

**Der Einfluss des Stärkeaufschlussgrads kommerzieller  
Versuchstierfutter auf das gastrointestinale Mikrobiom  
von Labormäusen**

von Jasmin Alexandra Wenderlein

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Der Einfluss des Stärkeaufschlussgrads kommerzieller  
Versuchstierfutter auf das gastrointestinale Mikrobiom  
von Labormäusen**

von Jasmin Alexandra Wenderlein  
aus München

München 2022

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Sonja Härtle  
Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann  
Priv.-Doz. Dr. Nadja Jeßberger  
Univ.-Prof. Dr. Claudia Guldemann, Ph.D.

Tag der Promotion: 12. Februar 2022

Für meine Eltern

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1</b>	<b>Das Mikrobiom des Gastrointestinaltraktes.....</b>	<b>3</b>
1.1	Einflüsse der Mikrobiota auf den Wirt.....	7
1.2	Physiologische Einflüsse.....	8
1.2.1	Entwicklung des Gastrointestinaltraktes .....	9
1.2.2	Immunmodulation .....	10
1.2.3	Entwicklung des Herz-Kreislauf-Systems .....	11
1.2.4	Entwicklung des Nervensystems.....	12
1.3	Pathologische Einflüsse.....	13
1.3.1	Störungen durch pathogene Eindringlinge im Gastrointestinaltrakt .....	13
1.3.1.1	Chronisch entzündliche Darmerkrankung (IBD) .....	15
1.3.1.2	Malignitäten .....	17
1.3.2	Extragastrointestinale Erkrankungen .....	19
1.3.2.1	Übergewicht .....	19
1.3.2.2	Diabetes Typ 2 .....	21
1.3.2.3	Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems .....	22
1.4	Das Mikrobiom des Gastrointestinaltraktes der Maus .....	24
<b>2</b>	<b>Exogene Einflüsse auf das Mikrobiom .....</b>	<b>29</b>
2.1	Trächtigkeit, Geburt und erste Lebenswochen.....	29
2.2	Haltung.....	33
2.3	Einfluss des Futters auf das Mikrobiom.....	34
2.3.1	Ballaststoffe.....	35
2.3.2	Stärke und resistente Stärke .....	37
2.3.2.1	Stärkegelatinisierung.....	41
<b>3</b>	<b>Arten der Mikrobiomanalyse.....</b>	<b>44</b>
3.1	Kulturelle Anzucht und Zellmorphologie .....	44
3.2	Next-Generation Sequencing .....	46
3.3	Next-Generation Sequencing von Illumina.....	48
3.3.1	Vorbereitung der Sequenzierungsbibliothek.....	49
3.3.2	Cluster Generierung .....	51
3.3.3	Sequenzierung .....	53

---

3.3.4	Dual Index Read.....	55
3.4	16S-rRNA-Gensequenzierung .....	55
<b>III.</b>	<b>PUBLIKATION .....</b>	<b>58</b>
<b>1</b>	<b>Publikation Mikrobiom .....</b>	<b>58</b>
<b>2</b>	<b>Publikation Energie- und Nährstoffverdaulichkeit .....</b>	<b>75</b>
<b>IV.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>84</b>
<b>1</b>	<b>Veränderung der Nährstoffzusammensetzung.....</b>	<b>85</b>
<b>2</b>	<b>Verdaulichkeit .....</b>	<b>88</b>
<b>3</b>	<b>Gewichtsentwicklung und Phänotyp .....</b>	<b>90</b>
<b>4</b>	<b>Mikrobiom .....</b>	<b>92</b>
<b>5</b>	<b>Metabolische Eigenschaften der gefundenen molekularen Spezies.....</b>	<b>95</b>
<b>V.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>99</b>
<b>VI.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>101</b>
<b>VII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>103</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>138</b>
<b>IX.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>140</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

BMI	body mass index
Bp	Basenpaare
CARD	caspase recruitment domain insoforms
CD4+ T-Zelle	cluster differentiation 4 der T-Zelle
CRC	colorectal cancer (dt. kolorektaler Krebs)
DNA	deoxyribonucleic acid (dt. Desoxyribonukleinsäure)
GALT	gut associated lymphoid tissue
GLP	glukagon-like peptid
GPR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
HbA1c	Hämoglobin A1c
HDL	high density lipoprotein
HMO	human milk oligosaccharide
IBD	inflammatory bowel disease (dt. chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen)
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
LPS	Lipopolysaccharide
miBC	mouse intestinal bacterial collection
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain
NSP	nicht-Stärke Polysaccharide
Ob	obesity (dt. Adipositas)
OH	Hydroxygruppe
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PP	Peyer-Platten
PSA	capsular polysaccharide A
PRRs	pattern recognition receptors
PYY	Peptid YY
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RDS	rapid digestable starch
RNA	ribonucleic acid (dt. Ribonukleinsäure)
ROS	radical oxygen species (dt. Radikale Sauerstoffspezies)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure

---

RS	resistente Stärke
SBS	sequencing by synthesis
SCFA	short-chain fatty acids
SDS	slow digestable starch
sIgA	sekretorisches Immunglobulin A
SPF	specific-pathogen-free (dt. spezifisch pathogenfrei)
spp.	Spezies (Plural)
ssDNA	einzelsträngige DNA
TLR	Toll-Like Rezeptor
TMAO	Trimethylamin N-Oxid
WGS	whole genome sequencing

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1:	<i>Rarefaction</i> -Kurve beider Versuchsteile.....	5
Abbildung 2:	$\alpha$ - und $\beta$ -Diversität graphisch dargestellt.....	6
Abbildung 3:	Darm Mikrobiom und mögliche molekulare Signalwege, die mit kardiovaskulären und kardiometabolischen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden können .....	23
Abbildung 4:	Taxonomische Diversität in der oralen Maus-Mikrobiom-Datenbank .....	25
Abbildung 5:	Taxonomische Klassifikation der 76 Spezies im miBC.....	27
Abbildung 6:	Vergleich von Stärke verschiedener Pflanzenspezies .....	37
Abbildung 7:	Schematische Darstellung des Aufbaus eines Stärkekorns.....	38
Abbildung 8:	Vergleich pelletiertes und extrudiertes Mausfutter im Rasterelektronenmikroskop.....	42
Abbildung 9:	Illumina MiSeqDx (ILLUMINA INC., 2021a) .....	48
Abbildung 10:	MiSeq Fließzelle (ILLUMINA INC., 2021a) .....	49
Abbildung 11:	<i>Library Fragment</i> mit Dual Index .....	49
Abbildung 12:	Illumina NGS: <i>Library Preparation</i> .....	50
Abbildung 13:	Illumina NGS: <i>Cluster Amplification</i> .....	52
Abbildung 14:	Illumina NGS: Sequenzierung .....	54
Abbildung 15:	16S-rRNA-Gen .....	57
Abbildung 16:	Beispiel einer Haltungsdiät für Labormäuse - Produktdatenblatt	85
Abbildung 17:	Mauskäfige .....	86
Abbildung 18:	Gewichtsentwicklung aller Versuchsgruppen (E = Extrudat, P = Pellet) .....	90
Abbildung 19:	<i>Rarefaction-Curves</i> beider Versuchsteile .....	92

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS ANHANG**

Abbildung A 1: Nutzungsrecht für Abbildung 3.....	138
Abbildung A 2: Nutzungsrecht für Abbildung 15.....	139

**TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: Physiologische Einflüsse der Mikrobiota .....	8
Tabelle 2: Scheinbare Verdaulichkeit von Bruttoenergie und Nährstoffen (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (%)) der Mäuse mit pelletierter (P) und extrudierter (E) Fütterung .....	88

## I. EINLEITUNG

Mäuse gehören zu den meistverwendeten Versuchstieren in der Grundlagenforschung. Für die Planung von Tierversuchen aller Art hat man sich ethische Ziele zur Überprüfung des Versuchsvorhabens gesetzt. Dabei geht es zentral um die Fragen, ob ein Erkenntnisgewinn nicht ohne die Verwendung von empfindungsfähigen Versuchstieren erreicht werden kann (Replace), mit einer geringeren Anzahl an Versuchstieren durchgeführt werden könnte (Reduce) oder mit weniger belastenden Methoden zu erzielen wäre (Refine) (DEUTSCHE FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT, 2019). Die Ziele Replace, Reduce und Refine wurden als die 3R erstmalig 1959 zusammengefasst (RUSSELL & BURCH, 1959). Ebenso ist es von größter Wichtigkeit bei der Durchführung von Tierversuchen auf Validität und Replizierbarkeit zu achten. Zudem sollte bei Versuchen auch eine Standardisierung mit dem Ziel einer externen Validität, also einer externen Replizierbarkeit und Generalisierbarkeit des Mausversuchs, angestrebt werden (DEUTSCHE FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT, 2019). Eine Standardisierung kommerziell erhältlicher Labortierfutter wurde bis heute jedoch noch nicht genauer untersucht. Die Hersteller bieten Labortierfutter in verschiedenen Verarbeitungsformen an, die entsprechend ihrem Etikett identisch und vermeintlich in der Nutzung gleichwertig sind. Auch in wissenschaftlichen Publikationen beziehen sich Autoren nicht auf das im Versuch verwendete Futter bzw. dessen Zusammensetzung.

Dabei ist die Zusammensetzung des Futters ein wichtiger Einflussfaktor für die Verdaulichkeit und die Mikrobiota von monogastrischen Säugetieren (CUMMINGS & MACFARLANE, 1997; TURNBAUGH *et al.*, 2009b; ALBENBERG & WU, 2014). Insbesondere der Stärkegehalt und -gelatinisierungsgrad des Futters sind wichtig für die präcaecale Verdaulichkeit und postileale mikrobielle Fermentation (BÖSWALD *et al.*, 2021). Stärke ist die Hauptquelle für Kohlenhydrate in Nahrungs- und Futtermitteln und das ergiebigste Lager von Polysacchariden in Pflanzen. Die Stärke kommt als Granen in den Chloroplasten von grünen Blättern und den Amyloblasten von Samen, Hülsenfrüchten und Knollen vor (ELLIS *et al.*, 1998; SAJILATA *et al.*, 2006). Bakterien im Verdauungstrakt nutzen den unverdaulichen Teil der Stärke, der den Dickdarm erreicht, als Nahrungsquelle. Je nach Menge und Art der verfügbaren Stärke entwickeln sich die Mikrobiota bzw. die einzelnen Bakterien im Magendarmtrakt. Damit verändert sich

unter Umständen die Zusammensetzung der Mikrobiota (CUMMINGS & MACFARLANE, 1991; CUMMINGS *et al.*, 1996; HERRMANN *et al.*, 2018). Eine vermehrte Aufnahme von Stoffen durch die Mikrobiota und die damit verbundene Veränderung der Mikrobiota führen zu einer vermehrten Ausscheidung von bakteriellen Stoffwechselendprodukten, wie z.B. den short-chain fatty acids (SCFA). Diese Stoffwechselendprodukte haben, ebenso wie die Mikrobiota, Einfluss auf den Wirt, dessen Physiologie und ebenso auf die Pathologie (DEN BESTEN *et al.*, 2013; MORRISON & PRESTON, 2016; MCLOUGHLIN *et al.*, 2017).

In verschiedenen Versuchen wurde bereits belegt, dass eine Hitzebehandlung beziehungsweise Verarbeitung die Eigenschaften des Futters und insbesondere der Stärke verändert (HOLM *et al.*, 1988; KIENZLE, 1989; WANG & COPELAND, 2013). In weiteren Versuchen konnte ein Zusammenhang zwischen der Fütterung verschiedener Futter und veränderten Mikrobiota bei der Maus festgestellt werden (JAKOBSSON *et al.*, 2015; RAUSCH *et al.*, 2016; DO *et al.*, 2020). Auch für die Verarbeitungsformen von Futtermitteln konnten Versuche einen Einfluss auf die Mikrobiota und den Phänotyp von Mäusen belegen (DESMARCHELIER *et al.*, 2013; CLAVEL *et al.*, 2014; DANIEL *et al.*, 2014). Voruntersuchungen an verschiedenen kommerziellen Labortierfuttern für Mäuse zeigen, dass sich die Futter in ihrem Stärkeaufschlussgrad zwischen den verschiedenen Herstellern, aber auch desselben Herstellers zwischen verschiedenen Konfektionierungen unterscheiden (BÖSWALD & KIENZLE, 2019).

In dieser Arbeit soll gezeigt werden, dass die Fütterung verschiedener Konfektionierungen eines kommerziellen Labortierfutters (Pellet oder Extrudat) die Zusammensetzung der Mikrobiota beeinflusst und somit Auswirkungen auf Tierversuche und deren Ergebnisse und Replizierbarkeit hat.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1 Das Mikrobiom des Gastrointestinaltraktes

Das Mikrobiom ist in den letzten Jahren zunehmend in das Visier der Forschung gerückt. Dank früherer Pionierarbeit und modernen Analysetechniken ist es möglich das Mikrobiom genauestens zu bestimmen.

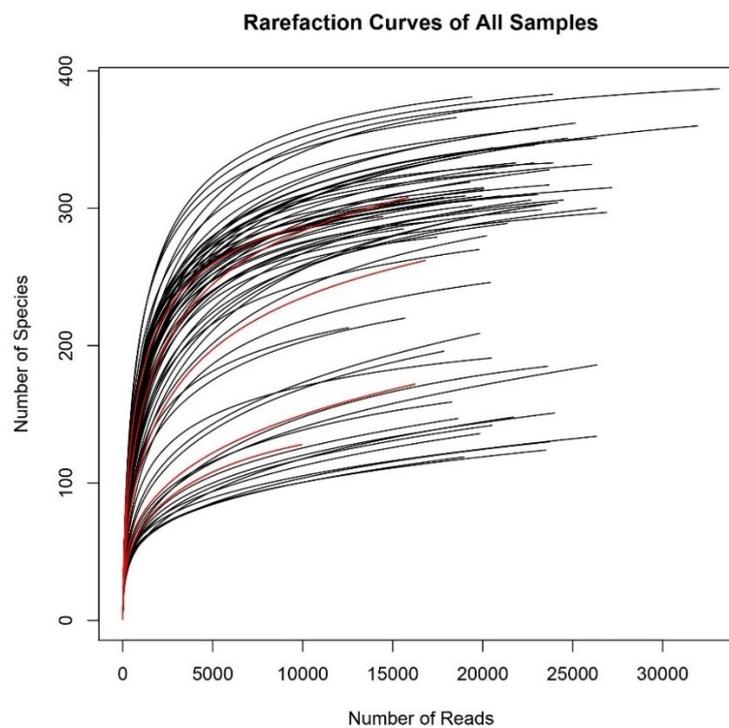
Das Mikrobiom ist definiert als der gesamte Lebensraum einschließlich den Mikroorganismen, deren Genomen und den umgebenen Umweltbedingungen (MARCHESI & RAVEL, 2015). In der ersten Definition des Begriffs Mikrobiom 1988 wurde der Begriff als Kombination der altgriechischen Worte „micro“ für klein und „biome“ für Leben gebildet und als „charakteristische mikrobielle Gemeinschaft“ in einem „angemessen gut definierten Habitat mit eindeutigen physiochemischen Eigenschaften“ als deren „Schauplatz der Aktivität“ beschrieben (WHIPPS *et al.*, 1988). Dabei wird das Mikrobiom durch die Analyse eines einzelnen Bestandteils oder einer Kombination der folgenden Techniken bestimmt: Metagenomik, Metabonomik, Metatranskriptomik und Metaproteomik (MARCHESI & RAVEL, 2015). Das Mikrobiom besteht aus Prokaryoten wie Bakterien und Archaeen, sowie aus Protozoen und Pilzen (MARCHESI & RAVEL, 2015). Es herrscht jedoch eine gewisse Uneinigkeit hinsichtlich der Frage, ob Viren, Plasmide und mobile genetische Elemente zum Mikrobiom zählen (BERG *et al.*, 2020). Ebenso ist nicht gänzlich geklärt, wie mit extrazellulärer DNA von toten Zellen verfahren werden soll. Diese so genannte „relikte DNA“ macht je nach Studie zwischen 30 und 80 % der Gesamt-DNA aus (CARINI *et al.*, 2016; LENNON *et al.*, 2018). Bei genauerer Betrachtung der von Whipps vorgelegten Definition wird der „Schauplatz der Aktivität“ genannt. Dieser „Schauplatz“ beinhaltet das gesamte Spektrum von Molekülen, die von Mikroorganismen produziert werden, eingeschlossen der strukturellen Elemente, Metaboliten und Moleküle, die von dem koexistierenden Wirt produziert und von Umweltbedingungen strukturiert werden. Im Sinne dieser Definition sollten alle mobilen genetischen Elemente wie Phagen, Viren und extrazelluläre DNA im Begriff Mikrobiom eingebunden sein (BERG *et al.*, 2020). Eine klare Trennung zwischen den Begriffen Mikrobiom und Mikrobiota hilft, Kontroversen zu überbrücken. Unter dem Begriff Mikrobiota wird die An-

sammlung an lebenden Mikroorganismen in einer definierten Umgebung beschrieben (BERG *et al.*, 2020) und damit sind Phagen, Viren, Plasmide, Prionen, Viroide und freie DNA auf Grund deren Einordnung als nicht lebende Organismen ausgeschlossen (DUPRÉ & O'MALLEY, 2009; BERG *et al.*, 2020). Analysiert werden die Mikrobiota mittels molekularer Methoden wie der 16S-rRNA-Genanalyse (MARCHESI & RAVEL, 2015).

Mikroben finden sich über den Körper verteilt, aber hauptsächlich auf externen und internen Oberflächen wie dem Gastrointestinaltrakt, der Haut, dem Speichel, der Mukosa der Mundhöhle und den Konjunktiven. Dabei sind Bakterien im Mikrobiom zwei bis dreimal so häufig vertreten wie Eukaryoten und Archaeen (QIN *et al.*, 2010; YATSUNENKO *et al.*, 2012). Der größte Teil der Bakterien lebt im Colon mit schätzungsweise  $3,8 \times 10^{13}$  Bakterien. Da die Gesamtzahl an Bakterien in allen anderen Organen geschätzt  $10^{12}$  beträgt, kann von einer geschätzten Anzahl von  $3,8 \times 10^{13}$  Bakterien im gesamten Körper eines 70 kg schweren Menschen ausgegangen werden (SENDER *et al.*, 2016). Entsprechend dieser Schätzung beträgt die gesamte Biomasse des Mikrobioms beim Menschen etwa 200 g (SENDER *et al.*, 2016). Damit haben Menschen dieselbe Anzahl an Bakterienzellen wie Körperzellen (SENDER *et al.*, 2016). Insgesamt geht man davon aus, dass sich 300 bis 500 Bakterienspezies im Mikrobiom des Menschen befinden (MOORE & HOLDEMAN, 1974; CLAVEL *et al.*, 2016), von denen bis zum jetzigen Zeitpunkt lediglich 30 bis 50 % kultiviert werden konnten (ALMEIDA *et al.*, 2021; HITCH *et al.*, 2021).

Bei der Analyse der 16S-rRNA-Gensequenzen werden die vom Sequenziergerät erfassten Daten zunächst auf der Plattform IMNGS (*Integrated Microbial Next Generation Sequencing*) bearbeitet (LAGKOUVARDOS *et al.*, 2016b). Im Anschluss werden die so generierten Daten mit der Datenbank Rhea (LAGKOUVARDOS *et al.*, 2017), einer auf dem Programm R basierenden Plattform zur Analyse von Mikrobiomdaten, mittels sechs verschiedener Skripten analysiert: Normalisierung,  $\alpha$ -Diversität,  $\beta$ -Diversität, das taxonomische Reichtum, Serien-Gruppenvergleiche, sowie Korrelationen (LAGKOUVARDOS *et al.*, 2017).

Bei der Normalisierung werden die Rohdaten so verändert, dass Störfaktoren, die durch unterschiedliche Probengrößen entstehen, entfernt werden. Da bei der Sequenzierung von Proben eine unterschiedliche Anzahl an Sequenzen pro Probe auftritt, ist die Normalisierung zwingend erforderlich. Der dem zu Grunde liegende Prozess wird üblicherweise *rarefying*, zu Deutsch verfeinern, genannt. Dabei wird meist eine zufällige Teilbeprobung der DNA-Sequenzabschnitte (*Reads*) jeder Probe zu einem gegebenen Ganzen durchgeführt. Im oben beschriebenen Programm wird durch die Aufteilung anhand der Probengröße und anschließende Multiplikation mit der Größe der kleineren Probe normalisiert. Die Ausgabe erfolgt in Form einer *Rarefaction*-Kurve (Abbildung 1), die die Anzahl der gefundenen DNA-Sequenzabschnitte gegen die Speziesanzahl aufträgt (LAGKOUVARDOS *et al.*, 2017).

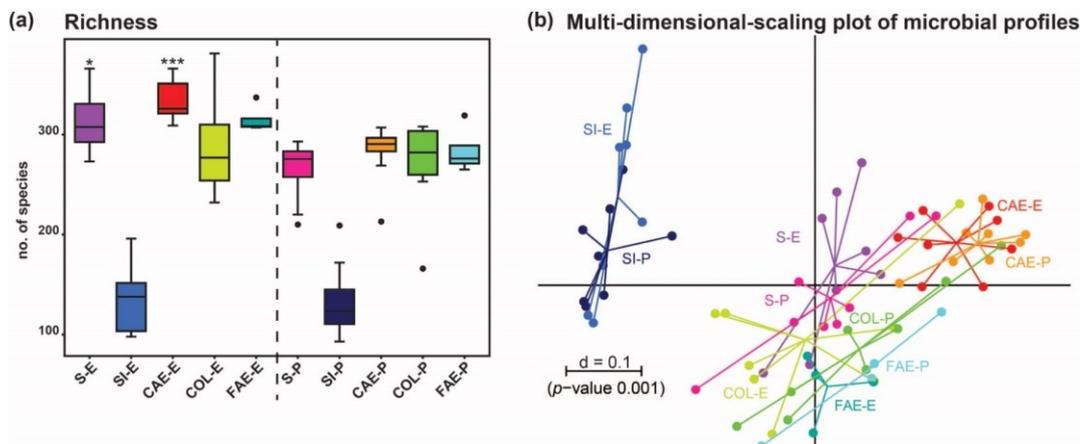


**Abbildung 1: Rarefaction-Kurve beider Versuchsteile**

Auf der x-Achse aufgetragen ist die Nummer der DNA-Sequenzabschnitte (*Reads*); auf der y-Achse aufgetragen ist die Nummer der Spezies  
rot: Fünf am meisten unterrepräsentierte Proben

Im nächsten Schritt wird die  $\alpha$ -Diversität (Abbildung 2 (a)) analysiert. Diese ist definiert als alle unterschiedlichen Spezies (*operational taxonomic units*) in einer Probe. Der einfachste Weg die  $\alpha$ -Diversität zu berechnen ist die Aufzählung aller Spezies in einer Probe, auch Speziesreichtum genannt. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass weder auf die Struktur der Gemeinschaft, noch auf die Häufigkeit der individuellen Spezies eingegangen wird (LAGKOUVARDOS *et al.*, 2017).

Bei der anschließenden Analyse der  $\beta$ -Diversität (Abbildung 2 (b)) werden die ökologischen Profile und damit die Unterschiede der *operational taxonomic units* (OTU) über alle Proben hinweg miteinander verglichen. Hierfür wird ein Distanzmaß über die taxonomischen oder genomischen Profile gelegt, das in einer alle-gegen-alle Distanzmatrix resultiert (LAGKOUVARDOS *et al.*, 2017).



**Abbildung 2:  $\alpha$ - und  $\beta$ -Diversität graphisch dargestellt**

Nach Wenderlein *et al.* (WENDERLEIN *et al.*, 2021)

(a) Darstellung des Speziesreichtums ( $\alpha$ -Diversität) zwischen Proben verschiedener Darmabschnitte: rechts mit extrudierter Diät gefütterte Mäuse, links mit pelletierter Diät gefütterte Mäuse.

(b) Darstellung der ökologischen Profile verschiedener Darmabschnitte im Vergleich zueinander ( $\beta$ -Diversität).

## 1.1 Einflüsse der Mikrobiota auf den Wirt

Kommensale Bakterien, die den Gastrointestinaltrakt besiedeln, beeinflussen sowohl die Entwicklung des Gastrointestinaltraktes, als auch die Entwicklung extraintestinaler Organsysteme, wie das Herz-Kreislauf-System und die Darm-Hirn-Achse. Die Schleimhaut des Magen-Darm-Trakts ist die größte mukosale Oberfläche im Körper. Dabei trennt nur eine einzige Schicht Epithelzellen das Milieu in den Zellen von externen Umwelteinflüssen im Darm (SHANAHAN, 2002). Diese Epithelzellschicht bildet eine physikalische und biochemische Barriere zwischen dem Wirt und seiner durch das Mikrobiom besiedelten Umwelt. Dabei können die Epithelzellen verschiedenste Aufgaben ausführen und haben eine enorme Selbstreparaturfunktion (VAN DER FLIER & CLEVERS, 2009). Die Organisation des Epithels ist dabei an die Anforderungen der verschiedenen Darmabschnitte angepasst. Zur Verbesserung der Nährstoffaufnahme ist der Dünndarm „zusammengefaltet“ und bildet fingerförmige Strukturen („Villus“) aus, die durch Einsenkungen („Krypten“) voneinander getrennt sind (MARSHMAN *et al.*, 2002). Entlang der Darmwand sitzen verschiedenste Zellen mit unterschiedlichen Aufgaben, darunter Enterozyten, Enteroendokrine Zellen, Büschelzellen und Becherzellen (VAN DER FLIER & CLEVERS, 2009). Im Ileum sind die Regionen in den Krypten unterbrochen durch lymphatische Follikel, die Peyer Platten (PP) genannt werden (MOWAT, 2003). Die Peyer Platten enthalten Gruppen lymphatischer Aggregate in der Submukosa des Dünndarms, die verschiedene Immunzellen, wie B-Zellen, T-Zellen und dendritische Zellen enthalten (JUNG *et al.*, 2010). Das Epithel des Kolons ist im Gegensatz zum Dünndarm mit langgezogenen Krypten und einer flachen luminalen Oberfläche aufgebaut (BARKER, 2014). Das lymphatische Gewebe im Kolon wird als Darm assoziiertes lymphatisches Gewebe (GALT) bezeichnet und ähnelt den PP des Dünndarms (GIBBONS & SPENCER, 2011).

## 1.2 Physiologische Einflüsse

Die Bakterien spielen eine wichtige Rolle in der Physiologie des Magen-Darm-Trakts. Dabei schützen die Mikrobiota den Wirt vor Pathogenen durch die sog. „Kolonisierungsresistenz“ (TYTGAT *et al.*, 2019), zudem helfen sie bei der Aufrechterhaltung der Epithelbarriere (ZHENG *et al.*, 2017) und dem Metabolismus (SEKIROV *et al.*, 2010).

**Tabelle 1: Physiologische Einflüsse der Mikrobiota**

Metabolische Funktionen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kontrolle der Differenzierung und Proliferation intestinaler Epithelzellen</li> <li>• Metabolisierung diätetischer Karzinogene</li> <li>• Synthese von Vitaminen</li> <li>• Fermentation nicht verdaulicher Nahrungsbestandteile</li> <li>• Absorption von Ionen</li> <li>• Wiedergewinnung von Energie</li> </ul>
Strukturelle Funktionen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Festigung der Darmbarriere</li> <li>• Induktion von IgA</li> <li>• Apikale Verengung der <i>tight junctions</i></li> <li>• Entwicklung des Immunsystems</li> </ul>
Schutzfunktionen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verdrängung von Pathogenen</li> <li>• Konkurrenz um Nährstoffe</li> <li>• Konkurrenz um Rezeptoren</li> <li>• Produktion antimikrobieller Faktoren</li> </ul>

Modifiziert nach O'Hara und Shanahan (O'HARA & SHANAHAN, 2006)

### 1.2.1 Entwicklung des Gastrointestinaltraktes

Die Unterstützung der Mikrobiota bei der Entwicklung der Strukturen des Gastrointestinaltraktes wurde durch die Beobachtung und Beprobung von keimfreien Tieren erforscht. Keimfreie Tiere sind von Geburt an frei von Mikroorganismen und haben dementsprechend auch keine Immunantwort gegen mikrobielle Einflüsse entwickeln können (GORDON, 1960). In keimfreien Mäusen wurde eine Reduktion des Gewichts von Dünndarm, ileocaecalen Lymphknoten und Leber beobachtet. Dabei ließ sich ein reduzierter Flüssigkeitsgehalt dieser Organe bei diesen Tieren feststellen. Ebenso waren die lymphatischen Gewebe bei keimfreien Tieren unterentwickelt, was sich durch ein reduziertes Gewicht und einen reduzierten Gehalt an Lymphozyten erklären lässt. Diese Reduktion betraf jedoch nur Organe, die mit der Umgebung des Tieres in Kontakt stehen. Die Zellwand im Dünndarm wog weniger pro Einheit Körpergewicht in keimfreien Mäusen (GORDON & BRUCKNER-KARDOSS, 1961) und zeigte eine geringere Anzahl an Zellen des retikulohistiozytären Systems (GORDON, 1960). Ebenso zeigte sich im Dünndarm keimfreier Ratten eine Verringerung der mukosalen Oberfläche um ca. 30 %. Dieses Defizit konnte über die gesamte Länge des Dünndarms beobachtet werden (GORDON & BRUCKNER-KARDOSS, 1961). Bei keimfreien Nagetieren konnte eine Zunahme des Gewichts des Caecuminhalts um das Vier- bis Sechsfache festgestellt werden, sowie ein Anstieg des Gewichts des Caecums um das Zwei- bis Dreifache. Diese Entwicklung ist durch die Besiedelung mit Bakterien rückgängig zu machen (GORDON & WOSTMANN, 1959). Im Ileum keimfreier Tiere zeigten sich qualitative Unterschiede in der Morphologie und Kinetik der Zellen. Diese stellten sich als leichtgradige Villushyperplasie mit einem verkürzten Zellzyklus dar (ALAM *et al.*, 1994). Im Kolon keimfreier Ratten konnte man eine reduzierte Zahl epithelialer Zellen nachweisen, verursacht durch einen verlängerten Zellzyklus (ALAM *et al.*, 1994). Cherbuy *et al.* konnten bei keimfreien Ratten sogar eine Reduktion der Glukoseumsetzung in Kolonozyten beobachten. Diese Reduktion ist bedingt durch einen Unterschied in der Aktivität des Enzyms 6-Phosphofructo-1-Kinase. Im Gegenzug stieg der Verbrauch von Glutamin bei keimfreien Ratten, dieser korrelierte mit einer höheren maximalen Geschwindigkeit der Glutaminase in den Kolonozyten (CHERBUY *et al.*, 2019).

Auch in der Funktion des Darms kommt es bei keimfreien Tieren zu Einschränkungen. Der Darm keimfreier Tiere verfügt über ein reduziertes Kapillarnetzwerk in den Villi (STAPPENBECK *et al.*, 2002). Ebenso war eine Beeinträchtigung der Peristaltik zu beobachten (HUSEBYE *et al.*, 1994). Zusätzlich hatten keimfreie Tiere einen abnormalen Cholesterin- und Gallensäuremetabolismus (WOSTMANN *et al.*, 1966; GUSTAFSSON *et al.*, 1975; MADSEN *et al.*, 1976). Einige Mikrobiota können die Transkription von Angiogenin-3 induzieren, einem Protein mit angiogenetischer Aktivität (HOOPER *et al.*, 2001).

Dieser Erhalt der Homöostase der Darmschleimhaut ist im Interesse der Darmbakterien, da eine funktionierende Homöostase den Bakterien ein langfristiges Habitat erhält. Verschiedene Bakterien tragen zum Erhalt der intestinalen Epithelbarriereintegrität durch die Aufrechterhaltung von Zell-zu-Zell-Verbindungen und die Verstärkung der epithelialen Reparatur nach Verletzungen bei (WOSTMANN *et al.*, 1966; HOOPER *et al.*, 2001; CARIO *et al.*, 2007; LUTGENDORFF *et al.*, 2008).

