

**Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von  
Haunerschen Kinderspital der  
Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Direktor: Herr Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein**

**Aus der Abteilung für Asthma und Allergie des Dr. von Haunerschen  
Kinderspitals**

**Forschungszentrum Kubus des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der  
Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Thema der Dissertation:**

**Analyse der bakteriellen Mikrobiota von Schleimhaut- und  
Umweltproben mittels Next-Generation-Sequencing und Untersuchung  
ihrer Rolle bei kindlichem Asthma**

**Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der  
Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**vorgelegt von  
Lena Teresa Birzele**

**aus  
Eichstätt**

**Jahr  
2017**

# Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

---

**Berichterstatter:** Frau Prof. Dr. med. Dr. h.c. Erika von Mutius

**Mitberichterstatter:**

- Herr Prof. Johannes Wagener
- Frau Prof. Katja Radon
- Herr Prof. Peter Thomas

**Betreuerin:** Frau Dr. rer. nat. Antje Legatzki

**Dekan:** Herr Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

**Tag der mündlichen Prüfung:** 26.10.2017

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Asthma bronchiale im Kindesalter . . . . .	1
1.1.1 Epidemiologie . . . . .	1
1.1.2 Pathophysiologie . . . . .	1
1.1.3 Protektive und risikoerhöhende Einflussfaktoren . . . . .	2
1.1.4 Der <i>Bauernhof-Effekt</i> : von epidemiologischen Grundlagen bis heute . . . . .	4
1.2 Methoden zur Untersuchung der mikrobiellen Vielfalt . . . . .	7
1.2.1 Kulturabhängige und kulturunabhängige Methoden . . . . .	7
1.2.1.1 DNA-Fingerprint-Methoden . . . . .	8
1.2.1.2 Phylogenetische Microarrays . . . . .	8
1.2.1.3 Parallelsequenzierung . . . . .	8
1.2.2 Überblick über das Next-Generation-Sequencing und Einführung in die <i>454-Pyrosequenzierung</i> . . . . .	8
1.2.3 Die GABRIELA-Studie . . . . .	10
1.3 Zusammensetzung und Ziele der Studie . . . . .	12
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>13</b>
2.1 Untersuchungsmaterial . . . . .	13
2.1.1 Nasenabstriche . . . . .	14
2.1.1.1 Sammlung und Aufbewahrung . . . . .	14
2.1.2 Matratzenstaub . . . . .	14
2.1.2.1 Sammlung und Aufbewahrung . . . . .	14
2.1.2.2 Aliquotierung des Matratzenstaubes . . . . .	15
2.2 DNA-Extraktion . . . . .	15
2.2.1 Nasenabstrichproben . . . . .	15
2.2.2 Matratzenstaub . . . . .	17
2.2.2.1 DNA-Extraktion mit Powersoil Kit . . . . .	17
2.2.2.2 DNA-Extraktion mit Fast Spin Kit for Soil . . . . .	17
2.2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung mittels Picogreen . . . . .	17
2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur Amplifikation des bakterienspezifischen 16S rRNA-Gen-Fragments . . . . .	18
2.4 Gelelektrophorese zur Visualisierung der PCR-Produkte . . . . .	20
2.5 Aufreinigung der PCR-Produkte . . . . .	21
2.5.1 Agencourt AMPure XP beads . . . . .	21
2.5.2 QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen . . . . .	21

2.5.2.1	QIAquick PCR Purification Kit für die Aufreinigung von PCR Produkten . . . . .	21
2.5.2.2	Verwendung QIAquick Gel Extraction Kit für das Ausschneiden von PCR-Produkten aus einem Agarosegel . . . . .	22
2.6	Qualitätskontrolle der PCR Produkte mittels Agilent 2100 Bioanalyzer . . . . .	22
2.7	454-Pyrosequenzierung . . . . .	22
2.7.1	Herstellung der äquimolaren Pools . . . . .	23
2.7.2	<i>emulsion PCR (emPCR)</i> . . . . .	24
2.7.3	<i>Emulsion Breaking</i> . . . . .	25
2.7.4	Sequenzierlauf . . . . .	25
2.8	Datenverarbeitung und statistische Auswertung . . . . .	26
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>29</b>
3.1	Methodische Vorergebnisse: Optimierung der DNA-Bibliothek . . . . .	29
3.1.1	Auswahl des DNA-Extraktionskits für Matratzenstaub . . . . .	29
3.1.2	DNA-Konzentrationen der DNA-Extrakte . . . . .	31
3.1.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. polymerase chain reaction) (PCR)	31
3.1.3.1	Zusätze im Mastermix . . . . .	31
3.1.3.2	Einsatzhöhe des DNA-Extrakts und Wahl der Zyklenzahl . . . . .	32
3.1.4	Die Aufreinigung zur Entfernung von Primerdimeren . . . . .	34
3.1.5	Vergleich der PCR-Produkte . . . . .	35
3.2	Erste Sequenzierergebnisse anhand einer Testplatte . . . . .	36
3.3	Hauptergebnisse: Analyse der Mikrobiota in Nasenabstrichen und Matratzenstaub . . . . .	38
3.3.1	Charakteristika der Sequenzierung . . . . .	38
3.3.2	Taxonomische Zusammensetzung . . . . .	39
3.3.2.1	<i>Phyla</i> . . . . .	39
3.3.2.2	<i>Genera</i> . . . . .	40
3.3.2.3	Operational Taxonomic Units (OTUs) . . . . .	43
3.3.3	$\alpha$ -Diversität . . . . .	45
3.3.4	$\beta$ -Diversität . . . . .	46
3.3.5	Die Zusammensetzung der Mikrobiota von Bauernhofkindern und Kontrollen . . . . .	48
3.3.6	Die Zusammensetzung der bakteriellen Mikrobiota bei Asthmatikern und Kontrollen . . . . .	51
3.3.7	Auswirkung einer Infektion der oberen Atemwege auf die mikrobielle Zusammensetzung und Diversität . . . . .	56
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>57</b>
4.1	Stärken und Grenzen der eingesetzten Methoden . . . . .	57
4.2	Matratzenstaubproben haben eine höhere $\alpha$ -Diversität, Nasenabstrichproben dagegen eine höhere $\beta$ -Diversität . . . . .	59
4.3	Die bakterielle Zusammensetzung in Nasenabstrichen und Matratzenstaub . . . . .	62

---

4.4	Die Mikrobiota von Matratzenstaub wird durch die Umwelt und durch den Menschen beeinflusst . . . . .	62
4.5	Die Mikrobiota der Nase erscheint weniger durch die Umwelt beeinflusst zu sein als Matratzenstaub . . . . .	66
4.6	Die Mikrobiota im Matratzenstaub von Bauernhofkindern unterscheidet sich signifikant von den Referenzkindern . . . . .	69
4.7	In Asthmatikern ist sowohl die Mikrobiota der Nasenschleimhaut als auch von Matratzenstaub im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant verändert . .	70
<b>5</b>	<b>Schlussfolgerung und Ausblick</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>Ergebniszusammenfassung</b>	<b>77</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>79</b>
	<b>Anhang</b>	<b>96</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>109</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>111</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Asthma</b>	Asthma bronchiale . . . . .	1
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool	
<b>BMI</b>	Body Mass Index . . . . .	3
<b>bp</b>	Basenpaar (engl. base pair)	
<b>bzw.</b>	beziehungsweise	
<b>DGGE</b>	Denaturierungs-Gradienten-Gel-Elektrophorese (engl. denaturing gradient gel electrophoresis) . . . . .	8
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosid-Triphosphat (engl. deoxynucleotide triphosphate)	
<b>d. h.</b>	das heißt	
<b>emBreaking</b>	emulsion Breaking . . . . .	24
<b>emPCR</b>	emulsion PCR . . . . .	II
<b>GABRIELA</b>	weiterentwickelte multidisziplinäre Studie zur Identifikation der genetischen und umweltbeeinflussten Ursachen für Asthma in der Europäischen Gemeinschaft (engl. GABRIEL Advanced Studies)	
<b>h</b>	Stunde (lat. hora)	
<b>ISAAC</b>	International Study of Asthma and Allergies in Childhood . . . . .	1
<b>IgE</b>	Immunglobulin E . . . . .	1
<b>IL</b>	Interleukin	
<b>min</b>	Minute (engl. minute)	
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information	
<b>NGS</b>	Next-Generation Sequencing . . . . .	8
<b>NMDS</b>	Nonmetric Multidimensional Scaling . . . . .	47
<b>OTU</b>	Operational Taxonomic Unit . . . . .	10
<b>PCR</b>	Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. polymerase chain reaction) . . . . .	II
<b>PTP</b>	Picotiterplatte (engl. picotiter plate) . . . . .	9
<b>QIIME</b>	Quantitative Insights Into Microbial Ecology . . . . .	26
<b>RISA</b>	rRNA Intergenic Spacer Analysis . . . . .	8
<b>RSV</b>	Respiratory Syncytial Virus . . . . .	4
<b>SD</b>	Standardabweichung (engl. standard deviation) . . . . .	10
<b>sec</b>	Sekunden (engl. second)	
<b>SNPs</b>	Single Nucleotide Polymorphisms . . . . .	2
<b>SSCP</b>	Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus (engl. single strand conformation polymorphism) . . . . .	5

---

<b>16S rRNA</b>	16S ribosomale Ribonukleinsäure (engl. 16S ribosomal ribonucleic acid) . . . .	7
<b>TGGE</b>	Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese (engl. temperature gradient gel electrophoresis) . . . . .	8
<b>T-RFLP</b>	Terminaler Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus (engl. terminal restriction fragment length polymorphism) . . . . .	8
<b>u. a.</b>	unter anderem	
<b>V</b>	Volt	
<b>xg</b>	-fache Erdbeschleunigung	
<b>z. B.</b>	zum Beispiel	

## Abbildungsverzeichnis

1	Zusammenhang zwischen mikrobieller Exposition und Auftreten von Asthma bronchiale für A) Bakterien und B) Pilze . . . . .	6
2	Schematische Darstellung des 16S rRNA-Gens . . . . .	7
3	Die Abschnitte der <i>454-Pyrosequenzierung</i> . . . . .	9
4	Studienzentren der GABRIELA Studie . . . . .	11
5	Überblick über die Probenauswahl . . . . .	14
6	Darstellung der verwendeten Primer . . . . .	19
7	Beurteilung der <i>emPCR</i> . . . . .	25
8	Vereinfachtes Schema zum besseren Verständnis der Bedeutung der $\alpha$ -Diversität und $\beta$ -Diversität . . . . .	27
9	Häufigkeitsverteilung der Menge an Matratzenstaub aller abgewogenen Proben (n=119) . . . . .	29
10	Vergleich von <i>Power Soil DNA Isolation Kit (PS)</i> und <i>FastDNA SPIN Kit for Soil (FS)</i> bei unterschiedlichen Mengen an Matratzenstaub . . . . .	31
11	Gesamt-DNA-Konzentrationen von Matratzenstaub und Nasenabstrichproben mit Picogreen bestimmt . . . . .	32
12	Vergleich der PCR-Produkte bei Zugabe von BSA und Betain in den Mastermix . . . . .	32
13	Vergleich unterschiedlicher Mengen an DNA-Extrakt als Einsatz für die PCR und unterschiedlicher Zyklenzahl der PCR bei Nasenabstrichproben . . . . .	33
14	Amplifizierte 16S rRNA Genfragmente in A) vor der Aufreinigung und in B) nach zweimaliger Aufreinigung mit Agengourt AMPure XP Beads . . . . .	34
15	Analyse einer Nasenabstrichprobe mit dem Bioanalyzer . . . . .	35
16	Amplikon-Konzentrationen (Picogreen) von Matratzenstaub- (blau) und Nasenabstrichproben (lila) . . . . .	36
17	<i>Multiple Rarefaction</i> Kurven für die Proben der Testplatte . . . . .	37
18	<i>Multiple Rarefaction</i> Kurven für A) Nasenabstrichproben und B) Matratzenstaubproben . . . . .	38
19	Veranschaulichung der Streuung der Sequenzzahl pro Probe für Nasenabstriche und Matratzenstaub . . . . .	39
20	Relative Häufigkeitsverteilung der Phyla von Nasenabstrich- und Matratzenstaubproben . . . . .	41
21	Verteilung der Genera in Nasenabstrich- und Matratzenstaubproben . . . . .	42
22	Relative Häufigkeitsverteilung der häufigen OTUs für Nasenabstrich- und Matratzenstaubproben . . . . .	44
23	<i>Richness</i> von Nasenabstrich- und Matratzenstaubproben . . . . .	46
24	Darstellung von <i>Nonmetric Multidimensional Scaling (NMDS)</i> durch <i>ungewichtete UniFrac</i> Analyse . . . . .	47
25	Vergleich der häufigen OTUs von Bauernhof- und Referenzkindern in Matratzenstaub . . . . .	49
26	Auf 1254 Sequenzen rarefizierte <i>richness</i> und <i>Shannon-Index</i> als Maß für die $\alpha$ -Diversität in A) Nasenabstrichproben und B) Matratzenstaubproben getrennt für Bauernhof- und Referenzgruppe . . . . .	50

---

27	Vergleich der <i>richness</i> im Matratzenstaub für Bauernhof- und Referenzkinder bei einer Stichprobe von 5000 Sequenzen . . . . .	51
28	Analyse der <i>richness</i> und des <i>Shannon-Index</i> für A) Nasenabstrichproben und B) Matratzenstaubproben . . . . .	53
29	Vergleich der <i>richness</i> im Matratzenstaub für Asthmatiker und Kontrollen bei einer Stichprobe von 5000 Sequenzen . . . . .	54
30	<i>Richness</i> von Matratzenstaub bei Bauernhof- und Referenzkindern mit und ohne Erkrankung an Asthma . . . . .	54
31	<i>Richness</i> von Nasenabstrichproben bei Bauernhof- und Referenzkindern mit und ohne Erkrankung an Asthma . . . . .	55
32	Die Matratze wird stärker durch die Umwelt beeinflusst als die Nase, welche deutlich geprägt ist durch die Mikrobiota des Kindes. . . . .	75
E1	Sequenzzahl pro Probe und Pool . . . . .	108

## Tabellenverzeichnis

1	Übersicht über einige wichtige protektive Einflüsse und Risikofaktoren für Asthma bronchiale im Kindesalter . . . . .	3
2	Einstellungen zur Herstellung der DNA-Bibliothek . . . . .	20
3	Erstellung der Pools für Platte 1-5 . . . . .	23
4	Thermocycler-Einstellungen für die <i>emPCR</i> . . . . .	24
5	Anzahl der Studienkinder im Verlauf der Untersuchung . . . . .	26
6	Quantitativer Vergleich der DNA-Konzentrationen der DNA-Extraktionen mit unterschiedlichen Staubmengen und DNA-Extraktionskits . . . . .	30
7	Übersicht über die Sequenzverteilung der Testplatte . . . . .	37
8	Relative Häufigkeit der häufigen Phyla (> 1% repräsentiert) in Nasenabstrich- und Matratzenstaubproben (markante Unterschiede sind fett gedruckt hervorgehoben) . . . . .	40
9	Relative Häufigkeit der häufigen Genera (> 1% repräsentiert) in Nasenabstrich- und Matratzenstaubproben (markante Unterschiede sind fett gedruckt hervorgehoben) . . . . .	40
10	Relative Häufigkeit der häufigen OTUs (> 1% repräsentiert) in Nasenabstrich- und Matratzenstaubproben (markante Unterschiede sind fett gedruckt hervorgehoben) . . . . .	43
11	Die häufigsten in beiden Probenotypen eines Kindes vorhandenen OTUs . . . . .	45
12	Mittelwert (und Standardfehler) für verschiedene Maße der Diversität . . . . .	46
13	Auf Signifikanz beschränkte Unterschiede zwischen Bauernhofkindern und Referenzkindern . . . . .	48
14	Auf Signifikanz beschränkte Unterschiede zwischen Asthmatikern und Kontrollen . . . . .	52
E1	Allgemein verwendete Materialien . . . . .	96
E2	Verwendete Puffer und Materialien für die DNA-Isolation und die PCR . . . . .	97
E3	Materialien für die Aufreinigung und die Sequenzierung . . . . .	98
E4	Darstellung der Barcodes der verwendeten Primer BC0001-0058 . . . . .	99
E5	Darstellung der Barcodes der Reverse Primer BC0059-0116 . . . . .	100
E6	Unterschiede zwischen Bauernhof- und Referenzkindern bei den Nasenabstrichproben . . . . .	101
E7	Unterschiede zwischen Bauernhof- und Referenzkindern bei den Nasenabstrichproben (Fortsetzung) . . . . .	102
E8	Unterschiede zwischen Bauernhof- und Referenzkindern bei den Matratzenstaubproben . . . . .	103
E9	Unterschiede zwischen Bauernhof- und Referenzkindern bei den Matratzenstaubproben (Fortsetzung) . . . . .	104
E10	Unterschiede zwischen Asthmatikern und Kontrollen bei den Nasenabstrichproben . . . . .	105
E11	Unterschiede zwischen Asthmatikern und Kontrollen bei den Nasenabstrichproben (Fortsetzung) . . . . .	106

E12	Unterschiede zwischen Asthmatikern und Kontrollen bei den Matratzenstaubproben . . . . .	107
E13	Unterschiede zwischen Asthmatikern und Kontrollen bei den Matratzenstaubproben (Fortsetzung) . . . . .	108

# 1 Einleitung

## 1.1 Asthma bronchiale im Kindesalter

### 1.1.1 Epidemiologie

Asthma bronchiale (Asthma) ist eine Erkrankung, die in den westlichen Ländern eine stark steigende Prävalenz zeigt (Eder et al., 2006; von Mutius, 2014). Bei Kindern ist sie zur häufigsten chronischen Erkrankung geworden (WHO, 2014). Oft leiden in westlichen Ländern mehr als 10 % der Kinder an Asthma. In Deutschland lag die Prävalenz bei den sechs- bis siebenjährigen bei 7 % und bei Jugendlichen (13-14 Jahre) sogar bei 15 % (ISAAC, 2007).

Studien, die das Auftreten von kindlichem Asthma in West- und Ostdeutschland untersuchten (von Mutius et al., 1994), rückten Asthma im Kindesalter ins Interesse der epidemiologischen Forschung in Deutschland. Auf der Suche nach den Gründen für die stark steigende Prävalenz wurden seither zahlreiche groß angelegte Untersuchungen durchgeführt. Es wurden protektive Umweltfaktoren, wie z. B. das Aufwachsen in ländlichem Umfeld (von Ehrenstein et al., 2000) und eine erhöhte mikrobielle Exposition (Braun-Fahrlander et al., 2002; Ege et al., 2011; Riedler et al., 2001; von Mutius et al., 2000), aber auch bestimmte risikoerhöhende Genvarianten (Moffatt et al., 2007; Ober et al., 2006) identifiziert.

Die internationale Zusammenarbeit wurde durch die 1991 gegründete *International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)* vereinfacht, welche weltweit epidemiologische Forschungsgruppen mit Interesse an Asthma und Allergie vernetzt (ISAAC, 1991).

### 1.1.2 Pathophysiologie

Die Definition von Asthma lautet aktuell (2014) wie folgt:

„Asthma is a heterogeneous disease, usually characterized by chronic airway inflammation. It is defined by the history of respiratory symptoms such as wheeze, shortness of breath, chest tightness, and cough that vary over time and in intensity, together with variable expiratory airflow limitation (Global Initiative for Asthma (GINA), 2014: 16).“

Pathophysiologisch geläufig ist die Einteilung der Erkrankung in *atopisches* Asthma und *nicht atopisches* Asthma (Eder et al., 2006; Kurukulaaratchy et al., 2005). Beim atopischen Asthma führt ein erster Kontakt gegenüber *Allergenen* zur Sensibilisierung. Allergene können z. B. Hausstaubmilben, Tierhaare und Pollen sein, die beim Gesunden keine Immunantwort auslösen. Bei der Sensibilisierung kommt es TH2-Zell-vermittelt durch Plasmazellen (B-Zellen) zu einer Produktion von Immunglobulin E (IgE), das gegen das Allergen gerichtet ist. Die gebildeten IgEs docken an IgE-Rezeptoren von Mastzellen an. Zu Symptomen kommt es jedoch erst nach erneutem Kontakt gegenüber dem Allergen. Dabei werden je zwei IgEs über ein Allergen verbunden (*bridging*). Daraufhin kommt es zu einer Degranulation der Mastzellen. Die Granula enthalten u. a. Histamin und Leukotriene, die zu einer rasch einsetzenden Bronchokonstriktion mit daraus resultierender Atemnot, zu einer Vasodilatation und einer erhöhten Gefäßpermeabilität (Immunreaktion vom Soforttyp / Typ 1) führen (Koletzko, 2012). TH2-Zellen sezernieren IL-4 und IL-13, die eine erneute Produktion von IgE auslösen. Das ebenfalls von ihnen freigesetzte IL-5 lässt Eosinophile heranreifen. Durch IL-13 wird die Produktion von Schleim angeregt und Umbauprozesse der Atemwege mit resultierender Verengung des Lu-

mens eingeleitet. Auffällige Blutparameter sind eine Erhöhung der Gesamt-IgE-Spiegel und der spezifischen IgE-Spiegel im Blutserum, erhöhte Eosinophile im Differentialblutbild und eine IgE-vermittelte allergische Reaktion beim Hauttest (Hansel et al., 2013).

Atopisches Asthma tritt häufig mit weiteren atopischen Erkrankungen auf, zu denen die allergische Rhinokonjunktivitis, die atopische Dermatitis (Neurodermitis) und Nahrungsmittelallergien zählen (Zimmermann et al., 1988). Kinder mit einer atopischen Dermatitis entwickeln schätzungsweise zu zwei Dritteln eine allergische Rhinokonjunktivitis und zu einem Drittel Asthma (Spergel, 2010; van der Hulst et al., 2007). Diese typische Reihenfolge wird als „atopic march“ bezeichnet, kann aber auch in entgegengesetzter Richtung verlaufen (Barberio et al., 2008).

Im Gegensatz dazu werden die Symptome beim nicht atopischen Asthma hauptsächlich durch Virusinfektionen ausgelöst, aber auch durch Inhalation von kalter Luft und durch physische Anstrengung und psychische Belastung. In der Regel ist es gekennzeichnet durch eine normale Anzahl an Eosinophilen im Differentialblutbild, erhöhte IgEs fehlen im Blutserum (Koletzko, 2012; McGrath et al., 2012).

Beiden Formen gemeinsam ist die Endstrecke mit einer bronchialen Hyperreagibilität sowie einer reversiblen und variablen Atemwegsobstruktion im Anfall. Das frühkindliche Asthma, als *multi-trigger-wheeze* bezeichnet, kann sowohl durch *charakteristische Trigger des atopischen Asthmas* wie Allergene, als auch durch *typische Trigger des nicht atopischen Asthmas* wie virale Infekte, kalte Luft und physische Anstrengung ausgelöst werden (Brand, 2008). Asthma wird je nach Ausmaß der Erkrankung in verschiedene Schweregrade eingeteilt (Reddel et al., 2009) und kann abhängig davon die Lebensqualität der Erkrankten massiv einschränken, was das Forschungsgebiet medizinisch äußerst relevant macht. Dabei kommt es zur Beeinträchtigung des Schlafs, zu erhöhter und prolongierter Infektanfälligkeit sowie zu verminderter physischer Belastbarkeit. In bis zu 0,7 pro 100.000 Fällen kann es tödlich verlaufen (Asher und Pearce, 2014).

Aktuell scheint es, als wäre für die Erkrankung nicht ein einziger Grund, sondern eine Vielzahl von Faktoren und deren Zusammenspiel verantwortlich. Daher wird Asthma auch als „komplexe Erkrankung“ bezeichnet und stellt für Forscher weltweit eine Herausforderung dar.

### 1.1.3 Protektive und risikoerhöhende Einflussfaktoren

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden viele prädisponierende Faktoren für eine Erkrankung an Asthma identifiziert. Die Kausalität dieser multifaktoriellen Erkrankung ist aber bis heute nicht ausreichend geklärt. Die Wahrscheinlichkeit, im Kindesalter an Asthma zu erkranken, kann durch verschiedene Faktoren determiniert oder auch gesenkt werden (hierzu auch Tabelle 1).

- **Genetik und familiäre Häufung:** Die allen vorangehende Studie über eine genetische Komponente bei Asthma war eine internationale Kooperation, bei der mehr als 317.000 *Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)* an insgesamt 2.237 Kindern mit und ohne Asthma untersucht wurden (Moffatt et al., 2007; Ober et al., 2006). Es zeigt sich, dass bestimmte Genvarianten im Genlocus 17q21 das Risiko, in der Kindheit an Asthma zu erkranken, deutlich erhöhen. Die Genvarianten im Genlocus 17q21

**Tabelle 1:** Übersicht über einige wichtige protektive Einflüsse und Risikofaktoren für Asthma bronchiale im Kindesalter

<b>Protektive Faktoren</b>	<b>Risikofaktoren</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Viele Geschwister</li> <li>• Aufwachsen auf einem Bauernhof</li> <li>• <b>Hohe mikrobielle Exposition</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Passivrauchen</li> <li>• Adipositas</li> <li>• Positive Familienanamnese</li> <li>• Genvarianten im Genlocus 17q21</li> </ul>

waren nicht mit erhöhten IgE-Spiegeln im Blut assoziiert (Granell et al., 2013; Moffatt et al., 2007; Ober et al., 2006). Die risikoerhöhende Genvariante im Genlocus 17q21 ist daher nicht mit einer atopischen Sensibilisierung assoziiert.

Des Weiteren steigt bei einer Asthmaerkrankung der Mutter das Risiko des Kindes, an Asthma zu erkranken (Gaffin et al., 2012; Martinez et al., 1995).

Der überaus schnelle Anstieg der Asthmaprävalenz lässt sich laut aktueller Forschung aber nicht allein durch sich verändernde genetische Voraussetzungen erklären (von Mutius, 2014).

- **Inhalative Noxen und Allergene:** Zur Entwicklung dieser multifaktoriellen Erkrankung trägt auch eine Reihe von inhalativen Noxen bei. So ist bekannt, dass Passivrauch-exponierte Kinder ein erhöhtes Risiko tragen, akute Erkrankungen der unteren Atemwege, *Wheezing* und kindliches Asthma zu entwickeln (Strachan et al., 1998) und Aktivrauchen im Jugendalter Asthma im Jugend- und Erwachsenenalter fördert (Strachan et al., 1996).

Ozon und Feinstaub führen zu Asthma-Exazerbationen (Tatum et al., 2005). Viele Kinder und Erwachsene klagen über Hausstaubmilbenallergien als Folge einer Sensibilisierung und Produktion spezifischer IgEs. So trägt eine Allergenexposition zur Persistenz der Asthmasymptome bei (Illi et al., 2006). Jedoch gibt es keinen Anhaltspunkt für einen kausalen Zusammenhang zwischen Hausstaubmilbenexposition und der Entstehung von Asthma (Lau et al., 2000). Auch der Fokus auf die Exposition gegenüber Tierepithelien und -haaren von z. B. Katzen konnte keine erhöhten Asthmainzidenzen nachweisen, es gibt sogar Hinweise für einen protektiven Effekt (Lynch et al., 2014).

- **Nutritive Faktoren:** Auch die Ernährung scheint einen Einfluss auf Asthma zu haben, weil Übergewichtige, und hier besonders Mädchen im Jugendalter, vermehrt Asthmasymptome zeigen (Schaub et al., 2005). Da eine Gewichtsreduktion zu besseren Lungenfunktionstests führt, ist es wahrscheinlich, dass der erhöhte Body Mass Index (BMI) Asthma begünstigt und nicht die mangelnde Bewegung aufgrund verminderter physischer Belastbarkeit bei Asthma zu einer Gewichtszunahme führt.
- **Hygiene, Viren und Bakterien:** Dr. Strachan (1989) stellte fest, dass das Risiko, an allergischer Rhinokonjunktivitis und Atopie zu erkranken, bei Kindern mit Geschwistern

sinkt. Der Effekt war besonders bei Vorhandensein von älteren Geschwistern zu sehen und wurde mit steigender Geschwisteranzahl verstärkt. Auf diese Beobachtung stützt sich die von ihm formulierte *Hygiene-Hypothese* (Strachan, 1989): Durch die verbesserten hygienischen Verhältnisse besteht ein geringerer Kontakt mit Mikroorganismen als früher, sodass auf zellulärer Ebene eine Verschiebung der früher TH1-Zell-geprägten Immunantwort, die getriggert war durch bakterielle Infektionen und Viren, in Richtung der TH2-Zell-dominierten Immunreaktion erfolgt. Diese führt u. a. zu erhöhten IgE-Spiegeln (Karmaus et al., 2002; Martinez und Holt, 1999; Schaub et al., 2006).

Der Besuch einer Kinderkrippe erhöht den Kontakt des Kindes zu Bakterien und Viren und kann bei einer bereits bestehenden atopischen Dermatitis das Risiko für Asthma in jungen Jahren stark senken (Gaffin et al., 2012).

In den ersten drei Lebensjahren können virale Infektionen der oberen Atemwege zwar zu *transientem Wheezing* führen, jedoch verschwindet dieses typischerweise, sobald sich das Lumen der Atemwege mit der Entwicklung vergrößert hat, ohne dass sich Asthma entwickelt (Martinez und Holt, 1999; Schaub et al., 2006). Eine erhöhte Rate an persistierendem frühkindlichem *Wheezing* bei Kindern mit einer Respiratory Syncytial Virus (RSV)-positiven Bronchiolitis wurde aber beschrieben (Corne et al., 2002). Außerdem konnte festgestellt werden, dass eine Kolonisierung der Hypopharynx-Region von Neugeborenen mit den als Pathogene der Atemwege bekannten Bakterienspezies *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, oder *Moraxella catarrhalis* oder mit einer Kombination aus diesen Spezies das Risiko für wiederkehrendes *Wheezing* und Asthma im Alter von fünf Jahren erhöht (Bisgaard et al., 2007). Aktuell gibt es jedoch Hinweise darauf, dass nicht ein bestimmter Virustyp oder die Infektion mit diesen speziellen Bakterien, sondern vielmehr die Anzahl an frühkindlichen obstruktiven Episoden die Entwicklung von Asthma im Alter von sieben Jahren begünstigt (Bønnelykke et al., 2015).

- Der *Bauernhof-Effekt*: Bei Kindern, die auf einem Bauernhof aufwachsen, reduziert sich die Prävalenz von Heuschnupfen, Asthma und allergischen Erkrankungen im Allgemeinen konsistent um ca. 40 % (Braun-Fahrländer et al., 1999; Riedler et al., 2000). Diese interessante Erkenntnis hat zahlreiche weiterführende Untersuchungen in Gang gesetzt und einige vielversprechende Ergebnisse hervorgebracht.

#### 1.1.4 Der *Bauernhof-Effekt*: von epidemiologischen Grundlagen bis heute

Zunächst konnte durch epidemiologische Analysen gezeigt werden, dass *traditionelle* Bauernhofkinder besonders gut vor Asthma geschützt sind. *Traditionell* bedeutete, dass die Eltern dieser Kinder den Bauernhof hauptberuflich betrieben. Das Risiko dieser Bauernhofkinder wurde um 60 % reduziert (von Ehrenstein et al., 2000).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein Kontakt mit Tierställen und eine Ernährung mit unpasteurisierter Rohmilch in den ersten fünf Lebensjahren und insbesondere im Säuglingsalter den stärksten protektiven Effekt hatten (Riedler et al., 2000).

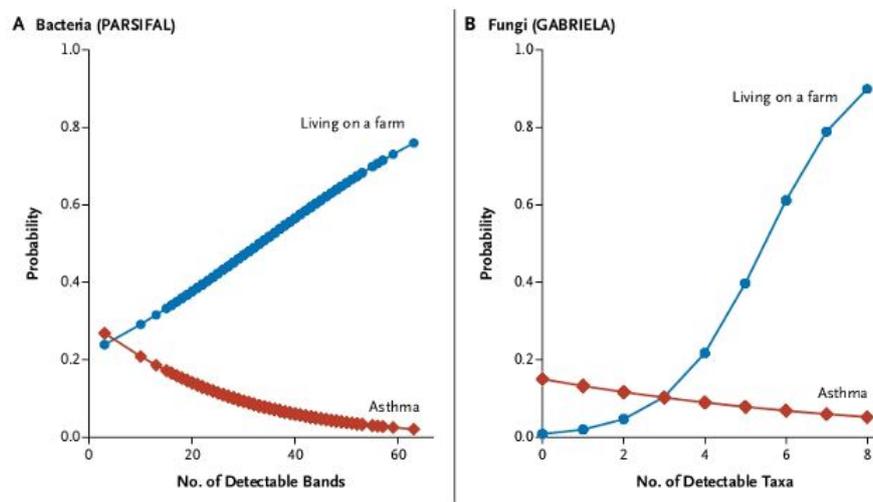
Hinweise, dass Bakterien einen schützenden Effekt haben könnten, gaben signifikant höhere Endotoxin-Werte in Küchenbodenstaub und Matratzenstaub aus den Schlafzimmern von Bau-

ernhofkindern im Vergleich zu einer nicht auf einem Bauernhof lebenden Referenzgruppe. Endotoxine sind Lipopolysaccharide und Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien. In Tierställen wurden besonders hohe Endotoxin-Spiegel festgestellt (von Mutius et al., 2000). Es zeigte sich ein inverser Zusammenhang zwischen der Menge an Endotoxin und dem Auftreten von Atopie, allergischer Rhinokonjunktivitis und atopischem Asthma (Braun-Fahrlander et al., 2002). Endotoxin hat Einfluss auf verschiedene Immunprozesse und kann u. a. die Produktion von Interleukin 12 und Interferon- $\gamma$  anregen. Dadurch wird die Proliferation von TH2-Zellen inhibiert, die eine tragende Rolle bei der Entwicklung von atopischen Erkrankungen spielen (Ulevitch und Tobias, 1995). Auch N-Acetyl-Muraminsäure, ein Bestandteil der Zellwand zahlreicher grampositiver Bakterien, konnte häufiger in Matratzenstaub von Bauernhofkindern gefunden werden und korrelierte invers mit dem Auftreten von nicht atopischem Asthma (van Strien et al., 2004).

Mittels *Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus* (engl. *single strand conformation polymorphism*) (SSCP) (Kapitel 1.2.1.1) konnten in Stallstaub und Matratzenstaub von Bauernhofkindern die gleichen Bakterienspezies gefunden werden, was eine Übertragung dieser Bakterien durch die Kinder vom Stall auf die Matratze wahrscheinlich machte (Korthals et al., 2008). Wenn Bakterien für den *Bauernhof-Effekt* mitverantwortlich sind, könnte Matratzenstaub somit eine sehr geeignete Umweltprobe zur Untersuchung darstellen.

Neben den Bakterien wurde auch dem Molkeprotein in unpasteurisierter Rohmilch ein möglicher protektiver Effekt zugeschrieben (Loss et al., 2011; Loss et al., 2014).

2011 konnten Ege et al. zeigen, dass in Umweltproben der häuslichen Umgebung eine inverse Beziehung zwischen der mikrobiellen Diversität von Pilzen und Bakterien und der Wahrscheinlichkeit, Asthma zu entwickeln, besteht (Ege et al., 2011). Dies wurde durch Kultivierung von Pilzen für Matratzenstaub und durch Untersuchung der Bakterien mittels SSCP (Kapitel 1.2.1.1) an Zimmerstaub festgestellt (Abbildung 1).



Reproduziert mit Erlaubnis von Ege et al., NEJM, 2011 (Copyright Massachusetts Medical Society).

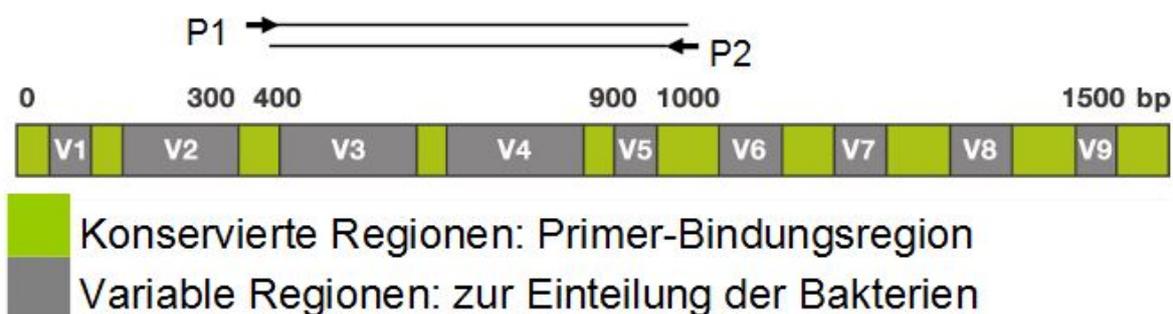
**Abbildung 1:** Zusammenhang zwischen mikrobieller Exposition und Auftreten von Asthma bronchiale für A) Bakterien und B) Pilze

## 1.2 Methoden zur Untersuchung der mikrobiellen Vielfalt

### 1.2.1 Kulturabhängige und kulturunabhängige Methoden

Lange Zeit versuchte man, die mikrobielle Diversität mittels Anzucht und Selektion durch kulturabhängige Methoden zu untersuchen. Diese Methoden erfassen nur 0,1 % bis maximal 10 % der Bakterien (Amann et al., 2001, Staley et al., 1985).

Die Untersuchung der bakteriellen Diversität konnte durch die Entwicklung kulturunabhängiger Methoden erweitert werden. Mittlerweile sind unter den molekularbiologischen Nachweisverfahren zur Erfassung der bakteriellen Diversität die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)-basierten am meisten verbreitet (Kirk et al., 2004). Nach der DNA-Extraktion als essentieller Schritt werden bestimmte DNA-Abschnitte mittels PCR amplifiziert, wobei meist repräsentativ das 16S ribosomale Ribonukleinsäure (engl. 16S ribosomal ribonucleic acid) (16S rRNA)-Gen genutzt wird. Woese und Fox beschrieben 1977, dass die Nukleotidsequenz des 16S rRNA-Gens für die phylogenetische Klassifikation von Archäen und Bakterien verwendet werden kann. Das Gen kodiert für die 30S Untereinheit von prokaryoten Ribosomen. Diese Untereinheit ist essentiell für das Überleben und besitzt eine geringe Mutationsrate. Das Gen ist in jedem Bakterium vorhanden, ca. 1500 bp lang und weist hochkonservierte und variable Regionen auf (Woese und Fox, 1977) (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des 16S rRNA-Gens

Anhand der neun variablen Regionen (V1-V9) lassen sich die einzelnen Bakterien und Archäen voneinander unterscheiden (Stackebrandt und Goebel, 1994). Die phylogenetische Einordnung richtet sich nach vermutetem Ursprung und dem Verwandtschaftsgrad. Mittels PCR, die 1983 von dem Biochemiker K. Mullis entwickelt wurde, können durch zyklische Abfolge von Denaturierung der doppelsträngigen DNA, Anlagerung von sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primersequenzen) an die DNA-Einzelstränge und enzymatische Verlängerung bereits geringe DNA-Mengen in einer Probe vervielfältigt werden (Saiki et al., 1985).

Bei der PCR werden zur Amplifikation Primer verwendet, die komplementär zu den hochkonservierten Regionen sind und somit an das 16S rRNA-Gen der Bakterien binden können. Die für jede PCR benötigten Forward- und Reverse-Primer schließen variable Regionen ein. Die Amplifikate können für DNA-Fingerprint-Methoden und phylogenetische Microarrays genutzt oder sequenziert werden.

### 1.2.1.1 DNA-Fingerprint-Methoden

Häufig verwendete Analysemethoden dieser Kategorie sind

- *Denaturierungs-Gradienten-Gel-Elektrophorese* (engl. *denaturing gradient gel electrophoresis*) (DGGE) (Muyzer et al., 1993)
- *Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese* (engl. *temperature gradient gel electrophoresis*) (TGGE) (Muyzer et al., 1993)
- *Terminaler Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus* (engl. *terminal restriction fragment length polymorphism*) (T-RFLP)-Analyse (Liu et al., 1997)
- *Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus* (engl. *single strand conformation polymorphism*) (SSCP)-Analyse (Orita et al., 1979)
- *rRNA Intergenic Spacer Analysis* (RISA) (Fisher und Triplett, 1999)

Bei diesen Methoden wird die Probe mit universellen Bakterienprimern, die an die hochkonservierten Regionen binden, amplifiziert. Die entstandenen Fragmente werden durch verschiedene Verfahren gelelektrophoretisch aufgetrennt. Durch die unterschiedlich langen Fragmente entsteht ein Bandenmuster, das charakteristisch für bestimmte Bakterienspezies ist. Somit kann man Aussagen über die vermutete Taxonomie der Bakterien treffen (Vanechoutte, 1996). Von Nachteil ist jedoch, dass keine direkte Zuordnung von Gelbande zu Bakterienspezies möglich ist. Eine Bande kann nämlich mehrere unterschiedliche Sequenzen beinhalten, aber mehrere Banden können auch dieselbe Spezies repräsentieren (Gelsomino, 1999; Orti et al, 1997).

### 1.2.1.2 Phylogenetische Microarrays

Phylogenetische Microarrays wie z. B. der *Phylochip* können die taxonomische Zusammensetzung von Proben bestimmen, indem sie die amplifizierten und fragmentierten 16S rRNA-Gen Fragmente durch Hybridisierung detektieren (Brodie et al., 2006). Dieses Verfahren wurde bereits bei Lemon et al. (2010) zur Untersuchung von Abstrichen aus der Nase und des Oropharynx angewandt und kann etwa 8.700 Taxa bestimmen (Brodie et al., 2006). Der Nachteil besteht jedoch darin, dass nur diejenigen Taxa detektiert werden, deren Komplementärsequenz bekannt ist. Zudem muss sich die Komplementärsequenz auf dem Chip befinden. Alle Taxa mit (noch) unbekannter Sequenz können somit nicht erfasst werden.

### 1.2.1.3 Parallelsequenzierung

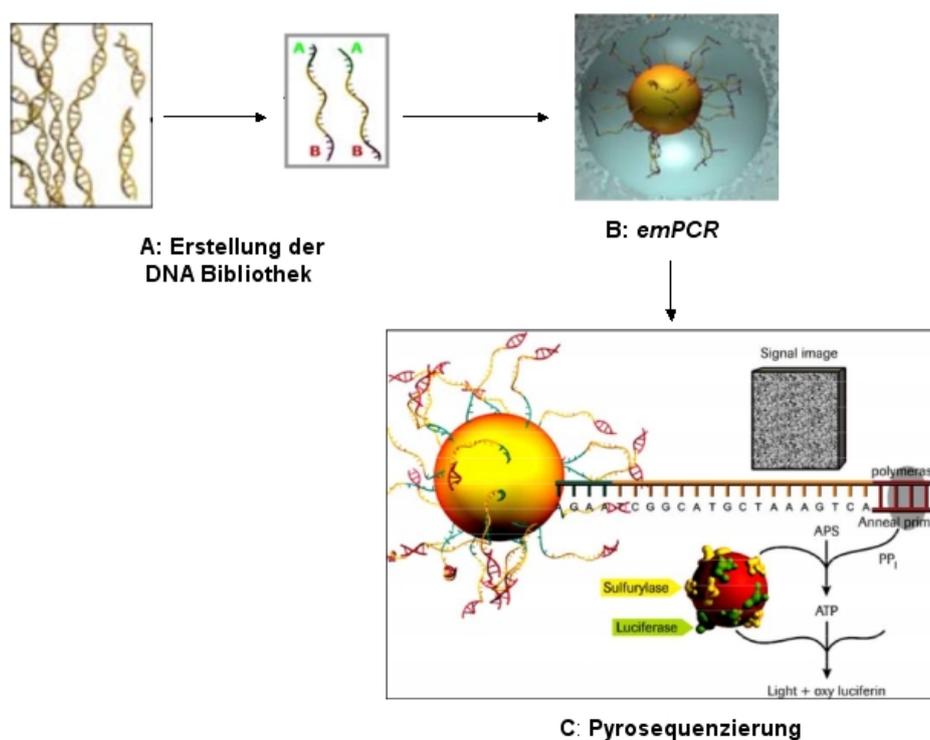
Diese neue Generation der Sequenzierung umfasst verschiedene Sequenzieretechniken, die es ermöglichen, unterschiedliche Sequenzen gleichzeitig zu ermitteln und damit einen hohen Durchsatz bei niedrigen Kosten zu garantieren (Ronaghi, 2001). Eine in diese Kategorie fallende Methode, die *454-Pyrosequenzierung*, wurde für die Analyse der zur Verfügung stehenden Proben der GABRIELA Studie angewandt.

## 1.2.2 Überblick über das Next-Generation-Sequencing und Einführung in die 454-Pyrosequenzierung

Die neuesten Technologien der Sequenzierung werden unter dem Begriff Next-Generation Sequencing (NGS) zusammengefasst (Voelkerding et al., 2009).

Dazu gehören die *454-Technologie* (Pyrosequenzierung, Roche/454 Life Sciences), der *Genome Analyzer* (Sequenzierung durch Ligation und Spaltung, Illumina), die *SOLiDTM Technologie* (Sequenzierung durch Ligation und Spaltung, Applied Biosystems), die *HeliScope Sequenzierung* (Einzelmolekül-Sequenzierung ohne vorherige Amplifikation, Helicos Bioscience) und die *Ion Torrent Technologie* (Ionenhalbleiter-Sequenzierung, life technologies). Die *454-Pyrosequenzierung* wurde als Sequenziermethode für diese Arbeit angewandt. Sie besteht im Wesentlichen aus folgenden Abschnitten (Rothberg und Leamon, 2008) (Abbildung 3):

- Erstellung der DNA-Bibliothek
- *emPCR*
- *Pyrosequenzierung*.



**Abbildung 3:** Die wesentlichen Abschnitte der *454-Pyrosequenzierung*: A) Erstellung der DNA-Bibliothek, B) *emPCR* und C) *Pyrosequenzierung* (Abbildung nach Roche 454 Life Sciences)

Die DNA-Bibliothek einer Probe besteht aus den amplifizierten 16S rRNA-Gen-Fragmenten der Bakterien, die in ihr vorkommen. Da auf eine Picotiterplatte (engl. picotiter plate) (PTP) verschiedene Proben aufgetragen werden, erhält jede Probe für die Identifizierung bei der Analyse einen mit probenspezifischem Barcode versehenen Primer. Um von jeder Probe ähnlich viele Sequenzen zu gewinnen, wird bei der *emPCR* für jede Probe die gleiche (äquimolare) Menge an 16S rRNA-Gen-Fragmenten eingesetzt.

Ziel der *emPCR* ist es, die 16S rRNA-Gen-Fragmente an synthetische Partikel (Beads) zu binden und zu vervielfältigen. Die einzelnen Beads tragen viele Kopien eines gleichen DNA-Moleküls (ein Bead - ein Fragment). Die Beads werden auf die PTP aufgetragen. Als Matrize zum Ablesen dient einzelsträngige DNA, die mithilfe eines Sequenzierprimers und Enzymen zum Doppelstrang verlängert wird. Die Pyrosequenzierung-Reaktion ist eine Sequencing-by-Synthesis Methode, bei der beim Einbau des passenden komplementären Nukleotids Pyrophosphat abgespalten wird. Pyrophosphat wird durch die Sulfurylase zu ATP umgewandelt, welches von der Luciferase verwendet wird, um Luciferin zu Oxiluciferin umzusetzen. Während dieses Vorgangs entsteht Licht, welches mit der *Charge-Coupled Device (CCD)*-Kamera aufgenommen und in Information übersetzt wird. Die Nukleotide (A, C, T und G) werden nacheinander zyklisch dazugegeben. Die Zyklen werden 200 Mal wiederholt (vier Basen pro Zyklus). Die Stärke des Lichtimpulses ist proportional zur Anzahl der eingebauten Nukleotide: Leuchtet ein Well im zweiten Zyklus dreimal so stark wie im ersten, bedeutet es den dreifachen Einbau des gleichen Nukleotids hintereinander. Die gewonnenen Daten werden in Form eines Flowgramms dargestellt, aus dem die Sequenzabfolge extrahiert werden kann (Mardis, 2008; Ronaghi, 2001).

