotischen (DI=1-2) sowie dysbiotischen (DI>2) Indizes in den verschiedenen Gruppen. Kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Kohorten.

Bei der Kohorte mit FD konnte bei 57,1% der Patienten ein dysbiotischer Index gezeigt werden, bei den Gesunden wurde bei 46,7% der Probanden eine Dysbiose nachgewiesen. Die wenigsten dysbiotischen Patienten lagen mit 46,2% in der Kohorte mit IBS-D vor. Trotz des sehr hohen Anteils an Dysbiose in der IBS-C Kohorte konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dysbiotischen- sowie nicht dysbiotischen Patienten innerhalb der 4 Kohorten ($p = 0,267$) gezeigt werden.

3.5.2 Unterschiede in der Stuhl-Mikrobiomzusammensetzung zwischen den 4 Kohorten

Die stark veränderte Mikrobiomzusammensetzung in der IBS-C Kohorte deutete sich nicht nur durch den erhöhten Anteil dysbiotischer Patienten in dieser Gruppe an, sondern ebenfalls beim Vergleich der mikrobiellen Komposition der 4 Kohorten mittels PCA. Hierbei zeigte sich deutlich, dass die Gruppen Gesunde, FD und IBS-Diarrhoe am meisten überlappen und ein jeweils eng gefasstes Gebiet einschließen, wobei die IBS-

Obstipations Gruppe ein größeres und zu den Vergleichsgruppen leicht verschobenes Areal in der PCA abdeckte (siehe *Abbildung 11*).

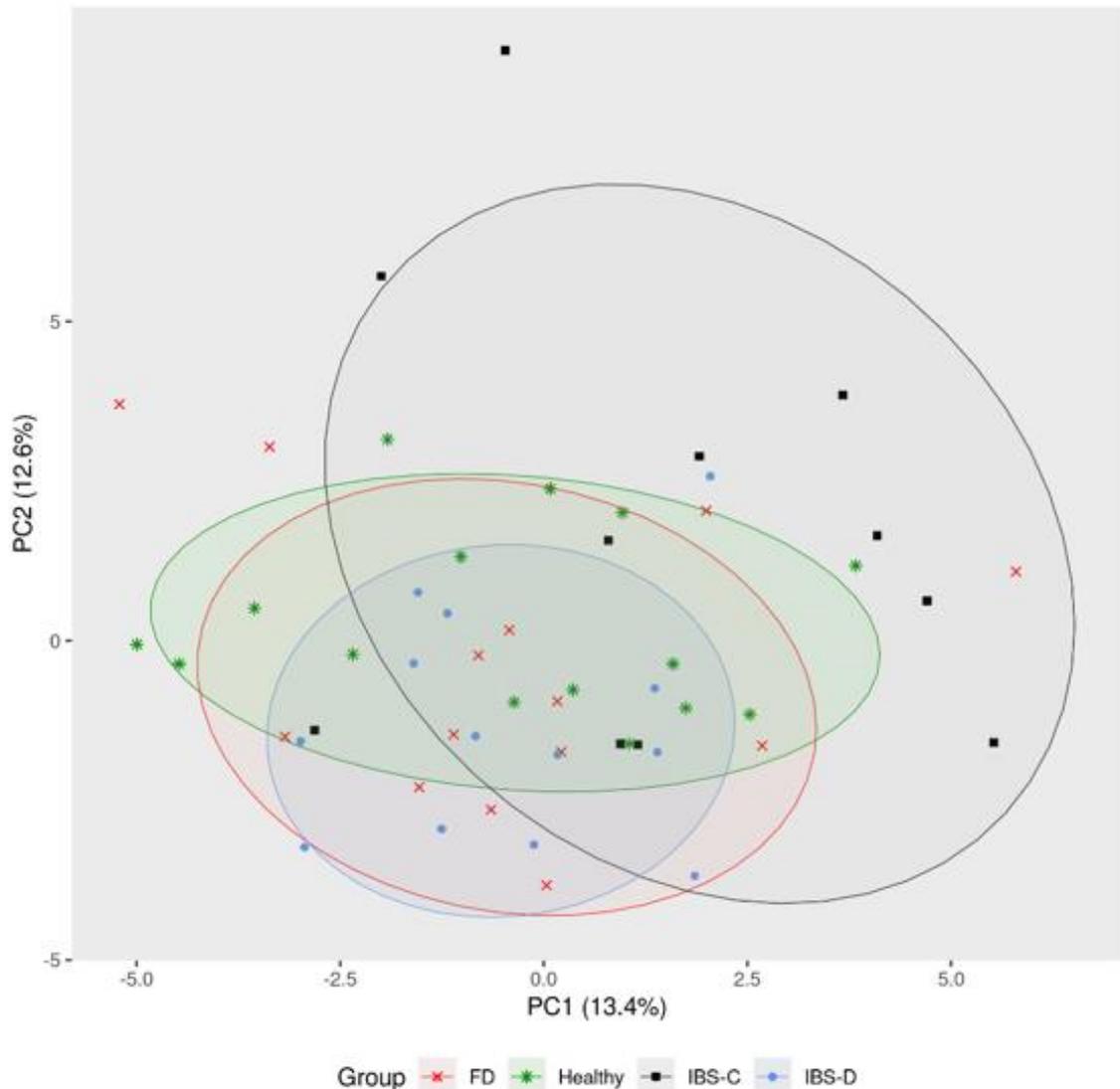


Abbildung 11: Unterschiede in der Stuhl-Mikrobiomzusammensetzung der 4 Kohorten dargestellt als PCA: Gesund (n=15), IBS-Obstipation (n=11), IBS-Diarrhoe (n=13) und FD (n=14). Jeder Patient ist mit einer patienteneigenen ID visualisiert, die entsprechend der zugehörigen Kohorte farblich gekennzeichnet ist (siehe Legende). Die Ellipsen decken ungefähr 80% der Punkte für jede Gruppe ab.

Dies bedeutet zum einen, dass sich die IBS-C Kohorte in ihrer Mikrobiomzusammensetzung stärker von den anderen 3 Gruppen unterscheidet, wohingegen diese untereinander jeweils ein ähnlicheres Mikrobiotaprofil teilen. Zum anderen verdeutlicht dies, dass die IBS-C Gruppe auch eine größere interindividuelle Variation im Vergleich zu den anderen Gruppen zeigt, sie separiert sowohl in PC1-, als auch in PC2-Richtung am meisten von allen Gruppen.

Vergleicht man nun zur genaueren Unterscheidung der Kohorten die gesunden Kontrollen einzeln mit jeweils den drei Krankheitsgruppen (IBS-D, IBS-C und FD), so kann mittels OPLS-DA keine klare Trennung der Gruppen gezeigt werden (Gesunde vs. IBS-D $R^2Y = 0,273$, $Q^2 = -0,179$, Gesunde vs. $R^2Y = 0,269$, $Q^2 = -0,375$, Gesunde vs. FD $R^2Y = 0,155$, $Q^2 = -0,103$).

3.5.3 Vergleich der Mikrobiomkomposition von Ak-positiven- und Ak-negativen Probanden innerhalb der jeweiligen 4 Kohorten

Um weiter zu differenzieren, ob es Unterschiede in der Mikrobiomzusammensetzung innerhalb der Kohorten zwischen AK-positiven und AK-negativen Probanden gibt, wurden die Probanden der jeweiligen Gruppen nochmals in Antikörper-positive- sowie Antikörper-negative Subgruppen unterteilt. Hierbei konnte mittels PCA kein Clustering bzw. keine Überlappung und somit keine subgruppen spezifischen Zusammenhänge von Antikörperstatus und Mikrobiomprofil gezeigt werden (*Abbildung 12, Abbildung 13, Abbildung 14*). Auch in dieser Darstellung spiegelt sich die in 3.5.2 beschriebene breitere interne Streuung der IBS-C Kohorte erneut wider (*Abbildung 13*).

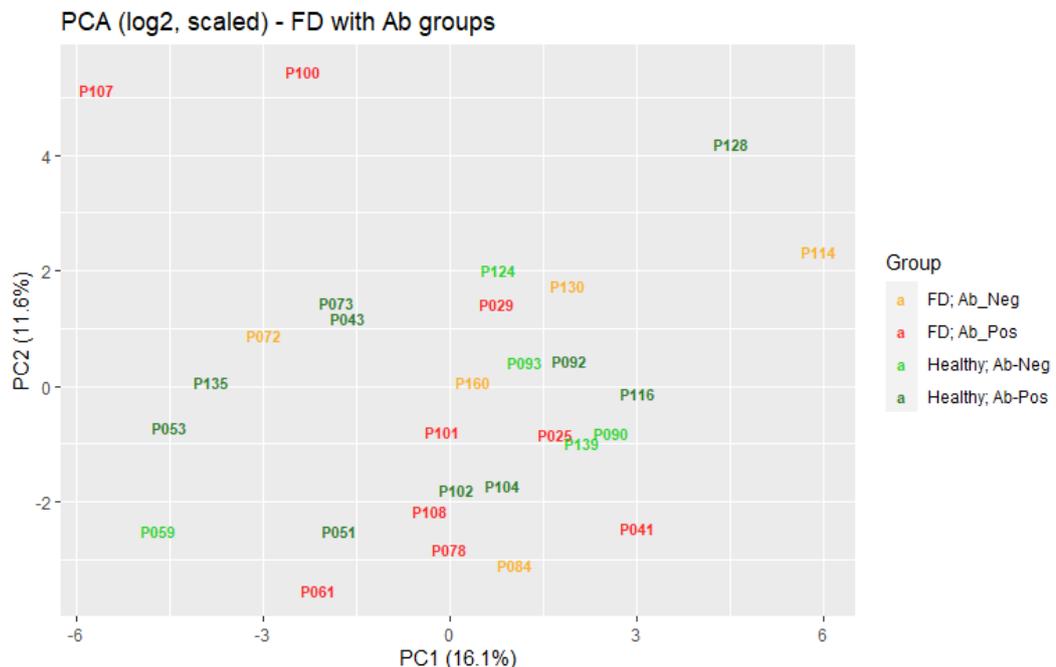


Abbildung 12: PCA der AK-Gruppen in FD ($n=5$ Ak-negativ, $n=9$ Ak-positiv) und gesunden Probanden ($n=5$ Ak-negativ, $n=10$ Ak-positiv). Kein Clustering der Subgruppen.

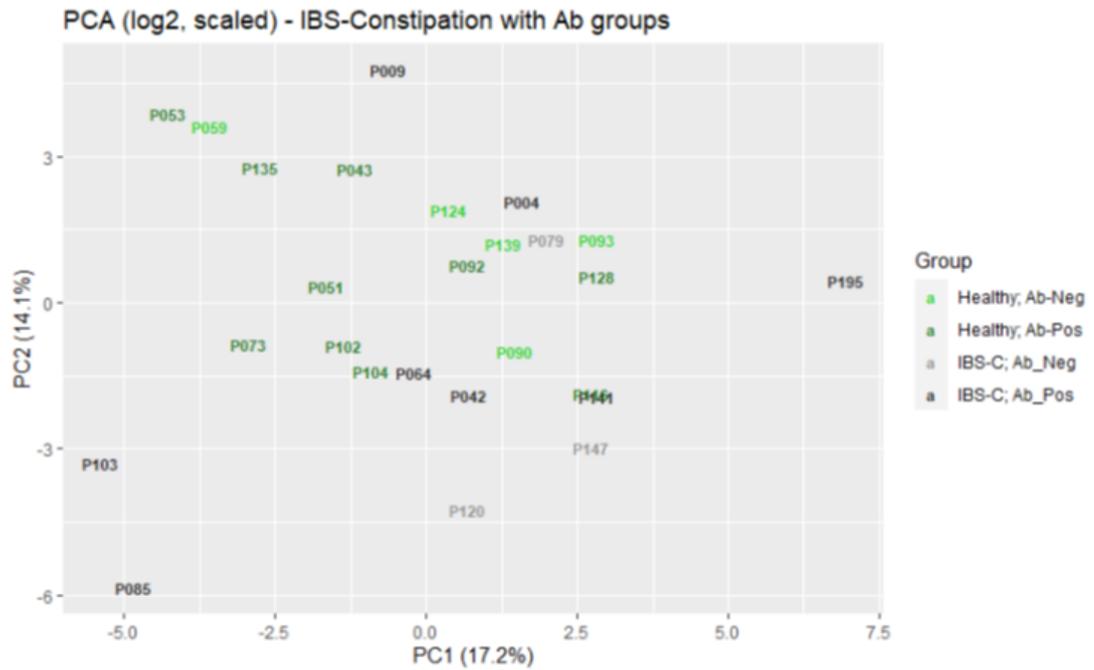


Abbildung 13: PCA der AK-Gruppen in IBS-Obstipation ($n=3$ Ak-negativ, $n=8$ Ak-positiv) und gesunden Probanden ($n=5$ Ak-negativ, $n=10$ Ak-positiv). Kein Clustering der Subgruppen.

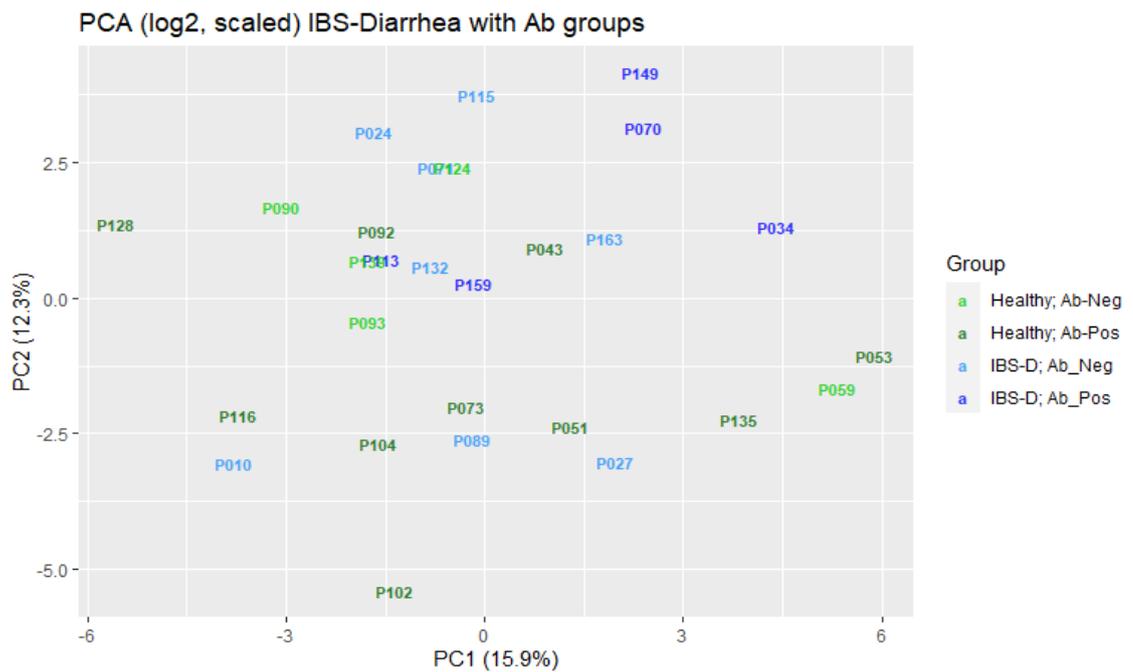


Abbildung 14: PCA der AK-Gruppen in IBS-Diarrhoe ($n=8$ Ak-negativ, $n=5$ Ak-positiv) und gesunden Probanden ($n=5$ Ak-negativ, $n=10$ Ak-positiv). Kein Clustering der Subgruppen.