### 1.2.2 Immunmodulation

Zum Schutz des Wirtes dient die einzellige Schicht des Darmepithels als Verteidigungsbarriere. Diese Zellschicht überprüft aktiv die ansässigen Mikrobiota, Pathogene und andere Antigene. Als Verstärkung des Epithels dienen die Schleimschicht auf den Darmzellen, die Sekretion von IgA und die Produktion antimikrobieller Moleküle durch das Epithel (GANZ, 2003). Der Darm produziert mit 40 mg/kg Körpergewicht pro Tag mehr Antikörper als jedes andere Organ des Körpers. Außerdem enthält der Darm 80 % aller antikörperproduzierenden Zellen (BRANDTZAEG, 2000). Diese Produktion findet in drei Typen immunsensorischer Zellen statt: Enterozyten, M-Zellen und intestinalen dendritischen Zellen (O'HARA & SHANAHAN, 2006). Enterozyten dienen als afferente Sensoren, die durch Freisetzung von Chemokinen und Cytokinen das angeborene und erworbene Immunsystem alarmieren (SHANAHAN, 2002). M-Zellen, die auf den Lymphfollikeln aufliegen, beproben die Umgebung und transportieren luminale Antigene zu den darunterliegenden dendritischen Zellen oder anderen Antigen präsentierenden Zellen. Die dendritischen Zellen des Darms spielen eine zentrale immunsensorische Rolle. Sie können den Darminhalt direkt beproben, indem sie Dendriten zwischen den Oberflächen der Enterozyten hindurchschieben, ohne die *tight junctions* zu zerstören (RESCIGNO *et al.*, 2001).

Die Unterscheidung pathogener Bakterien von kommensalen Bakterien durch die immunosensorischen Zellen erfolgt durch zwei größere Wirts-Mustererkennungsrezeptoren Systeme (PRRs): Toll-like Rezeptoren (TLR) und Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomänen (NOD) oder Caspase-Rekrutierungsdomänen (CARD) (CARIO, 2005).

Keimfreie Tiere haben eine abnormale Anzahl verschiedener Immunzelltypen und Immunzellprodukte. Ebenso zeigen sich Defizite in den lokalen und systemischen lymphoiden Strukturen. Milz und Lymphknoten keimfreier Tiere sind unterentwickelt (SEKIROV *et al.*, 2010). Auch die Peyer Platten sind bei keimfreien Tieren hypoplastisch (MACPHERSON & HARRIS, 2004). Die Anzahl ausgereifter isolierter Lymphfollikel (BOUSKRA *et al.*, 2008), sowie die Anzahl der IgA produzierenden Plasmazellen und deren Endprodukte IgA und IgG sind reduziert (MACPHERSON & HARRIS, 2004). Keimfreie Tiere zeigen ein reduziertes Wachstum der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Population, was zu Immundefizienz führt. Eine Einzelanzucht mit *Bacteroides fragilis* oder die orale Verabreichung des *Bacteroides fragilis* Kapselantigens PSA (capsular polysaccharide A) konnte die CD4<sup>+</sup> T-Zell-Defizite, die in den Milzen keimfreier Tiere zu beobachtet wurden, komplett korrigieren (MAZMANIAN *et al.*, 2005).

### 1.2.3 Entwicklung des Herz-Kreislauf-Systems

Bei keimfreien Tieren können verschiedene Veränderungen des Herz-Kreislauf-Systems beobachtet werden. Im Vergleich zu SPF-Tieren zeigen keimfreie Tiere geringere Herzgrößen, ein geringeres Blutvolumen und einen signifikant reduzierten Herzauswurf (GORDON *et al.*, 1963). Auch der relative Blutfluss in Regionen wie der Leber und dem Darm ist reduziert (WOSTMANN *et al.*, 1963). Die Vasomotion präkapillärer Arteriolen war bei keimfreien Ratten im Vergleich zu herkömmlichen Ratten deutlich reduziert (BAEZ & GORDON, 1971). Zudem reagierten präkapilläre Gefäße keimfreien Ratten hyporeaktiv auf Substanzen wie Katecholamine, Epinephrin und Norepinephrin. Auch gegenüber Vasopressin reagierten die Gefäße weniger empfindlich. Diese Hyporeaktivität war bei Angiotensin nicht zu beobachten (BAEZ & GORDON, 1971).

### 1.2.4 Entwicklung des Nervensystems

Die Entwicklung des Nervensystems ist durch Keimfreiheit beeinträchtigt. Die Auffälligkeiten reichen von einer Dysregulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindenachse (SUDO *et al.*, 2004; SUDO, 2006) bis hin zu einer verringerten Wahrnehmung von entzündungsbedingtem Schmerz (AMARAL *et al.*, 2008). Ebenso konnte ein Zusammenhang zwischen den Darmmikrobiota und der Kontrolle der Höhe verschiedener Signalmoleküle (brain-derived neurotrophic factor, z.B. Noradrenalin und Tryptophan) in verschiedenen Bereichen des zentralen Nervensystems festgestellt werden (FORSYTHE *et al.*, 2010). Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass Bakterien eine Rolle bei Stimmung und Verhalten innehaben, sowie zur Pathophysiologie von Verhaltensstörungen beitragen (COLLINS & BERCIK, 2009; NEUFELD & FOSTER, 2009; RHEE *et al.*, 2009; FORSYTHE *et al.*, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass das Einbringen pathogener Bakterien in das Kolon von Nagern zu einer Aktivierung verschiedener Hirnstammkerne (paraventriculärer, supraoptischer, parabranchialer *Tractus solitarius*) führt und somit bakterielle Signale an das ZNS weitergeleitet werden. Dabei könnte der *Nervus vagus*, der am Hirnstamm entspringt und die abdominalen Organe innerviert und die viszerale, sensorischen Signale ans Gehirn weiterleitet, auch für die Weiterleitung bakterieller Signale verantwortlich sein (COLLINS & BERCIK, 2009).

### 1.3 Pathologische Einflüsse

#### 1.3.1 Störungen durch pathogene Eindringlinge im Gastrointestinaltrakt

Die Darmbarriere schützt den Wirt vor dem Eindringen der Pathogene. Diese Barriere besteht aus vier verschiedenen Komponenten: dem intestinalen Epithel, der Schleimschicht, der mukosalen Immunität und dem intestinalen Mikrobiom (IACOB *et al.*, 2018). Das intestinale Epithel dient als physische Barriere gegen die Umwelt. Die Schleimschicht besteht aus einem wasserhaltigen Gel, das die Schleimhaut des Darms bedeckt. Dabei besteht der Schleim aus Mucinen, die von den Becherzellen des Darms produziert werden und antimikrobiellen Peptiden, die durch Paneth-Zellen produziert werden. Diese Schleimschicht bildet zudem eine schützende Umgebung für die Darmbakterien, insbesondere jene, die nahe an der Darmwand gedeihen (CORNICK *et al.*, 2015). Die mukosale Immunität besteht aus dem Darm assoziierten lymphatischen Gewebe (GALT), sekretorischen IgA (sIgA), antimikrobiellen Peptiden (Defensine oder Lysozyme) und mukosalen Immunzellen (wie z.B. Th1, Th2 und Treg Zellen) (GOTO *et al.*, 2016; KURASHIMA & KIYONO, 2017). Das intestinale Mikrobiom wiederum verhindert die Invasion von Pathogenen durch einen Mechanismus namens „Kolonisierungsresistenz“ (TYTGAT *et al.*, 2019). Dabei nutzen die Bakterien Mechanismen wie Biofilmbildung (DENG *et al.*, 2020), Sekretion antimikrobieller Peptide, Konkurrenz um Nährstoffe, sowie Veränderung des lokalen Redoxpotentials und pH-Werts gegen eine Besiedelung nicht kommensaler Bakterien (DERRIEN & VAN HYLCKAMA VLIET, 2015). Aber auch pathogene Bakterien haben Mechanismen entwickelt, die ihnen dabei helfen, den Gastrointestinaltrakt zu besiedeln. So konkurrieren pathogene Bakterien aus der *Escherichia-coli*-Gruppe oder *Clostridium difficile* mit kommensalen Bakterien um den Mukus des Darms (COLLADO *et al.*, 2005; O'CALLAGHAN & VAN SINDEREN, 2016). Andere Pathogene wie *Salmonella* sp., *Campylobacter* spp., *Clostridium difficile* oder *Vibrio cholerae* haben Strategien entwickelt, um die mukosale Schicht des Darmes zu umgehen. Hierzu zählen die Vermeidung der Schleimschicht, sowie das Überwinden der mukosalen Rezeptoren mittels Flagellen (TASTEYRE *et al.*, 2001; ERDEM *et al.*, 2007), die Exkretion von Mucinasen oder Störung der Mucinsekretion (BRANKA *et al.*, 1997; GANESH *et al.*, 2013; LUO *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2015), sowie das Fehlen von Adhäsinen, die in die intestinale Adhäsion involviert sind (SICARD *et al.*, 2017).

Andere Strategien führen zu einer besseren Mucinadhäsion der Pathogene durch Mucin-bindende Proteine, sog. fimbriale Adhäsine. Eine weitere Überlebensstrategie pathogener Bakterien ist ihre Anpassung an die Nährstoffversorgung im Darm. Einige Pathogene nutzen Nährstoffe, die von kommensalen Bakterien produziert werden. Ein Beispiel hierfür ist *Clostridium difficile*, welches das von *Bacteroides thetaiotaomicron* produzierte Succinat metabolisiert (FERREYRA *et al.*, 2014). Ebenso ist die Fruktosylierung von Glucanen durch *Bacteroides* spp. wichtig für die Ernährung von *Bacteroides* spp., wird aber auch von pathogenen Spezies wie *Salmonella* Typhimurium, *Clostridium difficile* und *Campylobacter jejunii* genutzt (COYNE *et al.*, 2005; PACHECO *et al.*, 2012; WANDS *et al.*, 2015). Andere Pathogene nutzen Nährstoffe, die von kommensalen Mikrobiota nicht metabolisiert werden können. Zu diesen Nährstoffen gehört Ethanolamin, das u.a. als Kohlenstoff und Stickstoffquelle für *Salmonella* Typhimurium, EHEC und *Klebsiella* spp. dient (GARSIN, 2010).

Bei einer Infektion mit Pathogenen wehrt sich der Darm mit einer Entzündungsreaktion, um die pathogenen Eindringlinge unter Kontrolle zu bringen. Die Entzündungsreaktion richtet sich jedoch nicht ausschließlich gegen pathogene Organismen, sondern auch gegen die physiologischen Mikrobiota (SEKIROV & FINLAY, 2009).

### 1.3.1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankung (IBD)

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen umfassen Erkrankungen des Magen-Darm-Trakts, die zu wiederkehrenden Entzündungen und langjährigen Beschwerden führen. Klinische Zeichen sind Bauchschmerzen und Durchfall mit oder ohne Schleim oder Blut im Stuhl (STROBER *et al.*, 2007). Diese Veränderungen entstehen durch eine übermäßige Reaktion des Immunsystems auf körpereigene Zellen oder kommensale Bakterien im Darm (SARTOR, 2008). Die Ursache für die Entstehung dieser Erkrankung ist bis heute nicht vollständig geklärt, vermutlich ist sie multifaktoriell bedingt. Zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (IBD) gehören *Colitis ulcerosa* (engl. Ulcerative colitis, UC) und Morbus Crohn (engl. Crohn's disease, CD) (SARTOR, 2008).

In Versuchen mit Nagetieren mit spontaner oder induzierter intestinaler Entzündung konnte nachgewiesen werden, dass die kommensalen enterischen bakteriellen Antigene die chronisch immunmedierte Colitis und Ileitis am Laufen hielten (CONG *et al.*, 2002; SARTOR, 2006; STROBER *et al.*, 2007). Kullberg *et al.* konnten nachweisen, dass bei RAG<sup>-/-</sup>-Mäusen der Eintrag einer einzelnen CD4<sup>+</sup> Th1 T-Zelle, die für ein bestimmtes bakterielles Epitop spezifisch ist, zu einer Colitis in den Empfängermäusen führte (KULLBERG *et al.*, 2003). Es schien jedoch eine wiederkehrende Erkennung verschiedener Mitglieder des Mikrobioms durch das Immunsystem notwendig zu sein, um die entzündlichen Veränderungen einzuleiten (STEPANKOVA *et al.*, 2007). Auch ein vermehrtes Vorkommen pathogener *Escherichia coli* konnte bei Patienten mit Morbus Crohn nachgewiesen werden (SARTOR, 2008).

Bei Nagern gibt es zudem Anzeichen dafür, dass Veränderungen in der bakteriellen Zusammensetzung durch Entzündungen und/oder Infektionen im Kolon entstehen. Die entzündete Schleimhaut und/oder das veränderte Milieu bei einer Entzündung beeinflussen selektiv das Wachstum und die Anhaftung verschiedener Bakterien-spezies (BIBILONI *et al.*, 2005; SWIDSINSKI *et al.*, 2005a; LUPP *et al.*, 2007). Frank *et al.* haben in 190 Gewebeproben erniedrigte Zahlen an Firmicutes und Bacteroidetes und einen co-dominanten Anstieg an Proteobacteria und Actinobacteria festgestellt. Die erniedrigte Zahl an Firmicutes entstand größtenteils durch Verringerungen der Clostridium XIVa und IV Gruppen (FRANK *et al.*, 2007). Eine Re-

duktion der *Clostridia* spp. bei Morbus Crohn ist auch in einigen anderen Versuchen beschrieben worden (HOOPER & GORDON, 2001; SWIDSINSKI *et al.*, 2005b; GOPHNA *et al.*, 2006; MANICHANH *et al.*, 2006; MARTINEZ-MEDINA *et al.*, 2006). Die erniedrigten Clostridien könnten zudem Ursache für die erniedrigten SCFA Konzentrationen im Darm von IBD Patienten sein (MARCHESI *et al.*, 2007).

Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnte noch nicht abschließend geklärt werden, ob die pathologischen Veränderungen bei IBD Grund oder Ursache eines veränderten Mikrobioms sind (SEKIROV *et al.*, 2010). Ein colitogenes Mikrobiom könnte sowohl ein Resultat der entzündeten Mukosa sein als auch ein Treiber dieser Entzündung (GARRETT *et al.*, 2007). Ebenso ist es bei Untersuchungen des Mikrobioms IBD kranker Patienten nicht möglich gewesen, ein definiertes IBD-typisches Mikrobiom festzustellen (METWALY & HALLER, 2019).

### 1.3.1.2 Malignitäten

Neben vorteilhaften Wirkungen kommensaler Bakterien im Darm, können Bakterien auch unerwünschte karzinogene Prozesse induzieren. Dabei gibt es drei Mechanismen der Mikrobiota induzierten Karzinogenese. Ersterer ist eine unverhältnismäßige proinflammatorische Zellsignalisierung in der Mukosa des Gastrointestinaltraktes. Dabei kommt es zur Verschorfung und zur Reparatur des intestinalen Epithels, was zu einer Entwicklung von Neoplasien und Malignitäten führen kann. Zweiterer ist der direkt zytotoxische Effekt von Bakterien auf Zellen und letzterer ist der Metabolismus toxischer Stoffwechselprodukte durch die Mikrobiota (SEKIROV *et al.*, 2010).

Veränderungen in der Schleimschicht des Darms wie eine abweichende Mucinexpression und -glykosylierung stehen in Zusammenhang mit chronischer Entzündung und gastrointestinalen Tumoren. Eine abnormale Mukusproduktion führt dabei zu einer Beeinträchtigung der Schleimschicht, was es den Bakterien ermöglicht in nahen Kontakt zur Darmwand zu kommen und Wirtsreaktionen auszulösen. Dies kann zur Entwicklung von Tumoren führen (COLEMAN & HALLER, 2021).

Meistuntersucht ist vermutlich das kanzerogene Potential von *Helicobacter pylori*. Bei einer Besiedelung mit *H. pylori* kommt es zu einer ständigen Immunantwort, die zu einer Entzündung der Magenschleimhaut führt. Diese ständige Entzündung kann wiederum zur malignen Transformation führen (CORREA & HOUGHTON, 2007). Neben dem Einfluss von *H. pylori* gibt es andere Veränderungen der Mikrobiota, die zur Entwicklung von kolorektalen Karzinomen führen (HOPE *et al.*, 2005). Patienten mit Polypen, einer Vorstufe des kolorektalen Karzinoms, zeigen ein Mikrobiom ähnlich zu dem von Patienten mit kolorektalem Karzinom (MOORE & MOORE, 1995). Huycke *et al.* konnten in einem Versuch nachweisen, dass *Enterococcus faecalis* reaktive Sauerstoffspezies (engl. Reactive oxygen species, ROS) und Wasserstoffperoxid produziert. Diese Stoffwechselprodukte führten zu Schäden in der DNA des Kolonepithels (HUYCKE *et al.*, 2002). Ebenso wurden ein Reichtum bestimmter *Clostridium* spp. (SCANLAN *et al.*, 2008), *Bacteroides* spp. und *Bifidobacterium* spp. (MOORE & MOORE, 1995) mit der Entwicklung von kolorektalen Karzinomen in Verbindung gebracht. Das polyketid synthase (pks) *E. coli* ist in der Lage ein Genotoxin namens Colibactin zu

produzieren, welches zu Doppelstrangbrüchen der DNA, Chromosomenaberrationen und Hemmungen des Zellzyklus führt (NOUGAYRÈDE *et al.*, 2006; CUEVAS-RAMOS *et al.*, 2010). Zudem verstärkt *E. coli* gemeinsam mit *Bacteroides fragilis* (ETBF) DNA-Schäden und Tumorformation in einem CRC-Mausmodell. Besonders wichtig in diesem Prozess war das Vorhandensein der Toxine Colibactin und *B. fragilis*-Toxin (BFT) (DEJEA *et al.*, 2018).

Bei der Entwicklung von gastrointestinalen Malignitäten ist die Ernährung ein großer Einflussfaktor (BINGHAM, 2000). Die metabolischen Produkte, die bei der Nahrungsaufnahme von Bakterien entstehen sind dabei entweder cytoprotektiv oder cytotoxisch (HOPE *et al.*, 2005; O'KEEFE, 2008). Prokarzinogene Produkte des bakteriellen Stoffwechsels sind Schwefelwasserstoffe, Dichloressigsäure, Lithocholsäure und ROS (CULPEPPER *et al.*, 2014).

### 1.3.2 Extragastrintestinale Erkrankungen

Veränderungen der Zusammensetzung der Mikrobiota können neben pathologischen Prozessen im Gastrointestinaltrakt auch zu pathologischen Prozessen außerhalb des Gastrointestinaltraktes führen oder werden mit diesen assoziiert (SEKIROV *et al.*, 2010). Zu den Mikrobiom-assoziierten extragastrintestinalen pathologischen Prozessen gehören Übergewicht, Diabetes, Allergien, Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems und des Nervensystems, Autismus, Familiäres Mittelmeerfieber, Pankreatitis, Lebererkrankungen und Arthritis (SEKIROV *et al.*, 2010). Auf Grund der Vielzahl soll hier nur auf einige wenige Erkrankungen eingegangen werden.

#### 1.3.2.1 Übergewicht

Die Deutsche Adipositas Gesellschaft definiert Adipositas als eine über das Normalmaß hinausgehende Vermehrung des Körperfetts (DEUTSCHE ADIPOSITAS GESELLSCHAFT E.V., 2020). Ley *et al.* fanden heraus, dass das intestinale Mikrobiom in die Regulation der Energiehomöostase bei Mäusen und Menschen involviert ist (LEY *et al.*, 2005). Dabei stellten sie fest, dass in *ob/ob* Mäusen ein um 50 % reduzierter Reichtum an Bacteroidetes zu finden war, der durch einen Anstieg an Firmicutes ausgeglichen wurde (LEY *et al.*, 2005). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch die Arbeiten weiterer Forschungsgruppen (BACKHED *et al.*, 2004; TURNBAUGH *et al.*, 2009a). Zhang *et al.* konnten in Patienten nach Magen-Bypass Operation ein Absinken der Firmicutes nachweisen und in adipösen Patienten eine Anreicherung an Prevotellaceae (ZHANG *et al.*, 2009). Andere Forschungsteams fanden im Mikrobiom übergewichtiger Patienten gegensätzliche Ergebnisse, erniedrigte Firmicutes und erhöhte Bacteroidetes (SCHWIERTZ *et al.*, 2010) oder konnten keinen Zusammenhang des Bacteroidetes: Firmicutes Verhältnisses bei Patienten mit Übergewicht nachweisen (DUNCAN *et al.*, 2008). Gene, die Enzyme zum Abbau von Polysacchariden kodieren, kommen in adipösen Mäusen vermehrt vor. Dabei fand sich eine insgesamt geringere Menge an Energie im Kot von adipösen Mäusen im Vergleich zu ihren schlanken Wurfgeschwistern. Dies spricht für eine erhöhte Kapazität des Mikrobioms zur Extraktion von Energie aus der Nahrung. Ebenso wurde ein Anstieg an Polysaccharid-abbauenden Enzymen mit einer vermehrten Ablagerung von Fett in Verbindung gebracht (TURNBAUGH *et al.*, 2006). Die Transplantation des Mikrobioms von Mäusen mit Diät-induzierter

Adipositas in keimfreie Mäuse führte zu einer vermehrten Fettablagerung. Wurde diesen Mäusen weiterhin eine westliche Diät angeboten blieben die Mäuse adipös. Mit Beendigung der westlichen Diät wurde der adipöse Phänotyp reversibel (TURNBAUGH *et al.*, 2008). Ebenso wurde Übergewicht beim Menschen mit einem verringerten Bakterienreichtum assoziiert (LE CHATELIER *et al.*, 2013). Testpersonen mit reduziertem Bakterienreichtum zeigten im Vergleich zu Individuen mit normalem Bakterienreichtum eine mit Übergewicht assoziierte Dyslipidämie, höhere Insulinresistenz und eine stille Entzündung (engl. *low grade inflammation*) (LE CHATELIER *et al.*, 2013). Dieser Phänotyp wurde in anderen Arbeiten mit einem erhöhten Prädiabetes Risiko, Typ 2 Diabetes, Leber- und Herzerkrankungen sowie einigen Krebsformen assoziiert (SHOELSON *et al.*, 2006; RENEHAN *et al.*, 2008; OUCHI *et al.*, 2011). Wostmann *et al.* konnten nachweisen, dass keimfreie Mäuse einen höheren Energiebedarf haben, um ein bestimmtes Körpergewicht zu erreichen und zu halten als Wildtyp Mäuse (WOSTMANN *et al.*, 1983). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen die Forscher um Backhed *et al.*; sie konnten zeigen, dass Wildtyp Mäuse eine um 47 % erhöhte Gesamtfettmasse haben im Vergleich zu keimfreien Mäusen. Kolonisierte man wiederum die keimfreien Mäuse mit den Mikrobiota der Wildtyp Mäuse, stieg die Körperfettmasse der keimfreien Mäuse um 60 % (BACKHED *et al.*, 2004). Neben der Wirkung von Bakterien, scheinen auch deren Metabolite einen Einfluss auf die Entstehung von Übergewicht zu haben. So konnte in GPR-41 defizienten Mäusen nachgewiesen werden, dass eine Aktivierung von GPR-41 durch SCFA zu einer Stimulation der Ausschüttung von PYY führt. PYY induziert die Sättigung und führt damit zu einer Reduktion der Futteraufnahme. Die Expression von GPR-41 in Fettgewebe stimuliert die Leptin Sekretion, die ebenfalls zu Sättigung führt (SAMUEL *et al.*, 2008). Eine GPR-43 Stoffwechselwegaktivierung unterdrückt Insulinsignalwege und verhindert damit die Ansammlung von Fettgewebe und stimuliert die Lipolyse in Adipozyten. Zudem fördert es die Sekretion von GLP-1, dies führt zu einem Anstieg postprandialer Insulinfreisetzung und einem Absinken der Glukagon-Sekretion (KIMURA *et al.*, 2013; ANDERSEN *et al.*, 2018).

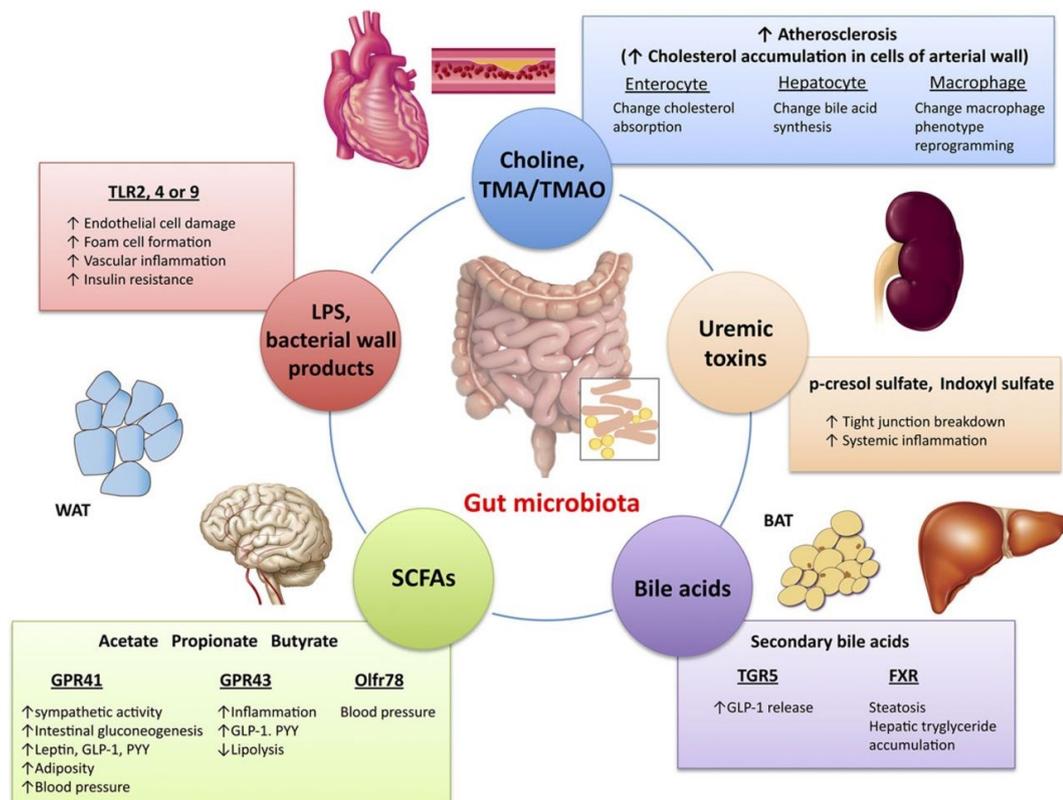
### 1.3.2.2 Diabetes Typ 2

Typ 2 Diabetes ist eines der am schnellsten wachsenden Gesundheitsprobleme in entwickelten Ländern und Entwicklungsländern (ZHANG *et al.*, 2013). Dabei fand man bei Vergleichen einer Gruppe 70-jähriger Frauen mit Typ 2 Diabetes, Glukoseintoleranz und normaler Glukosetoleranz heraus, dass bei Frauen mit Typ 2 Diabetes vier *Lactobacillus* spp. erhöht waren, fünf *Clostridium* spp. jedoch erniedrigt. Dabei konnte man eine positive Korrelation der *Lactobacillus* spp. mit Nüchtern-glukose und HbA1c feststellen. Die *Clostridium* spp. zeigten demgegenüber eine negative Korrelation zu Nüchtern-glukose, HbA1c, Insulin, C-Peptid und Plasma-Triglyceriden, sowie eine positive Korrelation mit Adiponektin und HDL. Beide Genera zeigten keine Korrelation zum body mass index (BMI), Taillenumfang und zum Taille-Hüft-Verhältnis (KARLSSON *et al.*, 2013). Bei einem Vergleich von Patienten mit und ohne Typ 2 Diabetes verschiedener Altersgruppen ließ sich ein vermehrter Reichtum von Firmicutes in der Kontrollgruppe nachweisen. In der Typ 2 Diabetes Gruppe waren die Stämme Bacteroidetes und Proteobacteria stärker vertreten als in der Kontrollgruppe. Das Bacteroidetes zu Firmicutes Verhältnis war positiv mit den Werten der Plasmaglukose korreliert, sowie negativ mit dem BMI (LARSEN *et al.*, 2010). In einem weiteren Vergleich von Patienten mit Diabetes, Prädiabetes oder ohne Diabetes zeigte sich eine höhere Konzentration an *Clostridium* spp. in der Typ 2 Diabetes Gruppe. Der relative Reichtum an *Bacteroides* spp. in der Typ 2 Diabetes Gruppe war geringer als in den beiden anderen Gruppen. *Dorea* spp., *Prevotella* spp. und *Collinsella* spp. zeigten einen höheren relativen Reichtum in mit Typ 2 Diabetes erkrankten Individuen. *Streptococcus* spp. war in den Gruppen nicht Diabetes, Prädiabetes und Typ 2 Diabetes mit abnehmendem Reichtum zu finden (ZHANG *et al.*, 2013). Insgesamt ist der Einfluss des Mikrobioms auf Typ 2 Diabetes bis zum jetzigen Zeitpunkt noch unzureichend erforscht und bedarf weiterer Untersuchungen.

### 1.3.2.3 Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems

Schon seit dem frühen 19. Jahrhundert war bekannt, dass Infektionen Erkrankungen wie Arteriosklerose bedingen oder verstärken (EPSTEIN *et al.*, 2000). Dabei beeinflussen die Mikrobiota sowohl den Lipidmetabolismus und atheromatöse Plaquebildung durch entzündungsbedingte Prozesse (CAESAR *et al.*, 2010), als auch arterielle Thrombosen (REINHARDT, 2019). Strukturkomponenten und Signalmoleküle der Mikrobiota interagieren mit der mukosalen Oberfläche des Wirtes über PRR (LARSSON *et al.*, 2012) und sind zudem physiologisch aktive PRR-Agonisten im Plasma (CAESAR *et al.*, 2012). Die PRR-Signalisierung von Thrombozyten (ZHANG *et al.*, 2015; BISWAS *et al.*, 2016) und Endothelzellen (JÄCKEL *et al.*, 2017) fördert in verschiedenen Mausmodellen arterielle Thrombosen. Bakterielle Strukturkomponenten wie LPS können das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen verstärken (BERG, 1996). LPS ist eine Verbindung, die in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien vorkommt, und kann auf zwei verschiedenen Wegen durch die Darmwand passieren, durch einen Chylomikron-assoziierten Transporter und durch ein Leck der *tight junctions* (CANI *et al.*, 2007; HOTAMISLIGIL & ERBAY, 2008). LPS nutzen den TLR-Stoffwechsel und können mit Insulinresistenz und einer gesteigerten Makrophageninfiltration in Fettgewebe assoziiert sein. Dabei beeinflusst LPS das metabolische Syndrom und das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen durch die Hochregulierung von entzündungsassoziierten Signalwegen (CANI *et al.*, 2007; HOTAMISLIGIL & ERBAY, 2008). Neben bakteriellen Metaboliten haben auch chemische Verbindungen wie TMAO (Trimethylamin N-Oxid), SCFA und Gallensäuren, die von den Darmbakterien produziert werden, einen Einfluss auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen (KOETH *et al.*, 2013). Diese Verbindungen erhöhen das Risiko arterieller Thrombosen (ZHU *et al.*, 2016) und verschlechtern die Prognose nach ischämischen Schlaganfällen (BENAKIS *et al.*, 2016). Jäckel *et al.* konnten im Mausversuch zeigen, dass keimfreie, TLR2-defiziente Mäuse im Vergleich zu normalen Mäusen eine reduzierte Thrombenbildung nach Verletzung an der *Arteria carotis* zeigten. Als vom Mikrobiom beeinflusste Ursache konnte ein reduzierter Gehalt an von Willebrand Faktor im Plasma und eine reduzierte Synthese des von Willebrand Faktors, insbesondere in den Endothelzellen der Leber festgestellt werden (JÄCKEL *et al.*, 2017). Auch die Zusammensetzung der Nahrung (DROUIN-CHARTIER *et al.*, 2016) und eine

Dysbiose des Mikrobioms (KARBACH *et al.*, 2016) scheinen wichtige Einflussfaktoren bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu sein. Dabei hat die Ernährung mit Ballaststoffen und der durch mikrobielle Fermentation angestiegene SCFA-Spiegel zu einem signifikant reduzierten systolischen und diastolischen Blutdruck, signifikant reduzierter Herzfibrose und linksventrikulärer Hypertrophie im Mausmodell geführt (MARQUES *et al.*, 2017). Eine Supplementierung mit Acetat konnte ähnliche Ergebnisse erzielen und reduzierte zudem Nierenfibrosen merklich (MARQUES *et al.*, 2017).



**Abbildung 3: Darm Mikrobiom und mögliche molekulare Signalwege, die mit kardi-ovaskulären und kardiometabolischen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden können**

Nach Tang *et al.* (TANG *et al.*, 2017)

BAT: braunes Fettgewebe; TGR: Takeda G-Protein-gekoppelter Rezeptor, FXR: farnesoid X Rezeptor; GLP: Glukagon-like Peptid; GPR: G-protein-gekoppelter Rezeptor; Olfr: olfaktorischer Rezeptor; WAT: weißes Fettgewebe; LPS: Lipopolysaccharid; PYY: Peptid YY; TLR: Toll-like Rezeptor; TMA: Trimethylamine; and TMAO: Trimethylamine *N*-oxide.