Bei der anschließenden Datenanalyse werden Sequenzen, die sich zu einem gewissen Prozentsatz in ihrer 16S rRNA-Sequenz ähneln, einer *Operational Taxonomic Unit (OTU)* zugeteilt, die eine Gruppe von Bakterienspezies oder eine einzelne Bakterienspezies darstellen soll (Blaxter et al., 2005).

### 1.2.3 Die GABRIELA-Studie

Das Material für die Untersuchung der Mikrobiota stammt aus dem österreichischen Arm der *weiterentwickelten multidisziplinären Studie zur Identifikation der genetischen und umweltbeeinflussten Ursachen für Asthma in der Europäischen Gemeinschaft (GABRIELA-Studie)*. Diese Studie wurde durchgeführt, um die entscheidenden Umweltfaktoren auf Bauernhöfen zu bestimmen, die den von europäischen Arbeitsgruppen gezeigten Schutz vor Asthma und Atopie (Braun-Fahrlander et al., 1999; von Ehrenstein et al., 2000; Riedler et al., 2001) erklären konnten (Genuneit et al., 2011). Der *Bauernhof-Effekt* gilt als einer der bedeutendsten protektiven Umweltfaktoren und ist zudem auch außerhalb Europas beständig (Ege et al., 2007; Sozanska et al., 2007; Tse et al., 2008; von Mutius et al., 2010).

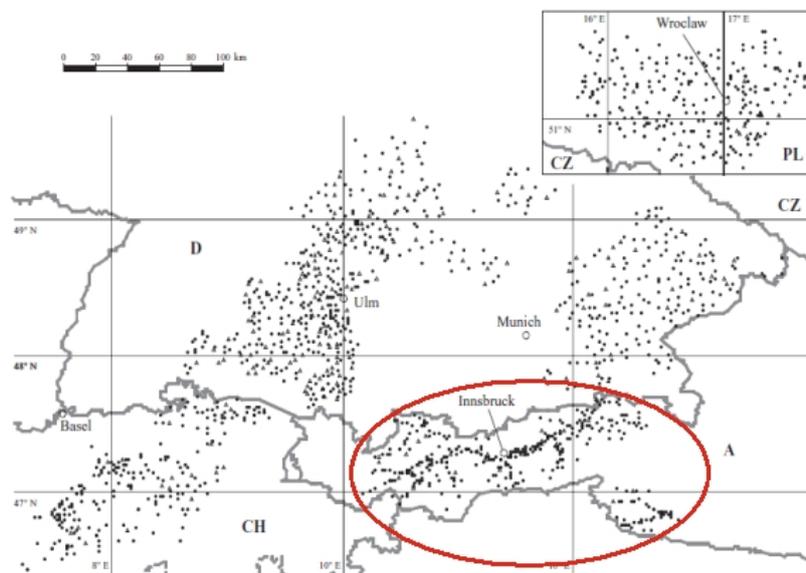
Das GABRIELA Studiendesign ist multi-phasisch stratifiziert und multizentrisch aufgebaut. Vier Länder nahmen an der Studie teil: (Süd-)Deutschland mit zwei Studienzentren, der LMU München in Bayern und der Universität Ulm in Baden-Württemberg, die Schweiz (Kantone Luzern, Zürich und Thurgau), Österreich (medizinische Universität Innsbruck) und Polen (medizinische Universität Wroclaw) (Abbildung 4).

Die Probanden, Schulkinder zwischen sechs und zwölf Jahren (Mittelwert: 8,5 Jahre (Standardabweichung (engl. standard deviation) (SD): 1,2)) (Genuneit et al., 2011) und alle aus ländlicher Gegend stammend, wurden nach Ausmaß der Bauernhof-Exposition und Erkrankung (Einteilung nach (Genuneit et al., 2011)) gruppiert.

Phase eins, die Screening Phase, sollte die Prävalenz der Bauernhof-Exposition von Asthma und Atopie eruieren ( $n = 103.219$ ). Phase zwei, aus der das hier verwendete Untersuchungsmaterial stammte, ermittelte Details aus einer stratifizierten randomisierten Stichprobe

( $n = 15.255$ ) aus Phase eins über das Ausmaß der Bauernhof-Exposition und nahm Biomaterial ab. Voraussetzung für Phase zwei war, dass die Probanden selbst die Nationalität ihres Studienlandes aufwiesen und die Eltern im Studienland geboren waren. Eine weiterführende Phase drei wurde nur in Bayern durchgeführt.

Die Umfrage zeigte, dass der größte positive Effekt auf den Kontakt der Mutter und des Kindes selbst im Säuglingsalter mit Bauernhoftieren und mit deren Futter zurückzuführen ist, sowie auf eine Ernährung mit unpasteurisierter Rohmilch (Illi et al., 2012).



**Abbildung 4:** Studienzentren der GABRIELA Studie: Das österreichische Studienzentrum, aus dem die analysierten Proben stammten, ist rot umrandet.

### 1.3 Zusammensetzung und Ziele der Studie

Die Asthma-Prävalenz ist in den letzten Jahrzehnten in den westlichen Ländern deutlich gestiegen und die genauen Ursachen hierfür sind bislang weitgehend unbekannt (Eder et al., 2006; von Mutius, 2014).

Weil das Aufwachsen auf einem Bauernhof einer der stärksten die Asthma-Prävalenz reduzierenden Umweltfaktoren ist (Genuneit et al., 2011) und eine hohe mikrobielle Exposition mit einer niedrigeren Wahrscheinlichkeit einhergeht, Asthma im Kindesalter zu entwickeln (Ege et al., 2011), stellt die Analyse der Mikrobiota einen interessanten Forschungsansatz dar.

Die Methode der *454-Pyrosequenzierung* bietet im Gegensatz zu den bisher angewandten Verfahren den entscheidenden Vorteil, parallel sehr viele unbekannte Sequenzen zu gewinnen und zu analysieren. So lassen sich Aussagen über die phylogenetische Komposition und die relativen Häufigkeiten der Bakterien treffen.

Das erste Hauptziel dieser Arbeit war die *Etablierung der Methoden* zur Erstellung der DNA-Bibliothek, der *emPCR* und der *454-Pyrosequenzierung* für die zwei unterschiedlichen Probenotypen als Voraussetzung für die Analyse der Mikrobiota. Die Methoden sollten nach der Etablierung reproduzierbar sein und in darauffolgenden Studien einheitlich durchgeführt werden können.

Das zweite Hauptziel war die Erschließung der taxonomischen Zusammensetzung und die Bestimmung eines möglichen Ursprungs der Bakterien in den beiden Probenotypen sowie die Analyse der Diversität. Die Frage war, ob die Matratze eine geeignete Probe zur Erfassung der Umwelt, in der die Kinder lebten, darstellte und inwieweit die vordere Nasenhöhle durch die Umwelt beeinflusst wurde. Um einen Umwelteinfluss beurteilen zu können, wurden die Proben von zwei unterschiedlichen Gruppen betrachtet: Auf der einen Seite standen Bauernhofkinder, deren Eltern hauptberuflich einen Bauernhof betrieben, auf der anderen Seite standen Referenzkinder ohne Kontakt zu einem Bauernhof. Diese beiden Gruppen wurden auf unterschiedliche taxonomische Zusammensetzung und Diversität in den beiden Probenotypen untersucht.

Als letztes Hauptziel galt es, Unterschiede zwischen Kindern mit einer Erkrankung an Asthma und gesunden Kontrollen zu definieren. Lange Zeit wurden Erkrankungen der oberen Atemwege wie die allergische Rhinitis in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde und Erkrankungen der unteren Atemwege wie das Asthma in der Pneumologie behandelt und strikt voneinander getrennt. Heute ist bekannt, dass das atopische Asthma und die allergische Rhinokonjunktivitis im Sinne einer *united airway disease* häufig kombiniert auftreten und es wird immer mehr nach systemischen Therapieansätzen gesucht (Bachert et al., 2004; Bousquet et al., 2004; Rimmer und Ruhno, 2006). Diese Vorstellung der *united airways* erlaubt es, die Vermutung aufzustellen, dass die Nasenschleimhaut möglicherweise auch bei einer Erkrankung an Asthma verändert sein könnte und sich von gesunden Kontrollen unterscheidet. Unterschiede zwischen Asthmatikern und Kontrollen im Matratzenstaub könnten des Weiteren für protektive Faktoren oder Risikofaktoren in der Umwelt sprechen oder aber auch die Mikrobiota des Kindes, das auf der Matratze schlief, widerspiegeln.

Hierbei sollte auch nach einer inversen Korrelation zwischen der Mikrobiota von Bauernhofkindern und Asthmatikern in Matratzenstaub und Nasenabstrichproben gesucht werden, um mögliche Erklärungen für die niedrigere Asthmaprävalenz von Bauernhofkindern zu finden.

## 2 Material und Methoden

Eine Auflistung aller verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte befindet sich in den Tabellen E1, E2 und E3 (in Kapitel 6).

### 2.1 Untersuchungsmaterial

Das analysierte Probenmaterial stammte aus der österreichischen Studienregion der GABRIELA Studie Phase 2 mit 1011 Kindern (Abbildung 5). In Phase 1 bestand die österreichische Population aus 5020 Kindern (Genuneit et al., 2011). Der Fokus der Arbeit richtete sich auf zwei wesentliche Informationen: die Erkrankung an Asthma und das Leben auf einem Bauernhof (Bauernhof-Exposition). Der Unterschied zu einer klassischen retrospektiven Fall-Kontroll-Studie bestand darin, dass in der GABRIELA Studie die Kinder zusätzlich vor der Analyse in exponierte Bauernhofkinder und nicht-exponierte Referenzkinder eingeteilt wurden.

Die Studienpopulation wurde in 4 Strata eingeteilt, Bauernhof-exponierte nicht Bauernhofkinder wurden aus der Analyse ausgeschlossen. In die Referenzgruppen (ohne Asthma) wurden Nichtatopiker und Atopiker in einem Verhältnis eingeschlossen, wie es der Normalbevölkerung entspricht. Damit wurde sichergestellt, dass mögliche Assoziationen von Bauernhof-Exposition und Asthma nicht durch die potenzielle Störgröße Atopie verzerrt wurden.

Die untersuchte Population setzte sich in Phase 2 aus 452 Bauernhofkindern und 559 Referenzkindern zusammen. Bis auf die Materialsammlung, die zwischen Mai und Juli 2007 durch trainiertes Studienpersonal stattfand, wurden alle experimentellen Arbeitsschritte selbstständig durchgeführt. Zwischen Nasenabstrich- und Matratzenstaubprobennahme lagen ca. 0-2 Tage Abstand (Mittelwert= 0,86 d; SD = 1,14).

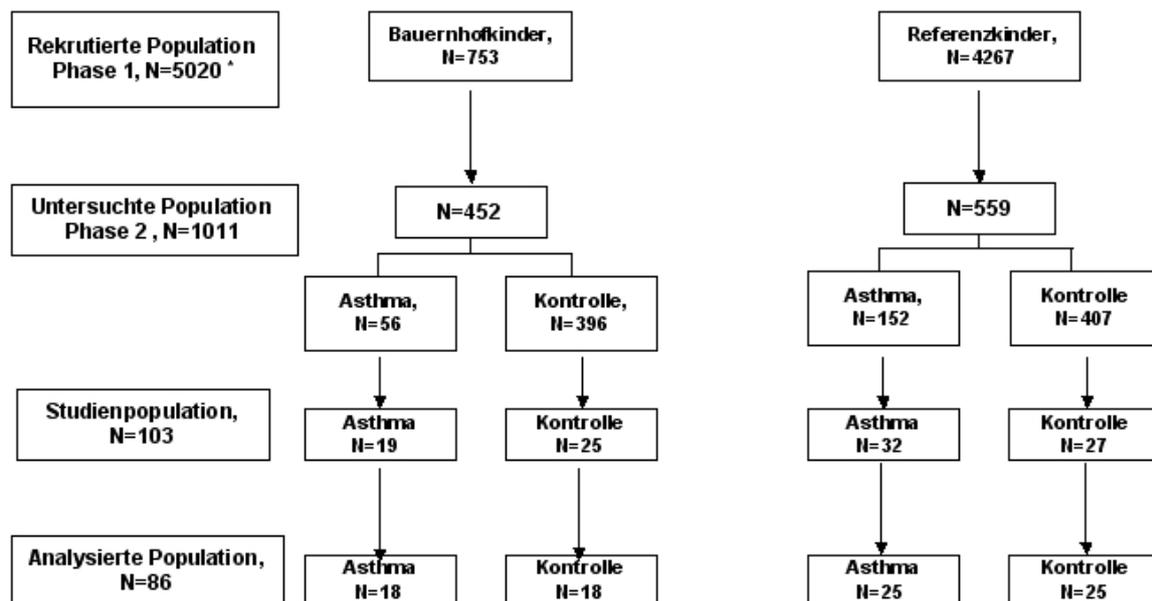
Die Proben wurden wie folgt in vier Gruppen eingeteilt: Erkrankung an Asthma (*Fall*) jeweils mit (*Bauernhof-Gruppe*) und ohne (*Referenz-Gruppe*) *Bauernhof-Exposition*; keine Erkrankung an Asthma (*Kontrolle*) ebenfalls mit (*Bauernhof-Gruppe*) und ohne (*Referenz-Gruppe*) *Bauernhof-Exposition*.

Die Variable Asthma wurde definiert, wenn eine der folgenden Aussagen zutrif: eine ärztliche Asthma bronchiale Diagnose, *Wheezing* (pfeifendes Atemgeräusch) in den letzten zwölf Monaten, der Gebrauch eines Asthmasprays mindestens einmal im Leben oder mindestens zweimal im Leben eine obstruktive oder spastische oder asthmatische Bronchitis.

Für die Einstufung als *Bauernhofkind* musste das Kind auf einem Bauernhof aufwachsen, der von der Familie bewirtschaftet wurde, ein Referenzkind lebte in ländlicher Gegend, durfte aber weder auf einem Bauernhof aufwachsen noch Kontakt zu Rohmilch, Tierställen oder einer Scheune haben (Genuneit et al., 2011; Illi et al., 2012).

Die Studienpopulation bestand anfangs aus 119 zufällig ausgewählten Probenpaaren (Abbildung 5). Sieben Matratzenstaubproben enthielten zwischen 0 und 9,5 mg Staub, sodass sie aufgrund zu geringer Staubmengen von der Studie ausgeschlossen wurden. Neun Nasenabstrichproben konnten wegen schlechter Probenqualität nicht sequenziert werden. So reduzierte sich das für die Sequenzierung verwendete Probenmaterial auf 103 Proben. Letztendlich analysiert und verglichen werden konnten 86 Matratzenstaub- und die korrespondierenden Nasenabstrichproben, da bei einer Probe das Filtern der Sequenzen nicht durchgeführt werden konnte und 16 Proben das für die Analyse benötigte Einschlusskriterium von mehr als 1000

Sequenzen verfehlten (Abbildung 5). Bei den Bauernhofkindern hatten 18 Kinder eine Asthmadiagnose und 18 waren in der gesunden Kontrollgruppe. Bei den Referenzkindern gab es 25 Kinder mit Asthmadiagnose und 25 Kinder waren gesund.



**Abbildung 5:** Überblick über die Probenauswahl

## 2.1.1 Nasenabstriche

### 2.1.1.1 Sammlung und Aufbewahrung

Die Abnahme der Nasenabstriche erfolgte durch trainiertes Studienpersonal. Ein steriles Wattestäbchen (Stiel Kunstfaser: Mastaswab MD 559, Fa. Mast, Grünwald) wurde 1 cm tief in den vorderen Teil der Nasenhöhle des Kindes eingeführt, auf die Schleimhaut aufgesetzt und diese fünfmal kreisförmig abgestrichen. Die Sammlung erfolgte zwischen Mai und Juli 2007. Innerhalb von 24 h wurden die Proben bei -80 °C im Tropeninstitut Basel bis zur Aufarbeitung gelagert. Im November 2012 wurden die ausgewählten Proben selbstständig in Basel sortiert und auf Trockeneis nach München (LMU; AG von Mutius) transportiert. Dort wurden sie bis zur DNA-Extraktion bei -80 °C gelagert.

## 2.1.2 Matratzenstaub

### 2.1.2.1 Sammlung und Aufbewahrung

Das Sammeln des Matratzenstaubes erfolgte durch die Eltern der Studienteilnehmer. Unter Zuhilfenahme eines standardisierten bebilderten Protokolls und eines Nylonsäckchens, das am eigenen Staubsauger vorne am Saugrohr fixiert wurde, saugten diese die gesamte Matratze

des Kindes für 2 min ab (Schram et al., 2005). Der so gewonnene Staub wurde dem Studienzentrum zugesandt und bei -80 °C zwischengelagert, bevor er, bis zur DNA-Extraktion in München, in Utrecht bei -80 °C aufbewahrt wurde.

### 2.1.2.2 Aliquotierung des Matratzenstaubes

Die Aliquotierung wurde eigenständig durchgeführt. Der Matratzenstaub wurde in sterile 2 ml Probenröhrchen (RNAse, DNAse und Endotoxin-frei; Axygen, Schwerte) aliquotiert. Von jeder Matratzenstaubprobe wurden fünf Aliquots erstellt: Zwei Probenröhrchen mit 30 mg, ein Röhrchen mit 50 mg, ein Probenröhrchen mit 100 mg und ein Röhrchen für den eventuell vorhandenen Rest.

Vor Beginn wurde der Arbeitsplatz mit DNA-Exitus plus (Appllichem, Darmstadt) gereinigt und zwischen zwei Proben erfolgte eine erneute Reinigung mit Ethanol 70 %. Der ungesiebte Staub wurde mit einer Feinwaage abgewogen, beim Abwiegevorgang wurden mit Ethanol gereinigte Latex-Handschuhe (Sempercare, Gevelsberg) und eine Einmal-Mundschutz-Maske (Tiga-Med, Ronneburg) getragen, um eine Kontamination des Staubs zu verhindern. Spatel, Einmal-Wägeschälchen und 2 ml Probenröhrchen wurden 20 min in der CL-1000 ultraviolet Crosslinker Box (UVP, Wasserburg) mit UV-Licht bestrahlt. Nach jeder Probe wurde der Spatel mit Ethanol benetzt und abgeflammt.

## 2.2 DNA-Extraktion

Bevor man mit der DNA-Extraktion beginnen konnte, war Folgendes zu beachten: Um eine Kontamination des Probenmaterials zu vermeiden, wurde die Extraktion unter einer zuvor 20 min mit UV-Licht bestrahlten Sicherheitswerkbank der Klasse II durchgeführt. Alle UV-Licht stabilen Reagenzien wurden für 20 min in der CL-1000 ultraviolet Crosslinker Box (UVP, Wasserburg) bestrahlt, ebenso alle verwendeten Gefäße und Arbeitsgeräte.

Zusätzlich zu jedem Extraktionslauf wurde eine Negativkontrolle, die keinen Nasenabstrich bzw. Matratzenstaub, sondern nur die zugefügten Agenzien enthielt, mitextrahiert, und im Anschluss daran der DNA-Gehalt der Negativkontrolle bestimmt, um eine eventuelle Kontamination festzustellen. Die DNA-Extraktion wurde eigenständig durchgeführt.

### 2.2.1 Nasenabstrichproben

Zur Vorbereitung der DNA-Extraktion wurden 50 mg mit Säure gewaschene Glaskügelchen (150-212 µm Durchmesser, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in ein steriles 2 ml Mikrozentrifugentröhrchen (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) gegeben. Diese unterstützen die Zellyse mechanisch und können die DNA-Ausbeute erhöhen sowie Inhibitorkonzentrationen (z. B. Huminsäure) erniedrigen (Ogram et al., 1987).

Die Extraktion erfolgte mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden). Es wurde wie folgt vorgegangen: Der Kopf des Mastaswab mit der daran haftenden Nasenabstrich-DNA wurde mit einer mit Ethanol desinfizierten Schere abgeschnitten und in das mit 50 mg Glaskügelchen gefüllte 2 ml Mikrozentrifugengefäß gestellt.

Dazu wurden 432 µl 1 x TE-Puffer (Stammlösung 100 x TE [1 M] Tris-HCl; pH 8.0; 0.1 M EDTA, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und 18 µl 4 x Lysozym (Stammlösung c=35000 U/µl von

Biozym; Endkonzentration  $c=1.000 \text{ U}/\mu\text{l}$ ) gegeben. Nach Vortexen und Inkubation bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  für 1 h (alle 15 min 20 sec lang vortexen) wurden  $30 \mu\text{l}$  Proteinase K (Qiagen, Hilden) und darauffolgend  $450 \mu\text{l}$  AL Puffer zugegeben und 15 sec gevortext. Die Mischung wurde 30 min bei  $56 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert, dann 5 min bei  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ . Aufgrund der Möglichkeit einer DNA-Degradierung wurde darauf geachtet, die Inkubationszeit nicht zu überschreiten. Nach Zugabe von  $450 \mu\text{l}$  100 %igem Ethanol (Biozym) und Vortexen, um Tröpfchen von der Innenwand zu entfernen, wurde die Probe 2 sec mit der Micro Star 17 (VWR, Darmstadt) bei 6.000-facher Erdbeschleunigung ( $6.000 \text{ xg}$ ) zentrifugiert. Eventuell ausfallendes weißes Präzipitat sollte in allen weiteren Schritten mitverwendet werden.

Nun wurden  $700 \mu\text{l}$  der Mischung, ohne mit der Pipette Glaskügelchen aufzusaugen, auf ein QIAamp Säulchen (Qiagen, Hilden), das sich in einem 2 ml Sammelgefäß (im verwendeten QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden) enthalten) befand, gegeben. Das Gefäß wurde verschlossen und bei  $6.000 \text{ xg}$  für 1 min zentrifugiert. Die DNA sollte dabei an das Säulchen binden. Das Filtrat wurde verworfen und das Säulchen wieder in das 2 ml Gefäß gestellt. Um möglichst viel DNA zu extrahieren, wurde nun der Nasenabstrich-Kopf in ein kleines Körbchen (DNA Spin Baskets, Promega) gelegt, dieses in ein  $1,5 \text{ ml}$  Mikrozentrifugenröhrchen gestellt, und für 30 sec zentrifugiert. Die gesammelte Flüssigkeit wurde zum Säulchen gegeben, ebenso die restliche Mischung bei  $6.000 \text{ xg}$  für 1 min zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde verworfen und das Säulchen wieder in das Gefäß gestellt.

Nach Zugabe von  $500 \mu\text{l}$  AW1 Waschpuffer zum Säulchen wurde bei  $6.000 \text{ xg}$  1 min lang zentrifugiert, das Säulchen in ein sauberes 2 ml Sammelgefäß (Qiagen, Hilden) gestellt und das Sammelgefäß, das das Filtrat enthielt, verworfen. Nun wurden  $500 \mu\text{l}$  AW2 Puffer dazugegeben, das Gefäß wurde verschlossen und bei  $20.000 \text{ xg}$  3 min zentrifugiert.

Das Filtrat wurde verworfen und, nach Zurückstellen des Säulchens, das Gefäß bei  $20.000 \text{ xg}$  für 1 min zentrifugiert. Danach wurde das Sammelgefäß samt Filtrat verworfen, das Säulchen in ein sauberes  $1,5 \text{ ml}$  DNA lo bind Gefäß (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) gestellt und  $50 \mu\text{l}$  AE Elutionspuffer zugefügt, das Gefäß 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und, um das DNA-Extrakt zu erhalten, das Gefäß 1 min bei  $6.000 \text{ xg}$  zentrifugiert. Die so gewonnene DNA wurde in zwei  $1,5 \text{ ml}$  DNA lo bind Gefäße (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) aliquotiert, Charge 1 mit  $25 \mu\text{l}$  für die PCR genutzt und der verbleibende Rest als Charge 2 für die Langzeitaufbewahrung bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

## 2.2.2 Matratzenstaub

### 2.2.2.1 DNA-Extraktion mit Powersoil Kit

Die DNA-Extraktion mit Staubmengen von 10 bis 100 mg erfolgte mit Powersoil-DNA-Isolation-Kit (MO BIO, Hamburg) nach dem Herstellerprotokoll unter einer Sicherheitswerkbank Klasse II ohne Modifikationen.

### 2.2.2.2 DNA-Extraktion mit Fast Spin Kit for Soil

Für die DNA-Isolation von Staubmengen zwischen 10 und 100 mg mit FastDNA Spin Kit for Soil (mp Biomedicals, Eschwege) wurde wie folgt vorgegangen: Der Matratzenstaub wurde zu einem *Lysing Matrix E* Gefäß gegeben und 978 µl *Sodium Phosphate Buffer* zugefügt. Nach Hinzugabe von 122 µl *MT Puffer* wurde die Lösung mit dem *FastPrep Adapter* (Vortex-Adapter, MO BIO) 10 min auf höchster Stufe gevortext. Danach wurde jedes Gefäß für 15 min bei 14.000 xg mit *Micro Star 17* (VWR, Darmstadt) zentrifugiert, der Überstand in ein sauberes 2 ml Mikrozentrifugenröhrchen überführt und 250 µl Protein Precipitation Solution (=PPS) zugefügt. Nach zehnmaligem Schütteln der Proben von Hand und Zentrifugation bei 14.000 xg für weitere 5 min wurde der Überstand in ein sauberes 2 ml Gefäß gegeben und 1 ml *Binding Matrix suspension* nach Resuspendierung hinzugefügt. Nach 2 min, in denen die Proben per Hand geschüttelt wurden, wurden 690 µl zu einem Säulchen, das sich in einem Auffanggefäß befand, gegeben, bei 14.000 xg 1 min zentrifugiert, das Auffanggefäß entleert und der Vorgang so lange wiederholt, bis die Lösung aufgebraucht war.

Die im Filter verbliebene Matrix mit der gebundenen DNA wurde durch Zugabe von 500 µl *SEWS-M* mit der Pipettenspitze und der Kraft des Flüssigkeitsstrahls gelöst und 1 min bei 14.000 xg zentrifugiert. Nach Entleeren des Auffanggefäßes wurde die Probe ohne Flüssigkeitszugabe 2 min bei 14.000 xg zentrifugiert, um letzte Flüssigkeitsreste zu entfernen, das Säulchen in ein neues Auffanggefäß gegeben und 5 min bei Raumtemperatur getrocknet. Nun wurde die DNA im Spin Filter mit 75 µl DNase freiem Wasser (DES) suspendiert und gevortext, danach die Probe 5 min bei 55 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 14.000 xg befand sich im Sammelgefäß das DNA-Isolat.

Die so gewonnene DNA wurde in zwei 1,5 ml DNA lo bind Gefäße (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) aliquotiert, Charge 1 mit 30 µl für die PCR genutzt und der verbleibende Rest als Charge 2 für die Langzeitaufbewahrung bei -80 °C gelagert.

### 2.2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung mittels Picogreen

Mit Picogreen wurden die DNA-Konzentrationen und PCR-Produkt-Konzentrationen gemessen. Der verwendete Kit war *Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit* (LifeTechnologies, Darmstadt). Alle Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt und die Proben auf 96 Well PCR Plates Standards (Peqlab, Erlangen) gemessen.

Pro Platte wurden acht Standards (Lambda DNA standard, 100 µg/mL in TE-Puffer), eine Negativkontrolle ohne DNA-Extrakt und 39 Proben gemessen. Eine Standardreihe von 8 Standards (ST) mit folgenden DNA-Konzentrationen in ng/µl wurde in 2 ml Mikrozentrifugenröhrchen (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) erstellt: 0; 7,18; 15,63; 31,25; 62,5; 125; 250; 500. Je 125 µl Standard wurden in die vorgesehenen Wells pipettiert, in jedes Probenwell dagegen

124  $\mu\text{l}$  1 x TE-Puffer (Stammlösung 100 x TE [1 M] Tris-HCl; pH 8.0; 0.1 M EDTA, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und 1  $\mu\text{l}$  DNA-Extrakt. Die verdünnte Picogreen-Lösung für eine Platte wurde aus 66  $\mu\text{l}$  Picogreen und 13,13 ml 1 x TE im Dunkeln angesetzt, da der Farbstoff lichtempfindlich ist. Danach wurden in jede Vertiefung 125  $\mu\text{l}$  verdünnte Picogreen-Lösung gegeben, mit einer Alufolie abgedeckt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Messung mit dem Plattenlesegerät *SpectraMax Fluorescence Microplate Reader* (Molecular Devices) und dem Programm SoftMaxPro stattfand. Somit lag jede Probe in einer Verdünnung von  $\frac{1}{250}$  vor. Folgende Einstellungen wurden verwendet: Picogreen Fluoreszenz, Wellenlänge 488 Exzitation, 520 Emission, kein *Auto cut off*, Sensitivität 30 (= *max*), mittlere MT Sensitivität, 10 sec *Automix*, keine Auto-Kalibrierung *Run Haven*, Assay Platte Typ 96-Wells *Standard opaque*, gesamte Platte zu lesen, kein *Auto Read*.

Das Programm SoftMaxPro errechnete die Werte in  $\frac{1}{250}$  Verdünnung, sodass mit 250 multipliziert werden musste, um die Konzentration in ng/ $\mu\text{l}$  zu erhalten.

### 2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur Amplifikation des bakterienspezifischen 16S rRNA-Gen-Fragments

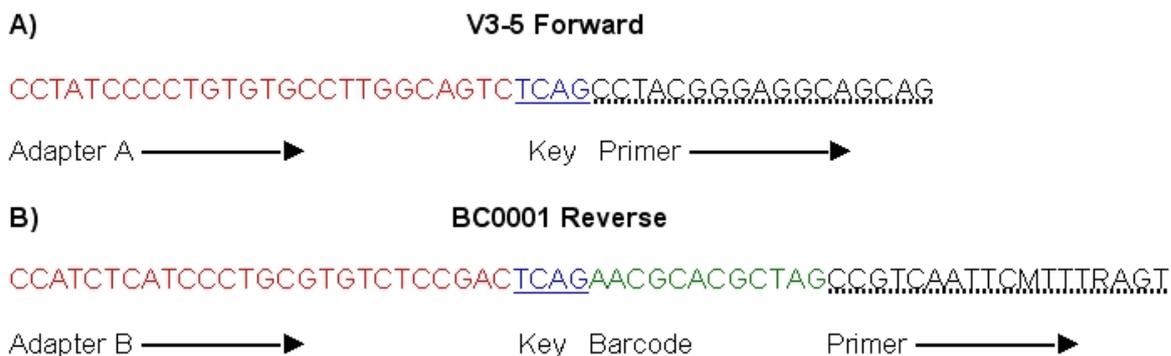
Die PCR diente als Verfahren, die variablen Regionen V3-V5 des 16S rRNA-Gens zu amplifizieren. Alle Schritte bei der PCR wurden selbstständig ausgeführt.

Das Amplifikat wurde mit dem *V3-5 Forward* Primer und dem *BCOXXX Reverse* Primer erzeugt (Abbildung 6) und hatte eine Länge von 586 Basen. Es wurde für jede Probe derselbe *V3-5 Forward* Primer verwendet, der *BCOXXX Reverse* Primer beinhaltete im Gegensatz dazu eine probenspezifische Barcodesequenz/multiplex identifier (MID) zur Identifikation der Proben. So wurde jedem Studienkind für Matratzenstaub- und die korrespondierende Nasenabstrichprobe eine Barcodesequenz zugeteilt. Die Primer bestehen aus folgenden Bereichen:

1. Die Adaptersequenz: Adapter A bei *Forward Primer 357F* zur Anlagerung der Amplifikationsprimer bei der *emPCR*, Adapter B bei *Reverse Primer 926R* zur Bindung an den Sequenzierprimer; in beiden Fällen ist zusätzlich ein *Key* vorhanden, der essentiell für die Sequenzierung des Amplikons ist.
2. Der probenspezifische 12 Basen lange Barcode, der bei der Auswertung für die Identifikation der Probe notwendig und nur beim *reverse Primer* vorhanden ist.
3. Der für die zu amplifizierende Region spezifische Primerabschnitt. Er bindet an eine konservierte Region im 16S rRNA-Gen im bakteriellen Genom.

Die Barcodes aller verwendeten Primer sind in den Tabellen E4 und E5 (in Kapitel 6) aufgelistet.

Es wurden 3 PCR Ansätze pro Probe mit einem Volumen von 25  $\mu\text{l}$  angesetzt. Für Matratzenstaub wurde 1  $\mu\text{l}$  DNA als Template eingesetzt, bei Nasenabstrichen 5  $\mu\text{l}$ . Bei einer geringen Menge an spezifischem PCR-Produkt, beurteilt über die Gelfotos nach der Stärke des amplifizierten spezifischen Produkts, wurde der Einsatz auf 3  $\mu\text{l}$  Matratzenstaub-DNA erhöht. Die PCR-Läufe wurden in 0,2 ml PCR-Gefäßen (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) bzw. 96-Wells-Platten (Biorad, München) durchgeführt.



**Abbildung 6:** Darstellung der verwendeten Primer: A) *V3-5 Forward* Primer, der für jede Probe die gleiche Sequenz besitzt; B) beispielhaft der *BC0001 Reverse* Primer, der zusätzlich eine probenspezifische Barcode-Sequenz enthält, um die einzelnen Proben voneinander unterscheiden zu können. Die Reverse Primer wurden mit BC0XXX bezeichnet (XXX: von 001-119 durchnummeriert).

Die verwendeten Primer (Eurofins, Ebersberg) hatten High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Reinheitsgrad. Jedem Probenkind wurde für Matratzenstaub und Nasenabstrich derselbe *Reverse Primer 926R* zugeordnet. Um eine Verunreinigung der Primer zu erkennen, wurde sowohl für jede Matratzenstaub- als auch Nasenabstrichprobe eine Negativkontrolle mit sterilem Wasser als Template und dem jeweiligen Primer angesetzt. Bei positivem Ergebnis in der Gelelektrophorese wurde das amplifizierte PCR-Produkt verworfen und die Probe erneut amplifiziert.

Die Reaktion wurde unter der UV-AirClean Workstation- Model GL UV/WL, UV-245nm (LTF Labortechnik, Wasserburg) angesetzt, die zuvor mit DNA-Exitus plus (Applichem, Darmstadt) gesäubert und 20 min mit UV-Licht bestrahlt worden war. Dabei wurden die Pipetten in der Arbeitsbank mitbestrahlt. Die Pipettenspitzen, die 0,2 ml PCR-Gefäße (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) bzw. 96-Well-Platten (Biorad, München), das sterile 50 ml Schraubgefäß für den Mastermix, das sterile Wasser (Roth, Karlsruhe), der Puffer, das Betain (Betaine solution, 5M, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und das albumin from bovine serum low endotoxin (BSA) ( $10 \frac{mg}{ml}$ ), Sigma-Aldrich, Taufkirchen) für die Reaktion wurden in der CL-1000 ultraviolet Crosslinker Box (UVP, Wasserburg) 20 min mit UV-Licht bestrahlt.

Bovine serum albumin (BSA) und Betain sind zwei Zusätze, die häufig zur Optimierung der PCR eingesetzt werden. Betain führt in GC-reichen Regionen zu einer Reduzierung der Sekundärstruktur, sodass eine Anlagerung der Primer leichter möglich ist (Rees et al., 1993). BSA wird besonders bei Proben mit niedrigem Reinheitsgrad verwendet, was auf die verwendeten Proben zutrif. Es wird angenommen, dass es die Taq-DNA-Polymerase stabilisiert (Jordan et al., 1992) und mit Substanzen interferiert, die durch die bakterielle Zelllyse bei der DNA-Extraktion entstanden sind und die PCR stören können (Nagai et al., 1998). Für die Reaktion wurde FastStart High Fidelity PCR System dNTP Pack (Roche, Mannheim) verwendet. Zunächst wurde ein Mastermix erstellt. Um für jede Probe eines PCR-Laufs dieselben Bedingungen zu schaffen, wurden die Angaben für eine PCR-Reaktion mit der Anzahl der PCR-Reaktionen multipliziert und 10 % zusätzlich für eventuelle Pipettierungenauigkeiten

hergestellt. Pro Probe benötigte man:

- V3-5 Forward Primer [5M]: 2  $\mu$ l
- High Fidelity dNTP-Pack [10mM]: 0,5  $\mu$ l
- FastStart 10 x Buffer [1,8 mM] mit zugesetztem  $Mg^{2+}$ : 2,5  $\mu$ l
- Steriles Wasser (Roth, Karlsruhe): 15,75  $\mu$ l für Matratzenstaubproben bzw. 13,75  $\mu$ l für Nasenabstrichproben; bei Zugabe von 6,5  $\mu$ l Betain und/oder 1  $\mu$ l BSA wurde das sterile Wasser um das entsprechende Volumen reduziert.
- Fast Start HiFi Polymerase [5 U/ $\mu$ l]: 0,25  $\mu$ l

Pro PCR wurden für eine Matratzenstaub-DNA-PCR 22  $\mu$ l und für eine Nasenabstrich-DNA-PCR 20  $\mu$ l Mastermix pipetiert, danach der probenspezifische Primer und zum Schluss die DNA als Template.

Für jeden Lauf wurde außerdem eine Positivkontrolle mit einer  $\frac{1}{100}$ -Verdünnung eines amplifizierten Fragments des E. coli 16S rRNA-Gens erzeugt. Für Reaktionen in 0,2 ml PCR-Gefäßen wurde nach jedem Pipettierschritt gevortext und danach kurz mit der Mikrozentrifuge Micro Star 17 (VWR, Darmstadt) zentrifugiert. Bei Verwendung von 96-Well-Platten wurden diese nach den Pipettierschritten mit Adhesive PCR Foil Seal (Peqlab, Erlangen) zugeklebt, kurz mit einer Plattenzentrifuge PerfectSpin P (Peqlab, Erlangen) zentrifugiert und in den *Professional Basic Thermocycler* (Biometra, Göttingen) gestellt. Die Einstellungen für den Thermocycler waren:

**Tabelle 2:** Einstellungen zur Herstellung der DNA-Bibliothek

	Schritt	Zeit in sec	Temperatur in °C
	1	120	95
Zyklus	2	20	94
	3	30	50
	4	300	72
	5	Pause	12
Matratzenstaub: Zyklus 28 x			
Nasenabstriche: Zyklus 35 x			

## 2.4 Gelelektrophorese zur Visualisierung der PCR-Produkte

Um die PCR-Produkte sichtbar zu machen, wurden sie nach der PCR und nach den Aufreinigungsschritten auf ein selbstständig hergestelltes 1 %iges Agarosegel aufgetragen.

Zur Herstellung wurden 100 ml 1x *TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer*, hergestellt aus 50x *TAE-Buffer* (Roth, Karlsruhe) und Wasser, sowie 1 g *PeqGold Universal Agarose* (Peqlab, Erlangen) verrührt und 2 min bei 600 Watt in einer Mikrowelle erhitzt. Nach 1,5 min Abkühlen wurden 5  $\mu$ l Ethidiumbromid [ $10\frac{mg}{ml}$ ] (life technologies, Darmstadt) zugegeben und durch Schwenken vermischt. Dann wurde das Gel in eine Gelkammer mit Probenstaschenkamm (VWR,

Darmstadt) gegossen und 1 h ausgehärtet. Nach Entfernung des Kammes wurden, sofern nicht anders angegeben, zum Laden des Gels pro Proben- und Negativkontrollen-Geltasche 2  $\mu$ l *Gel Loading Dye* (New England Biolabs (NEB), Frankfurt), 3  $\mu$ l Probe und 7  $\mu$ l Wasser verwendet. Bei der Positivkontrolle wurde nur 1  $\mu$ l Amplicon verwendet, dafür 9  $\mu$ l Wasser. Um eine Verunreinigung des Wassers auszuschließen, wurde auch immer eine Probe mit 2  $\mu$ l *Gel loading Dye* und 10  $\mu$ l Wasser und außerdem die *DNA-Ladder 100 bp* (New England Biolabs, Frankfurt) zur Beurteilung der Länge und Reinheit des amplifizierten Fragments aufgetragen. Diese war laut Herstellerangaben geeignet für 100-1.517 bp. Die DNA-Ladder erzeugte Banden bei 100, 200, 300, 400, 500, 517, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.200 und 1.517 bp. Zur Orientierung verfügten die Banden bei 500, 517 und 1.000 bp über eine erhöhte Intensität. Die Elektrophorese lief 55-60 min bei einer Spannung von 100 V.

## 2.5 Aufreinigung der PCR-Produkte

### 2.5.1 Agencourt AMPure XP beads

Für die selbstständig durchgeführte Aufreinigung wurden Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, Krefeld) verwendet. Zunächst wurden die drei PCR-Ansätze in 1,5 ml DNA lo bind Gefäße (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) vereinigt, das Volumen betrug 70  $\mu$ l. Währenddessen wurden alle Agenzien mit Ausnahme der Agencourt AMPure XP beads 20 min in der CL-1000 ultraviolet Crosslinker Box (UVP, Wasserburg) bestrahlt, ebenso die Pipettenspitzen und Pipetten. Nach Äquilibrieren auf Raumtemperatur wurden diese stets im Verhältnis  $\frac{AMPureXPbeads}{Amplicon} = \frac{0,7}{1}$  zugegeben, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und 5 min in den DynaMag-2 Magnet (12321D) Magnetic Particle Collector (MCP) (life technologies, Darmstadt) gestellt. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Nach Zugabe von 200  $\mu$ l frisch hergestelltem 70 % Ethanol aus sterilem Wasser (Roth, Karlsruhe) und Ethanol absolute (Applichem, Darmstadt), wurden die DNA lo bind Gefäße im MPC für 1 min inkubiert. Danach wurde der Überstand erneut abpipettiert und verworfen. Dieser Waschschritt mit Ethanol wurde wiederholt und die Gefäße 3 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 50  $\mu$ l 1 x TE-Puffer (Stammlösung 100 x TE [1 M Tris-HCl; pH 8.0; 0.1 M EDTA, Sigma-Aldrich]) zu jeder Probe, wurden die Gefäße 5 sec gevortext und 2 min im MCP bei Raumtemperatur inkubiert.

Im letzten Schritt wurde der Überstand in ein 1,5 ml DNA lo bind Gefäß (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) überführt. Die so gewonnenen aufgereinigten Amplicons wurden bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

### 2.5.2 QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen

#### 2.5.2.1 QIAquick PCR Purification Kit für die Aufreinigung von PCR Produkten

Ein Teil der PCR-Produkte von Nasenabstrichproben wurde zusätzlich zur Aufreinigung mit Agencourt AMPure XP beads mit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach den Herstellerangaben von Qiagen aufgereinigt und das gewonnene PCR-Produkt in 20  $\mu$ l 1 x TE-Puffer (Stammlösung 100 x TE 1 M Tris-HCl; pH 8.0; 0.1 M EDTA, Sigma-Aldrich,

Taufkirchen) eluiert.

### 2.5.2.2 Verwendung QIAquick Gel Extraction Kit für das Ausschneiden von PCR-Produkten aus einem Agarosegel

Einige ausgewählte Nasenabstrich-PCR-Produkte wurden auf 1 %iges Agarosegel aufgetragen (Herstellung Kapitel 2.4) und die PCR-Produkte in einer Gelkammer für 70 min bei 100 V aufgetrennt. Das spezifische Produkt wurde mit UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem Messer ausgeschnitten. Mittels QG Puffer (Masseverhältnis 1:3) wurde das PCR-Produkt nach Herstellerangaben aus dem Gel gelöst. Danach erfolgte eine erneute Aufreinigung mit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden).

## 2.6 Qualitätskontrolle der PCR Produkte mittels Agilent 2100 Bioanalyzer

Die Messungen wurden selbstständig mit dem DNA 7500 Kit und 2100 Bioanalyzer (Agilent, Waldbronn) nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach Verteilung des Gel-Dye-Mix (Agilent, Waldbronn; Herstellung laut Protokoll) auf dem gesamten Chip konnten pro Lauf max. 12 Proben (jeweils 1 µl) in die dafür vorgesehenen Vertiefungen gegeben und gelelektrophoretisch aufgetrennt werden. Bei jedem Lauf wurde als qualitative und quantitative Kontrolle eine „Ladder“ mit aufgetragen. Durch den im Gel vorhandenen Fluoreszenzfarbstoff wurden die Proben analysiert und die Ergebnisse in gelartige Bilder (Banden) und Elektropherogramme mit Spitzen (Peaks) im Sinne einer DNA-Detektion bei einer bestimmten Fragmentlänge übersetzt. Durch den Einsatz eines Lasers wurden DNA-Konzentrationen ab 0,1 ng/µl erfasst. Der verwendete Kit DNA 7500 konnte Fragmentlängen von 100 bis 7.500 bp analysieren. So konnten besonders auch kleine DNA-Fragmente wie Primerdimere (kurze Fragmente, bestehend aus Adapter A bzw. B, key-Sequenz, Barcode und eigentlichem Primer, wobei zwei Primer durch Bindung der Adaptoren dimerisieren (454 Sequencing System Guidelines, 2011)) analysiert werden (Agilent 2100 Bioanalyzer).

## 2.7 454-Pyrosequenzierung

Für die 454-Pyrosequenzierung von bakterieller DNA aus Matratzenstaub und Nasenabstrichen stand ein GS FLX+ / XLR70 Titanium Instrument (Roche, Mannheim) zur Verfügung. Nach Erstellung der DNA-Bibliothek (Gesamtheit aller in einer Probe vorhandenen und amplifizierten 16S rRNA-Genabschnitte der bakteriellen DNA) wurden die Proben laut Herstelleranleitungen präpariert (*emPCR* Amplification Method Manual Lib L LV, Mai 2011; Amplicon Library Preparation Manual, Juni 2013; 454 Sequencing System Guidelines, 2011; Sequencing Method Manual for the GS FLX+ Instrument, Juni 2013). Dies geschah mit freundlicher Unterstützung und unter Anleitung von Susanne Kublik und Dr. Marion Engel, Arbeitsgruppe Egen und wurde am Helmholtz Zentrum München Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH) Research Unit Environmental Genomics Ingolstädter Landstr. 1 85764 Neuherberg durchgeführt.

### 2.7.1 Herstellung der äquimolaren Pools

Für jede Platte wurde ein Pool, bestehend aus verschiedenen Proben, hergestellt. Um sicherzustellen, dass für jede Probe theoretisch die gleiche Anzahl an 16S rRNA-Gen-Fragmenten sequenziert werden konnte, wurde der gleiche molare Einsatz für jede Probe gewählt. So wurde nach Errechnung der Konzentration jeder Probe berechnet, welches Volumen eingesetzt werden musste, um dieselbe Anzahl an 16S rRNA-Gen-Fragmenten (entspricht der gleichen Molekülzahl) zu erzielen. Für Matratzenstaub- und Nasenabstrichproben wurden noch je vier Negativ-Kontrollen (=NPCR) bei der PCR und je zwei Negativ-Kontrollen der DNA-Extraktion (=NER) in die Pools gegeben.

Ebenso von Bedeutung war die Anzahl der Proben pro Pool und Platte. Je mehr Proben auf einer Platte sequenziert wurden, desto weniger Sequenzen konnten theoretisch pro Probe gewonnen werden.

Besonders aus diesem Grund wurde im Vorfeld eine Testsequenzierung zur Abschätzung der benötigten Plattenanzahl durchgeführt. Für die Testplatte wurden die 8 verwendeten Proben auf  $10^9 \frac{\text{Moleküle}}{\mu\text{l}}$  verdünnt und ein Pool mit  $10^9 \frac{\text{mol}}{\mu\text{l}}$  erstellt.

Für die fünf Pools der eigentlichen Analyse von Matratzenstaub- und Nasenabstrichproben erfolgte eine zufällige Verteilung der Matratzenstaubproben auf Pool eins bis drei und der Nasenabstrichproben auf Pool vier und fünf (Tabelle 3).