Zu beachten ist jedoch, dass es sich bei den Subgruppen jeweils um sehr kleine Gruppengrößen gehandelt hat ($n = 3$ bis $n = 10$), sodass ein mögliches Clustering auch aufgrund der kleinen Anzahl gegebenenfalls nicht zustande kam.

3.5.4 Unterschiede in Bakterienprofilen der Kohorten durch „functional bacteria profiling“

Anhand des Dysbioseindex und der PCA Darstellung wurde bereits deutlich, dass es Unterschiede in den Mikrobiomprofilen der Kohorten gibt. Um zu untersuchen welche Unterschiede genau auftreten, wurde ein „functional bacteria profiling“ durchgeführt, bei dem die Stuhlproben der Probanden mit 5 zuvor berechneten „normobiotischen-Bakterienprofilen“, die als Referenzwert dienen, verglichen wurden. Diese Bakterienprofile wurden zuvor von Genetic Analysis in Oslo, basierend auf einigen ausgewählten bakteriellen Sonden und ihrem Häufigkeitswert (abundance score von -3 bis +3 reichend), berechnet. Durch dieses Verfahren war es möglich, Abweichungen hin zu erhöhten oder erniedrigten Werten vom jeweiligen „Referenzprofil“ zu detektieren. Die 5 ermittelten Bakterienprofile waren ein butyrat-produzierendes Bakterienprofil, ein protektives Bakterienprofil der Darmmukosa, *F. prausnitzii* als Darmgesundheitsmarker, ein Profil für protektive Darmbarriere-Bakterien und opportunistische Bakterien und ein Pro-inflammatorisches Bakterienprofil. Im Folgenden sind die jeweiligen Profile im Einzelnen kurz erläutert und charakterisiert.

Butyrat-produzierendes Bakterienprofil:

Dieses Profil setzt sich zusammen aus *Eubacterium hallii* (*E. hallii*), *Eubacterium rectale* (*E. rectale*) und *Faecalibacterium prausnitzii* (*F. prausnitzii*). Als pathologisch verändert galten Profile, bei denen mindestens 2 der oben genannten Bakterien einen abundance score < 0 aufwiesen. Erniedrigte Werte dieses Bakterienprofils können bei den Betroffenen eine verminderte Produktion der kurzkettigen Fettsäure Butyrat verursachen. Sie stellt die Hauptenergiequelle der Darmzellen dar und ist bei vielen Immunologischen- und Stoffwechselfunktionen beteiligt [117].

Protektives Bakterienprofil der Darmmukosa:

Zum protektiven Profil der Mukosa zählen *Akkermansia Muciniphila* (*A. Muciniphila*) und *F. prausnitzii*. Falls die abundance scores beider Bakterien < 0 sind, liegt ein pathologisch verändertes Profil vor. Erniedrigte Werte können eine verminderte Schutzfunktion der Darmmukosa verursachen.

F. prausnitzii Darmgesundheitsmarker:

Zu diesem Bakterienprofil zählt *F. prausnitzii*, ein Schlüsselbakterium, welches die Darmgesundheit fördert und eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Darmhomöostase

spielt. Pathologische Veränderungen wurden hier bei einem abundance score < -1 definiert. Es wurden bereits erniedrigte Werte in Zusammenhang mit M. Chron und Zöliakie beschrieben [118].

Profil für protektive Darmbarriere-Bakterien und opportunistische Bakterien:

F. prausnitzii, *R. gnavus*, *Proteobacteria* und *Shigella spp.* & *Escherichia spp.* ergeben zusammen dieses Profil. Hierbei gelten Profile als pathologisch, falls mindestens ein abundance score der Bakterien (*R. gnavus*, *Proteobacteria* oder *Shigella spp.* & *Escherichia spp.*) > 0 aufweist und der abundance score von *F. prausnitzii* < 0 ist. Mit diesem Bakterienprofil können Rückschlüsse darauf gezogen werden, ob eine Imbalance zwischen protektiven Bakterien, welche eine Schutzfunktion der Darmbarriere darstellen, sowie opportunistischen pro-inflammatorischen Bakterien vorliegt.

Pro-inflammatorisches Bakterienprofil:

Zu diesem Profil werden *Proteobacteria* und *Shigella spp.* & *Escherichia spp.* gerechnet. Pathologisch veränderte Profile mit erhöhten Leveln an proinflammatorischen Bakterien gelten bei abundance scores > 0 (für beide Bakterien) sowie wenn zusätzlich eines der beiden Bakterien einen abundance score > 1 zeigt.

Auf Basis dieser berechneten Referenzprofile wurden im Folgenden die Bakterienprofilveränderungen der 4 Kohorten untersucht und die jeweilige prozentuale Verteilung an pathologischen Profilabweichungen zur Referenzgruppe in *Abbildung 15* dargestellt.

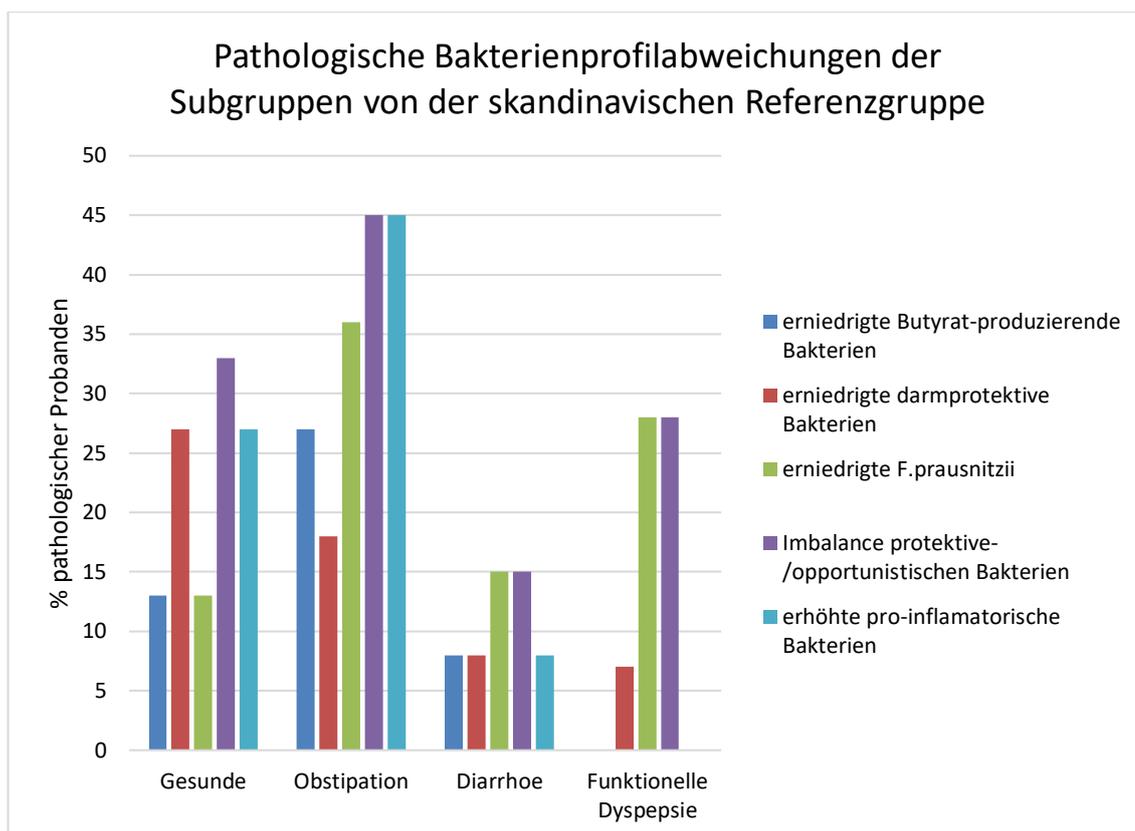


Abbildung 15: Prozentualer Anteil an Patienten pro Kohorte mit Profil-Abweichungen von den errechneten Referenzwerten

Insgesamt verdeutlicht diese Graphik, dass in der IBS-C Kohorte prozentual gesehen die meisten Probanden mit pathologisch abweichenden Mikrobiomprofilen vorliegen. Hier wiesen fast die Hälfte (45%) der Probanden eine Imbalance zwischen protektiven Bakterien und opportunistischen Bakterien-, sowie erhöhten proinflammatorischen Bakterien auf. Ebenso wurde in dieser Gruppe der höchste Anteil an erniedrigten *F.prausnitzii* sowie butyratproduzierenden Bakterien verzeichnet, sodass diese Kohorte bei 4 von 5 Profilen die größten pathologischen Abweichungen aller Kohorten aufwies. Beim Profil der proinflammatorischen Bakterien erreichten diese kohortenspezifischen Unterschiede statistische Signifikanz ($p = 0,013$) mit signifikant erhöhten proinflammatorischen Bakterien in der IBS-C Kohorte.

Erstaunlicherweise zeigten sich bei den Profilen von IBS-D und funktioneller Dyspepsie die geringsten Abweichungen zur skandinavischen Referenzgruppe, wobei die Profile der gesunden Probanden mit Ausnahme des Profils für erniedrigte *F. prausnitzii*, häufiger auf pathologische Abweichungen hinwiesen. In den nachfolgenden Abschnitten werden die jeweiligen Veränderungen der Profile in den 4 Kohorten nochmals ausführlich im Detail beschrieben.

3.5.4.1 Bakterienprofil der Gesunden Kohorte:

In der gesunden Kohorte zeigten 2 der insgesamt 15 Probanden (13%) erniedrigte Level an Butyrat produzierenden Bakterien auf. Diese beiden Probanden hatten ebenfalls eine Dysbiose. Erniedrigte Level der Bakterien des protektiven Bakterienprofils waren bei 4 (27%) Studienteilnehmern zu verzeichnen, hier konnte bei 3 dieser Probanden zusätzlich eine Dysbiose gezeigt werden. Bei der Häufigkeit von *F. prausnitzii* waren bei 2 Patienten (13%) erniedrigte Werte gemessen worden, welche ebenfalls einen dysbiotischen Index aufwiesen. Bei 5 gesunden Probanden (33%) wurde eine Imbalance von protektiven und opportunistischen Bakterien nachgewiesen, 3 der 5 Probanden waren ebenfalls dysbiotisch. Zuletzt konnten bei 4 gesunden Teilnehmern (27%) erhöhte Level an proinflammatorischen Bakterien gemessen werden, wobei alle 4 Probanden ebenfalls einen $DI > 2$ zeigten.

3.5.4.2 Bakterienprofil der IBS-Obstipations Kohorte:

Bei Patienten mit IBS-Obstipation wurden bei 3 Probanden (27%) erniedrigte Butyrat-produzierende Bakterien sowie eine zusätzliche Dysbiose nachgewiesen. Die darmprotektiven Bakterien zeigten sich bei 2 Studienteilnehmern (18%) als verringert, auch diese Probanden wiesen eine Dysbiose auf. Von den insgesamt 4 Probanden (36%), welche erniedrigte Werte von *F. prausnitzii* zeigten, waren 3 Probanden zusätzlich dysbiotisch. Ein gestörtes Gleichgewicht zwischen protektiven und opportunistischen Bakterien stellt sich bei 5 Studienteilnehmern (45%) heraus, wovon 4 wiederum eine Dysbiose zeigten. Erhöhte Level an pro-inflammatorischen Bakterien konnten ebenfalls bei 5 (45%) der 11 Patienten gemessen werden, hiervon waren alle Patienten dysbiotisch.

3.5.4.3 Bakterienprofil der IBS-Diarrhoe Kohorte:

Von den insgesamt 13 Patienten, die der Gruppe IBS-D angehören, wies 1 Patient (8%) erniedrigte Level an Butyrat-produzierenden Bakterien auf. Bei ebenfalls einem Probanden (8%) wurde eine verringerte Anzahl darmprotektiver Bakterien nachgewiesen. Dieser Proband hatte zusätzlich eine Dysbiose. Insgesamt 2 Patienten (15%) (einer davon dysbiotisch) zeichneten sich durch erniedrigte Spiegel von *F. prausnitzii* aus. Eine Imbalance protektiver- und opportunistischer Bakterien wurde ebenso bei 2 Probanden (15%) gemessen, auch hiervon zeigte sich 1 Proband dysbiotisch. Erhöhte Level an pro-inflammatorischen Bakterien konnten bei einem Probanden (8%) nachgewiesen werden.

3.5.4.4 Bakterienprofil der Funktionellen Dyspepsie Kohorte:

Von den Patienten mit funktioneller Dyspepsie waren weder im Profil der Butyratproduzierenden- noch im Profil der pro-inflammatorischen Bakterien Abweichungen in der Bakterienanzahl im Verhältnis zu den errechneten Referenzprofilen festzustellen. Bei den darmprotektiven Bakterien konnten jedoch bei einem Probanden (7%) verringerte Werte gemessen werden, dieser wies gleichzeitig auch eine Dysbiose auf. Insgesamt 4 Patienten (28%) (alle dysbiotisch) zeichneten sich durch erniedrigte Werte von *F.prausnitzii* aus. Ein gestörtes Gleichgewicht zwischen protektiven- und opportunistischen Bakterien zeigte sich ebenfalls bei 4 Probanden (28%), wovon auch alle Probanden dysbiotisch waren.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse des functional bacteria profiling, dass die Mikrobiota der Patienten mit IBS-C die größten Abweichungen zu der berechneten normobiotischen Referenzgruppe aufweisen, wobei diese Veränderungen hauptsächlich auf signifikant erhöhte proinflammatorische Bakterien sowie erniedrigte butyrat produzierende Bakterien zurückzuführen sind.

Zusammenfassend wurde deutlich, dass weder bei den Anti-CdtB-Titern und -Positivitätsraten noch bei den Anti-Vinculin-Titern und -Positivitätsraten gruppenspezifische Unterschiede vorlagen und dass diese beiden Antikörper auch keine Korrelation untereinander aufwiesen. Es zeigte sich jedoch ein positiver Einfluss von Antibiotikaeinnahmen auf die Anti-CdtB-Werte sowie eine Korrelation zwischen Dysbiose und Anti-CdtB-positiven Probanden. Außerdem konnten signifikant erhöhte proinflammatorische Bakterien sowie (nicht signifikant) erniedrigte butyrat produzierende Bakterien in der IBS-C Kohorte nachgewiesen werden.