## 1.4 Das Mikrobiom des Gastrointestinaltraktes der Maus

Für eine Nutzung von Mäusen in Mikrobiomprojekten ist es essenziell, das Mikrobiom der Maus und die externen und internen Einflüsse, die auf das Mikrobiom wirken, zu kennen. Verschiedene aktuelle Studien beschäftigen sich mit der Zusammensetzung des Mausmikrobioms, der Beschreibung neuer Bakterien im Magen-Darm-Trakt der Maus, sowie der Wirkung äußerer Einflussfaktoren auf das Mikrobiom. Obwohl die Maus eines der meistverwendeten Versuchstiere ist, ist das Wissen über ihr Mikrobiom noch immer sehr lückenhaft, was die Interpretation und die Vergleichbarkeit dieser Studien erschwert (CLAVEL *et al.*, 2014; LAGKOUVARDOS *et al.*, 2016a). Der Gastrointestinaltrakt besteht aus einer Vielzahl verschiedener Milieus, die sich in Redoxpotential, pH-Wert, Durchflussrate, Nährstoffverfügbarkeit und vielen weiteren Faktoren unterscheiden (OUWEHAND *et al.*, 2002).

Das orale Mikrobiom der Maus wurde bereits in einigen Studien zu Parodontose und oralem Karzinom verwendet, jedoch in seiner Zusammensetzung noch nicht genauer charakterisiert (STASHENKO *et al.*, 2019). Abusleme *et al.* führten neben Empfehlungen zur Probenentnahme des oralen Mikrobioms bei der Maus, exemplarische Daten von 10 Mäusen auf, deren Maulhöhle mit einem Tupfer ausgestrichen und anschließend mittels 16S-rRNA-Gensquenzierung analysiert wurde. Meistvertreten sind hier *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. und *Acinetobacter* spp. (ABUSLEME *et al.*, 2017). Eine Referenzdatenbank zum Mikrobiom der Maulhöhle der Maus wurde erst in diesem Jahr veröffentlicht. Darin enthalten sind 103 Maus-Maulhöhle-Taxa aus den vier Bakterienstämmen Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria und Bacteroidetes, sowie zwölf neu beschriebene Spezies (Abbildung 4) (JOSEPH *et al.*, 2021).

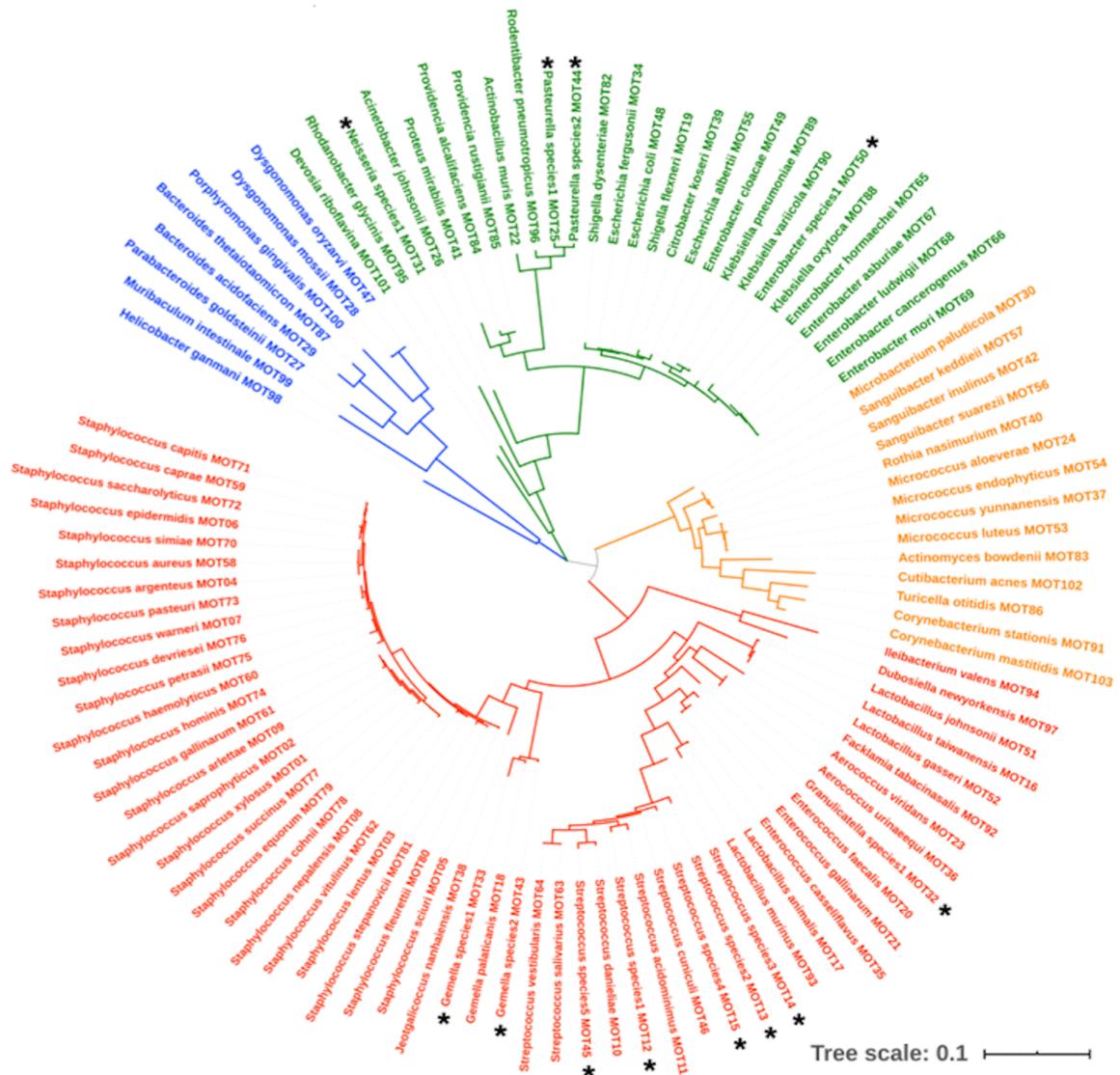
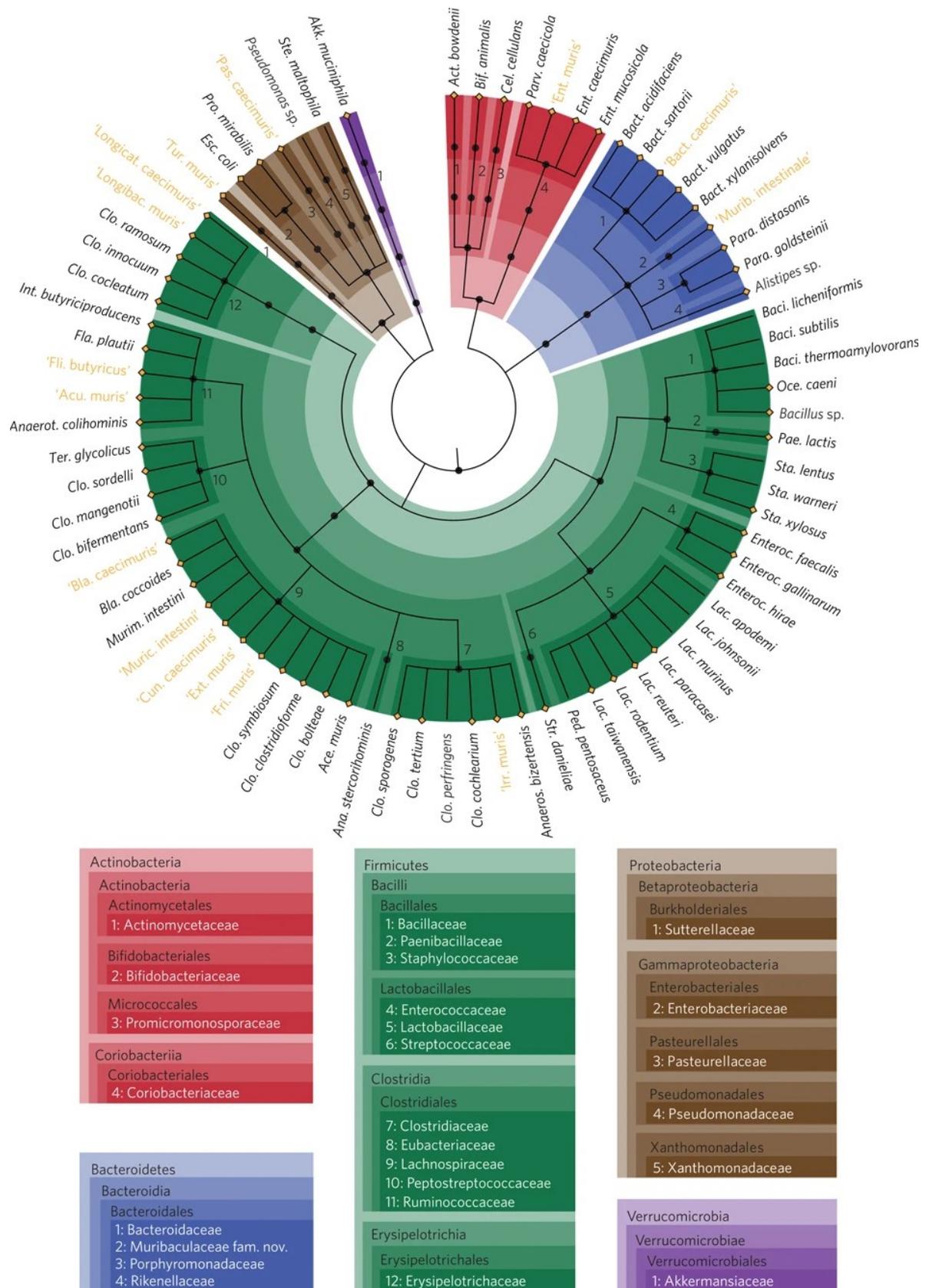


Abbildung 4: Taxonomische Diversität in der oralen Maus-Mikrobiom-Datenbank

Nach Joseph *et al.* (JOSEPH *et al.*, 2021)

Beschreibung der phylogenetischen Verwandtschaft zwischen den 103 oralen Maus Taxa (MOT), die in der oralen Maus-Mikrobiom-Datenbank charakterisiert wurden. Schwarze Sternchen markieren neu beschriebene Spezies. Die Bakterienstämme entsprechen der folgenden Farbgebung: Firmicutes (**rot**), Proteobacteria (**grün**), Bacteroidetes (**blau**) und Actinobacteria (**orange**).

Das Mikrobiom im Magen der Maus umfasst Konzentrationen von  $10^8$  *Lactobacillus* spp. pro Gramm Organinhalt, eine deutlich höhere Konzentration als beim Menschen (CLAVEL *et al.*, 2016). In Mageninhaltsproben von Mäusen ( $n = 10$ ) waren die Stämme Firmicutes und Bacteroidetes, und deren Ordnungen Lactobacillales und Bacteroidales dominierend (WURM *et al.*, 2018). Das Darmmikrobiom der Maus wurde viele Jahre analysiert, die Daten jedoch nicht ausreichend ausgewertet und charakterisiert. Lagkouvardos *et al.* (2016) arbeiteten eine Sammlung von Bakterien aus dem Darm der Maus aus, um diese der Wissenschaft zur Verfügung zu stellen. Hierfür wurden ca. 1.500 Kulturen aus dem Darm von Mäusen isoliert und Sequenzen auf Basis von Kolonie und Zellmorphologie, sowie 16S-rRNA-Gensequenzierung ausgewählt. Dies sollte eine größtmögliche Diversität auf Speziesebene abdecken. Diese so entstandene Sammlung umfasst 100 Sequenzen, die 76 verschiedene Spezies von 26 Familien der Bakterienstämme Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria und Verrucomicrobia repräsentieren. Neben der Erstellung einer Maus-Mikrobiom-Datenbank wurden in diesem Projekt auch neue Bakterienspezies beschrieben (Abbildung 5) (LAGKOUVARDOS *et al.*, 2016a).



**Abbildung 5: Taxonomische Klassifikation der 76 Spezies im miBC**

Nach Lagkouvardos et. al (LAGKOUVARDOS *et al.*, 2016a)

Kladogramm der taxonomischen Klassifikation der 76 Spezies in der miBC Datenbank: Spezies in **Gelb** wurden von Lagkouvardos *et al.* neu beschrieben

Ein wichtiger Faktor bei der Erforschung des Darmmikrobioms ist neben der Speziesbeschreibung auch die Beschreibung der metabolischen Eigenschaften einer Spezies und wie diese auf den Organismus wirkt (CLAVEL *et al.*, 2014). Für die Familie der Muribaculaceae, einer der meistvertretenen Familien im Gastrointestinaltrakt der Maus, sind erste Beschreibungen des Metabolismus einiger zugehöriger Spezies bereits verfügbar. So beschreiben Lagkouvardos *et al.* (2019) die Familie S 24-7, die inzwischen als Muribaculaceae bezeichnet wird, als fähig, komplexe Kohlenhydrate zu verdauen. Dabei lassen sich drei verschiedene trophische Gruppen mit verschiedenen Abbaukapazitäten erkennen. Die drei Gruppen sind  $\alpha$ -Glukane, komplexe Zellwandglykane, wie Hemicellulose und Pektin, und wirtsstämmige Glykane (ORMEROD *et al.*, 2016). Lagkouvardos *et al.* konnten diese Einteilung mittels 16S-rRNA-Gensequenzen nachvollziehen und 34 ausgesuchte Genome den verschiedenen Gruppen zuteilen (LAGKOUVARDOS *et al.*, 2019).

Eine weitere Datenbank des Mausmikrobioms wurde erst kürzlich von einem Forscherteam aus China veröffentlicht (LIU *et al.*, 2020). Diese neue Datenbank enthält 126 Spezies aus 80 verschiedenen Genera, 28 Familien und 5 Stämmen. Damit ist die kultivierbare Maus-Darmmikrobiom-Datenbank von 76 auf 180 Spezies angestiegen, die wiederum zu 110 verschiedenen Genera gehören. Neben der Bereitstellung einer weiteren Datenbank hatten Liu *et al.* (2020) auch 77 neue Bakterienpezies stammend aus einem *ob/ob* C57BL/6-Stamm beschrieben (LIU *et al.*, 2020).

Neben der Beschreibung des Mikrobioms der Maus in spezifischen Bereichen hat ein koreanisch-amerikanisches Forscherteam die regionalen Unterschiede des Mikrobioms bei C57BL/6 Mäusen beschrieben. Dabei konnten die folgenden Beobachtungen gemacht werden: das Mikrobiom im Kot ist mit dem Mikrobiom im Gastrointestinaltrakt der Maus nicht zu vergleichen. Das Mikrobiom im Dünndarm unterschied sich vom Mikrobiom im Dickdarm. Bezüglich der Bakterienfamilien dominierten im Magen die Familien Muribaculaceae, Lactobacillaceae und Lachnospiraceae, im Dünndarm die Familien Muribaculaceae und Lactobacillaceae, im Dickdarm und Kot die Familien Muribaculaceae, Lachnospiraceae und Ruminococcaceae (LKHAGVA *et al.*, 2021).

## 2 Exogene Einflüsse auf das Mikrobiom

Exogene Einflüsse beschreiben Einflüsse der Umwelt auf einen Organismus. Das Mikrobiom ist stark von Umwelteinflüssen abhängig. Zu diesen Einflüssen gehören Geburt, Säugen, Haltungseinflüsse wie Gruppen- oder Einzelhaltung, Art der Haltung, d.h. konventionell oder SPF, Enrichment, wie Häuschen oder Spielzeug, Häufigkeit der Reinigung, Stress und insbesondere die Fütterung. Für C57BL/6 Mäuse in deutschen Instituten wurden derartige Einflüsse bereits ausführlich beschrieben (RAUSCH *et al.*, 2016).

### 2.1 Trächtigkeit, Geburt und erste Lebenswochen

Die Entwicklung des Mikrobioms bei Mäusen in den Tagen direkt nach der Geburt wurde 1965 von Schaedler *et al.* untersucht. Hierfür beprobte man keimfreie Mäuse, die mittels Schnittentbindung entbunden wurden. Die Neugeborenen verfügten zum Zeitpunkt der Geburt über keine kultivierbaren Mikroorganismen (SCHAEDLER *et al.*, 1965). Auch der französische Kinderarzt Henry Tissier ging davon aus, dass sich der Fötus in einer sterilen Umgebung entwickelt und die bakterielle Besiedelung erst bei der Geburt und der damit verbundenen vaginalen Passage stattfindet (TISSIER, 1900).

Inzwischen haben einige Studien versucht zu belegen, dass die bakterielle Besiedelung des Fötus bereits im Uterus beginnt. In einem Mausversuch konnten Jimenéz *et al.* einen markierten, dem Muttertier oral verabreichten *Enterococcus-faecium*-Stamm, mittels PCR in der Amnionflüssigkeit und im Mekonium nachweisen (JIMENÉZ *et al.*, 2005; JIMENÉZ *et al.*, 2008). Bei der Untersuchung von Nabelschnurblut menschlicher Neugeborener fanden sich *Enterococcus faecium*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus sanguinis* (JIMENÉZ *et al.*, 2005). Es wird zudem vermutet, dass die Zusammensetzung des mütterlichen Darmmikrobioms das bakterielle Milieu des Mekoniums Neugeborener qualitativ und quantitativ beeinflusst (JIMENÉZ *et al.*, 2008). Eine Untersuchung des plazentalen Mikrobioms beim Menschen mittels 16S-rRNA-Genanalyse zeigte, dass sich in der Plazenta ein einzigartiges Mikrobiom mit geringer Artenvielfalt befindet, welches sich aus nicht pathogenen kommensalen Bakterien der Stämme Firmicutes, Tenericutes, Proteobacteria, Bacteroidetes und Fusobacteria zusammensetzt. Bei einem Vergleich dieses Mikrobioms mit dem Mikrobiom von

Mundraum, Nasenschleimhaut, Haut, Vagina und Darm von nicht schwangeren Kohorten zeigte sich, dass das plazentale Mikrobiom dem Mikrobiom der Mundhöhle sehr ähnlich ist. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass das plazentale Mikrobiom durch hämatogene Streuung aus dem Mundraum entsteht (AAGAARD *et al.*, 2014). Fardini *et al.* wiesen in einem Mausversuch nach, dass sich hämatogen in Mäuse eingebrachte Bakterien, die aus dem Speichel und Plaque von Menschen isoliert wurden, in der Plazenta der Mäuse ansiedeln (FARDINI *et al.*, 2010). Diese hämatogene Streuung von oralem Mikrobiom in die Plazenta wurde bei schwangeren Frauen untersucht (BEARFIELD *et al.*, 2002). Auch Collado *et al.* fanden bei Untersuchungen von Amnionflüssigkeit und plazentalem Gewebe mittels 16S-rRNA-Genanalyse und qPCR ein fötales Mikrobiom. Dies ist charakterisiert durch ein geringes Bakterienreichtum und eine geringe Artenvielfalt. Es wurde von Proteobacteria dominiert und war besonders reich an einer Spezies der Familie Enterobacteriaceae. Das Mikrobiom im Mekonium dieser Neugeborenen war ähnlich aufgebaut, wie das Mikrobiom der Proben aus Plazenta und Amnionflüssigkeit (COLLADO *et al.*, 2016). Satokari *et al.* konnten die DNA von *Bifidobacterium* spp. und *Lactobacillus* spp. in menschlichen Plazentaprobe nach vaginaler Geburt oder Schnittentbindung mittels PCR nachweisen (SATOKARI *et al.*, 2009).

Einige neuere Studien widersprechen der These eines plazentalen Mikrobioms. In einer dieser Studien wurden 51 Proben von plazentalem oder fetalem Gewebe genommen und mittels qPCR, 16S-rRNA-Gensequenzierung und Kultur analysiert. In 51 Proben wurde nur eine einzige Probe von fetalem Gehirn gefunden, die bakteriell stärker besiedelt war als die Kontaminationskontrollen und korrespondierend zu einer der mütterlichen Proben war (THEIS *et al.*, 2020). Auch Kuperman *et al.* konnten in einer Untersuchung von 28 menschlichen Plazenten kein bakterielles Wachstum nachweisen. Auch die durchgeführte 16S-rRNA-Genanalyse zeigte keine Ergebnisse (KUPERMAN *et al.*, 2020).

Ob die Besiedelung mit Bakterien bereits *in utero* geschieht, bleibt also noch zu klären. Sicher ist jedoch, dass die Geburt zur bakteriellen Besiedelung des Neugeborenen beiträgt. Bei der natürlichen Geburt, der Passage durch die mütterliche Vagina, wird das Neugeborene mit der vaginalen Keimflora der Mutter inokuliert (TISSIER, 1900). Im Unterscheid zu einer natürlichen Geburt kommt das Neugeborene bei einer Schnittentbindung in Kontakt z.B. mit *Staphylococcus* spp., die sich auf der Haut der Mutter befinden (DOMINGUEZ-BELLO *et al.*, 2010).

Schaedler *et al.* konnten eine Besiedelung mit *Lactobacillus* spp., anaeroben *Streptococcus* spp. und *Flavobacterium* spp. bei Mäusen in den ersten 24 Stunden nach der Geburt nachweisen. Diese Bakterienpopulationen vermehrten sich schnell und erreichten ihre maximale Populationsgröße um den 12. Tag *post partum*. Dabei blieb die Population an *Lactobacillus* spp. und *Streptococcus* spp. auf einem konstanten Niveau. Etwa am 12. Tag *post partum* verschwanden die *Flavobacterium* spp. und der Gastrointestinaltrakt wurde durch *Enterococcus* spp. besiedelt, welche bis zum 12. Tag nur in geringen Mengen vorhanden waren. Ebenso wuchsen ab dem 10. Tag *Bacillus* spp. (SCHAEDLER *et al.*, 1965). Das vaginale Mikrobiom bei menschlichen Müttern ist in der Schwangerschaft dominiert von *Lactobacillus* spp. und verschiedenen anderen Bakterien, wie *Streptococcus* spp. und *Prevotella* spp. (NUNN *et al.*, 2021). Andere Autoren beschreiben das vaginale Mikrobiom ebenfalls mit einer Prädominanz von Lactobacillales, gefolgt von Clostridiales, Bacteroidales und Actinomycetales (AAGAARD *et al.*, 2012). Jasarevic *et al.* konnten zudem zeigen, dass sich Stress langfristig negativ auf die *Lactobacillus* spp. des vaginalen Mikrobioms von trächtigen Mäusen auswirkte (JASAREVIC *et al.*, 2015).

Einen ebenso entscheidenden Beitrag zur Entwicklung des Mikrobioms im Gastrointestinaltrakt liefert die Muttermilch. Sie besteht aus 5 bis 23 g Oligosacchariden pro Liter. Diese bestehen aus einem Laktosekern am reduzierenden Ende, verlängert mit N-Acetylglucosamin Einheiten. Strukturelle Diversität entsteht durch Fructosylierung und oder Sialylierung. Daraus ergeben sich über 200 verschiedene menschliche Milch oligosaccharide (human milk oligosaccharide, HMO; (NINONUEVO *et al.*, 2006). Warum es so viele verschiedene Oligosaccharide gibt und wie diese sich bei einzelnen Individuen verteilen ist nicht abschließend geklärt. Mögliche Faktoren sind genetische, kulturelle, diätetische und umweltbedingte Einflüsse (ZIVKOVIC *et al.*, 2011). Das Mikrobiom in der Muttermilch wird zudem von Faktoren wie Geburtsart und Übergewicht beeinflusst (CABRERA-RUBIO *et al.*, 2012). Beim Menschen ist das Kolostrum besiedelt von *Weissella* spp., *Leuconostoc* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. und *Lactococcus* spp. (CABRERA-RUBIO *et al.*, 2012), sowie *Serratia* spp. und *Corynebacterium* spp. (HUNT *et al.*, 2011). Die Muttermilch und das darin enthaltene Mikrobiom sind essentiell für das Neugeborene, da es die Inzidenz und Schwere von Infektionen

---

senkt (MARTIN *et al.*, 2005; MARTIN *et al.*, 2006), zur Reifung des Immunsystems beiträgt (DIAZ-ROPERO *et al.*, 2007) und der Entstehung von Allergien entgegenwirkt (OLIVARES *et al.*, 2005). Außerdem spielen die Bakterien aus der Muttermilch eine metabolische Rolle, indem sie beim Abbau von Proteinen und Zuckern helfen, sowie die Produktion von SCFA, wie Butyrat, steigern (GIL-CAMPOS *et al.*, 2012).

## 2.2 Haltung

Bei der Haltung von Mäusen gibt es viele variable Faktoren. Konventionelle Haltung oder SPF Haltung, Enrichment-Auswahl, Gruppenzusammensetzung sowie Handhabung. Diese Faktoren spielen für Mäuse, deren Stresslevel und Mikrobiom eine wichtige Rolle. Es ist wichtig sich vor dem Versuch zu überlegen, wie sich etwaige Haltungsarten auf den Versuch auswirken könnten.

Schaedler *et al.* stellten bereits früh fest (1962), dass sich die Haltung von Mäusen auf das Mikrobiom auswirkt. Dabei wirkte sich eine Verunreinigung des mit Sägespänen eingestreuten Käfigs, ebenso wie eine isolierte Haltung auf Drahtgittern kaum auf das Mikrobiom aus. Eine plötzliche Umstellung des Käfigs von Einzelhaltung auf Drahtgittern zu Gruppenhaltung auf Sägespänen und umgekehrt führte zu einer deutlichen Veränderung der *Lactobacillus*-spp.-Flora. Auch verändert sich die Menge an *Lactobacillus* spp., wenn die Mäuse Stress ausgesetzt wurden. Ein Rückgang der *Lactobacillus* spp. durch Stress fand innerhalb von 24 Stunden statt, die Erholungsphase des Mikrobioms nahm demgegenüber mehrere Tage in Anspruch. Zu Stressquellen in diesem Versuch wurden Veränderungen der Haltungsbedingungen wie Futterwechsel, Temperaturänderungen, Besatzdichte, sowie häufige Handhabung gezählt. Die Reduktion der *Lactobacillus* spp. durch Stress führte zu einem Anstieg gramnegativer Bakterien. Die Gabe von Antibiotika hat noch stärkere Auswirkungen auf die *Lactobacillus* spp., diese verschwanden auch bei einer sehr kurzen Anwendungszeit des Antibiotikums von nur einem Tag sofort und wurden von gramnegativen Keimen ersetzt (NELSON, 1961; SCHAEDLER *et al.*, 1965).

Rausch *et al.* konnten feststellen, dass die Haltungsart einen Einfluss auf Speziesverteilung, Speziesreichtum und phylogenetische Vielfalt des Mikrobioms hat. Untersuchte Parameter in dieser Arbeit waren Labormausanbieter, Ankunftszeitpunkt, Anzahl der vergangenen Generationen, Futterhersteller und Futterbehandlung, Käfigsystem, Häufigkeit des Einstreuwechsels und Hersteller der Einstreu, Enrichment, die Anwesenheit anderer Mausstämmen in der Haltung, die Anzahl der Tierpfleger, Zugang zur Haltung, Luftfeuchtigkeit, Temperatur und Gewichtszunahmen. Futterbehandlung und Haltungsbedingungen beeinflussten den Artenreichtum, die Gleichmäßigkeit und phylogenetische Diversität des Mikrobioms am stärksten. Konventionelle Haltung führte zu einem Rückgang der Speziesdiversität.

Das Alter der Tiere war positiv korreliert mit der Speziesanzahl und der phylogenetischen Diversität der Tiere. Es fanden sich Unterschiede in der  $\beta$ -Diversität zwischen Forschungseinrichtungen und Haltungsbedingungen. Konventionelle Haltung, die Anwesenheit von anderen Mausstämmen und uneingeschränkter Zugang zu den Haltungsräumen schien die individuelle Variation des Mikrobioms zu steigern. Außerdem haben Futterhersteller und Futterbehandlung einen starken Einfluss auf das Mikrobiom (RAUSCH *et al.*, 2016).

### 2.3 Einfluss des Futters auf das Mikrobiom

Der Einfluss von verschiedenen Konfektionierungen einer Labormausdiät auf das Mikrobiom wurde bereits beschrieben (DESMARCHELIER *et al.*, 2013). Dabei wurden Mäusen verschiedene Diäten (Kontrolle, *high-fat*, *Western-style*) in pelletierter oder gemahlener Form angeboten. Die verschiedenen Zubereitungsformen hatten Einfluss auf die Gewichtsentwicklung der Mäuse (DESMARCHELIER *et al.*, 2013). In einer Nachstellung des Versuchs von Desmarchelier wurde die Auswirkung der Futter auf das Mikrobiom mittels 16S-rRNA-Gensequenzierung bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass die Fütterung einer *high-fat*-Diät zu einem Absinken von Ruminococcaceae und einem Anstieg von Rikenellaceae im Caecum führte. Daneben wurden *Lactobacillus* spp. in höherer Anzahl in den Proben der Tiere mit *high-fat*-Diät gefunden (DANIEL *et al.*, 2014). Außerdem konnte in diesem Versuch festgestellt werden, dass auch die Fütterung verschiedener Konfektionierungen einen Effekt auf das Mikrobiom hatte. Es konnte eine Verringerung von Firmicutes durch ein Absinken von Lachnospiraceae und Ruminococcaceae festgestellt werden, sowie ein Anstieg des Genus *Akkermansia* (CLAVEL *et al.*, 2014).

### 2.3.1 Ballaststoffe

Ballaststoffe sind unlösliche und lösliche Kohlenhydrate wie Zellulose, Lignin und nicht-Stärke-Polysaccharide wie Hemizellulose, Pektin und Arabinoxylan Oligosaccharide. Außerdem gehören zu den Ballaststoffen die nicht verdaulichen Oligosaccharide wie Inulin und Oligofruktose, sowie resistente Stärke (FRY, 2004).

Ballaststoffe sind essbare Pflanzenteile, die resistent gegen eine Verdauung und Absorption im Dünndarm sind. Diese pflanzlichen Kohlenhydrate lassen sich in zwei Gruppen aufteilen. Die erste Gruppe ist durch enzymatische Reaktionen leicht hydrolysierbar und kann im Dünndarm absorbiert werden. Zu dieser Gruppe gehören Stärke, Einfachzucker und Fruktane. Die zweite Gruppe besteht aus Kohlenhydraten, die verdauungsresistent sind und die durch bakterielle Fermentation im Dickdarm verdaut werden müssen. Hierzu gehören Zellulose, Hemizellulose, Lignin, Pektin und beta-Glukane. Diese letzte Gruppe wird auch Nicht-Stärke-Polysaccharide (NSP) genannt (LATTIMER & HAUB, 2010).

Die NSP können in eine lösliche und eine unlösliche Gruppe eingeteilt werden. Dabei bilden lösliche NSP, die in Wasser aufgelöst werden, ein dickflüssiges Gel. Sie werden nicht im Dünndarm verdaut, sind aber leicht verdaulich für die bakterielle Flora im Dickdarm. Zu diesen NSP gehören Pektine, Gummi, Inulintyp Fruktane und einige Hemizellulosen. Die nicht löslichen NSP sind entsprechend ihres Namens nicht in Wasser löslich und bilden auch keine Gele. Auch ihre bakterielle Fermentation ist begrenzt. Zu den nicht löslichen NSP gehören Lignin, Zellulose und einige Hemizellulosen (LATTIMER & HAUB, 2010).

Verdauungsresistente Ballaststoffe führen zu einer erhöhten Viskosität und Ansammlung von Chymus im Darm (LATTIMER & HAUB, 2010). Außerdem werden die Ballaststoffe durch Bakterien im Dickdarm zu SCFA fermentiert. Diese SCFA sind die Hauptenergiequelle für Kolonozyten (MACFARLANE & GIBSON, 1997). Ein Mangel an Ballaststoffen wird von den Darmbakterien durch die Verdauung der Glykoproteine in der Schleimschicht der Darmzellen ausgeglichen, dies führt zu einer vermehrten Pathogenanfälligkeit des Darmes (DESAI *et al.*, 2016).