Zunächst wurde für jede Probe die Amplikon-Konzentration in  $\frac{\text{Moleküle}}{\mu\text{l}}$  berechnet:

**Tabelle 3:** Erstellung der Pools für Platte 1-5

Pool Nr.	1	2	3	4	5
Probentyp	Matratzenstaub	Matratzenstaub	Matratzenstaub	Nasenabstrich	Nasenabstrich
Gesamtanzahl Proben	40	38	40	56	57
davon GABRIELA	37	36	39	53	54
davon NPCR	1	2	1	3	1
davon NER	2	0	0	0	2

$$\frac{\text{Moleküle}}{\mu\text{l}} = \frac{\text{Probenkonzentration}[\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}] \cdot 6,022 \cdot 10^{23}}{656,6 \cdot 10^9 \cdot 586\text{bp}^*}; \text{ * Amplikonlänge.}$$

Nun wurde von jeder Probe das Volumen ( $V_P$ ) berechnet, das eine Molekülzahl von  $10^{11}$  für Matratzenstaub bzw.  $10^{10}$  für Nasenabstrichproben beinhaltet:

$$V_P = \frac{10^x}{\frac{\text{Moleküle}}{\mu\text{l}}}; x = 11 \text{ für Matratzenstaub und } x = 10 \text{ für Nasenabstrichproben.}$$

Die berechneten Volumina wurden zu einem Pool zusammenpipettiert. Für NPCR bzw. NER wurden standardisiert 4  $\mu\text{l}$  unverdünnte Negativkontrollen eingesetzt (theoretisch enthielten die Negativkontrollen keine Amplikons). Die Anzahl der Moleküle pro  $\mu\text{l}$  des Pools wurde wie folgt ermittelt:  $\frac{10^x \cdot n}{V}$ ;  $x = 11$  für Matratzenstaub- und  $x = 10$  für Nasenabstrichproben;  $n$ =Anzahl der Proben ohne NPC und NER; NPC und NER enthalten theoretisch keine Moleküle;  $V$ =Gesamtvolumen des Pools in  $\mu\text{l}$  mit MDNPCR und MDNER, da diese den Pool quasi verdünnen.

Dieser so erstellte Pool wurde aliquotiert und in 1,5 ml DNA lo bind Gefäßen (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) bei -20 °C bis zur Weiterverwendung eingefroren.

### 2.7.2 *emPCR*

Für jede *emPCR* wurde die gewünschte Verdünnung frisch erstellt, da die Stabilität des Pools mit sinkender Molekülanzahl pro  $\mu\text{l}$  abnimmt.

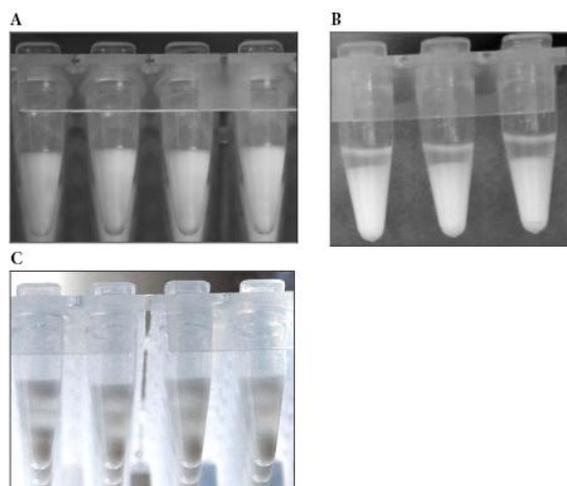
Der Einsatz wurde im Verhältnis zur eingesetzten Menge an *DNA capture beads* angegeben und für jeden Pool neu berechnet. Zur Ermittlung des optimalen DNA-Einsatzes wurde eine *emPCR* mit *Small Volume (SV) emulsion oil* angesetzt und die DNA-Menge bestimmt, die beim *emulsion Breaking (emBreaking)* ein *enrichment* (Menge der *DNA capture beads* in %, die nach Reinigungs- und Waschschritten von der ursprünglichen Menge gewonnen werden kann) im Zielbereich von 5-20 % erreichte. Bei 5 % ist zusätzlich ein geringer Anteil an DNA-negativen Beads, bei 20 % zusätzlich ein geringer Anteil an polyklonalen Beads enthalten. Bei einer Anreicherung von 8 % geht man von einem optimalen  $\frac{\text{DNA}}{\text{Bead}}$ -Verhältnis aus. Wurde diese Konzentration erreicht, konnte die *emPCR* mit *Large Volume Emulsion Oil (=LV)* erfolgen.

Die *emPCR* wurde nach den Vorgaben des FLX long amplicon Lib A Protokoll (Technical Bulletin (454 Sequencing System Guidelines, 2011)) durchgeführt, der verwendete Kit war *GS FLX Titanium SV/LV emPCR Kit (Lib-L)* (Roche, Mannheim), alle verwendeten Gefäße waren 1,5 und 2 ml DNA lo bind Gefäße (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf). Für die *emPCR* wurde zunächst, wie bei einer konventionellen PCR, ein aus der DNA-Bibliothek, den dNTPs, den Enzymen, den Primern, der Polymerase und den Beads bestehender Reaktionsmix erstellt, dieser zu einer thermostabilen Wasser-Öl Emulsion gegeben und in dem Tissue Lyser II (Qiagen, Hilden) bei einer bestimmten Frequenz geschüttelt. Auf diese Weise entstehen  $10^6$  einzelne Mikroreaktoren pro ml, die im Idealfall exakt ein Bead, ein DNA-Fragment und einen entsprechenden Anteil an Reaktionsmix enthalten. Die Emulsion wurde auf einer 96-Well PCR-Platte (Biorad, München) mit 100  $\mu\text{l}$  pro Well dispensiert und die Bead-gebundenen DNA-Fragmente klonal vervielfältigt, so dass nach der PCR Millionen derselben Fragmente an ein und dem selben Bead gebunden waren. Die Emulsion wurde nach dem PCR-Lauf (Tabelle 4) binnen 6 h weiterverarbeitet (erlaubte Zeit ohne Qualitätsverlust: 16 h). Der Ampliconeinsatz betrug bei der Testplatte 1 und  $1\frac{1}{3}$  *copy per bead* (Verhältnis Anzahl der Amplicons zu Anzahl der Kügelchen im Emulsion Oil), bei den Matratzenstaubproben 1 *copy per bead*, bei den Nasenabstrichen 0,5 *copy per bead*. Bevor mit dem *emBreaking* begonnen werden

**Tabelle 4:** Thermocycler-Einstellungen für die *emPCR*

Schritt	Zeit in sec	Temperatur in °C	Anzahl an Läufen
1	240	94	1 x
2	30	94	50 Zyklen Schritt 2 und 3
3	600	60	
4	Bis zum Emulsion Breaking	10	1 x

konnte, wurde das *emPCR*-Produkt auf Qualität geprüft (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Beurteilung der *emPCR*: Eine intakte Emulsion ist entweder A) homogen oder zeigt B) eine milchige Phase, auf der sich eine klare Phase befindet. Ist die Emulsion dagegen wie in C) gebrochen, kann sie nicht verwendet werden (454 Sequencing System Guidelines, 2011; Roche Diagnostics GmbH, 2010).

### 2.7.3 Emulsion Breaking

Das *Emulsion Breaking* wurde nach Herstellerangaben (Roche, Mannheim) durchgeführt. Die verwendeten Kits waren: *GS FLX Titanium emPCR Breaking Kit SV* und *LV*.

Es setzt sich im Wesentlichen aus *Bead-recovery* und *enrichment* zusammen.

Bei der *Bead-Recovery* wurden die Beads mehreren Waschschrinen unterzogen, um sie vom *Emulsion-Oil* zu lösen. Mittels Isopropanol wurden die Beads gereinigt und die DNA-positiven von den DNA-negativen Beads getrennt. Dazu wurden Biotin-markierte Anreicherungsprimer verwendet, die einerseits DNA-gebundene Beads und andererseits an Streptavidin ummantelte Magnetbeads binden.

Beim *enrichment* wurden die sequenztragenden *enrichment beads* angereichert. Unter Verwendung eines DynaMag-2 Magnet (12321D) Magnetic Particle Collector (MCP) (life technologies, Darmstadt) wurden die an Magnet-Beads haftenden DNA-Beads an der Wandung des Magneten durch Pelletierung gewonnen und die DNA-negativen Beads gleichzeitig aus der Lösung herausgewaschen.

Zur Berechnung des *enrichment* wurden die hierfür vorgesehenen Gefäße zunächst leer gewogen, danach im mit *enrichment beads* gefüllten Zustand. Zuvor wurden 3 µl des Volumens entnommen, um die Beads für 3 µl an einem Coulter Counter Multisizer (Beckman Coulter) zu zählen. Zur Berechnung der Ausbeute an DNA-Beads wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Bead-Anreicherung [100\%]} = \left( \frac{\text{Anzahl der angereicherten DNA-tragenden Beads}}{35 \cdot 10^6 \frac{\text{Beads}}{\text{Gefäß}}} \right) \cdot 100$$

### 2.7.4 Sequenzierlauf

Die Vorbereitungen der PTP und des GS FLX+ Instruments sowie das Beladen der PTP erfolgten nach Herstellerangaben. Der verwendete Kit war GS FLX Titanium PicoTiterPlate Kit

70x75 (Roche, Mannheim). Der Testpool wurde auf eine Viertel PTP, jeder Matratzenstaub- und Nasenabstrichpool auf eine eigene PTP aufgetragen.

## 2.8 Datenverarbeitung und statistische Auswertung

Die Rohdaten wurden zunächst mit der Roche 454 Datenprozessierungspipeline v2.8 für shotgun Sequenzen prozessiert. Das *Denoising*, ein Algorithmus zur Entfernung fehlerhafter Sequenzen, und die Entfernung von Chimären wurden mit Ampliconnoise durchgeführt (Quince et al., 2011). Die verbleibenden Sequenzen wurden in OTUs geclustert, indem Sequenzen mit 97 % Ähnlichkeit mit *UCLUST* (Edgar, 2010) einer OTU zugeteilt wurden. Dabei wurde die *de-novo picking* Methode (eine Clusterung, die unabhängig von externen Referenzdatenbanken geschieht (QIIME developing team, 2015)) der Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) version 1.8. (Caporaso et al., 2010) verwendet.

Um die Sequenzen taxonomisch zuzuordnen, wurden die repräsentativen Sequenzen aller OTUs gegen die *SILVA* Datenbank Version 111 *aligned* (abgeglichen). OTUs, die Chloroplasten-DNA zugeordnet werden konnten, wurden, ebenso wie Proben mit < 1000 Sequenzen (Tabelle 5), von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Um die Proben inter- und intraindividuell

**Tabelle 5:** Anzahl der Studienkinder im Verlauf der Untersuchung

Probenmaterial	Nasenabstriche	Matratzenstaub
Anzahl an Studienkindern	119	119
Anzahl an nicht sequenzierten Proben (Ursache)	9 (Probenqualität ungenügend, beurteilt mit 2100 Bioanalyzer)	7 (Staubmenge < 30 mg)
Proben mit < 1000 Sequenzen	14	2
Fehler beim <i>Denoising</i>	1	
vergleichbare Anzahl an Proben	86	86

vergleichen zu können, wurden sie auf die Minimalzahl an Sequenzen pro Probe (n=1.254) rarefiziert und für alle Analysen, sofern nicht anders angegeben, die rarefizierte Stichprobe verwendet. Dies bedeutet, dass ein Subsample von reads in jeder Probe gezogen wurde, um mit der gleichen Anzahl von reads in jeder Probe zu operieren. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Analysen in dieser rarefizierten Stichprobe durchgeführt.

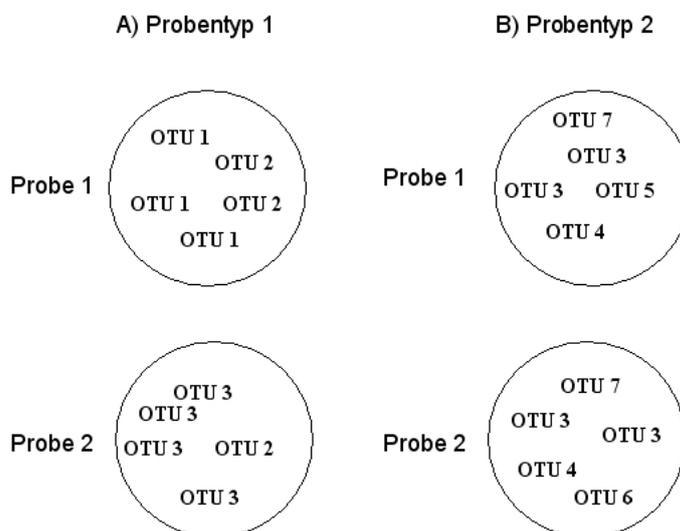
Die gesamte Datenprozessierung und die statistischen Analyseverfahren der Testplatte wurden in Rücksprache und mit freundlicher Unterstützung von Dr. rer. nat. Antje Legatzki, Dr. von Haunersches Kinderspital, Ludwig-Maximilians-Universität München, Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Dr. h.c. Erika von Mutius, mit der QIIME version 1.8. (Caporaso et al., 2010) durchgeführt. Die statistischen Analyseverfahren der fünf Platten mit den eigentlichen Nasenabstrich- und Matratzenstaubproben wurden in Rücksprache und mit freundlicher Unterstützung von Dr. rer. biol. hum. Martin Depner, Dr. von Haunersches Kinderspital, Ludwig-Maximilians-Universität München, Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Dr. h.c. Erika von Mutius, durchgeführt. Die Abläufe wurden gemeinsam geplant, besprochen und ausgearbeitet. Die Interpretation der Daten erfolgte eigenständig.

Um einzelne OTUs genauer charakterisieren zu können, wurden sie mit den Datenbankeinträgen der BLAST NCBI-Datenbank verglichen.

Die  $\alpha$ -Diversität ist ein Maß für die Diversität innerhalb eines Probentyps, d. h. die Vielfalt der Spezies in einem bestimmten Umfeld (Fisher et al., 1943; Whittaker, 1972). Zur Beurteilung dienen die (*species*) richness (Anzahl an beobachteten OTUs) (Whittaker, 1972; Whittaker, 1965), der *Shannon-Index*, der nicht nur die Anzahl, sondern auch die Proportionen der verschiedenen OTUs berücksichtigt (Shannon et al., 1963) und die (*Pielou's*) evenness. Die evenness ist ein Maß für die Biodiversität. Ein Wert nahe bei 0 bedeutet, dass die in einem System vorkommenden Arten in sehr unterschiedlicher Anzahl vorkommen, ein Wert nahe bei 1, dass die Arten gleichverteilt sind (Mulder, 2004). Die  $\alpha$ -Diversität wurde mit dem *R package vegan* ermittelt (Oksanen und O'Hara, 2013).

Die  $\beta$ -Diversität beschreibt, wie groß die interindividuellen Unterschiede zwischen den Proben in einem Probentyp sind (Whittaker, 1972). Die  $\beta$ -Diversität wurde mit *weighted* und *unweighted UniFrac* analysiert (Lozupone et al., 2011) und mit *Nonmetric MultiDimensional Scaling (NMDS)* (Minchin, 1987) unter Verwendung von *R package phyloseq* dargestellt (McMurdie, 2013). *UniFrac* misst den phylogenetischen Abstand zwischen den Taxa einer Probe im phylogenetischen Baum als der Teil der Baumastlänge, der zu den Abkömmlingen eines der beiden betrachteten Lebensräume führt. Hier wurde es genutzt, um bakterielle Gemeinschaften auf signifikante Unterschiede zu untersuchen und um die Ähnlichkeit der einzelnen Proben eines Probentyps (Matratzenstaub oder Nasenabstrich) untereinander und gleichzeitig die beiden Probentypen miteinander zu vergleichen (Lozupone und Knight, 2005).

Zur Verdeutlichung ist in Abbildung 8 eine schematische Darstellung zum Vergleich zweier Probentypen dargestellt.



**Abbildung 8:** Vereinfachtes Schema zum besseren Verständnis der Bedeutung der  $\alpha$ -Diversität und  $\beta$ -Diversität. Für A) Probentyp 1 und B) Probentyp 2 sind jeweils zwei Proben mit 5 OTUs dargestellt.

Probentyp 2 weist eine höhere  $\alpha$ -Diversität auf als Probentyp 1, da Probentyp 2 jeweils vier verschiedene OTUs in den Proben 1 und 2 aufweist. Im Gegensatz dazu weist Probentyp 1 in beiden Proben nur zwei verschiedene OTUs auf, die sehr ungleich verteilt sind. Die *richness* und die *evenness* sind daher in Probentyp 2 höher. Probentyp 1 weist eine höhere  $\beta$ -Diversität auf als Probentyp 2, da Probe 1 und 2 nur in einer OTU übereinstimmen. Im Gegensatz dazu stimmen in Probentyp 2 die Proben 1 und 2 in vier OTUs überein.

Um Unterschiede hinsichtlich der Diversität zwischen der Bauernhof- und Referenzgruppe sowie der Asthma- und Kontrollgruppe zu bestimmen, wurden *gewichtete* Tests, d. h. für das Design adjustierte Wilcoxon-Tests oder t-Tests, verwendet. *Gewichtete Regressions Modelle* dienten zur Bestimmung von Unterschieden in Bezug auf die relative Häufigkeit von Phyla, Genera und OTUs zwischen Bauernhof- und Referenzgruppe sowie Asthma- und Kontrollgruppe. Für alle Assoziationen wurden lineare und logistische Regressionsmodelle berechnet und die lineare Regression als Standardmodell verwendet. Die lineare Regression testete die OTUs als abhängige Variable von Bauernhofkind und Referenzkind bzw. Asthmatiker und Kontrolle.

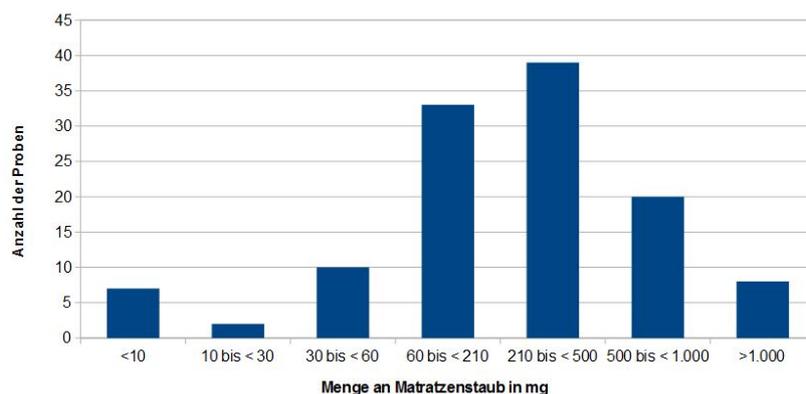
Ein p-Wert von  $p \leq 0,05$  wurde als signifikant angenommen. Als *häufige Taxa* wurden Phyla, Genera und OTUs mit einer relativen Häufigkeit von  $> 1\%$  in der Probe eingestuft und als *selten*, wenn sie zu  $\leq 1\%$  repräsentiert waren. Die seltenen Genera und OTUs wurden bei den Analysen als *Gesamtvariable seltene Genera* bzw. *seltene OTUs* zusammengefasst.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Methodische Vorergebnisse: Optimierung der DNA-Bibliothek

#### 3.1.1 Auswahl des DNA-Extraktionskits für Matratzenstaub

Die Matratzenstaubmenge sollte bei der DNA-Extraktion so gering wie möglich gehalten werden, da sie pro Studienkind stark variierte (Abbildung 9) und möglichst viele Proben analysiert werden sollten.



**Abbildung 9:** Häufigkeitsverteilung der Menge an Matratzenstaub aller abgewogenen Proben (n=119)

Des Weiteren erwies sich die DNA-Extraktion mit 100 mg Staub als schwierig, da das Probenmaterial inklusive Reagenzien nur knapp in die vorgesehenen Gefäße passte. Effizientes Schütteln war kaum möglich.

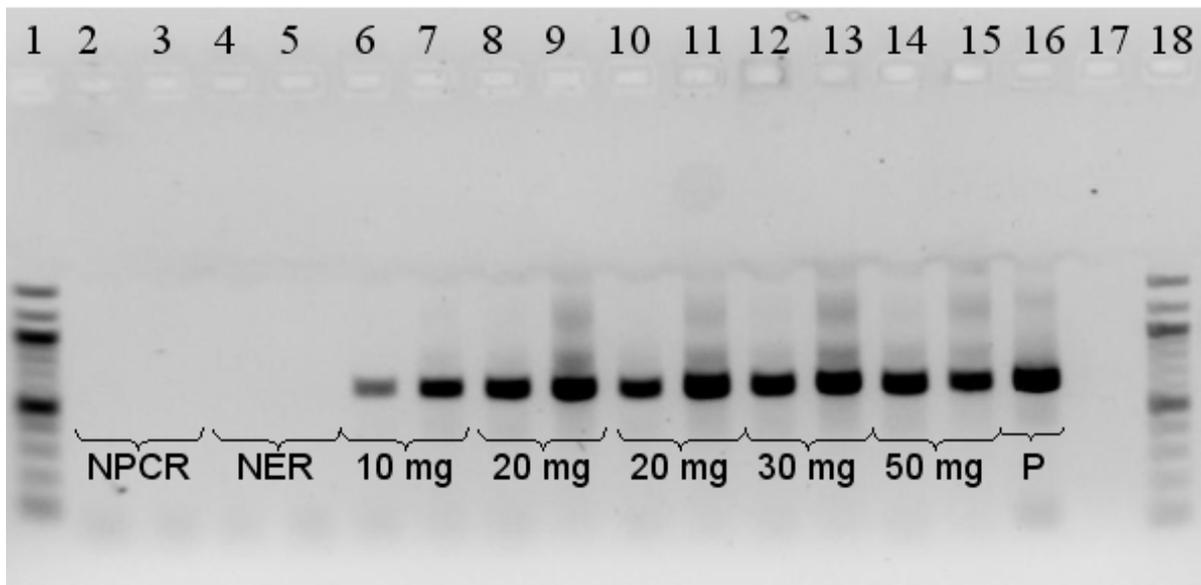
Zwei verschiedene DNA-Extraktionskits, *FastDNA SPIN Kit for Soil* (FS) (mp Biomedicals, Eschwege) und *Power Soil DNA Isolation Kit* (PS) (MO BIO über dianova, Hamburg), wurden mit unterschiedlichen Staubmengen (10, 20, 30 und 50 mg) getestet. Der Kit mit der im Vergleich effizienteren DNA-Extraktion bei möglichst geringer Staubmenge sollte ermittelt werden. Als Maßstab galt die mit *Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit* (LifeTechnologies, Darmstadt) bestimmte DNA-Konzentration und eine starke spezifische Bande bei der zu erwartenden Fragmentgröße von 586 bp bei der Gelelektrophorese. Als Material diente Testmatratzenstaub, der nach demselben Protokoll wie die österreichischen Matratzenstaubproben von zwei Matratzen eines Wohnheims in München entnommen und für die Kits verwendet wurde. Mit beiden Kits wurden nach Aliquotierung in je 10, 20, 30 und einmal 50 mg Staub zwei DNA-Extraktionsläufe durchgeführt. Die DNA-Konzentration wurde mittels Picogreen (LifeTechnologies, Darmstadt) bestimmt (Tabelle 6).

Nach DNA-Extraktion beider Staubproben mit FS und PS wurden 2 µl DNA-Isolat als Template für die PCR-Reaktion eingesetzt, bei der ein gemeinsamer Mastermix verwendet wurde. Die DNA-Extrakte wurden bei einem gemeinsamen PCR-Lauf mit dem *Professional Basic Thermocycler* (Biometra, Göttingen) amplifiziert. Die Zyklenanzahl betrug 29. Nach der Amplifikation wurden 2 µl des PCR-Produkts auf ein gemeinsames Gel aufgetragen. Bei Staub-

**Tabelle 6:** Quantitativer Vergleich der DNA-Konzentrationen der DNA-Extraktionen mit unterschiedlichen Staubmengen und DNA-Extraktionskits

Menge an Matratzenstaub in mg	DNA-Konzentration Ex 1 FS (in ng/µl)	DNA-Konzentration Ex 1 PS (in ng/µl)	DNA-Konzentration Ex 2 FS (in ng/µl)	DNA-Konzentration Ex 2 PS (in ng/µl)
0 mg (Negativkontrolle)	0	0	0,5	0,75
10 mg	1,375	0,5	0,875	0,75
20 mg	8,5	0,75	6,25	0,875
20 mg	8	0,75	/	/
30 mg	6	0,75	9,75	0,875
50 mg	10	5	12,5	1

probe 1 wurden zweimal 20 mg Staub isoliert, bei Staubprobe 2 nur einmal. Die Picogreen-Ergebnisse zeigten deutliche Unterschiede zwischen den beiden DNA-Isolationsverfahren: FS zeigte durchgehend höhere Konzentrationen als PS. Nach PCR-Amplifikation und Darstellung des spezifischen PCR-Produkts bei der Gelelektrophorese zeigten sich intensivere und breitere Banden bei DNA-Extraktion mit FS (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Vergleich von PCR-Produkten mit Extrakten von Power Soil DNA Isolation Kit (PS) und FastDNA SPIN Kit for Soil (FS) bei unterschiedlichen Mengen an Matratzenstaub. Auftragungsreihenfolge: 1) DNA-Ladder; 2) DNA-freie Negativkontrolle für PCR (NPCR); 3) DNA-freie Negativkontrolle für PCR (NPCR) (hier 5 µl Extrakt und nur 5 µl Wasser); 4) DNA-freie Negativkontrolle (NER) für DNA-Extraktion mit FS; 5) DNA-freie Negativkontrolle (NER) für DNA-Extraktion mit PS; 6) 10 mg (PS); 7) 10 mg (FS); 8) 20 mg (PS); 9) 20 mg (FS); 10) 20 mg (PS); 11) 20 mg (FS); 12) 30 mg (PS); 13) 30 mg (FS); 14) 50 mg (PS); 15) 50 mg (FS); 16) *E. coli* Positivkontrolle (P); 17) leer; 18) DNA-Ladder.

Besonders bei geringen Mengen an Matratzenstaub lieferte die Extraktion mit *FastSpin Kit for Soil* bessere Ergebnisse. Eine Menge von 20 und 30 mg Staub war vollkommen ausreichend. Man entschied sich für FS und 30 mg Staub pro Probe. Sieben Proben lagen zwischen 0 und 10 mg und wurden daher aufgrund mangelnder Vergleichbarkeit von allen weiteren Schritten ausgeschlossen. Zwei Proben hatten 22,5 und 27,5 mg, wurden amplifiziert und aufgrund hoher Amplikon-Konzentrationen in die Analyse mitaufgenommen.

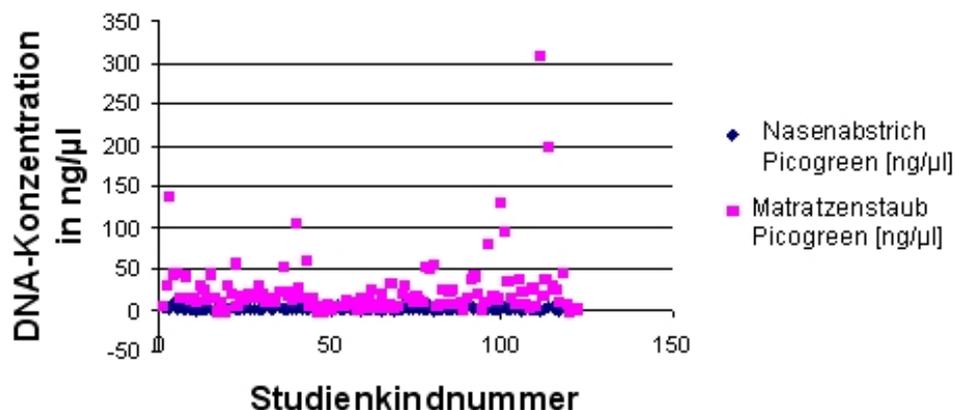
### 3.1.2 DNA-Konzentrationen der DNA-Extrakte

Wie durch die unterschiedliche Probenbeschaffenheit anzunehmen war, zeigten 30 mg Matratzenstaub durchschnittlich höhere Gesamt-DNA-Konzentrationen (Abbildung 11) als der korrespondierende Nasenabstrich.

### 3.1.3 PCR

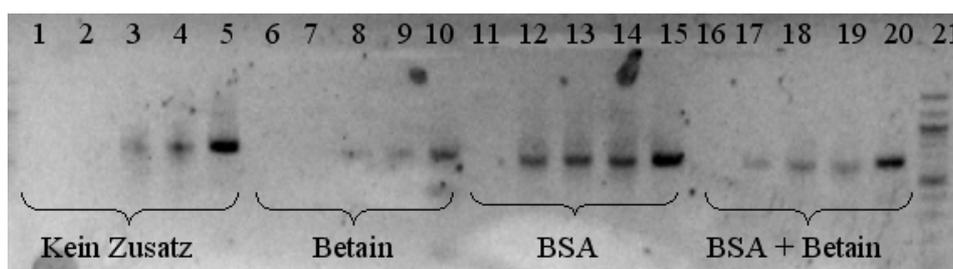
#### 3.1.3.1 Zusätze im Mastermix

Um die Wirkung der Zusätze Bovine serum albumin (BSA) und Betain zu testen und gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen, wurde zunächst ein großer Mastermix mit 8,25 µl sterilem Wasser pro Probe erstellt und dieser in vier 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt.



**Abbildung 11:** Gesamt-DNA-Konzentrationen von Matratzenstaub und Nasenabstrichproben mit Picogreen bestimmt

Die Versuche unter Verwendung von BSA zeigten die stärkste spezifische Bande bei der Gelelektrophorese, danach folgten die PCRs mit Zugabe von beiden Stoffen. Die alleinige Zugabe von Betain führte zu den schlechtesten Ergebnissen (Abbildung 12).



**Abbildung 12:** Vergleich der PCR-Produkte bei Zugabe von BSA und Betain in den Mastermix. Es wurden 3  $\mu$ l Amplikon aufgetragen.

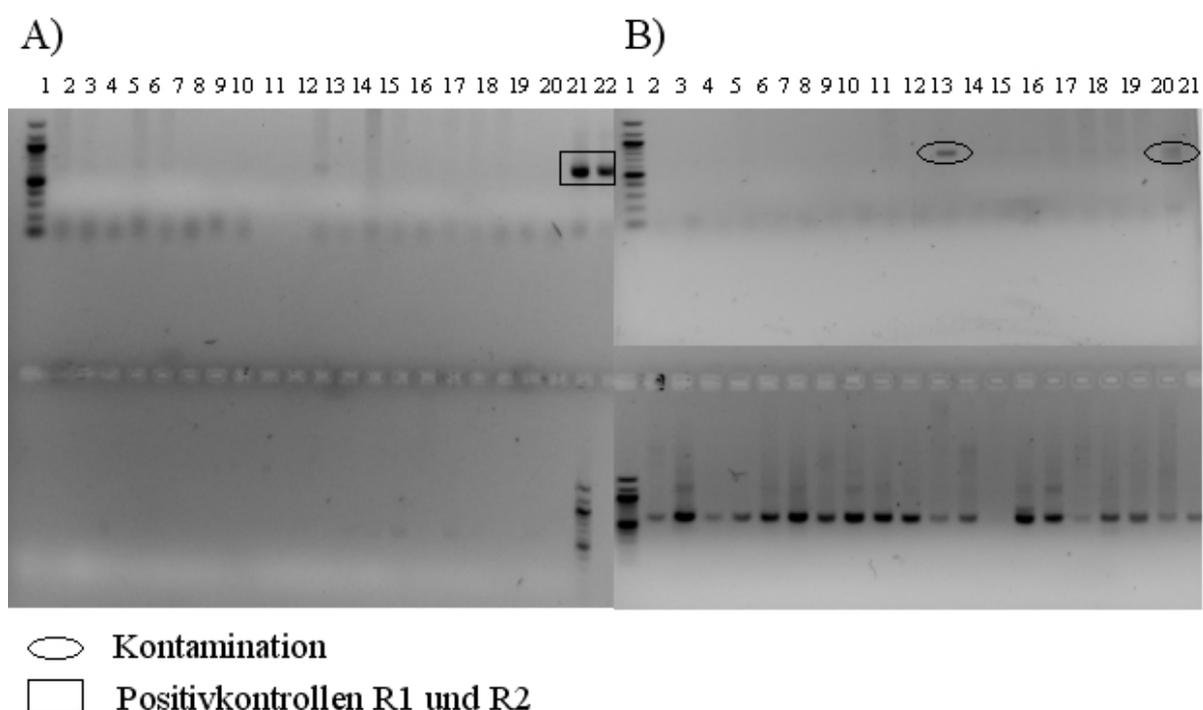
Auftragungsreihenfolge: 1) DNA-freie Negativkontrolle für PCR ohne Zusatz; 2-4) Teststaub 1, 2 und 3 100 mg ohne Zusatz; 5) E. coli Positivkontrolle (P); 6) DNA-freie Negativkontrolle für PCR mit Betain; 7-9) Teststaub 1, 2 und 3 mit BSA-Zusatz; 10) E. coli Positivkontrolle (P) mit Betain-Zusatz; 11) DNA-freie Negativkontrolle für PCR mit Betain-Zusatz; 12-14) Teststaub 1, 2 und 3 100 mg mit BSA-Zusatz; 15) E. coli Positivkontrolle (P) mit BSA-Zusatz; 16) DNA-freie Negativkontrolle für PCR mit BSA+Betain-Zusatz; 17-19) Teststaub 1, 2 und 3 mit BSA+Betain-Zusatz; 20) E. coli Positivkontrolle (P) mit BSA + Betain-Zusatz; 21) DNA-Ladder.

Aufgrund dieser Tatsache wurde für alle Proben 1  $\mu$ l BSA pro PCR-Reaktionsansatz und Probe eingesetzt. Gleichmaßen wurde für die Nasenabstriche verfahren.

### 3.1.3.2 Einsatzhöhe des DNA-Extrakts und Wahl der Zyklenzahl

Da nur eine limitierte Menge an DNA-Extrakt hergestellt werden konnte, sollte nur so viel wie nötig eingesetzt werden. Bei 66 Matratzenstaubproben reichte 1  $\mu$ l DNA-Extrakt pro Master-

mix aus. Bei 22 schlecht amplifizierbaren Proben wurde der Einsatz auf 3  $\mu$ l pro Ansatz erhöht. Bei der Nasenabstrich-DNA wurden aufgrund schlechter Amplifizierbarkeit statt anfänglich 3  $\mu$ l (Abbildung 13 zur Veranschaulichung) kontinuierlich 5  $\mu$ l DNA-Extrakt verwendet. Vorversuche zeigten, dass bei Matratzenstaub 28 Zyklen zur Amplifikation ausreichten. Die problematische Amplifikation der Nasenabstrich-DNA machte es notwendig, die Zyklenzahl von 33 auf 35 zu erhöhen. Eine Kontamination zweier *Reverse Primer* bei den Nasenabstrichproben führte zu den in Abbildung 13 dargestellten positiven Negativkontrollen. Die mit diesen *Reverse Primern* erzeugten Amplifikate und die kontaminierten *Reverse Primer* wurden verworfen und eine erneute Amplifikation unter Verwendung neu hergestellter *Reverse Primer* durchgeführt.



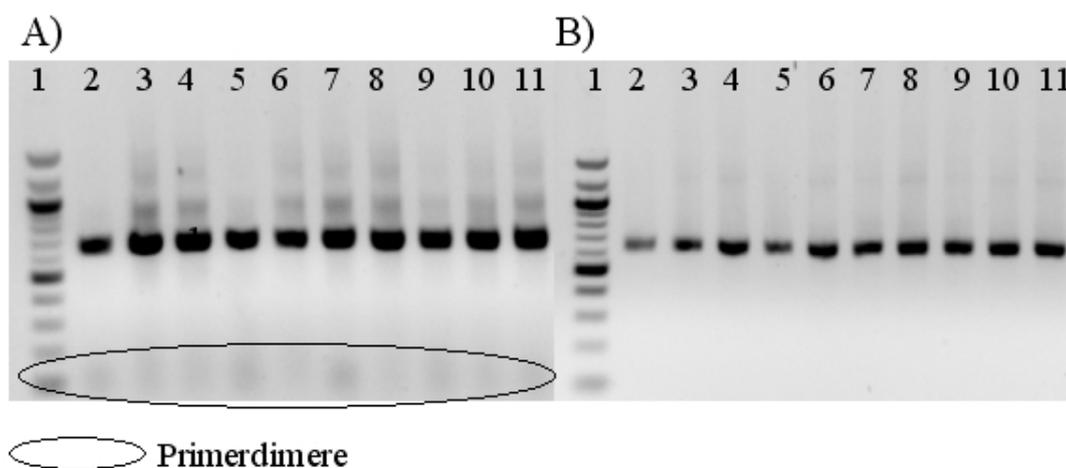
**Abbildung 13:** Vergleich unterschiedlicher Mengen an DNA-Extrakt als Einsatz für die PCR und unterschiedlicher Zyklenzahl der PCR bei Nasenabstrichproben. Es wurden 3  $\mu$ l Amplikon aufgetragen.

Auftragungsreihenfolge für A) PCR mit 33 Zyklen und 3  $\mu$ l; oben: 1) DNA-Ladder; 2-20) Negativkontrollen für Nasenabstrichproben ohne Aufreinigung; 21 und 22) *E. coli* Positivkontrolle (P) ohne Aufreinigung für Run 1 (R1; 3  $\mu$ l DNA-Einsatz und 33 Zyklen) und Run 2 (R2; 5  $\mu$ l DNA-Einsatz und 35 Zyklen). Unten: 1-20) PCR-Produkt für Nasenabstrichproben (es zeigt sich keine Amplifikation) nach einmaliger Aufreinigung; 21) DNA-Ladder.

Für B) PCR mit 35 Zyklen und 5  $\mu$ l; oben: 1) DNA-Ladder; 2-21) Negativkontrollen für Nasenabstrichproben (Probe 13 und 20 mussten aufgrund von Kontamination wiederholt werden). Unten 1) DNA-Ladder; 2-21) PCR-Produkt für Nasenabstrichproben nach einmaliger Aufreinigung (durch die Optimierung der PCR ist ein spezifisches Produkt amplifiziert worden).

### 3.1.4 Die Aufreinigung zur Entfernung von Primerdimeren

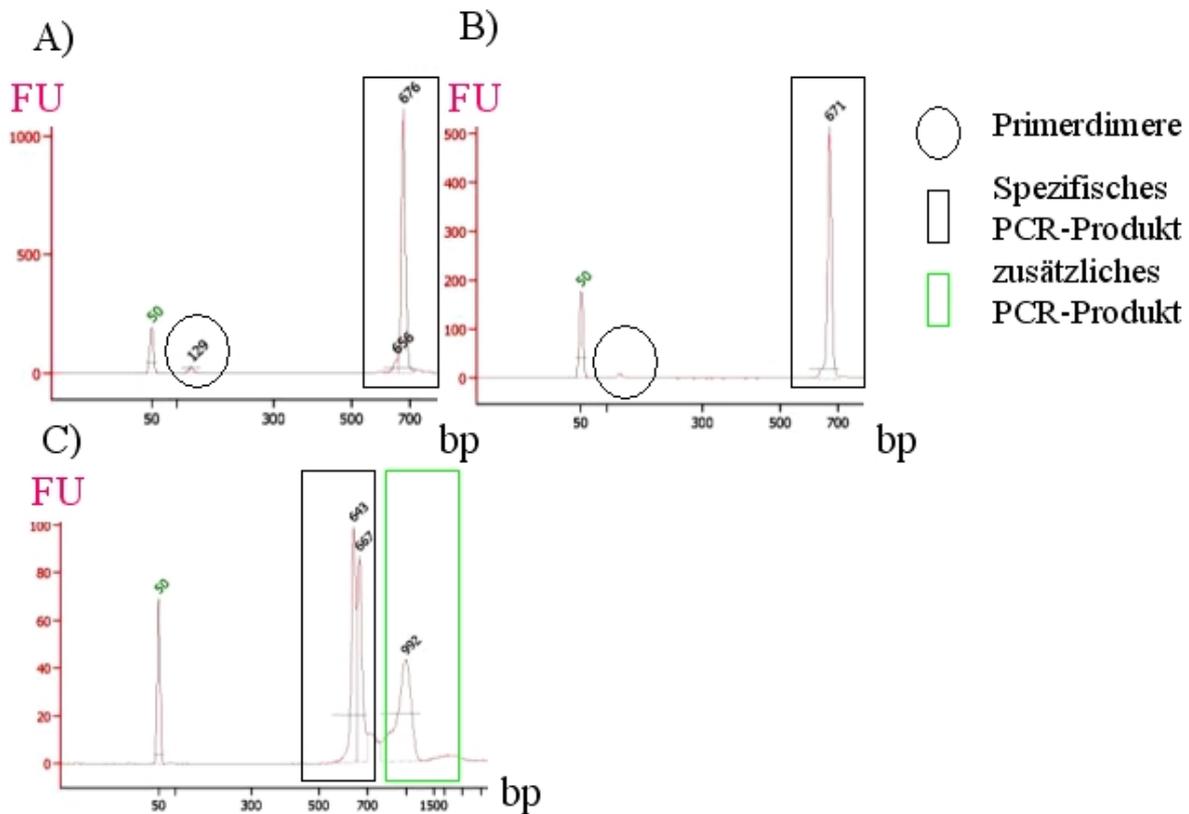
Die Aufreinigung der PCR-Produkte spielte eine entscheidende Rolle für die Sequenzierung. Mit jeder Aufreinigung verringerte sich die Anzahl an Primerdimeren, jedoch wurde auch spezifisches PCR-Produkt verloren. Bei den Matratzenstaubproben erzielte man bei der Gelelektrophorese mit zweimaliger Aufreinigung gut sichtbare spezifische Banden (Abbildung 14), sodass alle Matratzenstaubproben zweimal aufgereinigt wurden. In Abbildung 14 wird ersichtlich, dass durch die Aufreinigung die Primerdimere deutlich weniger werden und die DNA auf das spezifische Produkt reduziert wird. Matratzenstaub mit einem aufgereinigten PCR-Produkt von  $< 10 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$  (Picogreen) wurde mittels Bioanalyzer analysiert und konnte aufgrund nicht messbarer Primerdimere ohne weitere Aufreinigungsschritte verwendet werden. Die Na-



**Abbildung 14:** Amplifizierte 16S rRNA Genfragmente in A) vor der Aufreinigung und in B) nach zweimaliger Aufreinigung mit Agencourt AMPure XP Beads. Es ist jeweils 1  $\mu\text{l}$  Ampikon aufgetragen.  
Auftragungsreihenfolge: 1) DNA-Ladder; 2-11) PCR-Produkte von unterschiedlichen Matratzenstaubproben der GABRIELA Studie.

senabstriche wurden wegen der geringeren Konzentration an spezifischem PCR-Produkt zunächst nur einmal aufgereinigt und auf dem Bioanalyzer beurteilt (Abbildung 15 A) und B)). Nasenabstriche wiesen meist einen hohen schmalen Peak auf, Matratzenstaubproben (Abbildung 15 C)) dagegen häufig mehrere spezifische Peaks und ein weiteres Fragment bei etwa 1.000 bp. Da an die Beads bevorzugt kleinere Fragmente binden, stören große Fragmente bei der Sequenzierung jedoch nicht. Proben ohne detektierten Primerpeak (ein graphisch sichtbarer aber nicht messbarer Peak wurde ebenfalls als negativ gewertet) und mit einem schmalen hohen PCR-Produkt-Peak wurden als sequenzierbar eingestuft. Waren messbare Primerdimere vorhanden, wurden die Proben ein weiteres Mal mit *Agencourt AMPure Beads* aufgereinigt. Für 34 Proben zeigte sich bei der mit Bioanalyzer beurteilten Qualität keine Besserung in Bezug auf Primerdimere, sodass die Proben bis zu zweimal mit *Qiagen PCR Purifikation Kit* aufgereinigt werden mussten. Als letzte Möglichkeit diente für 16 Proben das Aufreinigen des ausgeschnittenen spezifischen Produkts aus einem Gel. Beim Vergleich der Menge an sequenzierten Primerdimeren bei Matratzenstaub und Nasenabstrichproben zeigte die aufwän-

digere Methode mit Analyse jeder Probe auf dem Bioanalyzer geringere Primerdimere. 12 Proben konnten aufgrund der aus den Optimierungsverfahren resultierenden PCR-Produkt-Konzentration  $< 3 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$  nicht sequenziert werden.

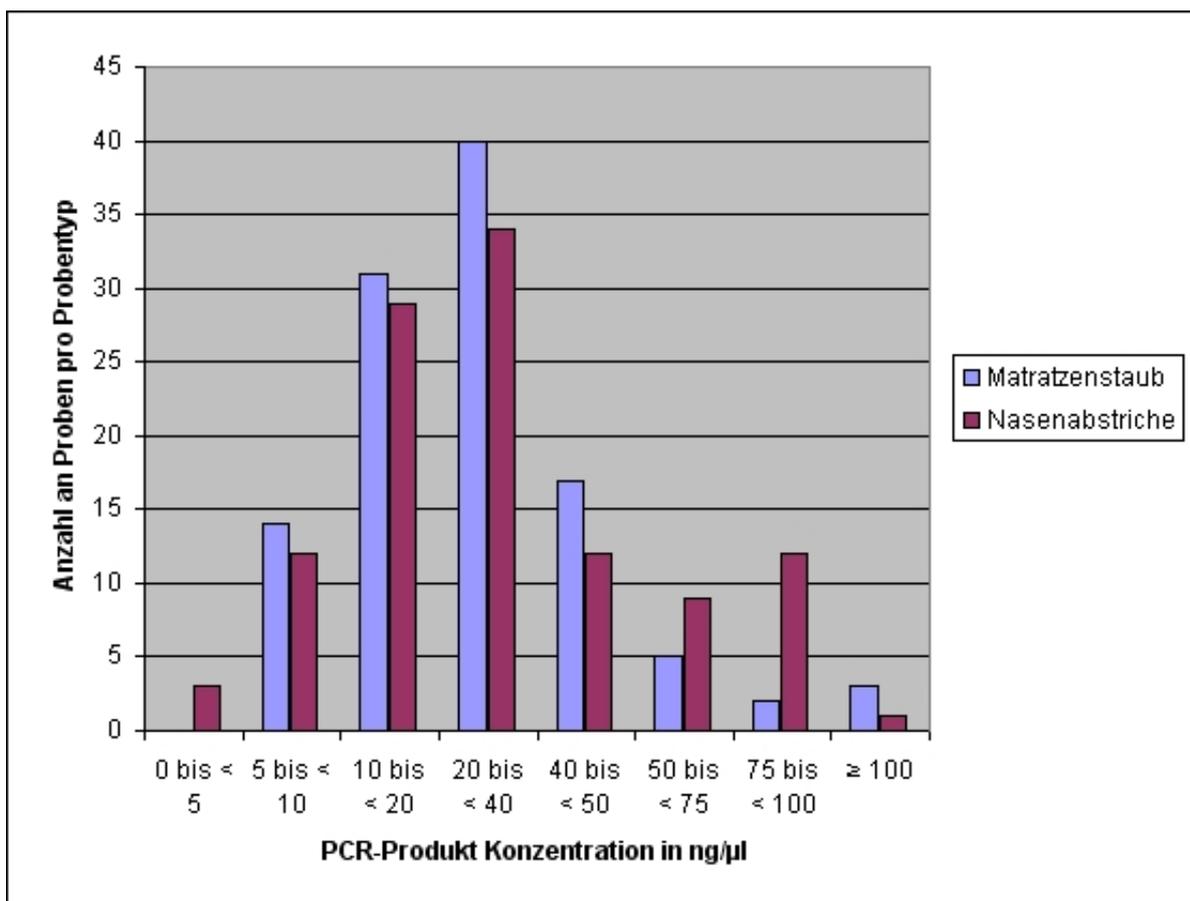


**Abbildung 15:** Analyse einer Nasenabstrichprobe mit dem Bioanalyzer: in A) nach einmaliger und in B) nach zweimaliger Aufreinigung mit *Agencourt AMPure XP Beads*.

Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung der Fluoreszenzskala (FU), der Peak bei 50 bp repräsentiert die zur Kontrolle mit aufgetragene DNA-Ladder. Nur bei A) ist mit der Software eine Primerdimerkonzentration von  $1,17 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$  detektierbar, bei B) sind die Primerdimere nur noch grafisch darstellbar. Das spezifische PCR-Produkt (im schwarzen Rechteck) reduziert sich von  $25,65 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$  auf  $12,10 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$ . C) zeigt eine Matratzenstaubprobe, bei der man ein bei diesem Probentyp häufig beobachtetes zusätzliches PCR-Produkt (im grünen Rechteck) bei 992 bp sehen kann.