4 DISKUSSION

Die zuverlässige Diagnose von funktionellen gastrointestinalen Erkrankungen ist von entscheidender Bedeutung für eine gezielte Therapie. Hier werden in der Literatur neben den Rom-Kriterien im Wesentlichen Mikrobiomanalysen durch 16S-rRNA-Sequenzierung sowie Antikörper basierte Tests beschrieben. Ein eindeutiges Diagnostikverfahren, insbesondere für die Unterscheidung von IBS-C, IBS-D bzw. Funktioneller Dyspepsie von anderen Erkrankungen mit sich ähnlich präsentierender Symptomatik ist bislang noch nicht etabliert. Daher wurde in dieser Arbeit neben einer kohortenspezifischen Analyse der Anti-CdtB- sowie Anti-Vinculin-Antikörpertiter, ebenso eine hochspezifische Analyse von bestimmten zuvor ausgewählten mikrobiellen Profilen von Probanden mit FGID's vorgenommen. Mikrobiomunterschiede wurden zwischen den Kohorten sowie zwischen AK-positiven und AK-negativen Probanden untersucht. Interessanterweise grenzten sich dabei die Patienten mit IBS-C durch eine abweichende Mikrobiomzusammensetzung (mit einem verstärkt proinflammatorischem Darmmilieu und niedrigen Butyratproduzierenden Bakterien) von den restlichen untersuchten Kohorten ab. Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen Dysbiose und Anti-CdtB-Antikörpern hergestellt werden. Diese neuen Erkenntnisse können eine andere Sichtweise auf die Pathophysiologie, insbesondere die des PI-IBS, werfen und einen Beitrag zur Entwicklung optimierter Diagnostik und ggf. verbesserter Therapieansätze leisten. Basierend auf der Analyse der veränderten Mikrobiomprofile könnte so das Ausmaß der Dysbiose erkannt und durch gezielte mikrobielle Therapien ausgeglichen werden, um die folgenden inflammatorischen Reaktionen zu reduzieren.

4.1 Übersicht der Ergebnisse sowie Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse der Literatur

Die bislang in der Literatur beschriebenen Ergebnisse sind aktuell noch sehr uneinheitlich und basieren insbesondere bei der Bewertung der Antikörper auf einigen wenigen Studien. Hierbei konnten 3 Studien [105, 113, 114] erhöhte Anti-CdtB und Anti-Vinculin-Antikörpertiter bei Patienten mit IBS-D nachweisen, eine andere Studie [115] beschrieb lediglich erhöhte Anti-CdtB Werte bei Patienten mit FD und FD/IBS overlap. Ähnlich heterogen ist die Datenlage für Studien der Mikrobiomanalyse. Hier befassen sich zwar deutlich mehr Arbeiten mit der Untersuchung der Bakterienzusammensetzung, aber aus den sehr heterogenen Daten kann bislang noch kein eindeutiges Mikrobiomprofil den verschiedenen Subgruppen zugeordnet werden. Einen Versuch,

das Ausmaß der komplexen mikrobiellen Veränderungen zu erfassen, machten Casén et al. [104] durch die Entwicklung des Dysbioseindex, welcher den Grad der vorliegenden Dysbiose angibt und bei beiden IBS-Subgruppen gegenüber der Kontrollgruppe erhöht war. Zahlreiche Analysen der Mikrobiotakomposition, die auf verschiedenen taxonomischen Ebenen und bei unterschiedlichen Ethnien durchgeführt wurden, lieferten bislang sehr uneinheitliche Profile, jedoch wird vermehrt der Trend einer erhöhten *Firmicutes*abundanz, einer erniedrigten *Bacteroidetes*häufigkeit und einer reduzierten α -Diversität bei Patienten mit IBS beschrieben [119]. In den wenigen Subgruppenanalysen zeichnete sich jedoch kein Trend eines eindeutigen reproduzierbaren spezifischen Profils ab.

Das in dieser Arbeit vorgestellte Verfahren nutzte eine Kombination aus einer serologischen- als auch einer mikrobiellen Charakterisierung der Probanden. Hierbei zeichnete sich die IBS-C Kohorte durch zahlreiche Unterschiede (sowohl bei den Antikörpern als auch bei dem Mikrobiom) zu den Vergleichsgruppen aus (siehe *Tabelle 5*).

Tabelle 5: Übersicht der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, (+/- Referenzprofil, + verändertes Profil hin zu gesünderem Profil, ++ verändertes Profil hin zu deutlich gesünderem Profil, -/- verändertes Profil hin zu deutlich inflammatorischem Profil)

	Gesunde	IBS-D	IBS-C	FD
Bakterienprofiling	-/+	+	-/-	+/+
Mittlerer Dysbioseindex	2,6	2,5	3,6	2,8
Dysbiotisch (%)	47	46	81	57
Anti-CdtB (OD)	2,53	2,35	2,72	2,62
Anti-CdtB (% pos)	41	33	54	40
Anti-Vinculin (OD)	1,60	0,86	1,26	1,30
Anti-Vinculin (%pos)	36	13	31	33
PCA	-	Ähnlich wie Gesunde	Abweichendes Profil, gesteigerte Heterogenität	Ähnlich wie Gesunde

Nicht bei allen Einzelergebnissen konnte eine statistische Signifikanz erreicht werden, wofür eine zu geringe Anzahl an Probanden ursächlich sein könnte. Dennoch waren in der IBS-C Kohorte am häufigsten positive Anti-CdtB Titer und eine deutlich abweichende intestinale mikrobielle Zusammensetzung zu beobachten. Dies manifestierte sich durch erhöhte Dysbioseindizes, pathologisch veränderte Abundanzen von proinflammatorischen- und butyrat-produzierenden Bakterien, sowie ein separates Clustering der IBS-C Kohorte in der PCA. Im Gegensatz zu diesem Befund ließen sich anhand des funktionalen Profilings keine bestimmten Muster identifizieren, die eine Abgrenzung zwischen den Kontrollen und FD oder IBS-D ermöglichen.

Mit Ausnahme der Indikatorbakterien für die Darmgesundheit (*F. prausnitzii*) sprechen alle anderen Indikatorbakterien des funktionalen Bakterienprofilings für eine physiologischere Darmpopulation dieser beiden Kohorten. Der Befund bei IBS-D steht im Gegensatz zu der bislang beschriebenen Literatur, hier wird ein Anstieg von proinflammatorischen Proteobakterien- sowie von Enterobakterien berichtet [71, 120, 121]. Diese Unterschiede resultieren jedoch nicht aus der verwendeten Sequenzierungsmethode, da es sowohl bei RNA-basierten- als auch bei DNA- basierten Sequenzierungsmethoden Unterschiede zu unserer Studie gibt. Bezüglich dieser Abweichungen bedarf es weiterhin Abklärungsbedarf.

Basierend auf der funktionalen Charakterisierung zeigt das Profil der FD-Kohorte den niedrigsten Anteil an unphysiologischen Veränderungen. Mit Ausnahme von *F. prausnitzii* deuten alle Indikatoren auf ein niedriges Niveau an entzündlichen Prozessen-, sowie einen guten Schutz der Darmschleimhaut durch Mukosa-schützende und Butyrat-produzierende Bakterien hin. Dies lässt vermuten, dass es bei FD nicht zu einer vollständigen Änderung der Bakterienzusammensetzung im gesamten Gastrointestinaltrakt kommt, sondern dass sich diese Mikrobiomänderungen primär, wie von mehreren Studien beschrieben [93–95], auf den Oberbauch beziehen. Die Arbeit von Vasapolli et al. [122] zeigte jedoch, dass die Mikrobiomanalysen im Stuhl, kein genaues Abbild der Mukosasiluation des oberen Gastrointestinaltraktes darstellen, sodass die Mikrobiomanalysen, die alleine auf Feacesproben (ohne zusätzliche Mukosaproben) beruhen, mit Vorsicht zu interpretieren sind.

4.2 Vergleich der Mikrobiomprofile und Einfluss der Bakterien auf den Wirt

Die anhand des funktionalen Bakterienprofilings ermittelten Profilabweichungen, die sich am stärksten in der IBS-C Kohorte zeigten, wurden ebenfalls in der PCA Darstellung (*Abbildung 9*) deutlich. Hier zeigte die IBS-C Kohorte eine größere und weniger überlappendere Streuung als die Gruppen IBS-D, FD und Gesunde, welche ein nahezu übereinstimmendes Clustering aufwiesen. Zu vergleichbaren Erkenntnissen kamen auch Zeber-Lubecka et al. [123], die ebenfalls ein separates Clustering der IBS-C Kohorte beschrieben. Die Änderungen beruhten bei dieser Studie jedoch auf einer erniedrigten *Bacteroidetes/Firmicutes* ratio, sowie erhöhten Abundanzen von *Lachnospiraceae* und *Ruminococcaceae* bei IBS-C, wohingegen die Separation in der vorliegenden Studie durch erhöhte Werte an proinflammatorischen Bakterien sowie erniedrigte Abundanzen von butyratproduzierenden Bakterien, und hier im Wesentlichen von *E. hallii*, *E. rectale* sowie *F. prausnitzii* zurückzuführen war.

4.2.1 Butyrat produzierende Bakterien

Insbesondere die Erniedrigung des *F. prausnitzii* und die damit einhergehende Reduktion der Butyratkonzentration im Darm spielt in der Pathophysiologie des IBS eine bedeutende Rolle. Butyrat dient nicht nur als Haupt Energiequelle den epithelialen Zellen des Colons, sondern wirkt auch als schleimhautschützender, motilitätssteigernder und vor allem immunregulatorischer Metabolit [124]. So wurde nachgewiesen, dass eine Erniedrigung der Butyratkonzentration zu einem Anstieg der proinflammatorischen Zytokine (IL-8 und TNF- α) [125] sowie zu einer geringeren Inhibition des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B sowie IFN- γ führt [126]. Sokol et al. [127] zeigten darüber hinaus, dass das Buttersäure produzierende Bakterium *F. prausnitzii* durch Interaktion mit dem Epithel zusätzlich eine verstärkte Sekretion von antiinflammatorischem IL-10 induziert. Damit deutet die in vorliegender Arbeit beobachtete Erniedrigung der butyrat-produzierenden Bakterien in der IBS-C Kohorte auf Konformität mit der bisher postulierten Low-grade-entzündung der Mukosa bei IBS Patienten hin.

Neben dem breiten Effekt auf inflammatorische Prozesse in der Mukosa führt ein erniedrigter Butyrat Spiegel zusätzlich zu einer Vielzahl weiterer Symptome, die das Krankheitsbild des IBS-C prägen. So wurden eine Auswirkung auf die abdominale Schmerzempfindung [128], sowie eine verminderte Kontraktilität der Ringmuskelschicht und somit eine verminderte Peristaltik beschrieben [129]. Demzufolge können neben der

verlängerten Transitzeit auch das gesteigerte abdominale Schmerzempfinden, welches laut Rome-Kriterien zu den Hauptmerkmalen des IBS zählt, durch erniedrigte Buttersäurekonzentrationen im Darm erklärt werden.

Die in unserer Studie festgestellte Erniedrigung der Butyratbildner bei IBS-C Patienten kann bislang jedoch nur durch vereinzelte Studien bestätigt werden. So wurden erniedrigte Werte von *E. rectale* bei Patienten mit IBS-C beschrieben [130], eine Metaanalyse [131] wies verminderte Abundanzen von *F. prausnitzii* bei IBS nach, jedoch hier ohne Subgruppenspezialisierung. Teilweise gegensätzliche Beobachtung werden von Zeber-Lubecka et al. [123] berichtet, hier wurde bei einer vergleichbar belastbaren Studie ein Anstieg von *Eubacterium spp.* in der IBS-C Kohorte gezeigt. Carroll et al. [84] beschrieben für IBS-D Patienten eine sequenzierungsabhängige Veränderung der bakteriellen Abundanzen: Bei Verwendung der V3 Region bei der 16S-rRNA Sequenzierung wurde eine Reduktion der *Ruminococcaceae* um den Faktor 1,5 beobachtet, während in der gleichen Probe bei Verwendung der V6 Region ein Anstieg um den Faktor 7,6 zu verzeichnen war. Vor dem Hintergrund dieser Beobachtung sind die oft unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Studien kritisch zu hinterfragen und erlauben ohne ausreichende Standardisierung keine verlässliche Aussage über die Veränderung der Mikrobiomprofile für die verschiedenen Subgruppen.

4.2.2 Proinflammatorische Bakterien

Auffallend war auch, dass der Anteil an Probanden, die erhöhte proinflammatorische Bakterien (*Proteobacteria/Shigella spp. & Escherichia spp.*) aufwiesen, in der IBS-C Kohorte mit 45% im Vergleich zu den anderen Kohorten signifikant erhöht war. Auch hier ist die Datenlage in der Literatur bezüglich der Häufigkeiten dieser Bakterien bei IBS sehr heterogen. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen, beschrieben Chassard et al. [130] ebenfalls erhöhte Häufigkeiten von *Enterobacteriaceae* bei IBS-C im Vergleich zu gesunden Kontrollen, während bei Maccaferri et al. [77] nicht nur für IBS-C, sondern auch in der Subgruppe IBS-D erhöhte Anteile von *Enterobacteriaceae* nachweisbar waren. Die Diskrepanz zu den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen ist Bestandteil weiterer Untersuchungen. Im Gegensatz hierzu konnten Studien aus Taiwan [121] und Japan [132] keine Unterschiede in den Abundanzen dieser Bakterien im Vergleich zu den Kontrollen nachweisen, was in diesem Fall durch den oftmals beschriebenen Einfluss der unterschiedlichen Ernährung auf die intestinale Mikrobiota erklärt werden könnte. Ähnlich uneinheitlich ist die Literaturlage auf Phyla-Ebene bei den Proteobakterien, wobei die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Erhöhung bei obstipations-dominierenden IBS durch die Studien von Gobert et al. [120] und Rangel et

al. [89] bestätigt werden konnten, während in Arbeiten von Dior et al. [80] und Chung et al. [121] jedoch keine Unterschiede in der Häufigkeit beschrieben wurden. Dies ist möglicherweise auf die uneinheitlich verwendeten hypervariablen Regionen bei der Sequenzierung zurückzuführen.

4.3 Diversität

Ein ebenso uneinheitliches Bild ergibt sich bei der Betrachtung der Diversität bei Patienten mit Reizdarmsyndrom. In der Zusammenschau der heterogenen Literaturergebnisse, konnte dennoch ein Trend hin zu einer erniedrigten α -Diversität sowie Richness bei IBS beobachtet werden. Bei der deutlich seltener untersuchten β -Diversität konnten jedoch keine Unterschiede zwischen IBS und Gesunden aufgezeigt werden [88, 133]. Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektiv war in der PCA eine höhere interne Streuung als Indikator für eine erhöhte β -Diversität der IBS-C Kohorte zu beobachten, während alle anderen Subgruppen (Gesunde, IBS-D und FD) ein engeres und weitestgehend überlappendes Clustering aufweisen. Hierbei steht noch aus, ob bei diesem Merkmal eine Signifikanz erreicht werden konnte. Da sich keine der bisherigen Studien auf Diversitätsunterschiede innerhalb der IBS-Subgruppen und Gesunden bezogen haben, ist es schwierig die Erkenntnisse dieser Arbeit in die Literatur einzuordnen.