In Ernährungsversuchen bei Menschen konnte nachgewiesen werden, dass eine Verringerung der Kohlenhydratmenge bei übergewichtigen Erwachsenen zu einem Absinken von *Roseburia* spp. und *Eubacterium rectale* im Darm führte (DUNCAN

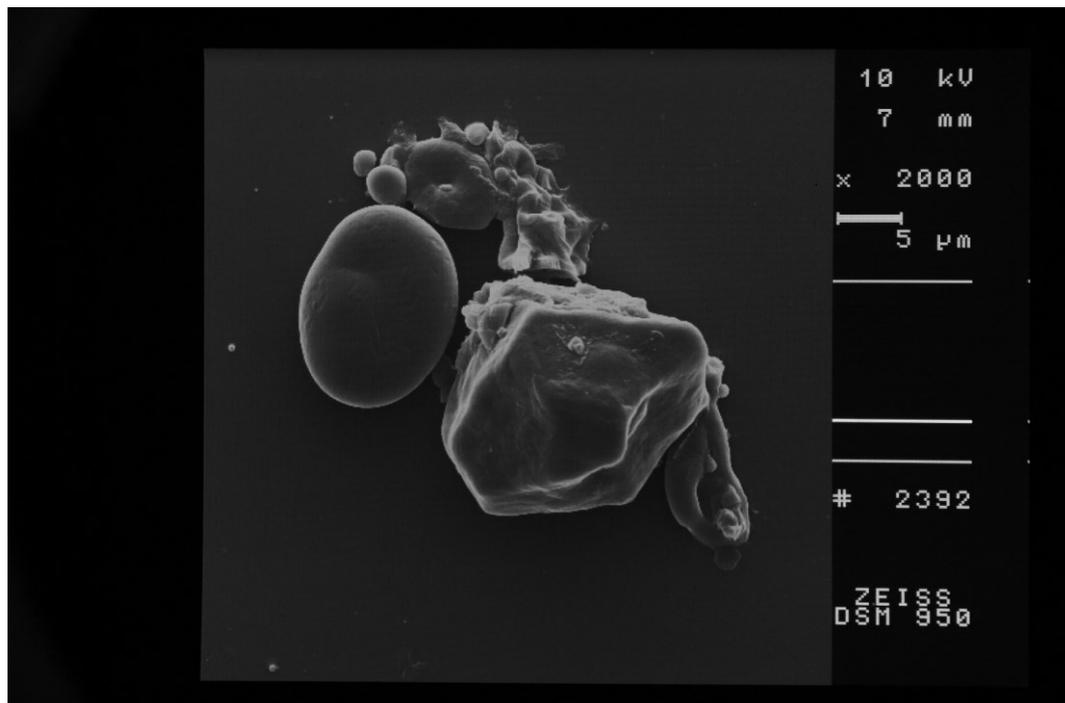
*et al.*, 2007). Eine Supplementierung von RS führte zu einem Anstieg von *Ruminococcus* spp. und *Eubacterium rectale* (WALKER *et al.*, 2011). Ähnliche Beobachtungen wie die von Duncan *et al.* gab es bei einem weiteren Versuch mit übergewichtigen Testpersonen und einer erniedrigten Kohlenhydrataufnahme. Bei diesem Versuch war eine zusätzliche Reduktion von *Bacteroides* spp. zu beobachten (RUSSELL *et al.*, 2011).

Nichtverdauliche Ballaststoffe, die sich positiv auf eine bestimmte Anzahl an Darmbakterien auswirken werden Präbiotika genannt. Präbiotika sind definiert als Nährstoffe, die den Enzymen im Magen widerstehen und nicht durch Enzyme im Darmtrakt hydrolysiert werden. Sie können zudem nicht vom Darm aufgenommen werden. Diese Nährstoffe werden von den gastrointestinalen Mikrobiota fermentiert. Die Fermentation durch bestimmte Bakterienarten führt zum Wachstum dieser Arten und einem vermehrt positiven Effekt dieser Bakterien auf die Gesundheit des Wirtes (GIBSON *et al.*, 2004).

Ein präbiotischer Effekt von Oligofruktose wurde mit einem Anstieg der *Bifidobacterium* spp. in Verbindung gebracht (KLEESSEN *et al.*, 2001). Die Gabe von Inulin zeigte in verschiedenen Versuchen keinen Effekt bei *Bifidobacterium* spp., führte aber zu einem Anstieg der SCFA-Konzentrationen (KLEESSEN *et al.*, 2001); demgegenüber konnten andere Versuche einen Effekt von Inulin auf *Bifidobacterium* spp. feststellen (DJOUZI & ANDRIEUX, 1997; COSTABILE *et al.*, 2010). Weitere Versuch mit Inulin stellten einen Anstieg von *Roseburia intestinalis*, *Eubacterium rectale* und *Anaerostipes caecae* fest (VAN DEN ABBEELE *et al.*, 2011). Die Verabreichung von Arabinoxylan führte zu einem Anstieg von *Bifidobacterium longum*. Die Gabe beider Präbiotika, Inulin und Arabinoxylan, zusammen führten zu einer Reduktion von *Akkermansia muciniphila* (VAN DEN ABBEELE *et al.*, 2011).

### 2.3.2 Stärke und resistente Stärke

Stärke ist das Hauptlagerungskohlenhydrat der Pflanzen und steuert 50 – 70 % der Energie in der menschlichen Ernährung bei. Es ist eine der Hauptglukosequellen der Nahrung und damit wichtig für die Energieversorgung von Gehirn und Blutzellen. Form und Funktion von Stärke ändern sich zwischen verschiedenen botanischen Spezies und sogar innerhalb derselben Pflanze, wenn diese in unterschiedlichen Umgebungen kultiviert wurden. Stärke wird als unlösliches, semikristallines Korn in den Speichergeweben von Pflanzen eingelagert (COPELAND *et al.*, 2009).

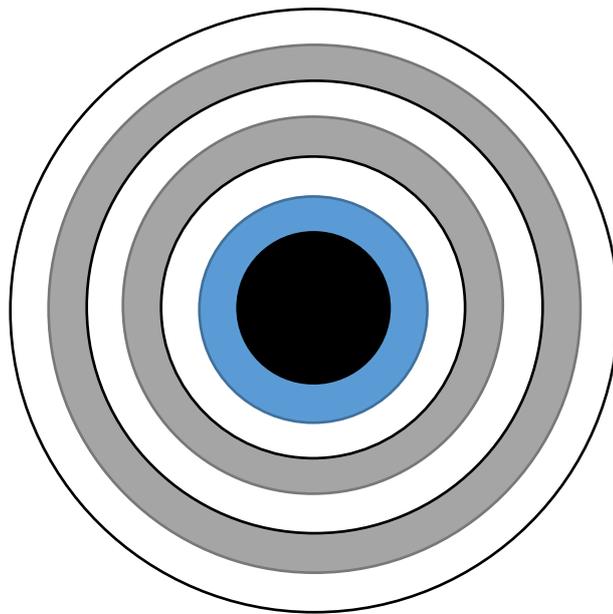


**Abbildung 6: Vergleich von Stärke verschiedener Pflanzenspezies**

**Rechts:** Maisstärke; **Links:** Weizenstärke in einem pelletierten Mausfutter (Haltungsdiät für Ratten und Mäuse, 10-mm Pellets, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) im Rasterelektronenmikroskop, 2000-fache Vergrößerung.

Stärke besteht aus zwei Glukose-Homopolymeren: Amylose, die unverzweigte Form, deren Glukoseeinheiten mittels  $\alpha$ -1,4-glykosidischen Bindungen verbunden sind und Amylopektin, die verzweigte Form, deren Glukosemoleküle mittels  $\alpha$ -1,6-glykosidischen und  $\alpha$ -1,4-glykosidischen Bindungen im Verhältnis 1:30 verbunden sind (BERG *et al.*, 2015). Das Verhältnis zwischen Amylose und Amylopektin verändert sich zwischen verschiedenen Pflanzenspezies. Ebenso verändert sich die Organisation der beiden Glukose-Homopolymere im Korn, und damit die Größe,

Form und die Eigenschaften des Stärkekorns (WANG & COPELAND, 2013) (Abbildung 6). Das Stärkekorn besitzt durch die strahlenförmige Ausrichtung von Amylose und Amylopektin eine semikristalline Form. Dabei sind die Ketten von Amylose und Amylopektin durch Wasserstoffbrückenbindungen verbunden und formen viele konzentrische Schichten, die als Wachstumsringe bezeichnet werden. Die Wachstumsringe reichen vom Hilum, dem Wachstumszentrum, zur Oberfläche des Stärkekorns (PARADA & AGUILERA, 2011). Sie haben eine Dicke von 120 - 400 nm und bestehen abwechselnd aus kristallinen und amorphen Regionen mit jeweils höherer oder geringerer Dichte. Dabei werden die kristallinen Lagen vorrangig durch Amylopektinketten geformt, die amorphen Lagen durch die Amylopektinverzweigungen und Amylose- und Amylopektinmoleküle in ungeordneter Formierung (COPELAND *et al.*, 2009) (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Stärkekorns**

Modifiziert nach Wang & Copeland *et al.* (WANG & COPELAND, 2013)

schwarz: Hilus

blau: Größtenteils amorphe Region aus Amylose und ungeordneten Amylopektinenden

grau: Amorphe Lagen

weiß: Kristalline Lagen

Stärke wird im Verdauungstrakt durch Amylasen aufgeschlossen und wird anschließend als Glukose im Dünndarm resorbiert. Dabei lässt sich Stärke unterteilen in eine schnell verdauliche Stärke (*rapid digestible starch*, RDS), welche durch enzymatische Verdauung innerhalb von 20 Minuten zu Glukose aufgeschlossen werden kann und in eine langsam verdauliche Stärke (*slowly digestible starch*, SDS), welche durch enzymatische Verdauung langsamer verdaut wird (BERRY, 1986).

Allerdings ist manche Form der Stärke nicht durch Verdauungsenzyme aufschließbar. Diesen nicht verdaulichen Teil der Stärke bezeichnet man als resistente Stärke (RS). RS ist *in vitro* nicht durch Verdauungsenzyme nach 120-minütiger Inkubation aufschließbar und passiert *in vivo* den Dünndarm unverändert. Im Dickdarm wird die resistente Stärke durch das Darmmikrobiom fermentiert (SAJILATA *et al.*, 2006). Resistente Stärke lässt sich in vier Fraktionen unterteilen: RS<sub>1</sub>, RS<sub>2</sub>, RS<sub>3</sub> und RS<sub>4</sub>. RS<sub>1</sub> ist resistent gegen enzymatische Verdauung durch seine physikalisch unzugängliche Form z.B. durch Einschluss in Körnern oder Samen. RS<sub>2</sub> kann auf Grund ihrer Anordnung nicht von den Enzymen des Gastrointestinaltraktes angegriffen werden. RS<sub>3</sub> ist meist retrogradierte Amylose, die während dem Abkühlen von aufgeschlossener Stärke entsteht und RS<sub>4</sub> ist chemisch modifizierte Stärke (SAJILATA *et al.*, 2006). Durch die unveränderte Dünndarmpassage und anschließende Fermentation durch Darmbakterien besitzt RS präbiotische Eigenschaften (GIBSON *et al.*, 2004).

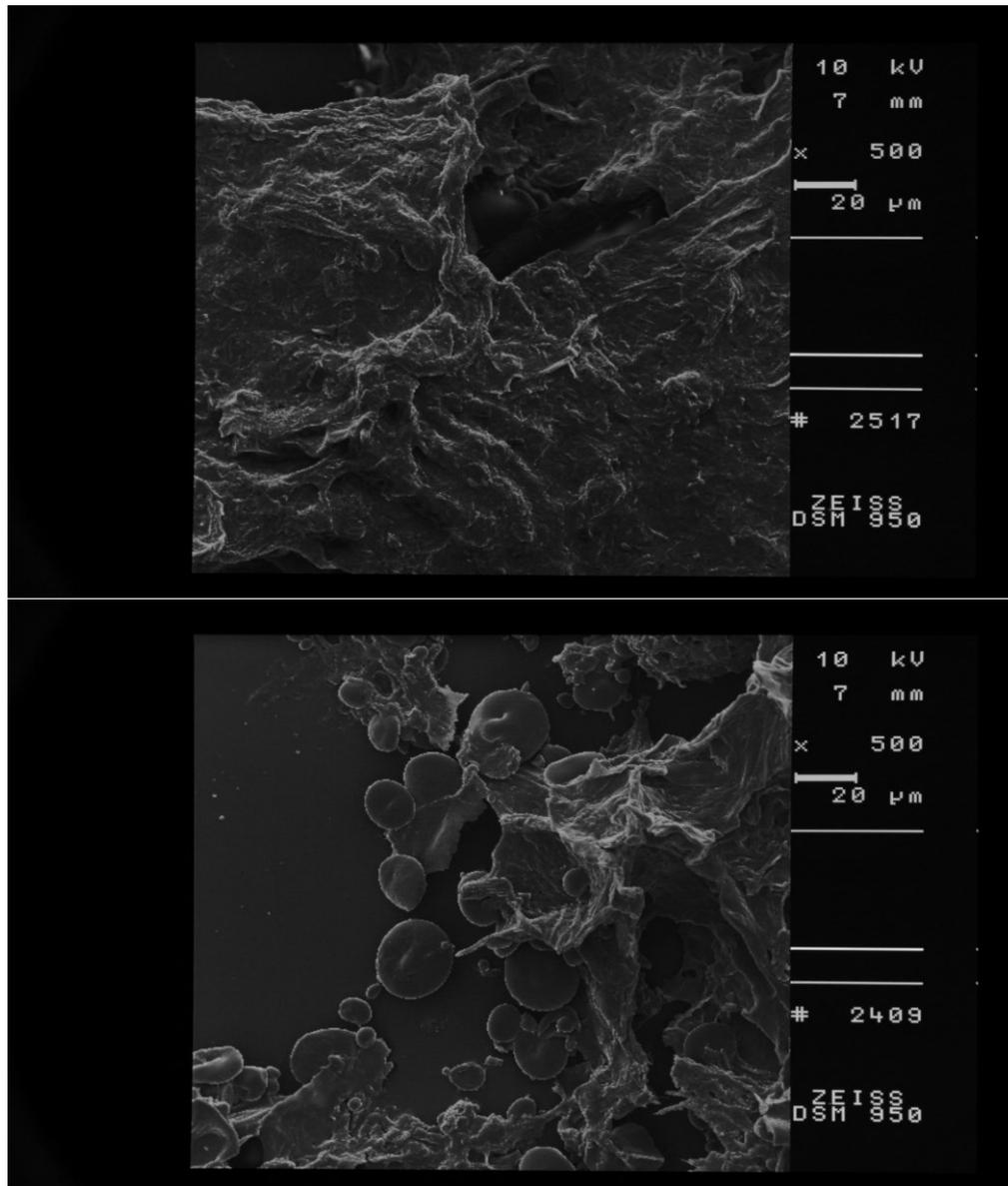
Die Gabe von Isotopenmarkierter Stärke an Mäuse lässt den anschließenden Nachweis des Isotops in der 16S-rRNA von Bakterien zu. Die Isotopenmarkierung und der Isotopennachweis erlauben den Rückschluss, dass diese Bakterien aktiv in der Verwertung von Stärke involviert sind. Bei der Fütterung Isotopenmarkierter Stärke zeigte sich ein signifikanter Anstieg von unklassifizierbaren Clostridiales und *Dorea* spp., sowie eine Zunahme von *Bacteroides* spp. und *Turicibacter* spp. bei Mäusen (HERRMANN *et al.*, 2018). In einem weiteren Mausversuch mit Maisstärke (RS<sub>2</sub>) zeigte sich bei höheren Anteilen RS ein Anstieg von Bacteroidetes, *Bifidobacterium* spp., *Akkermansia* spp. und *Allobaculum* spp. (TACHON *et al.*, 2013). Beim Schwein führte RS zu einer Erhöhung der molekularen Spezies *Turicibacter* spp., *Blautia* spp., *Ruminococcus* spp., *Coprococcus* spp., *Marvinbryantia* spp. und *Ruminococcus bromii* und zu einem Rückgang der molekularen Spezies *Clostridium* spp., *Treponema* spp., *Oscillospira* spp. und der S 24-7 Familie (SUN

*et al.*, 2015). In einem weiteren Versuch mit Schweinen führte die Fütterung RS zu einer Zunahme von Lachnospiraceae und *Ruminococcus* spp. (UMU *et al.*, 2015). Bei Ratten konnte bei der Fütterung von RS ein Anstieg von Bacteroidetes, Actinobacteria und ein Abfall von Firmicutes festgestellt werden. Dabei führte die resistente Stärke (RS<sub>2</sub>) zu einer Erhöhung von molekularen Spezies der Familien Porphyromonadaceae, *Bifidobacterium* spp. und einer Verringerung von Clostridiaceae (YOUNG *et al.*, 2012). Beim Menschen führt die Supplementierung mit RS<sub>3</sub> zu einem vermehrten Wachstum von *Lactobacillus* spp. und *Bifidobacterium* spp. (SILVI *et al.*, 1999). Dieses Ergebnis wurde zuvor schon von Kleessen *et al.* beobachtet (KLEESSEN *et al.*, 1997). RS<sub>2</sub> führte in diesem Versuch zu einer Zunahme von *Ruminococcus bromii* und *Eubacterium rectale*. RS<sub>4</sub> führte dagegen zu einer Erhöhung von *Bifidobacterium adolescentis* und *Parabacteroides distasonis* (MARTINEZ *et al.*, 2010). In einem weiteren Versuch beim Menschen führte RS<sub>3</sub> zu einem Anstieg von *Ruminococcus bromii* und *Eubacterium rectale* (WALKER *et al.*, 2011). Verschiedene Arten von RS scheinen unterschiedliche Effekte zu haben.

### 2.3.2.1 Stärkegelatinisierung

Bei der Stärkegelatinisierung schwellen die Stärkekörner an und verlieren ihre kristalline und molekulare Organisation. Erhitzt man Stärke bei Wasserüberschuss, führt dies zu einer irreversiblen Veränderung des Stärkekorns (WANG & COPELAND, 2013). Der erste Schritt in diesem Prozess ist die Aufnahme von Wasser durch die amorphen Wachstumsringe und deren schnelle Größenzunahme. Dieses Wachstum geht mit einer Zerstörung der kristallinen Regionen im Stärkekorn einher. Die Wasserstoffbrücken im Stärkekorn lösen sich und es kommt zu einer veränderten Organisation der Amylose- und Amylopektinketten. Dies führt zu einer Veränderung der Eigenschaften der Stärke. Die gekoppelten semikristallinen Lamellen werden zerstört, was zu einer verringerten Kristallinität im Stärkekorn führt. Es kommt zum Verlust der Doppelbrechung des Korns unter dem Lichtmikroskop (WAIGH *et al.*, 2000). Beim anschließenden Anschwellen des Stärkekorns kommt es unter ständigem Mischen zu einer Steigerung der Viskosität (WANG & COPELAND, 2013). Diese nun entstandene Struktur ist besser zugänglich für Verdauungsenzyme und dementsprechend besser verdaulich (TESTER *et al.*, 2004). Extrusion, eine Verarbeitungsmethode, bei der das Wasser in Form von Wasserdampf verfügbar ist und hohe Scherkräfte und Druck auftreten, führt nur zu einer teilweisen Hydrolyse der Stärke (LAI & KOKINI, 1991). In der Futtermittelherstellung wird dieser Prozess auch Dextrinisierung genannt. Es kommt zu einem Absinken des molekularen Gewichts von Amylose um den Faktor 1,5 und Amylopektin um den Faktor 15 (COLONNA *et al.*, 1984).

Beim Abkühlen und der Lagerung nach dem Gelatinisieren können Amylose und Amylopektin wieder geordnete Strukturen ausbilden. Diesen Prozess nennt man Retrogradierung. Bei der Retrogradierung entstehen erhebliche Veränderungen, wie ein Anstieg der Viskosität, Trübung, Verfestigung des Gels und die Phasentrennung zwischen Polymer und Wasser. Diese Veränderungen beeinflussen die Qualität und den Nährwert von stärkereichen Futtermitteln (WANG & COPELAND, 2013). Die Retrogradierung von Amylose vollzieht sich im Bereich von Minuten, wohingegen Amylopektin Stunden oder Tage braucht (WANG & COPELAND, 2013). Diese Rekristallisierung führt zu einer schlechteren Verdaulichkeit, da die Struktur für Verdauungsenzyme schlechter zugänglich ist (PARADA & AGUILERA, 2011).



**Abbildung 8: Vergleich pelletiertes und extrudiertes Mausfutter im Rasterelektronenmikroskop**

**Oben:** Extrudiertes Futter (Haltungsdiät für Ratten und Mäuse, Extrudat, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage), kaum einzelne Stärkekörner auszumachen, Struktur homogen verschmolzen;

**Unten:** Pelletiertes Futter (Haltungsdiät für Ratten und Mäuse, 10-mm Pellets, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage), einzelne Stärkekörner gut abgrenzbar, viele Stärkekörner sichtbar, Struktur inhomogen.

Der Effekt gelatinisierter Weizenstärke wurde von Do *et al.* bei Mäusen beschrieben. In dem Versuch wurde ein Futter mit Weizenstärke und ein Futter mit gelatinisierter Weizenstärke verfüttert. Die Fütterung von Weizenstärke führte zu einer signifikanten Erhöhung des Körpergewichts, zu vermehrtem weißem Fettgewebe und einer erhöhten Darmpermeabilität. Zudem trat bei Mäusen dieser Gruppe ein erhöhter Cholesterinspiegel und Fetteinlagerungen in der Leber auf, eine Vorstufe der nichtalkoholischen Fettleber. Bei den Mäusen, die gelatinisierte Weizenstärke verfüttert bekamen, kam es nicht zu einem Anstieg des Körpergewichts, auch konnte kein vermehrtes weißes Fettgewebe festgestellt werden. Jedoch fand man, wie bei den Mäusen mit weizenstärkehaltigem Futter, eine erhöhte Darmpermeabilität. Die gelatinisierte Stärke führte nicht zu erhöhten Cholesterinwerten, es konnte aber eine geringgradige Fettablagerung in der Leber beobachtet werden. Im Hinblick auf das Mikrobiom führte eine Fütterung des weizenstärkehaltigen Futters zu einem Anstieg an *Desulfovibrio* spp., *Faecalibaculum* spp., *Rombutsia* spp. und *Lactobacillus* spp. Es wurde gleichzeitig ein Rückgang von *Alistipes* spp. und *Muribaculum* spp. festgestellt. Bei der gelatinisierten Weizenstärke kam es zu einer Erhöhung von *Faecalibaculum* spp., *Muribaculum* spp. und *Bacteroides* spp., sowie zu einer Reduktion von *Lactobacillus* spp. und *Desulfovibrio* spp. (DO *et al.*, 2020).

### **3 Arten der Mikrobiomanalyse**

Die Mikrobiomanalyse hat sich mit den technischen Entwicklungen, insbesondere im Bereich der Sequenzierung weiterentwickelt. Ebenso stehen noch heute die technisch weniger aufwendigen Methoden, wie z.B. die kulturelle Anzucht, im Interesse der Wissenschaft. In diesem Kapitel wird auf die Entwicklung der Mikrobiomanalyse bis zum heutigen Stand eingegangen.

#### **3.1 Kulturelle Anzucht und Zellmorphologie**

Die kulturelle Anzucht beschreibt die Anzucht von Bakterien auf einem Agar oder in einer Flüssigkultur. Dabei können verschiedene Nährmedien, sowie Antibiotika oder Antimykotika zugegeben werden. Im Anschluss lassen sich die so gewonnenen Kulturen morphologisch auf der Agarplatte und unter dem Mikroskop beurteilen bzw. mittels Färbung oder biochemischen Reaktionen unterscheiden.

Erste Untersuchungen zum Mikrobiom wurden in den 1950er Jahren am Rockefeller Institut gemacht. Auf Grund limitierter Möglichkeiten beschränkte sich die Forschung zunächst auf die Anzucht der Bakterien auf verschiedenen Agarplatten und der anschließenden phänotypischen Beurteilung der Kulturen. Man begann mit der genaueren Analyse des Mikrobioms, nachdem man bei der Etablierung eines SPF-Mausstammes feststellte, dass die SPF-Tiere schneller an Gewicht zunahmen, anfälliger gegenüber experimentellen Infektionen waren, sowie resistenter gegenüber dem tödlichen Effekt von Endotoxinen als konventionelle Mäuse waren (DUBOS & SCHAEDLER, 1960).

Aufgrund von methodischen Fortschritten, wie der Entwicklung anaerober Anzuchtverfahren (HUNGATE, 1950; MOORE, 1966) und der zuvor gelungenen Anzucht von SPF-Tieren, war es Gordon und Dubos in den 1970er Jahren möglich, Caecumproben von SPF-Mäusen unter strikt anaeroben Bedingungen zu sammeln und diese anaerob auf Agarplatten zu kultivieren. Zur genaueren Analyse wurden die Proben in ein anaerobes Labor gesendet, wo sie mittels biochemischen und morphologischen Eigenschaften einem Genus und einer Spezies zugeordnet wurden (GORDON & DUBOS, 1970).

Harris *et al.* führten eine Zählung und Identifikation der prädominanten anaeroben Genera von Labormäusen durch. Das Kolon wurde steril entnommen, der Inhalt herausgedrückt und gewogen. Direkte mikroskopische Zählungen wurden aus einer 1000-fachen Verdünnung nach Holdeman und Moore (MOORE *et al.*, 1969) angefertigt. Die Proben wurden mittels verschiedener kultureller Methoden angezüchtet. Die Identifikation und Zuordnung zu Gattungen basierte auf Gramreaktion, Morphologie, Motilität, Sauerstofftoleranz und metabolischen Endprodukten. Vorläufig identifizierte Genera waren *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus* und *Propionibacterium* (HARRIS *et al.*, 1976).

Auch heute sind die kulturelle Anzucht und anschließende mikroskopische und biochemische Analyse von Darmbakterien ein wichtiger Bestandteil bei der Identifikation und Spezieszuordnung. Die Identifikation des Organismus erfolgt hierbei mittels Zellmorphologie im Mikroskop, enzymatischen Tests, zellulären Fettsäuren, Diaminopimelinsäure, automatisierter Ribotypisierung und Massenspektrometrieanalyse mittels MALDI-TOF (CLAVEL *et al.*, 2009; LAGKOUVARDOS *et al.*, 2016a).

### 3.2 Next-Generation Sequencing

Next-Generation Sequencing oder Sequenzierung der zweiten Generation beschreibt eine Technik des Sequenzierens, bei der einzelne geklonte DNA-Vorlagen generiert werden und mittels Mikrofluiden sequenziert werden. Die Sequenzierungsreaktionen finden in Zyklen von Basenadditionen und Bildgebung mittels Chemolumineszenz, Fluoreszenz oder pH-Wert-Änderungen statt (MCGINN & GUT, 2013).

Die technische Entwicklung der Sequenzierung begann in den 1960er Jahren mit den Arbeiten von Fred Sanger. Zu Beginn des Projekts arbeiteten Sanger und seine Kollegen mit einem generellen Ansatz der Sequenzierung, der sog. Puzzle-Methode. Dabei werden große DNA-Moleküle in kleinere Teile gespalten, analysiert und im Anschluss wieder zusammengesetzt. Anhand der Zusammensetzung der Nukleinsäure aus nur vier Basen (Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin) entwickelten die Forscher eine Methode, bei der sie das Verhalten der Basen während der Auftrennung identifizierten und eine DNA-Polymerase für den Kopiervorgang nutzten. Dies führte zur Entwicklung der Didesoxymethode nach Sanger (SANGER *et al.*, 1977). Ein weiterer Durchbruch war die Nutzung der Ionophorese, bei der DNA-Fragmente nach der Größe aufgetrennt werden (SANGER & COULSON, 1978). Ein Problem dieser Methode war jedoch, dass sie ausschließlich für einsträngige DNA verwendet werden konnte (SANGER, 2001).

Ende der 1970er Jahre entwickelten die Forscher Gronenborn und Messing eine Methode bei der DNA-Fragmente in einer ssDNA Bakteriophage geklont und sequenziert wurden. Diese Technik löste das Problem der Forschungsgruppe von Sanger und bot den zusätzlichen Vorteil, dass die DNA-Fragmente nicht mehr aufgetrennt werden mussten, da dies durch die Isolation purer Klone möglich war (GRONENBORN & MESSING, 1978).

Zunächst wurde auf Grund der ihrer geringen Größe mit der DNA von Bakteriophagen gearbeitet, bis sich die Forscher um Sanger an die Analyse der mitochondrialen DNA des Menschen wagten. Dies stellte den ersten Schritt im Human Genom Projekt dar (ANDERSON *et al.*, 1981; SANGER, 2001). Diese Sequenzierungstechnik verblieb für die nächsten 30 Jahre der Goldstandard. Technische Errungen-

schaften und Weiterentwicklungen entstanden ab 1990 im Rahmen des Human Genome Projekts. Dies leitete die Entwicklung der Next-Generation Sequenzierung ein. Hierbei war das Ziel, die Zeit, den Aufwand und die Kosten der Whole-Genome Sequenzierung zu minimieren (MCGINN & GUT, 2013).

Die Erfindung der PCR und automatisierten DNA-Sequenzierung in den 1980er Jahren ermöglichte es zudem, eine große Menge an Sequenzdaten zu verschiedenen Genen zu sammeln und dabei neue Genera und Spezies zu definieren, Spezies zu reklassifizieren und nicht kultivierbare Bakterien zu bestimmen (WOO *et al.*, 2008).

### 3.3 Next-Generation Sequencing von Illumina

Die Proben in dieser Arbeit wurden mit dem Illumina MiSeq sequenziert (Abbildung 9), weshalb hier nur auf die von Illumina verwendete Solexa-Technologie eingegangen wird.

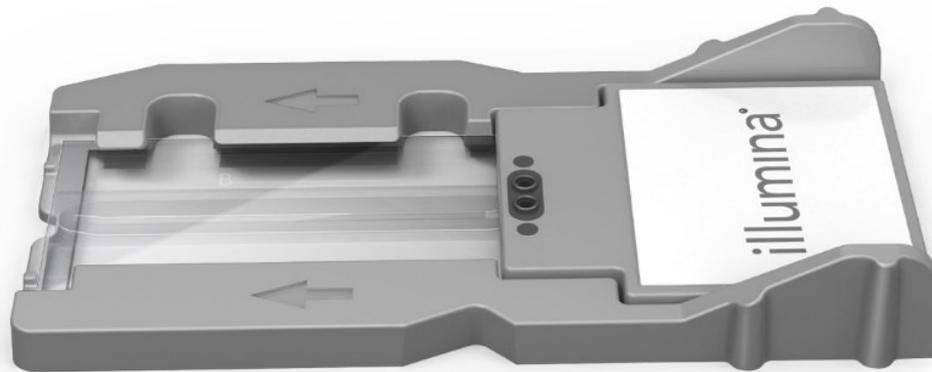


**Abbildung 9: Illumina MiSeqDx (ILLUMINA INC., 2021a)**

Bei der Solexa-Technologie von Illumina werden zwei neu entwickelte Technologien verwendet, die *clonal single molecule array*<sup>TM</sup> - Technologie und die *DNA sequencing by synthesis* Technologie (MÜLHARDT, 2013). Die Erklärung der Illumina *Sequencing by Synthesis* Technologie der folgenden Unterkapitel wurde dem Illumina Inc. Trainingsvideo „Sequencing: Introduction to Sequencing by Synthesis (SBS)“ entnommen (ILLUMINA INC., 2021b).

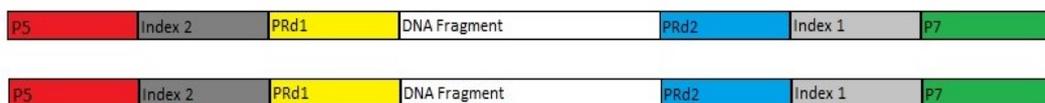
### 3.3.1 Vorbereitung der Sequenzierbibliothek

Bei der SBS-Technologie wird die DNA in Fragmente einer zuvor bestimmten Größe gespalten. Es werden zwei verschiedene DNA-Adapter zugegeben, bestehend aus einer P5- und einer P7-Sequenz, die es den „Library“-Strängen erlaubt, an den DNA-Sequenzen der Fließzelle (DNA-FZ) zu binden. Die Fließzelle ist ein Glasobjektträger mit Flüssigkeitskanälen, in denen sich die Sequenzierungschemie befindet (Abbildung 10).