### 3.1.5 Vergleich der PCR-Produkte

Nach den jeweiligen Optimierungsverfahren waren die mit *Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit* (LifeTechnologies, Darmstadt) gemessenen PCR-Produkt-Konzentrationen von Matratzenstaub und Nasenabstrichen rein quantitativ in etwa vergleichbar. Der Großteil der Proben lag im Bereich zwischen  $30$  und  $50 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$ , wie in Abbildung 16 zu sehen ist.

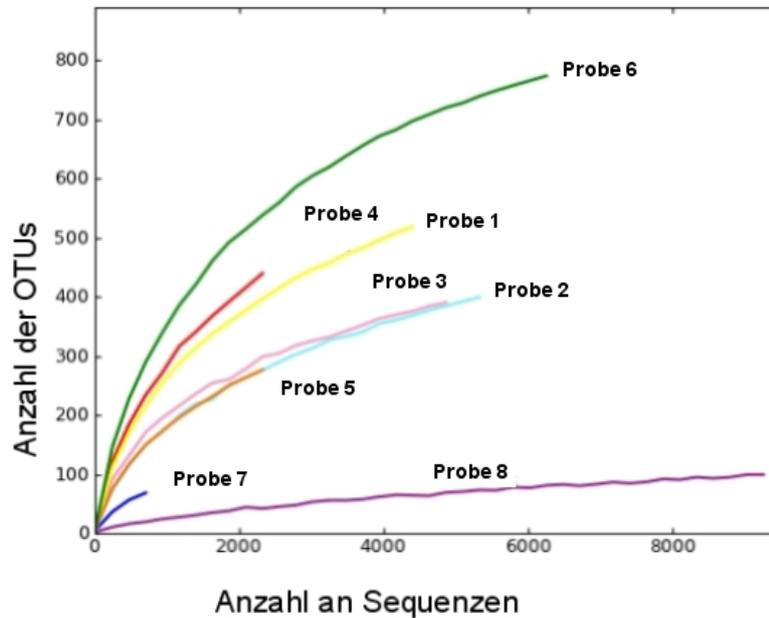


**Abbildung 16:** Amplikon-Konzentrationen (Picogreen) von Matratzenstaub- (blau) und Nasenabstrichproben (lila). Graphisch dargestellt sind alle 112 Matratzenstaub- und die korrespondierenden Nasenabstrichproben, die in die experimentelle Arbeit aufgenommen wurden. Die Konzentrationen der sieben Proben mit Staubmengen zwischen 0 und 9,5 mg wurden für beide Probenotypen aufgrund fehlender Vergleichbarkeit nicht ermittelt.

### 3.2 Erste Sequenziererergebnisse anhand einer Testplatte

Hauptziel der Testplatte war es, die benötigte Sequenziertiefe insbesondere für Matratzenstaubproben zu bestimmen, da bisher noch keine Ergebnisse zur Orientierung vorlagen. Des Weiteren sollte ein erstes Bild über die Sequenzen entstehen. Die Rohdaten wurden mithilfe von QIIME analysiert.

*Multiple-Rarefaction* Kurven zeigten bei Matratzenstaubproben durchschnittlich eine höhere Anzahl an OTUs (Abbildung 17). Bei ca. 6.000 Reads lag man im Sättigungsbereich. Die Proben 4-6 (österreichischer Matratzenstaub, gesammelt von Mai bis Juli 2007) wiesen durchschnittlich 50 % Chloroplastensequenzen auf, die Proben 1-3 (Münchener Matratzenstaubproben, gesammelt zwischen Oktober 2007 und Januar 2008) dagegen nur ca. 14 % (Tabelle 7). Bei den Proben 7 und 8 (österreichische Nasenabstriche, gesammelt von Mai bis Juli 2007) waren es nur etwa 5 %.



**Abbildung 17:** Multiple Rarefaction Kurven für die Proben der Testplatte.

Ein zusätzlicher Sequenzverlust von etwa 30 % aufgrund von Primerdimeren Filterung sowie *Denoising* der Rohdaten musste ebenfalls berücksichtigt werden. Auf jeder Platte konnten theoretisch 1.000.000 Sequenzen erzielt werden.

$$\frac{1.000.000 - 0,3 \cdot 1.000.000}{2} = 350.000$$

Bei 350.000 erwarteten Sequenzen pro Platte und ca. 120 Matratzenstaubproben entschied man sich für drei Platten mit jeweils 40 Proben:

$$\frac{350.000}{40} = 8.750$$

Die 120 Nasenabstrichproben wurden aufgrund der geringeren vermuteten Anzahl an OTUs und der weitaus geringeren Anzahl an Chloroplasten nur auf zwei Platten sequenziert.

**Tabelle 7:** Übersicht über die Sequenzverteilung der Testplatte

Charakteristika	Probe	Anzahl der Sequenzen mit Chloroplasten	Anzahl der Sequenzen ohne Chloroplasten	Anzahl der OTUs ohne Chloroplasten
Matratzenstaub Bayern (gesammelt von 10/07-01/08)	Probe 1	5073	4200	690
Matratzenstaub Bayern (gesammelt von 10/07-01/08)	Probe 2	6221	5549	613
Matratzenstaub Bayern (gesammelt von 10/07-01/08)	Probe 3	6372	4658	569
Matratzenstaub Österreich (gesammelt von 05-07/07)	Probe 4	4921	2256	571
Matratzenstaub Österreich (gesammelt von 05-07/07)	Probe 5	3853	2094	358
Matratzenstaub Österreich (gesammelt von 05-07/07)	Probe 6	10715	5528	1034
Nasenabstrich Österreich (gesammelt von 05 - 07/07)	Probe 7	839	769	97
Nasenabstrich Österreich (gesammelt von 05 - 07/07)	Probe 8	33462	32494	686

### 3.3 Hauptergebnisse: Analyse der Mikrobiota in Nasenabstrichen und Matratzenstaub

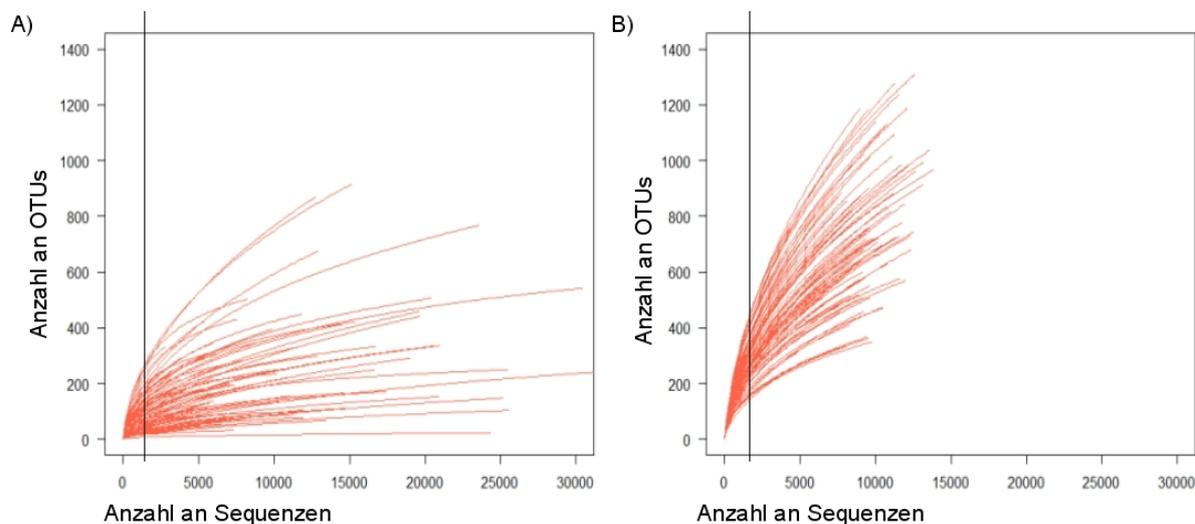
#### 3.3.1 Charakteristika der Sequenzierung

Die Prozessierung der Rohdaten zeigte für die Platten vier und fünf, auf denen die Nasenabstrichproben sequenziert wurden, eine geringere Anzahl an Primerdimeren als die Platten eins bis drei mit den Matratzenstaubproben. Für die Analysen wurden alle Sequenzen auf 400 bp getrimmt.

Nach dem *Denoising* und *Clustern* wurden alle OTUs, deren Sequenzen Chloroplasten-DNA zugeteilt werden konnten, von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Prozentual nahmen OTUs, die Chloroplasten-DNA repräsentierten, in Matratzenstaub 26,8 % und in Nasenabstrichproben 4,4 % ein. Unter diesen OTUs war die OTU 14728 die häufigste. Sie wies eine 100 % Ähnlichkeit zu *Picea abies* (gemeine Fichte) und *Pinus sylvestris* (Waldkiefer) auf.

Nach dieser Filterung ergaben sich für die 86 verbliebenen Kinder (s. Kapitel 2.8) 622.126 Sequenzen für Matratzenstaubproben und 871.490 Sequenzen für Nasenabstrichproben.

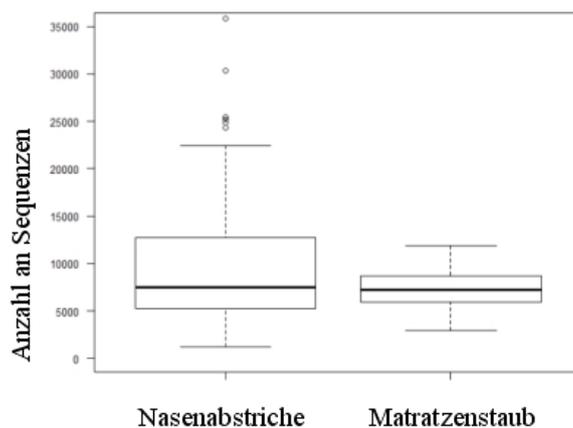
Bei der überwiegenden Anzahl an Nasenabstrichproben konnte mittels *Multiple rarefaction* Kurven eine adäquate Sequenztiefe bestätigt werden (Abbildung 18). In Kontrast dazu zeigten Matratzenstaubproben aufgrund einer unvollständigen Erfassung der OTUs keine Annäherung an eine horizontale Asymptote. Die beim Vergleich der beiden Probenotypen durchgeführte Rarefizierung auf 1.254 Sequenzen zeigte, dass in diesem Bereich die Steigung der Kurven bei den meisten Nasenabstrichproben abnahm, wohingegen bei Matratzenstaub noch keine Abflachung erkennbar war. Es wurde eine Stichprobe von 1.254 repräsentativen Sequenzen



**Abbildung 18:** *Multiple Rarefaction* Kurven für A) Nasenabstrichproben und B) Matratzenstaubproben. Jede Probe ist als eine einzelne Kurve zu betrachten. Alle einer Probe zugehörigen Sequenzen (und nicht wie sonst die auf 1.254 rarefizierten Sequenzen) wurden ermittelt und in Abhängigkeit davon die unrarefizierte bakterielle *richness* (Anzahl an OTUs pro Probe) errechnet. Die vertikale schwarze Linie zeigt den Cut-off von 1.254 Sequenzen für die rarefizierten Analysen.

(schwarze vertikale Linie in Abbildung 18) für jede Probe festgelegt, da dies die Minimalzahl an Sequenzen in den 86 verbliebenen vergleichbaren Proben war (Abbildung 19). Der Mittelwert der Nasenabstrichproben lag bei 10.130 Sequenzen und es wurde eine Maximalzahl von 35.800 Sequenzen erreicht. Matratzenstaub wies eine geringere Streuung der Einzelwerte auf. Das Minimum lag bei 2.909 Sequenzen, der Mittelwert bei 7.234 und das Maximum bei 11.860 Sequenzen.

Die mitsequenzierten Negativkontrollen lagen mit ihrer durchschnittlichen Sequenzzahl bei 0,14 % der durchschnittlichen Sequenzzahl einer Matratzenstaubprobe und bei 0,54 % der durchschnittlichen Sequenzzahl einer Nasenabstrichprobe. Daher konnte eine Kontamination der Proben mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.



**Abbildung 19:** Veranschaulichung der Streuung der Sequenzzahl pro Probe für Nasenabstriche und Matratzenstaub. Der schwarze Balken stellt den *Median* dar.

### 3.3.2 Taxonomische Zusammensetzung

Es wurde eine Einteilung in *häufige* und *seltene* Taxa vorgenommen. *Häufige* Phyla, Genera und OTUs waren definiert durch ein Vorkommen zu  $> 1\%$ . *Seltene* Phyla, Genera und OTUs waren definiert durch ein Vorkommen zu  $\leq 1\%$  und wurden für die statistischen Analysen jeweils als eine Gesamtvariable zusammengefasst.

#### 3.3.2.1 Phyla

Matratzenstaub- und Nasenabstrichproben wiesen dieselben vier dominierenden Phyla auf: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* und *Actinobacteria* (Tabelle 8 und Abbildung 20). In ihrer relativen Häufigkeit unterschieden sie sich außer in den *Actinobacteria* deutlich (in Tabelle 8 fett gedruckt hervorgehoben). Des Weiteren fielen in Matratzenstaub *Cyano*- und in Nasenabstrichproben *Fusobacteria* unter die häufigen Phyla. In Matratzenstaub waren außerdem mehr seltene Phyla vertreten.

**Tabelle 8:** Relative Häufigkeit der häufigen Phyla (> 1% repräsentiert) in Nasenabstrich- und Matratzenstaubproben (markante Unterschiede sind fett gedruckt hervorgehoben)

PHYLUM	Nasenabstrich	Matratzenstaub
	relative Häufigkeit (%) über alle Proben	
Proteobacteria	<b>43,1%</b>	<b>17,0%</b>
Firmicutes	<b>37,5%</b>	<b>52,5%</b>
Actinobacteria	13,0%	15,8%
Bacteroidetes	<b>4,5%</b>	<b>10,6%</b>
Fusobacteria	<b>1,3%</b>	<b>2,5%</b>
Gesamtvariable seltene Phyla ≤ 1% repräsentiert	<b>0,7%</b>	<b>1,5%</b>

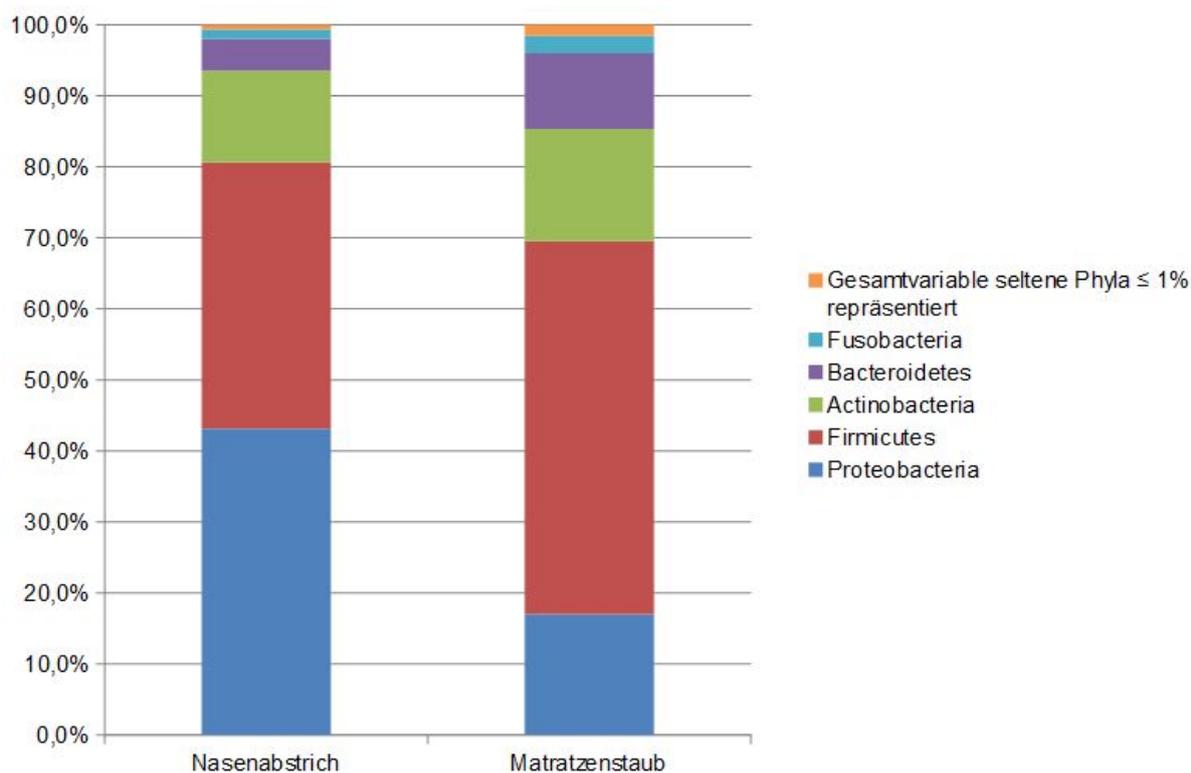
### 3.3.2.2 Genera

Bei den häufigen Genera unterschieden sich die beiden Probenarten bis auf den hohen Prozentsatz von *Streptococcus* und *Staphylococcus* und die ähnlichen relativen Häufigkeiten für *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Peptoniphilus*, *Neisseria*, *Porphyromonas* und *Actinobacillus* (Tabelle 9 und Abbildung 21) deutlich: In Nasenabstrichproben konnten nur halb so viele (17,50 %) seltene Genera nachgewiesen werden wie in Matratzenstaub (34,0 %) (Tabelle 9). Matratzenstaub beinhaltete 22 häufige Genera, in Nasenabstrichen waren es nur zwölf. Be-

**Tabelle 9:** Relative Häufigkeit der häufigen Genera (> 1% repräsentiert) in Nasenabstrich- und Matratzenstaubproben (markante Unterschiede sind fett gedruckt hervorgehoben)

GENUS	Nasenabstrich	Matratzenstaub
	relative Häufigkeit (%) über alle Proben	
Gesamtvariable seltene Genera ≤ 1% repräsentiert	<b>17,8%</b>	<b>34,0%</b>
<i>Streptococcus</i>	15,9%	15,7%
<i>Staphylococcus</i>	12,0%	10,2%
<i>Corynebacterium</i>	6,8%	5,7%
<i>Anaerococcus</i>	/	<b>3,9%</b>
<i>Propionibacterium</i>	3,4%	3,8%
<i>Prevotella</i>	<b>1,8%</b>	<b>3,3%</b>
<i>Fingoldia</i>	/	<b>2,2%</b>
<i>Peptoniphilus</i>	1,3%	2,1%
<i>Bacteroides</i>	/	<b>1,9%</b>
<i>Faecalibacterium</i>	/	<b>1,8%</b>
<i>Lactobacillus</i>	/	<b>1,6%</b>
<i>Neisseria</i>	1,3%	1,5%
<i>Porphyromonas</i>	1,1%	1,5%
<i>Acinetobacter</i>	/	1,5%
<i>Moraxella</i>	<b>29,9%</b>	<b>1,4%</b>
<i>Actinobacillus</i>	1,3%	1,3%
<i>Veillonella</i>	/	<b>1,2%</b>
<i>Lachnospiraceae (Incertae sedis)</i>	/	<b>1,1%</b>
<i>Granulicatella</i>	/	<b>1,1%</b>
<i>Sphingomonas</i>	/	<b>1,1%</b>
<i>Lactococcus</i>	/	<b>1,0%</b>
<i>Ruminococcaceae (Uncultured)</i>	/	<b>1,0%</b>
<i>Haemophilus</i>	<b>6,3%</b>	/
<i>Gemella</i>	1,1%	/

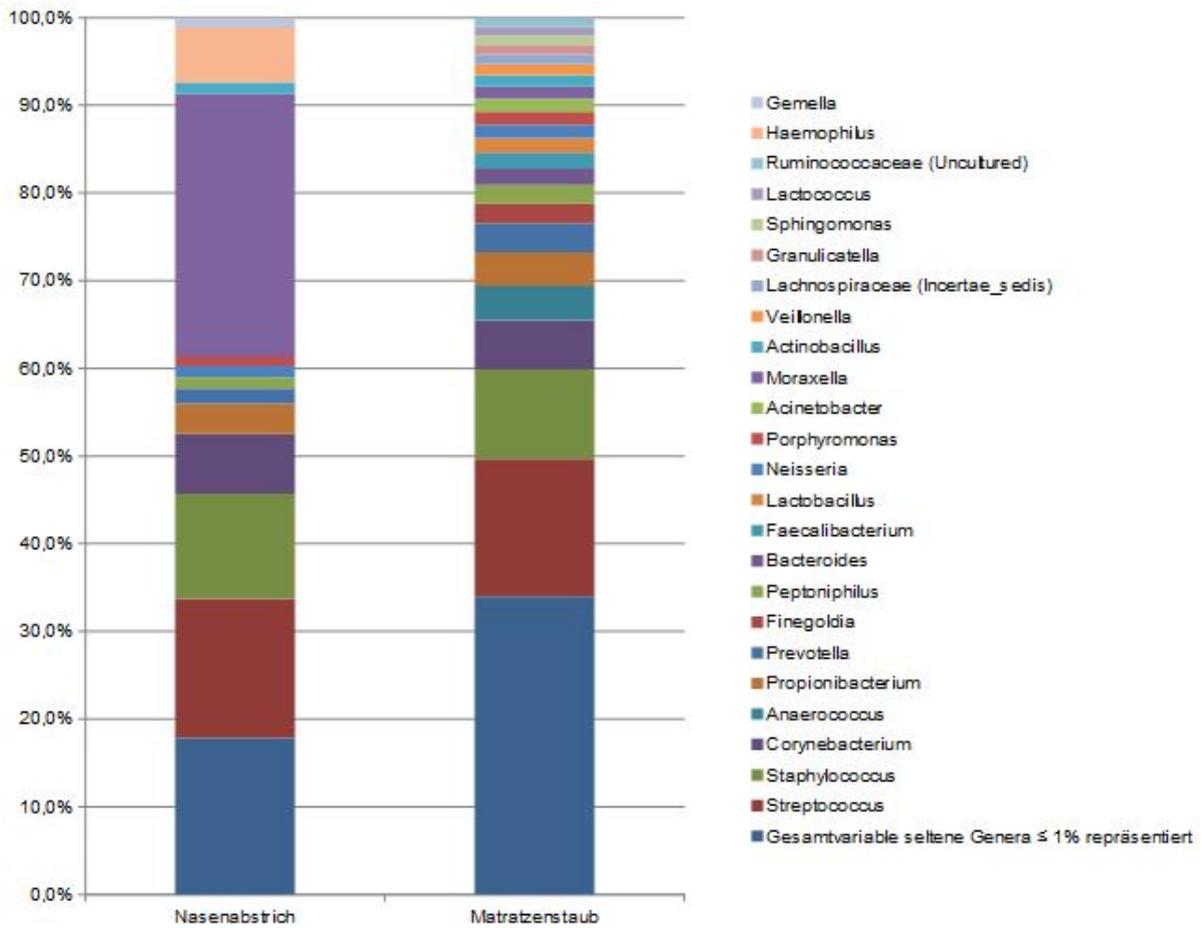
sonders auffällig war der hohe Prozentsatz von *Moraxella* (29,9 %) und *Haemophilus* (6,3 %) in Nasenabstrichproben. Matratzenstaub enthielt hingegen nur 1,4 % *Moraxella* (in Tabelle 9



**Abbildung 20:** Relative Häufigkeitsverteilung der Phyla von Nasenabstrich- und Matratzenstaubproben

fett gedruckt hervorgehoben). *Haemophilus* konnte unter den häufigen Genera nicht gefunden werden. Das Genus *Gemella* (1,1 %) war unter den häufigen Genera ebenfalls nur in Nasenabstrichproben vorhanden.

Bei Matratzenstaub lagen 14 Genera bei relativen Häufigkeiten zwischen 1 und 2 % und somit nahe der seltenen Genera. *Anaerococcus* war mit 3,9 % nur in Matratzenstaub vertreten. Des Weiteren gab es eine Reihe von Genera, die mit nur in Matratzenstaub vorhanden waren (in Tabelle 9 fett gedruckt hervorgehoben) und zwischen 1 und 2 % repräsentiert waren.



**Abbildung 21:** Verteilung der Genera in Nasenabstrich- und Matratzenstaubproben.

### 3.3.2.3 Operational Taxonomic Units (OTUs)

Auf OTU-Ebene wurde der Unterschied zwischen Matratzenstaub und Nasenabstrichproben in Bezug auf die Gesamtvariable der seltenen OTUs noch deutlicher. Mehr als die Hälfte aller OTUs (58,5 %) konnte als selten eingestuft werden, in Nasenabstrichproben waren es weniger als ein Viertel (23,5 %) (Tabelle 10 und Abbildung 22). Die OTUs sind mit einer Nummer bezeichnet, in Klammern steht das Genus, dem sie angehören.

**Tabelle 10:** Relative Häufigkeit der häufigen OTUs (> 1% repräsentiert) in Nasenabstrich- und Matratzenstaubproben (markante Unterschiede sind fett gedruckt hervorgehoben)

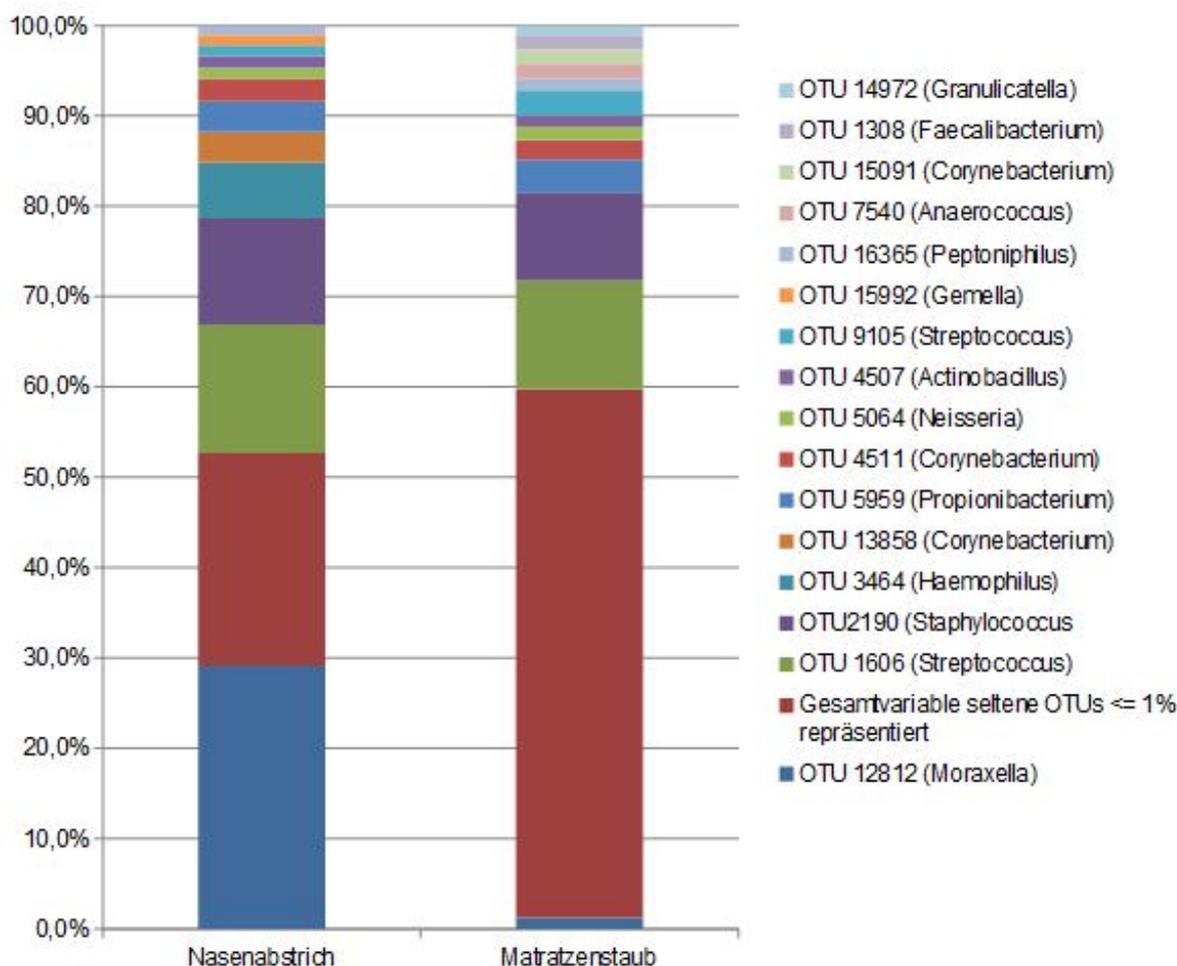
OTU (GENUS)	Nasenabstrich	Matratzenstaub
	relative Häufigkeit (%) über alle Proben	
OTU 12812 ( <i>Moraxella</i> )	<b>29,2%</b>	<b>1,3%</b>
Gesamtvariable seltene OTUs <= 1% repräsentiert	<b>23,5%</b>	<b>58,5%</b>
OTU 1606 ( <i>Streptococcus</i> )	14,3%	12,0%
OTU2190 ( <i>Staphylococcus</i> )	11,7%	9,8%
OTU 3464 ( <i>Haemophilus</i> )	<b>6,1%</b>	/
OTU 13858 ( <i>Corynebacterium</i> )	<b>3,4%</b>	/
OTU 5959 ( <i>Propionibacterium</i> )	3,4%	3,6%
OTU 4511 ( <i>Corynebacterium</i> )	2,5%	2,2%
OTU 5064 ( <i>Neisseria</i> )	1,3%	1,5%
OTU 4507 ( <i>Actinobacillus</i> )	1,3%	1,3%
OTU 9105 ( <i>Streptococcus</i> )	<b>1,2%</b>	<b>2,8%</b>
OTU 15992 ( <i>Gemella</i> )	<b>1,1%</b>	/
OTU 16365 ( <i>Peptoniphilus</i> )	1,0%	1,3%
OTU 7540 ( <i>Anaerococcus</i> )	/	<b>1,7%</b>
OTU 15091 ( <i>Corynebacterium</i> )	/	<b>1,6%</b>
OTU 1308 ( <i>Faecalibacterium</i> )	/	<b>1,6%</b>
OTU 14972 ( <i>Granulicatella</i> )	/	<b>1,0%</b>

In Matratzenstaub waren 13, in Nasenabstrichproben 12 häufige OTUs vorhanden.

Parallel zur Genusanalyse und deutlich dominierend waren die OTU 12812 (Genus *Moraxella*) (29,2 %) und OTU 3464 (Genus *Haemophilus*) (6,1 %) in Nasenabstrichproben, die beinahe alle OTUs der Genera *Moraxella* bzw. *Haemophilus* abdeckten. In Matratzenstaub waren OTU 12812 nur zu 1,3 % und OTU 3464 nicht unter den häufigen OTUs vertreten (in Tabelle 10 fett gedruckt hervorgehoben).

Ebenfalls nur in Nasenabstrichproben unter den häufigen OTUs detektiert wurden OTU 13858 (Genus *Corynebacterium*) und OTU 15992 (Genus *Gemella*). Nur in Matratzenstaub konnten dagegen unter den häufigen OTUs die OTU 7540 (Genus *Anaerococcus*), OTU 15091 (Genus *Corynebacterium*), OTU 1308 (Genus *Faecalibacterium*) und OTU 14972 (Genus *Granulicatella*) nachgewiesen werden.

In beiden Probenotypen fanden sich unter den häufigen OTUs die OTU 1606 (Genus *Streptococcus*), OTU 2190 (Genus *Staphylococcus*), OTU 5959 (Genus *Propionibacterium*), OTU 4511 (Genus *Corynebacterium*), OTU 5064 (Genus *Neisseria*), OTU 4507 (Genus *Actinobacillus*), OTU 9105 (Genus *Streptococcus*) und OTU 16365 (Genus *Peptoniphilus*) (Tabelle 10).



**Abbildung 22:** Relative Häufigkeitsverteilung der häufigen OTUs für Nasenabstrich- und Matratzenstaubproben

Beim Vergleich mit der NCBI-Datenbank konnten einige häufige OTUs mit jeweils 100 % Ähnlichkeit ihrer Sequenz den folgenden Spezies zugeteilt werden: OTU 12812 der Spezies *Moraxella catarrhalis* und *Moraxella nonliquefaciens* und OTU 3464 *Haemophilus influenzae* und *Haemophilus haemolyticus*. Für OTU 1606 konnten verschiedene *Streptococcus* Spezies ausfindig gemacht werden, u. a. *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus infantis* und *Streptococcus mitis*. Die zweite häufige unter das Genus *Streptococcus* fallende OTU 9105 (Genus *Streptococcus*) hatte 100 % Ähnlichkeit zu *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus thermophilus* und *Streptococcus vestibularis*. Die übrigen häufigen OTUs zeigten Ähnlichkeiten zu vielen verschiedenen Spezies.

Des Weiteren wurde auf intraindividuelle Gemeinsamkeiten untersucht. Dabei wurde geprüft, welche OTUs sowohl in der Nasenabstrich-, als auch in der korrespondierenden Matratzenstaubprobe desselben Kindes vorkamen. Es wurden nicht nur die häufigen OTUs in den beiden Probentypen betrachtet, sondern alle OTUs, die in jedem Kind unabhängig vom Probentyp

mindestens mit jeweils fünf Sequenzen vorkamen. Tabelle 11 zeigt OTUs, für die mindestens 5 Sequenzen für mindestens 10 % der Kinder in beiden Probentypen gefunden wurden. Für Interpretationsansätze interessant wären die OTUs, die bei der Betrachtung aller Proben typisch für den einen und untypisch für den anderen Probentyp sind. Kommen sie häufig gemeinsam vor, so könnte eine Übertragung stattfinden. Daher wurden u. a. OTU 12812 und OTU 3464 als mögliche Transferkandidaten von der Nase auf die Matratze angesehen und OTU 1344, OTU 658 und OTU 11013 als mögliche Transferkandidaten von der Matratze auf die Nase. Beim Vergleich mit der NCBI-Datenbank konnten für OTU 12812 und OTU 3464 die oben genannten Ähnlichkeiten ermittelt werden. OTU 658 zeigte 100 % Ähnlichkeit zu verschiedenen *Acinetobacter* Spezies, OTU 11013 eine 100 % Ähnlichkeit zu *Lactococcus lactis*.

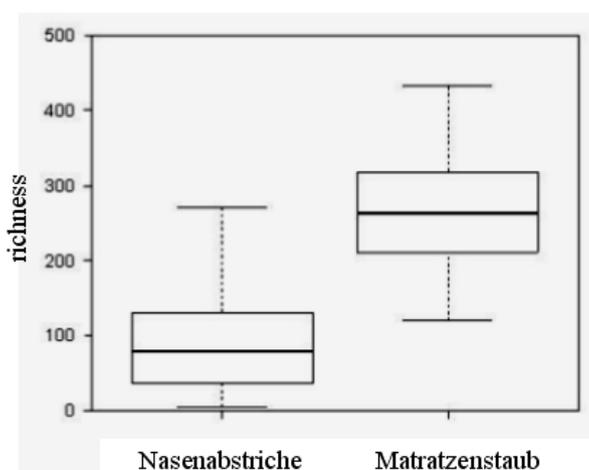
**Tabelle 11:** Die häufigsten in beiden Probentypen eines Kindes vorhandenen OTUs

OTU (gehörig zu Genus)	Gleichzeitiges Vorhandensein in beiden Probentypen
OTU 1606 (Streptococcus)	88,4%
OTU 2190 (Staphylococcus)	81,4%
OTU 9105 (Streptococcus)	52,3%
OTU 12812 (Moraxella)	43,0%
OTU 5064 (Neisseria)	39,5%
OTU 4507 (Actinobacillus)	38,4%
OTU 4511 (Corynebacterium)	36,0%
OTU 15992 (Gemella)	34,9%
OTU 14972 (Granulicatella)	34,9%
OTU 1076 (Veillonella)	30,2%
OTU 3464 (Haemophilus)	25,6%
OTU 5959 (Propionibacterium)	20,9%
OTU 13099 (Porphyromonas)	17,4%
OTU 11013 (Lactococcus)	16,3%
OTU 9956 (Kocuria)	15,1%
OTU 2484 (Finegoldia)	14,0%
OTU 14642 (Prevotella)	14,0%
OTU 7540 (Anaerococcus)	11,6%
OTU 15091 (Corynebacterium)	10,5%
OTU 658 (Acinetobacter)	10,5%
OTU 1344 (Acinetobacter)	10,5%
OTU 5039 (Veillonella)	10,5%

### 3.3.3 $\alpha$ -Diversität

Bei der  $\alpha$ -Diversitätsanalyse wies Matratzenstaub eine mit  $p < 0,01$  signifikant höhere *richness* (Anzahl an OTUs pro Probe) auf als die Nasenabstrichproben (hierzu auch Abbildung 23). Der Mittelwert betrug 251 OTUs pro Probe (SD=7), in Nasenabstrichproben waren es 93

OTUs (SD=10) (Tabelle 12). Mit einer zweieinhalbfach höheren Anzahl an OTUs pro Pro-



**Abbildung 23:** *Richness* von Nasenabstrich- und Matratzenstaubproben. In Matratzenstaub konnte eine signifikant ( $p < 0,01$ ) höhere *richness* nachgewiesen werden. Mittelwert = schwarzer horizontaler Balken (Werte in Tabelle 12).

be und einer Differenz im Durchschnitt von 158 OTUs zeigte Matratzenstaub deutlich mehr OTUs als die Nasenabstrichproben (Tabelle 12). Der *Shannon-Index* war bei Matratzenstaubproben mit 4,20 doppelt so hoch wie bei den Nasenabstrichproben (2,09).

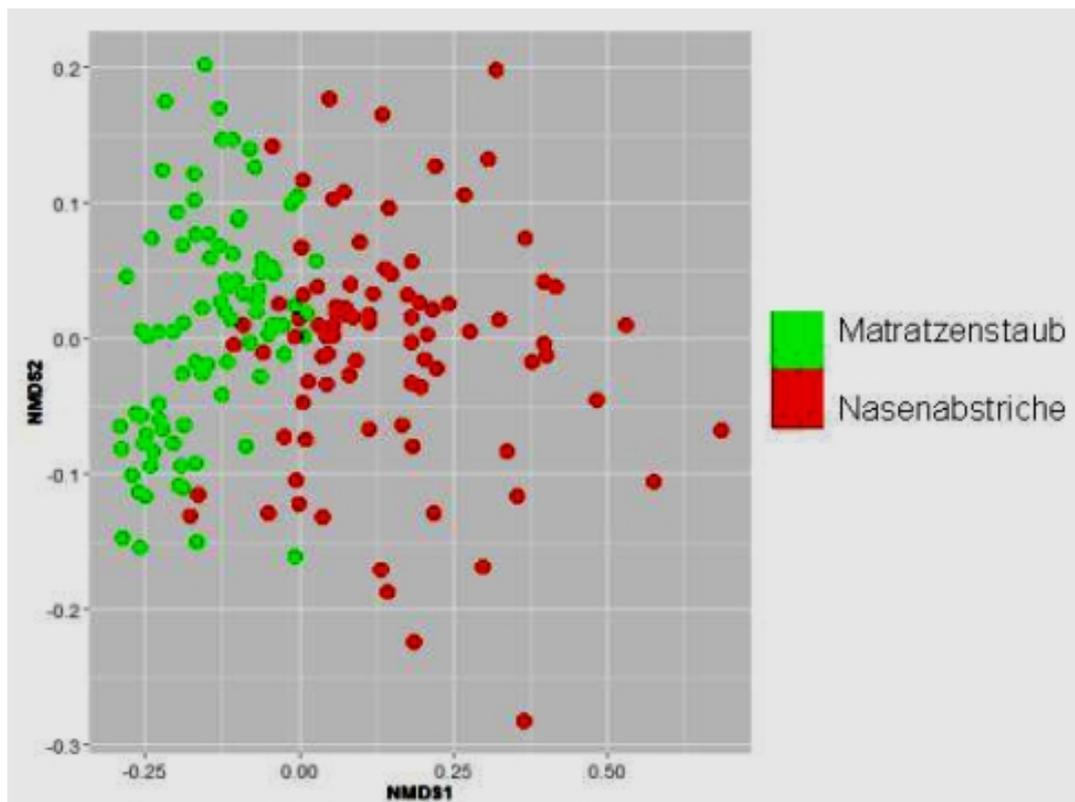
Die *evenness* als Maß für die Biodiversität einer Probe war bei Matratzenstaubproben mit 0,76 höher als mit 0,43 bei den Nasenabstrichproben. Dies bedeutete, dass die Spezies (repräsentiert durch die OTUs) in Matratzenstaub in einem ausgewogeneren Verhältnis zueinander standen als in den Nasenabstrichproben.

**Tabelle 12:** Mittelwert (und Standardfehler) für verschiedene Maße der Diversität

	Nasanabstrich	Matratzenstaub
Richness (Anzahl an OTUs pro Probe)	93,48 (10,05)	251,49 (7,43)
Shannon-Index	2,09 (0,17)	4,20 (0,06)
Evenness	0,46 (0,03)	0,76 (0,01)

### 3.3.4 $\beta$ -Diversität

Beim Vergleich der bakteriellen Zusammensetzung mittels *Nonmetric Multidimensional Scaling (NMDS)* durch *ungewichtete UniFrac* Analyse zeigten sich zwei deutlich voneinander unterscheidbare Verteilungsmuster (Abbildung 24). Jeder Punkt im Koordinatensystem repräsentierte eine Probe. Matratzenstaub- (grüne Punkte) und Nasenabstrichproben (rote Punkte) wiesen im Koordinatensystem einen deutlichen Abstand zueinander auf. Die Matratzenstaubproben lagen außerdem dichter beieinander. Die Mikrobiota der Nasenabstrichproben unterschied sich schlussfolgernd zwischen den einzelnen Proben mehr als in Matratzenstaubproben. *Gewichtete UniFrac* Analyse zeigte ähnliche Ergebnisse (Daten nicht angegeben).



**Abbildung 24:** Darstellung von *Nonmetric Multidimensional Scaling (NMDS)* durch *ungewichtete UniFrac* Analyse. Matratzenstaubproben (grüne Punkte) zeigten ein deutlich dichteres Verteilungsmuster als Nasenabstrichproben (rote Punkte).

### 3.3.5 Die Zusammensetzung der Mikrobiota von Bauernhofkindern und Kontrollen

Es zeigten sich in Nasenabstrich- und Matratzenstaubproben keine signifikanten Unterschiede zwischen Bauernhofkindern und Kontrollen im Hinblick auf die häufigen Phyla. Auch eine Betrachtung der seltenen Phyla als eine Gesamtvariable zeigte keine Unterschiede in der relativen Häufigkeit (Tabellen E6, E7, E8 und E9 in Kapitel 6).

Bei Nasenabstrichproben lagen auf Genus-Ebene keine signifikanten Unterschiede zwischen Bauernhof- und Referenzkindern vor (Tabelle 13).

In Matratzenstaub konnten bei Bauernhofkindern signifikant mehr seltene Genera, die als Gesamtvariable zusammengefasst wurden, festgestellt werden als bei den Referenzkindern ( $p < 0,0001$ ). Außerdem zeigte sich ein vermindertes relatives Vorkommen der Genera *Propionibacterium* ( $p = 0,0057$ ), *Finegoldia* ( $p = 0,0256$ ), *Neisseria* ( $p = 0,0013$ ), *Staphylococcus* ( $p = 0,0020$ ) und *Porphyromonas* ( $p = 0,0002$ ). Ein bereits auf Familienebene unklassifizierbares Genus *Uncultured*, war hingegen signifikant häufiger repräsentiert ( $p = 0,0018$ ). Es gehörte zur Familie der *Ruminococcaceae* (Phylum Firmicutes, Klasse Clostridia, Ordnung Clostridiales).

**Tabelle 13:** Auf Signifikanz beschränkte Unterschiede zwischen Bauernhofkindern und Referenzkindern. *Positive beta-Werte* bedeuten ein höheres relatives Vorkommen der zugehörigen Genera in Bauernhofkindern im Vergleich zu den Referenzkindern und *negative beta-Werte* erniedrigte Werte.

Taxon	Probentyp	Vorkommen in X % der Proben	Mittelwert der relativen Häufigkeit (%)	beta	p-Wert
<b>Genus (zugehörig zu Phylum)</b>					
Gesamtvariable seltene Genera $\leq 1\%$ repräsentiert	Matratzenstaub	100	34,2	0,106	<0,0001
Ruminococcaceae (Genus Uncultured) (Firmicutes)	Matratzenstaub	93	1,0	0,022	0,0018
Staphylococcus (Firmicutes)	Matratzenstaub	100	10,2	-0,037	0,0020
Finegoldia (Firmicutes)	Matratzenstaub	99	2,2	-0,012	0,0256
Propionibacterium (Actinobacteria)	Matratzenstaub	91	3,8	-0,025	0,0057
Porphyromonas (Bacteroidetes)	Matratzenstaub	98	1,5	-0,008	0,0002
Neisseria (Proteobacteria)	Matratzenstaub	94	1,5	-0,009	0,0013
<b>OTU (zugehörig zu Genus)</b>					
Gesamtvariable seltene OTUs Genera $\leq 1\%$ repräsentiert	Matratzenstaub	100	58,5	0,133	<0,0001
OTU 4511 (Corynebacterium)	Matratzenstaub	94	2,2	-0,012	0,0075
OTU 15091 (Corynebacterium)	Matratzenstaub	93	1,6	-0,007	0,0207
OTU 5959 (Propionibacterium)	Matratzenstaub	88	3,6	-0,023	0,0064
OTU 5064 (Neisseria)	Matratzenstaub	94	1,5	-0,009	0,0011
OTU 2190 (Staphylococcus)	Matratzenstaub	100	9,8	-0,036	0,0020

Nasenabstrichproben von Bauernhofkindern zeigten keine Unterschiede zwischen Bauernhof- und Referenzkindern im Hinblick auf die häufigen OTUs. Die Nasenschleimhaut wurde nicht signifikant durch die Tatsache, auf einem Bauernhof zu leben, beeinflusst.

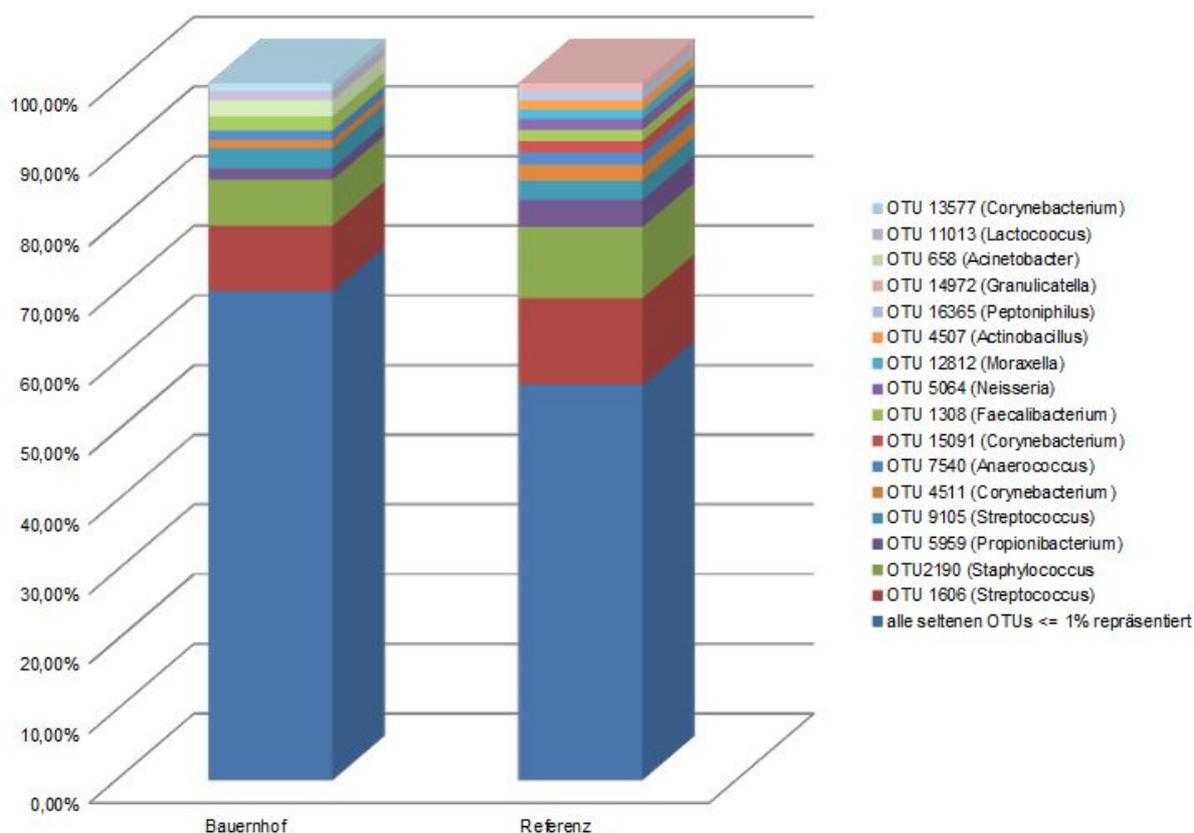
Für Matratzenstaub zeigten sich im Hinblick auf die häufigen OTUs zwischen Bauernhof- und Referenzgruppe einige Unterschiede (s. Abbildung 25): Bauernhofkinder wiesen im Gegensatz zur Referenzgruppe die OTU 658 (Genus *Acinetobacter*) mit 2,3 % und die OTU 11013 (Genus *Lactococcus*) mit 1,3 % auf. Im Gegensatz dazu waren sie bei den Referenzkindern innerhalb der seltenen OTUs zu  $\leq 1\%$  vertreten. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

Auffällig war aber, dass die OTU 658 im Matratzenstaub bei nur einem Bauernhofkind nicht

vorkam, aber bei den Referenzkindern 13 Kinder diese OTU nicht aufwiesen. Die OTU 11013 war, außer bei zwei Bauernhof- und drei Referenzkindern, in allen Matratzenstaubproben vorhanden.