4.4 Dysbioseindex

Als Maß für die Veränderung des Mikrobioms vom „Normzustand“ wird der von Casén et al. [104] beschriebene und für eine skandinavische Referenzgruppe validierte Dysbioseindex genutzt. Auch hier zeichnete sich die vorliegende IBS-C Kohorte durch den höchsten Anteil an Abweichungen (statistisch jedoch nicht signifikant) von den Referenzprofilen aus. Dabei glichen unsere Werte bei der Gruppe mit IBS-C mit einem Anteil von 81% dysbiotischen Patienten denen von Casén et al. [104] (73% dysbiotisch), während für die IBS-D Kohorte und die Kontrollgruppe bei Casén et.al mit 76% und 16% Dysbiose abweichende Zahlen zu unseren Ergebnissen (46% IBS-D und 47% Gesunde) gezeigt wurden. Dabei ist die Diskrepanz der gesunden Probanden (47% dysbiotisch vs. 16% dysbiotisch) zwischen beiden Studien möglicherweise auf generelle Umweltfaktoren, wie beispielsweise Diät zurückzuführen (deutsche vs. skandinavische). Diese ernährungsabhängige Veränderung des Dysbioseindex wurde auch in der oben

zitierten Studie beschrieben. Hier wiesen mit 37% der dänischen bzw. 42% der spanischen gesunden Probanden, ein größerer Anteil der Kontrollen eine Dysbiose auf, im Vergleich zu der skandinavischen Kontrollgruppe, was durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt wird. Dass die Ernährung die mikrobielle Komposition moduliert, ist bekannt und von mehreren Studien bestätigt worden [134–137]. Im Gegenteil zu der IBS-C Kohorte waren bei der vorliegenden IBS-D Gruppe keine erhöhten Dysbioseindizes zu beobachten. Hier ist der Index nicht wie bei Casén et al. berichtet deutlich gegenüber der Referenzgruppe erhöht, sondern liegt mit 46% dysbiotischen Probanden auf dem Niveau der gesunden Gruppe. Eine Annahme ist, dass in vorliegender Kohorte primär IBS-D Patienten mit einer sehr milden Ausprägungsform rekrutiert wurden und sich die mikrobielle Komposition dementsprechend nicht stark von den Gesunden unterscheidet. So zeigte eine Studie von Tap et al. [88], dass die Mikrobiomprofile von Patienten mit milden IBS Symptomen, denen der gesunden Probanden stärker ähneln als denen mit schweren Ausprägungsformen von IBS. Dementsprechend gelte die Schwere der Erkrankung als Hauptfaktor für die Mikrobiomzusammensetzung.

Bei weiteren Untersuchungen, zur Identifizierung bakterieller Gruppen, die als „Haupttreiber“ der erhöhten Dysbioseindizes fungieren, konnten *R. albus* & und *Phascolarctobacterium* sp. bestimmt werden. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen verzeichneten Casén et al. [104] ebenfalls *Proteobacteria*, sowie eine andere Spezies der Familie *Ruminococcaceae* als einflussreiche Bakterien bei Patienten mit hohem Dysbioseindex.

4.5 Analyse der Anti-CdtB- und Anti-Vinculin-Antikörper Werte

Neben einer potentiellen Veränderung der Mikrobiom-Komposition in Abhängigkeit der IBS-Symptomatik wurden für Patienten mit post-infektiösem IBS erhöhte Titer von Anti-CdtB- und Anti-Vinculin Antikörpern beschrieben und als Diagnosikmarker vorgeschlagen [105]. Daher wurde in vorliegender Arbeit (erstmalig in Europa) der Antikörpertiter für beide Antigene über alle Kohorten bestimmt, um deren zusätzlichen Wert für eine bessere Diagnosestellung zu überprüfen. In dieser Arbeit konnten keinerlei statistisch signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Kohorten (IBS-D, IBS-C und FD) gezeigt werden- weder bei den Anti-CdtB- noch bei den Anti-Vinculin Antikörpertitern. Diese Ergebnisse stehen in Diskrepanz zu den Studien von Pimentel et al. [105] und Rezaie et al. [114], in denen erhöhte Anti-CdtB und Anti-Vinculin Antikörper Titer nur für die Gruppe mit IBS-D nachgewiesen wurden. Damit bestätigen vorliegende

Ergebnisse nicht den von Pimentel et al. vorgeschlagenen Pathomechanismus, bei dem es durch eine vorherige intestinale Infektion mit cytolethal distending toxin (Cdt) bildenden Keimen zu einer CdtB-Antikörperbildung und anschließend durch molekular mimikry zur Ausbildung von Autoantikörpern gegen Vinculin kommt. Auch die von Schmulson et al. [113] gemachten Beobachtungen unterstützen nicht die o.g. Hypothese. Hier wurden Antikörpertiter sowohl bei PI-Patienten, als auch bei nicht-PI Patienten nachgewiesen, ebenso wurde keine Kopplung zwischen Anti-CdtB- und Anti-Vinculin Antikörpern, wie von Pimentel postuliert, gezeigt. Vor dem Hintergrund dieser und unserer Daten erscheint es daher wahrscheinlich, dass es einen möglichen anderen kausalen Mechanismus der Antikörperbildung gibt, der nicht auf einer vorherigen enterischen Infektion beruht. So wurde z.B. die Ausbildung von Anti-Vinculin Antikörpern bereits im Zusammenhang mit systemischer Sklerose oder einem erhöhter BMI beschrieben [138]. Beide Einflussfaktoren konnten mittels Regressionsanalysen in vorliegender Arbeit jedoch als potenzielle Faktoren auf die Anti-Vinculinbildung ausgeschlossen werden. Als eine mögliche Erklärung für die divergierenden Antikörpertiter in den verschiedenen IBS-Subgruppen könnte die unterschiedliche ethnische Herkunft der Probanden sein. In den oben genannten Studien [105, 113, 114] wurden Probanden aus Nordamerika und Mexiko rekrutiert, wohingegen unsere Studie nur Probanden aus Europa einschloss. Diese Annahme wird von der Studie von Talley et al. [115] unterstrichen, welche Anti-CdtB und Anti-Vinculin Titer australischer Probanden gemessen hat und erhöhte Anti-CdtB Titer für Patienten mit FD und FD/IBS-overlap nachwies, wohingegen auch hier die IBS-D Gruppe keine erhöhten Werte zeigte. Hinzu kommt, dass in dieser, wie auch in unserer Studie, keine signifikant erhöhten Anti-Vinculin Titer gemessen wurden.

Eine andere denkbare Erklärung für erhöhte Anti-CdtB-Antikörper Titer in IBS Patienten könnte aus vorliegenden Daten abgeleitet werden: In unserer Studie konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhten Anti-CdtB Antikörpern und erhöhten Dysbioseindizes gezeigt werden. Ebenso stellte sich mittels Regressionsanalysen heraus, dass eine Antibiotikaeinnahme (innerhalb der letzten 3 Jahre) einen signifikanten Einfluss auf die Anti-CdtB-Höhe hat. Dabei waren diese Korrelationen unabhängig von der klinischen Symptomatik und lediglich für Anti-CdtB-Antikörper und nicht für Anti-Vinculin Antikörper zu beobachten. In Betracht zu ziehen wäre hier eine andere Hypothese als die von Pimentel et al. vorgeschlagene, bei der es über Anti-CdtB-Antikörperbildung und Epitopmimikry zur Ausbildung der motilitäts- sowie barriereschädigenden und damit krankheitsursächlichen Anti-Vinculin Antikörpern kommt. So könnten nicht postinfektiöse Ursachen wie beispielsweise Stress, eine Ernährungsumstellung oder eine vorherige Antibiotikaeinnahme eine Dysbiose herbeigeführt haben, durch die es anschließend, aufgrund der Anreicherung von

proinflammatorischen CdtB-produzierenden Bakterien, wie z.B. *Shigella spp.* oder *Escherichia spp.*, zu einem Anstieg des besagten Antikörpertiters kommt. Dies würde bedeuten, dass die beobachtete Anti-CdtB-Antikörperbildung nicht die Ursache, sondern die Folge einer Dysbiose ist und Anti-CdtB-Ak dementsprechend eher als ein genereller Marker für eine Dysbiose, speziell für eine Abundanzsteigerung von proinflammatorischen Bakterien, zu sehen sein könnten und weniger als ein spezifischer Marker für PI-IBS-D. Diese Hypothese wird auch durch die Arbeit von Talley et al. [115] unterstützt, in der ebenfalls keine erhöhten Anti-CdtB- und Anti-Vinculin Titer bei IBS-D beobachtet wurden, sondern stattdessen lediglich eine Steigerung der Anti-CdtB-Antikörper bei FD beschrieben wurden. Insgesamt ist die Sachlage zu dieser Hypothese aber noch unzureichend und muss durch weitere Arbeiten überprüft werden.

4.6 Schlussfolgerung und Limitationen dieser Studie

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass weder subgruppenspezifische Unterschiede in den fäkalen Mikrobiotaprofilen noch in den Anti-CdtB- und Anti-Vinculin-Titern, der untersuchten Subgruppen mit FGID's vorliegen. Jedoch weist die IBS-C Kohorte den höchsten Anteil an Anti-CdtB-positiven Probanden sowie dysbiotischen Probanden auf, wobei der erhöhte Dysbioseindex durch vermehrte proinflammatorische und verminderte butyratproduzierende Bakterien getrieben wird. Durch den signifikanten Zusammenhang der beiden Parameter (DI und Anti-CdtB), könnte basierend auf vorliegenden Daten eine mögliche neue ätiologische Verbindung der dysbiose-abhängigen Antikörperbildung (durch CdtB bildende proinflammatorische Bakterien) hergestellt werden. Dies bietet für zukünftige Studien einen neuen Anhaltspunkt der Biomarkerforschung. Aufgrund der nicht immer erreichten Signifikanz bedürfen die vorliegenden Ergebnisse weitere Studien.

Aufgrund der geringen Anzahl an Studienprobanden pro Subgruppe ist die nicht erreichte Signifikanz nicht stichhaltig. Die erkennbaren statistischen Trends lassen jedoch vermuten, dass eine größere Studienpopulation zu einer Signifikanz führen könnte. Hinzu kommen die unterschiedlichen Einschlusskriterien vieler und somit auch unserer Studie. Obwohl bei dieser Arbeit Patienten nicht anhand der aktualisierten Rome- IV-Kriterien, sondern anhand der Rome- III-Kriterien eingeschlossen wurden, konnte eine Studie aus Schweden [139] zeigen, dass die meisten Rome- III-positiven IBS-Patienten, ebenfalls die Rome- IV-Kriterien erfüllten. Dies macht Vergleiche zwischen dieser Studie und Studien zur Auswahl von Patienten gemäß den Rome- IV-

Kriterien verwertbar. Außerdem muss beachtet werden, dass die in dieser Arbeit verwendeten nicht-invasiv gewonnenen Stuhlproben vornehmlich luminale intestinale Bakterien enthalten. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass sich das Mikrobiom von Stuhlproben und von entsprechenden Schleimhautproben stark unterscheidet, sodass sich eine relevante Ableitung der mikrobiellen Komposition des Darmtraktes aus der Zusammenschau dieser beiden Proben besser eignet, als die alleinige Betrachtung der Faeces [122]. Dieser Punkt stellt gegebenenfalls zusammen mit dem nächsten Punkt eine mögliche Ursache der heterogenen Mikrobiomergebnisse dar. Es gilt nämlich zusätzlich zu beachten, dass bislang kein standardisiertes Sequenzierungsverfahren der 16S-rRNA festgelegt wurde. Durch die zufällige Wahl der hypervariablen Region(en) kann es deshalb zu einer „amplification bias“ kommen, die aufgrund einer unzureichenden Spezifität des Primer-Annealing zum Detektieren relevanter bakterieller Taxa zustande kommt [140]. In dieser Studie wurde jedoch ein Panel verwendet, welches mit den Regionen V3 bis V9 einen großen Bereich der 16S-rRNA Gene abdeckt und dementsprechend sehr genaue Sequenzierungsdaten liefern kann, wenn auch hierdurch der Vergleich zu anderen Studien ungenauer wird.

Für zukünftigen Studien gelten daher die Empfehlungen, ein übereinstimmendes standardisiertes Sequenzierungsverfahren anzuwenden, ähnliches Probematerial zu verwenden und Einflussfaktoren wie beispielsweise Ernährung, Ethnie und Stresslevel stärker zu berücksichtigen, um bei den Analysen möglicherweise einheitlichere und repräsentativere Mikrobiomprofile liefern zu können.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Funktionelle gastrointestinale Erkrankungen gehören wegen ihrer großen Verbreitung zu den häufigsten Krankheiten, die den Patienten zum Arzt führen. Bislang mangelt es an entsprechenden Markern, die zu einer eindeutigen Diagnose verhelfen würden. Ziel dieser Arbeit war es daher, Unterschiede bei den verschiedenen Subgruppen (IBS-D, IBS-C, FD und Gesunde) hinsichtlich Anti-CdtB- und Anti-Vinculin-titern, Mikrobiomprofilen sowie Dysbioseindizes zu finden. An Blutproben von 65 Probanden (15 IBS-D, 13 IBS-C, 15 FD, 22 Gesunde) sowie Stuhlproben von 53 Probanden (13 IBS-D, 11 IBS-C, 14 FD, 15 Gesunde) wurden zwischen März 2015 und März 2017 in der Universitätsklinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie Magdeburg entsprechende Untersuchungen durchgeführt. Die Bestimmung der Anti-CdtB- sowie Anti-Vinculin-Antikörper-Titer erfolgte durch ein ELISA. Die Analyse der Stuhlproben wurde anhand des GA-map®- Dysbiose Tests vorgenommen. Dieser Test basiert er auf 48 zuvor berechneten bakteriellen Sonden, welche die hypervariablen Regionen (V3 bis V9) der 16S-rRNA Sequenz abdecken und Bakterien von 6 Phyla, sowie 10 Bakterienklassen und 36 Genera detektieren können. Bei unserer Kohorte waren weder bei den Antikörpertitern noch bei den Dysbioseindizes subgruppenspezifische Unterschiede zu verzeichnen. Allerdings zeichnete sich die IBS-C Kohorte durch den höchsten Anteil an CdtB-positiven- sowie dysbiotischen Probanden aus, wobei die Dysbiose hauptsächlich durch signifikant erhöhte proinflammatorische- und erniedrigte butyratproduzierende Bakterien zustande kam. Zudem zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhten CdtB-Werten und erhöhten Dysbioseindizes. Das deutet auf eine neue ätiologische Verbindung zwischen diesen beiden Parametern hin. Zugrunde liegt die Anti-CdtB Antikörperbildung, die als Folge von Dysbiose (bzw. von vermehrten proinflammatorischen CdtB-bildenden Keimen) auftritt, anstatt die Ursache der Dysbiose darzustellen. Unsere Studie liefert weitere Erkenntnisse im großen Forschungsfeld der Biomarker- sowie Mikrobiomanalysen und kann somit einen Teil zur Weiterentwicklung der Marker-basierten Diagnostik bei funktionellen gastrointestinalen Erkrankungen beitragen.