**Abbildung 10: MiSeq Fließzelle (ILLUMINA INC., 2021a)**

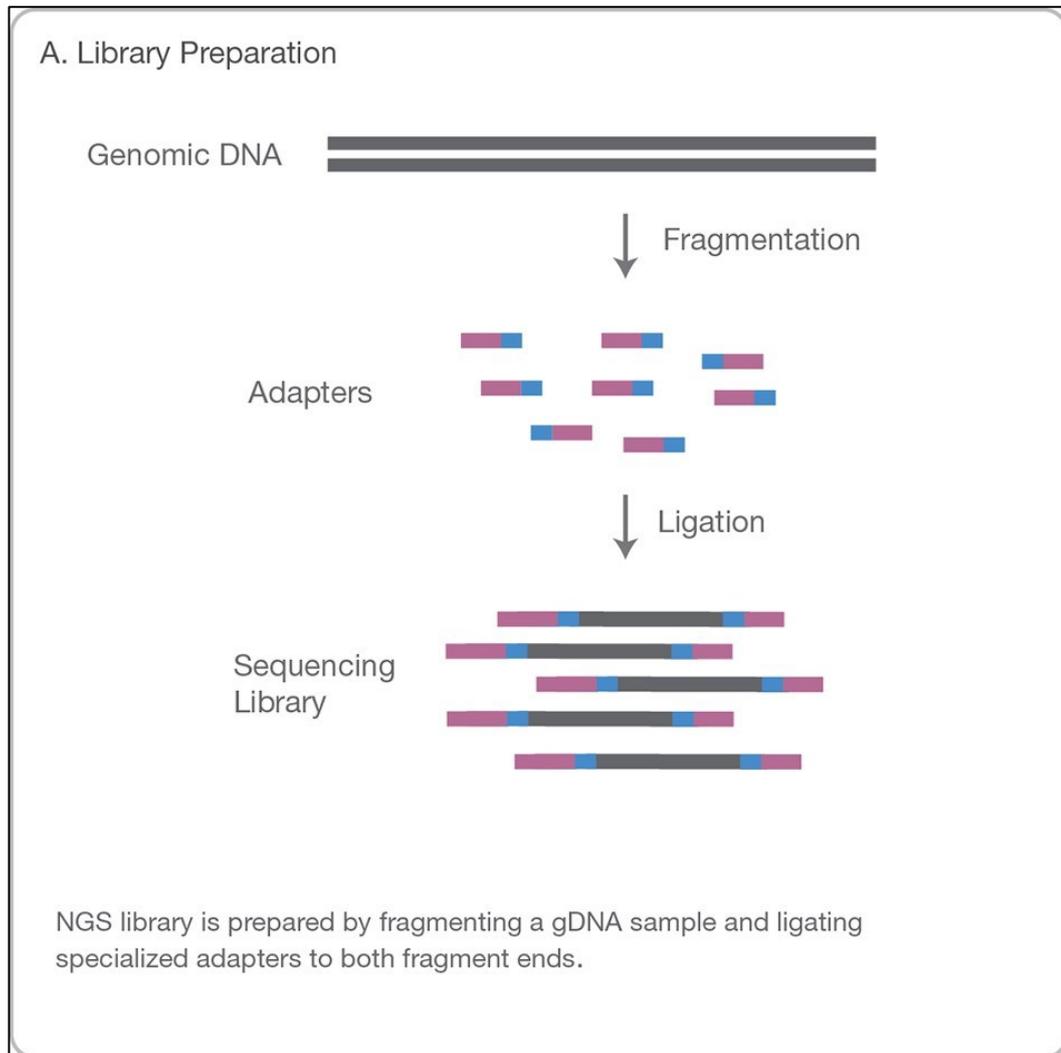
Des Weiteren werden Bindungssequenzen für die Primer von Read 1 und Read 2, sowie Indexsequenzen (Index 1 und Index 2) hinzugefügt. Die Indexsequenzen erlauben die Identifikation einer Probe bei der multiplexen Sequenzierung verschiedener Proben (Abbildung 11) (ILLUMINA INC., 2020).



**Abbildung 11: Library Fragment mit Dual Index**

Nach Illumina Inc. „Illumina adapter portfolio“ (ILLUMINA INC., 2020)  
PRd1: Primer Read 1, PRd2: Primer Read 2

Die DNA-Adapter binden in einem als Ligation bezeichneten Prozess an die beiden Enden der DNA-Einzelstränge. Die DNA-Einzelstränge mit gebundenen DNA-Adaptoren werden als „Library“ bezeichnet. Vor Auftragen auf die Fließzelle wird die Library mittels qPCR quantifiziert, um eine optimale Anzahl an Clustern zu erreichen (Abbildung 12) (ILLUMINA INC., 2021b).

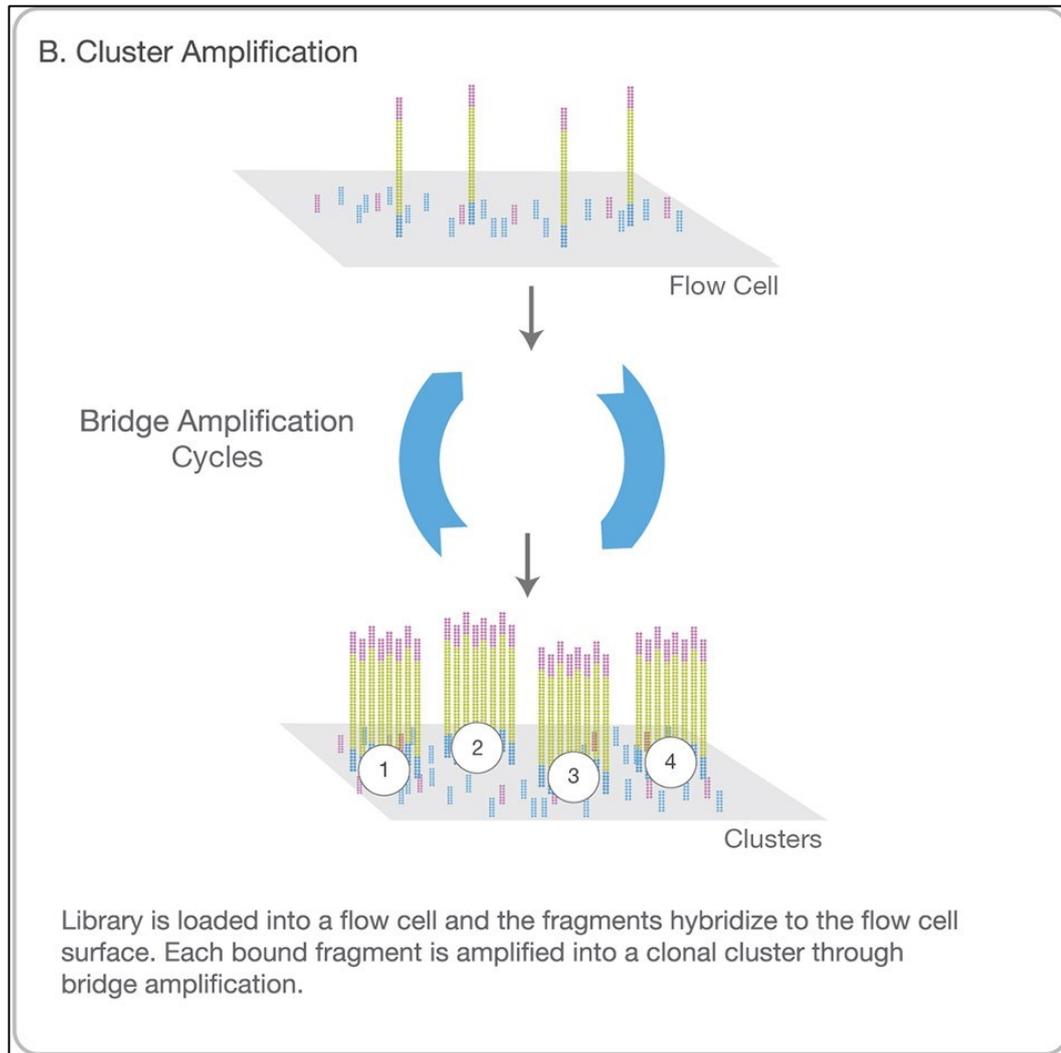


**Abbildung 12: Illumina NGS: *Library Preparation***

Aus der Anleitung zur Next-Generation Sequencing von Illumina Inc. (ILLUMINA INC., 2017).

### 3.3.2 Cluster Generierung

Im Anschluss wird die Library auf eine Sequenzierungsplatte, die sogenannten Fließzelle aufgetragen. Dabei ist die Clusterverteilung bei der Illumina MiSeq zufällig. Auf der Fließzelle sind zwei verschiedene DNA-Sequenzen (DNA-FZ) fixiert, die komplementär zu den zuvor zugegebenen Adaptern sind. Bei Zugabe der „Library“-DNA binden die Adapter der DNA ungeordnet an die 5'-Enden der DNA-FZ. Im ersten Schritt erfolgt eine Hybridisierung. Die an die DNA-FZ gebundene DNA wird von der DNA-FZ ausgehend polymerisiert. Die „Library“ ist jetzt doppelsträngig und beinhaltet das originale Template und einen neu synthetisierten Strang. Dieser Strang ist kovalent an die Fließzelle über die DNA-FZ gebunden. Der Doppelstrang wird nun denaturiert und der originale Templatestrang wird weggespült. Es verbleibt die einsträngige DNA, die an der DNA-FZ gebunden ist. Anschließend müssen diese Einzelstränge vervielfältigt werden, damit das Fluoreszenzsignal in der anschließenden Sequenzierung stark genug ist, um gemessen zu werden. Diese Phase wird als *solid-phase bridge amplification* bezeichnet. Die einzelsträngigen DNAs klappen um und binden an die freien 5'-Enden der DNA-FZ in Form einer Brücke. Das 5'-Ende der DNA-FZ dient nun als Startpunkt für die Synthese des Gegenstrangs. Es entsteht ein Doppelstrang, der bogenförmig auf der Oberfläche der Fließzelle sitzt. Die DNA-Doppelstränge werden bei Denaturierung wieder in zwei Einzelstränge gespalten. Hierbei sitzt der neu synthetisierte Gegenstrang kopfüber auf der Oberfläche. Beide Enden der DNA-Fragmente sind an der DNA-FZ gebunden, sodass sie im nächsten Zyklus erneut Brücken bilden können und so erneut vermehrt werden. Es bilden sich nach einigen Zyklen Cluster mit identischen DNA-Fragmenten. Am Ende der Amplifikation werden die Gegenstränge, die an den 3'-Enden der DNA-FZ gebunden sind abgewaschen und die 3'-Enden mit reversen Primer geblockt (Abbildung 13) (ILLUMINA INC., 2021b).



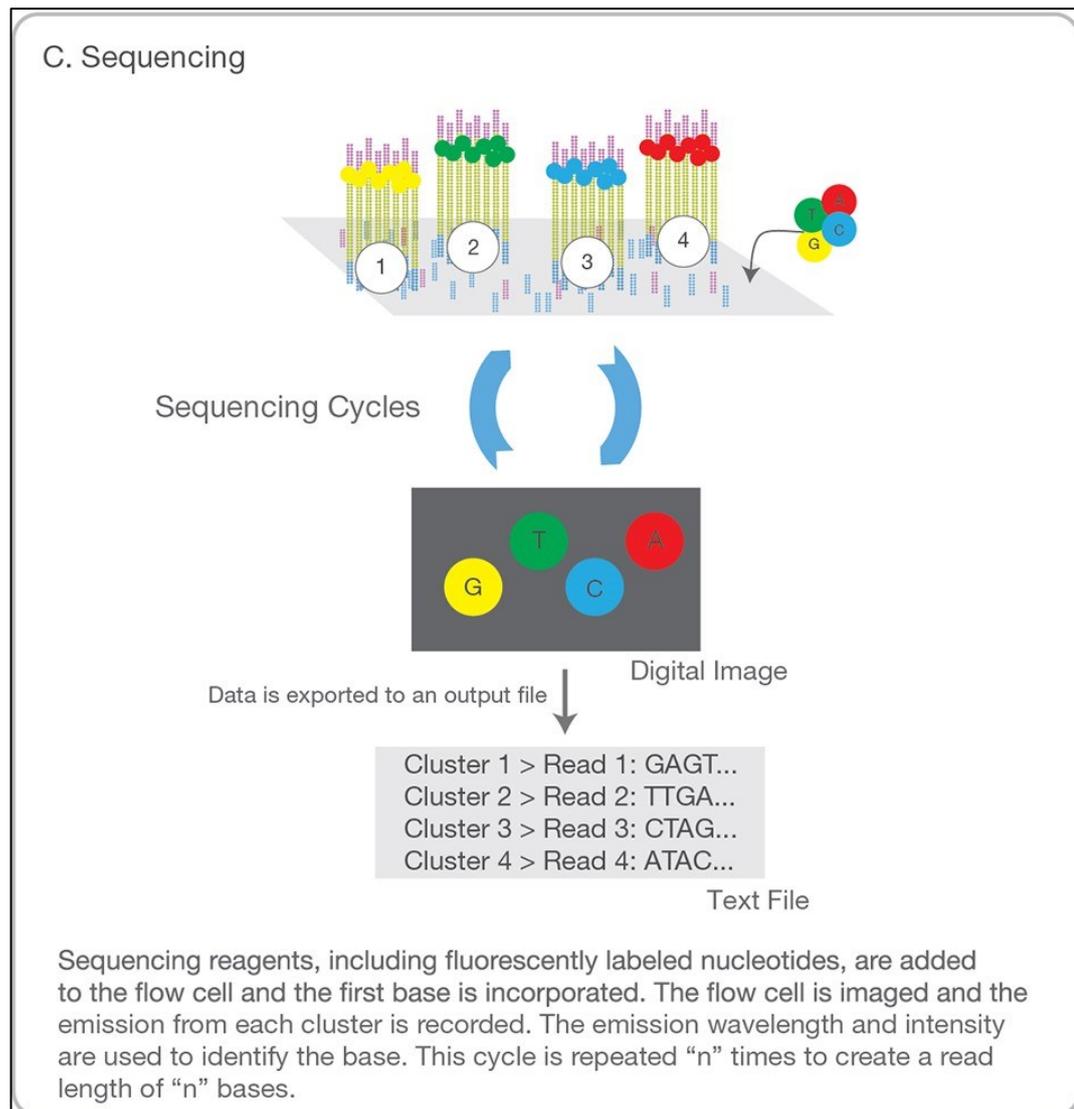
**Abbildung 13: Illumina NGS: *Cluster Amplification***

Aus der Anleitung zum Next-Generation Sequencing von Illumina Inc. (ILLUMINA INC., 2017)

### 3.3.3 Sequenzierung

Das Prinzip der Illumina MiSeq Sequenzierung basiert auf der 4-Channel SBS Chemistry, bei der jede der vier Basen eine eigene Fluoreszenzfärbung besitzt und ein einzigartiges Signal produziert, sobald die Fluoreszenzfärbung von einer Lichtquelle angeregt wird. Dafür pausiert während jedem Sequenzierungszyklus das Gerät und eine Lichtquelle regt die Fluoreszenzmarkierungen in der Library an. Es werden vier verschiedene Bilder mit vier verschiedenen Wellenlängen angefertigt, passend zu den Wellenlängen der vier fluoreszenzmarkierten Basen. Dabei wird die Stärke des Signals einer bestimmten Wellenlänge genutzt, um die entsprechende Base zu bestimmen.

Die Sequenzierung erfolgt über die klassische Kettenabbruchmethode. Es werden Polymerase und vier fluoreszenzmarkierte Nukleotide hinzugefügt. Die 3'-OH-Gruppen der Nukleotide sind außerdem mit einer Schutzgruppe versehen, die dafür sorgt, dass die DNA-Polymerase immer nur ein einzelnes Nukleotid gleichzeitig anbaut. Ein Sequenzierprimer bindet an den zuvor generierten DNA-Strang und die DNA-Polymerase baut genau ein fluoreszenzmarkiertes Nukleotid ein. Nach einem Waschschrift, bei dem die freien Nukleotide gewaschen werden, kann für jedes Cluster die Identität des eingebauten Nukleotids anhand des Fluoreszenzsignals bestimmt werden. Dabei wird wie oben beschrieben durch ein Lichtsignal die Fluoreszenzmarkierung angeregt und vier verschiedene Bilder werden mit verschiedenen Wellenlängen angefertigt. Die Base wird entsprechend der Wellenlänge des Fluoreszenzsignals bestimmt. Im nächsten Schritt werden die Fluoreszenzmarkierung und die Schutzgruppe entfernt. An das so entstandene freie 3'-OH-Ende kann nun ein neues, fluoreszenzmarkiertes Nukleotid angefügt werden (Abbildung 14). Der Zyklus Einbauen-Anregen-Messen wiederholt sich, bis die vorgegebene Anzahl an Zyklen erreicht ist (ILLUMINA INC., 2021b).



#### Abbildung 14: Illumina NGS: Sequenzierung

Aus der Anleitung zum Next-Generation Sequencing von Illumina Inc. (ILLUMINA INC., 2017).

Die Sequenzierreihenfolge entspricht einer Paired-End Sequenzierung, bei der die DNA-Polymerase zunächst die DNA von einer Seite (Read 1) und anschließend von der anderen Seite (Read 2) sequenziert. Bei der Sequenzierung des zweiten Reads werden die neu synthetisierten DNA-Stränge aus dem ersten Read entfernt und die 3'-Enden der DNA-FZ freigegeben. Nun bindet der Sequenzierstrang aus Read 1 zuerst an das 3'-Ende der DNA-FZ und es wird mittels *bridge amplification* ein doppelsträngiger DNA-Strang erzeugt. Es folgt eine Denaturierung des Doppelstrangs und der Einzelstrang aus Read 1 wird entfernt. Nun verbleiben die Rückwärtsstränge auf der Fließzelle, die 5'-Enden der DNA-FZ werden mit Primern blockiert und die Sequenzierung erfolgt in die Gegenrichtung (ILLUMINA INC., 2021b).

### 3.3.4 Dual Index Read

Das Dual Index Read Verfahren wird bei der Multiplexsequenzierung genutzt und erlaubt es verschiedene Proben in einem Sequenzierungslauf zu verwenden. Dabei können zwei Indices genutzt werden, um viele verschiedene Indexkombinationen zu erzeugen. Die Indices werden genutzt, um die Proben in einem Cluster nach dem Sequenzieren identifizieren zu können. Bei einem Dual Index Sequenzierungslauf werden vier verschiedene Reads der Reihe nach erzeugt: Read 1, Index 1, Index 2 und Read 2. Nach der Sequenzierung des Vorwärtsstrangs wird die erste Indexsequenz, die direkt am 5'-Ende der DNA-FZ liegt, sequenziert und abgelesen. Im Anschluss wird wie oben beschrieben der Strang umgedreht. In der *bridge amplification* Phase wird der zweite Index, der nun an dem neu gebundenen 3'-Ende der DNA-FZ liegt, sequenziert und abgelesen. Nachfolgend wird der Rückwärtsstrang gebildet, sequenziert und abgelesen (ILLUMINA INC., 2021b).

### 3.4 16S-rRNA-Gensequenzierung

Bei der 16S-rRNA-Gensequenzierung wird das 16S-rRNA-Gen auf der DNA, das für die RNA für den Aufbau der 30S-Untereinheit der Ribosomen kodiert, sequenziert. Das Ribosom in Bakterienzellen hat ein Sedimentationsgewicht von 70S und besteht aus zwei Untereinheiten, einer schwereren 50S-Untereinheit und einer leichteren 30S-Untereinheit (BERG *et al.*, 2015). Das 16S-rRNA-Gen auf der DNA ist ca. 1500 bp lang und kodiert für 21 Proteine. Es besteht aus neun variablen Regionen, zwischen denen sich konservierte Regionen befinden (Abbildung 15) (JOHNSON *et al.*, 2019). Das 16S-rRNA-Gen vereinigt die Eigenschaften der oben beschriebenen stark konservierten Regionen, die sich als Ansatzstelle universeller Primer eignen, mit hypervariablen Regionen, die sich für die taxonomische Zuordnung eignen. Damit ist das 16S-rRNA-Gen als molekulares Chronometer geeignet. Als molekulares Chronometer eignet sich ein Molekül, das die Messung und Repräsentation der Gesamtrate evolutionärer Veränderungen einer Abstammungslinie zulässt, eine ausreichende phylogenetische Reichweite für evolutionäre Veränderungen anzeigt, sowie eine ausreichende Größe hat, um Regionen abzubilden, die aus evolutionärer Sicht unabhängig sind (WOESE, 1987).

Bei den meisten Experimenten werden nur einzelne oder kombinierte Regionen sequenziert, da die vielgenutzte Illumina MiSeq Plattform eine maximale DNA-

Größe von weniger als 600 Basen sequenziert (JOHNSON *et al.*, 2019). Diese Art der Sequenzierung bezeichnet man auch als *short-amplicon* 16S-rRNA-Gensequenzierung, die es erlaubt, ein bis drei benachbarte variable Regionen des 16S-rRNA-Gens zu sequenzieren (ABELLAN-SCHNEYDER *et al.*, 2021). Die *short-amplicon* Sequenzierung führt im Vergleich zur Sequenzierung des gesamten (*full-length*) 16S-rRNA-Gens allerdings nur zu einer zufriedenstellenden Bestimmung des Genus, nicht jedoch zu einer annehmbaren Bestimmung und Unterscheidung zwischen verschiedenen Spezies (JOHNSON *et al.*, 2019). Dabei ist der größte Vorteil der *full-length* 16S-rRNA-Gensequenzierung, die mit der Entwicklung der Sequenzierung der Drittengeneration möglich wurde, die Länge der DNA-Bruchstücke von bis zu 10.000 Basenpaaren und die Sequenzierung auf einer einzigen Molekülebene in kurzer Zeit (ABELLAN-SCHNEYDER *et al.*, 2021). Wie bereits beschrieben führt dies zu einer besseren Identifikation bakterieller Taxa, nimmt jedoch auch signifikante Nachteile in Kauf. Zu den Nachteilen dieser Technik zählen die relativ hohe Fehlerrate von bis zu 15 % pro Sequenz, die begrenzte Nutzbarkeit in Hochdurchsatzverfahren, höhere Gesamtkosten und noch weniger standardisierte Protokolle und Analysepipelines (ABELLAN-SCHNEYDER *et al.*, 2021).

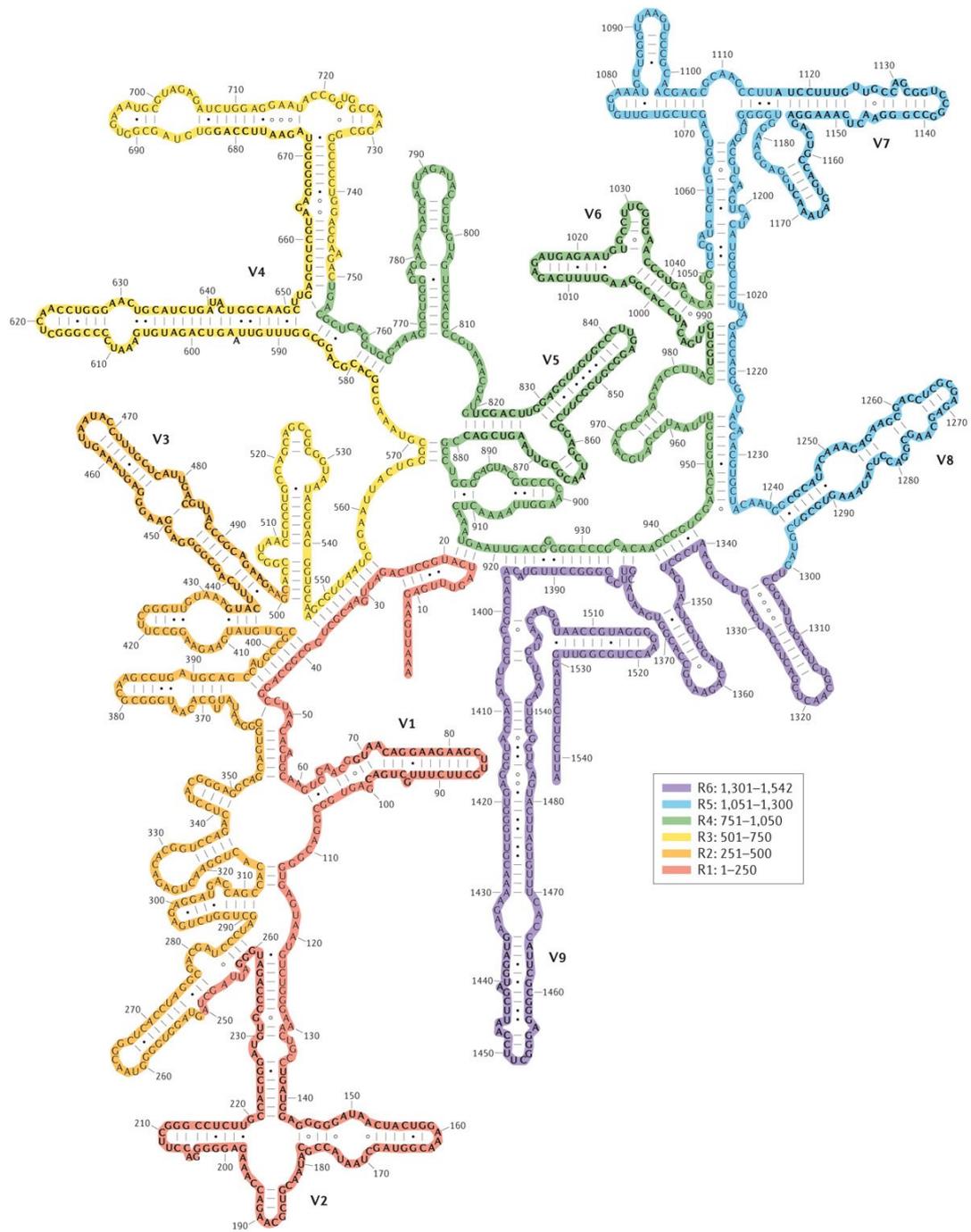


Abbildung 15: 16S-rRNA-Gen

Konservierte (blau) und variable Regionen (gelb) auf dem 16S-rRNA-Gen

## III. PUBLIKATION

### 1 Publikation Mikrobiom



Article

## Processing Matters in Nutrient-Matched Laboratory Diets for Mice—Microbiome

Jasmin Wenderlein <sup>1</sup>, Linda F. Böswald <sup>2</sup>, Sebastian Ulrich <sup>1</sup>, Ellen Kienzle <sup>2</sup>, Klaus Neuhaus <sup>3</sup>, Ilias Lagkouvardos <sup>3,4</sup>, Christian Zenner <sup>5</sup> and Reinhard K. Straubinger <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Chair of Bacteriology and Mycology, Institute for Infectious Diseases and Zoonosis, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, LMU Munich, Veterinärstr. 13, 80539 Munich, Germany; jasmin.wenderlein@micro.vetmed.uni-muenchen.de (J.W.); ulrich@micro.vetmed.uni-muenchen.de (S.U.)
  - <sup>2</sup> Chair of Animal Nutrition and Dietetics, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, LMU Munich, Schönleutenerstr. 8, 85764 Oberschleifheim, Germany; linda.boeswald@lmu.de (L.F.B.); kienzle@tph.vetmed.uni-muenchen.de (E.K.)
  - <sup>3</sup> Core Facility Microbiome, ZIEL—Institute for Food & Health, Technical University of Munich, Weihenstephaner Berg 3, 85354 Freising, Germany; neuhaus@tum.de (K.N.); ilias.lagkouvardos@tum.de (I.L.)
  - <sup>4</sup> Hellenic Centre for Marine Research (HCMR), Institute of Marine Biology and Aquaculture (IMBBC), 715 00 Heraklion, Greece
  - <sup>5</sup> Veterinary Immunology Study Group, Department for Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, LMU Munich, Lena-Christ-Str. 48, 82152 Planegg-Martinsried, Germany; Christian.Zenner@tph.vetmed.uni-muenchen.de
- \* Correspondence: r.straubinger@lmu.de



**Citation:** Wenderlein, J.; Böswald, L.F.; Ulrich, S.; Kienzle, E.; Neuhaus, K.; Lagkouvardos, I.; Zenner, C.; Straubinger, R.K. Processing Matters in Nutrient-Matched Laboratory Diets for Mice—Microbiome. *Animals* **2021**, *11*, 862. <https://doi.org/10.3390/ani11030862>

Academic Editor: Domenico Nuzzo

Received: 17 February 2021

Accepted: 16 March 2021

Published: 18 March 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Simple Summary:** Feed for laboratory mice is available in different physical forms. However, there is insufficient standardization in nutrient composition and physical forms. Results pertaining to energy and nutrient digestibility show that differentially processed feed (pelleted vs. extruded) and even batches from the same provider (pelleted vs. pelleted) differ in starch gelatinization. Here we show that feed processing impacts the mice's gastrointestinal microbiome. Reproducibility and comparability between experiments with differently processed feeds in laboratory mice should not be taken for granted. Therefore, details on dietary ingredients and feed processing should be specified in studies that include animal experiments.

**Abstract:** The composition of the microbiome is subject to the host's diet. In commercial laboratory mouse diets, different physical forms of the same diets are available, containing—according to their labels—identical ingredients and nutrient compositions. However, variations in nutrient composition and starch gelatinization due to production processes and their impact on digestibility have been described. In this study, a total of 48 C57BL/6 mice were assigned to two equal groups and were fed diets (produced with different processes—extruded vs. pelleted) for eight weeks in two biological replicates. At the end of the experiment, samples were collected from five different gastrointestinal regions, including the stomach, small intestine, cecum, large intestine, and an extracorporeal region (feces), and the microbiome was analyzed with 16S rRNA gene amplicon sequencing. The replicates in both experiments differed significantly in their relative abundances of Muribaculaceae species. Furthermore, the gastrointestinal content of pellet-fed mice contained larger numbers of *Lactobacillus* species. These results indicate that starch gelatinization and ingredient composition significantly influence microbial makeup. In conclusion, different feed processing methods may affect fundamental digestive and metabolic processes, impacting animal experiments and biasing microbiome data.

**Keywords:** feed processing; starch gelatinization; laboratory mouse; diet; intestinal microbiome

### 1. Introduction

The intestinal microbiome is defined as the entirety of bacteria, archaea, viruses, fungi, and protozoa that inhabit the gastrointestinal tract of humans or animals [1]. The

microbiome is composed of trillions of bacterial cells [2], mostly consisting of facultative and strictly anaerobic bacteria. The most abundant phyla are Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Verrucomicrobia, and Proteobacteria [3]. In monogastric species, these microorganisms contribute to the hosts' metabolism by fermentation of prececally indigestible nutrients that reach the large intestine. The main products of fermentation are short-chain fatty acids (SCFA) [4]. The microbiome aids in host metabolism and takes part in its physiological processes. During the development of the host, the microbiome is implicated in the maturation of the immune system [5,6] and the gastrointestinal tract [7,8]. Furthermore, the microbiome protects the host mucosa through opsonization [9,10]. It also influences the development of extraintestinal organs, e.g., the cardiovascular system [11] or the nervous system [12,13]. Shifts in the composition of the microbiota may lead to dysbiosis in the gut, resulting in pathological processes [14] and can lead to gastrointestinal disorders, such as inflammatory bowel disease [15,16] and malignancies [17,18]. The microbiome may even affect disease etiology in other organ systems, such as obesity [19,20] and diabetes [21,22]. Therefore, it is crucial to control and standardize all possible factors influencing the microbiome.

The microbiome composition can be influenced by various factors, such as feeding, cage size, enrichment, group size, and feed composition [23]. Mouse feed consists of different carbohydrates: mono-, di-, tri-, oligo- and polysaccharides. Starch is a plant polysaccharide composed of two polymers of D-glucose: unbranched amylose and highly branched amylopectin [24]. Starch serves as a macronutrient in many foods and is the main glycemic carbohydrate in diet [25,26]. From a nutritional point of view, there are three fractions of starch: rapidly digestible starch (RDS), slowly digestible starch (SDS), and resistant starch (RS) [27]. RDS and SDS form when starch is heated with abundant water. Thereby, the semicrystalline form of starch changes its microstructure during starch gelatinization [28,29]. In a heating process under controlled moisture conditions, called extrusion, the gelatinization of starches occurs only partially [30]. The now disoriented starch structure is more accessible to mammalian digestive enzymes and can thus be digested in the small intestine [30]. Higher digestibility of gelatinized starch has been described for cats and horses [31,32], as well as mice [33]. Resistant starch (RS) cannot be digested enzymatically in the small intestine and undergoes bacterial fermentation in the large intestine [34]. Various studies have already demonstrated that animals fed with RS show a change in their microbiome [35–37].

According to current feeding protocols for laboratory mice, a murine diet is available either in pelleted, extruded, semi-pelleted or powdered form. Often, all these physical forms are marketed as identical with the same ingredient and nutrient labeling so that they seem to be exchangeable. Desmarchelier et al. (2013) [38] have described changes in microbiome [3] and body condition of mice when fed either powdered or pelleted diet. Rausch et al. (2016) [23] compared factors contributing to the mouse microbiome's variation and found that chow provider and chow treatment influence the microbiome variation. The contributing factors of why different physical forms of mouse laboratory diets influence the microbiome have not been identified yet. Studies on digestibility and the composition of nutrients in the feed conducted by Böswald et al. (2021) [33] revealed that extruded and pelleted diets significantly differed in their degree of starch gelatinization, which led to differences in digestibility. This study also showed unexpected differences in diet composition between batches of the same diet form, which also influences digestibility. We aimed to investigate whether these variations in diets may impact the composition of the microbiome. In this study, two groups of mice were fed either with a pelleted or an extruded diet, and the microbial gastrointestinal content in various sampling points was analyzed applying 16S rRNA gene amplicon sequencing.