Beim Vergleich mit der NCBI-Datenbank ergab sich für OTU 658 eine 100 % Übereinstimmung mit verschiedenen *Acinetobacter* Spezies. Die OTU 11013 zeigte beim Vergleich mit der NCBI-Datenbank eine 100 % Übereinstimmung mit *Lactococcus lactis*.

In Referenzkindern dagegen waren unter den häufigen OTUs die OTU 12812 (Genus *Moraxella*), die OTU 5064 (Genus *Neisseria*), die OTU 4507 (Genus *Actinobacillus*), die OTU 16365 (Genus *Peptoniphilus*) und die OTU 14972 (Genus *Granulicatella*). Die OTU 13577 (Genus *Corynebacterium*) war nur in der Bauernhof- und die OTU 15091 (ebenfalls Genus *Corynebacterium*) nur in der Referenzgruppe unter den häufigen OTUs zu finden.



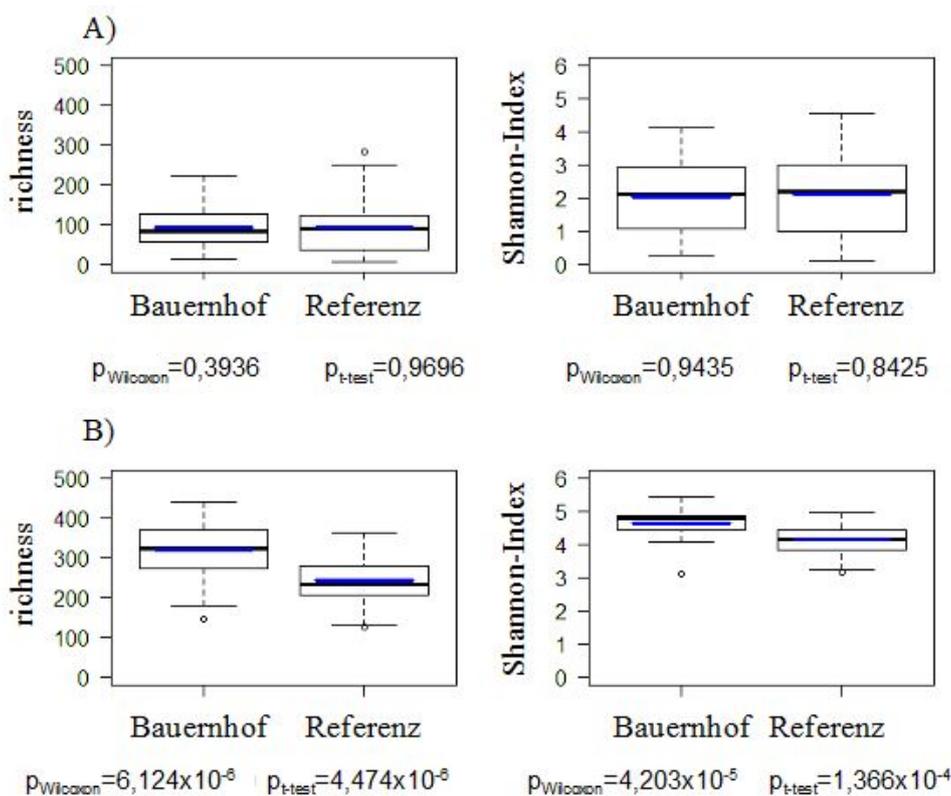
**Abbildung 25:** Vergleich der häufigen OTUs von Bauernhof- und Referenzkindern in Matratzenstaub

Bei den auf Signifikanz beschränkten Unterschieden (Tabelle 13) konnten deutlich mehr seltene OTUs in Matratzenstaub von Bauernhofkindern gesehen werden ( $p < 0,0001$ ). Dies bedingte, dass in den Bauernhofkindern nur 10 OTUs unter den häufigen vertreten waren im Vergleich zu den Referenzkindern, die 13 häufige OTUs aufwiesen.

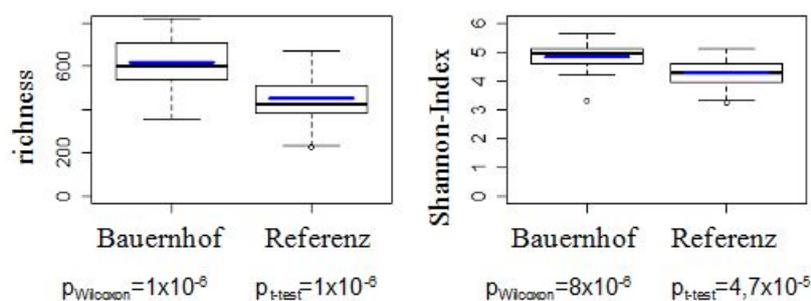
Matratzenstaubproben von Bauernhofkindern wiesen außerdem signifikant niedrigere Werte für die OTU 4511 (Genus *Corynebacterium*) ( $p = 0,0075$ ), OTU 15091 (Genus *Corynebacterium*) ( $p = 0,0207$ ), OTU 5959 (Genus *Propionibacterium*) ( $p = 0,0064$ ), OTU 5064 (Genus *Neisseria*) ( $p = 0,0011$ ) und OTU 2190 (Genus *Staphylococcus*) ( $p = 0,0020$ ) auf als die

Referenzgruppe.

Durch den Vergleich mit der NCBI-Datenbank konnten keine richtungsweisenden Aussagen getroffen werden, da die genannten OTUs zu 100 % vielen verschiedenen Spezies zugeordnet werden konnten. Matratzenstaubproben von Bauernhofkindern zeigten eine signifikant höhere *richness* und einen signifikant höheren *Shannon-Index* (B) in (Abbildung 26). Bei den Nasenabstrichproben gab es keinen Unterschied (A) in Abbildung 26. Die höhere *richness* konnte als Zeichen des bereits beschriebenen signifikant höheren Wertes für die Gesamtvariable der seltenen OTUs gesehen werden. Bei Matratzenstaub wurde dies bei einer Stichprobe von 5000 Sequenzen noch deutlicher (Reduktion der analysierten Proben auf  $n = 76$ , da 10 Kinder  $< 5000$  Sequenzen lieferten). Besonders die *richness* als Zeichen für eine erhöhte Anzahl an OTUs pro Matratzenstaubprobe nahm mit dem Wert 600 bei den Bauernhofkindern beinahe um das Doppelte zu (Abbildungen 26 und 27 im Vergleich).



**Abbildung 26:** Auf 1254 Sequenzen rarefizierte *richness* und *Shannon-Index* als Maß für die  $\alpha$ -Diversität in A) Nasenabstrichproben und B) Matratzenstaubproben getrennt für Bauernhof- und Referenzgruppe. Der blaue horizontale Balken stellt den Mittelwert, der schwarze horizontale Balken den Median dar.



**Abbildung 27:** Vergleich der *richness* im Matratzenstaub für Bauernhof- und Referenzkinder bei einer Stichprobe von 5000 Sequenzen. Die Gesamtzahl der Kinder reduzierte sich auf  $n=76$ , da 10 Kinder  $< 5000$  Sequenzen lieferten. Die *richness* steigt im Vergleich zu Abbildung 26 auf das Doppelte an. Der blaue horizontale Balken stellt den Mittelwert, der schwarze horizontale Balken den Median dar.

### 3.3.6 Die Zusammensetzung der bakteriellen Mikrobiota bei Asthmatikern und Kontrollen

Beim Vergleich von Asthmatikern und Kontrollen ließ sich in den Nasenabstrichproben auf Phylumebene ein signifikanter Unterschied feststellen: Die *Bacteroidetes* waren bei Kindern mit Asthma signifikant erniedrigt ( $p = 0,0402$ ) (Tabelle 14 für die auf Signifikanz beschränkten Assoziationen; s. Tabellen E10, E11, E12 und E13 in Kapitel 6 für alle Assoziationen). Für Matratzenstaub zeigte sich dieselbe, jedoch nicht signifikante Tendenz ( $p = 0,1018$ ). In beiden Probenarten zeigte sich eine Tendenz für ein vermehrtes Auftreten an *Firmicutes*.

Als Korrelat dieses reduzierten Vorkommens der *Bacteroidetes* in Nasenabstrichproben von Asthmatikern konnten auf Genus-Ebene signifikant erniedrigte relative Häufigkeiten für *Porphyromonas* ( $p = 0,0445$ ) (Phylum *Bacteroidetes*) und *Prevotella* ( $p = 0,0372$ ) (Phylum *Bacteroidetes*) festgestellt werden. Für Matratzenstaub waren in „inverser Parallelität“ zu Bauernhofkindern bei Asthmatikern die seltenen Genera, als Gesamtvariable zusammengefasst, signifikant erniedrigt ( $p = 0,0075$ ). Außerdem war das Genus *Corynebacterium* signifikant häufiger bei Asthmatikern als bei den Kontrollen ( $p = 0,0189$ ) (Tabelle 14) anzutreffen.

Im Hinblick auf die häufigen OTUs fanden sich für Nasenabstrichproben keine signifikanten Assoziationen.

Parallel zu den Genera und OTUs bei Bauernhofkindern und ebenso wie bei Asthmatikern auf Genus-Ebene waren die als Gesamtvariable zusammengefassten seltenen OTUs in Matratzenstaub erniedrigt ( $p = 0,0026$ ). Es bestand somit eine konsistente „inverse Parallelität“ der seltenen Genera/OTUs mit Bauernhofkindern und Asthmatikern. Außerdem war die OTU 9015 (Genus *Streptococcus*) signifikant mit Asthma assoziiert ( $p = 0,0496$ ) (Tabelle 14). Diese OTU konnte, wie bereits erwähnt, bei der Analyse mit der NCBI-Datenbank eine 100 % Ähnlichkeit zu *Streptococcus salivarius* und *Streptococcus thermophilus* aufweisen.

Auch adjustiert für Bauernhof-Exposition zeigten sich die gleichen Assoziationen (Daten nicht angegeben).

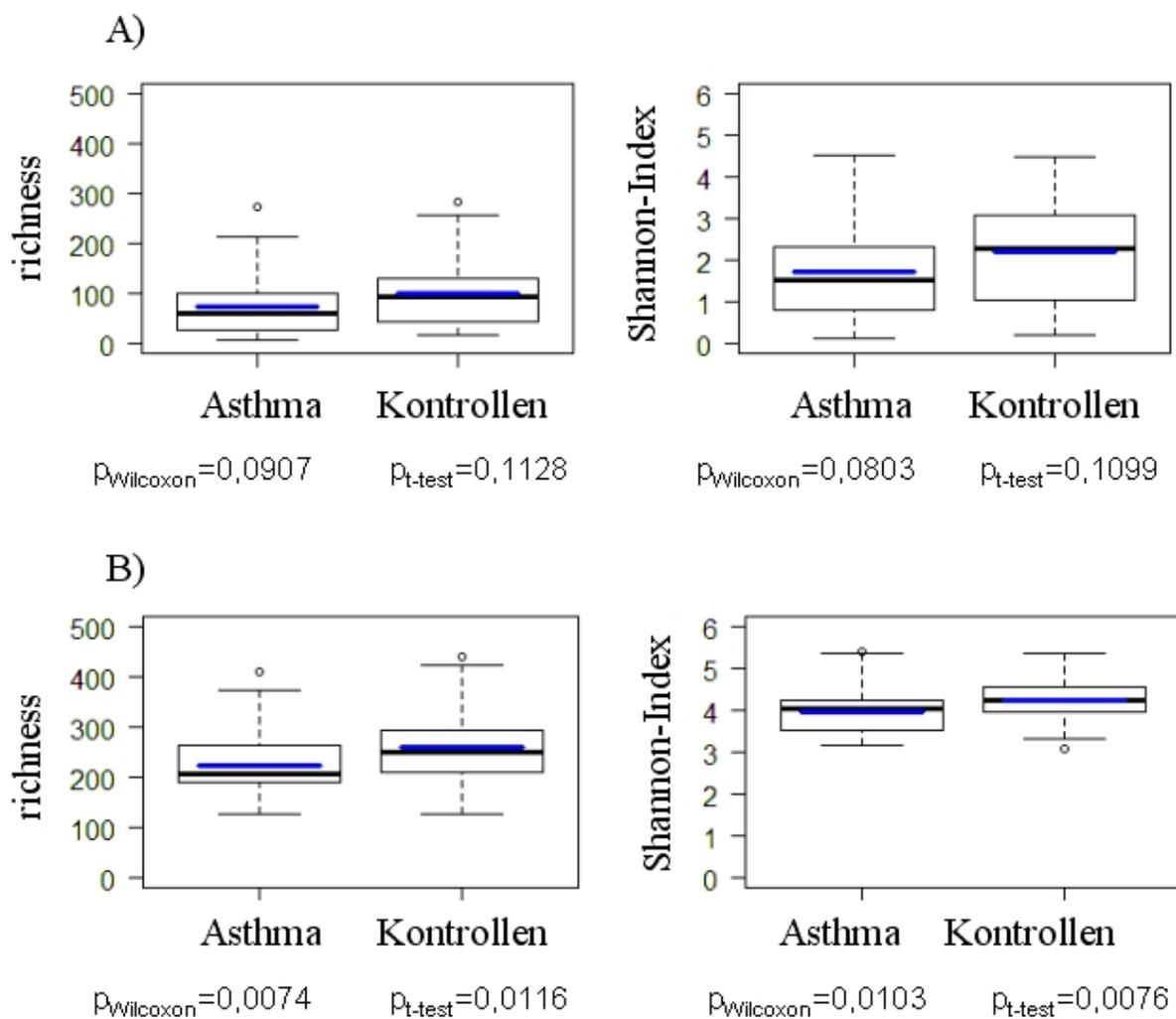
Die  $\alpha$ -Diversitätsanalyse ergab bei den Matratzenstaubproben sowohl eine signifikant höhere bakterielle *richness* ( $p = 0,0116$ ), als auch einen signifikant höheren *Shannon-Index*

**Tabelle 14:** Auf Signifikanz beschränkte Unterschiede zwischen Asthmatikern und Kontrollen. *Positive beta-Werte* bedeuten ein höheres relatives Vorkommen der zugehörigen Genera in Asthmatikern im Vergleich zu den Kontrollen und *negative beta-Werte* erniedrigte Werte.

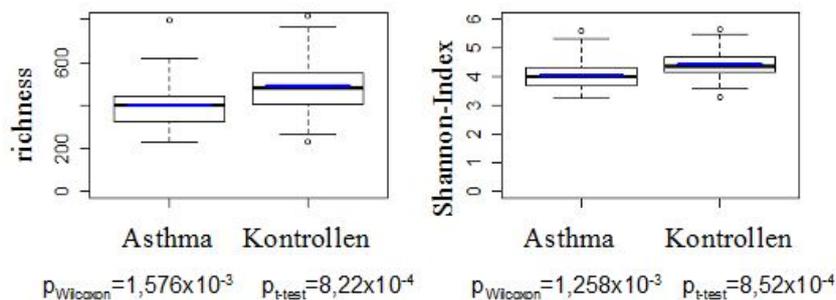
TABELLE 14					
Taxon		Vorkommen in X % der Proben	Mittelwert der relativen Häufigkeit (%)	beta	p-Wert
<b>Phylum</b>					
Bacteroidetes	Nasenabstrich	95	4,46	-0,0215	0,0401
<b>Genus (zugehörig zu Phylum)</b>					
Gesamtvariable seltene Genera	Matratzenstaub	100	34,18	-0,067	0,0075
Corynebacterium (Actinobacteria)	Matratzenstaub	95	5,67	0,028	0,0189
Prevotella (Bacteroidetes)	Nasenabstrich	88	1,78	-0,012	0,0372
Porphyromonas (Bacteroidetes)	Nasenabstrich	78	1,09	-0,007	0,0445
<b>OTUs (zugehörig zu Genera)</b>					
Gesamtvariable seltene OTUs	Matratzenstaub	100	58,49	-0,083	0,0026
OTU 9105 (Streptococcus)	Matratzenstaub	100	2,76	0,009	0,0496

( $p = 0,0076$ ) bei den Kontrollen. Auch bei den Nasenabstrichproben war diese Tendenz, jedoch nicht statistisch signifikant, zu beobachten (Abbildung 28). Der *Asthma-Effekt* konnte somit bei Matratzenstaub (Abbildung der Umweltexposition) bestätigt werden. Für eine höhere Stichprobe von 5000 Sequenzen in Matratzenstaub (Reduktion der Gesamtzahl der Kinder auf 76, da 10 Kinder  $< 5000$  Sequenzen lieferten) wurde dieses Ergebnis noch deutlicher. Hier zeigten sich für die *richness* ( $p = 0,000822$ ) und den *Shannon-Index* ( $p = 0,0008$ ) noch deutlichere p-Werte (Abbildung 29).

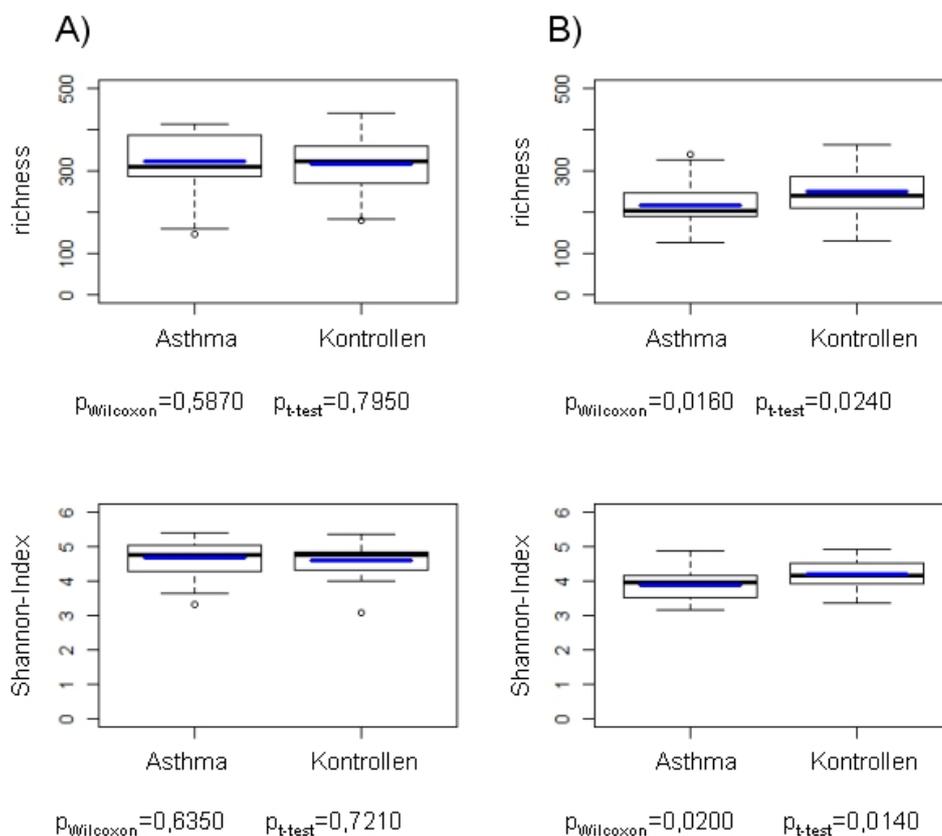
Wurde zusätzlich zur Einteilung in Asthmatischer und Kontrollen eine Trennung für Bauernhof- und Referenzkinder vorgenommen, so zeigte sich nur noch bei den Referenzkindern mit Asthma eine im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erniedrigte  $\alpha$ -Diversität in Matratzenstaub (Abbildung 30), der Median war aber auch bei den Bauernhofkindern mit Asthma im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt. Bei den Nasenabstrichproben gab es bei gleicher Einteilung keine signifikanten Veränderungen, jedoch ließ sich in der Referenzgruppe derselbe Trend beobachten wie bei den Matratzenstaubproben (Abbildung 31).



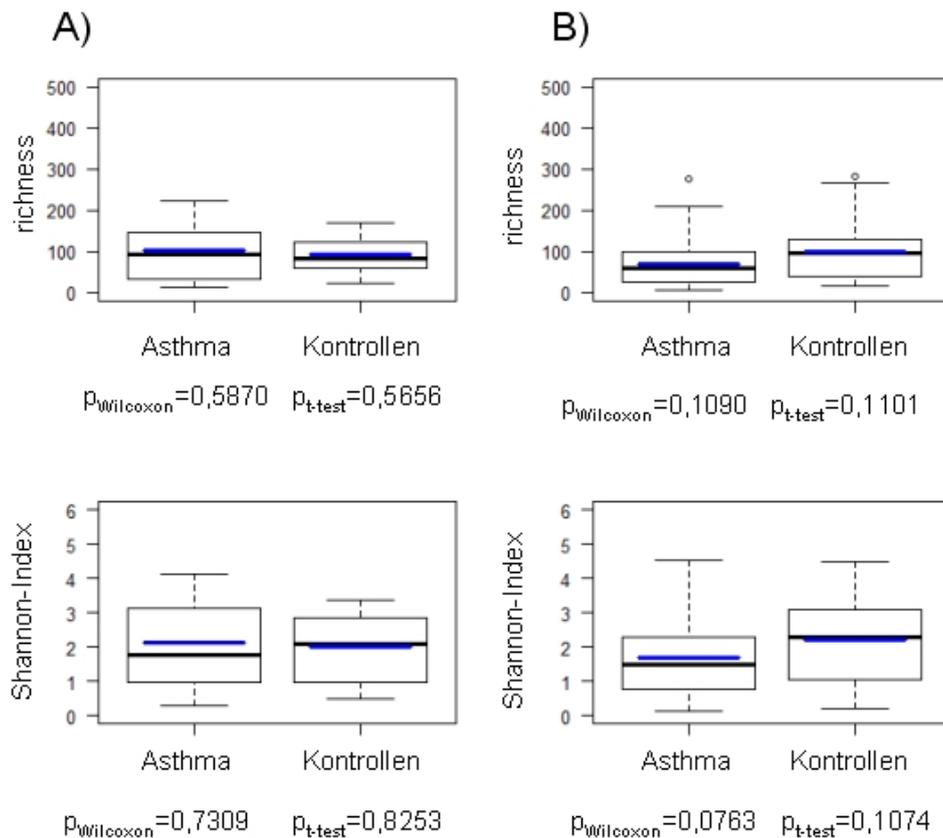
**Abbildung 28:** Analyse der *richness* und des *Shannon-Index* für A) Nasenabstrichproben und B) Matratzenstaubproben. Der blaue horizontale Balken stellt den Mittelwert, der schwarze horizontale Balken den Median dar.



**Abbildung 29:** Vergleich der *richness* im Matratzenstaub für Asthmatiker und Kontrollen bei einer Stichprobe von 5000 Sequenzen: Die analysierten Proben reduzieren sich auf  $n = 76$ , da 10 Kinder  $< 5000$  Sequenzen lieferten. Der Unterschied der *richness* zwischen Asthmatikern und Kontrollen wird noch deutlicher (s. im Vergleich dazu B) in Abbildung 28). Der blaue horizontale Balken stellt den Mittelwert, der schwarze horizontale Balken den Median dar.



**Abbildung 30:** *Richness* von Matratzenstaub bei Bauernhof- und Referenzkindern mit und ohne Erkrankung an Asthma. In A) sind die Bauernhofkinder und in B) die Referenzkinder dargestellt. Der blaue horizontale Balken stellt den Mittelwert, der schwarze horizontale Balken den Median dar.



**Abbildung 31:** *Richness* von Nasenabstrichproben bei Bauernhof- und Referenzkindern mit und ohne Erkrankung an Asthma. In A) sind die Bauernhofkinder und in B) die Referenzkinder dargestellt. Der blaue horizontale Balken stellt den Mittelwert, der schwarze horizontale Balken den Median dar.

Aufgrund der Tatsache, dass *Bauernhofkinder* im Matratzenstaub eine höhere *richness* aufweisen als Referenzkinder und Asthmatiker in Matratzenstaub eine niedrigere *richness* hatten als die Kontrollgruppe, wurde untersucht, ob die *richness* den *Bauernhof-Effekt* erklären konnte. Für die Beurteilung wurde der *change in estimate* herangezogen: In dieser Studienpopulation war das Verhältnis für eine Erkrankung an Asthma bei Bauernhofkindern und Referenzkindern:

$$\text{estimate} = \frac{\text{Bauernhofkind mit Asthma}}{\text{Referenzkind mit Asthma}} = (-0,5268)$$

Bei Adjustierung für die *richness* lag der estimate für Bauernhof bei estimate = (0,232467). Für den *change in estimate* galt:

$$\frac{-0,5268 - 0,232467}{-0,5268} \cdot 100\% = 144,13\%$$

→ Der *Bauernhof-Effekt* war also vollständig durch die Variable *richness* zu erklären, der Schätzer drehte sich sogar um.

### 3.3.7 Auswirkung einer Infektion der oberen Atemwege auf die mikrobielle Zusammensetzung und Diversität

Bei der Abnahme der Nasenabstrichproben wurde bei 13 der 86 Studienkinder aktuell ein Infekt der oberen Atemwege, definiert als sichtbar laufende Nase oder sichtbare Erkältung, festgestellt. Diese Kinder wurden auf gehäuftes Auftreten der Genera *Moraxella*, *Streptococcus* und *Haemophilus* untersucht. Die Probenabnahme erfolgte in der Schule, weshalb von einem Infekt ohne Fieber und keiner oder nur einer geringen Beeinträchtigung des Gesundheitszustandes ausgegangen werden konnte. Es konnten keine signifikanten Assoziationen zwischen einem Infekt und der relativen Häufigkeit der untersuchten Genera festgestellt werden. Die mögliche Störvariable „akuter Infekt der oberen Atemwege“ mit den typischen Bakterien konnte somit weitgehend ausgeschlossen werden.

## 4 Diskussion

### 4.1 Stärken und Grenzen der eingesetzten Methoden

Die Hauptziele dieser Studie waren die Erfassung der bakteriellen Diversität der Mikrobiota von Matratzenstaub- und Nasenabstrichproben sowie die Analyse ihrer taxonomischen Zusammensetzung. Diese Arbeit sollte eine Ergänzung und Weiterführung der durch Kultivierung und SSCP-Analyse festgestellten inversen Korrelation zwischen der mikrobiellen Exposition und Asthma (Ege et al., 2011) darstellen. Der entscheidende Vorteil der *454-Pyrosequenzierung* im Vergleich zu den früheren Verfahren ist die parallele Erfassung der Bakterien bei hohem Durchsatz und relativ geringen Kosten (Ronaghi, 2001).

Weil die *454-Pyrosequenzierung* die 16S rRNA Amplikons sequenziert, die vorher durch PCR vervielfältigt werden, können theoretisch alle Bakterien in einer Probe erfasst werden. Jedes Bakterium enthält nämlich das 16S rRNA-Gen.

Nach der parallelen Sequenzierung, bei der alle Proben eines Probenotyps gemischt vorlagen, konnte durch die Barcodesequenz außerdem eine eindeutige Zuordnung der Sequenzen zur jeweiligen Probe, in der sie vorkamen, erfolgen. Durch die Analyse der Sequenzen war es weiterhin möglich zu bestimmen, welche Bakterien in der jeweiligen Probe vorhanden waren. Die erzeugten Rohsequenzen hatten nach der Sequenzierung zunächst eine Länge von ca. 500 bp, nach dem Durchlaufen von *Ampliconnoise* waren die Sequenzen auf max. 400 bp getrimmt. Mit dieser Länge konnte meist eine eindeutige taxonomische Zuordnung auf Genus-Ebene erfolgen. Durch das Herausgreifen einer repräsentativen OTU für alle Sequenzen, die zu 97 % übereinstimmten, konnten teilweise sogar Aussagen auf Spezies-Ebene getroffen und durch das Vergleichen mit der NCBI-Datenbank Ähnlichkeiten zu den in der Datenbank hinterlegten Bakterienspezies ermittelt werden.

Weil die taxonomische Zuordnung anhand der erzeugten Sequenz erfolgt, wird deutlich, dass eine fehlerfreie Sequenz die Grundlage hierfür darstellt. In diesem Punkt gab es bei der *454-Pyrosequenzierung* einige Risiken. Fehler konnten auftreten, wenn als Nukleotidsequenz *Homopolymere* (mehrere identische Basen, z. B. CCC) aufeinanderfolgten. Die Kamera kann beim eigentlichen Sequenzierschritt aufgrund der schnellen Abfolge der Lichtblitze und infolge des Grenzwerts der Lichtintensität, ab dem ein Nukleotideinbau als stattgefunden angenommen wird, eine Insertion oder Deletion von Basen in der Sequenz erzeugen (Quinlan et al., 2008). Auch wenn mehrere nicht identische Fragmente an ein Bead binden, kann die Kamera kein fragmentspezifisches Signal detektieren (Huse et al., 2007). Falls die zwischen jedem Zyklus durchgeführten Waschvorgänge nicht alle Reagenzien entfernen, können daraus Fehler in der Synthese des Komplementärstrangs entstehen (Margulies et al., 2005).

Die durchschnittliche Fehlerrate wegen Deletion, Insertion, Mismatches und nicht eindeutig zu benennender Basen bei der Pyrosequenzierung beträgt 0,50 % (Luo et al., 2012) bis 1,07 % (Gilles et al., 2011). Durch die Prozessierung der gewonnenen Rohdaten und durch das Filtern und Bereinigen können diese nicht vermeidbaren Probleme jedoch minimiert werden. *Illumina*, eine Sequenzierfirma mit derzeit hohem Marktanteil, nutzt das Prinzip der Brückensynthese, bei der an beiden Enden der zunächst doppelsträngigen DNA zwei verschiedene DNA-Adaptoren binden. Die DNA wird denaturiert und das Fragment weiterhin einzelsträngig von beiden Enden vervielfältigt (Illumina, 2012; Liu et al., 2012). Infolge der Weiterent-

wicklung der Next-Generation-Sequencing-Verfahren in den letzten Jahren ist *Illumina* nun in der Lage, durch Zusammenfügen der gepaarten Sequenzen Fragmentlängen zu generieren, die mit der *454-Pyrosequenzierung* vergleichbar sind (Illumina, 2012; Nelson et al., 2014).

Zum Zeitpunkt der Projektplanung war dies mittels *Illumina*-Verfahren, die eine höhere Sequenzzahl bei niedrigeren Kosten pro Base bieten, aber noch nicht möglich (Luo et al., 2012). Außerdem waren die Ergebnisse damals noch von geringerer Qualität als die Analysen mit der *454-Pyrosequenzierung* (Degnan und Ocham, 2012). Aktuelle Studien zeigen nun, dass die Ergebnisse der *454-Pyrosequenzierung* und von *Illumina* vergleichbar sind und auch kombiniert werden können, sofern sie mit denselben Methoden prozessiert und analysiert werden (Sinclair et al., 2015).

Grundvoraussetzung für eine gute Sequenzierung ist jedoch die Erstellung einer qualitativ hochwertigen DNA-Bibliothek. Die DNA-Extraktion von Matratzenstaub und Nasenabstrichproben erfolgte aufgrund der unterschiedlichen Materialbeschaffenheit mit zwei verschiedenen Extraktionskits.

Bei der Etablierung und Optimierung dieser Methoden mussten das DNA-Einsatz-Volumen und die Zyklenzahl für die Nasenabstrichproben erhöht und die Aufreinigungsschritte angepasst werden. Je mehr Zyklen bei der PCR durchgeführt werden, desto wahrscheinlicher ist bei der Analyse der taxonomischen Zusammensetzung eine Verzerrung der relativen Häufigkeit durch unterschiedlich gute Amplifikation des 16S rRNA-Gen-Fragments.

Die bakterielle *richness* wird dabei hauptsächlich durch das Auftreten von chimären Sequenzen überschätzt. Diese Gefahr wurde durch die Verwendung einer thermostabilen Polymerase, die eine geringere Anzahl an chimären Sequenzen erzeugt, reduziert (Ahn et al., 2012).

Da Matratzenstaub trotz der geringeren Zyklenzahl eine höhere *richness* aufwies, kann die wahre Differenz höchstens unterschätzt worden und noch deutlicher ausgeprägt sein.

Diese Unterschiede müssen beim direkten Vergleich der beiden Probenotypen beachtet werden. Ohne die Optimierungsschritte bei den Nasenabstrichproben wäre jedoch eine effiziente *454-Pyrosequenzierung* nicht möglich gewesen.

Beim Studiendesign handelte es sich um eine retrospektive Studie mit *Fällen* (Erkrankung an Asthma) und *Kontrollen* (gesunde Kinder). Demnach kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob sich die Mikrobiota veränderte, weil eine Erkrankung an Asthma vorlag, oder ob eine Veränderung der Mikrobiota zu einer Asthmaerkrankung führte. Die Kausalität kann also nicht geklärt werden.

Ein Beweis könnte nur durch eine prospektive Studie erfolgen. Zu Beginn, im Verlauf und nach einem definierten Endpunkt müssten Untersuchungen auf Asthma erfolgen, Proben abgenommen werden und signifikante Unterschiede erkennbar sein. Die Bauernhof- und Referenzkinder müssten von Geburt an oder besser noch im Mutterleib beobachtet werden, weil die Bauernhofumgebung in der frühen Kindheit und „in utero“ besonders stark vor einer Asthmaerkrankung schützt (Wlasiuk und Vercelli, 2012).

Ein entscheidender Vorteil dieser Studie war jedoch, dass etwa gleich große Gruppen in den vier Strata gebildet werden und aussagekräftige statistische Analysen erfolgen konnten. Die Ergebnisse wurden in einem weiteren Schritt auf die Ausgangspopulation zurückgewichtet. Bei der Analyse zu beachten war die relativ geringe statistische Power. Einige erkennbare

Tendenzen wären bei einer größeren Stichprobe an Studienkindern möglicherweise signifikant gewesen.

Jedoch war die Größe der Stichprobe für eine „Pilotstudie“ und zur Etablierung der Next-Generation-Sequencing-Analyse an zwei verschiedenen Probentypen sehr angemessen gewählt.

Bei der Abnahme der Nasenabstrichproben litten 13 Kinder an einer Erkältung. Die Probenentnahme fand in der Schule statt, weshalb ein guter oder höchstens gering reduzierter Allgemeinzustand angenommen werden kann. Spezies der Genera *Haemophilus*, *Streptococcus* und *Moraxella* sind die typischen Verursacher einer *bakteriellen Superinfektion* bei einem viralen Infekt (Anon et al., 2004). Es lag kein signifikanter Unterschied zwischen erkälteten Kindern und gesunden Kindern vor, weshalb ein *rein viraler Infekt* angenommen und die Erkältung als Störvariable weitgehend ausgeschlossen werden kann.

Das *recall bias*, eine Verzerrung der Ergebnisse durch falsche Erinnerung, gilt als häufiges Problem der retrospektiven Studie. Es kann in Bezug auf die Exposition (Bauernhofkind und nicht auf einem Bauernhof lebendes Referenzkind) als gering eingestuft werden. Da die Kinder zusätzlich alle aus derselben ländlichen Umgebung stammten, konnte die Bauernhofkomponente gut untersucht werden und der Einfluss anderer Umweltstörvariablen wurde minimiert.

Für die Variable *Erkrankung an Asthma* wurde eine breite Asthmadefinition (Illi et al., 2012) gewählt (Kapitel 2.1). Dadurch konnten auch milder verlaufende und nicht atopische Asthma-Phänotypen besser erfasst werden und gewichtete Analysen unproblematischer durchgeführt werden. Dies konnte besonders unter der Voraussetzung erfolgen, dass sich bei der GABRIELA Studie der *Bauernhof-Effekt* durch die Anwendung einer breiten Asthmadefinition nicht veränderte (Illi et al., 2012).

Die hier vorgestellten Ergebnisse wurden unter Einschluss sogenannter *Singletons* berechnet. Das bedeutet, dass Sequenzen, die bei der Sequenzierung nur einmalig vorkamen, nicht gefiltert, sondern in die Berechnung aufgenommen wurden. Einerseits können dadurch auch sehr seltene Bakterien miterfasst werden. Andererseits kann es sich hier aber auch um fehlerhafte Sequenzen handeln. Die Diversität kann dadurch überschätzt werden.

In der aus den Daten hervorgegangenen Publikation (Birzele et al., 2016) wurden die *Singletons* herausgefiltert. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit und der Publikation unterscheiden sich nur in äußerst geringem Maß. Die entscheidenden Aussagen bleiben erhalten, was für eine hohe Datenvalidität spricht.

## 4.2 Matratzenstaubproben haben eine höhere $\alpha$ -Diversität, Nasenabstrichproben dagegen eine höhere $\beta$ -Diversität

Bei der Beurteilung der Ergebnisse sollte zunächst ein kurzer Blick auf die Sammlung des Probenmaterials geworfen werden:

Eine Nasenabstrichprobe stellte das Resultat aus dem Abstreichen einer Fläche von ein paar  $\text{cm}^2$  der vorderen Nasenhöhle dar. Nicht nur Bakterien, sondern auch menschliche Zellen, Nasensekret und gefilterte Partikel konnten in ihr vorhanden sein. Die Nasenabstrichprobe war

eine Momentaufnahme. Es konnte zu starken quantitativen interindividuellen Unterschieden kommen.

Eine Matratzenstaubprobe wurde dagegen durch das Absaugen der Matratze für zwei Minuten gewonnen. Diese besaß eine deutlich größere Fläche als die Nasenschleimhaut. Der Staub hatte sich über einen längeren Zeitraum angesammelt und jede Probe bestand aus einer definierten Menge von 30 mg an Matratzenstaub.

Bereits die Gesamt-DNA-Konzentrationen waren nach der DNA-Extraktion in Matratzenstaub deutlich höher. Da bei diesem Schritt DNA jeden Ursprungs extrahiert und gemessen wurde, war unbekannt, welcher Anteil davon bakterieller DNA zuzuordnen war. Es bestand jedoch die Möglichkeit für eine höhere bakterielle DNA-Konzentration in Matratzenstaub. Dies wurde bekräftigt durch die Notwendigkeit eines höheren DNA-Einsatzes pro Nasenabstrichprobe bei der Erstellung der Amplikons im Vergleich zu den Matratzenstaubproben.

Um diese große Menge an seltenen Bakterien besser beurteilen zu können, wurden die seltenen ( $\leq 1\%$ ) Genera und OTUs als eine Gesamtvariable angesehen. Auch wenn dadurch keine klaren Aussagen gemacht werden konnten, was sich hinter diesem Begriff verbarg, konnten mit dieser Variable statistische Berechnungen durchgeführt und die Vielfalt der Bakterien anschaulich beurteilt werden. Der Begriff *häufig* wurde für die Genera und OTUs, die zu  $> 1\%$  vertreten waren, verwendet.

In der aus der Arbeit hervorgegangenen Publikation wurden zusätzlich die Assoziationen mit OTUs, die zu  $\leq 1\%$  repräsentiert waren, betrachtet. So war die Bauernhofumgebung signifikant assoziiert mit OTUs, die folgenden Genera zugeordnet werden konnten: *Planococcus*, *Pseudomonas*, *Alistipes*, *Bacteroides* und zwei unklassifizierten OTUs der Familie der *Ruminococcaceae*. Letztere konnten auch auf Genusebene, hier ebenfalls nicht näher klassifizierbar, als signifikant erhöht bei Bauernhofkindern identifiziert werden. Auf den Ursprung der *Ruminococcaceae* wird in Kapitel 4.6 näher eingegangen.

Bei einer dichotomen Analyse, die die Daten auf An- und Abwesenheit bestimmter Bakterien untersucht, sah man zudem ein signifikant häufigeres Vorkommen von Bakterien aus den Genera *Clostridium* (Familie *Clostridiaceae*) und *Facklamia* (Familie *Aerococcaceae*) sowie einer OTU, die auf Familienebene den *Ruminococcaceae* zugeordnet werden konnte (Genus *unclassified*). Alle oben genannten Bakterien kommen natürlicherweise im Magen-Darm-Trakt von Rindern sowie in Milchproben vor (Birzele et al., 2016; Rasolofo et al., 2010; Takamatsu et al., 2010).

Betrachtete man nun die Ergebnisse der Diversitätsanalyse, so konnte eine höhere durchschnittliche Anzahl an OTUs pro Matratzenstaubprobe im Vergleich zu den Nasenabstrichproben festgestellt werden. Dies bedeutete eine höhere *richness*. Hierfür waren sowohl die häufigen OTUs als auch die seltenen OTUs verantwortlich. Der *Shannon-Index* zeigte einen doppelt so hohen Wert in Matratzenstaub im Vergleich zu Nasenabstrichproben. Auch waren die OTUs in Matratzenstaub in einem ausgewogeneren Verhältnis vorhanden als in den Nasenabstrichproben, was die höhere *evenness* in Matratzenstaub widerspiegelte.

Die Werte für *richness*, *Shannon-Index* und *evenness* sprachen also für eine höhere  $\alpha$ -Diversität von Matratzenstaub. Diese Ergebnisse ließen schon vermuten, dass Matratzenstaub in seiner bakteriellen Zusammensetzung durch viele verschiedene Einflüsse geprägt wurde. Die Nasen-

schleimhaut eines Kindes schien dagegen im Durchschnitt weniger unterschiedliche Bakterien aufzuweisen, wobei der Einfluss einiger Bakterienspezies auf die Mikrobiota möglicherweise stärker ausgeprägt war. Dies könnte für eine Kolonisierung mit bestimmten Bakterien sprechen.

Interessant war die Tatsache, dass sich die Kinder hinsichtlich ihrer Zusammensetzung an OTUs weniger im Matratzenstaub als in den Nasenabstrichen unterschieden, obwohl mehr OTUs in der Matratze zu finden waren.

Eine mögliche Erklärung dafür könnte der vermutete hohe Anteil von Hautbakterien in Matratzenstaub (Täubel et al., 2009) sein, die die weniger stark ausgeprägten interindividuellen Unterschiede verursachten. Außerdem ist die Matratze zudem kein Lebewesen, das durch Produktion von Sekreten, Abwehrstoffen und immunmodulatorischen Prozessen *agieren* und *reagieren* kann wie die Nasenschleimhaut als Teil des Menschen. Auch das könnte die größeren interindividuellen Unterschiede der Nasenabstrichproben erklären.

Eine hohe  $\beta$ -Diversität in Nasenabstrichproben wurde auch schon früher beschrieben (Human Microbiome Project, Consortium, 2012). Das könnte bedeuten, dass jeder Mensch in der Nase eine für ihn typische Mikrobiota aufweist, vergleichbar mit einem „Fingerabdruck“. Ähnliches konnte bei Mika et al. (2015) gesehen werden. Hier wurde die Nasenschleimhaut von Säuglingen untersucht. Die Proben wurden in zweiwöchigem Abstand innerhalb des ersten Lebensjahres abgenommen. Man konnte sehen, dass sich die Proben eines Säuglings zu den verschiedenen Zeitpunkten weniger stark unterschieden als die Proben der Kinder untereinander, was als „personalisierte Mikrobiota“ interpretiert wurde (Mika et al., 2015). Diese stark individuell geprägte Mikrobiota konnte auch schon im Nasopharynx beobachtet werden (Bogaert et al., 2011).

Außerdem sollte berücksichtigt werden, dass die Nase eine Filterfunktion hat. An den Nasenhaaren können Bakterien und mit Bakterien behaftete Partikel haften bleiben. Durch die *mukoziliäre Clearance*, Atmen, Niesen und Schneuzen können die Bakterien in der Nase bewegt und entfernt werden. Da in der vorliegenden GABRIELA Studie nicht mehrere Proben zu verschiedenen Zeitpunkten abgenommen wurden, kann dies als Ursache für die interindividuellen Unterschiede ebenso infrage kommen. Hätte man mehrere Male Abstriche zu verschiedenen Zeitpunkten genommen, wäre das komplette Bild an Nasenbakterien genauer erfasst worden. Berücksichtigt werden sollten bei dieser Überlegung aber die Ergebnisse von Mika et al. (2015), die nur geringe Unterschiede in der Mikrobiota zu verschiedenen Zeitpunkten feststellten.

Die großen interindividuellen Unterschiede bei den Nasenabstrichproben sowohl im Hinblick darauf, welche Bakterien vorkamen (hohe  $\beta$ -Diversität) als auch, in welchem Prozentsatz sie vorkamen (niedrige *evenness*), könnten in Anbetracht der Ergebnisse dafür sprechen, dass jeder Mensch, auch in der Nase, seine eigene Mikrobiota aufweist und sich dadurch von anderen Menschen gut unterscheiden lässt. Die höhere *richness* und der höhere *Shannon-Index* in Matratzenstaub könnten hingegen den hohen Umwelteinfluss widerspiegeln. Die niedrigere  $\alpha$ -Diversität der Nasenabstrichproben im Vergleich zu Matratzenstaub könnte dafür sprechen, dass einige bestimmte Bakterien das Nasenschleimhautmilieu als Lebensraum bevorzugen und sich dort ansiedeln. Es kann diskutiert werden, dass dies eine niedrigere Anzahl an Bakteri-

enspezies pro Nasenabstrich bedingt, weil die kolonisierten Bakterien das Ansiedeln anderer Bakterien verhindern.

### 4.3 Die bakterielle Zusammensetzung in Nasenabstrichen und Matratzenstaub

Die beiden Probenotypen wiesen auf Phylum-Ebene eine unterschiedliche quantitative Zusammensetzung auf. *Proteobacteria* waren in Nasenabstrichproben, *Firmicutes* in Matratzenstaub vorherrschend.

Auf Genus-Ebene zeigten die beiden Probenotypen eine ähnliche relative Häufigkeit von *Streptococcus*. Auch die Genera *Staphylococcus*, *Propionibacterium* und *Corynebacterium* waren ähnlich stark vertreten und werden als typische Hautbakterien bezeichnet. Diese Bakterien machen 60 % der Hautbakterien aus (Belkaid und Segre, 2014; Grice et al., 2009; Scharschmidt und Fischbach, 2014). Hier waren es bei beiden Proben unter 20 %. Diese Beobachtung der Übereinstimmung in epidermalen Bakterien konnte auch auf OTU-Ebene gesehen werden.

Matratzenstaub bestand aus beinahe doppelt so vielen häufigen Genera (> 1% repräsentiert). Jedoch lagen 16 der 22 Genera nur zwischen 1 % und 2 % und waren somit nahe der seltenen Genera ( $\leq 1\%$  repräsentiert). Die seltenen Genera deckten in Matratzenstaub mehr als ein Drittel aller Genera ab. In Nasenabstrichproben waren nur halb so viele seltene Genera vorhanden.

Ein besonders markanter Unterschied war der hohe Prozentsatz von *Moraxella* und *Haemophilus* in Nasenabstrichproben im Vergleich zu Matratzenstaub.