Literatur

- [1] V. Stanghellini, „Functional Dyspepsia and Irritable Bowel Syndrome: Beyond Rome IV“ (eng), *Digestive diseases (Basel, Switzerland)*, 35 Suppl 1, S. 14–17, 2017, doi: 10.1159/000485408.
- [2] N. J. Talley, „Functional Dyspepsia: Advances in Diagnosis and Therapy“ (eng), *Gut and liver*, Jg. 11, Nr. 3, S. 349–357, 2017, doi: 10.5009/gnl16055.
- [3] G. J. Holtmann, A. C. Ford und N. J. Talley, „Pathophysiology of irritable bowel syndrome“, *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, Jg. 1, Nr. 2, S. 133–146, 2016, doi: 10.1016/S2468-1253(16)30023-1.
- [4] M. Pimentel *et al.*, „Autoimmunity Links Vinculin to the Pathophysiology of Chronic Functional Bowel Changes Following *Campylobacter jejuni* Infection in a Rat Model“ (eng), *Digestive diseases and sciences*, Jg. 60, Nr. 5, S. 1195–1205, 2015, doi: 10.1007/s10620-014-3435-5.
- [5] A. C. Ford, A. Marwaha, A. Lim und P. Moayyedi, „Systematic review and meta-analysis of the prevalence of irritable bowel syndrome in individuals with dyspepsia“ (eng), *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, Jg. 8, Nr. 5, S. 401–409, 2010, doi: 10.1016/j.cgh.2009.07.020.
- [6] H. Suzuki und T. Hibi, „Overlap syndrome of functional dyspepsia and irritable bowel syndrome - are both diseases mutually exclusive?“ (eng), *Journal of neurogastroenterology and motility*, Jg. 17, Nr. 4, S. 360–365, 2011, doi: 10.5056/jnm.2011.17.4.360.
- [7] B. Löwe, A. Lohse, V. Andresen, E. Vettorazzi, M. Rose und W. Broicher, „The Development of Irritable Bowel Syndrome: A Prospective Community-Based Cohort Study“ (eng), *The American journal of gastroenterology*, Jg. 111, Nr. 9, S. 1320–1329, 2016, doi: 10.1038/ajg.2016.255.
- [8] L. Saha, „Irritable bowel syndrome: Pathogenesis, diagnosis, treatment, and evidence-based medicine“ (eng), *World journal of gastroenterology*, Jg. 20, Nr. 22, S. 6759–6773, 2014, doi: 10.3748/wjg.v20.i22.6759.
- [9] U. C. Ghoshal, „Pros and Cons While Looking Through an Asian Window on the Rome IV Criteria for Irritable Bowel Syndrome: Pros“ (eng), *Journal of neurogastroenterology and motility*, Jg. 23, Nr. 3, S. 334–340, 2017, doi: 10.5056/jnm17020.
- [10] R. C. Spiller, „Postinfectious irritable bowel syndrome“ 1Abbreviations used in this paper: EC, _; IBS, irritable bowel syndrome; PI, postinfective“, *Gastroenterology*, Jg. 124, Nr. 6, S. 1662–1671, 2003, doi: 10.1016/S0016-5085(03)00324-X.

- [11] M. Grover, „Role of gut pathogens in development of irritable bowel syndrome“ (eng), *The Indian Journal of Medical Research*, Jg. 139, Nr. 1, S. 11–18, 2014.
- [12] N. J. Talley und A. C. Ford, „functional dyspepsia“ (eng), *The New England journal of medicine*, Jg. 373, Nr. 19, S. 1853–1863, 2015, doi: 10.1056/NEJMra1501505.
- [13] M. Pimentel, C. Purdy, R. Magar und A. Rezaie, „A Predictive Model to Estimate Cost Savings of a Novel Diagnostic Blood Panel for Diagnosis of Diarrhea-predominant Irritable Bowel Syndrome“ (eng), *Clinical therapeutics*, Jg. 38, Nr. 7, 1638-1652.e9, 2016, doi: 10.1016/j.clinthera.2016.05.003.
- [14] N. J. Talley, „Functional dyspepsia: New insights into pathogenesis and therapy“ (eng), *The Korean journal of internal medicine*, Jg. 31, Nr. 3, S. 444–456, 2016, doi: 10.3904/kjim.2016.091.
- [15] I. M. Gralnek, R. D. Hays, A. Kilbourne, B. Naliboff und E. A. Mayer, „The impact of irritable bowel syndrome on health-related quality of life“, *Gastroenterology*, Jg. 119, Nr. 3, S. 654–660, 2000, doi: 10.1053/gast.2000.16484.
- [16] A. P. Manning, W. G. Thompson, K. W. Heaton und A. F. Morris, „Towards positive diagnosis of the irritable bowel“ (eng), *British medical journal*, Jg. 2, Nr. 6138, S. 653–654, 1978, doi: 10.1136/bmj.2.6138.653.
- [17] B. E. Lacy und N. K. Patel, „Rome Criteria and a Diagnostic Approach to Irritable Bowel Syndrome“ (eng), *Journal of clinical medicine*, Jg. 6, Nr. 11, 2017, doi: 10.3390/jcm6110099.
- [18] D. A. Drossman, „The Rome Criteria Process: Diagnosis and Legitimization of Irritable Bowel Syndrome“, *American Journal Of Gastroenterology*, Jg. 94, 2803 EP -, 1999, doi: 10.1111/j.1572-0241.1999.02803.x.
- [19] Chang L., „Updates to the Rome Criteria for Irritable Bowel Syndrome“, *Gastroenterology & Hepatology.*, 13(5), 304-306., 2017.
- [20] R. Sood und A. C. Ford, „Use of Biomarkers in Irritable Bowel Syndrome: To Predict the Future, Look at the Past“ (eng), *Clinical and translational gastroenterology*, Jg. 6, e116, 2015, doi: 10.1038/ctg.2015.41.
- [21] M. Simren, O. S. Palsson und W. E. Whitehead, „Update on Rome IV Criteria for Colorectal Disorders: Implications for Clinical Practice“ (eng), *Current gastroenterology reports*, Jg. 19, Nr. 4, S. 15, 2017, doi: 10.1007/s11894-017-0554-0.
- [22] C. Canavan, T. Card und J. West, „The incidence of other gastroenterological disease following diagnosis of irritable bowel syndrome in the UK: A cohort study“ (eng), *PloS one*, Jg. 9, Nr. 9, e106478, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0106478.

- [23] J. H. Kim, E. Lin und M. Pimentel, „Biomarkers of Irritable Bowel Syndrome“ (eng), *Journal of neurogastroenterology and motility*, Jg. 23, Nr. 1, S. 20–26, 2017, doi: 10.5056/jnm16135.
- [24] J. L. Buono, „Economic Burden of Irritable Bowel Syndrome with Diarrhea: Retrospective Analysis of a U.S. Commercially Insured Population“.
- [25] B. Cash, „Economic impact of irritable bowel syndrome: What does the future hold?“ (eng), *The American journal of managed care*, Jg. 11, 1 Suppl, S4-6, 2005.
- [26] D. A. Drossman *et al.*, „International survey of patients with IBS: Symptom features and their severity, health status, treatments, and risk taking to achieve clinical benefit“ (eng), *Journal of clinical gastroenterology*, Jg. 43, Nr. 6, S. 541–550, 2009, doi: 10.1097/MCG.0b013e318189a7f9.
- [27] A. C. Ford, P. Bercik, D. G. Morgan, C. Bolino, M. I. Pintos-Sanchez und P. Moayyedi, „Validation of the Rome III criteria for the diagnosis of irritable bowel syndrome in secondary care“ (eng), *Gastroenterology*, Jg. 145, Nr. 6, 1262-70.e1, 2013, doi: 10.1053/j.gastro.2013.08.048.
- [28] A. L. Engsbro *et al.*, „Patients suspected of irritable bowel syndrome--cross-sectional study exploring the sensitivity of Rome III criteria in primary care“ (eng), *The American journal of gastroenterology*, Jg. 108, Nr. 6, S. 972–980, 2013, doi: 10.1038/ajg.2013.15.
- [29] A. C. Ford, P. Bercik, D. G. Morgan, C. Bolino, M. I. Pintos-Sanchez und P. Moayyedi, „The Rome III criteria for the diagnosis of functional dyspepsia in secondary care are not superior to previous definitions“ (eng), *Gastroenterology*, Jg. 146, Nr. 4, 932-40; quiz e14-5, 2014, doi: 10.1053/j.gastro.2014.01.014.
- [30] S. Y. Nam, B. C. Kim, K. H. Ryu und B. J. Park, „Prevalence and risk factors of irritable bowel syndrome in healthy screenee undergoing colonoscopy and laboratory tests“ (eng), *Journal of neurogastroenterology and motility*, Jg. 16, Nr. 1, S. 47–51, 2010, doi: 10.5056/jnm.2010.16.1.47.
- [31] P. Aro, N. J. Talley, S.-E. Johansson, L. Agréus und J. Ronkainen, „Anxiety Is Linked to New-Onset Dyspepsia in the Swedish Population: A 10-Year Follow-up Study“ (eng), *Gastroenterology*, Jg. 148, Nr. 5, S. 928–937, 2015, doi: 10.1053/j.gastro.2015.01.039.
- [32] M. Thabane und J. K. Marshall, „Post-infectious irritable bowel syndrome“, *WJG*, Jg. 15, Nr. 29, S. 3591, 2009, doi: 10.3748/wjg.15.3591.
- [33] C. Dai und M. Jiang, „The incidence and risk factors of post-infectious irritable bowel syndrome: A meta-analysis“ (eng), *Hepato-gastroenterology*, Jg. 59, Nr. 113, S. 67–72, 2012, doi: 10.5754/hge10796.
- [34] J. Schwille-Kiuntke, N. Mazurak und P. Enck, „Systematic review with meta-analysis: Post-infectious irritable bowel syndrome after travellers' diarrhoea“

- (eng), *Alimentary pharmacology & therapeutics*, Jg. 41, Nr. 11, S. 1029–1037, 2015, doi: 10.1111/apt.13199.
- [35] F. Klem *et al.*, „Prevalence, Risk Factors, and Outcomes of Irritable Bowel Syndrome After Infectious Enteritis: A Systematic Review and Meta-analysis“ (eng), *Gastroenterology*, Jg. 152, Nr. 5, 1042-1054.e1, 2017, doi: 10.1053/j.gastro.2016.12.039.
- [36] M. Thabane, D. T. Kottachchi und J. K. Marshall, „Systematic review and meta-analysis: The incidence and prognosis of post-infectious irritable bowel syndrome“ (eng), *Alimentary pharmacology & therapeutics*, Jg. 26, Nr. 4, S. 535–544, 2007, doi: 10.1111/j.1365-2036.2007.03399.x.
- [37] K. R. Neal, J. Hebden und R. Spiller, „Prevalence of gastrointestinal symptoms six months after bacterial gastroenteritis and risk factors for development of the irritable bowel syndrome: Postal survey of patients“, *BMJ*, Jg. 314, Nr. 7083, S. 779, 1997, doi: 10.1136/bmj.314.7083.779.
- [38] S. Futagami, T. Itoh und C. Sakamoto, „Systematic review with meta-analysis: Post-infectious functional dyspepsia“ (eng), *Alimentary pharmacology & therapeutics*, Jg. 41, Nr. 2, S. 177–188, 2015, doi: 10.1111/apt.13006.
- [39] N. J. Talley, N. B. Vakil und P. Moayyedi, „American gastroenterological association technical review on the evaluation of dyspepsia“ (eng), *Gastroenterology*, Jg. 129, Nr. 5, S. 1756–1780, 2005, doi: 10.1053/j.gastro.2005.09.020.
- [40] L. E. Mazzoleni *et al.*, „Helicobacter pylori eradication in functional dyspepsia: HEROES trial“ (eng), *Archives of internal medicine*, Jg. 171, Nr. 21, S. 1929–1936, 2011, doi: 10.1001/archinternmed.2011.533.
- [41] J. K. Marshall, M. Thabane, M. R. Borgaonkar und C. James, „Postinfectious irritable bowel syndrome after a food-borne outbreak of acute gastroenteritis attributed to a viral pathogen“ (eng), *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, Jg. 5, Nr. 4, S. 457–460, 2007, doi: 10.1016/j.cgh.2006.11.025.
- [42] D. A. Drossman, M. Camilleri, E. A. Mayer und W. E. Whitehead, „AGA technical review on irritable bowel syndrome“ (eng), *Gastroenterology*, Jg. 123, Nr. 6, S. 2108–2131, 2002, doi: 10.1053/gast.2002.37095.
- [43] R. C. Spiller, „Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute Campylobacter enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome“, *Gut*, Jg. 47, Nr. 6, S. 804–811, 2000, doi: 10.1136/gut.47.6.804.

- [44] G. Holtmann *et al.*, „G-protein β 3 subunit 825 CC genotype is associated with unexplained (functional) dyspepsia 1 ☆“, *Gastroenterology*, Jg. 126, Nr. 4, S. 971–979, 2004, doi: 10.1053/j.gastro.2004.01.006.
- [45] T. Tahara *et al.*, „Homozygous TRPV1 315C influences the susceptibility to functional dyspepsia“ (eng), *Journal of clinical gastroenterology*, Jg. 44, Nr. 1, e1-7, 2010, doi: 10.1097/MCG.0b013e3181b5745e.
- [46] S. P. Dunlop *et al.*, „Abnormalities of 5-hydroxytryptamine metabolism in irritable bowel syndrome“, *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, Jg. 3, Nr. 4, S. 349–357, 2005, doi: 10.1016/S1542-3565(04)00726-8.
- [47] L. Zhang, J. Song und X. Hou, „Mast Cells and Irritable Bowel Syndrome: From the Bench to the Bedside“ (eng), *Journal of neurogastroenterology and motility*, Jg. 22, Nr. 2, S. 181–192, 2016, doi: 10.5056/jnm15137.
- [48] B. Adam *et al.*, „Severity of mucosal inflammation as a predictor for alterations of visceral sensory function in a rat model“ (eng), *Pain*, Jg. 123, 1-2, S. 179–186, 2006, doi: 10.1016/j.pain.2006.02.029.
- [49] M. M. Walker *et al.*, „Implications of eosinophilia in the normal duodenal biopsy - an association with allergy and functional dyspepsia“ (eng), *Alimentary pharmacology & therapeutics*, Jg. 31, Nr. 11, S. 1229–1236, 2010, doi: 10.1111/j.1365-2036.2010.04282.x.
- [50] M. M. Walker *et al.*, „Duodenal eosinophilia and early satiety in functional dyspepsia: Confirmation of a positive association in an Australian cohort“ (eng), *Journal of gastroenterology and hepatology*, Jg. 29, Nr. 3, S. 474–479, 2014, doi: 10.1111/jgh.12419.
- [51] X. Li *et al.*, „The study on the role of inflammatory cells and mediators in post-infectious functional dyspepsia“ (eng), *Scandinavian journal of gastroenterology*, Jg. 45, Nr. 5, S. 573–581, 2010, doi: 10.3109/00365521003632576.
- [52] S. Kindt, A. Tertychnyy, G. de Hertogh, K. Geboes und J. Tack, „Intestinal immune activation in presumed post-infectious functional dyspepsia“ (eng), *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, Jg. 21, Nr. 8, 832-e56, 2009, doi: 10.1111/j.1365-2982.2009.01299.x.
- [53] M. Vicario *et al.*, „Increased humoral immunity in the jejunum of diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome associated with clinical manifestations“ (eng), *Gut*, Jg. 64, Nr. 9, S. 1379–1388, 2015, doi: 10.1136/gutjnl-2013-306236.
- [54] M. Bashashati *et al.*, „Cytokine imbalance in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis“ (eng), *Neurogastroenterology and motility :*

the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society, Jg. 26, Nr. 7, S. 1036–1048, 2014, doi: 10.1111/nmo.12358.