## 2. Materials and Methods

The ethic commission of the veterinary faculty of the LMU Munich (reference number 169-03-05-2019) approved the use of mice in the proposed experiments. Mice were housed

in a specific pathogen-free facility at the faculty of veterinary medicine at the Institute for Infectious Medicine and Zoonosis of the LMU Munich.

### 2.1. Animals and Diets

Forty-eight eight-week-old female C57BL/6 mice (Envigo, Horst, Netherlands) were housed in individually ventilated cages (504 cm<sup>2</sup> space) (Techniplast GmbH, Hohenpeißenberg, Germany) in groups of two. The cages contained a bentonite bedding (Silikatstreu, Tigerino Crystals Katzenstreu, Matina GmbH, Munich, Germany) enriched with a polycarbonate mouse shelter (Zoonlab GmbH, Castrop-Rauxel, Germany) and nesting material (Zoonlab GmbH). The cages were cleaned weekly. Feed and water were provided ad libitum. Two trials as biological replicates were conducted. All mice underwent a total experimental period of 56 days consisting of an adaptation to the husbandry facility (day 0 to 20), an adaptation to the individual diet (day 21 to 27), a digestibility trial (day 28 to 47) followed by a one week break to stabilize the microbiome (day 48 to 55). On day 56, all mice were sacrificed by cervical dislocation.

Trial 1. Sixteen mice were allocated randomly to two groups. During the adaptation to the husbandry, all mice were fed the same diet. The diet of both groups was then changed on day 21. Group E1 ( $n = 8$ ) was fed an extruded diet. Group P1 ( $n = 8$ ) was fed the same diet from the same manufacturer in a pelleted form. The degree of starch gelatinization in the diets was 57% in E1 and 17% in P1. All further parameters of the diet can be found in Böswald et al. (2021) [33].

Trial 2. The second trial served as a replicate of trial 1. Accordingly, 32 mice were randomly assigned into two groups. New batches of the same diets by the same provider were used. After adaptation as before, the diets of both groups were changed on day 21. Group E2 ( $n = 16$ ) was fed an extruded diet. Group P2 ( $n = 16$ ) was fed the same diet in a pelleted form. The degree of starch gelatinization was 70% in E2 and 17% in P2. All further parameters of the diet can be found in Böswald et al. (2021) [33].

### 2.2. Post Mortem Sampling

After sacrifice, the mice were weighed and positioned under a laminar flow for dissection. Samples were collected from the digesta of the fundus, the ileum approximately 1 cm before the cecum, from the cecum at the apex, and the colon approximately 1 cm after the cecum. The digesta was transferred into a 2.0 mL tube (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) containing 600 µL of stool DNA stabilizer (Invitek Molecular GmbH, Berlin, Germany). Tubes were then stored immediately at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3. Metagenomic DNA Extraction

Metagenomic DNA was extracted according to Reitmeier et al. (2020) [39]. Metagenomic DNA was extracted from samples thawed on ice. A total of 600 µL of the sample was transferred into a 2.0 mL screw-cap tube prefilled with 0.1 mm silica beads (lysing matrix tubes B, MP Biomedicals GmbH, Eschwege, Germany). Subsequently, 200 µL of 4 M guanidinium thiocyanate (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and 500 µL of 5% *N*-lauroylsarcosine sodium salt (Merck KGaA) were added. In the next step, samples were heated for 60 min in a shaker ( $70^{\circ}\text{C}$ , 700 rpm). Lysis of microbial cells was achieved using a FastPrep-24<sup>®</sup> (MP Biomedicals GmbH) fitted with a CoolPrep adapter (MP Biomedicals GmbH) filled with dry ice. FastPrep-24<sup>®</sup> was run on a standard cycle (40 s, 6.5 m/s) three times in total. Next, 15 mg of polyvinylpyrrolidone (Merck KGaA) was added, and then the content was mixed. Then, the samples were centrifuged for three min ( $15,000\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ). The supernatant was transferred into a 2.0 mL tube. RNase A at 10 mg/mL (Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich, Germany) was added and incubated for 20 min in a shaker ( $37^{\circ}\text{C}$ , 700 rpm). According to the manufacturer's instructions, DNA purification was achieved with a NucleoSpin gDNA clean-up kit (Macherey–Nagel GmbH and Co. KG, Düren, Germany). Nucleic acid concentrations were then measured using a NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc.). If not processed immediately, samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

The procedure of amplicon libraries preparation (V3–V4 region) and sequencing were described in detail previously [39]. Amplicon purification was performed with the AMPure XP system (Beckmann Coulter, Krefeld, Germany) and sequenced in a paired-end mode (PE300; only using reads of 275 each) with pooled samples containing 20% (vol:vol) PhiX standard library in a MiSeq system (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) prepared according to the manufacturer's instructions.

#### 2.4. Data Processing

16S rRNA gene amplicon data were analyzed as described previously [40], with the following changes. Raw reads of both experiments were merged using the NGS toolkit 3.3 (<https://pypi.org/project/ngs-toolkit/>, accessed on 22 October 2020) and were further processed using the “Integrated Microbial Next-generation sequencing” (IMNGS) pipeline [41] based on UPARSE [42]. Sequences were demultiplexed, trimmed to the first base with a quality score < 20, and paired. Sequences with <300 and >600 nucleotides and paired reads with an expected error > 2 were excluded from the analysis. The remaining reads were trimmed by fifteen nucleotides on each end to prevent analysis of the regions with distorted base composition observed at the start of sequences. The presence of chimeras was tested with UCHIME [43]. Zero-radius operational taxonomic units (zOTUs) were calculated using UNOISE 2 [44] from the Usearch 11 package [45], as implemented in IMNGS [41]. zOTUs with a relative abundance  $\geq 0.25\%$  in at least one sample were kept for further analysis. Taxonomy was assigned at an 80% confidence level with the RDP classifier [46]. Taxonomy and zOTUs tables were refined using SILVA [47] and MEGA X [48]. Rhea was used for further analysis in an R programming environment (R i386 3.6.0, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria), as described previously [49]. A detailed description of the analysis and the scripts is available online (<https://lagkouvardos.github.io/Rhea/>, accessed on 7 May 2019). Prior to normalization, samples of each experiment were assigned to unique zOTU tables to guarantee comparability within experiments. The zOTU tables of all study groups are provided in the Supplementary Material (Tables S1–S5).  $\alpha$ -diversity was evaluated based on species richness and Shannon effective diversity [50] as explained in detail in Rhea (see GitHub link).  $\beta$ -diversity was calculated based on generalized UniFrac distances [51].  $p$ -values were corrected for multiple comparisons according to the Benjamini–Hochberg method [52]. Only taxa with a prevalence  $\geq 20\%$  (proportion of samples positive for the given taxa) in at least one of the groups and a relative abundance  $\geq 0.25\%$  were considered for statistical testing. All given results were statistically tested with the Wilcoxon rank-sum test, if not stated otherwise. Significant zOTUs were then identified by EzBioCloud's 16 S rRNA gene-based ID [53]. Data were visualized using either OriginPro, Version 2020 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) or Illustrator CS6 Version 16.0.0 (Adobe Inc., San José, CA, USA).

### 3. Results

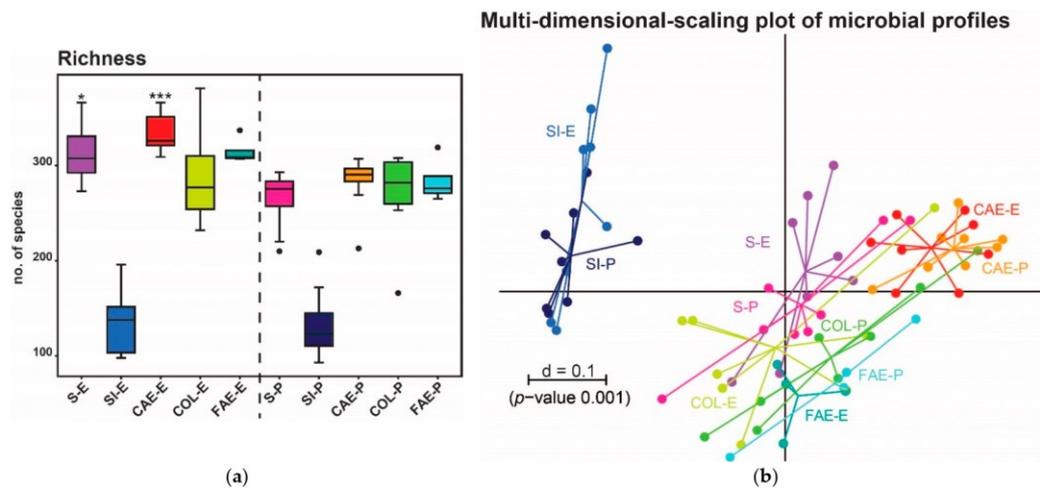
A total of 8,314,670 sequences were detected within both sequencing runs, with an average of 23,161 sequences (SD = 8259) per sample. The complete zOTU table contains a total of 722 zOTUs.

For  $\alpha$ -diversity analysis, richness was compared in different gut regions, including feces and groups of trial 1 (Table 1, Figure 1a) and trial 2 (Table 2, Figure 2a); these tables also include the sequence read counts of this region and group.

**Table 1.** Read count and  $\alpha$ -diversity (richness) in trial 1.

Sample		E1	P1	<i>p</i> -Value
Stomach content	Read count	23,679	19,682	<0.01
	Richness	313.6	264.4	
Small intestinal content	Read count	21,910	19,252	0.92
	Richness	135.3	134.4	
Cecal content	Read count	22,582	19,614	<0.001
	Richness	333.9	278.6	
Colon content	Read count	21,778	20,216	0.98
	Richness	288.6	270.4	
Feces	Read count	20,236	20,883	0.43
	Richness	315.3	284.0	

E1: mice fed with extruded diet in trial 1; P1: mice fed with pelleted diet in trial 1.

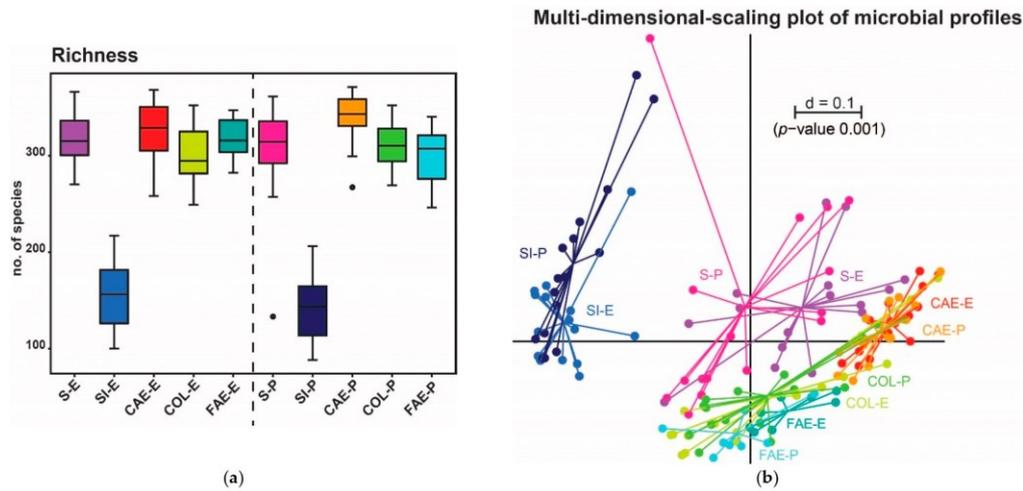


**Figure 1.** (a)  $\alpha$ -diversity shown as richness in different intestinal regions of trial 1. The group fed with extruded feed is plotted on the left, the pellet-fed group on the right. Stars indicate significance between the respective gut regions of both groups. (b)  $\beta$ -diversity of trial 1 is shown as a multidimensional-scaling (MDS) plot. The scale indicates the distance between samples ( $d = 0.1$  marks 10% difference). E = extruded diet, P = pelleted diet, S = stomach, SI = small intestine, CAE = cecum, COL = colon, FAE = feces. *p*-value summary: \*  $p \leq 0.05$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

**Table 2.** Read count and  $\alpha$ -diversity (richness) in trial 2.

Sample		E2	P2	<i>p</i> -Value
Stomach content	Read count	23,127	23,741	0.84
	Richness	320.4	308.1	
Small intestinal content	Read count	22,168	21,752	0.36
	Richness	158.8	146.2	
Cecal content	Read count	24,453	24,077	0.41
	Richness	330.6	342.3	
Colon content	Read count	23,262	22,953	0.45
	Richness	306.0	315.9	
Feces	Read count	21,508	24,614	0.37
	Richness	322.3	302.5	

E2: mice fed with extruded diet in trial 2; P2: mice fed with pelleted diet in trial 2.



**Figure 2.** (a)  $\alpha$ -diversity shown as richness in different intestinal regions of trial 2. The group fed with extruded feed is plotted on the left, the pelleted fed group on the right. (b)  $\beta$ -diversity in trial 2 is shown as an MDS plot. The scale indicates the distance between samples ( $d = 0.1$  marks 10% difference). E = extruded diet, P = pelleted diet, S = stomach, SI = small intestine, CAE = cecum, COL = colon, FAE = feces.

### 3.1. Trial 1

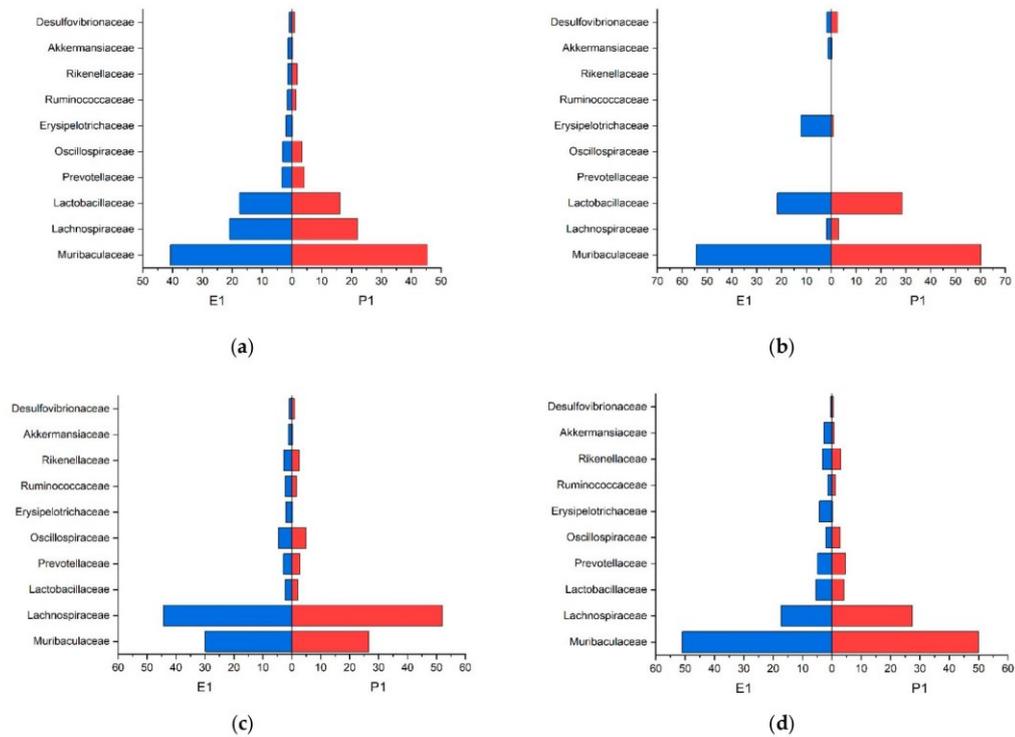
In the stomach, small intestinal and colon content, a common core-microbiome consisting of Muribaculaceae, Lachnospiraceae, and Lactobacillaceae, in the previous order descending in numbers, could be defined according to the guidelines of Risely et al. (2019) [54]. The cecal contents' core-microbiome consisted of the same families, but in the following descending order Lachnospiraceae, Muribaculaceae, and Lactobacillaceae. However, the feces showed different core-microbiota composed of Porphyromonadaceae, Lachnospiraceae, and Prevotellaceae. The relative abundance of these three families within the whole microbiome is displayed in Table 3. The distribution of the families that were higher than 0.5% in relative abundance for trial 1 is presented in Figure 3. As baseline (0 on the x-axis), we used zero percent richness of the according families.

**Table 3.** Relative group strength of core microbiome families in trial 1.

Sample	E1 (%)	P1 (%)
Stomach content	79.3	83.5
Small intestinal content	78.1	91.9
Cecal content	76.5	80.9
Colon content	73.8	83.5
Feces	79.3	81.1

E1: mice fed with extruded diet in trial 1; P1: mice fed with pelleted diet in trial 1.

The  $\beta$ -diversity in the stomachs' content did not significantly differ between the pelleted and the extruded diet (Figure 4a). By comparing taxa, the genera *Alloprevotella* and *Clostridium* cluster XIVa were significantly more abundant in P1 compared to E1. Looking at molecular species, zOTU 20 (*Alloprevotella* sp.), zOTU 25 (*Limosilactobacillus reuteri*) and zOTU73 (Lachnospiraceae) were significantly more abundant in P1. Significantly more abundant molecular species zOTU 11 (*Muribaculum* sp.) and zOTU 36 (Lachnospiraceae) were detected in E1, the latter being only present in one sample of the pelleted diet but in six samples of the extruded diet (Figure 4b).



**Figure 3.** Population pyramid of abundant families of trial 1 given in relative abundance (percent) (a) stomach; (b) small intestine; (c) cecum; (d) colon.

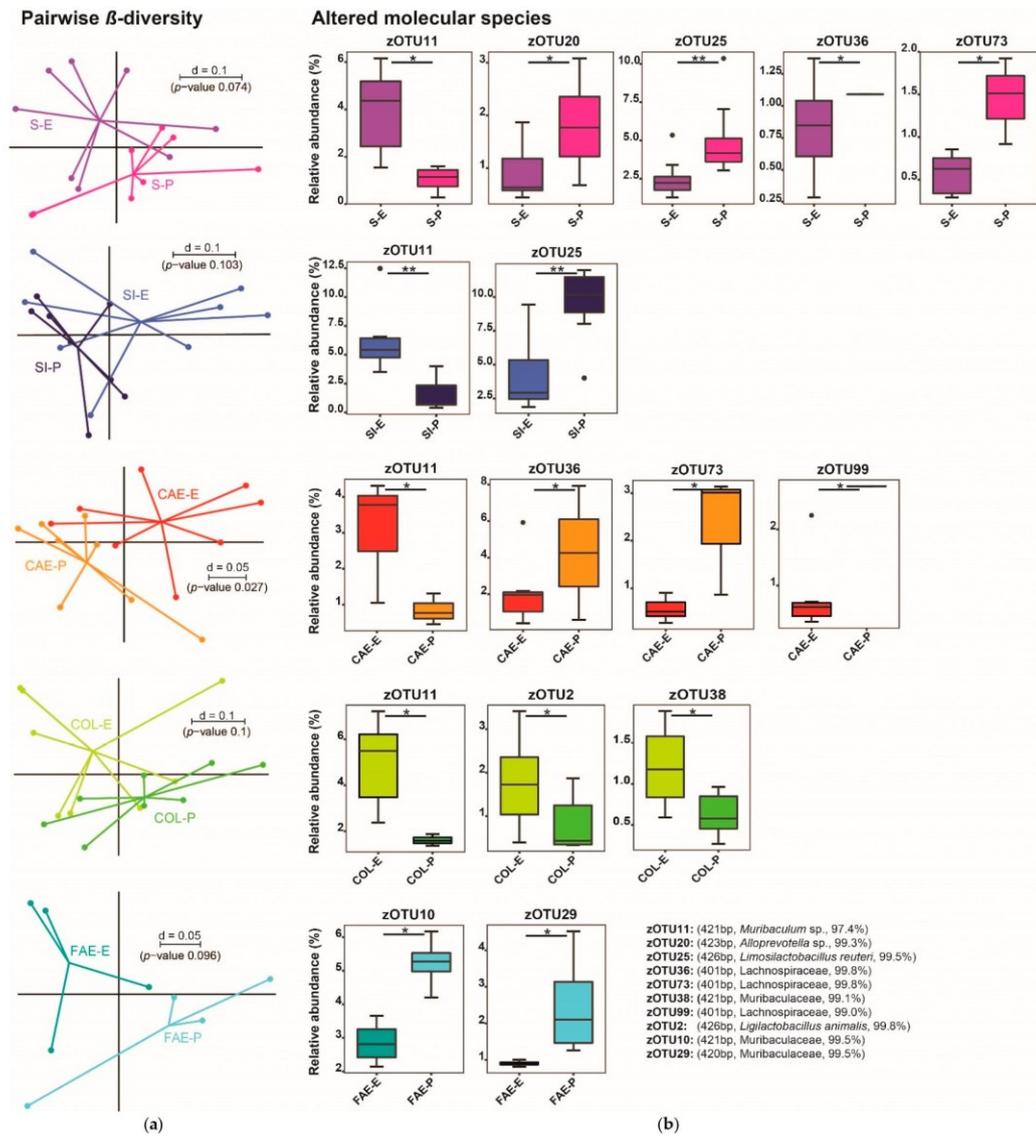
In the small intestines' digesta, the  $\beta$ -diversity did not significantly differ between the two groups (Figure 4a). In a serial group comparison of the taxa, the phylum Actinobacteria were significantly more abundant in E1. The comparison of the zOTUs displayed a *Muribaculum* species (zOTU 11) to be significantly more abundant in E1; however, zOTU 25 (*Limosilactobacillus reuteri*) was significantly more abundant in P1 (Figure 4b).

The cecal content showed a significant difference in  $\beta$ -diversity between the pelleted and the extruded diet (Figure 4a). Taxonomically, the genus *Clostridium* cluster XIVa was more abundant in P1, whereas the taxon Lachnospiraceae incertae sedis was only detected in E1, being significant according to Fisher's exact test. The molecular species zOTU 11 (*Muribaculum* sp.) was significantly more present in E1. zOTU 36 and zOTU 73 (both Lachnospiraceae) were detected in higher relative abundances in P1 compared to E1. Even though zOTU 99 (Lachnospiraceae) was only present in one P1 sample compared to its presence in six E1 samples, a significant difference was calculated by Fisher's exact test (Figure 4b).

In the colons' digesta, the  $\beta$ -diversity did not significantly differ between the two groups (Figure 4a). By comparing taxa, the family Oscillospiraceae was significantly more abundant in E1. At the zOTU level, two molecular species of the family Muribaculaceae (zOTU 11, zOTU 38) were detected that were significantly more abundant in E1. zOTU 2 (*Ligilactobacillus animals*) was also significantly more abundant in E1 (Figure 4b).

The fecal samples displayed no significant difference in  $\beta$ -diversity between the two groups (Figure 4a). Compared taxa also did not show significant differences. When

comparing zOTUs, two members of the family Muribaculaceae (zOTU 10, zOTU 29) were significantly more abundant in P1 compared to E1 (Figure 4b).



**Figure 4.** (a) Pairwise comparison of  $\beta$ -diversities of trial 1 is shown as MDS plot. Sample origins are indicated by abbreviations. (b) Altered molecular species in the respective gut region and feces, displayed horizontally for each gut region and feces according to (a). Stars indicate significance between the respective gut regions of both groups. zOTUs were identified by EZBiocloud; the sequence length, the closest relative taxon and the sequence identity score of zOTUs are indicated in the order of appearance. E = extruded diet, P = pelleted diet, S = stomach, SI = small intestine, CAE = cecum, COL = colon, FAE = feces.  $p$ -value summary: \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ .

In the stomach and cecum content, significant differences in  $\alpha$ -diversity were detected (Figure 1a). Only minor differences in  $\beta$ -diversity were identified between the compared groups, but analysis at the zOTU level revealed some molecular species with significantly changed abundance. The families Muribaculaceae, Lachnospiraceae, and Lactobacillaceae seem to be most affected by different physical forms of each diet (Figure 4b).

### 3.2. Trial 2

A common core-microbiome consisting of Muribaculaceae, Lachnospiraceae, and Lactobacillaceae in the previous order descending in numbers could be defined in the stomach, small intestine, and colon content according to the guidelines of Risely et al. (2019) [54]. In the cecum content, the core-microbiome consisted of the same families Lachnospiraceae, Muribaculaceae, and Lactobacillaceae, in descending order. However, for the feces, we detected different core-microbiota composed of Porphyromonadaceae, Lachnospiraceae, and Prevotellaceae. The relative group strength of the three families on the whole microbiome is displayed in Table 4. The distribution of the families that were higher than 0.5% in relative abundance in trial 2 (Figure 5). As baseline (0 on the x-axis), we used zero percent richness of the according families.

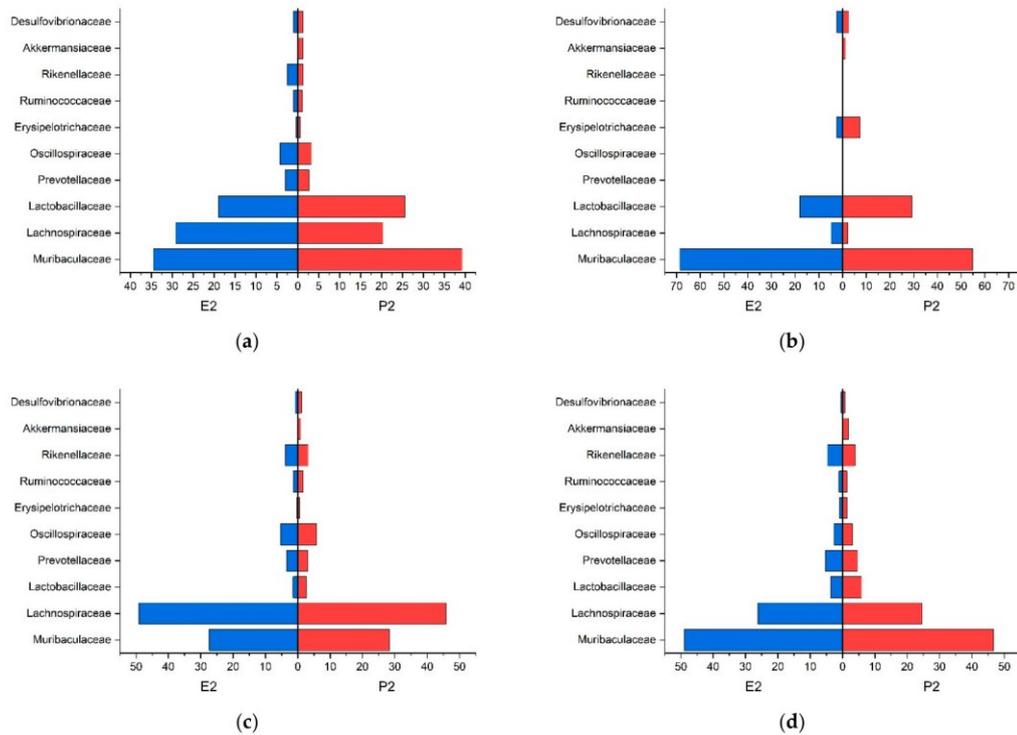
**Table 4.** Relative group strength of core microbiome families in trial 2.

Sample	E2 (%)	P2 (%)
Stomach content	82.6	85.2
Small intestinal content	91.5	86.5
Cecal content	78.0	76.8
Colon content	78.7	77.1
Feces	77.8	75.2

E2: mice fed with extruded diet in trial 2; P2: mice fed with pelleted diet in trial 2.

The gastric samples differed significantly in their  $\beta$ -diversity (Figure 6a). The taxonomic comparison revealed the family Rikenellaceae and its subordinate genus *Alistipes* to be significantly more abundant in E2 compared to P2; the same was true for the genus *Oscillibacter*. In contrast to trial 1, a species of the family Muribaculaceae (zOTU 11) was more abundant in P2 compared to E2. Other members of this family with a similar distribution were zOTU 15, zOTU 28, and zOTU 80. Two more precisely identifiable species, *Muribaculum gordoncarteri* (zOTU 60) and *Paramuribaculum intestinale* (zOTU 9) were also significantly more abundant in P2 than E2. However, some species of the family Muribaculaceae were still significantly more abundant in E2 (zOTU 5, zOTU 54) (Figure 6b).

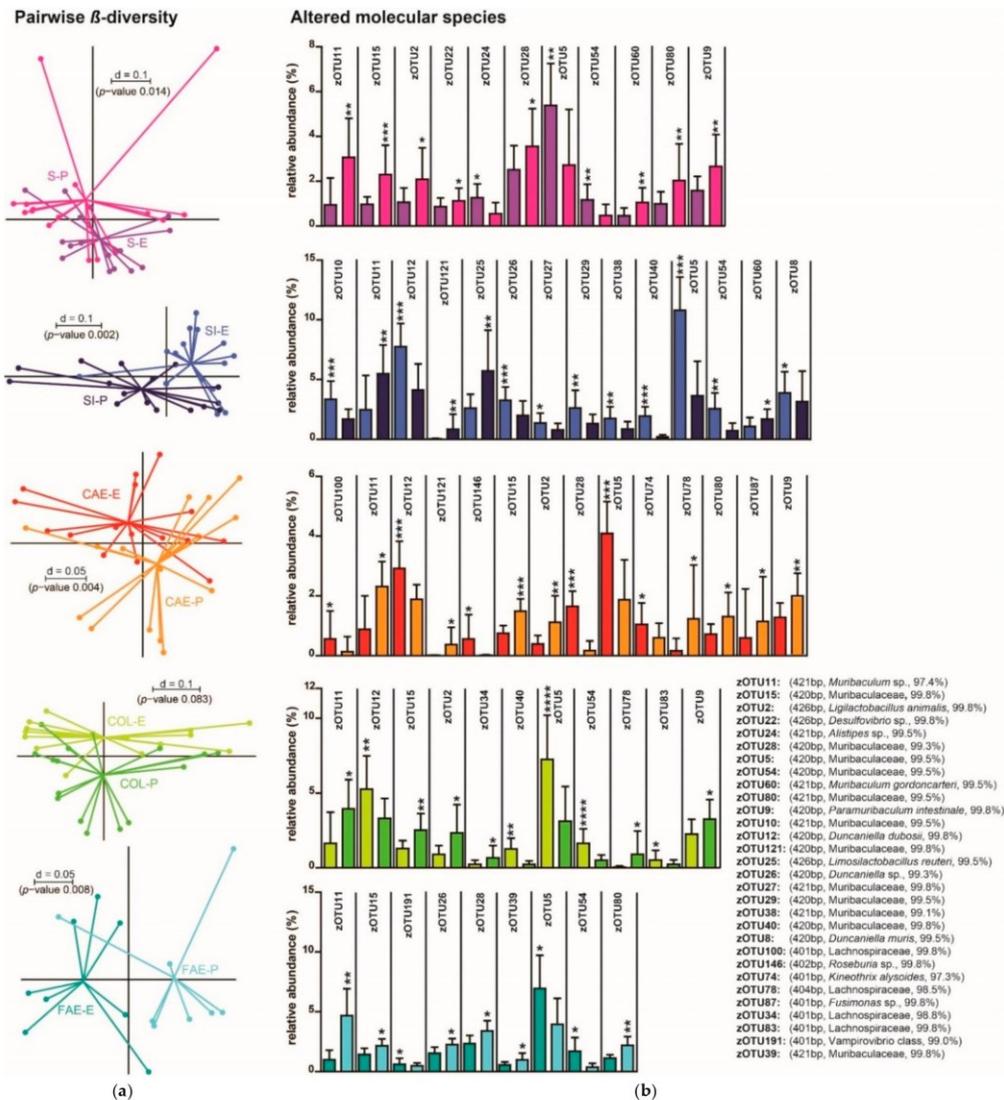
Pairwise comparisons of  $\beta$ -diversity revealed significant differences between the two groups in small intestinal content (Figure 6a). Taxonomic comparisons showed a significantly higher relative abundance of the phylum Bacteroidetes in E2. In our data, this phylum is mostly composed of the family Muribaculaceae. The phylum Firmicutes was significantly more abundant in P2 compared to E2. However, in this phylum, the family Lachnospiraceae was significantly higher in E2 compared to P2. By evaluating molecular species, we found inverted results to trial 1 for zOTU 11 (*Muribaculum* sp.), as it was now significantly more abundant in P2. Lining up with the stomach content samples of trial 2, zOTU 60 (*Muribaculum gordoncarteri*) was significantly increased in P2. zOTU 121 (Muribaculaceae) was only present in seven samples of P2 but not present in E2; this finding was significant according to the Fisher's Exact test. However, more species of the family Muribaculaceae were significantly more abundant in E2 (zOTU 10, zOTU 27, zOTU 29, zOTU 38, zOTU 40, zOTU 5, and zOTU 54). Of the family Muribaculaceae, the species *Duncaniella dubosii* (zOTU 12) was significantly more abundant in E2. The same was true for another *Duncaniella* sp. (zOTU 26) and *Duncaniella muris* (zOTU 8). Concordant with trial 1, *Limosilactobacillus reuteri* (zOTU 25), was significantly more abundant in P2 compared to E2 (Figure 6b).