Da sich ein Genus aus mehreren Spezies zusammensetzt und eine OTU bei der Analyse eine Spezies darstellen sollte, gab es deutlich mehr OTUS als Genera, die aber zu einem geringeren Prozentsatz vertreten waren. Dadurch fielen viele OTUs unter den relativen Wert von 1 % und wurden als seltene OTU bezeichnet. Weil vorher bei Matratzenstaub viele Genera zwischen 1 % und 2 % repräsentiert waren und nun die OTUs eines Genus den seltenen OTUs zugeteilt wurden, stieg der Wert der seltenen OTUs in Matratzenstaub stark an und der Wert der häufigen OTUs nahm im Vergleich zur Genus-Ebene ab. Sie deckten beinahe zwei Drittel aller OTUs ab. Bei den Nasenabstrichproben waren die seltenen OTUs zu weniger als einem Viertel aller OTUs vertreten und somit deutlich weniger als bei den Matratzenstaubproben.

Proben von Nasenabstrichen und Matratzenstaub unterschieden sich sowohl hinsichtlich phylogenetischer Maße als auch in der taxonomischen Zusammensetzung (*UniFrac*-Analyse).

Diese Ergebnisse sprechen für eine vielfältigere taxonomische Zusammensetzung von Matratzenstaub im Vergleich zur Nase und könnten ein Hinweis für eine Kolonisierung mit bestimmten Bakterien in der Nase sein.

### 4.4 Die Mikrobiota von Matratzenstaub wird durch die Umwelt und durch den Menschen beeinflusst

Für einen ausgeprägten Einfluss der Luft und der nicht häuslichen Umgebung des Kindes auf die Matratze spricht als indirekter Marker der hohe Wert von 26,8 % an Chloroplasten-DNA

in Matratzenstaub.

Chloroplasten sind keine Bakterien, sondern Zellorganellen, die für die Photosynthese der Pflanzen zuständig sind. Man geht aber nach der *Endosymbiontentheorie* davon aus, dass bei der Entwicklung der Chloroplasten Cyanobakterien in die Chloroplasten einwanderten. Diese enthalten, wie alle Bakterien, 16S rRNA (Zablen et al., 1975).

Daher enthalten Chloroplasten DNA und das 16S rRNA-Gen, das bei der PCR amplifiziert und später unvermeidbar mitsequenziert wird.

In der hier vorliegenden Arbeit war die OTU 14728 für den Großteil der Chloroplasten-DNA verantwortlich und zeigte beim Vergleich mit der NCBI-Datenbank eine 100 % Ähnlichkeit zu *Picea abies* (*Gemeine Fichte*) und *Pinus sylvestris* (*Waldkiefer*).

Die *Gemeine Fichte* ist laut einer großangelegten Studie in österreichischen Wäldern die häufigste Baumart (58 %), die *Waldkiefer* ist mit mehr als 8 % vertreten (Monserud und Sterba, 1996). Das Vorkommen von Chloroplasten-DNA besonders in den österreichischen Proben könnte in Zusammenhang mit dem saisonalen Zeitpunkt der Sammlung stehen. Die österreichischen Proben wurden in den Monaten Mai bis Juli abgenommen. Diese Monate liegen in der Hauptpollenflugsaison der *Gemeinen Fichte* und der *Waldkiefer*. In den bei der Testplatte mitsequenzierten bayerischen Matratzenstaubproben, die zwischen Oktober und Januar gesammelt wurden, konnte dagegen weniger Chloroplasten-DNA gefunden werden. Und auch in einer Studie, die Luftproben aus zwei Gebäuden zu vier verschiedenen Jahreszeiten analysierte, war die Anzahl an Sequenzen, die Chloroplasten-DNA repräsentierten, im Sommer am größten (Rintala et al., 2008).

Da keine Sequenzierdaten von österreichischen Proben vorliegen, die zwischen Oktober und Januar gesammelt wurden, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass in österreichischen Proben allgemein mehr Chloroplasten-DNA vorhanden ist. Mögliche Übertragungswege der Pollen sind das Kind selbst, z. B. durch seine Kleidung und die Haare, aber auch offene Fenster und die Luft als Transportmedium.

Sowohl für einen Umwelteinfluss auf die Matratze als auch für einen möglichen Transfer von Matratze auf die Nase während des Schlafens sprachen die Genera *Acinetobacter* und *Lactococcus*.

Das Genus *Acinetobacter* wurde in einer Studie von Quigley et al. (2013) in unbehandelter Rohmilch, nicht aber in pasteurisierter Milch gefunden. Bei Debarry et al. (2007) wurde die Spezies *Acinetobacter lwoffii* aus Kuhställen isoliert. Außerdem wurde in früheren Studien eine Übertragung von *Acinetobacter lwoffii* aus der Bauernhof-Umgebung auf die Matratze vermutet (Korthals et al., 2008; Normand et al., 2011).

Das Genus *Lactococcus* konnte bei Hagi et al. (2013) als häufigstes Bakterium aus Rohmilchproben isoliert werden und wurde auch schon aus Kuhställen isoliert (Debarry et al., 2007). Es wurde auch beobachtet, dass es mit der Luft transportiert und verteilt werden konnte (Garijo et al., 2009). Für diese beiden Genera besteht also die Möglichkeit, die Stallluft „einzufangen“. Hinweise für die Übertragung von *Acinetobacter* und *Lactococcus* gaben nicht nur die Ergebnisse der genannten Studien, sondern auch der intraindividuelle Vergleich der OTUs einer Nasenabstrich- und der korrespondierenden Matratzenstaubprobe desselben Kindes.

Bei der Betrachtung aller Proben waren sie in Matratzenstaub unter den häufigen Genera, in Nasenabstrichproben hingegen nicht unter den häufigen Genera vertreten. Es konnte also

davon ausgegangen werden, dass sie bei der Betrachtung aller Proben typischer für die Matratzenstaubproben waren als für die Nase.

Nun wurde der Blickwinkel gewechselt und ein intraindividueller Vergleich vorgenommen, indem die Matratzenstaub- und die Nasenabstrichprobe desselben Kindes auf gleiche OTUs untersucht wurden. Gerechtfertigt werden konnte der Vergleich durch zeitnahe Abnahmen von Nasenabstrich- und korrespondierendem Matratzenstaub desselben Kindes, die durchschnittlich innerhalb von 0-2 Tagen erfolgten. Es wurde eine Rangliste erstellt, die den Prozentsatz zeigte, mit dem die OTUs in beiden Proben gleichzeitig vorkamen. Als Einschlusskriterium für die Analyse dieser Fragestellung galt, dass nur OTUs betrachtet wurden, die in Matratzenstaub und Nasenabstrichprobe insgesamt mehr als fünfmal vorkamen. Das Genus *Acinetobacter*, unter das die OTU 1344 und OTU 658 fielen und das Genus *Lactococcus*, zu dem die OTU 11013 gehörte, waren häufig in Matratzenstaub und nicht unter den häufigen Genera in der Nase. Diese drei OTUs kamen aber zu mindestens 10 % in beiden Probentypen desselben Kindes gleichzeitig vor.

Die OTU 1344 (Genus *Acinetobacter*) hatte beim Vergleich mit der NCBI-Datenbank eine 100 % Übereinstimmung zu *Acinetobacter lwoffii*. Eine weitere 100 % Übereinstimmung bestand zu *Prolinoborus fasciculus*. Von *Prolinoborus fasciculus* ist bekannt, dass es in seiner 16S rRNA zu 99,79 % mit *Acinetobacter lwoffii* übereinstimmt (Yarza et al., 2013), was die beiden Spezies durch Sequenzierung des 16S rRNA-Gens nicht voneinander unterscheiden lässt. In der Studie von Ege et al. (2012) wurde ebenfalls eine Sequenz gefunden, die als *Acinetobacter lwoffii* klassifiziert wurde. Diese zeigte eine 100 % Übereinstimmung mit der OTU 1344. Die OTU 11013 zeigte beim Vergleich mit der NCBI-Datenbank eine 100 % Übereinstimmung mit *Lactococcus lactis*. *Acinetobacter lwoffii* und *Lactococcus lactis* sind zum einen beide schon aus Kuhställen isoliert worden (Debarry et al., 2007). Zum anderen waren OTUs der Genera *Acinetobacter* und *Lactococcus* auch in der hier vorliegenden Studie bei den Bauernhofkindern häufig ( $> 1\%$ ), bei den Referenzkindern dagegen selten ( $\leq 1\%$ ) vertreten.

Auch wenn hier keine Ergebnisse von Proben aus den Ställen der Bauernhofkinder bzw. aus der Umweltumgebung der Referenzgruppe zum direkten Vergleich vorlagen, sprachen diese Ergebnisse für die Möglichkeit eines Transfers von der Bauernhofumgebung auf die Matratze und auch auf die Nase.

Auch die OTU 15992 (Genus *Gemella*), die OTU 14972 (Genus *Granulicatella*) und die OTU 1076 (Genus *Veillonella*) könnten laut dieser Analyse von der Matratze auf die Nase übertragen werden, weil sie typisch für Matratzenstaub in allen Proben waren und zugleich untypisch für Nasenabstrichproben, jedoch häufig in den korrespondierenden Proben desselben Kindes vorkamen.

In Richtung von der Nase auf die Matratze gab es aber ebenfalls mögliche Kandidaten für einen Transfer. Diese wären die OTU 12812 (Genus *Moraxella*) und die OTU 3464 (Genus *Haemophilus*), da sie bei Betrachtung aller Proben typisch für die Nase waren und gleichzeitig nicht typisch in Matratzenstaubproben vorkamen. Sie kamen aber häufig gleichzeitig in beiden Probentypen eines Kindes vor. Dies könnte bedeuten, dass die Mikrobiota des Menschen, im Speziellen die der Nasenschleimhaut, die Mikrobiota der Matratze beeinflussen kann.

Für einen möglichen Umwelteinfluss sprechen nicht nur die Chloroplasten-DNA und die möglichen Transferkandidaten, sondern auch drei weitere Genera in Matratzenstaub: *Shingomo-*

*nas* ist in der Umwelt ubiquitär vorhanden und kommt in Boden, Wasser und Sedimenten vor (White et al., 1996). Es konnte aber auch in feuchter häuslicher Umgebung wie Duschvorhängen nachgewiesen werden (Kelley et al., 2004).

*Incerte sedis* stammt aus der Familie der *Lachnospiraceae* (Phylum *Firmicutes*, Klasse *Clostridia*, Ordnung *Clostridiales*). Diese sind mit DNA-basierten Untersuchungsmethoden als typische Darmbakterien bei Säugetieren identifiziert worden (Gosalbes et al., 2011). *Lachnospiraceae* sind dazu fähig, im menschlichen Darm komplexe Polysaccharide zu kurz-kettigen Fettsäuren (wie z. B. Acetat, Butyrat und Propionat) abzubauen. Diese können dann als Energiequelle genutzt werden (Biddle et al., 2013).

Auf den Ursprung eines schon auf Genusebene nicht klassifizierbaren Bakteriums *Uncultured*, das auf Familienebene den *Ruminococcaceae* zugeteilt werden konnte, wird in Kapitel 4.6 näher eingegangen.

Alle hier genannten Genera, die für einen Umwelteinfluss auf die Matratze sprechen, waren bei der Betrachtung aller Proben durchschnittlich zwischen 1 % und 2 % repräsentiert. In Kapitel 4.2 wird bereits diskutiert, dass gerade bei den seltenen Genera und OTUs weitere Umweltbakterien zu finden sind (Birzele et al., 2016). In Matratzenstaub waren beinahe 60 % aller OTUs selten, also zu  $\leq 1\%$  repräsentiert.

Die Genera und OTUs mit hoher relativer Häufigkeit waren beim Vergleich mit der gegenwärtigen Literatur eher Mensch-typisch. So kamen Täubel et al. (2009), die Matratzenstaub, Fußbodenstaub und Hautabstriche von Erwachsenen analysierten, zu dem Ergebnis, dass sich die Matratzenstaubproben und die Hautabstriche ähnelten. Sie vermuteten daher, dass ein großer Teil der Bakterien von menschlicher Haut stammte. In Anbetracht aller möglichen menschlichen Körperlokalisationen wurde für weit über die Hälfte der Bakterien ein menschlicher Ursprung angenommen. Bei Täubel et al. (2009) zeigten sich in Matratzenstaub und Hautabstrichen am häufigsten die *Firmicutes*, gefolgt von den *Actinobacteria* und den *Proteobacteria*. In den Matratzenstaubproben der GABRIELA Studie waren ebenfalls die *Firmicutes* die häufigsten Bakterien, darauf folgten aber die *Proteobacteria* und am dritthäufigsten waren die *Actinobacteria* vertreten. Da bei den Studien unterschiedliche methodische Vorgehensweisen verwendet wurden, könnte dieser Unterschied dadurch erklärt werden. Aber auch die Tatsache, dass ein Teil der in Matratzenstaub repräsentierten Bakterien die menschliche Mikrobiota widerspiegelt und die Proben in der GABRIELA Studie von Kindern, bei Täubel et al. (2009) jedoch von Erwachsenen stammten, kann dieses Resultat möglicherweise erklären.

Bei Oh et al. (2012) fiel bei Haut- und Nasenabstrichproben der Unterschied zwischen den Tanner Stadien 1-3 und 4-5 auf. Diese bezeichnen unterschiedliche Entwicklungsstufen des Menschen, wobei Tanner 1 das vorpubertäre Stadium bezeichnet und Tanner 5 einem Erwachsenen gleicht (Marshall, 1969; Marshall, 1970). Es zeigten sich bei den Tanner Stadien 1-3 mehr *Proteobacteria*, bei Erwachsenen dagegen mehr *Actinobacteria* (Oh et al., 2012).

In dem ebenfalls untersuchten Bodenstaub bei Täubel et al. (2009) wurde der Anteil an Bakterien der menschlichen Hautflora geringer geschätzt.

Dies ist möglicherweise durch den intensiveren Hautkontakt von Matratze und menschlicher Haut im Vergleich zu Fußboden und Haut bedingt: Etwa 1 Billion abgestorbene Keratinozyten werden in 24 Stunden bei jedem Menschen abgestoßen (Milstone, 2004), um von der darun-

terliegenden Zellschicht ersetzt zu werden. Man kann davon ausgehen, dass jeder Quadrat-zentimeter der Haut mit etwa  $10^2$  bis  $10^4$  Bakterien bedeckt ist (Leyden et al., 1987). Da die Proben für die hier vorliegende Arbeit zwischen Mai und Juli gesammelt wurden, konnte ein direkter Hautkontakt durch kurzärmelige Schlafbekleidung vermutet werden. Bewegungen im Schlaf begünstigen das Abschilfern der Keratinozyten und machen das Auftreten von Bakterien der epidermalen Flora wahrscheinlich. Auch auf Genus-Ebene konnten Gemeinsamkeiten zu der Studie von Täubel et al. (2009) festgestellt werden, die in ihren Matratzenstaubproben ebenfalls *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Neisseria*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium* und *Streptococcus* identifizieren konnten. In den hier analysierten Matratzenstaubproben der GABRIELA Studie waren die Genera *Staphylococcus*, *Propionibacterium* und *Corynebacterium* durchschnittlich zu insgesamt knapp einem Fünftel vertreten und Spezies dieser Genera wurden in zahlreichen Studien (Belkaid und Segre, 2014; Grice et al., 2009; Scharschmidt und Fischbach, 2014) als typisch für die menschliche epidermale Flora bezeichnet. Sie waren auf der menschlichen Haut zu über 60 % vertreten (Grice et al., 2009).

Jedoch gibt es natürlich auch Spezies dieser Genera, die nicht der menschlichen Haut als Ursprungsquelle zugeordnet werden. Dies gilt z. B. für *Corynebacterium tuberculostearicum* und *Corynebacterium mucifaciens*. Sie konnten in Stallstaub gefunden werden (Korthals et al., 2008) und auch in Stroh (Krysinska-Traczyk et al., 2004). Die OTU 4511 hatte 100 % Ähnlichkeit zu *Corynebacterium tuberculostearicum* und konnte in Matratzenstaub und in den Nasenabstrichproben gefunden werden.

Dies macht deutlich, dass verschiedene Spezies eines Genus unterschiedliche Ursprungsquellen aufweisen. Neben der Haut galten als weitere mögliche menschliche Quellen der Bakterien in Matratzenstaub der Mund, der Magen-Darm- und der Urogenitaltrakt.

So wurden bei Dunn et al. (2013) Kissenbezüge untersucht und Bakterien gefunden, die oralen Ursprungs waren. In den hier analysierten Matratzenstaubproben der GABRIELA Studie könnten *Granulicatella* (Wildeboer-Veloo et al., 2007), *Actinobacillus* (Simon-Soro et al., 2013), *Fingoldia* (Wildeboer-Veloo et al., 2007) und *Porphyromonas* (Talan et al., 1999) für den Mund als Ursprung sprechen.

Aus dem Magen-Darm- und Urogenitaltrakt könnten die *Bacteroides* (Li et al., 2012; Lynch et al., 2014), *Faecalibacterium* (Khan et al., 2012) und *Lactobacillae* (Li et al., 2012) stammen.

Die Ergebnisse der Analyse der Matratzenstaubproben verdeutlichen, dass die Mikrobiota des Matratzenstaubes sowohl durch die Umwelt des Kindes, als auch durch die Mikrobiota des Kindes geprägt ist.

#### **4.5 Die Mikrobiota der Nase erscheint weniger durch die Umwelt beeinflusst zu sein als Matratzenstaub**

In den meisten gegenwärtigen vergleichbaren Studien dominierten in Nasenabstrichproben die *Actinobacteria* und *Firmicutes*, *Proteobacteria* waren in Kontrast zu der hier vorliegenden Studie nur zu einem geringen Prozentsatz vorhanden (Bassis et al., 2014; Costello et al., 2009; Frank et al., 2010; Hilty et al., 2010; Lemon et al., 2010; Yan et al., 2013). Die Proben in diesen Studien stammten jedoch von Erwachsenen.

Die in den Nasenabstrichproben ebenfalls vorgefundenen *Fusobacteria* wurden schon früher in der Nase in ähnlich niedriger relativer Häufigkeit beobachtet (Frank et al., 2010; Hilty et al., 2010; Lemon et al., 2010).

Eine Erklärung für die Unterschiede in der relativen Häufigkeit könnte die Studie von Oh et al. (2012) sein. Hier wurden Kinder in zwei Entwicklungsstadien (Tanner 1-3 und Tanner 4-5) untersucht. Die Zusammensetzung der bakteriellen Mikrobiota in den zwei Stadien konnte klar voneinander getrennt werden: Kinder im Entwicklungsstadium Tanner 1-3 zeigten deutlich mehr *Proteobacteria*, *Firmicutes* und *Bacteroidetes*. Bei Tanner 4-5 waren wiederum, wie in den vorher beschriebenen Studien, die *Actinobacteria* häufiger. Eine Änderung der bakteriellen Mikrobiota in der Pubertät wurde als Grund hierfür angenommen (Oh et al., 2012). Andere Probenregionen wie der volare Unterarm und die Kniekehle wiesen bei Oh et al. (2012) ebenfalls diese altersspezifischen Unterschiede auf, sie waren jedoch in der Nase am stärksten ausgeprägt.

Die analysierten Proben aus GABRIELA stammten von Kindern zwischen sechs und zwölf Jahren (Genuneit et al., 2011) und entsprachen in ihrer Entwicklung den Tanner Stadien 1-3. Mit den bei Oh et al. (2012) analysierten Proben in diesen Entwicklungsstadien stimmten sie gut überein. Dies wäre eine Erklärung für die Abweichung der mikrobiellen Zusammensetzung von den gegenwärtigen Studien an Erwachsenen. Zwar wurden bei der GABRIELA Studie keine Proben von Erwachsenen analysiert, der Vergleich mit der gegenwärtigen Literatur gibt aber Hinweise darauf, dass sich die Mikrobiota in der Nase altersabhängig ändern könnte.

Auch auf Genus-Ebene waren deutliche Übereinstimmungen mit den Tanner Stadien 1-3 bei Oh et al. (2012) zu sehen. Dies zeigte sich insbesondere durch die Anwesenheit von *Moraxella*, *Streptococcus*, *Haemophilus* und *Neisseria*, die bei Oh et al. (2012) in den Tanner Stadien 1-3 im Vergleich zu den Stadien 4-5 überrepräsentiert waren. *Corynebacterium* und *Propionibacterium* fanden sich bei Oh et al. (2012) dagegen gehäuft in den Stadien 4-5. Die Begründung für die Unterschiede war, dass diese Genera besonders in talgreicher Haut vorkommen (McGinley, 1978; Roth und James, 1988) und die Talgproduktion unter Hormoneinfluss in der Pubertät ansteigt (Oh et al., 2012).

Außerdem fanden sich Genera wie *Prevotella* und *Staphylococcus*, die auch bei Erwachsenen schon in früheren Studien (Hilty et al., 2010; Oh et al., 2012) detektiert werden konnten.

Da *Actinobacillus* und *Porphyromonas* typisch für den menschlichen Mundraum (Jiang et al., 2014; Simon-Soro et al., 2013) sind, könnten diese Bakterien über den Nasopharynx vom Mundraum in die Nase gelangen.

Besonders auffällig waren auf OTU-Ebene die starken Präsenzen der OTUs 12812 (Genus *Moraxella*) und OTU 3464 (Genus *Haemophilus*), die beide maßgeblich das ihnen zugehörige Genus repräsentierten. Durch einen Vergleich mit der NCBI-Datenbank wurde der OTU 12812 eine 100 % Ähnlichkeit mit *Moraxella catharrhalis* und *Moraxella nonliquefacens* und der OTU 3464 eine 100 % Ähnlichkeit mit den Spezies *Haemophilus influenzae* und *Haemophilus haemolyticus* zugesprochen. *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* und *Haemophilus influenzae* wurden bei Bisgaard et al. (2007) in Neugeborenen als Prädiktoren für die spätere Entwicklung von Asthma genannt und mit persistierendem *Wheezing* im Kindesalter in Verbindung gebracht (De Schutter et al., 2012). Besonders bei Kindern spielt *Moraxella catarrhalis* eine entscheidende Rolle bei einer akuten respiratorischen Infektion

und konnte zusammen mit *Streptococcus pneumoniae* am häufigsten aus nasopharyngealem Sekret kultiviert werden (Berner et al., 1996; Karalus und Campagnari, 2000). *Moraxella catarrhalis* kann aber auch bei gesunden Kindern die Nasenschleimhaut kolonisieren (Eposito et al., 2015; Oh et al., 2012).

*Moraxella nonliquefaciens* konnte in Nasopharynx-Abstrichen bei Yi et al. (2014) besonders bei Kindern unter fünf Jahren mit einem viralen Infekt vorgefunden werden. Hier wurde auch untersucht, ob *Moraxella nonliquefaciens* die gleichen potenziell pathogenen Proteine produzieren kann wie *Moraxella catarrhalis*. Die  $\beta$ -Lactamasen-Antibiotika-Resistenz-Gene *BRO-1* and *BRO-2* waren meist nur bei *Moraxella catarrhalis* vorhanden. Mit dieser Ausnahme stimmte *Moraxella nonliquefaciens* in den potenziell für pathogene Proteine kodierenden Genen mit *Moraxella catarrhalis* überein. Es wird angenommen, dass diese beiden Spezies wegen ihrer Ähnlichkeit in der 16S rRNA und wegen des ähnlichen Verhaltens bei kulturabhängigen Untersuchungsmethoden häufig verwechselt wurden. Daher ist es möglich, dass das Vorkommen von *Moraxella nonliquefaciens* bisher unterschätzt wurde (Yi et al., 2014).

Auch wenn die beiden Spezies nicht unterschieden werden konnten, können laut Yi et al. (2014) beide Infektionen verursachen.

Die Vergleiche mit der Literatur sprechen dafür, dass bestimmte Bakterien häufig in der Nase zu finden sind und könnten darauf hindeuten, dass einige Bakterienspezies die Nase kolonisieren.

In Zusammenschau der Ergebnisse sprechen die häufigen und bei Vergleich mit der Literatur typischen Bakterien der Nase für eine weniger ausgeprägte Beeinflussung der Nasenschleimhaut durch die Umwelt.

Ein gewisser Umwelteinfluss lässt sich jedoch dennoch durch zwei Ergebnisse dieser Arbeit vermuten: Zum einen befand sich in den Nasenabstrichproben noch durchschnittlich 4,4 % an Chloroplasten-DNA, also DNA von Pflanzen. Dies spricht zum einen für einen Einfluss der Luft und der *nicht häuslichen Umwelt*, verdeutlicht aber auch die Funktion der Nase als Filter der Luft.

Zum anderen kann es aber auch darauf hinweisen, dass das *nähere bakterielle Umfeld*, hier erfasst durch die Mikrobiota der Matratze, einen Einfluss auf die Mikrobiota der Nasenschleimhaut hat. Es könnte, wie in Kapitel 4.4 erläutert, ein Transfer von der Matratze auf die Nase desselben Kindes stattfinden.

Außerdem zeigte die aus dieser Arbeit hervorgehende Publikation noch Folgendes: Die Kinder wurden in gegenüber Kühen und Stroh exponierte Kinder eingeteilt und in Kinder, die keinen Kontakt zu Kühen und Stroh hatten. Der Hintergrund dieser Einteilung ist, dass der *Kontakt zu Kühen und Stroh* zusammen mit dem *Konsum von unpasteurisierter Rohmilch* zu den stärksten Asthma-protektiven Umweltfaktoren (Illi et al., 2012) zählen. *Richness* und *Shannon-Index* zeigten sich hier nicht nur bei Matratzenstaub-, sondern auch bei den Nasenabstrichproben bei der Gruppe der Exponierten signifikant erhöht (Birzele et al., 2016).

## 4.6 Die Mikrobiota im Matratzenstaub von Bauernhofkindern unterscheidet sich signifikant von den Referenzkindern

Eines der wohl interessantesten Ergebnisse war, dass das Leben auf einem Bauernhof die bakterielle Mikrobiota der Matratze stark beeinflusste. In der Nase lagen hingegen weniger ausgeprägte Unterschiede zwischen Bauernhof- und Referenzkindern vor. Die Matratze scheint sich gut dafür zu eignen, die Umwelt der Kinder abzubilden.

Unter den häufigen Phyla gab es keinen Unterschied. Jedoch ließen sich die Matratzenstaubproben von Bauernhof- und Referenzgruppe auf Genus-Ebene eindeutig voneinander trennen. Die bakterielle Mikrobiota bei Bauernhofkindern zeigte insbesondere im Hinblick auf die Gesamtvariable der seltenen Genera signifikant höhere Werte an als die Mikrobiota von Referenzkindern. Das Genus *Uncultured* war ebenfalls signifikant erhöht. Dieses Genus war nur bis auf Familienebene, den *Ruminococcaceae*, eindeutig zu klassifizieren und könnte einen Einfluss der Bauernhof-Umgebung repräsentieren. Die *Ruminococcaceae* sind typische Darmbakterien sowohl bei Kühen als auch bei Menschen. Interessanterweise konnten mehrere Studien einen Zusammenhang zwischen einer hohen Anzahl an diesen Darmbakterien und der menschlichen Gesundheit zeigen: In der Studie von Martínez et al. (2015) gab es eine positive Korrelation mit den *Ruminococcaceae* und Normalgewichtigen im Vergleich zu Übergewichtigen sowie eine negative Korrelation mit Entzündungsmediatoren. Außerdem wurde bei geringerem Auftreten von Bakterien aus dieser Familie eine höhere *Toll-like receptor 2 (TLR-2)*-Antwort sowie ein gesteigertes Risiko, an IgE-assoziiertem Ekzem zu leiden, beobachtet (Morgan et al., 2012; West et al., 2010). Bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sind diese Bakterien ebenfalls vermindert (Willing et al., 2010). Es kann also durchaus sein, dass diese Bakterien einen gewissen Schutz vor bestimmten Krankheiten bieten.

Unter den häufigen OTUs waren nur bei Bauernhofkindern *Acinetobacter* und *Lactococcus* nachzuweisen, im Gegensatz dazu waren sie bei den Referenzkindern innerhalb der seltenen OTUs zu  $\leq 1\%$  vertreten. Wie in Kapitel 4.4 erläutert, könnten sie für einen Einfluss der Bauernhof-Umgebung sprechen (Debarry et al., 2007; Garijo et al., 2009; Korthals et al., 2008; Normand et al., 2011; Quigley et al., 2013). Dagegen waren unter den häufigen OTUs der Referenzkinder *Moraxella* und *Neisseria* zu beobachten.

Einige Genera und OTUs waren bei Bauernhofkindern in ihrer relativen Häufigkeit signifikant erniedrigt, wobei diese Beobachtung vorsichtig zu bewerten ist: Es handelte sich bei der Analyse der Assoziationen um den Mittelwert der *relativen* Häufigkeit pro Probe. Durch die deutlich höheren Werte für die Gesamtvariable der seltenen Genera und OTUs, verifiziert durch die höhere *richness*, mussten rein mathematisch gesehen einige Genera und OTUs ein reduziertes *relatives Vorkommen* aufweisen. Die auf Genus-Ebene verminderten Bakterien könnten typische Hautkeime (Belkaid und Segre, 2014; Grice et al., 2009; Scharschmidt und Fischbach, 2014) gewesen sein (Kapitel 4.4). Da Matratzenstaub vermutlich auch viele Hautbakterien enthält (Täubel et al., 2009) und diese bei jedem Kind etwa in gleicher Menge abgegeben werden, reduziert sich nicht deren Gesamtzahl, sondern die relative Häufigkeit, wenn andere Bakterien vermehrt vorkommen.

Auch im Hinblick auf die *richness* und den *Shannon-Index* konnte Matratzenstaub von Bauernhofkindern signifikant höhere Werte aufweisen. Bei einer Stichprobenanzahl von 5000 Se-

quenzen verdoppelte sich die *richness* beinahe. Eine ungenügende Abdeckung der OTUs, die durch *Multiple Rarefaction* Kurven schon bei Matratzenstaub im Allgemeinen bestätigt werden konnte, ist bei Bauernhofkindern bei Betrachtung der häufigen OTUs also noch ausgeprägter. Eine Rarefizierung auf 1254 Sequenzen war aber nötig und sinnvoll, um Nasenabstrich- und Matratzenstaubproben vergleichen zu können.

Was bedeutet es also, auf einem Bauernhof aufzuwachsen? Laut dieser Ergebnisse ist es eine größere bakterielle Vielfalt der Umgebung bzw. die Konfrontation mit vielen unterschiedlichen Bakterienspezies, was sich in einer höheren bakteriellen *richness* bei den Bauernhofkindern widerspiegelt.

Die Ergebnisse bestätigen mithilfe der *454-Pyrosequenzierung* frühere Studien, die bei Bauernhofkindern, basierend auf SSCP- und kulturabhängigen Methoden, eine höhere Diversität von Matratzen- und Hausstaub feststellten (Braun-Fahländer et al., 2002; Ege et al., 2011). Dies könnte ein wichtiger Hinweis dafür sein, dass die *richness* bzw. ein „Cocktail“ an bestimmten Bakterien zum Schutz vor Asthma beiträgt. Es kann vermutet werden, dass Matratzenstaub die Umwelt der Kinder „einzufangen“ scheint und als adäquater Repräsentant der Bauernhof-Umgebung aufgefasst werden kann.

#### **4.7 In Asthmatikern ist sowohl die Mikrobiota der Nasenschleimhaut als auch von Matratzenstaub im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant verändert**

Betrachtete man die Mikrobiota der Nasenabstriche von Asthmatikern und Kontrollen, so fielen signifikante Unterschiede auf. Denn obwohl die einzelnen Nasenabstrichproben in ihrer Gesamtheit große interindividuelle Unterschiede aufwiesen, besaßen alle Asthmatiker einige Gemeinsamkeiten. Asthmatiker zeigten auf Phylumebene signifikant niedrigere relative Häufigkeiten für die *Bacteroidetes* ( $p = 0,0402$ ) auf.

Dieses Ergebnis scheint im Hinblick auf die gegenwärtige Literatur äußerst interessant zu sein. Bei der Untersuchung des Respirationstrakts durch Oropharynx-Abstriche konnte nämlich bei 17 Gesunden und 17 an Asthma Erkrankten ein signifikant vermindertes Auftreten der *Bacteroidetes* und ein signifikant häufigeres Vorkommen der *Firmicutes* festgestellt werden (Park et al., 2014). In den unteren Atemwegen von Asthmatikern wurde ebenfalls ein signifikant vermindertes Vorkommen der *Bacteroidetes* beobachtet (Hilty et al., 2010). Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass die Mikrobiota von Asthmatikern sowohl im unteren, als auch im oberen Respirationstrakt verändert ist. Es wäre eine Bekräftigung der Annahme, dass Asthma eine *united airway disease* ist (Bachert et al., 2004; Bousquet et al., 2004; Rimmer und Ruhno, 2006).

Auch Stuhlproben von Kindern mit Lebensmittelallergie wiesen diese Veränderung auf (Ling et al., 2014). Eine andere Analyse sah, basierend auf der Kultivierung von Stuhlproben, einen Zusammenhang zwischen der Verminderung von *Bacteroidetes* bei Kleinkindern (ein Jahr alt) und der Entwicklung von Allergien (Björkstén et al., 2001). Diese Ergebnisse lassen sich zwar aufgrund der anderen Lokalisationen und Erkrankungen nicht uneingeschränkt mit der hier vorliegenden GABRIELA Studie vergleichen. Dazu hätte man die hier analysierte Stu-

dienpopulation u. a. auch in atopisches und nicht atopisches Asthma auftrennen müssen. Sie können aber dennoch ein Hinweis dafür sein, dass die bakterielle Mikrobiota von Atopikern in mehreren Körperregionen in ähnlicher Weise verändert ist.

Auch bei Adipositas konnten ähnliche Veränderungen in der Mikrobiota des Darmes beobachtet werden, die sich in einer erhöhten  $\frac{\text{Firmicutes}}{\text{Bacteroidetes}}$ -Ratio äußerten (Turnbaugh et al., 2006). Bei einer Gewichtsreduktion durch Ernährungsumstellung und körperliche Aktivität konnte bei übergewichtigen Jugendlichen eine Reduktion der  $\frac{\text{Firmicutes}}{\text{Bacteroidetes}}$ -Ratio beobachtet werden (Nadal et al., 2009). Dies erscheint interessant, weil sich beim Vorliegen von Adipositas, besonders bei jugendlichen Mädchen, eine erhöhte Asthmaprävalenz zeigt und eine Gewichtsreduktion die Lungenfunktion verbessert (Schaub et al., 2005).

Auf Genus-Ebene ließ sich das verminderte Auftreten der *Bacteroidetes* noch genauer spezifizieren: In Nasenabstrichproben waren *Prevotella* und *Porphyromonas*, beide zur Gruppe der *Bacteroidetes* gehörend, signifikant erniedrigt.

*Prevotella* war auch bei den vorher erwähnten Studien über die Mikrobiota des Respirationstraktes (Hilty et al., 2010; Park et al., 2014) in Asthmatikern signifikant erniedrigt. Es kann daher vermutet werden, dass nicht nur die Mikrobiota des unteren, sondern auch des oberen Respirationstraktes in ähnlicher Weise durch eine Erkrankung an Asthma beeinflusst wird. Dies stützt die These der *united airways* und bestärkt, dass der Nasenabstrich ein geeigneter und gut zu erreichender Probentyp für die Beurteilung der Mikrobiota von Asthmatikern und Kontrollen ist.

Auch bei Adipositas zeigte sich ein vermindertes Vorkommen (Turnbaugh et al., 2006) von *Prevotella*, bei Gewichtsreduktion zeigte sich ein Anstieg (Nadal et al., 2009). *Prevotella* galt bei Turnbaugh et al. (2006) als wichtiger Produzent von immunmodulatorischen Metaboliten wie kurzkettigen Fettsäuren. Möglicherweise ist *Prevotella* daher bei verschiedenen Erkrankungen aufgrund dieser Eigenschaft ein protektives Bakterium.

*Porphyromonas* gilt als möglicher Verursacher von Karies und ist normalerweise im Mundraum anzutreffen (Arbes und Matsui, 2011). Ein vermindertes Auftreten von *Porphyromonas* in Asthmatikern konnte auch bei Arbes et al. (2006) durch die Analyse von Antikörpern gegen *Porphyromonas* beobachtet werden.

Der Zusammenhang zwischen Asthma und oraler Zahngesundheit wird jedoch kontrovers diskutiert und ist Gegenstand aktueller Forschung. So wurden zwölf Studien verglichen, die Assoziationen mit allergischen Erkrankungen und dem Auftreten von Karies untersuchten (Arbes und Matsui, 2011). Fünf Studien konnten ein erhöhtes Auftreten von allergischen Erkrankungen bei Zahngesunden feststellen, drei Studien fanden keine Assoziationen und vier Studien zeigten die entgegengesetzte Assoziation. Bei keiner der Studien wurden jedoch direkte Speichelproben entnommen, sondern die Kinder auf Peridontitis oder Antikörper gegen pathogene orale Bakterien untersucht (Arbes und Matsui, 2011). Die hier analysierten Proben der GABRIELA Studie sprechen für ein vermindertes Vorkommen von *Porphyromonas* bei Asthmatikern.

Die Nasenabstriche von Asthmatikern zeigten zwar einen Trend für eine erniedrigte  $\alpha$ -Diversität bei den Asthmatikern im Vergleich zu Kontrollen, jedoch keine signifikanten Unterschiede. Auch in der aus dieser Arbeit hervorgegangenen Publikation wurde dieser Trend beobach-

tet (Birzele et al., 2016).

Eine Analyse von Stuhlproben bei einer prospektiven Studie von Abrahamsson et al. (2014) zeigte Unterschiede in verschiedenen Altersgruppen: Die Proben wurden im Alter von einer Woche, einem Jahr und sieben Jahren abgenommen. Eine niedrigere  $\alpha$ -Diversität bei Kindern, die später Asthma entwickelten, wurde nur im Alter von einer Woche festgestellt. Mit einem Jahr und sieben Jahren unterschieden sich die Proben von Asthmatikern und Kontrollen in ihrer  $\alpha$ -Diversität nicht mehr (Abrahamsson et al., 2014). In den Matratzenstaubproben von Asthmatikern besonders auffällig war die signifikant erniedrigte relative Häufigkeit der seltenen Genera und OTUs im Vergleich zu den Kontrollen. Außerdem wiesen Asthmatiker im Vergleich zu den Kontrollen in Matratzenstaub eine signifikant erniedrigte  $\alpha$ -Diversität, beurteilt nach der *richness* und dem *Shannon-Index*, auf. Die Ergebnisse deuten, analog zu früheren Untersuchungen (Ege et al., 2011), darauf hin, dass das Umfeld von Asthmatikern eine niedrigere mikrobielle Diversität aufweist.

Diese Ergebnisse standen in Kontrast zum vermehrten Vorkommen der seltenen Genera und OTUs und der höheren  $\alpha$ -Diversität bei Bauernhofkindern im Vergleich zu den Referenzkindern, sodass hierauf der protektive *Bauernhof-Effekt* beruhen könnte. Der Kontakt mit einer vielfältigen bakteriellen Umwelt könnte in Übereinstimmung mit Ege et al. (2011) als eine mögliche Begründung für die um 40 % reduzierte Wahrscheinlichkeit (Braun-Fahrlander et al., 1999; Riedler et al., 2000), als Bauernhofkind an Asthma zu leiden, angesehen werden.

Paralleles konnte bei der Analyse von Boden- und Sofastaub bei Säuglingen im Alter von drei Monaten nachgewiesen werden. Die höchste *richness* hatten hier die Kontrollen, die niedrigste *richness* die an Atopie und *Wheezing* leidenden Säuglinge (Lynch et al., 2014). Die Kombination aus frühem *Wheezing* und atopischer Dermatitis ist ein Prädiktor für Asthma im Kindesalter (Sly et al., 2008), was die Studie vergleichbar mit der Gruppe der Asthmatiker in dieser Arbeit macht.

Wurden die Matratzenstaubproben von Asthmatikern und Kontrollen zusätzlich getrennt für die Bauernhof- und die Referenzgruppe betrachtet, so zeigte sich die erniedrigte *richness* bei Asthmatikern nur in der Referenzgruppe. Bei der Bauernhofgruppe zeigte sich kein Effekt mehr. Eine mögliche Interpretation des Ergebnisses wäre die Folgende: Kinder, die von einer höheren mikrobiellen Diversität, hier gemessen an der *richness*, umgeben sind, leiden seltener an Asthma. Kinder, die auf einem Bauernhof leben, sind im Vergleich zu Referenzkindern einer erhöhten mikrobiellen Diversität ausgesetzt. Beides spiegelt sich im Matratzenstaub wider. Die *richness* konnte den *Bauernhof-Effekt* vollständig erklären, der *change in estimate* lag bei 144 %. Eine höhere mikrobielle Exposition gegenüber Bakterien könnte, wie auch schon früher vermutet wurde (Ege et al., 2011), zum Schutz vor Asthma beitragen.

Erkrankt ein Bauernhofkind trotz eines generell protektiven Effekts des Aufwachsens auf einem Bauernhof an Asthma, so könnte eine stark ausgeprägte genetische Prädisposition vorliegen, die auch durch die höhere mikrobielle Diversität nicht beeinflusst werden kann. Hinweise hierauf gibt die Untersuchung von Depner et al. (2014), bei der unterschiedliche *Wheezing*-Typen im Kindesalter untersucht wurden. Bei zwei bestimmten Ausprägungen waren Bauernhof- und Referenzkinder in etwa gleich häufig betroffen. Diese *Wheezing*-Typen zeigten eine Assoziation mit dem das Asthma-Risiko erhöhenden Genlocus 17q21. Es könnte also diskutiert werden, dass die *richness* bestimmte Ausprägungen besser beeinflussen kann

als andere. Da bei der Trennung in Bauernhof- und Referenzgruppe mit und ohne Asthma unvermeidlich auch die Stichproben halbiert und damit verkleinert wurden, sollte auch die geringere statistische Power beachtet werden. Der Median lag nämlich auch bei den Bauernhofkindern mit Asthma unterhalb des Medians der Bauernhofkinder ohne Asthma. Da die *richness* bei Bauernhofkindern deutlich höher war als bei den Referenzkindern, war es auch deutlich schwieriger, signifikante Werte zu erzielen.

Um herauszufinden, ob die erhöhte *richness* im Matratzenstaub der Bauernhofkinder verantwortlich für die niedrigere Asthma-Prävalenz im Vergleich zu den Referenzkindern sein könnte, wurde der *change in estimate* bestimmt. In unserer Stichprobe war der *Bauernhof-Effekt* durch die *richness* gut erklärt.

Bei Ege et al. (2011) waren bei der PARSIFAL Studie 26 % des *Bauernhof-Effekts* durch die höhere bakterielle Diversität in Matratzenstaub erklärbar. Mit der Sequenzierung können, im Vergleich zur Verwendung von Kultivierungs- und SSCP-Methoden bei PARSIFAL, theoretisch alle Bakterien erfasst werden. Der äußerst hohe *change in estimate* bei der GABRIELLA Studie könnte also durch das Next-Generation-Sequencing-Verfahren entstanden sein. Die höhere *richness* könnte laut dieser Ergebnisse für die niedrigere Asthma-Prävalenz mitverantwortlich sein.

Außerdem sollte auch ein Blick auf die beiden Genera *Acinetobacter* und *Lactococcus* geworfen werden. In den hier analysierten Bauernhofkindern bestand eine höhere relative Häufigkeit dieser beiden Genera in Matratzenstaub. Speziell die OTU 11013 mit 100 % Ähnlichkeit zu *Lactococcus lactis* und die OTU mit 100 % Ähnlichkeit zu verschiedenen *Acinetobacter* Spezies waren unter den häufigen (> 1%) OTUs in Bauernhofkindern und zu ≤ 1% bei den Referenzkindern zu finden. Beim Vergleich mit der Literatur konnte für *Acinetobacter lwoffii* und *Lactococcus lactis* eine inverse Korrelation mit Atopie in Matratzenstaub nachgewiesen werden (Ege et al., 2012). Bestimmten Spezies des Genus *Acinetobacter* wird ein Schutz vor Inflammation bei atopischer Dermatitis (Fyhrquist et al., 2014) und der Spezies *Lactococcus lactis* eine Reduktion bei akuter Entzündung der Atemwege zugesprochen (Marinho et al., 2010). Beides wurde am Mausmodell getestet (Fyhrquist et al., 2014; Marinho et al., 2010). Bei Debarry et al. (2007) wurde sowohl für *Acinetobacter lwoffii* als auch für *Lactococcus lactis*, die beide aus Kuhställen isoliert wurden, u. a. im Mausmodell und durch Untersuchungen an dendritischen Zellen ein stark protektiver Effekt vor Allergien gezeigt und die Induzierung einer TH1-Zell-dominierten Immunantwort nachgewiesen (Debarry et al., 2007).

Bei Matratzenstaubproben konnte des Weiteren bei Asthmatikern eine höhere relative Häufigkeit von *Corynebacterium* festgestellt werden als bei Matratzenstaub von Kontrollen. Da Matratzenstaub von Asthmatikern signifikant weniger seltene Genera aufwies, kann es auch sein, dass einige Genera in ihrem *relativen* Vorkommen erhöht sind und *keine absoluten* Unterschiede zwischen Asthmatikern und Kontrollen vorhanden sind. Einige *Corynebacterium* Spezies sind hautassoziiert (Belkaid und Segre, 2014; Grice et al., 2009; Scharschmidt und Fischbach, 2014). Es lässt sich vermuten, dass die Menge an Hautbakterien im Matratzenstaub von Asthmatikern und Kontrollen etwa gleich hoch ist und es somit durch das geringere Vorkommen der seltenen Genera zu einem relativ erhöhten Anteil von Hautbakterien kommt. Eine absolute Erhöhung von *Corynebacterium* erscheint auch deshalb eher unwahrscheinlich,

weil einigen Spezies dieses Genus ein antiinflammatorischer und asthmaprotektiver Effekt zugeschrieben wurde (Ege et al., 2012; Korf et al., 2006).

Die signifikante Erhöhung der OTU 9105 (Genus *Streptococcus*) in Matratzenstaub von Asthmatikern im Vergleich zu den Kontrollen könnte folgendermaßen erklärt werden:

OTU 9105 zeigte eine 100 % Ähnlichkeit mit der *Streptococcus Salivarius*-Gruppe (Untergruppe der *Viridans-Gruppe* der Streptokokken), zu denen *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus thermophilus* und *Streptococcus vestibularis* (Facklam, 2002; Kawamura et al, 1995; Poyart et al., 1998) gehören. Sie kommen normalerweise im Mundraum vor (Delorme et al., 2014). Es kann diskutiert werden, dass Asthmatiker durch das typischerweise nächtliche Husten dieses ansonsten im Mundraum lokalisierte Bakterium auf die Matratze übertragen. In dem hier analysierten Matratzenstaub wurden, wie vorher dargelegt, auch weitere orale Bakterien vermutet. Weitere Hinweise auf die Übertragung von Bakterien aus dem Mundraum auf die Matratze zeigten auch Analysen von Kissenbezügen (Dunn et al., 2013). Bei dieser Studie wurden verschiedene Gegenstände in Wohnhäusern untersucht und ein hoher Anteil an oralen Bakterien in Kissenbezügen vermutet (Dunn et al., 2013).

*Streptococcus salivarius* wird in Verbindung mit der Homöostase des Immunsystems gebracht (Artis, 2008). *Streptococcus salivarius* ist schon ein paar Stunden nach der Geburt sowohl oral (Kaci et al., 2014), als auch intestinal lokalisiert (Hakalehto et al., 2011). Er reguliert den inflammatorischen *NFκB-Pathway* und reduziert die IL-8 Produktion. Jedoch gibt es auch Ergebnisse, die zeigen, dass er ähnliche Effekte auf die Immunantwort hat wie *Streptococcus pneumoniae* (Engen et al., 2014), ein bekanntes Pathogen bei Asthmatikern (Bisgaard et al., 2007).