- [55] E. M. Wilcz-Villega, S. McClean und M. A. O'Sullivan, „Mast Cell Tryptase Reduces Junctional Adhesion Molecule-A (JAM-A) Expression in Intestinal Epithelial Cells: Implications for the Mechanisms of Barrier Dysfunction in Irritable Bowel Syndrome“, *The American journal of gastroenterology*, Jg. 108, 1140 EP -, 2013, doi: 10.1038/ajg.2013.92.
- [56] N. Bertiaux-Vandaële *et al.*, „The Expression and the Cellular Distribution of the Tight Junction Proteins Are Altered in Irritable Bowel Syndrome Patients With Differences According to the Disease Subtype“, *The American journal of gastroenterology*, Jg. 106, 2165 EP -, 2011, doi: 10.1038/ajg.2011.257.
- [57] T. Liebrechts *et al.*, „Small bowel homing T cells are associated with symptoms and delayed gastric emptying in functional dyspepsia“ (eng), *The American journal of gastroenterology*, Jg. 106, Nr. 6, S. 1089–1098, 2011, doi: 10.1038/ajg.2010.512.
- [58] S. Temraz, F. Nassar, R. Nasr, M. Charafeddine, D. Mukherji und A. Shamseddine, „Gut Microbiome: A Promising Biomarker for Immunotherapy in Colorectal Cancer“ (eng), *International journal of molecular sciences*, Jg. 20, Nr. 17, 2019, doi: 10.3390/ijms20174155.
- [59] S. Menees und W. Chey, „The gut microbiome and irritable bowel syndrome“ (eng), *F1000Research*, Jg. 7, 2018, doi: 10.12688/f1000research.14592.1.
- [60] M. Gabrielli, G. D'Angelo, T. Di Rienzo, E. Scarpellini und V. Ojetti, „Diagnosis of small intestinal bacterial overgrowth in the clinical practice“ (eng), *European review for medical and pharmacological sciences*, 17 Suppl 2, S. 30–35, 2013.
- [61] M. Rajilić-Stojanović und W. M. de Vos, „The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota“ (eng), *FEMS microbiology reviews*, Jg. 38, Nr. 5, S. 996–1047, 2014, doi: 10.1111/1574-6976.12075.
- [62] E. Distrutti, L. Monaldi, P. Ricci und S. Fiorucci, „Gut microbiota role in irritable bowel syndrome: New therapeutic strategies“ (eng), *World journal of gastroenterology*, Jg. 22, Nr. 7, S. 2219–2241, 2016, doi: 10.3748/wjg.v22.i7.2219.
- [63] P. P. Chong, V. K. Chin, C. Y. Looi, W. F. Wong, P. Madhavan und V. C. Yong, „The Microbiome and Irritable Bowel Syndrome - A Review on the Pathophysiology, Current Research and Future Therapy“ (eng), *Frontiers in microbiology*, Jg. 10, S. 1136, 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.01136.
- [64] K. Hiippala *et al.*, „The Potential of Gut Commensals in Reinforcing Intestinal Barrier Function and Alleviating Inflammation“ (eng), *Nutrients*, Jg. 10, Nr. 8, 2018, doi: 10.3390/nu10080988.

- [65] I. Sekirov, S. L. Russell, L. C. M. Antunes und B. B. Finlay, „Gut microbiota in health and disease“ (eng), *Physiological reviews*, Jg. 90, Nr. 3, S. 859–904, 2010, doi: 10.1152/physrev.00045.2009.
- [66] J. J. Faith *et al.*, „The long-term stability of the human gut microbiota“ (eng), *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 341, Nr. 6141, S. 1237439, 2013, doi: 10.1126/science.1237439.
- [67] A. Salonen, J. Salojärvi, L. Lahti und W. M. de Vos, „The adult intestinal core microbiota is determined by analysis depth and health status“ (eng), *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18 Suppl 4, S. 16–20, 2012, doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03855.x.
- [68] Y. Bhattarai, D. A. Muniz Pedrego und P. C. Kashyap, „Irritable bowel syndrome: A gut microbiota-related disorder?“ (eng), *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, Jg. 312, Nr. 1, G52-G62, 2017, doi: 10.1152/ajpgi.00338.2016.
- [69] S. M. P. Bennet, L. Ohman und M. Simren, „Gut microbiota as potential orchestrators of irritable bowel syndrome“ (eng), *Gut and liver*, Jg. 9, Nr. 3, S. 318–331, 2015, doi: 10.5009/gnl14344.
- [70] A. Hadjivasilis, C. Tsioutis, A. Michalinos, D. Ntourakis, D. K. Christodoulou und A. P. Agouridis, „New insights into irritable bowel syndrome: from pathophysiology to treatment“ (eng), *Annals of gastroenterology*, Jg. 32, Nr. 6, S. 554–564, 2019, doi: 10.20524/aog.2019.0428.
- [71] I. B. Jeffery *et al.*, „An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota“ (eng), *Gut*, Jg. 61, Nr. 7, S. 997–1006, 2012, doi: 10.1136/gutjnl-2011-301501.
- [72] M. Rajilić-Stojanović *et al.*, „Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome“ (eng), *Gastroenterology*, Jg. 141, Nr. 5, S. 1792–1801, 2011, doi: 10.1053/j.gastro.2011.07.043.
- [73] L. Krogius-Kurikka *et al.*, „Microbial community analysis reveals high level phylogenetic alterations in the overall gastrointestinal microbiota of diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome sufferers“ (eng), *BMC gastroenterology*, Jg. 9, S. 95, 2009, doi: 10.1186/1471-230X-9-95.
- [74] E. Malinen *et al.*, „Analysis of the fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients and healthy controls with real-time PCR“ (eng), *The American journal of gastroenterology*, Jg. 100, Nr. 2, S. 373–382, 2005, doi: 10.1111/j.1572-0241.2005.40312.x.

- [75] A. P. M. Kerckhoffs *et al.*, „Lower Bifidobacteria counts in both duodenal mucosa-associated and fecal microbiota in irritable bowel syndrome patients“, *WJG*, Jg. 15, Nr. 23, S. 2887, 2009, doi: 10.3748/wjg.15.2887.
- [76] K. Triantafyllou, C. Chang und M. Pimentel, „Methanogens, methane and gastrointestinal motility“ (eng), *Journal of neurogastroenterology and motility*, Jg. 20, Nr. 1, S. 31–40, 2014, doi: 10.5056/jnm.2014.20.1.31.
- [77] S. Maccaferri *et al.*, „IBS-associated phylogenetic unbalances of the intestinal microbiota are not reverted by probiotic supplementation“ (eng), *Gut microbes*, Jg. 3, Nr. 5, S. 406–413, 2012, doi: 10.4161/gmic.21009.
- [78] A. P. M. Kerckhoffs *et al.*, „Molecular analysis of faecal and duodenal samples reveals significantly higher prevalence and numbers of *Pseudomonas aeruginosa* in irritable bowel syndrome“ (eng), *Journal of medical microbiology*, Jg. 60, Pt 2, S. 236–245, 2011, doi: 10.1099/jmm.0.022848-0.
- [79] R. Pittayanon *et al.*, „Gut Microbiota in Patients With Irritable Bowel Syndrome-A Systematic Review“ (eng), *Gastroenterology*, Jg. 157, Nr. 1, S. 97–108, 2019, doi: 10.1053/j.gastro.2019.03.049.
- [80] M. Dior *et al.*, „Interplay between bile acid metabolism and microbiota in irritable bowel syndrome“ (eng), *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, Jg. 28, Nr. 9, S. 1330–1340, 2016, doi: 10.1111/nmo.12829.
- [81] H. Duboc *et al.*, „Increase in fecal primary bile acids and dysbiosis in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome“ (eng), *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, Jg. 24, Nr. 6, 513-20, e246-7, 2012, doi: 10.1111/j.1365-2982.2012.01893.x.
- [82] J. Sundin *et al.*, „Altered faecal and mucosal microbial composition in post-infectious irritable bowel syndrome patients correlates with mucosal lymphocyte phenotypes and psychological distress“ (eng), *Alimentary pharmacology & therapeutics*, Jg. 41, Nr. 4, S. 342–351, 2015, doi: 10.1111/apt.13055.
- [83] J. Jalanka-Tuovinen *et al.*, „Faecal microbiota composition and host-microbe cross-talk following gastroenteritis and in postinfectious irritable bowel syndrome“ (eng), *Gut*, Jg. 63, Nr. 11, S. 1737–1745, 2014, doi: 10.1136/gutjnl-2013-305994.
- [84] I. M. Carroll, T. Ringel-Kulka, J. P. Siddle und Y. Ringel, „Alterations in composition and diversity of the intestinal microbiota in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome“ (eng), *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, Jg. 24, Nr. 6, 521-30, e248, 2012, doi: 10.1111/j.1365-2982.2012.01891.x.
- [85] C. Codling, L. O'Mahony, F. Shanahan, E. M. M. Quigley und J. R. Marchesi, „A molecular analysis of fecal and mucosal bacterial communities in irritable bowel

- syndrome“ (eng), *Digestive diseases and sciences*, Jg. 55, Nr. 2, S. 392–397, 2010, doi: 10.1007/s10620-009-0934-x.
- [86] I. M. Carroll *et al.*, „Molecular analysis of the luminal- and mucosal-associated intestinal microbiota in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome“ (eng), *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, Jg. 301, Nr. 5, G799-807, 2011, doi: 10.1152/ajpgi.00154.2011.
- [87] A. Durbán *et al.*, „Structural alterations of faecal and mucosa-associated bacterial communities in irritable bowel syndrome“ (eng), *Environmental microbiology reports*, Jg. 4, Nr. 2, S. 242–247, 2012, doi: 10.1111/j.1758-2229.2012.00327.x.
- [88] J. Tap *et al.*, „Identification of an Intestinal Microbiota Signature Associated With Severity of Irritable Bowel Syndrome“ (eng), *Gastroenterology*, Jg. 152, Nr. 1, 111-123.e8, 2017, doi: 10.1053/j.gastro.2016.09.049.
- [89] I. Rangel, J. Sundin, S. Fuentes, D. Repsilber, W. M. de Vos und R. J. Brummer, „The relationship between faecal-associated and mucosal-associated microbiota in irritable bowel syndrome patients and healthy subjects“ (eng), *Alimentary pharmacology & therapeutics*, Jg. 42, Nr. 10, S. 1211–1221, 2015, doi: 10.1111/apt.13399.
- [90] A. Swidsinski, J. Weber, V. Loening-Baucke, L. P. Hale und H. Lochs, „Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease“ (eng), *Journal of clinical microbiology*, Jg. 43, Nr. 7, S. 3380–3389, 2005, doi: 10.1128/JCM.43.7.3380-3389.2005.
- [91] U. C. Ghoshal, R. Shukla und U. Ghoshal, „Small Intestinal Bacterial Overgrowth and Irritable Bowel Syndrome: A Bridge between Functional Organic Dichotomy“ (eng), *Gut and liver*, Jg. 11, Nr. 2, S. 196–208, 2017, doi: 10.5009/gnl16126.
- [92] R. S. Choung *et al.*, „Clinical predictors of small intestinal bacterial overgrowth by duodenal aspirate culture“ (eng), *Alimentary pharmacology & therapeutics*, Jg. 33, Nr. 9, S. 1059–1067, 2011, doi: 10.1111/j.1365-2036.2011.04625.x.
- [93] H. Nakae, A. Tsuda, T. Matsuoka, T. Mine und Y. Koga, „Gastric microbiota in the functional dyspepsia patients treated with probiotic yogurt“ (eng), *BMJ open gastroenterology*, Jg. 3, Nr. 1, e000109, 2016, doi: 10.1136/bmjgast-2016-000109.
- [94] M. Igarashi *et al.*, „Alteration in the gastric microbiota and its restoration by probiotics in patients with functional dyspepsia“ (eng), *BMJ open gastroenterology*, Jg. 4, Nr. 1, e000144, 2017, doi: 10.1136/bmjgast-2017-000144.
- [95] L. Zhong *et al.*, „Dyspepsia and the microbiome: time to focus on the small intestine“ (eng), *Gut*, Jg. 66, Nr. 6, S. 1168–1169, 2017, doi: 10.1136/gutjnl-2016-312574.

- [96] N. E. Walsham und R. A. Sherwood, „Fecal calprotectin in inflammatory bowel disease“ (eng), *Clinical and experimental gastroenterology*, Jg. 9, S. 21–29, 2016, doi: 10.2147/CEG.S51902.
- [97] U. von Arnim, T. Wex, C. Ganzert, C. Schulz und P. Malfertheiner, „Fecal calprotectin: A marker for clinical differentiation of microscopic colitis and irritable bowel syndrome“ (eng), *Clinical and experimental gastroenterology*, Jg. 9, S. 97–103, 2016, doi: 10.2147/CEG.S97701.
- [98] H. Sztajer *et al.*, „Autoinducer-2-regulated genes in *Streptococcus mutans* UA159 and global metabolic effect of the luxS mutation“ (eng), *Journal of bacteriology*, Jg. 190, Nr. 1, S. 401–415, 2008, doi: 10.1128/JB.01086-07.
- [99] D. Chaves-Moreno *et al.*, „The microbial community structure of the cotton rat nose“ (eng), *Environmental microbiology reports*, Jg. 7, Nr. 6, S. 929–935, 2015, doi: 10.1111/1758-2229.12334.
- [100] Q. Wu *et al.*, „Revealing Potential Biomarkers of Functional Dyspepsia by Combining ¹H NMR Metabonomics Techniques and an Integrative Multi-objective Optimization Method“ (eng), *Scientific reports*, Jg. 6, S. 18852, 2016, doi: 10.1038/srep18852.
- [101] I. Ahmed, R. Greenwood, B. d. L. Costello, N. M. Ratcliffe und C. S. Probert, „An investigation of fecal volatile organic metabolites in irritable bowel syndrome“ (eng), *PloS one*, Jg. 8, Nr. 3, e58204, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0058204.
- [102] P. G. Farup, K. Rudi und K. Hestad, „Faecal short-chain fatty acids - a diagnostic biomarker for irritable bowel syndrome?“ (eng), *BMC gastroenterology*, Jg. 16, Nr. 1, S. 51, 2016, doi: 10.1186/s12876-016-0446-z.
- [103] F. Tanaka *et al.*, „Exosomal hsa-miR-933 in Gastric Juice as a Potential Biomarker for Functional Dyspepsia“ (eng), *Digestive diseases and sciences*, 2020, doi: 10.1007/s10620-020-06096-7.
- [104] C. Casén *et al.*, „Deviations in human gut microbiota: a novel diagnostic test for determining dysbiosis in patients with IBS or IBD“, *Aliment Pharmacol Ther*, Jg. 42, Nr. 1, S. 71–83, 2015, doi: 10.1111/apt.13236.
- [105] M. Pimentel *et al.*, „Development and validation of a biomarker for diarrhea-predominant irritable bowel syndrome in human subjects“ (eng), *PloS one*, Jg. 10, Nr. 5, e0126438, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0126438.
- [106] F. Mearin *et al.*, „Dyspepsia and Irritable Bowel Syndrome After a Salmonella Gastroenteritis Outbreak: One-Year Follow-up Cohort Study“, *Gastroenterology*, Jg. 129, Nr. 1, S. 98–104, 2005, doi: 10.1053/j.gastro.2005.04.012.
- [107] P. C. Okhuysen, Z. D. Jiang, L. Carlin, C. Forbes und H. L. DuPont, „Post-diarrhea chronic intestinal symptoms and irritable bowel syndrome in North