**Figure 5.** Population pyramid of abundant families of trial 2 given in relative abundance (percent) (a) stomach; (b) small intestine; (c) cecum; (d) colon.

In the digesta of the cecum, the  $\beta$ -diversity did differ significantly between P2 and E2 (Figure 6a). By comparing taxa, we found that the class Bacilli, with its subordinate taxa Lactobacillales, Lactobacillaceae, and *Lactobacillus*, were significantly more abundant in P2 than E2. In an evaluation of molecular species, some species of the family Muribaculaceae (zOTU 11, zOTU 15, zOTU 28 and, zOTU 80) and *Paramuribaculum intestinale* (zOTU 9) were significantly more abundant in P2 compared to E2. Of the same family, zOTU 121 was only present in five samples of P2, but not E2, with a significance according to Fisher's Exact test. Only zOTU 5 (Muribaculaceae) was significantly stronger in E2; this finding was according to the samples of the stomach and small intestine content of trial 2. In line with the small intestinal content, *Duncaniella dubosii* (zOTU 12) was significantly more abundant in E2 than P2. *Ligilactobacillus animalis* (zOTU2) had a significantly stronger abundance in P2 compared to E2 (Figure 6b).

Pairwise  $\beta$ -diversity did not significantly differ between P2 and E2 for the colon content (Figure 6b). Serial group comparison of this region's taxa showed no significant differences. Looking at molecular species, some members of the family Muribaculaceae (zOTU 40, zOTU 5, and zOTU 54) and *Duncaniella dubosii* (zOTU 12) were significantly more abundant in E2 than P2; in contrast, zOTU 11 and zOTU 15 (both family Muribaculaceae) and *Paramuribaculum intestinale* (zOTU 9) were significantly higher in P2. *Ligilactobacillus animalis* (zOTU2) had a significantly stronger abundance in P2, in concordance with trial 1 (Figure 6b).



**Figure 6.** (a) Pairwise comparison of  $\beta$ -diversities of trial 2 shown as the multidimensional-scaling plot. Sample origins are indicated by abbreviations. (b) Altered molecular species for the respective sample origin, classification and coloring of groups according to (a). Stars indicate significance between the respective gut regions of both groups. zOTUs were identified by EZBiocloud; the sequence length, the closest relative taxon and the sequence identity score of zOTUs are indicated in the order of appearance. E = extruded diet, P = pelleted diet, S = stomach, SI = small intestine, CAE = cecum, COL = colon, FAE = feces. p-value summary: \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ .

In the fecal samples of trial 2,  $\beta$ -diversity significantly differed between the pelleted and extruded diet (Figure 6b). By comparing taxa, Firmicutes were found to be significantly stronger in E2 than P2. Of this phylum, the class of Clostridia, with its subordinate taxa Lachnospiraceae and *Clostridium* cluster XIVa, all were significantly more abundant in

E2. In a comparison of the zOTUs, some species of the family Muribaculaceae (zOTU 11, zOTU 15, zOTU 28, zOTU 39, and zOTU 80) were significantly stronger in P2 than in E2. However, zOTU 5 and zOTU 54, which are other species of the family Muribaculaceae, were found to be significantly more abundant in E2 than P2. Of the same family, zOTU 26, a *Duncaniella* species, was significantly higher in P2 in contrast to the samples of the small intestine of trial 2 (Figure 6b).

Within the second trial,  $\beta$ -diversity differed significantly in almost all gut regions between P2 and E2 but not in the colon (Figure 6a). Interestingly, these differences were not noticeable by just looking at the  $\alpha$ -diversity (i.e., richness; Figure 2a). Throughout all observed regions, the family Muribaculaceae seems to be most affected by different physical forms of feed. However, alterations of Muribaculaceae were detected mostly for either P2 or E2, underlining the importance and dominance of this bacterial family in the mouse gut (Figure 6b).

#### 4. Discussion

Intestinal content samples (stomach, small intestine, cecum, colon) were collected according to a standardized protocol and displayed consistent results for read counts, normalization and  $\alpha$ -diversity (Tables 1 and 2). In the case of feces, an extracorporeal material, standardization in terms of short, fixed time intervals were not feasible, as they were not removed from the cages immediately after deposition, and environmental factors may have led to further fermentation and reorganization of the microbiome. Therefore, we have not included the feces in all figures and have not considered the feces for further discussion. This observation underlines the importance of standardized sampling protocols and the necessity of fresh feces to obtain valid microbiome data.

Böswald et al. (2021) [33] had described a difference in composition and starch gelatinization for the diets used in this experiment and the feed's impact on digestibility. Due to the higher degree of starch gelatinization in the extruded diet of trial 1, digestibility of energy and the carbohydrate and fiber fraction was higher in E1 than P1. Diet P2 was a new batch of the diet P1 by the same manufacturer purchased in a 6 month interval. P2 had a much higher starch content and a lower total dietary fiber content than the other three diets. Fiber is the major limiting factor of digestibility in mammalian species. This unexpected but seemingly normal difference in feed composition for different batches resulted in a better digestibility of diet P2 compared to E2 [33].

It is not surprising that these considerable changes in nutrient composition and digestibility affect the microbiome. Therefore, a reproduction of the results of Trial 1 in trial 2 was not possible; changes in the microbiome even between batches of the same diet (P1 vs. P2; Figures 4b and 6b) were observed.

The microbiome in trial 1 showed a stronger relative abundance of several members of the family Muribaculaceae in E1 than P1. *Limosilactobacillus reuteri* was more abundant in P1 than E1 (Figure 4b).

Trial 2 displayed similar results for *Limosilactobacillus reuteri* with a higher relative abundance in the small intestinal content of P2 in comparison to E2. However, the Muribaculaceae family members that were more abundant in trial 1/E1 compared to P1 now showed a significantly higher abundance in P2 compared to E2. Other species of this family, mostly *Duncaniella*, were more abundant in E2 than P2 but have not been significantly altered in trial 1 at all (Figures 4b and 6b).

The effect of diet composition and different physical forms of the feed on the microbiome of mice have been described for caecal content samples in a few studies before [23,38]. Desmarchelier et al. (2013) [38] have described a difference in body weight development when feeding either a pelleted or a powdered diet. Clavel et al. (2014) [3,38] described, based on similar experiments, a pelleted diet to cause an increase in Firmicutes due to more abundant Lachnospiraceae and Ruminococcaceae, and a decrease in Verrucomicrobiaceae due to lower numbers of Akkermansiaceae, compared to powdered diet. The latter authors speculate that differences in feed intake, as well as the shift in the intestinal microbiome,

may be associated with differences in the hosts' weight gain. In the present study, the cecal content of group P1 showed higher numbers of Lachnospiraceae and fewer numbers of Akkermansiaceae compared to E1, verifying the difference in microbiota when different diets forms are consumed. The degree of starch gelatinization seems to be the major determinant for the abundance of Lachnospiraceae and Akkermansiaceae in this case, as the diets E1 and P1 were nutrient-matched in all other aspects (Figure 3c).

Another recently published work from Do et al. (2020) [55] described the effect of a wheat starch diet (WD) in comparison to a gelatinized wheat starch diet (GWD) on the fecal microbiome of mice. They found that the WD diet led to an increase in *Lactobacillus*, *Desulfovibrio* and *Faecalibaculum* and a decrease in the numbers of *Muribaculum* and *Alistipes*. The supply with a GWD diet caused reversed results, displaying an increase in numbers of *Muribaculum* and a decrease in *Lactobacillus* and *Desulfovibrio*.

For the microbiota, we discovered in the colon content of the mice similar results as described by Do et al. (2020) [55], e.g., an increase in Muribaculaceae and a decrease in *Lactobacillus* in the gelatinized diet (E2) and decreased numbers for Muribaculaceae and increased numbers for *Lactobacillus* in P2, the diet with highest total starch content (Figure 5d). Other sampling regions in our experiment did not concord with the previous findings. As Do et al. (2020) [55] were using fecal samples for their study, the findings seem to be comparable to those found in the colons content and feces only. However, Do et al. (2020) [55] did not provide data on the degree of starch gelatinization or dietary fiber in their diets, which makes a comparison with the data presented here difficult.

*Muribaculum* and *Duncaniella* are genera that have been described not long ago [56,57]. Their metabolism is not well characterized, and it is not completely understood how members of these genera may influence the host. Lagkouvardos et al. (2019) [57] described that members of the S24-7 family, now designated Muribaculaceae, have the potential to degrade complex carbohydrates, including host glycans,  $\alpha$ -glucans or plant polysaccharides. Besides the carbohydrate metabolic pathway, described metabolic products for this family are vitamin B7 and the amino acid ornithine. Particularly in trial 2, different members of the family Muribaculaceae were found to significantly differ between the pelleted and extruded feed groups, with E2 having more overall counts in the small intestinal and colon content. Several *Duncaniella* species (zOTU 8, zOTU 12, and zOTU 26) were found to be significantly more abundant in the extruded-diet group in trial 2 than in P2. *Duncaniella muris* (zOTU 8 with 99.5% similarity) is described to digest complex plant polysaccharides like hemicelluloses and pectins [57]. zOTU 12 was identified with 99.8% similarity as *Duncaniella dubosii* [58] and could be linked to the *Candidatus* Homeothermaceae strain H5 [59], which is part of the plant polysaccharide guild as well [57]. zOTU 26 has a 99.3% similarity to isolate-110 (HZ1) [57] and is described as belonging to the plant polysaccharide guild. This is also true for another species of the family Muribaculaceae, zOTU 29, which has a 99.5% similarity to isolate-036 (Harlan) [57]. For other species (i.e., zOTUs) of our study, an assignment to the species of the study of Lagkouvardos et al. (2019) [57] was not possible.

As Böswald et al. (2021) [33] described, the degree of starch gelatinization is higher in extruded than pelleted diets, resulting in a higher digestibility of similar starch content. Non-gelatinized starch is hardly digestible in the prececal gut so that in mice fed with pellets, a higher percentage of undigested starch is available for microbial fermentation in the large intestine than in mice fed an extruded diet with a similar starch content. Diet E2 contained markedly more total dietary fiber than diet P2, which may be associated with the increase of fiber-fermenting *Duncaniella* in this group. However, *Paramuribaculum intestinale* (zOTU9), found to be more abundant in P2, is described to ferment host glycans [57]. The digestion of host glycans like mucus has already been described for other *Bacteroides* spp. [60]. It is not clear to us why *Paramuribaculum intestinale* is more abundant in the pelleted group of trial 2. A possible reason might be that due to the high digestibility of diet P2 and its low fiber content, less indigestible nutrients are available to the microbiome in the large intestine and thus, species that can ferment host glycans outcompete others. The

digestion of intestinal mucus glycans may lead to an erosion of the intestinal mucus barrier. Interestingly, the lack of dietary fiber combined with host glycan degrading bacteria as *Paramuribaculum intestinale* can lead to greater epithelial access for pathogenic bacteria as *Citrobacter rodentium* [61].

With regard to the influence of Muribaculaceae on the host, a decrease in the population strength of *Muribaculum* has been linked to high-fat diets [62] and resistance to obesity in mice [63]. In trial 2, E2 induced a higher relative number of Muribaculaceae in the small intestine, caecum and colon content in comparison to P2. The mice in group P2 showed a significantly higher body fat content and significantly lower body weights than E2 mice ("skinny-fat" phenotype) [33]. This may be linked to an impact of the larger numbers of Muribaculaceae in E2. However, as the exact metabolism of our Muribaculaceae species is a matter of speculation, further research is needed before a definite interpretation is possible.

In addition to changes in the family Muribaculaceae, other species with changed abundance in either experiment, depending on the gastrointestinal region sampled, were identified. One of these species found to be increased in both experiments in the pelleted diet is *Limosilactobacillus reuteri* JCM 1112 (zOTU 25). As an obligate heterofermentative species, *Limosilactobacillus reuteri* JCM 1112 metabolizes glucose primarily through the pentose phosphate pathway resulting in carbon dioxide, acetate, ethanol, and lactate. Another enzyme described for this species is the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system (PTS) subunit IIC for cellobiose and galactitol. It is also able to synthesize vitamin B12 since it possesses *cbi*, *cobi*, and *hem* gene sets [64]. Taken together, *Limosilactobacillus reuteri* could be cross-feeding from other bacteria fermenting starch.

As proposed in other studies [3,23,55] and now verified in this work for pelleted vs. extruded diet of the same ingredients, differences in the processing of commercial laboratory mouse diets led to significant changes in the gastrointestinal microbiome. Unexpectedly, there was even a difference in nutrients content between two batches of diet by the same manufacturer (P1 vs. P2) [33], leading to an increase in the abundance of Muribaculaceae in P2 that has not been observed in P1. Commercial diets for laboratory animals are available in different physical forms and yet marketed as identical products. Due to the variation in feed compositions, obtaining reproducible results between subsequent animal trials was not possible, even when the experiments were conducted in the same research facility and with identical staff as in our project. These changes were surprising since we purchased seemingly identical diets by the same manufacturer only six months after the first trial. Nevertheless, standardization of feedstuff is of utmost importance. The observed effects of a changed microbiome due to different feed forms (e.g., powdered compared to pelleted, extruded and semi-pellet), as in our experiment, have repercussions on mouse experiments published and those to come. Speculating, also the specific preparation of food could possibly impact the human microbiome, an effect which may be considered as a confounder.

## 5. Conclusions

The results of our study show that the processing of laboratory mouse diets significantly influences the development of the microbiome in the animals' gut. Therefore, researchers should always bear in mind that commercial diets of different batches and preparations will influence the mouse microbiome. Thus, metabolic changes due to this influence need to be taken into account. At this moment, biological reproducibility and a comparison between mouse experiments regarding the microbiome are not given, and future research will be helpful here. Manufacturers should provide more data on the diets' characteristics. Further, details on the animals' diets should be given in publications on animal experiments.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/2076-2615/11/3/862/s1>, Table S1: OTU table stomach, Table S2: OTU table small intestine, Table S3: OTU table caecum, Table S4: OTU table colon, Table S5: OTU Table feces.

**Author Contributions:** Conceptualization, R.K.S., E.K., S.U., L.F.B. and J.W.; methodology, J.W.; software, J.W., I.L. and C.Z.; validation, I.L. and K.N.; formal analysis, J.W. and C.Z.; investigation, L.F.B. and J.W.; resources, R.K.S. and E.K.; data curation, L.F.B. and J.W.; writing/original draft preparation, J.W.; writing/review and editing, R.K.S., S.U., and K.N.; visualization, J.W. and C.Z.; supervision, R.K.S. and S.U.; project administration, R.K.S. and E.K.; funding acquisition, L.F.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** We are grateful that the H. Wilhelm Schaumann Foundation kindly funded this research.

**Institutional Review Board Statement:** The Ethics Committee of veterinary faculty LMU Munich (reference number 169-03-05-2019) approved the use of animals.

**Data Availability Statement:** The data that support the findings of this study are openly available in the Sequence Read Archive under the reference number PRJNA700529.

**Acknowledgments:** We would like to thank various people for their contribution to this project; Ursula Klostermeier, Axel Groß, Johannes Döring, and Patricia Bonert for their support with the experimental animal holding; Christoph Kleinemeier for the administration of the computers and programs needed. The advice given by Sandra Reitmeier was a great help in sequencing data preparation.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study, in the collection, analyses, or interpretation of data, in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

- Dethlefsen, L.; Huse, S.; Sogin, M.L.; A Relman, D. The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing. *PLoS Biol.* **2008**, *6*, e280. [[CrossRef](#)]
- Sender, R.; Fuchs, S.; Milo, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* **2016**, *14*, e1002533. [[CrossRef](#)]
- Clavel, T.; Desmarchelier, C.; Haller, D.; Gérard, P.; Rohn, S.; Lepage, P.; Daniel, H. Intestinal microbiota in metabolic diseases. *Gut Microbes* **2014**, *5*, 544–551. [[CrossRef](#)]
- Cummings, J.H.; Beatty, E.R.; Kingman, S.M.; Bingham, S.A.; Englyst, H.N. Digestion and physiological properties of resistant starch in the human large bowel. *Br. J. Nutr.* **1996**, *75*, 733–747. [[CrossRef](#)]
- Bouskra, D.; Brézillon, C.; Bérard, M.; Werts, C.; Varona, R.; Boneca, I.G.; Eberl, G. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nat. Cell Biol.* **2008**, *456*, 507–510. [[CrossRef](#)]
- O'Hara, A.M.; Shanahan, F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* **2006**, *7*, 688–693. [[CrossRef](#)]
- Banasaz, M.; Norin, E.; Holma, R.; Midtvedt, T. Increased Enterocyte Production in Gnotobiotic Rats Mono-Associated with *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 3031–3034. [[CrossRef](#)]
- Hooper, L.V.; Stappenbeck, T.S.; Hong, C.V.; Gordon, J.I. Angiogenins: A new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat. Immunol.* **2003**, *4*, 269–273. [[CrossRef](#)]
- Cash, H.L.; Whitham, C.V.; Behrendt, C.L.; Hooper, L.V. Symbiotic Bacteria Direct Expression of an Intestinal Bactericidal Lectin. *Science* **2006**, *313*, 1126–1130. [[CrossRef](#)]
- Salzman, N.H.; Underwood, M.A.; Bevins, C.L. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: A hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin. Immunol.* **2007**, *19*, 70–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gordon, H.A.; Wostmann, B.S.; Bruckner-Kardoss, E. Effects of Microbial Flora on Cardiac Output and Other Elements of Blood Circulation. *Exp. Biol. Med.* **1963**, *114*, 301–304. [[CrossRef](#)]
- Sudo, N.; Chida, Y.; Aiba, Y.; Sonoda, J.; Oyama, N.; Yu, X.-N.; Kubo, C.; Koga, Y. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J. Physiol.* **2004**, *558*, 263–275. [[CrossRef](#)]
- Sudo, N. Stress and gut microbiota: Does postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response? *Int. Congr. Ser.* **2006**, *1287*, 350–354. [[CrossRef](#)]
- Sekirov, I.; Russell, S.L.; Antunes, L.C.M.; Finlay, B.B. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol. Rev.* **2010**, *90*, 859–904. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sartor, R.B. Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* **2008**, *134*, 577–594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chen, H.; Li, H.; Liu, Z. Interplay of intestinal microbiota and mucosal immunity in inflammatory bowel disease: A relationship of frenemies. *Ther. Adv. Gastroenterol.* **2020**, *13*. [[CrossRef](#)]
- Moore, W.; Moore, L.H. Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 3202–3207. [[CrossRef](#)]
- Scanlan, P.D.; Shanahan, F.; Clune, Y.; Collins, J.K.; O'Sullivan, G.C.; O'Riordan, M.; Holmes, E.; Wang, Y.; Marchesi, J.R. Culture-independent analysis of the gut microbiota in colorectal cancer and polyposis. *Environ. Microbiol.* **2008**, *10*, 789–798. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

19. Ley, R.E.; Bäckhed, F.; Turnbaugh, P.; Lozupone, C.A.; Knight, R.D.; Gordon, J.I. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 11070–11075. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Turnbaugh, P.J.; Ley, R.E.; Mahowald, M.A.; Magrini, V.; Mardis, E.R.; Gordon, J.I. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nat. Cell Biol.* **2006**, *444*, 1027–1031. [[CrossRef](#)]
21. Hansen, A.K.; Ling, F.; Kaas, A.; Funda, D.P.; Farlov, H.; Buschard, K. Diabetes preventive gluten-free diet decreases the number of caecal bacteria in non-obese diabetic mice. *Diabetes/Metab. Res. Rev.* **2006**, *22*, 220–225. [[CrossRef](#)]
22. Wen, L.; Ley, R.E.; Volchkov, P.Y.; Stranges, P.B.; Avanesyan, L.; Stonebraker, A.C.; Hu, C.; Wong, F.S.; Szot, G.L.; Bluestone, J.A.; et al. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nat. Cell Biol.* **2008**, *455*, 1109–1113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Rausch, P.; Basic, M.; Batra, A.; Bischoff, S.C.; Blaut, M.; Clavel, T.; Gläsner, J.; Gopalakrishnan, S.; Grassl, G.A.; Günther, C.; et al. Analysis of factors contributing to variation in the C57BL/6j fecal microbiota across German animal facilities. *Int. J. Med. Microbiol.* **2016**, *306*, 343–355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Sajilata, M.G.; Singhal, R.S.; Kulkarni, P.R. Resistant Starch? A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2006**, *5*, 1–17. [[CrossRef](#)]
25. Copeland, L.; Blazek, J.; Salman, H.; Tang, M.C. Form and functionality of starch. *Food Hydrocoll.* **2009**, *23*, 1527–1534. [[CrossRef](#)]
26. Hoover, R. The Impact of Heat-Moisture Treatment on Molecular Structures and Properties of Starches Isolated from Different Botanical Sources. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2010**, *50*, 835–847. [[CrossRef](#)]
27. Englyst, H.N.; Kingman, S.M.; Cummings, J.H. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *Eur. J. Clin. Nutr.* **1992**, *46*, S33–S50.
28. Englyst, H.N.; Kingman, S.M.; Hudson, G.J.; Cummings, J.H. Measurement of resistant starch in vitro and in vivo. *Br. J. Nutr.* **1996**, *75*, 749–755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Berry, C. Resistant starch: Formation and measurement of starch that survives exhaustive digestion with amylolytic enzymes during the determination of dietary fibre. *J. Cereal Sci.* **1986**, *4*, 301–314. [[CrossRef](#)]
30. Wang, S.; Copeland, L. Molecular disassembly of starch granules during gelatinization and its effect on starch digestibility: A review. *Food Funct.* **2013**, *4*, 1564–1580. [[CrossRef](#)]
31. Kienzle, E. Carbohydrate metabolism of the cat 2. Digestion of starch. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **1993**, *69*, 102–114. [[CrossRef](#)]
32. Kienzle, E.; Pohlenz, J.; Radicke, S. Morphology of Starch Digestion in The Horse. *J. Veter. Med. Ser. A* **1997**, *44*, 207–221. [[CrossRef](#)]
33. Böswald, L.; Wenderlein, J.; Straubinger, R.; Ulrich, S.; Kienzle, E. Processing Matters in Nutrient-Matched Laboratory Diets for Mice—Energy and Nutrient Digestibility. *Animals* **2021**, *11*, 523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Chung, H.-J.; Lim, H.S.; Lim, S.-T. Effect of partial gelatinization and retrogradation on the enzymatic digestion of waxy rice starch. *J. Cereal Sci.* **2006**, *43*, 353–359. [[CrossRef](#)]
35. Kleessen, B.; Stoof, G.; Proll, J.; Schmiedl, D.; Noack, J.; Blaut, M. Feeding resistant starch affects fecal and cecal microflora and short-chain fatty acids in rats. *J. Anim. Sci.* **1997**, *75*, 2453–2462. [[CrossRef](#)]
36. Tachon, S.; Zhou, J.; Keenan, M.; Martin, R.; Marco, M.L. The intestinal microbiota in aged mice is modulated by dietary resistant starch and correlated with improvements in host responses. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2012**, *83*, 299–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Herrmann, E.; Young, W.; Reichert-Grimm, V.; Weis, S.; Riedel, C.U.; Rosendale, D.; Stoklosinski, H.; Hunt, M.; Egert, M. In Vivo Assessment of Resistant Starch Degradation by the Caecal Microbiota of Mice Using RNA-Based Stable Isotope Probing—A Proof-of-Principle Study. *Nutrients* **2018**, *10*, 179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Desmarchelier, C.; Ludwig, T.; Scheundel, R.; Rink, N.; Bader, B.L.; Klingenspor, M.; Daniel, H. Diet-induced obesity in ad libitum-fed mice: Food texture overrides the effect of macronutrient composition. *Br. J. Nutr.* **2012**, *109*, 1518–1527. [[CrossRef](#)]
39. Reitmeier, S.; Kiessling, S.; Neuhaus, K.; Haller, D. Comparing Circadian Rhythmicity in the Human Gut Microbiome. *STAR Protoc.* **2020**, *1*, 100148. [[CrossRef](#)]
40. Lagkouvardos, I.; Kläring, K.; Heinzmann, S.S.; Platz, S.; Scholz, B.; Engel, K.-H.; Schmitt-Kopplin, P.; Haller, D.; Rohn, S.; Skurk, T.; et al. Gut metabolites and bacterial community networks during a pilot intervention study with flaxseeds in healthy adult men. *Mol. Nutr. Food Res.* **2015**, *59*, 1614–1628. [[CrossRef](#)]
41. Lagkouvardos, I.; Joseph, D.; Kapfhammer, M.; Giritli, S.; Horn, M.; Haller, D.; Clavel, T. IMNGS: A comprehensive open resource of processed 16S rRNA microbial profiles for ecology and diversity studies. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, srep33721. [[CrossRef](#)]
42. Edgar, R.C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods* **2013**, *10*, 996–998. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Edgar, R.C.; Haas, B.J.; Clemente, J.C.; Quince, C.; Knight, R. UCHIME Improves Sensitivity and Speed of Chimera Detection. *Bioinformatics* **2011**, *27*, 2194–2200. [[CrossRef](#)]
44. Edgar, R.C. UNOISE2: Improved Error-Correction for Illumina 16S and Its Amplicon Sequencing. *bioRxiv* **2016**, 081257. [[CrossRef](#)]
45. Edgar, R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 2460–2461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Wang, Q.; Garrity, G.M.; Tiedje, J.M.; Cole, J.R. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 5261–5267. [[CrossRef](#)]
47. Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. The SILVA Ribosomal RNA Gene Database Project: Improved Data Processing and Web-Based Tools. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *41*, D590–D596. [[CrossRef](#)]
48. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Niyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1547–1549. [[CrossRef](#)]

49. Lagkouvardos, I.; Fischer, S.; Kumar, N.; Clavel, T. Rhea: A transparent and modular R pipeline for microbial profiling based on 16S rRNA gene amplicons. *PeerJ* **2017**, *5*, e2836. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Jost, L. Partitioning diversity into independent alpha and beta components. *Ecology* **2007**, *88*, 2427–2439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Chen, J.; Bittinger, K.; Charlson, E.S.; Hoffmann, C.; Lewis, J.; Wu, G.D.; Collman, R.G.; Bushman, F.D.; Li, H. Associating microbiome composition with environmental covariates using generalized UniFrac distances. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 2106–2113. [[CrossRef](#)]
52. Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate—A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B-Methodol.* **1995**, *57*, 289–300. [[CrossRef](#)]
53. Yoon, S.-H.; Ha, S.-M.; Kwon, S.; Lim, J.; Kim, Y.; Seo, H.; Chun, J. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2017**, *67*, 1613–1617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Risely, A. Applying the core microbiome to understand host–microbe systems. *J. Anim. Ecol.* **2020**, *89*, 1549–1558. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Do, M.H.; Lee, H.-B.; Lee, E.; Park, H.-Y. The Effects of Gelatinized Wheat Starch and High Salt Diet on Gut Microbiota and Metabolic Disorder. *Nutrients* **2020**, *12*, 301. [[CrossRef](#)]
56. Lagkouvardos, I.; Pukall, R.; Abt, B.; Foessel, B.U.; Meier-Kolthoff, J.P.; Kumar, N.; Bresciani, A.; Martínez, I.; Just, S.; Ziegler, C.; et al. The Mouse Intestinal Bacterial Collection (miBC) provides host-specific insight into cultured diversity and functional potential of the gut microbiota. *Nat. Microbiol.* **2016**, *1*, 16131. [[CrossRef](#)]
57. Lagkouvardos, I.; Lesker, T.R.; Hitch, T.C.A.; Gálvez, E.J.C.; Smit, N.; Neuhaus, K.; Wang, J.; Baines, J.F.; Abt, B.; Stecher, B.; et al. Sequence and cultivation study of Muribaculaceae reveals novel species, host preference, and functional potential of this yet undescribed family. *Microbiome* **2019**, *7*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Miyake, S.; Ding, Y.; Soh, M.; Low, A.; Seedorf, H. Cultivation and description of *Duncaniella dubosii* sp. nov., *Duncaniella freteri* sp. nov. and emended description of the species *Duncaniella muris*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2020**, *70*, 3105–3110. [[CrossRef](#)]
59. Ormerod, K.L.; Wood, D.L.A.; Lachner, N.; Gellatly, S.L.; Daly, J.N.; Parsons, J.D.; Dal’Molin, C.G.O.; Palfreyman, R.W.; Nielsen, L.K.; Cooper, M.A.; et al. Genomic characterization of the uncultured Bacteroidales family S24-7 inhabiting the guts of homeothermic animals. *Microbiome* **2016**, *4*, 36. [[CrossRef](#)]
60. Macfarlane, G.; Gibson, G.R. Formation of glycoprotein degrading enzymes by *Bacteroides fragilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1991**, *77*, 289–293. [[CrossRef](#)]
61. Desai, M.S.; Seekatz, A.M.; Koropatkin, N.M.; Kamada, N.; Hickey, C.A.; Wolter, M.; Pudlo, N.A.; Kitamoto, S.; Terrapon, N.; Muller, A.; et al. A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell* **2016**, *167*, 1339–1353.e21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Do, M.H.; Lee, E.; Oh, M.-J.; Kim, Y.; Park, H.-Y. High-Glucose or -Fructose Diet Cause Changes of the Gut Microbiota and Metabolic Disorders in Mice without Body Weight Change. *Nutrients* **2018**, *10*, 761. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Cao, W.; Chin, Y.; Chen, X.; Mi, Y.; Xue, C.; Wang, Y.; Tang, Q. The role of gut microbiota in the resistance to obesity in mice fed a high fat diet. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2019**, *71*, 453–463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Morita, H.; Toh, H.; Fukuda, S.; Horikawa, H.; Oshima, K.; Suzuki, T.; Murakami, M.; Hisamatsu, S.; Kato, Y.; Takizawa, T.; et al. Comparative Genome Analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* Reveal a Genomic Island for Reuterin and Cobalamin Production. *DNA Res.* **2008**, *15*, 151–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## 2 Publikation Energie- und Nährstoffverdaulichkeit



Article

### Processing Matters in Nutrient-Matched Laboratory Diets for Mice—Energy and Nutrient Digestibility

Linda F. Böswald <sup>1,\*</sup>, Jasmin Wenderlein <sup>2</sup>, Reinhard K. Straubinger <sup>2</sup>, Sebastian Ulrich <sup>2</sup> and Ellen Kienzle <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Chair for Animal Nutrition and Dietetics, Ludwig-Maximilians-Universität München, 85764 Oberschleißheim, Germany; kienzle@tiph.vetmed.uni-muenchen.de

<sup>2</sup> Institute for Infectious Diseases, Ludwig-Maximilians-Universität München, 80539 Munich, Germany; jasmin.wenderlein@micro.vetmed.uni-muenchen.de (J.W.); Reinhard.Straubinger@micro.vetmed.uni-muenchen.de (R.K.S.); ulrich@micro.vetmed.uni-muenchen.de (S.U.)

\* Correspondence: linda.boeswald@lmu.de

**Simple Summary:** The processing of feed items has an impact on their nutritive properties, e.g., differences in the degree of starch gelatinization between pelleted and extruded diets are apparent. In many species, including humans, it is known that this influences the digestion process on enzymatic and microbial levels, and thus the animals' ability to utilize the diet. Laboratory animal diets are often marketed as identical products, e.g., a standard maintenance diet, which can be purchased in pelleted or extruded form. The hypothesis that there are differences in energy and nutrient digestibility among such products, even though they are claimed to be the same diet, was investigated. The results of the digestibility trials confirm the hypothesis. Additionally, they show that even among batches of the same laboratory rodent diet in the same form, standardization is not always achieved.

**Abstract:** Starch gelatinization is a major determinant of carbohydrate digestibility and varies with diet processing. Laboratory rodent diets are often marketed as identical, but are sold in different forms, regardless of the markedly higher starch gelatinization in extruded than in pelleted diets. Our hypothesis was that this would impact energy and nutrient digestibility in mice fed pellets or extrudate, respectively. Trial 1 showed that feeding C57BL/6 mice a standard maintenance diet in extruded form results in a significantly higher digestibility of organic matter, energy, and carbohydrates than the identical diet in pelleted form. The replication of the experiment, however, revealed a variation between batches of the same pelleted diet regarding starch and total dietary fiber contents. Given the significant differences in diet digestibility and the potential impacts of digestibility on nutrient utilization, the intestinal microbiome, and intermediary metabolism, trials performed with differently processed diets are not comparable. This might partly explain failures to reproduce results, especially in gastrointestinal or microbiome research. Considering this impact on experimental animals, the degree of starch gelatinization should be declared in the diet information for laboratory animal diets. The differences between batches of laboratory animal diets as observed in the pellets are not acceptable.