Die hier analysierte Studienpopulation zeigte, dass Bauernhofkinder in ihrer Matratze deutlich mehr verschiedene Bakterien aufwiesen. Das wurde durch das signifikant häufigere relative Vorkommen an den seltenen Genera und OTUs und durch die höhere  $\alpha$ -Diversität von Bauernhofkindern deutlich. In Asthmatikern waren im Vergleich zu den gesunden Kontrollen in Kontrast dazu erniedrigte Werte für die seltenen Genera und OTUs und für die  $\alpha$ -Diversität sichtbar. Besonders deutlich wurde dieser *Asthma-Effekt* der erniedrigten mikrobiellen Diversität im Matratzenstaub der Asthmatiker bei den Referenzkindern, da diese über alle Proben betrachtet deutlich niedrigere Werte für die *richness* aufwiesen als die Bauernhofkinder.

Dieses Ergebnis deckt sich gut mit der „Hygiene-Hypothese“ (Strachan, 1989). Ein Kontakt in der frühen Kindheit mit einer sehr diversen bakterienreichen Umgebung schult das Immunsystem, polt es in Richtung TH1-Zell-Immunreaktion und verhindert eine überschießende TH2-Zell-Immunantwort bei Kontakt mit pathogenen Bakterienspezies.

Die höhere *richness*, die die *bunte Vielfalt der Bakterien* widerspiegelt, könnte für die niedrigere Asthma-Prävalenz bei Bauernhofkindern verantwortlich sein. Aber auch bestimmte in ihrer Gesamtheit protektive Bakteriengemeinschaften oder protektive Bakterien unter den seltenen Genera und OTUs könnten zum *Bauernhof-Effekt* beitragen. Oder es ist eine Kombination dieser Interpretationsansätze.

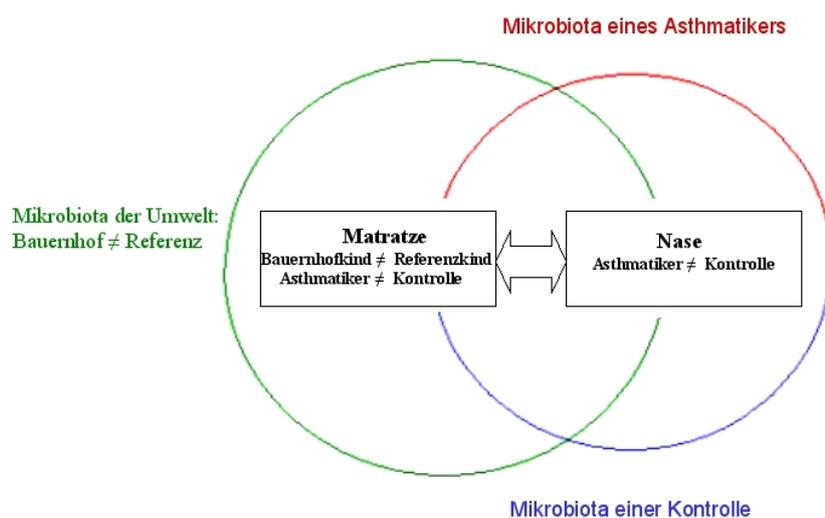
## 5 Schlussfolgerung und Ausblick

Im Rahmen dieser Studie wurden für die zwei unterschiedlichen Probenotypen Nasenabstrich und Matratzenstaub die einzelnen experimentellen Schritte der Probenvorbereitung, der DNA-Extraktion, der Amplikonpräparation und der *454-Pyrosequenzierung* etabliert und optimiert. Die etablierten Methoden sind reproduzierbar und wurden bereits im Rahmen der GABRIELA Studie für die Untersuchung von 360 Matratzenstaubproben (Bayern) bei weiteren Analysen verwendet.

Die höhere Diversität in Matratzenstaub und die unterschiedliche taxonomische Zusammensetzung der beiden Probenotypen gaben Hinweise darauf, dass Matratzenstaub stärker durch die Umwelt beeinflusst wird als Nasenabstrichproben (Abbildung 32). Dies wurde besonders durch die signifikant höhere Anzahl der seltenen Genera und OTUs und durch die höhere *richness* bei Bauernhofkindern im Vergleich zu Referenzkindern deutlich. Auch das auf Genesebene unklassifizierbare Bakterium aus der Familie der *Ruminococcaceae* könnte für einen Einfluss der Umwelt und speziell der Bauernhofumgebung sprechen.

Das könnte bedeuten, dass die Umwelt von Bauernhofkindern eine höhere Bakterienvielfalt aufweist als die Umwelt von Kindern, die nicht auf einem Bauernhof aufwachsen.

Nasenabstrichproben von Bauernhofkindern zeigten im Hinblick auf die relative Häufigkeit der häufigen (> 1%) Phyla, Genera und OTUs keine signifikanten Unterschiede zu den Referenzkindern.



**Abbildung 32:** Die Matratze wird stärker durch die Umwelt beeinflusst als die Nase, welche deutlich geprägt ist durch die Mikrobiota des Kindes. Ein Austausch von Bakterien zwischen Nase und Matratze erscheint möglich.

Ein möglicher Transfer von der Nase auf die Matratze oder umgekehrt, in Abbildung 32 durch den Pfeil verdeutlicht, erscheint möglich. Einige Bakterienspezies waren bei der Betrachtung der taxonomischen Zusammensetzung aller Proben für einen Probenotyp typisch und für den anderen untypisch. Sie wurden aber bei Vorhandensein in dem einem Probenotyp häufig auch im korrespondierenden anderen Probenotyp desselben Kindes gefunden. Diese Beobachtung

kann ein Hinweis auf eine mögliche Beeinflussung der Mikrobiota der Nasenschleimhaut durch das nähere Umfeld sein.

Die Nasenschleimhaut von Asthmatikern enthielt im Gegensatz zu den Kontrollen auf Phylum-Ebene signifikant weniger *Bacteroidetes* und auf Genus-Ebene signifikant weniger *Prevotella* und *Porphyromonas*, was auf eine veränderte Mikrobiota der oberen Atemwege bei einer Erkrankung mit Asthma hindeutet.

Auch der Matratzenstaub von Asthmatikern war verändert und ging mit deutlich verminderem Vorkommen von seltenen Genera und OTUs einher. Ebenso war die *richness* in Matratzenstaub von Asthmatikern erniedrigt.

Die Mikrobiota eines Asthmaticers war schlussfolgernd in Nasenabstrich- und Matratzenstaubproben eindeutig von einer gesunden Kontrolle zu unterscheiden, was in Abbildung 32 durch den roten und grünen Halbbogen für Asthmater und Kontrolle dargestellt ist.

Bei zusätzlicher Trennung in Bauernhof- und Referenzkinder zeigte sich bei den Referenzkindern mit Asthma im Matratzenstaub weiterhin eine signifikant erniedrigte *richness*. Die fehlende Signifikanz bei den Bauernhofkindern mit Asthma in dieser Fragestellung könnte einerseits bedingt sein durch die ohnehin im Vergleich zur Referenzgruppe deutlich höhere *richness* bei Bauernhofkindern, die das Erreichen von signifikanten Werten erschwerte. Außerdem war durch die Einteilung in vier statt zwei Gruppen die statistische Power deutlich geringer, denn auch bei den Referenzkindern mit Asthma war nun der p-Wert höher als bei der Betrachtung aller Asthmater im Vergleich zu allen Kontrollen. Andererseits könnte bei Bauernhofkindern noch ein anderer Einflussfaktor, wie z. B. eine genetische Prädisposition bzw. eine risikoerhöhende Genvariante im Genlocus 17q21, eine Rolle spielen, wenn sie trotz der bakteriellen Vielfalt Asthma entwickeln.

Die Ursache für die niedrigere Asthma-Prävalenz bei Bauernhofkindern könnte also mit einer größeren Bakterienvielfalt in der Bauernhofumgebung zusammenhängen.

Es sind daher noch weitere Untersuchungen nötig, z. B. die Sequenzierung von Staubproben aus den Ställen der Bauernhofkinder und aus der Umgebung der Referenzkinder. Die Inhalation von Stallstaub-Extrakt erwies sich nämlich im Mausmodell schützend im Bezug auf Asthma (Peters et al., 2006).

Ziel für die Zukunft wäre es, die Mikrobiota der Atemwege von Kindern mit einer gezielten Primärprophylaxe, ähnlich einem Probiotikum für den Darm, zu beeinflussen und so vor Asthma zu schützen. Da eine frühe Exposition besonders gut vor Asthma schützt (Wlasiuk und Vercelli, 2012), sollte die Therapie möglichst früh und über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden, um den Effekt zu optimieren. Bei klinischen Studien mit der Applikation von Bakterien müsste man aber mit großer Vorsicht vorgehen und strenge mikrobiologische Sicherheitsvorschriften einhalten, um schädliche Nebeneffekte zu vermeiden.

## 6 Ergebniszusammenfassung

Für die vorliegende Arbeit mit dem Thema „Analyse der bakteriellen Mikrobiota von Schleimhaut- und Umweltproben mittels Next-Generation-Sequencing und Untersuchung ihrer Rolle bei kindlichem Asthma“ lassen sich folgende Ergebnisse festhalten:

Die beiden Probenotypen wiesen dieselben dominanten Phyla mit unterschiedlicher quantitativer Verteilung auf. Gemeinsamkeiten zeigten sie vor allem in der relativen Häufigkeit der Genera *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* und *Propionibacterium* und den zu diesen Genera gehörenden OTUs.

Ein markanter Unterschied war das Auftreten von 29,9 % *Moraxella* und 6,3 % *Haemophilus* in den Nasenabstrichproben, die in Matratzenstaub nur zu 1,4 % bzw. nicht unter den häufigen OTUs vertreten waren. Die Anzahl der häufigen Genera in Matratzenstaub war mit 22 beinahe doppelt so hoch wie in den Nasenabstrichproben mit 12, jedoch waren in Matratzenstaub 14 Genera nur zwischen 1 % und 2 % vertreten. Die seltenen Genera waren mit einem Vorkommen von 34 % in Matratzenstaub doppelt so häufig wie in den Nasenabstrichproben. Diese Auffälligkeit wurde auf OTU-Ebene noch deutlicher mit 58,5 % seltenen OTUs in Matratzenstaub und 23,5 % in den Nasenabstrichproben.

Der Reichtum an verschiedenen OTUs pro Probe wurde durch die höhere  $\alpha$ -Diversität in Matratzenstaub verdeutlicht, zu der hauptsächlich die seltenen OTUs beitragen. Bei Nasenabstrichproben lag als Hinweis auf hohe interindividuelle Unterschiede der bakteriellen Mikrobiota eine höhere  $\beta$ -Diversität vor.

Die Nasenabstrichproben von Bauernhofkindern zeigten, beschränkt auf Phyla, Genera und OTUs, die zu mehr als 1 % vertreten waren, auf keiner taxonomischen Ebene signifikante Unterschiede zu den Referenzkindern.

In Matratzenstaub konnte bei den Bauernhofkindern eine signifikante Erhöhung eines unklassifizierten Genus *Uncultured*, das zur Familie der *Ruminococcaceae* gehörte, beobachtet werden. Genera dieser Ordnung sprechen, wie in Kapitel 4.6 geschildert, für einen Einfluss der Bauernhofumgebung. In Matratzenstaub stieg die Gesamtvariable der seltenen Genera und OTUs bei Bauernhofkindern im Vergleich zu den Referenzkindern signifikant an und stand im Einklang mit der signifikant höheren *richness* in Matratzenstaub von Bauernhofkindern. Matratzenstaub präsentierte sich somit als adäquates Probenmaterial, die unterschiedliche Umwelt von Bauernhof- und Referenzkindern abzubilden.

Bei Asthmatikern wurde bei den Nasenabstrichproben ein signifikant erniedrigtes Vorkommen der *Bacteroidetes* beobachtet. Dies ließ sich auf Genus-Ebene durch ein vermindertes Auftreten von *Prevotella* und *Porphyromonas*, beide den *Bacteroidetes* zugehörig, noch weiter spezifizieren. Es könnte also möglich sein, dass Asthma im Sinne der *united airways* nicht nur ein Krankheitsbild des unteren Respirationstraktes ist, sondern auch die oberen Atemwege beeinflusst.

In Matratzenstaub kam es dagegen zu einem signifikant höheren Vorkommen von *Corynebacterium* und der OTU 2190 (100 % Ähnlichkeit zur *Streptococcus salivarius*-Gruppe). Im Gegensatz zu Bauernhofkindern reduzierte sich der Anteil der seltenen Genera und OTUs si-

gnifikant, was sich ebenso in einer signifikant erniedrigten *richness* in Matratzenstaub widerspiegelte und den *Asthma-Effekt* (Ege et al., 2011) weiter bekräftigte. Die erniedrigte *richness* war bei einer Trennung von Bauernhof- und Referenzgruppe nur für Referenzkinder mit Asthma, nicht aber für Bauernhofkinder mit Asthma im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant. Tendenziell war aber auch bei den Bauernhofkindern mit Asthma der Median für die *richness* im Matratzenstaub erniedrigt.

Da der protektive Effekt von Bauernhof auf Asthma weitgehend durch die *richness* erklärt werden konnte (*change in estimate* von 144 %), könnte in Zusammenschau der Ergebnisse eine höhere bakterielle Vielfalt der Umwelt Kinder davor schützen, Asthma zu entwickeln.

## Literaturverzeichnis

- Abrahamsson TR, Jakobsson HE, Andersson AF, Bjorksten B, Engstrand L, Jenmalm MC:** *Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age.* Clin Exp Allergy, 2014. 44(6): 842-850.
- Agilent 2100 Bioanalyzer:** *Agilent 2100 Bioanalyzer Eine Plattform - zahlreiche Möglichkeiten für die Analyse von DNA, RNA, Proteinen und Zellen.* Agilent Technologies, 2007. Publikation Nummer 5989-6043DEE: 2, 3, 5 und 8-12.
- Ahn JH, Kim BY, Song J, Weon HY:** *Effects of PCR cycle number and DNA polymerase type on the 16S rRNA gene pyrosequencing analysis of bacterial communities.* J Microbiol, 2012. 50(6): 1071-1074.
- Amann R, Fuchs BM, Behrens S:** *The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation.* Curr Opin Biotechnol, 2001. 12(3): 231-236.
- Amplicon Library Preparation Manual:** *GS FLX+ Series XL+ Amplicon Library Preparation Manual.* Roche 454 Sequencing, 2013. Juni 2013: 1-12.
- Anon JB, Jacobs MR, Poole MD, Ambrose PG, Benninger MS, Hadley JA, Craig WA, Sinus Allergy Health, Partnership:** *Antimicrobial treatment guidelines for acute bacterial rhinosinusitis.* Otolaryngol Head Neck Surg, 2004. 130(1 Suppl.): 1-45.
- Arbes Jr. SJ, Sever ML, Vaughn B, Cohen EA, Zeldin DC:** *Oral pathogens and allergic disease: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey.* J Allergy Clin Immunol, 2006. 118: 1169-1175.
- Arbes Jr. SJ, Matsui EC:** *Can oral pathogens influence allergic disease?* J Allergy Clin Immunol, 2011. 127(5): 1119-1127.
- Artis D:** *Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut.* Nat Rev Immunol, 2014. 8(6): 411-420.
- Asher I, Pearce N:** *Global burden of asthma among children.* Int J Tuberc Lung Dis, 2014. 18(11): 1269-78.
- Bachert C, Vignola AM, Gevaert P, Leynaert B, Van Cauwenberge P, Bousquet J:** *Allergic rhinitis, rhinosinusitis, and asthma: one airway disease.* Immunol Allergy Clin North Am, 2004. 24(1): 19-43.
- Barberio G, Pajno GB, Vita D, Caminiti L, Canonica GW, Passalacqua G:** *Does a 'reverse' atopic march exist?* Allergy, 2008. 63(12): 1630-1632.
- Bassis CM, Tang AL, Young VB, Pynnonen MA:** *The nasal cavity microbiota of healthy adults.* Microbiome, 2014. 2: 27.
- Belkaid Y, Segre JA:** *Dialogue between skin microbiota and immunity.* Science, 2014. 346(6212): 954-9.

- Berner R, Schumacher RF, Brandis M, Forster J:** *Colonization and infection with Moraxella catarrhalis in childhood.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1996. 15(6): 506-509.
- Biddle A, Stewart L, Blanchard J, Leschine S** *Untangling the genetic basis of fibrolytic specialization by Lachnospiraceae and Ruminococcaceae in diverse gut communities.* Diversity, 2013. 5:627–40.10.3390/d5030627
- Birzele LT, Depner M, Ege MJ, Engel M, Kublik S, Bernau C, Loss GJ, Genuneit J, Horak E, Schloter M, Braun-Fahrländer C, Danielewicz H, Heederik D, von Mutius E, Legatzki A** *Environmental and mucosal microbiota and their role in childhood asthma.* Allergy, 2016. 10.1111/all.13002. [Epub ahead of print]
- Bisgaard H, Hermansen MN, Buchvald F, Loland L, Halkjaer LB, Bonnelykke K, Braaholt M, Heltberg A, Vissing NH, Thorsen SV, Stage M, Phipps CB:** *Childhood asthma after bacterial colonization of the airway in neonates.* N Eng J Med, 2007. 357(15): 1487-1495.
- Björkstén B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M:** *Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life.* J Allergy Clin Immunol, 2001. 108(4): 516-520.
- Blaxter M, Mann J, Chapman T, Thomas F, Whitton C, Floyd R, Abebe E:** *Defining operational taxonomic units using DNA barcode data.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005. 360(1462): 1935-1943.
- Bogaert D, Keijsers B, Huse S, Rossen J, Veenhoven R, van Gils E, Bruin J, Montijn R, Bonten M, Sanders E:** *Variability and diversity of nasopharyngeal microbiota in children: a metagenomic analysis.* PLoS One, 2011. 6(2): e17035.
- Bønnelykke K, Vissing NH, Sevelsted A, Johnston SL, Bisgaard H:** *Association between respiratory infections in early life and later asthma is independent of virus type.* J Allergy Clin Immunol, 2015. pii: S0091-6749(15)00325-5.[Epub ahead of print]
- Bousquet J, Jacot W, Vignola AM, Bachert C, Van Cauwenberge P:** *Allergic rhinitis: a disease remodeling the upper airways?* J Allergy Clin Immunol, 2004. 113(1): 43-49.
- Brand P:** *New guidelines on recurrent wheeze in preschool children: implications for primary care.* Prim Care Respir J, 2008. 17(4): 243-245.
- Brar T, Nagaraj S, Mohapatra S:** *Microbes and asthma: the missing cellular and molecular links.* Curr Opin Pulm Med, 2012. 18(1): 14-22.
- Braun-Fahrländer C, Gassner M, Grize L, Neu U, Sennhauser FH, Varonier HS, Vuille JC, Wuthrich B:** *Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution.* Clin Exp Allergy, 1999. 29(1): 29-34.

- Braun-Fahrländer C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, Maisch S, Carr D, Gerlach F, Bufe A, Lauener RP, Schierl R, Renz H, Nowak D, von Mutius E, Allergy Endotoxin Study Team:** *Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children.* N Engl J Med, 2002. 347(12): 869-877.
- Brodie EL, Desantis TZ, Joyner DC, Baek SM, Larsen JT, Andersen GL, Hazen TC, Richardson PM, Herman DJ, Tokunaga TK, Wan JM, Firestone MK:** *Application of a high-density oligonucleotide microarray approach to study bacterial population dynamics during uranium reduction and reoxidation.* Appl Environ Microbiol, 2006. 72(9): 6288-6298.
- Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Pena AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R:** *QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data.* Nat Methods, 2010. 7(5): 335-336.
- Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R:** *Bacterial community variation in human body habitats across space and time.* Science, 2009. 326(5960): 1694-1697.
- Corne JM, Marshall C, Smith S, Schreiber J, Sanderson G, Holgate ST, Johnston SL:** *Frequency, severity, and duration of rhinovirus infections in asthmatic and non-asthmatic individuals: a longitudinal cohort study.* Lancet, 2002. 359(9309): 831-834.
- Davies RJ, Holford-Strevens VC, Wells ID, Pepys J:** *Bacterial precipitins and their immunoglobulin class in atopic asthma, non-atopic asthma, and chronic bronchitis.* Thorax, 1976. 31: 419-424.
- Debarry J, Garn H, Hanuszkiewicz A, Dickgreber N, Blumer N, von Mutius E, Bufe A, Gatermann S, Renz H, Holst O, Heine H:** *Acinetobacter lwoffii and Lactococcus lactis strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties.* J Allergy Clin Immunol, 2007. 119(6): 1514-1521.
- Degnan PH, Ochman H:** *Illumina-based analysis of microbial community diversity.* ISME J, 2012. 6(1): 183-194.
- Delorme C, Abraham AL, Renault P, Guedon E:** *Genomics of Streptococcus salivarius, a major human commensal.* Infect Genet Evol, 2014: Epub ahead of print.
- Depner M, Fuchs O, Genuneit J, Karvonen AM, Hyvarinen A, Kaulek V, Roduit C, Weber J, Schaub B, Lauener R, Kabesch M, Pfefferle PI, Frey U, Pekkanen J, Dalphin JC, Riedler J, Braun-Fahrländer C, von Mutius E, Ege MJ, Pasture Study Group:** *Clinical and epidemiologic phenotypes of childhood asthma.* Am J Respir Crit Care Med, 2014. 189(2): 129-138.

- Depner M, Ege MJ, Cox MJ, Dwyer S, Walker AW, Birzele LT, Genuneit J, Horak E, Braun-Fahrländer C, Danielewicz H, Maier RM, Moffatt MF, Cookson WO, Heederik D, von Mutius E, Legatzki A.** *Bacterial microbiota of the upper respiratory tract and childhood asthma.* J Allergy Clin Immunol. 2016 Jul 27. pii: S0091-6749(16)30710-2. doi: 10.1016/j.jaci.2016.05.050. [Epub ahead of print]
- De Schutter I, Dreesman A, Soetens O, De Waele M, Crokaert F, Verhaegen J, Pierard D, Malfroot A:** *In young children, persistent wheezing is associated with bronchial bacterial infection: a retrospective analysis.* BMC Pediatr, 2012. 12: 83.
- Desta AF, Assefa F, Leta S, Stomeo F, Wamalwa M, Njahira M, Appolinaire D:** *Microbial Community Structure and Diversity in an Integrated System of Anaerobic-Aerobic Reactors and a Constructed Wetland for the Treatment of Tannery Wastewater in Modjo, Ethiopia.* PLoS One, 2014. 9(12): e115576.
- Dunn RR, Fierer N, Henley JB, Leff JW, Menninger HL:** *Home life: factors structuring the bacterial diversity found within and between homes.* PLoS One, 2013. 8(5): e64133.
- Eder W, Ege MJ, von Mutius E:** *The asthma epidemic.* N Engl J Med, 2006. 355(21): 2226-2235.
- Edgar RC:** *Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST.* Bioinformatics, 2010. 26(19): 2460-2461.
- Ege MJ, Frei R, Bieli C, Schram-Bijkerk D, Waser M, Benz MR, Weiss G, Nyberg F, van Hage M, Pershagen G, Brunekreef B, Riedler J, Lauener R, Braun-Fahrländer C, von Mutius E, Parsifal Study team:** *Not all farming environments protect against the development of asthma and wheeze in children.* J Allergy Clin Immunol, 2007. 119(5): 1140-1147.
- Ege MJ, Mayer M, Normand AC, Genuneit J, Cookson, WOCM, Braun-Fahrländer C, Heederik D, Piarroux R, von Mutius E, GABRIELA Transregio 22 Study Group:** *Exposure to Environmental Microorganisms and Childhood Asthma.* N Engl J Med, 2011. 364(8): 701-709.
- Ege MJ, Mayer M, Schwaiger K, Mattes J, Pershagen G, van Hage M, Scheynius A, Bauer J, von Mutius E:** *Environmental bacteria and childhood asthma.* Allergy, 2012. 67(12): 1565-1571.
- Ehrenstein OS, von Mutius E, Illi S, Baumann L, Böhm O, von Kries R:** *Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers.* Clin Exp Allergy, 2000. 30(2): 187-193.
- Ejlertsen T, Thisted E, Ebbesen F, Olesen B, Renneberg J:** *Branhamella catarrhalis in children and adults. A study of prevalence, time of colonisation, and association with upper and lower respiratory tract infections.* J Infect, 1994. 29(1): 23-31.

- emPCR Amplification Method Manual Lib L LV: GS FLX+ Series XL+ emPCR Amplification Method Manual Lib L LV.** Roche 454 Sequencing, 2011. Mai 2011: 1-12.
- Engen SA, Valen Rukke H, Becattini S, Jarrossay D, Blix IJ, Petersen FC, Sallusto F, Schenck K:** *The oral commensal Streptococcus mitis shows a mixed memory Th cell signature that is similar to and cross-reactive with Streptococcus pneumoniae.* PLoS One, 2014. 9(8): e104306.
- Eposito S, Terranova L, Ruggiero L, Ascolese B, Montinaro V, Rios WP, Galeone C, Principi N :** *Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus carriage in healthy school-age children and adolescent.* J Med Microbiol, 2015: Epub ahead of print.
- Facklam R:** *What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes.* Clin Microbiol Rev, 2002. 15(4): 613-630.
- Fisher RA, Corbet AS, Williams CB:** *The relation between the number of species and the number of individuals in a random samples of an animal population.* J Anim Ecol, 1943. 12(1): 42-58.
- Fisher MM, Triplett EW:** *Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities.* Appl Environ Microbiol, 1999. 65(10): 4630-4636.
- Frank DN, Feazel LM, Bessesen MT, Price CS, Janoff EN, Pace NR:** *The human nasal microbiota and Staphylococcus aureus carriage.* PLoS One, 2010. 5(5): 10598.
- Fyhrquist N, Ruokolainen L, Suomalainen A, Lehtimäki S, Veckman V, Vendelin J, Karisola P, Lehto M, Savinko T, Jarva H, Kosunen TU, Corander J, Auvinen P, Paulin L, von Hertzen L, Laatikainen T, Makela M, Haahtela T, Greco D, Hanski I, Alenius H:** *Acinetobacter species in the skin microbiota protect against allergic sensitization and inflammation.* J Allergy Clin Immunol, 2014. 134(6): 1301-1309e11.
- Gaffin JM, Spergel JM, Boguniewicz M, Eichenfield LF, Paller AS, Fowler JF Jr, Dinulos JG, Tilles SA, Schneider LC, Phipatanakul W:** *Effect of cat and daycare exposures on the risk of asthma in children with atopic dermatitis.* Allergy Asthma Proc, 2012. 33(3): 282-288.
- Garijo P, Santamaría P, Ocón E, López R, Sanz S, Olarte C, Gutiérrez AR:** *Presence of lactic acid bacteria in the air of a winery along one vintage.* Int. J. Food Microbiol, 2009. 136: 142-146.
- Gelsomino A, Keijzer-Wolters AC, Cacco G, van Elsas JD:** *Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis.* J Microbiol Methods, 1999. 38: 1-15.

- Genuneit J, Buchele G, Waser M, Kovacs K, Debinska A, Boznanski A, Strunz-Lehner C, Horak E, Cullinan P, Heederik D, Braun-Fahrländer C, von Mutius E, GABRIELA Study Group:** *The GABRIEL Advanced Surveys: study design, participation and evaluation of bias.* Paediatr Perinat Epidemiol, 2011. 25(5): 436-447.
- Gilles A, Meglecz E, Pech N, Ferreira S, Malausa T, Martin JF:** *Accuracy and quality assessment of 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing.* BMC Genomics, 2011. 12: 245.
- Global Initiative for Asthma (GINA):** [http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA\\_Report\\_2014\\_Aug12.pdf](http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Report_2014_Aug12.pdf) *Asthma definition.* Global Initiative for Asthma (GINA), 2014. August 2014: 16 (Stand: 15.03.2014).
- Gosalbes MJ, Durban A, Pignatelli M, Abellan JJ, Jimenez-Hernandez N, Pérez-Cobas AE, et al.:** *Metatranscriptomic approach to analyze the functional human gut microbiota.* PLoS One, 2011. 6:e17447.10.1371/journal.pone.0017447
- Granell R, Henderson AJ, Timpson N, St Pourcain B, Kemp JP, Ring SM, Ho K, Montgomery SB, Dermitzakis ET, Evans DM Sterne JA:** *Examination of the relationship between variation at 17q21 and childhood wheeze phenotypes.* J Allergy Clin Immunol, 2013. 131(3): 685-694.
- Grice EA, Kong HH, Conlan S, Deming CB, Davis J, Young AC, NISC Comparative Sequencing Program, Bouffard GG, Blakesley RW, Murray PR, Green ED, Turner ML, Segre JA:** *Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome.* Science, 2009. 324(5931): 1190-1192.
- Hagi T, Sasaki K, Aso H, Nomura M:** *Adhesive properties of predominant bacteria in raw cow's milk to bovine mammary gland epithelial cells.* Folia Microbiol (Praha), 2013. 58(6): 515-522.
- Hakalehto E, Vilpponen-Salmela T, Kinnunen K, von Wright A:** *Lactic Acid bacteria enriched from human gastric biopsies.* ISRN Gastroenterol, 2011. 109183.
- Hamady M, Lozupone C, Knight R:** *Fast UniFrac: facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and Phylo-Chip data.* ISME J, 2010. 4(1): 17-27.
- Hansel TT, Johnston SL, Openshaw PJ:** *Microbes and mucosal immune responses in asthma.* Lancet, 2013. 381(9869): 861-873.
- Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, Davies J, Ervine A, Poulter L, Pachter L, Moffatt MF, Cookson WO:** *Disordered microbial communities in asthmatic airways.* PLoS One, 2010. 5(1): e8578.
- Human Microbiome Project Consortium:** *Structure, function and diversity of the healthy human microbiome.* Nature, 2012. 486(7402): 207-214.

- Huse SM, Huber JA, Morrison HG, Sogin ML, Welch DM:** *Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing.* Genome Biol, 2007. 8(7): R143.
- Illi S, von Mutius E, Lau S, Niggemann B, Gruber C, Wahn U, Multicentre Allergy Study Group:** *Perennial allergen sensitisation early in life and chronic asthma in children: a birth cohort study.* Lancet, 2006. 368(9537): 763-770.
- Illi S, Depner M, Genuneit J, Horak E, Loss G, Strunz-Lehner C, Büchele G, Boznanski A, Danielewicz H, Cullinan P, Heederik D, Braun-Fahrlander C, von Mutius E, GABRIELA Study Group:** *Protection from childhood asthma and allergy in Alpine farm environments-the GABRIEL Advanced Studies.* J Allergy Clin Immunol, 2012. 129(6): 1470-1477.
- Illumina Genomic Sequencing:** [http://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet\\_genomic\\_sequence.pdf](http://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_genomic_sequence.pdf) *Genomic Sequencing:* 1-6 (Stand: 14.03.2015).
- ISAAC:** [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0012/96996/3.1.pdf](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0012/96996/3.1.pdf): *International Study of Asthma and Allergies in Childhood.* Prevalence of asthma and allergies in children, 2007: 1-4 (Stand: 14.03.2015).
- ISAAC:** <http://isaac.auckland.ac.nz/>: *The International Study of Asthma and Allergies in Childhood* (Stand: 14.03.2015).
- Jenkins SN, Waite IS, Blackburn A, Husband R, Rushton SP, Manning DC, O'Donnell AG:** *Actinobacterial community dynamics in long term managed grasslands.* Antonie Van Leeuwenhoek, 2009. 95(4): 319-334.
- Jiang W, Ling Z, Lin X, Chen Y, Zhang J, Yu J, Xiang C, Chen H:** *Pyrosequencing analysis of oral microbiota shifting in various caries states in childhood.* Microb Ecol, 2014. 67(4): 962-969.
- Jordan P, Darke PL, Kuo LC:** *Activity and dimerization of human immunodeficiency virus protease as a function of solvent composition and enzyme concentration.* J Biol Chem, 1992. 267(28): 20028-20032.
- Kaci G, Goudercourt D, Dennin V, Pot B, Dore J, Ehrlich SD, Renault P, Blottiere HM, Daniel C, Delorme C:** *Anti-inflammatory properties of Streptococcus salivarius, a commensal bacterium of the oral cavity and digestive tract.* Appl Environ Microbiol, 2014. 80(3): 928-934.
- Karalus R, Campagnari A:** *Moraxella catarrhalis: a review of an important human mucosal pathogen.* Microbes Infect, 2000. 2(5): 547-559.
- Karmaus W, Botezan C:** *Does a higher number of siblings protect against the development of allergy and asthma? A review.* J Epidemiol Community Health, 2002. 56(3): 209-217.

- Kawamura Y, Hou XG, Sultana F, Miura H, Ezaki T:** *Determination of 16S rRNA sequences of Streptococcus mitis and Streptococcus gordonii and phylogenetic relationships among members of the genus Streptococcus.* Int J Syst Bacteriol, 1995. 45(2): 406-408.
- Kelley ST, Theisen U, Angenent LT, St Amand A, Pace NR:** *Molecular analysis of shower curtain biofilm microbes.* Appl Environ Microbiol, 2004. 70(7): 4187-4192.
- Khan MT, Duncan SH, Stams AJ, van Dijk JM, Flint HJ, Harmsen HJ:** *The gut anaerobe Faecalibacterium prausnitzii uses an extracellular electron shuttle to grow at oxic-anoxic interphases.* ISME J, 2012. 6(8): 1578-1585.
- Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, Moutoglis P, Klironomos JN, Lee H, Trevors JT:** *Methods of studying soil microbial diversity.* J Microbiol Methods, 2004. 58(2): 169-188.
- Koletzko B, Harnack GA:** *Kinder- und Jugendmedizin.* Springer Verlag, 2012. 14. Auflage: 391-394.
- Korf JE, Pynaert G, Tournoy K, Boonefaes T, Van Oosterhout A, Ginneberge D, Haegeman A, Verschoor JA, De Baetselier P, Grooten J:** *Macrophage reprogramming by mycolic acid promotes a tolerogenic response in experimental asthma.* Am J Respir Crit Care Med, 2006. 174(2): 152-160.
- Korthals M, Ege MJ, Tebbe CC, von Mutius E, Bauer J:** *Application of PCR-SSCP for molecular epidemiological studies on the exposure of farm children to bacteria in environmental dust.* J Microbiol Methods, 2008. 73(1): 49-56.
- Krysinska-Traczyk E, Skorska C, Prazmo Z, Sitkowska J, Cholewa G, Dutkiewicz J:** *Exposure to airborne microorganisms, dust and endotoxin during flax scutching on farms.* Ann Agric Environ Med, 2004. 11: 309-317.
- Kurukulaaratchy RJ, Matthews S, Arshad SH:** *Defining childhood atopic phenotypes to investigate the association of atopic sensitization with allergic disease.* Allergy, 2005. 60(10): 1280-1286.
- Lau S, Illi S, Sommerfeld C, Niggemann B, Bergmann R, von Mutius E, Wahn U:** *Early exposure to house-dust mite and cat allergens and development of childhood asthma: a cohort study.* Multicentre Allergy Study Group. Lancet, 2000. 356(9239): 1392-1397.
- Lemon KP, Klepac-Ceraj V, Schiffer HK, Brodie EL, Lynch SV, Kolter R:** *Comparative analyses of the bacterial microbiota of the human nostril and oropharynx.* MBio, 2010. 1(3).
- Leyden JJ, McGinley KJ, Nordstrom KM, Webster GF:** *Skin microflora.* J Invest Dermatol, 1987. 88(3): 65s-72s.
- Li K, Bihan M, Yooseph S, Methe BA:** *Analyses of the microbial diversity across the human microbiome.* PLoS One, 2012. 7(6): e32118.

- Ling Z, Li Z, Liu X, Cheng Y, Luo Y, Tong X, Yuan L, Wang Y, Sun J, Li L, Xiang C:** *Altered fecal microbiota composition associated with food allergy in infants.* Appl Environ Microbiol. , 2014. 80: 2546-2554.
- Liu WT, Marsh TL, Cheng H, Forney LJ:** *Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA.* Appl Environ Microbiol, 1997. 63(11): 4516-4522.
- Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M:** *Comparison of next-generation sequencing systems.* J Biomed Biotechnol, 2012. 2012: 251364.
- Loss G, Apprich S, Waser M, Kneifel W, Genuneit J, Buchele G, Weber J, Sozanska B, Danielewicz H, Horak E, van Neerven RJ, Heederik D, Lorenzen PC, von Mutius E, Braun-Fahrländer C, GABRIELA Study Group:** *The protective effect of farm milk consumption on childhood asthma and atopy: the GABRIELA study.* J Allergy Clin Immunol, 2011. 128(4): 766-773 e4.
- Loss G, Depner M, Ulfman LH, Joost van Neerven RJ, Hose AJ, Genuneit J, Karvonen AM, Hyvarinen A, Kaulek V, Roduit C, Weber J, Lauener R, Pfefferle PI, Pekkanen J, Vaarala O, Dalphin JC, Riedler J, Braun-Fahrländer C, von Mutius E, Ege M J, the Pasture Study Group:** *Consumption of unprocessed cow's milk protects infants from common respiratory infections.* J Allergy Clin Immunol, 2014. 135(1): 56-62.
- Lozupone C, Lladser ME, Knights D, Stombaugh J, Knight R:** *UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison.* ISME J, 2011. 5(2): 169-172.
- Lozupone C, Knight R:** *UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities.* Appl Environ Microbiol, 2005. 71(12): 8228-8235.
- Luo C, Tsementzi D, Kyrpides N, Read T, Konstantinidis KT:** *Direct Comparisons of Illumina vs. Roche 454 Sequencing Technologies on the Same Microbial Community DNA Sample.* PLoS One, 2012. 7(2): e30087.
- Lynch SV, Wood RA, Boushey H, Bacharier LB, Bloomberg GR, Kattan M, O'Connor GT, Sandel MT, Calatroni A, Matsui E, Johnson CC, Lynn H, Visness CM, Jaffee KF, Gergen PJ, Gold DR, Wright RJ, Fujimura K, Rauch M, Busse WW, Gern JE:** *Effects of early-life exposure to allergens and bacteria on recurrent wheeze and atopy in urban children.* J Allergy Clin Immunol, 2012. 134(3): 593-601 e12.
- Mardis ER:** *The impact of next-generation sequencing technology on genetics.* Trends Genet, 2008. 24(3): 133-141.
- Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer ML, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson**

- E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM:** *Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors.* Nature, 2005. 437(7057): 376-80.
- Marinho FA, Pacifico LG, Miyoshi A, Azevedo V, Le Loir Y, Guimaraes VD, Langella P, Cassali GD, Fonseca CT, Oliveira SC:** *An intranasal administration of Lactococcus lactis strains expressing recombinant interleukin-10 modulates acute allergic airway inflammation in a murine model.* Clin Exp Allergy, 2010. 40(10): 1541-1551.
- Marshall WA, Tanner JM:** *Variations in pattern of pubertal changes in girls.* Arch Dis Child (1969): Vol. 44 (235) S. 291-303.
- Marshall WA, Tanner JM:** *Variations in pattern of pubertal changes in boys.* Arch Dis Child (1970): Vol. 45(239) S. 13-23.
- Martinez FD, Wright AL, Taussig LM, Holberg CJ, Halonen M, Morgan WJ:** *Asthma and wheezing in the first six years of life. The Group Health Medical Associates.* N Engl J Med, 1995. V332(3): 133-138.
- Martinez I, Lattimer JM, Hubach KL, Case JA, Yang J, Weber CG, Louk JA, Rose DJ, Kyureghian G, Peterson DA, Haub MD, Walter J:** *Gut microbiome composition is linked to whole grain-induced immunological improvements.* ISME, 2013. J7: 269-280.
- Martinez FD, Holt PG:** *Role of microbial burden in aetiology of allergy and asthma.* Lancet, 1999. 354(suppl. 2): 1112-1115.
- McGinley KJ, Webster GF, Leyden JJ:** *Regional variations of cutaneous propionibacteria.* Appl Environ Microbiol, 1978. 35(1): 62-66.
- McGrath KW, Icitovic N, Boushey HA, Lazarus SC, Sutherland ER, Chinchilli VM, Fahy JV, Asthma Clinical Research Network of the National Heart Lung Blood Institute:** *A large subgroup of mild-to-moderate asthma is persistently noneosinophilic.* Am J Respir Crit Care Med, 2012. 185(6): 612-619.
- McMurdie PJ, Holmes S:** *phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data.* PLoS One, 2013. 8(4): 612-617.
- Mika M, Mack I, Korten I, Qi W, Aebi S, Frey U, Latzin P, Hilty M:** *Dynamics of the nasal microbiota in infancy: A prospective cohort study.* J Allergy Clin Immunol, 2015: Epub ahead of print.
- Milstone LM:** *Epidermal desquamation.* J Dermatol Sci, 2004. 36(3): 131-140.
- Minchin PR:** *An evaluation of the relative robustness of techniques for ecological ordination.* Vegetation, 1987. 69: 89-107.

- Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, Dixon AL, Strachan D, Heath S, Depner M, von Berg A, Bufe A, Rietschel E, Heinzmann A, Simma B, Frischer T, Willis-Owen SA, Wong KC, Illig T, Vogelberg C, Weiland SK, von Mutius E, Abecasis GR, Farrall M, Gut IG, Lathrop GM, Cookson WO:** *Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma.* Nature, 2007. 448(7152): 470-473.
- Monserud A, Sterba H:** *A basal area increment model for individual trees growing in even- and uneven-aged forest stands in Austria.* Forest Ecology and Management, 1996. 80: 57-80.
- Morgan XC, Tickle TL, Sokol H, Gevers D, Devaney KL, Ward DV, Reyes JA, Shah SA, LeLeiko N, Snapper SB, Bousvaros A, Korzenik J, Sands BE, Xavier RJ, Huttenhower C** *Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment.* Genome Biol, 2012. 13: R79. 10.1186/gb-2012-13-9-r79.
- Mulder CPH, Bazeley-White E, Dimitrakopoulos PG, Hector A, Scherer-Lorenzen M, Schmid B:** *Species evenness and productivity in experimental plant communities.* Oikos, 2004. 107: 50-63.
- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG:** *Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA.* Appl Environ Microbiol, 1993. 59(3): 695-700.
- Nadal I, Santacruz A, Marcos A, Warnberg J, Garagorri JM, Moreno LA, Martin-Matillas M, Campoy C, Marti A, Moleres A, Delgado M, Veiga OL, Garcia-Fuentes M, Redondo CG, Sanz Y:** *Shifts in clostridia, bacteroides and immunoglobulin-coating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents.* Int J Obes (Lond), 2009. 33(7): 758-767.
- Nagai M, Yoshida A, Sato N:** *Additive effects of bovine serum albumin, dithiothreitol, and glycerol on PCR.* Biochem Mol Biol Int, 1998. 44(1): 157-163.
- NCBI BLAST:** [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) (Stand: 14.03.2015).
- Nelson MC, Morrison HG, Benjamino J, Grim SL, Graf J:** *Analysis, optimization and verification of Illumina-generated 16S rRNA gene amplicon surveys.* PLoS One, 2014. 9(4): e94249.
- Normand AC, Sudre B, Vacheyrou M, Depner M, Wouters IM, Noss I, Heederik D, Hyvarinen A, Genuneit J, Braun-Fahrlander C, von Mutius E, Piarroux R, GABRIELA Study Group:** *Airborne cultivable microflora and microbial transfer in farm buildings and rural dwellings.* Occup Environ Med, 2011. 68(11): 849-855.
- Ober C, Hoffjan S:** *Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery.* Genes Immun, 2006. 7(2): 95-100.

- Ogram A, Sayler GS, Barkay T:** *The extraction and purification of microbial DNA from sediments.* J Microbiol Methods, 1987. 7: 57-66.
- Oh J, Conlan S, Polley EC, Segre JA, Kong HH:** *Shifts in human skin and nares microbiota of healthy children and adults.* Genome Med, 2012. 4(10): 77.
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Wagner H:** *vegan: Community Ecology Package. R package version 2.0-10.*
- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K:** *A rapid and sensitive detection of point mutations and genetic polymorphisms using polymerase chain reaction.* Genomics, 1989. 5: 874-879.
- Orti G, Hare MP, Avise JC:** *Detection and isolation of nuclear haplotypes by PCR-SSCP.* Mol Ecol, 1997. 6: 575-580.
- Park H, Shin JW, Park SG, Kim W:** *Microbial communities in the upper respiratory tract of patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease.* PLoS One, 2014. 9(10): e109710.
- Peters M, Kauth M, Schwarze J, Korner-Rettberg C, Riedler J, Nowak D, Braun-Fahrlander C, von Mutius E, Bufe A, Holst O:** *Inhalation of stable dust extract prevents allergen induced airway inflammation and hyperresponsiveness.* Thorax, 2006. 61(2): 134-139.
- Poyart C, Quesne G, Coulon S, Berche P, Trieu-Cuot P:** *Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase.* J Clin Microbiol, 1998. 36(1): 41-47.
- Quant-iT PicoGreen:** <https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp07581.pdf> *Quant-iT PicoGreen dsDNA Reagent and Kits.* Molecular Probes invitrogen detection technologies, 2008: 1-7 (Stand: 15.03.2015).
- Quigley L, McCarthy R, O'Sullivan O, Beresford TP, Fitzgerald GF, Ross RP, Stanton C, Cotter PD:** *The microbial content of raw and pasteurized cow milk as determined by molecular approaches .* J Dairy Sci, 2013. 96(8): 4928-4937.
- Quince C, Lanzen A, Davenport RJ, Turnbaugh PJ:** *Removing noise from pyrosequenced amplicons.* BMC Bioinformatics, 2011. 12: 38.
- Quinlan AR, Stewart DA, Stromberg MP, Marth GT:** *Pyrobayes: an improved base caller for SNP discovery in pyrosequences.* Nat Methods, 2008. 5(2): 179-181.
- QIIME developing team, 2015:** [http://qiime.org/tutorials/otu\\_picking.html](http://qiime.org/tutorials/otu_picking.html) *de-novo-picking.* QIIME developing team, 2015. (Stand: 28.08.2016).

- Rasolofa EA, St-Gelais D, LaPointe G, Roy D:** *Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk.* Int J Food Microbiol 2010;138:108–118.
- Reddel HK, Taylor DR, Bateman ED, Boulet LP, Boushey HA, Busse WW, Casale TB, Chanaz P, Enright PL, Gibson PG, de Jongste JC, Kerstjens HA, Lazarus SC, Levy ML, O’Byrne PM, Partridge MR, Pavord ID, Sears MR, Sterk PJ, Stoloff SW, Sullivan SD, Szefer SJ, Thomas MD, Wenzel SE, American Thoracic Society/European Respiratory Society Task Force on Asthma Control Exacerbations:** *An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: asthma control and exacerbations: standardizing endpoints for clinical asthma trials and clinical practice.* Am J Respir Crit Care Med, 2009. 180(1): 59-99.
- Rees WA, Yager TD, Korte J, von Hippel PH:** *Betaine can eliminate the base pair composition dependence of DNA melting.* Biochemistry, 1993. 32(1): 137-144.
- Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, Carr D, Schierl R, Nowak D, von Mutius E, Alex Study Team:** *Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey.* Lancet, 2001. 358(9288): 1129-1133.
- Riedler J, Eder W, Oberfeld G, Schreuer M:** *Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization.* Clin Exp Allergy, 2000. 30(2): 194-200.
- Rimmer J, Ruhno JW:** *6: Rhinitis and asthma: united airway disease.* Med J Aust, 2006. 185(10): 565-571.
- Rintala H, Pitkaranta M, Toivola M, Paulin L, Nevalainen A:** *Diversity and seasonal dynamics of bacterial community in indoor environment.* BMC Microbiol, 2008. 8: 56.
- Roche 454 Life Sciences:** [http://www.454.com/downloads/news-events/how-genome-sequencing-is-done\\_FINAL.pdf](http://www.454.com/downloads/news-events/how-genome-sequencing-is-done_FINAL.pdf): *How is genome sequencing done?:* 1-8 (Stand: 14.03.2015).
- Roche Diagnostics GmbH:** *454 Sequencing Systems Get the complete picture:* [http://454.com/downloads/454SystemsBrochureSpread\\_Final.pdf](http://454.com/downloads/454SystemsBrochureSpread_Final.pdf): Roche Diagnostics GmbH, 2010. : 1-7.
- Ronaghi M:** *Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing.* Genome Research, 2001. 11(1): 3-11.
- Roth RR, James WD:** *Microbial ecology of the skin.* Annu Rev Microbiol, 1988. 42: 441-446.
- Rothberg JM, Leamon JH:** *The development and impact of 454 sequencing.* Nat Biotechnol, 2008. 26(10): 1117-1124.
- Rubin DB:** *Matching using estimated propensity scores: relating theory to practice.* Biometrics, 1996. 52(1): 249-264.

- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N:** *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.* *Science*, 1985. 230(4732): 1350-1354.
- Scharschmidt TC, Fischbach MA:** *What Lives On Our Skin: Ecology, Genomics and Therapeutic Opportunities Of the Skin Microbiome.* *Drug Discov Today Dis Mech*, 2014. 10(3-4): e93-e89.
- Schaub B, von Mutius E:** *Obesity and asthma, what are the links?* *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2005. 5(3): 185-193.
- Schaub B, Lauener R, von Mutius E:** *The many faces of the hygiene hypothesis.* *J Allergy Clin Immunol*, 2006. 117(5): 969-977.
- Schram D, Doekes G, Boeve M, Douwes J, Riedler J, Ublagger E, von Mutius E, Budde J, Pershagen G, Nyberg F, Alm J, Braun-Fahrlander C, Waser M, Brunekreef B, PARSIFAL Study Group:** *Bacterial and fungal components in house dust of farm children, Rudolf Steiner school children and reference children—the PARSIFAL Study.* *Allergy*, 2005. 60(5): 611-618.
- Sen A, Daubin V, Abrouk D, Gifford I, Berry AM, Normand P:** *Phylogeny of the class Actinobacteria revisited in the light of complete genomes. The orders 'Frankiales' and Micrococcales should be split into coherent entities: proposal of Frankiales ord. nov., Geodermatophilales ord. nov., Acidothermales ord. nov. and Nakamurellales ord. nov.* *Int J Syst Evol Microbiol*, 2014. 64(11): 3821-3832.
- Sequencing Method Manual for the GS FLX+ Instrument:** *GS FLX+ Series XLR70 Kit.* Roche 454 Sequencing, 2013. Juni 2013: 1-32.
- Shannon CE, Weaver W:** *The mathematical theory of communication.* University of Illinois Press, Urbana, 1963.
- Simon-Soro A, Tomas I, Cabrera-Rubio R, Catalan MD, Nyvad B, Mira A:** *Microbial geography of the oral cavity.* *J Dent Res*, 2013. 92(7): 616-621.
- Sinclair L, Osman OA, Bertilsson S, Eiler A:** *Microbial Community Composition and Diversity via 16S rRNA Gene Amplicons: Evaluating the Illumina Platform.* *PLoS One*, 2015. 10(2): e0116955.
- Sly PD, Boner AL, Bjorksten B, Bush A, Custovic A, Eigenmann PA, Gern JE, Gerritsen J, Hamelmann E, Helms PJ, Lemanske RF, Martinez F, Pedersen S, Renz H, Sampson H, von Mutius E, Wahn U, Holt PG:** *Early identification of atopy in the prediction of persistent asthma in children.* *Lancet*, 2008. 372(9643): 1100-1106.
- Sozanska B, Macneill SJ, Kajderowicz-Kowalik M, Danielewicz H, Wheatley M, Newman Taylor AJ, Boznanski A, Cullinan P:** *Atopy and asthma in rural Poland: a paradigm for the emergence of childhood respiratory allergies in Europe.* *Allergy*, 2007. 62(4): 394-400.

- Spergel JM:** *Epidemiology of atopic dermatitis and atopic march in children.* Immunol Allergy Clin North Am, 2010. 30(3): 269-280.
- Stackebrandt E, Goebel BM:** *Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology.* Int J Syst Evol Microbiol, 1994. 44: 846-849.
- Staley JT, Konopka A:** *Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats.* Annu Ref Microbiol, 1985. 39: 321-346.
- Strachan DP, Cook DG:** *Health effects of passive smoking. 6. Parental smoking and childhood asthma: longitudinal and case-control studies.* Thorax, 1998. 53(3): 304-312.
- Strachan DP, Butland BK, Anderson HR:** *Incidence and prognosis of asthma and wheezing illness from early childhood to age 33 in a national British cohort.* BMJ, 1996. 312(7040): 1195-1199.
- Strachan DP:** *Hay fever, hygiene, and household size.* BMJ, 1989. 299(6710): 1259-1260.
- Swidrak I, Schuster R, Oberhuber W:** *Comparing growth phenology of co-occurring deciduous and evergreen conifers exposed to drought.* Flora, 2013. 208 (10-12).
- Takamatsu D, Ide H, Osaki M, Sekizaki T.:** *Identification of Facklamia sourekii from a lactating cow.* J Vet Med Sci 2006;68:1225– 1227.
- Talan DA, Citron DM, Abrahamian FM, Moran GJ, Goldstein EJ:** *Bacteriologic analysis of infected dog and cat bites. Emergency Medicine Animal Bite Infection Study Group.* N Engl J Med, 1999. 340(2): 85-92.
- Tan H, Deng Q, Cao L:** *Ruminant feces harbor diverse uncultured symbiotic actinobacteria.* World J Microbiol Biotechnol, 2013. 30(3): 1093-1100.
- Tatum AJ, Shapiro GG:** *The effects of outdoor air pollution and tobacco smoke on asthma.* Immunol Allergy Clin North Am, 2005. 25(1): 15-30.
- Täubel M, Rintala H, Pitkaranta M, Paulin L, Laitinen S, Pekkanen J, Hyvarinen A, Nevalainen A:** *The occupant as a source of house dust bacteria.* J Allergy Clin Immunol, 2009. 124(4): 834-40 e47.
- Tse K, Horner AA:** *Defining a role for ambient TLR ligand exposures in the genesis and prevention of allergic diseases.* Semin Immunopath, 2008. 30(1): 53-62.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI:** *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest.* Nature, 2006. 44(7122): 1027-1031.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI:** *The human microbiome project.* Nature, 2007. 449(7164): 804-810.

- Ulevitch RJ, Tobias PS:** *Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin.* Annu Rev Immunol, 1995. 13: 437-457.
- Vaneechoutte M, Verschraegen G, Claeys G, Weise B, Van den Abeele AM:** *Respiratory tract carrier rates of Moraxella (Branhamella) catarrhalis in adults and children and interpretation of the isolation of M. catarrhalis from sputum.* J Clin Microbiol, 1990. 28(12): 2674-2680.
- Vaneechoutte M:** *DNA fingerprinting techniques for microorganisms. A proposal for classification and nomenclature.* Mol Biotechnol, 1995. 6 (2): 115-142.
- van der Hulst AE, Klip H, Brand PL:** *Risk of developing asthma in young children with atopic eczema: a systematic review.* J Allergy Clin Immunol, 2007. 120(3): 565-569.
- van Strien RT, Engel R, Holst O, Bufe A, Eder W, Waser M, Braun-Fahrländer C, Riedler J, Nowak D, von Mutius E, Alex Study Team:** *Microbial exposure of rural school children, as assessed by levels of N-acetyl-muramic acid in mattress dust, and its association with respiratory health.* J Allergy Clin Immunol, 2004. 113(5): 860-867.
- Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD:** *Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics.* Clin Chem, 2009. 55(4): 641-658.
- von Mutius E, Vercelli D:** *Farm living: effects on childhood asthma and allergy.* Nature Reviews. Immunology, 2010. 10: 861-868.
- von Mutius E, Martinez FD, Fritsch D, Nicolai T, Roell G, Thiemann HH:** *Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany.* Respiratory and Critical Care Medicine, 1994. 149(2): 358-364.
- von Mutius E:** *Will we be able to reverse the epidemiological trend?* Pediatr Allergy Immunol, 2014. 25(1): 9-11.
- von Mutius E, Braun-Fahrländer C, Schierl R, Riedler J, Ehlermann S, Maisch S, Waser M, Nowak D:** *Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy.* Clin Exp Allergy, 2000. 30(9): 1230-1234.
- Wassall HJ, Devenny AM, Daud Khan S, Ninan TK, Russell G:** *A comparison of virus-associated and multi-trigger wheeze in school children.* J Asthma, 2005. 42(9): 737-744.
- West CE, Ryden P, Lundin D, Engstrand L, Tulic MK, Prescott SL:** *Gut microbiome and innate immune response patterns in IgE-associated eczema.* Clin Exp Allergy, 2015. 45: 1419-1429. 10.1111/cea.12566.
- White DC, Sutton SD, Ringelberg DB:** *The genus Sphingomonas: physiology and ecology.* Current opinion in biotechnology, 1996. 7(3): 301-306.
- Whittaker RH:** *Dominance and Diversity in Land Plant Communities: Numerical relations of species express the importance of competition in community function and evolution.* Science, 1965. 147(3655): 250-260.

- Whittaker RH:** *Evolution and measurement of species diversity*. *Taxon*, 1972. 21: 213-251.
- WHO:** <http://www.who.int/respiratory/asthma/en/>: *Chronic Respiratory Diseases*. WHO, 2014 (Stand: 14.03.2015).
- Wildeboer-Veloo AC, Harmsen HJ, Welling GW, Degener JE:** *Development of 16S rRNA-based probes for the identification of Gram-positive anaerobic cocci isolated from human clinical specimens*. *Clin Microbiol Infect*, 2007. 13(10): 985-992.
- Willing BP, Dicksved J, Halfvarson J, Andersson AF, Lucio M, Zheng Z, Jarnerot G, Tysk C, Jansson JK, Engstrand L:** *A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes*. *Gastroenterology*, 2010. 139: 1844.e1–1854.e1. 10.1053/j.gastro.2010.08.049.
- Wlasiuk G, Vercelli D:** *The farm effect, or: when, what and how a farming environment protects from asthma and allergic disease*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2012. 12(5): 461-466.
- Woese CR, Fox GE:** *Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. 74(11): 5088-90.
- Yan M, Pamp SJ, Fukuyama J, Hwang PH, Cho DY, Holmes S, Relman DA:** *Nasal micro-environments and interspecific interactions influence nasal microbiota complexity and *S. aureus* carriage*. *Cell Host Microbiome*, 2013. 14(6): 631-640.
- Yarza P, Sproer C, Swiderski J, Mrotzek N, Spring S, Tindall BJ, Gronow S, Pukall R, Klenk HP, Lang E, Verburg S, Crouch A, Lilburn T, Beck B, Unosson C, Cardew S, Moore ER, Gomila M, Nakagawa Y, Janssens D, De Vos P, Peiren J, Suttels T, Clermont D, Bizet C, Sakamoto M, Iida T, Kudo T, Kosako Y, Oshida Y, Ohkuma MR, Arahall D, Spieck E, Pommerening Roeser A, Figge M, Park D, Buchanan P, Cifuentes A, Munoz R, Euzeby JP, Schleifer KH, Ludwig W, Amann R, Glockner FO, Rossello-Mora R:** *Sequencing orphan species initiative (SOS): Filling the gaps in the 16S rRNA gene sequence database for all species with validly published names*. *Syst Appl Microbiol*, 2013. 36(1): 69-73.
- Yi H, Yong D, Lee K, Cho YJ, Chun J:** *Profiling bacterial community in upper respiratory tracts*. *BMC Infect Dis*, 2014. 14(1): 583.
- Zablen LB, Kissil MS, Woese CR, Buetow DE:** *Phylogenetic Origin of the Chloroplast and Prokaryotic Nature of Its Ribosomal RNA (*Euglena*/16S rRNA/ evolution*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1975. 72(6): 2418-2422.
- Zimmerman B, Feanny S, Reisman J, Hak H, Rashed N, McLaughlin FJ, Levison H:** *Allergy in asthma. I. The dose relationship of allergy to severity of childhood asthma*. *J Allergy Clin Immunol*, 1988. 81(1): 63-70.
- 454 Sequencing System Guidelines:** *454 Sequencing System Guidelines for Amplicon Experimental Design*. Roche, 2011.

# Anhang

**Tabelle E1:** Allgemein verwendete Materialien

Bezeichnung-Produkt	Firma	Katalognummer
<b>allgemeine Chemikalien</b>		
Ethanol absolut für Molekularbiologie	Roth	T833.1
Ethanol 80%	Roth	A5023
DNA Exitus Plus IF (indicator free)	AppliChem	A7409,0500
Ethanol absolut für Molekularbiologie	Applichem	A3678,0500
50 X TAE Puffer	Roth	CL 86.1
AL-Buffer, Lysis Buffer	Qiagen	19075
TAE-Buffer 50x (1 l)	Roth	24710030
Tris EDTA-Buffer solution 100x für Molekularbiologie	Sigma-Aldrich	T9285-100ml
<b>allgemeines Verbrauchsmaterial</b>		
DNA lo bind Tubes 1,5 ml	Eppendorf	30108051
Safe-Lock Reaktionsgefäß, PCR clean 1,5 ml	Omnilab	5283548
Safe-Lock Reaktionsgefäß, PCR clean 2 ml	Omnilab	5409341
10 µl Pipettenspitzen, steril	Sarstedt	70116210
Bioshere Pipettenspitze mit Filter 200 µl	Sarstedt	70.760.211
Biosphere Pipettenspitze mit Filter 2-20 µl	Sarstedt	70.760.213
Biosphere Pipettenspitzen m. Filter 10 µl	Sarstedt	701115210
Biosphere Pipettenspitzen m. Filter 100 µl	Sarstedt	70760212
Biosphere Pipettenspitzen m. Filter 1000 µl	Sarstedt	70762211
Biosphere Pipettenspitzen m. Filter 2,5 µl	Sarstedt	701130212
Biosphere Pipettenspitzen m. Filter 20 µl	Sarstedt	70760213
Biosphere Pipettenspitzen m. Filter 200 µl	Sarstedt	70760211
Biosphere Pipettenspitzen m. Filter 0,5 - 20 µl	Sarstedt	701116210
Pipettenspitze ep.TIPS 2-200 µl	Omnilab	5409413
<b>allgemein verwendete technische Geräte</b>		
UVC/T-M-ARE DNA/RNA UV-Reiniger Box mit Glaswänden und Edelstahlgehäuse	Profilab 24	BS-10805
Crosslinker CL1000 254nm	VWR	732-4302
Research Plus Pack, Option 2 (3 Pipetten), 3x96ep TIPS	VWR	613-1144
Mikrozentrifuge Micro Star 17, luftgekühlt mit 24 Plätzen	VWR	521-1646
Sprout Minizentrifuge	Omnilab	5422695
UV-AirClean Workstation- Model GL UV/WL, UV-245nm	Labortechnik	1120012
Plattenzentrifuge PerfectSpin P	Peqlab	91-PSIN-P

**Tabelle E2:** Verwendete Puffer und Materialien für die DNA-Isolation und die PCR

Bezeichnung-Produkt	Firma	Katalognummer
<b>Puffer</b>		
50 X TAE Puffer	Roth	CL 86.1
AL-Buffer, Lysis Buffer	Qiagen	19075
TAE-Buffer (50x) 1 l	online Bestellsystem	24710030
Tris EDTA-Buffer solution (TE-Puffer) 100x für Molekularbiologie	Sigma-Aldrich	T9285-100ml
GS Titanium Sequencing Buffer CB	Roche	5351588001
GS FLX Titanium Sequencing Bead/Wash Buffer	Roche	5351596001
<b>spezielles Material und Chemikalien für die DNA-Isolation</b>		
FastDNA 2ml Spin Kit for Soil (50 Proben)	MP Biomedicals Germany	116560200
MoBio Powersoil Kit (50 Proben)	Süd-Laborbedarf	312888-050
Qiamp DNA Minikit zur DNA Isolation (50 Proben)	Qiagen	51304
DNA Spin Baskets	Promega	V1221
Ready Lyse Lysozym Lsg (c=35000 U/µl)	Biozym	186002
Glassbeads, acid-washed (150-212µm)	Appilchem	A3678,0500
Vortex Adapter für 24 1,5-2ml Gefäße	MOBO	13000 V1 24
<b>spezielles Material und Chemikalien für PCR</b>		
Fast Start High Fidelity PCR System (500 U)	Roche	4738292001
PCR-Wasser 500 ml	Carl Roth	T143.2
PCR-Wasser 50x1ml	Carl Roth	T143.4
PCR Wasser, nukleasefrei, steril 5x20ml	Roth	T143.5
Forward-Primer V3-F	Eurofins	auf Anfrage
Reverse-Primer mit probenspezifischem Barcode	Eurofins	auf Anfrage
Betaine solution (5M)	Sigma Aldrich	B0300-1VL
Albumin From Bovine Serum, Low Endotoxin	Sigma-Aldrich	A1933-1G
PCR-Tube, dünnwandig mit Deckel, 0,2ml	Omnilab	5283579
PCR 96 Wellplatte	Bio Rad	HSL-9601
Adhesive PCR Foil Seal	Peqlab	82-0626-A
Biometra Thermocycler Standard für 96 Wellplatten	Biometra	3100-813-01

Tabelle E3: Materialien für die Aufreinigung und die Sequenzierung

Bezeichnung-Produkt	Firma	Katalognummer
<b>Material und Chemikalien für die Aufreinigung</b>		
DynaMag-2 Magnet (12321D) für 16 Proben (10-2000µl zur magnetischen Separation)	Life Technologie	12321 D
AMPURE XP Kit Agencourt	Beckmann Coulter GmbH	A63881
QIAquick Purification Kit (50 Proben)	Qiagen	28140
<b>Verbrauchsmaterial und Geräte für die Bioanalyser-Nutzung</b>		
DNA Chip 7500 Agilent	Agilent Technologies	5067-1506
Agilent 2001 Bioanalyser	Agilent Technologies	G2938c
<b>Verbrauchsmaterial und Geräte für die Picogreen DNA-Konzentrationsbestimmung</b>		
Quant-IT Picogreen dsDNA Assay Kit	life technologies	P7589
Opti Plate 96F (black, opaque) 50/Box	Perkin Elmer	6005270
SpectraMax Fluorescence Microplate Reader	Molecular Devices	EM 0200-5060
<b>Verbrauchsmaterial und Chemikalien für die Gelelektrophorese</b>		
DNA Ladder 100 bp	New England Biolabs	SAP_NR506233
DNA-Ladder 100 bp NEB N3231S	Sigma-Aldrich	G1145-10g
Peq 35-1020 PeqGold Universal Agarose, 500g	MDM	558533
Ethidiumbromidlg. INN 15585-01110mg/ml	life technologies	SAP_Nr. 553608
NEB 100bp Marker N3231S	New England Biolabs	SAP_Nr. 553608
NEB B7021 S Gel loading dye, blue, 6ml	New England Biolabs	576027
Probetaschenkamm 2mm, für KurogelMiniPlus10	VWR	700-0051
Gelkammer	VWR	700-0034
<b>Verbrauchsmaterial und Chemikalien für die Sequenzierung</b>		
GS FLX Titanium emPCR Breaking Kit LV/MV	Roche	5233658001
GS FLX Titanium Sequencing Kit XLR70	Roche	5233526001
GS FLX Maintenance Wash Kit	Roche	4932358001
GS FLX Titanium PicoTiterPlate Kit 70x75	Roche	5233682001
GS FLX Titanium LV emPCR Kit (Lib-L)	Roche	5618428001
GS FLX Titanium Packing Beads 70	Roche	5236541001
GS Titanium Sequencing Supplement CB	Roche	5365473001
GS FLX Titanium Pre-Wash Tubes XL	Roche	6540236001
GS FLX Titanium Sipper Tubes XL	Roche	6482449001
GS Titanium emPCR Reagents LV (Lib-L)	Roche	5233585001
GS Titanium emPCR Bead Recovery Rgt v2	Roche	5641870001
GS Titanium emPCR Emulsion Oil LV	Roche	5233607001
GS Titanium Sequencing Buffer CB	Roche	5351588001
GS FLX Titanium Sequencing Bead/Wash Buffer	Roche	5351596001
Sorenson Dolphin nose microcentrifuge tubes, 2 ml, autoklavierbar	Sigma-Aldrich	Z717533-5000EA

**Tabelle E4:** Darstellung der Barcodes der verwendeten Primer BC0001-0058

<b>Reverse Primer BC0XXX</b>	<b>BarcodeSequence</b>	<b>Reverse Primer BC0XXX</b>	<b>BarcodeSequence</b>
BC0001	AACGCACGCTAG	BC0030	ACGACGTCTTAG
BC0002	AACTGTGCGTAC	BC0031	ACGAGTGCTATC
BC0003	AAGAGATGTCGA	BC0032	ACGATGCGACCA
BC0004	AAGCTGCAGTCG	BC0033	ACGCAACTGCTA
BC0005	AATCAGTCTCGT	BC0034	ACGCGATACTGG
BC0006	AATCGTGACTCG	BC0035	ACGCGCAGATAC
BC0007	ACACACTATGGC	BC0036	ACGCTATCTGGA
BC0008	ACACATGTCTAC	BC0037	ACGCTCATGGAT
BC0009	ACACGAGCCACA	BC0038	ACGGATCGTCAG
BC0010	ACACGGTGTCTA	BC0039	ACGGTGAGTGTC
BC0011	ACACTGTTTCATG	BC0040	ACGTACTIONAGTG
BC0012	ACAGACCACTCA	BC0041	ACGTCTGTAGCA
BC0013	ACAGCAGTGGTC	BC0042	ACGTGAGAGAAT
BC0014	ACAGCTAGCTTG	BC0043	ACGTGCCGTAGA
BC0015	ACATGATCGTTC	BC0044	ACGTTAGCACAC
BC0016	ACATGTCACGTG	BC0045	ACTACAGCCTAT
BC0017	ACATTCAGCGCA	BC0046	ACTACGTGTGGT
BC0018	ACCAGACGATGC	BC0047	ACTAGCTCCATA
BC0019	ACCAGCGACTAG	BC0048	ACTATTGTCACG
BC0020	ACCGCAGAGTCA	BC0049	ACTCACGGTATG
BC0021	AACTCGTCGATG	BC0050	ACTCAGATACTC
BC0022	ACACTAGATCCG	BC0051	ACTCGATTGAT
BC0023	ACAGAGTCGGCT	BC0052	ACTCGCACAGGA
BC0024	ACAGTGCTTCAT	BC0053	ACTCTTCTAGAG
BC0025	ACAGTTGCGCGA	BC0054	ACTGACAGCCAT
BC0026	ACATCACTTAGC	BC0055	ACTGATCCTAGT
BC0027	ACCACATACATC	BC0056	ACTGTACGCGTA
BC0028	ACCTCGATCAGA	BC0057	ACTGTCAAGCT
BC0029	ACCTGTCTCTCT	BC0058	ACTGTGACTTCA

**Tabelle E5:** Darstellung der Barcodes der Reverse Primer BC0059-0116

<b>Reverse Primer BC0XXX</b>	<b>BarcodeSequence</b>	<b>Reverse Primer BC0XXX</b>	<b>BarcodeSequence</b>
BC0059	ACTTGTAGCAGC	BC0088	AGGCTACACGAC
BC0060	AGAACACGTCTC	BC0089	AGGTGTGATCGC
BC0061	AGACCGTCAGAC	BC0090	AGTACGCTCGAG
BC0062	AGACGTGCACTG	BC0091	AGTACTGCAGGC
BC0063	AGACTGCGTACT	BC0092	AGTAGTATCCTC
BC0064	AGAGAGCAAGTG	BC0093	AGTCACATCACT
BC0065	AGAGCAAGAGCA	BC0094	AGTCCATAGCTG
BC0066	AGAGTAGCTAAG	BC0095	AGTCTACTCTGA
BC0067	AGAGTCCTGAGC	BC0096	AGTCTCGCATAT
BC0068	AGATACACGCGC	BC0097	AGTGAGAGAAGC
BC0069	AGATCGGCTCGA	BC0098	AGTGCATGCGT
BC0070	AGATCTCTGCAT	BC0099	AGTGGATGCTCT
BC0071	AGATGTTCTGCT	BC0100	AGTGTCACGGTG
BC0072	AGCACACCTACA	BC0101	AGTGTTGATCG
BC0073	AGCACGAGCCTA	BC0102	AGTTAGTGCGTC
BC0074	AGCAGCACTTGT	BC0103	AGTTCAGACGCT
BC0075	AGCAGTCGCGAT	BC0104	AGTTCTACGTCA
BC0076	AGCATATGAGAG	BC0105	ATAATCTCGTCG
BC0077	AGCCATACTGAC	BC0106	ATACACGTGGCG
BC0078	AGCGACTGTGCA	BC0107	ATACAGAGCTCC
BC0079	AGCGAGCTATCT	BC0108	ATACGTCTTCGA
BC0080	AGCGCTGATGTG	BC0109	ATACTATTGCGC
BC0081	AGCGTAGGTCGT	BC0110	ATACTCACTCAG
BC0082	AGCTATCCACGA	BC0111	ATAGCTCCATAC
BC0083	AGCTCCATACAG	BC0112	ATAGGCGATCTC
BC0084	AGCTCTCAGAGG	BC0113	ATATCGCTACTG
BC0085	AGCTGACTAGTC	BC0114	ATATGCCAGTGC
BC0086	AGCTTGACAGCT	BC0115	ATCACGTAGCGG
BC0087	AGGACGCACTGT	BC0116	ATCACTAGTCAC

**Tabelle E6:** Unterschiede zwischen Bauernhof- und Referenzkindern bei den Nasenabstrichproben: *Positive beta-Werte* bedeuten ein höheres relatives Vorkommen der zugehörigen Phyla und Genera bei Bauernhof- im Vergleich zu den Referenzkindern und *negative beta-Werte* erniedrigte Werte.

Nasenabstriche				
Taxon	Vorkommen in X % der Proben	Mittelwert der relativen Häufigkeit pro Probe (%)	beta-Wert lineare Regression	p-Wert
<b>Phyla</b>				
Firmicutes	100	37,47	0,034	0,6250
Bacteroidetes	95	4,45	0,009	0,5231
Fusobacteria	78	1,35	0,003	0,7548
Proteobacteria	100	43,11	-0,014	0,8676
Actinobacteria	97	12,95	-0,031	0,4367
Gesamtvariable seltene Phyla $\leq$ 1% repräsentiert	88	0,68	-0,003	0,1677
<b>Genera (zugehörig zu Phyla)</b>				
Streptococcus	100	15,93	0,036	0,4774
Corynebacterium	94	6,82	0,004	0,8904
Carnobacteriaceae	50	0,89	0,014	0,2424
Fusobacterium	67	0,96	0,005	0,6481
Haemophilus	70	6,20	0,006	0,9111
Porphyromonas	78	1,09	0,006	0,4833
Veillonella	71	1,00	0,005	0,3797
Neisseria	78	1,28	0,006	0,3301
Actinobacillus	72	1,33	0,003	0,5958
Gesamtvariable seltene Genera $\leq$ 1% repräsentiert	100	17,50	-0,007	0,8697
Staphylococcus	92	11,96	-0,014	0,7797
Moraxella	90	29,82	-0,023	0,7893
Propionibacterium	63	3,42	-0,036	0,0703
Prevotella	88	1,78	-0,005	0,3908
Peptoniphilus	42	1,29	-0,003	0,8395
Gemella	71	1,13	-0,006	0,0543

**Tabelle E7:** Unterschiede zwischen Bauernhof- und Referenzkindern bei den Nasenabstrichproben (Fortsetzung): *Positive beta-Werte* bedeuten ein höheres relatives Vorkommen der zugehörigen OTUs bei Bauernhof- im Vergleich zu den Referenzkindern und *negative beta-Werte* erniedrigte Werte.

Nasenabstriche				
Taxon	Vorkommen in X % der Proben	Mittelwert der relativen Häufigkeit (%)	beta	p-Wert
<b>OTU (zugehörig zu Genera)</b>				
OTU 12812 (Moraxella)	88	29,2	-0,0480	0,5736
Gesamtvariable seltene OTUs	100	23,5	0,0577	0,2607
OTU 1606 (Streptococcus)	100	14,3	0,0302	0,5295
OTU2190 (Staphylococcus)	92	11,7	-0,0131	0,7919
OTU 3464 (Haemophilus)	67	6,1	0,0061	0,9102
OTU 13858 (Corynebacterium)	60	3,4	0,0205	0,3889
OTU 5959 (Propionibacterium)	60	3,4	-0,0357	0,0696
OTU 4511 (Corynebacterium)	67	2,5	-0,0168	0,2063
OTU 4507 (Actinobacillus)	71	1,3	0,0032	0,5893
OTU 5064 (Neisseria)	78	1,3	0,0055	0,3197
OTU 9105 (Streptococcus)	77	1,2	0,0033	0,6374
OTU 15992 (Gemella)	69	1,1	-0,0060	0,0580
OTU 16365 (Peptoniphilus)	28	1,0	-0,0068	0,4833

**Tabelle E8:** Unterschiede zwischen Bauernhof- und Referenzkindern bei den Matratzenstaubproben: *Positive beta-Werte* bedeuten ein höheres relatives Vorkommen der zugehörigen Phyla und Genera bei Bauernhof- im Vergleich zu den Referenzkindern und *negative beta-Werte* erniedrigte Werte.

Matratzenstaub				
Taxon	Vorkommen in X % der Proben	Mittelwert der relativen Häufigkeit (%)	beta	p-Wert
<b>Phyla</b>				
Firmicutes	100	52,8	-0,0159	0,6113
Proteobacteria	100	17,2	0,0266	0,3579
Actinobacteria	97	16,0	-0,0143	0,4802
Bacteroidetes	100	10,8	0,0036	0,7417
Gesamtvariable seltene Phyla	100	1,7	-0,0006	0,7737
Cyanobacteria	100	1,6	0,0008	0,8446
<b>Genera (zugehörig zu Phyla)</b>				
Gesamtvariable seltene Genera	100	34,2	0,1055	<0.0001
Streptococcus (Firmicutes)	100	15,6	-0,0251	0,1950
Staphylococcus (Firmicutes)	100	10,2	-0,0373	0,0020
Corynebacterium (Actinobacteria)	95	5,7	-0,0131	0,1275
Anaerococcus (Firmicutes)	100	3,9	-0,0102	0,1584
Propionibacterium (Actinobacteria)	91	3,8	-0,0247	0,0057
Prevotella (Bacteroidetes)	100	3,3	-0,0096	0,2949
Finegoldia (Firmicutes)	99	2,2	-0,0120	0,0256
Peptoniphilus (Firmicutes)	98	2,1	-0,0065	0,1243
Bacteroides (Bacteroidetes)	98	1,9	0,0007	0,8831
Faecalibacterium (Firmicutes)	98	1,8	0,0053	0,4005
Lactobacillus (Firmicutes)	100	1,6	0,0058	0,4123
Neisseria (Proteobacteria)	94	1,5	-0,0086	0,0013
Porphyromonas (Bacteroidetes)	98	1,5	-0,0082	0,0002
Acinetobacter (Proteobacteria)	92	1,5	0,0229	0,2560
Moraxella (Proteobacteria)	84	1,4	-0,0090	0,0612
Actinobacillus (Proteobacteria)	97	1,3	-0,0041	0,0598
Veillonella (Firmicutes)	98	1,2	-0,0029	0,1671
Lachnospiraceae (Genus Incertae sedis) (Firmicutes)	95	1,1	0,0029	0,3198
Granulicatella (Firmicutes)	98	1,1	-0,0027	0,1058
Sphingomonas (Proteobacteria)	99	1,1	0,0043	0,0546
Lactococcus (Firmicutes)	94	1,0	0,0046	0,2748
Ruminococcaceae (Genus Uncultured) (Firmicutes)	93	1,0	0,0220	0,0018

**Tabelle E9:** Unterschiede zwischen Bauernhof- und Referenzkindern bei den Matratzenstaubproben (Fortsetzung): *Positive beta-Werte* bedeuten ein höheres relatives Vorkommen der zugehörigen OTUs in Bauernhof- im Vergleich zu den Referenzkindern und *negative beta-Werte* erniedrigte Werte.

Matratzenstaub				
Taxon	Vorkommen in X % der Proben	Mittelwert der relativen Häufigkeit (%)	beta	p-Wert
<b>OTU (zugehörig zu Genera)</b>				
Gesamtvariable seltene OTUs	100	58,5	0,1334	<0,0001
OTU 1606 (Streptococcus)	100	12,0	-0,0299	0,0931
OTU 2190 (Staphylococcus)	100	9,8	-0,0361	0,0020
OTU 5959 (Propionibacterium)	88	3,6	-0,0232	0,0064
OTU 9105 (Streptococcus)	100	2,8	0,0019	0,7310
OTU 4511 (Corynebacterium)	94	2,2	-0,0119	0,0075
OTU 7540 (Anaerococcus)	97	1,7	-0,0038	0,3572
OTU 1308 (Faecalibacterium)	98	1,6	0,0051	0,3544
OTU 15091 (Corynebacterium)	93	1,6	-0,0071	0,0207
OTU 5064 (Neisseria)	94	1,5	-0,0085	0,0011
OTU 4507 (Actinobacillus)	95	1,3	-0,0040	0,0598
OTU 12812 (Moraxella)	78	1,3	-0,0083	0,0720
OTU 16365 (Peptoniphilus)	93	1,3	-0,0048	0,0663
OTU 14972 (Granulicatella)	98	1,0	-0,0026	0,1021

**Tabelle E10:** Unterschiede zwischen Asthmatikern und Kontrollen bei den Nasenabstrichproben: *Positive beta-Werte* bedeuten ein höheres relatives Vorkommen der Phyla und Genera in Asthmatikern im Vergleich zur Kontrollgruppe und *negative beta-Werte* ein niedrigeres relatives Vorkommen.

Nasenabstriche				
Taxon	Vorkommen in X % der Proben	Mittelwert der relativen Häufigkeit (%)	beta	p-Wert
<b>Phylum</b>				
Proteobacteria	100	43,1	0,0613	0,4505
Firmicutes	100	37,5	0,0352	0,5962
Actinobacteria	97	13,0	-0,0690	0,0669
Bacteroidetes	95	4,5	-0,0215	0,0401
Fusobacteria	78	1,3	-0,0027	0,6876
Gesamtvariable seltene Phyla	81	0,6	-0,0032	0,0848
<b>Genera (zugehörig zu Phyla)</b>				
Moraxella (Proteobacteria)	90	29,8	0,1019	0,2507
Gesamtvariable seltene Genera	100	17,9	-0,0503	0,1863
Streptococcus (Firmicutes)	100	15,9	0,0230	0,6471
Staphylococcus (Firmicutes)	92	12,0	0,0550	0,2350
Corynebacterium (Actinobacteria)	94	6,8	-0,0255	0,3078
Haemophilus (Proteobacteria)	70	6,2	-0,0294	0,4799
Propionibacterium (Actinobacteria)	63	3,4	-0,0378	0,0910
Prevotella (Bacteroidetes)	88	1,8	-0,0117	0,0372
Actinobacillus (Proteobacteria)	72	1,3	-0,0018	0,6911
Peptoniphilus (Firmicutes)	42	1,3	-0,0139	0,1896
Neisseria (Proteobacteria)	78	1,3	-0,0024	0,6275
Gemella (Firmicutes)	71	1,1	-0,0001	0,9784
Porphyromonas (Bacteroidetes)	78	1,1	-0,0070	0,0445

**Tabelle E11:** Unterschiede zwischen Asthmatikern und Kontrollen bei den Nasenabstrichproben (Fortsetzung): *Positive beta-Werte* bedeuten ein höheres relatives Vorkommen der OTUs in Asthmatikern im Vergleich zur Kontrollgruppe und *negative beta-Werte* ein niedrigeres relatives Vorkommen.

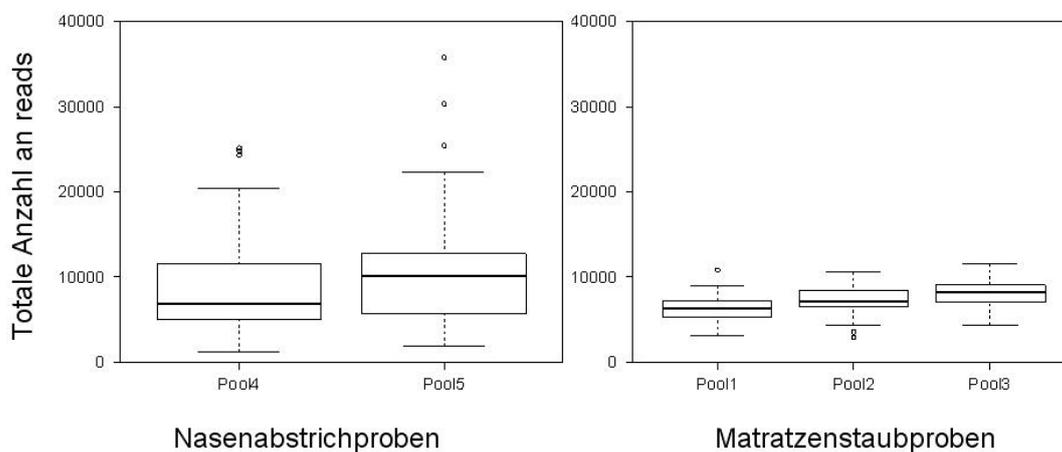
Nasenabstriche				
Taxon	Vorkommen in X % der Proben	Mittelwert der relativen Häufigkeit (%)	beta	p-Wert
<b>OTU (zugehörig zu Genera)</b>				
OTU 12812 (Moraxella)	88	29,2	0,1046	0,2373
Gesamtvariable seltene OTUs	100	23,5	-0,0785	0,0924
OTU 1606 (Streptococcus)	100	14,3	0,0244	0,6187
OTU2190 (Staphylococcus)	92	11,7	0,0549	0,2327
OTU 3464 (Haemophilus)	67	6,1	-0,0294	0,4760
OTU 13858 (Corynebacterium)	60	3,4	0,0003	0,9857
OTU 5959 (Propionibacterium)	60	3,4	-0,0376	0,0913
OTU 4511 (Corynebacterium)	67	2,5	-0,0228	0,1108
OTU 4507 (Actinobacillus)	71	1,3	-0,0017	0,7014
OTU 5064 (Neisseria)	78	1,3	-0,0024	0,6169
OTU 9105 (Streptococcus)	77	1,2	0,0000	0,9912
OTU 15992 (Gemella)	69	1,1	-0,0002	0,9735
OTU 16365 (Peptoniphilus)	28	1,0	-0,0117	0,2437

**Tabelle E12:** Unterschiede zwischen Asthmatikern und Kontrollen bei den Matratzenstaubproben. *Positive beta-Werte* bedeuten ein höheres relatives Vorkommen der Phyla und Genera in Asthmatikern im Vergleich zur Kontrollgruppe und *negative beta-Werte* ein niedrigeres relatives Vorkommen.

Matratzenstaub				
Taxon	Vorkommen in X % der Proben	Mittelwert der relativen Häufigkeit (%)	beta	p-Wert
<b>Phyla</b>				
Firmicutes	100	52,8	0,0358	0,2281
Proteobacteria	100	17,2	-0,0233	0,1915
Actinobacteria	97	16,0	0,0089	0,6667
Bacteroidetes	100	10,8	-0,0178	0,1018
Gesamtvariable seltene Phyla	100	1,7	-0,0011	0,6324
Cyanobacteria	100	1,6	-0,0024	0,5588
<b>Genera (zugehörig zu Phyla)</b>				
Gesamtvariable seltene Genera	100	34,2	-0,0672	0,0075
Streptococcus (Firmicutes)	100	15,6	0,0298	0,1458
Staphylococcus (Firmicutes)	100	10,2	0,0255	0,1870
Corynebacterium (Actinobacteria)	95	5,7	0,0277	0,0189
Anaerococcus (Firmicutes)	100	3,9	0,0072	0,4171
Propionibacterium (Actinobacteria)	91	3,8	-0,0046	0,6855
Prevotella (Bacteroidetes)	100	3,3	-0,0076	0,3668
Finegoldia (Firmicutes)	99	2,2	-0,0030	0,6455
Peptoniphilus (Firmicutes)	98	2,1	0,0020	0,6941
Bacteroides (Bacteroidetes)	98	1,9	-0,0029	0,6348
Faecalibacterium (Firmicutes)	98	1,8	-0,0035	0,4031
Lactobacillus (Firmicutes)	100	1,6	0,0003	0,9529
Neisseria (Proteobacteria)	94	1,5	0,0006	0,8574
Porphyromonas (Bacteroidetes)	98	1,5	-0,0013	0,5667
Acinetobacter (Proteobacteria)	92	1,5	-0,0006	0,9160
Moraxella (Proteobacteria)	84	1,4	0,0044	0,5889
Actinobacillus (Proteobacteria)	97	1,3	0,0005	0,8399
Veillonella (Firmicutes)	98	1,2	0,0000	0,9948
Lachnospiraceae (Genus Incertae sedis) (Firmicutes)	95	1,1	-0,0034	0,1639
Granulicatella (Firmicutes)	98	1,1	0,0020	0,3536
Sphingomonas (Proteobacteria)	99	1,1	-0,0009	0,6676
Lactococcus (Firmicutes)	94	1,0	-0,0015	0,6004
Ruminococcaceae (Genus Uncultured) (Firmicutes)	93	1,0	-0,0033	0,2118

**Tabelle E13:** Unterschiede zwischen Asthmatikern und Kontrollen bei den Matratzenstaubproben (Fortsetzung): *Positive beta-Werte* bedeuten ein höheres relatives Vorkommen der OTUs in Asthmatikern im Vergleich zur Kontrollgruppe und *negative beta-Werte* ein niedrigeres relatives Vorkommen.

Matratzenstaub				
Taxon	Vorkommen in X % der Proben	Mittelwert der relativen Häufigkeit (%)	beta	p-Wert
<b>OTU (zugehörig zu Genera)</b>				
Gesamtvariable selteneOTUs	100	58,5	-0,0830	0,0026
OTU 1606 (Streptococcus)	100	12,0	0,0236	0,2113
OTU 2190 (Staphylococcus)	100	9,8	0,0267	0,1573
OTU 5959 (Propionibacterium)	88	3,6	-0,0029	0,7915
OTU 9105 (Streptococcus)	100	2,8	0,0091	0,0496
OTU 4511 (Corynebacterium)	94	2,2	0,0099	0,1623
OTU 7540 (Anaerococcus)	97	1,7	0,0034	0,5234
OTU 1308 (Faecalibacterium)	98	1,6	-0,0024	0,5312
OTU 15091 (Corynebacterium)	93	1,6	0,0076	0,1332
OTU 5064 (Neisseria)	94	1,5	0,0008	0,8064
OTU 4507 (Actinobacillus)	95	1,3	0,0007	0,7749
OTU 12812 (Moraxella)	78	1,3	0,0030	0,6792
OTU 16365 (Peptoniphilus)	93	1,3	0,0015	0,6419
OTU 14972 (Granulicatella)	98	1,0	0,0021	0,3142



**Abbildung E1:** Sequenzzahl pro Probe und Pool

## Danksagung

Zuallererst möchte ich meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. med. Dr. h.c. Erika von Mutius, vielmals für das Angebot zur Durchführung meiner Doktorarbeit danken. Ich habe mich sehr über dieses äußerst spannende Thema gefreut und danke dir, dass ich modernste Verfahren verwenden und etablieren durfte. Vielen Dank auch für das in mich gesetzte Vertrauen, unzählige Beratungsgespräche und die stets vorhandene Rückendeckung bei der experimentellen Arbeit und Analyse der Daten.

Du hast mich aber nicht nur im Rahmen der Doktorarbeit begleitet, sondern mich in den letzten vier Jahren immer und überall unterstützt. Danke für die Ermöglichung eines Auslandsaufenthaltes im Rahmen des Praktischen Jahres im Fach Pädiatrie während des Medizinstudiums.

Du hast deine Aufgabe als „Doktormutter“ sehr ernst genommen und diese Rolle förmlich gelebt. Durch deine Begeisterung für das Fach Pädiatrie hast du mich maßgeblich bei meiner Berufswahl beeinflusst, sodass ich jetzt als Assistenzärztin in der Pädiatrie meinen Platz gefunden habe. Ich wünsche dir, liebe Erika, weiterhin beruflich und privat alles erdenklich Gute.

Uneingeschränkter Dank gebührt meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Antje Legatzki für die Einweisung und das Erlernen der methodischen Verfahren zur Herstellung der DNA-Bibliothek, aber auch für die immer freundliche, unverzügliche und unermüdliche Beantwortung meiner Fragen sowohl bei der experimentellen Arbeit, als auch bei der Interpretation der Daten und dem Schreiben meiner Dissertation. Auch möchte ich mich bei ihr für alle Gespräche, für die Hilfestellung bei Problemen im experimentellen Teil der Arbeit, für die Datenanalyse der Testplatte und besonders für die konstruktiven Korrekturen von Präsentationen und der Dissertation bedanken. Eine derart intensive und exzellente Betreuung ist einmalig und jedem Doktoranden nur zu wünschen. Sie ist in dieser Zeit nicht nur eine Areitskollegin, sondern eine Freundin für mich geworden. Leider hat sie den Abschluss der Promotion nicht mehr miterleben können, weil sie im März 2017 nach langer schwerer Krankheit verstorben ist. Wir werden sie immer vermissen und in dankbarer Erinnerung behalten.

Herrn Dr. rer. biol. hum. Martin Depner bin ich sehr dankbar für die Datenanalyse und die statistische Auswertung der Sequenzierdaten. Außerdem möchte ich mich bei ihm für die vielen Besprechungen, für das Verwirklichen von zusätzlichen Ideen zur Auswertung der Daten, für alle Verbesserungsvorschläge und Korrekturen ihm Rahmen des methodischen Teils der Doktorarbeit und für seine Vorschläge zur Interpretation der Daten bedanken.

Herzlichen Dank möchte ich auch Herrn PD Dr. med. Markus Ege für das Einweisen in das Thema meiner Doktorarbeit und seine Voranaylsen, für zahlreiche Besprechungen, für immer freundliche Hilfestellungen im Zuge der statistischen, epidemiologischen Auswertung und für die Ratschläge bei der Strukturierung und Korrektur des Manuskripts aussprechen.

Mein Dank gilt außerdem ganz besonders Frau Susanne Kublik und Frau Dr. rer. nat. Marion Engel aus der Arbeitsgruppe Egen, Helmholtz Zentrum München (Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH), Research Unit Environmental Genomics) für die Einführung in verschiedene methodische Verfahren, die Nutzung ihrer Labore und für die

große Unterstützung bei der Sequenzierung.

Frau Elisabeth Schmaußer-Hechenfelder bin ich für die randomisierte Auswahl der Proben, für Einblicke in epidemiologische Hintergründe der Studie und die Hilfestellung bei statistischen Berechnungen herzlich dankbar.

Ich bedanke mich bei meiner gesamten Arbeitsgruppe, besonders bei Dr. med. Oliver Fuchs, für die herzliche Aufnahme in das Team, für zahlreiche Gespräche und für die stets kompetenten Antworten zu Fragen über die Hintergründe des Studiendesigns meiner Arbeit.

Für die freundliche Aufnahme im Tropeninstitut Basel und für die optimalen Bedingungen beim Sortieren der Nasenabstrichproben möchte ich mich bei Frau Marianne Rutschi sehr bedanken. Der Universität Utrecht danke ich für das zuverlässige Heraussuchen der Staubproben und das Versenden nach München.

Ich bedanke mich bei der *Humanities in the European Research Area (HERA)* für die Finanzierung dieses Projekts und die Ermöglichung der Teilnahme am HERA-Meeting 2013 und der SEEON Konferenz 2014 zur Präsentation der Daten.

Meinen beiden wunderbaren Brüdern Philipp und Fabian und allen Freunden, besonders Marie-Luise Buchholtz, Maximilian Gassenmaier, Constance Jakob und Christoph Mahler bin ich für die persönliche Unterstützung in den letzten Jahren sehr dankbar.

Vor allem danke ich Adam Betz für seine aufbauenden und mich immer wieder beruhigenden Worte, für sein uneingeschränktes Verständnis, die mentale Unterstützung und die Ordnung meiner Gedanken.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern meinen uneingeschränkten Dank für die Begleitung auf meinem gesamten bisherigen Lebensweg aussprechen. Ihr habt mich immer unterstützt und mir mein Studium und diese Dissertation erst ermöglicht. Ihr seid einfach wunderbar und ich bin euch für immer unendlich dankbar.

# Eidesstattliche Versicherung

---

Birzele, Lena Teresa

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema **Analyse der bakteriellen Mikrobiota von Schleimhaut- und Umweltproben mittels Next-Generation-Sequencing und Untersuchung ihrer Rolle bei kindlichem Asthma** selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum: München, 21.11.2017

Unterschrift der Doktorandin: \_\_\_\_\_(Lena Birzele)