- American travelers to Mexico“ (eng), *The American journal of gastroenterology*, Jg. 99, Nr. 9, S. 1774–1778, 2004, doi: 10.1111/j.1572-0241.2004.30435.x.
- [108]S. Ji, H. Park, D. Lee, Y. K. Song, J. P. Choi und S.-I. Lee, „Post-infectious irritable bowel syndrome in patients with Shigella infection“ (eng), *Journal of gastroenterology and hepatology*, Jg. 20, Nr. 3, S. 381–386, 2005, doi: 10.1111/j.1440-1746.2005.03574.x.
- [109]C. Elwell, K. Chao, K. Patel und L. Dreyfus, „Escherichia coli CdtB mediates cytolethal distending toxin cell cycle arrest“ (eng), *Infection and immunity*, Jg. 69, Nr. 5, S. 3418–3422, 2001, doi: 10.1128/IAI.69.5.3418-3422.2001.
- [110]X. Peng, L. E. Cuff, C. D. Lawton und K. A. DeMali, „Vinculin regulates cell-surface E-cadherin expression by binding to beta-catenin“ (eng), *Journal of cell science*, Jg. 123, Pt 4, S. 567–577, 2010, doi: 10.1242/jcs.056432.
- [111]S.-R. Jee, „ICC density predicts bacterial overgrowth in a rat model of post-infectious IBS“, *WJG*, Jg. 16, Nr. 29, S. 3680, 2010, doi: 10.3748/wjg.v16.i29.3680.
- [112]J. H. Kim *et al.*, „Association between interstitial cells of Cajal and anti-vinculin antibody in human stomach“ (eng), *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, Jg. 24, Nr. 2, S. 185–191, 2020, doi: 10.4196/kjpp.2020.24.2.185.
- [113]M. Schmulson, R. Balbuena und C. Corona de Law, „Clinical experience with the use of anti-CdtB and anti-vinculin antibodies in patients with diarrhea in Mexico“, *Revista de Gastroenterología de México (English Edition)*, Jg. 81, Nr. 4, S. 236–239, 2016, doi: 10.1016/j.rgm xen.2016.07.002.
- [114]A. Rezaie *et al.*, „Assessment of Anti-vinculin and Anti-cytolethal Distending Toxin B Antibodies in Subtypes of Irritable Bowel Syndrome“ (eng), *Digestive diseases and sciences*, Jg. 62, Nr. 6, S. 1480–1485, 2017, doi: 10.1007/s10620-017-4585-z.
- [115]N. J. Talley *et al.*, „Circulating Anti-cytolethal Distending Toxin B and Anti-vinculin Antibodies as Biomarkers in Community and Healthcare Populations With Functional Dyspepsia and Irritable Bowel Syndrome“ (eng), *Clinical and translational gastroenterology*, Jg. 10, Nr. 7, e00064, 2019, doi: 10.14309/ctg.0000000000000064.
- [116]H. C. Vebø *et al.*, „Temporal development of the infant gut microbiota in immunoglobulin E-sensitized and nonsensitized children determined by the GA-map infant array“ (eng), *Clinical and vaccine immunology : CVI*, Jg. 18, Nr. 8, S. 1326–1335, 2011, doi: 10.1128/CVI.00062-11.

- [117]M. Vital, A. Karch und D. H. Pieper, „Colonic Butyrate-Producing Communities in Humans: an Overview Using Omics Data“ (eng), *mSystems*, Jg. 2, Nr. 6, 2017, doi: 10.1128/mSystems.00130-17.
- [118]S. Miquel *et al.*, „Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health“ (eng), *Current opinion in microbiology*, Jg. 16, Nr. 3, S. 255–261, 2013, doi: 10.1016/j.mib.2013.06.003.
- [119]R. Duan, S. Zhu, B. Wang und L. Duan, „Alterations of Gut Microbiota in Patients With Irritable Bowel Syndrome Based on 16S rRNA-Targeted Sequencing: A Systematic Review“ (eng), *Clinical and translational gastroenterology*, Jg. 10, Nr. 2, e00012, 2019, doi: 10.14309/ctg.0000000000000012.
- [120]A. P. Gobert *et al.*, „The human intestinal microbiota of constipated-predominant irritable bowel syndrome patients exhibits anti-inflammatory properties“ (eng), *Scientific reports*, Jg. 6, S. 39399, 2016, doi: 10.1038/srep39399.
- [121]C.-S. Chung *et al.*, „Differences of microbiota in small bowel and faeces between irritable bowel syndrome patients and healthy subjects“ (eng), *Scandinavian journal of gastroenterology*, Jg. 51, Nr. 4, S. 410–419, 2016, doi: 10.3109/00365521.2015.1116107.
- [122]R. Vasapolli *et al.*, „Analysis of Transcriptionally Active Bacteria Throughout the Gastrointestinal Tract of Healthy Individuals“ (eng), *Gastroenterology*, Jg. 157, Nr. 4, 1081-1092.e3, 2019, doi: 10.1053/j.gastro.2019.05.068.
- [123]N. Zeber-Lubecka *et al.*, „Limited prolonged effects of rifaximin treatment on irritable bowel syndrome-related differences in the fecal microbiome and metabolome“ (eng), *Gut microbes*, Jg. 7, Nr. 5, S. 397–413, 2016, doi: 10.1080/19490976.2016.1215805.
- [124]W. E. Roediger, „Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man“ (eng), *Gut*, Jg. 21, Nr. 9, S. 793–798, 1980, doi: 10.1136/gut.21.9.793.
- [125]A. Andoh, T. Bamba und M. Sasaki, „Physiological and anti-inflammatory roles of dietary fiber and butyrate in intestinal functions“ (eng), *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition*, Jg. 23, 5 Suppl, S70-3, 1999, doi: 10.1177/014860719902300518.
- [126]M. Lopez-Siles, S. H. Duncan, L. J. Garcia-Gil und M. Martinez-Medina, „Faecalibacterium prausnitzii: from microbiology to diagnostics and prognostics“ (eng), *The ISME journal*, Jg. 11, Nr. 4, S. 841–852, 2017, doi: 10.1038/ismej.2016.176.
- [127]H. Sokol *et al.*, „Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients“ (eng),

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 105, Nr. 43, S. 16731–16736, 2008, doi: 10.1073/pnas.0804812105.
- [128] T. Banasiewicz *et al.*, „Microencapsulated sodium butyrate reduces the frequency of abdominal pain in patients with irritable bowel syndrome“ (eng), *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*, Jg. 15, Nr. 2, S. 204–209, 2013, doi: 10.1111/j.1463-1318.2012.03152.x.
- [129] A. Załęski, A. Banaszekiewicz und J. Walkowiak, „Butyric acid in irritable bowel syndrome“ (eng), *Przegląd gastroenterologiczny*, Jg. 8, Nr. 6, S. 350–353, 2013, doi: 10.5114/pg.2013.39917.
- [130] C. Chassard *et al.*, „Functional dysbiosis within the gut microbiota of patients with constipated-irritable bowel syndrome“ (eng), *Aliment Pharmacol Ther*, Jg. 35, Nr. 7, S. 828–838, 2012, doi: 10.1111/j.1365-2036.2012.05007.x.
- [131] H.-N. Liu, H. Wu, Y.-Z. Chen, Y.-J. Chen, X.-Z. Shen und T.-T. Liu, „Altered molecular signature of intestinal microbiota in irritable bowel syndrome patients compared with healthy controls: A systematic review and meta-analysis“ (eng), *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, Jg. 49, Nr. 4, S. 331–337, 2017, doi: 10.1016/j.dld.2017.01.142.
- [132] C. Tana, Y. Umesaki, A. Imaoka, T. Handa, M. Kanazawa und S. Fukudo, „Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome“ (eng), *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, Jg. 22, Nr. 5, 512-9, e114-5, 2010, doi: 10.1111/j.1365-2982.2009.01427.x.
- [133] A. Lo Presti *et al.*, „Fecal and Mucosal Microbiota Profiling in Irritable Bowel Syndrome and Inflammatory Bowel Disease“ (eng), *Frontiers in microbiology*, Jg. 10, S. 1655, 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.01655.
- [134] L. A. David *et al.*, „Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome“ (eng), *Nature*, Jg. 505, Nr. 7484, S. 559–563, 2014, doi: 10.1038/nature12820.
- [135] G. D. Wu *et al.*, „Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes“ (eng), *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 334, Nr. 6052, S. 105–108, 2011, doi: 10.1126/science.1208344.
- [136] B. D. Muegge *et al.*, „Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans“ (eng), *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 332, Nr. 6032, S. 970–974, 2011, doi: 10.1126/science.1198719.
- [137] A. W. Walker *et al.*, „Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota“ (eng), *The ISME journal*, Jg. 5, Nr. 2, S. 220–230, 2011, doi: 10.1038/ismej.2010.118.

- [138]Suliman YA, Kafaja S, Alemam M, Valera I, Morales W, Pimentel M., „Anti-Vinculin Antibodies: A Novel Biomarker in Systemic Sclerosis, and Its Association with Vascular Involvement [abstract]. *Arthritis Rheumatol.* 2016; 68 (suppl 10)“.
- [139]I. Aziz, H. Törnblom, O. S. Palsson, W. E. Whitehead und M. Simrén, „How the Change in IBS Criteria From Rome III to Rome IV Impacts on Clinical Characteristics and Key Pathophysiological Factors“ (eng), *The American journal of gastroenterology*, Jg. 113, Nr. 7, S. 1017–1025, 2018, doi: 10.1038/s41395-018-0074-z.
- [140]A. W. Walker, J. C. Martin, P. Scott, J. Parkhill, H. J. Flint und K. P. Scott, „16S rRNA gene-based profiling of the human infant gut microbiota is strongly influenced by sample processing and PCR primer choice“ (eng), *Microbiome*, Jg. 3, S. 26, 2015, doi: 10.1186/s40168-015-0087-4.

6 ANHANG

6.1 Sonstiges

A *Tabelle 1: Originaldaten der mittels ELISA gemessenen Anti-CdtB-/Anti-Vinculin Antikörpertiter (Commonwealth Diagnostics International in Salem, Massachusetts)*

ID	Group	Anti-CdtB OD Result	Anti-Vinculin OD Result	Overall Result (Supported/Not Supported)
E-LA-004	Constipation	1,35	1,80	Supported
E-EA-009	Constipation	3,17	0,50	Supported
E-EE-042	Constipation	3,32	1,20	Supported
E-PD-064	Constipation	3,37	0,24	Supported
E-MA-081	Constipation	3,48	1,12	Supported
E-HH-085	Constipation	3,07	0,48	Supported
E-NA-079	Constipation	2,65	1,18	Not Supported
E-SI-103	Constipation	3,41	0,70	Supported
E-PD-120	Constipation	2,09	1,00	Not Supported
E-AA-127	Constipation	2,04	2,41	Supported
E-KD-141	Constipation	2,99	2,36	Supported
E-UG-147	Constipation	2,69	1,65	Not Supported
E-SA-195	Constipation	1,69	1,76	Supported
E-RN-010	Diarrhea	0,40	0,13	Not Supported
E-RA-024	Diarrhea	2,36	0,80	Not Supported
E-EN-027	Diarrhea	2,00	0,18	Not Supported
E-ZA-034	Diarrhea	3,08	2,22	Supported
E-TR-036	Diarrhea	3,19	0,67	Supported
E-RN-070	Diarrhea	3,29	0,29	Supported
E-KE-071	Diarrhea	1,01	0,64	Not Supported
E-TT-089	Diarrhea	2,60	1,12	Not Supported
E-NK-113	Diarrhea	2,86	0,58	Supported
E-RE-115	Diarrhea	2,18	0,28	Not Supported
E-RL-132	Diarrhea	2,65	1,24	Not Supported
E-EN-142	Diarrhea	2,62	0,44	Not Supported
E-ZR-149	Diarrhea	3,07	0,50	Supported
E-GE-159	Diarrhea	1,87	3,26	Supported
E-SL-163	Diarrhea	2,05	0,50	Not Supported
E-HA-025	Dyspepsia	2,56	2,47	Supported
E-RK-029	Dyspepsia	2,99	0,63	Supported
E-RN-041	Dyspepsia	3,54	0,19	Supported
E-RR-061	Dyspepsia	0,81	2,70	Supported
E-IZ-072	Dyspepsia	2,73	0,76	Not Supported

E-RA-069	Dyspepsia	2,29	1,41	Not Supported
E-RA-078	Dyspepsia	2,53	2,25	Supported
E-RY-084	Dyspepsia	2,44	0,91	Not Supported
E-ZA-100	Dyspepsia	3,46	1,73	Supported
E-BA-101	Dyspepsia	3,21	2,36	Supported
E-AA-108	Dyspepsia	2,84	0,66	Supported
E-ER-114	Dyspepsia	2,22	0,27	Not Supported
E-HF-107	Dyspepsia	3,01	1,67	Supported
E-NO-130	Dyspepsia	2,53	0,87	Not Supported
E-EE-160	Dyspepsia	2,07	0,63	Not Supported
E-RA-053	Healthy	1,91	2,86	Supported
E-RE-116	Healthy	3,52	1,08	Supported
E-RS-135	Healthy	3,16	2,70	Supported
E-TO-093	Healthy	2,79	0,26	Not Supported
E-NA-051	Healthy	3,04	0,69	Supported
E-FN-102	Healthy	1,64	2,14	Supported
E-ED-073	Healthy	2,14	3,06	Supported
E-TA-124	Healthy	2,32	1,32	Not Supported
E-TE-104	Healthy	2,96	0,44	Supported
E-RY-076	Healthy	3,38	2,11	Supported
E-EX-105	Healthy	2,80	1,68	Supported
E-EO-057	Healthy	0,90	3,18	Supported
E-IN-056	Healthy	2,81	0,89	Supported
E-RN-075	Healthy	2,50	0,38	Not Supported
E-KN-092	Healthy	2,14	3,21	Supported
E-AS-112	Healthy	1,07	0,41	Not Supported
E-SD-139	Healthy	2,57	0,70	Not Supported
E-RE-043	Healthy	2,96	1,65	Supported
E-TR-090	Healthy	1,63	1,16	Not Supported
E-NK-128	Healthy	3,27	0,93	Supported
E-NA-117	Healthy	3,40	2,94	Supported
E-EE-059	Healthy	2,74	1,46	Not Supported

B : Ethikvotum der EMGASTA-Studie

UNIVERSITÄTSKLINIKUM
MAGDEBURG A.Ö.R.



OTTO VON GUERICKE
UNIVERSITÄT
MAGDEBURG



MEDIZINISCHE
FAKULTÄT

Ethik-Kommission, Medizinische Fakultät / Universitätsklinikum, Leipziger Str. 44 Haus 28, 39120 Magdeburg

Frau OÄ Dr. med. K. Schütte
Universitätsklinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
Universitätsklinikum Magdeburg A.ö.R.
Leipziger Str. 44
39120 Magdeburg

Ethik-Kommission der
Otto-von-Guericke-
Universität an der
Medizinischen Fakultät und
am Universitätsklinikum
Magdeburg A.ö.R.

Univ.-Prof. Dr. med. Christof Huth
Vorsitzender

Dr. med. Norbert Beck
Geschäftsführer

Telefon: +49 391 67-14314
Telefax: +49 391 67-14354
elektr. Fax: +49 391 67-290185
eMail: ethikkommission@ovgu.de

Datum
13.04.2015

Unser Zeichen: 47/15

Bedeutung der Ernährung, des gastrointestinalen Mikrobioms und eines gesunden Gastrointestinaltraktes für die Autonomie des alternden Menschen

Sehr geehrte Frau OÄ Schütte,
sehr geehrte Kolleginnen und Kollegen,

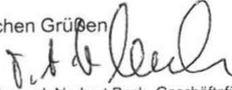
die Ethik-Kommission der Otto-von-Guericke-Universität an der Medizinischen Fakultät und am Universitätsklinikum Magdeburg hat die übergebenen Unterlagen zur o. g. Studie überprüft, in der letzten Kommissionssitzung eingehend erörtert und ist zu der Auffassung gekommen, dass gegen die Durchführung keine ethischen Bedenken bestehen.
Diese **zustimmende Bewertung** ergeht unter dem Vorbehalt gleichbleibender Gegebenheiten.

Die Verantwortlichkeit des jeweiligen Prüfungswissenschaftlers / behandelnden Prüfartztes bleibt in vollem Umfang erhalten und wird durch diese Entscheidung nicht berührt. Alle zivil- oder haftungsrechtlichen Folgen, die sich ergeben könnten, verbleiben uneingeschränkt beim Projektleiter und seinen Mitarbeitern.

Beim Monitoring sind die Bestimmungen des Bundes- und Landesdatenschutzgesetzes sowie die sich aus der ärztlichen Schweigepflicht ergebenden Einschränkungen zu beachten, was eine Aushändigung kompletter Patientenakten zum Monitoring ausschließt.
Ein Monitoring personen- und studienbezogener Daten wird dadurch nicht beeinträchtigt.

Um die Übersendung von studienbezogenen Jahresberichten / Abschlussberichten / Publikationen wird unter Nennung unserer Registraturnummer gebeten.

Mit freundlichen Grüßen


(i. A. Dr. med. Norbert Beck, Geschäftsführer)
Prof. Dr. med. C. Huth
Vorsitzender der Ethik-Kommission

Ethik-Kommission
der Otto-von-Guericke-Universität an der Medizinischen Fakultät
und am Universitätsklinikum Magdeburg A.ö.R.
Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. med. C. Huth

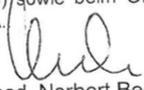
Anlage zum Votum der Studie 47/15 vom 13.04.2015

Zum Zeitpunkt der Bewertung der vorstehenden Studie waren folgende Damen und Herren Mitglied der Ethik-Kommission der Otto-von-Guericke-Universität an der Medizinischen Fakultät und am Universitätsklinikum Magdeburg:

Herr Prof. Dr. med. Norbert Bannert	Medizinische Fakultät / Universitätsklinikum, Pädiater
Frau Prof. Dr. phil. Eva Brinkschulte	Medizinische Fakultät / Universitätsklinikum, Bereich Geschichte, Ethik und Theorie der Medizin
Herr Prof. Dr.-Ing. Rolf Findeisen	Fakultät für Elektrotechnik und Informations- technik, Institut für Automatisierungstechnik
Herr Prof. Dr. med. Christof Huth	Medizinische Fakultät / Universitätsklinikum, Universitätsklinik für Herz- und Thoraxchirurgie
Frau Assessorin Ute Klanten	Medizinische Fakultät / Universitätsklinikum, Stabsstelle Recht
Herr OA Dr. med. Werner Kuchheuser	Medizinische Fakultät / Universitätsklinikum, Institut für Rechtsmedizin
Herr Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Läuter	Medizinische Fakultät / Universitätsklinikum, Mathematiker, Biometriker
Herr Prof. Dr. med. Frank Peter Meyer	Medizinische Fakultät / Universitätsklinikum, Klinischer Pharmakologe
Herr Prof. Dr. med. Jens Schreiber	Medizinische Fakultät / Universitätsklinikum, Universitätsklinik für Kardiologie, Angiologie und Pneumologie, Fachbereich Pneumologie
Herr Prof. Dr.-Ing. Klaus Tönnies	Fakultät für Informatik, Institut für Simulation und Graphik, AG Bildverarbeitung/Bildverstehen

Mitglieder der Ethik-Kommission, die in eine Studie eingebunden sind, haben für die Votierung der betreffenden Studie kein Stimmrecht.

Die Ethik-Kommission der Otto-von-Guericke-Universität an der Medizinischen Fakultät und am Universitätsklinikum Magdeburg ist unter Beachtung entsprechender internationaler Richtlinien (ICH, GCP) und nationaler Richtlinien (AMG, GCP-V, MPG, MPKPV) tätig, nach Landesrecht (Hochschulmedizingesetz des Landes Sachsen-Anhalt § 1 Abs. 4, Verordnung über Ethik-Kommissionen zur Bewertung klinischer Prüfungen von Arzneimitteln - Ethik-Kom-VO LSA - i. d. akt. Fassung) legitimiert. Weiterhin besteht eine Registrierung der Ethik-Kommission beim Bundesamt für Strahlenschutz nach § 28g Röntgenverordnung (EK-043/R) und § 92 Strahlenschutzverordnung (EK-046/S) sowie beim Office for Human Research Protections, reg. no. IRB00006099, Rockville, MD, U.S.A.


Dr. med. Norbert Beck
Geschäftsführer der Ethik-Kommission

C Schriftliche Einwilligungserklärung der EMGASTA-Studie



**MEDIZINISCHE
FAKULTÄT**

Medizinische Fakultät, Leipziger Str. 44, 39120 Magdeburg

**Klinik für Gastroenterologie,
Hepatology und Infektiologie**
Prof. Dr. med. Peter Malferteiner
Direktor

Otto-von-Guericke-Universität
Medizinische Fakultät
Leipziger Str. 44
39120 Magdeburg

Telefon: +49 391 67-13100
Telefax: +49 391 67-13105

peter.malferteiner@med.ovgu.de
www.med.uni-magdeburg.de

Einwilligungserklärung

Ihre Zeichen, Ihre Nachricht vom:

Unsere Zeichen:
prof mal-

Durchwahl:
13144

Datum:
30.03.2015

Bedeutung der Ernährung, des gastrointestinalen Mikrobioms und eines gesunden Gastrointestinaltraktes für die Autonomie des alternden Menschen

Patient (Etikett)

Name, Vorname _____

Geburtsdatum _____

Adresse _____

Ich erkläre mich mit der Durchführung zusätzlicher Untersuchungen (Fragebögen, Bestimmung des Ernährungszustandes, Untersuchung einer Stuhlprobe, Blutentnahme, Darmspiegelung, Magenspiegelung) einverstanden und bin mir darüber im Klaren, dass dieses Material nicht nur der klinischen Routinediagnostik, sondern auch wissenschaftlichen Zwecken dient (zum Beispiel Erbmaterialanalyse). Ich wurde in einem ausführlichen Gespräch über Wesen, Bedeutung und Tragweite der klinischen Studie, an der ich teilnehmen möchte, unterrichtet und mir wurde die Gelegenheit gegeben, meine Entscheidung zu überdenken. Meine Fragen zu diesen Untersuchungen wurden umfassend beantwortet und ich fühle mich ausreichend informiert.

Ich verzichte darauf, dass mir die im Rahmen der wissenschaftlichen Untersuchung möglicherweise an meiner DNA-Probe identifizierten, genetischen Risikofaktoren (dem Wissensstand zum Untersuchungszeitpunkt entsprechend) mitgeteilt werden. Dies betrifft genetische Risikofaktoren für das Magenkarzinom als auch andere genetische Risikofaktoren, die ursächlich für andere Erkrankungen sind und als Zufallsbefund bei den geplanten Analysen identifiziert werden könnten.

Ort, Datum

Unterschrift/Stempel des aufklärenden Arztes

Unterschrift des Patienten

Name des aufklärenden Prüfarztes (in Druckbuchstaben)

D Tabelle 2: Übersicht der bis 2020 vorhandenen Studien zu Anti-CdtB- und Anti Vinculin-AK
 *Overlap mit Colitis Ulcerosa:1, Zöliakie:1, Mikroskopische Colitis:1, *UFBD: unspezifische funktionelle Darmstörung

Studie	Patientenanzahl	Diagnostische Kriterien	Ergebnisse
Pimentel et. al [105] (2015)	IBS-D: 2375 Morbus Chron: 73 Colitis Ulcerosa: 69 Zöliakie: 121 Gesunde: 43	Fragebogen zu Darm-symptomen: Gesunde Rom- III: IBS-D Histologische Biopsie: IBD/Zöliakie(zusätzlich tTG AK↑)	Anti CdtB-AK und Anti-Vinculin AK ↑↑ bei IBS-D vs. Alle Vergleichsgruppen
Schmulson et.al [113] (2016)	IBS-D: 14 IBS-D Overlap *: 3 IBS-M: 3 Funkt. Diarrhö: 5 UFBD*: 2 Mikrosk. Kolitis: 1 „Nicht funktionelle“ chronische Diarrhö: 2	Rom- III: IBS-D, IBS-M, PI- IBS, funktionelle Diarrhö, UFBD Organische Erkrankungen: Diagnostik entsprechen der Diagnose	Positiver AK Nachweis: 47,1% IBS-D, 100% IBS- D Überlappung, 33,3% IBS-M
Ali Rezaie et. al [114] (2017)	IBS-D: 2375 IBS-M: 25 IBS-C: 30 Gesunde:43	Fragebogen zu Darm-symptomen: Gesunde Rom- III: IBS Subtypen	Anti CdtB-AK: IBS-D>IBS- M>IBS-C>Gesunde Positiver AK Nachweis: 43,3% IBS-D, 20% IBS-M, 13,3 IBS-C,9,3% Gesunde Anti-Vinculin AK: IBS- M≈IBS-D>IBS- C≈Gesunde Positiver AK Nachweis: 36% IBS-M, 32,4% IBS-D, 16,7% IBS-C, 6,9% Gesunde Positivraten für mind. einen AK: IBS-D: 58,1%, IBS-M 44%, IBS-C 26,7%,16,3% Gesunde

<p>Talley et.al [115] (2017)</p>	<p>1.Studie (Population based arm):</p> <p>IBS: 63 FD: 61 Gesunde: 246</p> <p>2.Studie (clinic based arm):</p> <p>IBS: 223 FD: 22 IBS/FD Overlap: 33 Gesunde: 182</p>	<p>Fragebogen zu Darm- symptomen: Gesunde</p> <p>Rom- III: IBS Subtypen</p>	<p>Erhöhte Anti-CdtB AK bei FD vs.Gesunde und IBS/FD Overlap vs. Gesunde</p>
---	---	---	--

6.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

- **Name:** Schweden
- **Vorname:** Melanie
- **Geburtsdatum:** 09.11.1992
- **Geburtsort:** Neustadt an der Weinstraße
- **Nationalität:** deutsch
- **Familienstand:** ledig

Ausbildung

- | | |
|-------------------|--|
| Seit 02/2021 | Assistenzärztin Urologie Klinikum Aschaffenburg-Alzenau |
| 06/2020 | Approbation als Ärztin |
| 10/2013-05/2020 | Studium der Humanmedizin
Otto-von-Guericke Universität Magdeburg |
| 10/2012 – 09/2013 | Bachelorstudium Biologie
Universität Ulm |
| 08/2003 – 04/2012 | Abitur
Leibniz-Gymnasium, Neustadt an der Weinstraße |
| 08/1999 – 06/2002 | Cary, North Carolina, USA
Grundschule |

Praktische Erfahrung

- | | |
|-------------------|---|
| 05/2019 - 04/2020 | Praktisches Jahr <ul style="list-style-type: none">• Klinikum Ludwigsburg, Klinik für Urologie• Klinikum der Stadt Ludwigshafen am Rhein gGmbH, Klinik für Allgemein, Viszeral-und Thoraxchirurgie• Klinikum der Stadt Ludwigshafen am Rhein gGmbH, Klinik für Innere Medizin, Hämato-Onkologie, Nephrologie, Infektiologie und Rheumatologie, Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie, Diabetologie und Gastrointestinale Onkologie |
| 08/2017 | Famulatur Chirurgie
Hetzelstift, Neustadt an der Weinstraße <ul style="list-style-type: none">• Klinik für Allgemein- und Visceralchirurgie, Proktologie |
| 03/2017 | Famulatur Zentrale Notaufnahme
Hetzelstift, Neustadt an der Weinstraße <ul style="list-style-type: none">• Interdisziplinäre zentrale Notaufnahme |

- 09/2016 **Famulatur Innere Medizin**
 Hetzelstift, Neustadt an der Weinstraße
 - Klinik für Innere Medizin I, Schwerpunkt für Kardiologie, Schlaganfallereinheit
- 08/2016 - 09/2016 **Famulatur Radiologie**
 Hetzelstift, Neustadt an der Weinstraße
 - Klinik für diagnostische und interkonventionelle Radiologie
- 08/2016 **Famulatur Anästhesie**
 Hetzelstift, Neustadt an der Weinstraße
 - Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie, Palliativmedizin
- 03/2016 - 04/2016 **Famulatur Hausarzt**
 Internistische Hausarztpraxis Dr. Messemer, Neustadt an der Weinstraße
- 06/2012 - 09/2012 **Pflegepraktikum**
 St. Vincentius Krankenhaus, Speyer

Fortbildungen

- 07/2019 Laparoskopie Basiskurs
- 09/2018 Kongress für Kinder- und Jugendmedizin
- 01/2018 Kongress „Das internistische Jahr 2017“
- 10/2017-04/2018 DEGUM-strukturierter Ultraschallkurs
- 04/2017 EKG Grund- und Aufbaukurs
- 01/2017 Kongress „Das internistische Jahr 2016“
- 10/2016 Famulanten und PJ'ler Camp (Notfallmedizin)

Veröffentlichungen

- 08/2021 Gut microbiota profiles and the role of anti-CdtB and antivinculin antibodies in patients with functional gastrointestinal disorders (FGID)

6.3 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Charakterisierung von Patienten mit funktionellen gastrointestinalen Erkrankungen anhand von serologischen Biomarkern und Analyse des Darmmikrobioms“

in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie des Uniklinikums Magdeburg

mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. med. habil Dr. h.c. Peter Malfertheiner sowie Dr. med. Riccardo Vasapolli

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- und ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Neustadt, den 19.09.2021



Melanie Schweden

6.4 Erklärung zur strafrechtlichen Verurteilung

Ich erkläre hiermit, nicht wegen einer Straftat verurteilt worden zu sein, die
Wissenschaftsbezug hat.

Neustadt, den 19.09.2021

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. Schweden', is centered on a light blue rectangular background.

Melanie Schweden

6.5 Danksagung

Ich möchte allen Menschen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, herzlich danken.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Peter Malfertheiner danke ich für die Bereitstellung des aktuellen interessanten Themas, seiner freundlichen Betreuung sowie der Begutachtung der vorliegenden Promotionsschrift.

Herrn Dr. Riccardo Vasapolli danke ich für die vertrauensvolle Zusammenarbeit und für die zielführenden Diskussionen.

Vielen Dank Frau Dr. Casén für die Sequenzierung der Proben, die bioinformatische Aufarbeitung der Sequenzierungsergebnisse sowie für die ausführlichen Erklärungen auf meine Fragen.

Frau Lux und Herrn Schomburg danke ich vielmals für die statistischen Analysen dieser Arbeit und der sehr netten und hilfreichen Diskussionen der Ergebnisse.

Frau Christine Cruz möchte ich für die Durchführung des ELISAs danken, sowie für die schnelle und freundliche Antwort bei Rückfragen.

Abschließend gilt mein besonderer Dank meiner Familie und meinem Freund für die uneingeschränkte Unterstützung, Ermutigung und Geduld in der gesamten Promotionszeit und darüber hinaus. Ohne den Rat und den Rückhalt meiner Eltern wäre weder mein Studium noch diese Arbeit möglich gewesen.