**Keywords:** standardization; carbohydrate digestibility; feed processing; starch gelatinization; gut



**Citation:** Böswald, L.F.; Wenderlein, J.; Straubinger, R.K.; Ulrich, S.; Kienzle, E. Processing Matters in Nutrient-Matched Laboratory Diets for Mice—Energy and Nutrient Digestibility. *Animals* **2021**, *11*, 523. <https://doi.org/10.3390/ani11020523>

Academic Editor: Domenico Nuzzo  
Received: 11 January 2021  
Accepted: 13 February 2021  
Published: 17 February 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

#### 1. Introduction

Laboratory animal diets are available in different forms, e.g., pelleted, extruded, and paste-like forms, or in the form of a meal or powder. Each form has its own benefits and disadvantages, however pellets are used most often. Pelleted and powdered variations of the same diet resulted in significant differences in growth and body composition in C57BL/6 mice [1]. Levy et al. [2] investigated the effects of pelleted vs. extruded diets in two strains of laboratory mice. They found significant effects of the diet form and strain of mice on feed disappearance, mass of excreta, and cage soilage. In terms of

animal nutrition, the relation between feed intake and fecal mass can give a rough estimate of feed utilization. Taking into account the differences in the processing techniques for pelleting and extrusion, the properties of dietary carbohydrates, i.e., starch, may explain some of the effects described by Levy et al. [2]. Starch is the main carbohydrate source in typical laboratory mouse diets; its properties are highly variable depending on source and processing type and impact the nutritive effects [3].

When treated with heat and moisture, starch will gelatinize [4]. The starch granules from plant materials are destroyed to a certain degree and the altered starch molecules become partly soluble, and thus more degradable, primarily by amylase, in the gastrointestinal tract. This can be quantified by the degree of starch gelatinization and varies with the type of processing a diet is subjected to. Extrusion uses the combination of shearing forces, heat, moisture, and pressure to partly destroy the granules [5]. Pelleting is a low-moisture, thermo-mechanical method of processing [6] that does not generate as much shear forces or heat as extrusion does [7].

In farm animal nutrition, the total starch content and degree of starch gelatinization are important parameters in assessing the effect on animal performance [4]. Previous observations have shown that the degree of starch gelatinization varies between the differently processed types of supposedly identical laboratory animal maintenance diets, i.e., pellets vs. extrudate [8].

Gelatinized starch can be digested more easily via the pancreatic amylase and disaccharidases in the small intestine of monogastric mammals, resulting in the absorption of glucose. Starch escaping digestion in the small intestine passes on into the large intestine, where it may be used as a substrate for microbial fermentation or is excreted via feces. The metabolites of microbial fermentation, volatile fatty acids (VFAs) and lactate, contribute to enterocyte nutrition, and if absorbed, to the host organism's energy supply [9,10]. A decrease in chyme pH indicates increased VFA synthesis, and therefore microbial fermentation due to higher availability of the substrate in various species [11–15]. However, glucose absorption from dietary starch is much higher in case of small intestinal enzymatic digestion, while in large intestinal fermentation more VFAs are absorbed.

In laboratory animal nutrition, maintenance diets are often marketed as pelleted and extruded products with identical product information. Even though it is known that the characterization of starch, especially in cereal-based products such as rodent diets, is important [16], labeled information on the degree of starch gelatinization is often lacking. A previous pilot study has shown that starch gelatinization differs significantly between such product pairs [8].

The aim of the present study was to show the impact of processing, i.e., pelleting vs. extrusion, on the growth and energy and nutrient digestibility of laboratory mice. Our hypothesis was that the higher degree of starch gelatinization in the extruded diet would lead to an overall higher energy digestibility as compared to pelleted diet.

## 2. Animals, Materials and Methods

### 2.1. Animals and Diets

Fifty-four young adult mice (C57BL/6 strain, female, purchased from envigo RMS B. V., Horst, Netherlands, at the age of 8 weeks) were used. They were housed in groups of 2–3 on silicate bedding (Tigerino Crystals, Matina GmbH, Munich, Germany) in isocages (Techniplast, Buguggiate, Italy) in a specific pathogen-free (SPF) facility. The mice were allocated to the experimental groups P (pelleted diet) and E (extruded diet) after a three-week adaptation period to the housing system. During the feeding trial, the mice were fed a commercial maintenance diet that is available either in pelleted (P) or extruded (E) form. Trials 1 and 2 were conducted following the same setup, but in two successive runs with different batches of the same diets to serve as a biological replication. The diets are described by the manufacturer to be based on soy and cereals (wheat, corn). Details of all diets are summarized in Table 1.

**Table 1.** Energy and nutrient contents and degrees of starch gelatinization for the diets used in both trials 1 and 2 in the pelleted (P) and extruded (E) diets.

Diet Parameter	Labeled Content	Trial 1		Trial 2	
		P1	E1	P2	E2
Gross energy (MJ/kg)	-	17.23	17.56	16.6	17.3
Dry matter (%)	88.8	89.8	89.8	89.5	88.5
Crude protein (%)	20.6	23.4 *	19.5	18.7	22.5
Crude fat (%)	4.1	3.6	4.3	2.5 *	5.1 *
Crude ash (%)	5.9	5.8	5.6	4.8	6.1
Crude fiber (%)	6.1	6.1	8.2 *	5.2	5.8
Nitrogen-free extracts (% calculated)	55.0	50.9	52.2	58.3	49.0
Starch (%)	-	27	27	43	28
Starch gelatinization (%)					
- before autoclaving	-	22	64	22	50
- after autoclaving	-	15	57	17	70
Total dietary fiber (%)	-	27.8	24.5	15.9	23.3
Soluble dietary fiber (%)	-	3.4	4.0	2.0	3.9
Insoluble dietary fiber (%)	-	24.4	20.5	13.9	19.4
Sugars (%)	-	6.2	6.1	4.6	6.5

\* Values marked with an asterisk (\*) deviate from the labeled value more than the legal tolerance stated in Regulation (EC) No. 767/2009, amended by Regulation (EC) 939/2010. The allowed tolerance for crude protein is  $\pm 12.5\%$  for a labeled content between 8 and 24%, and  $\pm 1\%$  for crude fat with a labeled content  $< 8\%$ .

Trial 1: Groups P and E consisted of 11 mice each. The P diet contained 27% starch, with a starch gelatinization degree of 22% (15% after autoclaving into the SPF facility). Diet E had the same starch content but higher degrees of starch gelatinization (64% before and 57% after autoclaving). Each group was distributed into five cages (4  $\times$  2 mice and 1  $\times$  3 mice per cage).

Trial 2: Groups P and E consisted of 16 mice each (pair-housed in 8 cages per group). New batches of the same P and E diets as in trial 1 were purchased for trial 2 from the same manufacturer. Diet P had a starch content of 43%, with starch gelatinization degrees of 22% before and 17% after autoclaving. The starch content of diet E was 28%, with starch gelatinization degrees of 50% before and 70% after autoclaving.

## 2.2. Digestibility Trial

Body weight (BW) was recorded weekly. Daily feed intake per cage was documented by weighing the amount of diet offered and weighing the refusals after 24 h. After the first 27 days of the experiment, a balance trial with complete fecal collection was conducted for 14 days in trial 1. The results from this trial showed that a longer collection period is advisable to obtain sufficient fecal mass, so in trial 2 the collection period lasted 17 days. Feces were lyophilized, ground, and analyzed with standard methods (bomb calorimetry, Weende analysis) [17] to assess the following nutrients: dry matter (DM), gross energy (GE), crude protein (CP), crude ash (CA), HCl-insoluble ash, and ether extracts (EE). The diets were analyzed for DM, GE, CP, CA, HCl insoluble ash and EE contents using the same methods. The dietary starch content and gelatinization degree were analyzed following standard methods (VD LUFA III 7.2.6), while fecal starch content was determined using an enzymatic kit (Cat.-No. 10 207 748 035, Boehringer Mannheim, R-Biopharm, Darmstadt, Germany).

The apparent digestibility (aD) of GE, DM, and the nutrients was calculated as follows:

$$aD(\text{nutrient}) = (\text{nutrient intake} - \text{fecal nutrient excretion}) / \text{nutrient intake} * 100 \quad (1)$$

By subtraction of CA from DM, the organic matter (OM), and in turn aD(OM), could be calculated. The dietary and fecal contents of the carbohydrate and fiber fraction (CH + F) were calculated by subtracting CP, CA, and CE from DM.

### 2.3. Organic Acids

Additional fecal samples were used for analysis of short-chain fatty acids and lactate. The samples were diluted 1:1 in distilled water and centrifuged ( $5000 \times g$  for 5 min). The supernatant was removed and laced with an internal standard and oxalic acid (2%), then centrifuged for 17 min ( $13,000 \times g$ ). Gas chromatography was performed (Shimadzu GC 2010, Flame Ionization Detector, SGE BP21 capillary column). Concentrations in mmol/L were calculated according to a 6-point calibration procedure.

### 2.4. Post-Mortem Sampling

After 56 days on the respective diets, the mice were killed via cervical dislocation. The gastrointestinal tract (GIT) was removed (stomach and intestines) and weighed. In trial 2, the liver was also removed, weighed, and frozen ( $-18^{\circ}\text{C}$ ) for further analysis. The lyophilized livers of each pair of mice sharing a cage were ground and pooled for bomb calorimetry (GE determination,  $n = 8$  per group). Chyme from the stomach, anterior and posterior small intestinal sites, cecum, and colon, as well as feces, was sampled, diluted with distilled water (1:5), and pH was measured (Inolab WTW pH Meter, Xylem Analytics Germany GmbH, Weilheim, Germany).

### 2.5. Statistics

The statistical analyses were conducted using SigmaPlot (Systat Software, San Jose, CA, USA). Comparisons between two diet groups from one trial were performed using a Student's *t*-test (significance level set to  $p = 0.05$ ). Calculations and statistics were conducted with data from individual animals, not cage units ( $n = 11$  and  $n = 16$  per group in trials 1 and 2, respectively).

## 3. Results

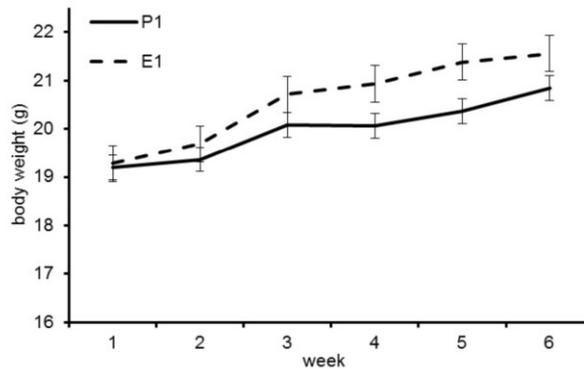
### 3.1. Diets

The analyzed nutrient content did not completely match the labeled values. In four cases, the analyzed values lay outside the legal tolerance given in Regulation (EC) 767/2009, amended by Regulation (EC) 939/2010 (see Table 1). The nutrient contents also differed markedly between P1 and P2 and E1 and E2, respectively.

Between the four diets used in the trials, there were differences in the degree of starch gelatinization. As expected based on the processing method, the extruded diets had a much higher degree of starch gelatinization than the pelleted diets. The degree of starch gelatinization was similar for P1 and P2, however the total starch contents differed considerably between these diets (27 vs. 43%, respectively, as fed), resulting in a difference in total intake of gelatinized starch in P1 vs. P2. Correspondingly, P2 had less total dietary fiber than the other diets.

### 3.2. Trial 1

The initial BW did not differ significantly between groups P1 ( $19.36 \pm 1.34$  g) and E1 ( $19.69 \pm 1.43$  g;  $p = 0.61$ ). BW increased in both groups during the trial, with higher BW in group E1 (Figure 1), however the difference in BW was not significant.



**Figure 1.** Body weight development of the mice in trial 1. Mice fed diet E1 show higher gains.

Mice maintained on diet E1 showed significantly higher apparent digestibility coefficients of GE, OM, and the CH+F (carbohydrate + fiber) fraction than group P1 ( $p < 0.001$ ; Table 2). There were no significant differences in the digestibility of CP and EE between P1 and E1 ( $p = 0.31$  and  $0.09$ , respectively).

**Table 2.** Apparent digestibility of gross energy and nutrients (mean  $\pm$  SD (%)) in the pelleted (P) and extruded (E) diets from trials 1 and 2.

aD [%]	Diet P1 <i>n</i> = 11	Trial 1 Diet E1 <i>n</i> = 11	<i>p</i>	Diet P2 <i>n</i> = 16	Trial 2 Diet E2 <i>n</i> = 16	<i>p</i>
GE	74.8 $\pm$ 0.5	80.9 $\pm$ 0.6	<0.001	84.4 $\pm$ 0.3	81.9 $\pm$ 0.6	<0.001
DM	70.8 $\pm$ 0.8	77.2 $\pm$ 0.7	<0.001	81.3 $\pm$ 0.2	77.6 $\pm$ 0.8	<0.001
OM	73.7 $\pm$ 0.6	80.3 $\pm$ 0.5	<0.001	84.7 $\pm$ 0.2	80.8 $\pm$ 0.7	<0.001
CP	82.2 $\pm$ 0.5	81.7 $\pm$ 0.9	0.31	83.8 $\pm$ 0.3	85.1 $\pm$ 0.4	<0.001
EE	91.2 $\pm$ 0.7	92.0 $\pm$ 0.5	0.09	92.9 $\pm$ 1.4	93.4 $\pm$ 1.0	0.71
CH+F	69.2 $\pm$ 0.7	79.1 $\pm$ 0.4	<0.001	85.1 $\pm$ 1.7	81.7 $\pm$ 4.5	<0.05

aD = apparent digestibility, GE = gross energy, DM = dry matter, OM = organic matter, CP = crude protein, EE = ether extracts, CH+F = carbohydrate + fiber.

The pH levels of the colon chyme samples differed significantly between the groups (P1:  $6.9 \pm 0.3$ , E1:  $7.2 \pm 0.1$ ,  $p < 0.05$ ), but in the other sampling sites there were no significant differences (Table 3).

**Table 3.** Gastrointestinal and fecal pH values in trials 1 and 2 (mean  $\pm$  SD).

Sample	Trial 1			Trial 2		
	Diet P1 <i>n</i> = 11	Diet E1 <i>n</i> = 11	<i>p</i>	Diet P2 <i>n</i> = 16	Diet E2 <i>n</i> = 16	<i>p</i>
stomach	3.9 $\pm$ 0.5	3.7 $\pm$ 0.7	0.46	3.9 $\pm$ 0.9	3.6 $\pm$ 0.5	0.33
anterior small intestine	6.7 $\pm$ 0.3	6.6 $\pm$ 0.3	0.54	6.7 $\pm$ 0.5	6.7 $\pm$ 0.3	0.76
posterior small intestine	7.0 $\pm$ 0.4	7.0 $\pm$ 0.3	0.70	7.3 $\pm$ 0.3	7.2 $\pm$ 0.2	0.11
cecum	6.5 $\pm$ 1.1	6.9 $\pm$ 0.4	0.24	7.2 $\pm$ 0.3	7.1 $\pm$ 0.2	0.16
colon	6.9 $\pm$ 0.3	7.2 $\pm$ 0.1	<0.05	7.6 $\pm$ 0.3	7.5 $\pm$ 0.3	0.14
faeces	7.6 $\pm$ 0.1	7.4 $\pm$ 0.1	<0.05	7.9 $\pm$ 0.2	7.7 $\pm$ 0.4	0.33

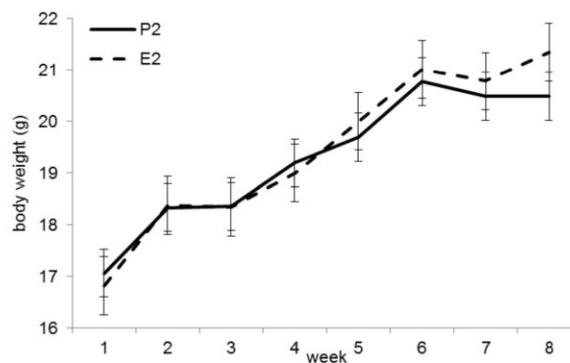
There was a trend of higher fecal acetic acid levels in P1 as compared to E1 ( $p = 0.09$ ; Table 4). The ratio of acetic acid to propionic acid was markedly higher in P1 than E1 (7.15/1 vs. 5.92/1).

**Table 4.** Fecal concentrations of organic acids (mean  $\pm$  SD (mmol/L)) and the ratios of fecal acetic acid to propionic acid for both trials.

mmol/L	Trial 1		<i>p</i>	Trial 2		<i>p</i>
	Diet P1 <i>n</i> = 11	Diet E1 <i>n</i> = 11		Diet P2 <i>n</i> = 16	Diet E2 <i>n</i> = 16	
acetic acid	8.37 $\pm$ 1.52	6.95 $\pm$ 1.61	0.09	6.44 $\pm$ 1.16	6.73 $\pm$ 0.97	0.60
propionic acid	1.16 $\pm$ 0.15	1.17 $\pm$ 0.15	0.92	1.19 $\pm$ 0.17	1.25 $\pm$ 0.18	0.47
n-butyric acid	1.18 $\pm$ 0.21	1.09 $\pm$ 0.02	0.57	0.47 $\pm$ 0.08	0.55 $\pm$ 0.08	0.06
acetic acid/propionic acid	7.15 / 1	5.92/1		5.41/1	5.38/1	

### 3.3. Trial 2

The initial BW did not differ between groups P2 and E2 ( $p = 0.53$ ). At the end of the trial, animals in group E2 were significantly heavier (mean  $21.3 \pm 1.0$  g vs.  $20.5 \pm 1.1$  g,  $p < 0.05$ , Figure 2). Feed intakes were significantly higher in group E2 ( $4.31 \pm 0.21$  g/mouse/day) than in group P2 ( $3.62 \pm 0.33$  g/mouse/day;  $p < 0.001$ ).



**Figure 2.** Bodyweight (BW) development in trial 2. The final BW (week 8) was significantly higher in group E2 ( $p < 0.05$ ).

Digestibility of GE, DM, and OM was significantly higher in diet P2 as compared to diet E2 ( $p < 0.001$ ; Table 2). For CP, digestibility was significantly higher in E2 ( $p < 0.001$ ). The carbohydrate and fiber fraction showed significantly higher digestibility in P2 than E2 ( $p < 0.05$ ). It has to be noted that group E2 showed highly similar digestibility coefficients as E1.

There were no significant differences between the pH levels of the intestinal and fecal samples in trial 2 (Table 3).

The fecal concentrations of propionic and n-butyric acid were higher in group E2 than P2 (trend for statistical significance in n-butyric acid,  $p = 0.0569$ ; Table 4). The ratios of acetic acid to propionic acid were similar between both diets from trial 2 and also compared to diet E1, but differed markedly from the same ratio in group P1.

In trial 2, post-mortem parameters were obtained. BW did not correlate with body fat content; P2 mice had a significantly higher carcass fat content ( $p < 0.05$ ; Table 5).

**Table 5.** Results of the carcass analysis from trial 2 (mean  $\pm$  SD (g)). BW = body weight; GIT = gastrointestinal tract.

Parameter	Diet P2 <i>n</i> = 16	Diet E2 <i>n</i> = 16	<i>p</i>
Gross energy (MJ/kg DM)	25.1 $\pm$ 1.9	23.7 $\pm$ 1.2	<0.05
Crude protein (% DM)	46.1 $\pm$ 7.3	51.9 $\pm$ 4.7	<0.05
Fat (% DM)	35.4 $\pm$ 9.6	28.4 $\pm$ 5.9	<0.05
Ash (% DM)	10.9 $\pm$ 1.6	12.1 $\pm$ 1.3	<0.05
Liver energy content (MJ/kg)	7.1 $\pm$ 0.3	6.9 $\pm$ 0.2	0.26
Liver weight in % final BW	4.7 $\pm$ 0.6	5.2 $\pm$ 0.3	<0.01
GIT weight in % final BW	13.1 $\pm$ 1.6	13.8 $\pm$ 3.1	<0.05

Group E2 mice had significantly higher absolute and relative liver weights ( $p < 0.05$ ; Table 5). Correspondingly, the liver GE content was also significantly higher in group E2 ( $p < 0.05$ ). The weight of the GIT was significantly higher in E2 than P2 ( $p < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

There were deviations in analyzed and labeled nutrient contents that exceeded the legal tolerances (see Table 1) and also marked differences between the batches (P1 vs. P2 and E1 vs. E2). The extruded diets were more similar across batches than the pelleted diets, with P2 differing most from all other diets in starch content. Nutrient levels in natural feed ingredients may differ, so some degree of variance may occur. Analysis of new batches of ingredients before use and consequent re-evaluation of diet formulation is necessary to provide constant nutrient levels in commercial diets. Legal tolerances are not necessarily nutritional tolerances, meaning that they take into account the accuracy of production and analysis, while a greater deviation does not always result in harmful effects for the animal. However, deviations from the labeled nutrient contents are misleading for the researchers using the diet. In laboratory animal diets, standardization is of the utmost importance. The variation of nutrient contents between batches of the same diet (i.e., P1 vs. P2 and E1 vs. E2) does not allow for reproducible experiments on one and the same diet when different batches have to be used.

The content of nitrogen-free extracts alone may be misleading when there is no information on starch and non-starch polysaccharide (NSP) contents. In the diets used in this study, diet P2 had a much lower content of total dietary fiber and contained more starch. The digestibility levels of P2 and E2 did not differ as much as P1 and E1, because the higher total dietary fiber content in E2 most likely counterbalanced the lower starch digestibility in P2. The lower ratio of digestible protein to digestible energy (1.12/1 vs. 1.35/1, respectively) in P2 than E2 explains the higher body fat content of the experimental mice in this study. The combination of the significantly higher body fat content and significantly lower final BW is indicative of marginal protein supply.

In the present study, the numbers of animals per group were relatively small. For digestibility trials, the number of 6 animals per group is accepted as sufficient [18]. Pair-housing is recommended where possible to minimize stress in social species [19,20], such as the mouse. Considering the 3R principles of reduction, refinement and replacement [20], it is ethically advisable not to use an unnecessarily high number of animals in an experiment. The digestibility data from this trial along with the extremely low standard deviation (see Table 2) proves that the number of animals used is valid for the target parameters.

As expected, the digestibility of energy in trial 1 and the carbohydrate plus fiber fraction were significantly higher in the extruded diet (E1) compared to the pelleted diet (P1). It can be assumed that lower pre-cecal starch digestibility in P1-fed mice led to higher influx of starch in the large intestine, resulting in higher microbial fermentation in that intestinal site. The significantly lower pH values in the colonic chyme of P1-fed animals

and the higher ratio of acetic to propionic acid, which indicate microbial fermentative activity, support that assumption [15,21].

The digestibility of diet E2 was highly similar to E1. However, the digestibility levels for P1 and P2 differed markedly, with P2 being better digestible. This can be explained by the much higher starch content of P2 (43% compared to 27%) and the corresponding lower total dietary fiber content in P2. Pelleted starch is likely to have a higher pre-cecal digestibility than many NSPs [22], and NSPs also negatively influence overall diet digestibility [23].

These differences in starch and NSP content are important with regard to quantitative digestibility. Gelatinized starch is highly digestible, whereas less processed starch is more slowly digested [24]. There is also an interaction between NSPs and starch in the digestive process. NSPs increase chyme viscosity. They may also delay absorption of glucose from starch digestion and alter the intestinal transit time, as well as the microbial fermentation patterns [13,24,25].

Some of the effects postulated above are confirmed by the differences in body composition observed in trial 2. The body fat content measured in trial 2 was significantly higher in P2 than E2, while P2 mice had a significantly lower final BW. This may resemble the “skinny-fat” phenotype [26,27] of individuals that are not obese but have a relatively high body fat content and lower lean body mass. Liver energy content was higher in P2 than E2. Because P2 livers were smaller, it can be concluded that they contained more fat as the most energy-dense compound. The higher body fat and liver fat contents in P2 combined with the lower BW can be indicative of slight protein deficiency. In general, females have small livers during marginal protein supply [28], which seemed to be the case in trial 2. Diet P2 had the lowest protein content of all four diets used in the study and contained much more carbohydrates (Table 1). The protein digestibility of P2 was significantly lower than that of E2 (Table 2). While not resulting in a clinically manifest protein deficiency, this might explain the findings in body composition.

## 5. Conclusions

The results of the present study show that laboratory mouse diets may lack standardization. Firstly, there are differences in composition between batches of the same diet that significantly influence diet digestibility and energy utilization. Secondly, there is an influence of processing on starch gelatinization and digestibility parameters, so that pelleted and extruded diets may not be marketed as identical. Because of the importance of starch content and gelatinization for pre-cecal digestibility and post-ileal microbial fermentation [29], both parameters should be declared on the diet labels.

**Author Contributions:** Conceptualization, E.K., L.F.B., R.K.S.; methodology, E.K., L.F.B.; investigation, L.F.B., J.W., S.U.; data curation, L.F.B., J.W.; writing—original draft preparation, L.F.B.; writing—review and editing, E.K., R.K.S.; supervision, E.K., R.K.S.; project administration, L.F.B.; funding acquisition, L.F.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** We are grateful to the H. Wilhelm Schaumann Foundation, who kindly funded this research.

**Institutional Review Board Statement:** The use of animals in this study was ethically approved by the Ethic Committee of the Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität München (reference number 169-03-05-2019) and followed the applicable guidelines of animal welfare.

**Data Availability Statement:** All relevant data is listed in the manuscript. Additional information can be requested from the authors upon reasonable request.

**Acknowledgments:** We are grateful for A. Zeyner and M. Bachmann, Georg-August-Universität Halle-Wittenberg, for the organic acid analysis.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

## References

1. Yan, L.; Combs, G.F., Jr.; DeMars, L.C.; Johnson, L.K. Effects of the physical form of the diet on food intake, growth, and body composition changes in mice. *J. Am. Assoc. Anim. Sci.* **2011**, *50*, 488–494.
2. Levy, D.R.; Flores, R.; Garcia, G.E.; Craig, S.L.; Jensen, V.B. Effects of Extruded Compared with Pelleted Diets on Laboratory Mice Housed in Individually Ventilated Cages and the Cage Environment. *J. Am. Assoc. Anim. Sci.* **2018**, *57*, 686–694. [[CrossRef](#)]
3. Jane, J. Starch properties, modifications, and applications. *J. Macromol. Sci. Part A Pure Appl. Chem.* **1995**, *32*, 751–757. [[CrossRef](#)]
4. Zhu, L.; Jones, C.; Guo, Q.; Lewis, L.; Stark, C.R.; Alavi, S. An evaluation of total starch and starch gelatinization methodologies in pelleted animal feed. *J. Anim. Sci.* **2016**, *94*, 1501–1507. [[CrossRef](#)]
5. Case, S.; Hamann, D.; Schwartz, S. Effect of starch gelatinization on physical properties of extruded wheat-and corn-based products. *Cereal Chem.* **1992**, *69*, 401–404.
6. Zimonja, O.; Svihus, B. Effects of processing of wheat or oats starch on physical pellet quality and nutritional value for broilers. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2009**, *149*, 287–297. [[CrossRef](#)]
7. Tran, Q.; van Lin, C.; Hendriks, W.; van der Poel, A. Lysine reactivity and starch gelatinization in extruded and pelleted canine diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2007**, *138*, 162–168. [[CrossRef](#)]
8. Böswald, L.; Kienzle, E. Differences in starch gelatinisation between differently processed laboratory rodent maintenance diets labelled as identical. In Proceedings of the 73rd Society of Nutrition Physiology (GfE) Conference, Goettingen, Germany, 13–15 March 2019.
9. Bergman, E. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol. Rev.* **1990**, *70*, 567–590. [[CrossRef](#)]
10. Wong, J.M.; Jenkins, D.J. Carbohydrate digestibility and metabolic effects. *J. Nutr.* **2007**, *137*, 2539S–2546S. [[CrossRef](#)]
11. Houdijk, J.; Hartemink, R.; Verstegen, M.; Bosch, M. Effects of dietary non-digestible oligosaccharides on microbial characteristics of ileal chyme and faeces in weaner pigs. *Arch. Anim. Nutr.* **2002**, *56*, 297–307. [[CrossRef](#)]
12. Zentek, J. Influence of diet composition on the microbial activity in the gastro-intestinal tract of dogs. I. Effects of varying protein intake on the composition of the ileum chyme and the faeces. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **1995**, *74*, 43–52. [[CrossRef](#)]
13. Drochner, W.; Kerler, A.; Zacharias, B. Pectin in pig nutrition, a comparative review. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2004**, *88*, 367–380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Kienzle, E.; Ahlborn, H.H.; Meyer, H.; Ganter, M. Effect of lactose on apparent prececal and fecal digestibility of crude nutrients and minerals in minipig. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **1995**, *74*, 227–234. [[CrossRef](#)]
15. Jiang, F.; Du, C.; Jiang, W.; Wang, L.; Du, S.-K. The preparation, formation, fermentability, and applications of resistant starch. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *150*, 1155–1161. [[CrossRef](#)]
16. Holm, J.; Lundquist, I.; Björck, I.; Eliasson, A.-C.; Asp, N.-G. Degree of starch gelatinization, digestion rate of starch in vitro, and metabolic response in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* **1988**, *47*, 1010–1016. [[CrossRef](#)]
17. Naumann, C.; Bassler, R. *Die Chemische Untersuchung von Futtermitteln. Band III: Methodenbuch*; Verlag J. Naumann: Neudamm, Germany, 1986.
18. FEDIAF *Nutritional Guidelines for Complete and Complementary Pet Food for Cats and Dogs*; Fediaf: Brussels, Belgium, 2020.
19. GfE. Opinion on the indispensability of animal experiments in animal nutrition research and suitability of alternative methods. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* **2017**, *26*, 218–224.
20. Russell, W.M.S.; Burch, R.L. *The Principles of Humane Experimental Technique*; Methuen & Co: London, UK, 1959.
21. Hald, S.; Schioldan, A.G.; Moore, M.E.; Dige, A.; Lærke, H.N.; Agnholt, J.; Bach Knudsen, K.E.; Hermansen, K.; Marco, M.L.; Gregersen, S. Effects of arabinoxylan and resistant starch on intestinal microbiota and short-chain fatty acids in subjects with metabolic syndrome: A randomised crossover study. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0159223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Haidar, M.N.; Petie, M.; Heinsbroek, L.T.; Verreth, J.A.; Schrama, J.W. The effect of type of carbohydrate (starch vs. nonstarch polysaccharides) on nutrients digestibility, energy retention and maintenance requirements in Nile tilapia. *Aquaculture* **2016**, *463*, 241–247. [[CrossRef](#)]
23. Högberg, A.; Lindberg, J.E. Influence of cereal non-starch polysaccharides and enzyme supplementation on digestion site and gut environment in weaned piglets. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2004**, *116*, 113–128. [[CrossRef](#)]
24. Sasaki, T.; Kohyama, K. Influence of non-starch polysaccharides on the in vitro digestibility and viscosity of starch suspensions. *Food Chem.* **2012**, *133*, 1420–1426. [[CrossRef](#)]
25. Spiller, G.A.; Chernoff, M.C.; Hill, R.A.; Gates, J.E.; Nassar, J.J.; Shipley, E.A. Effect of purified cellulose, pectin, and a low-residue diet on fecal volatile fatty acids, transit time, and fecal weight in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **1980**, *33*, 754–759. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Bjornvad, C.R.; Nielsen, D.H.; Armstrong, P.J.; McEvoy, F.; Hoelmkjaer, K.M.; Jensen, K.S.; Pedersen, G.F.; Kristensen, A.T. Evaluation of a nine-point body condition scoring system in physically inactive pet cats. *Am. J. Vet. Res.* **2011**, *72*, 433–437. [[CrossRef](#)]
27. Foulis, S.A.; Hughes, J.M.; Friedl, K.E. New concerns about military recruits with metabolic obesity but normal weight (“skinny fat”). *Obesity* **2020**, *28*, 223. [[CrossRef](#)]
28. Stewart, R.; Preece, R.; Sheppard, H.G. Twelve generations of marginal protein deficiency. *Br. J. Nutr.* **1975**, *33*, 233–253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Le Leu, R.K.; Brown, I.L.; Hu, Y.; Morita, T.; Esterman, A.; Young, G.P. Effect of dietary resistant starch and protein on colonic fermentation and intestinal tumourigenesis in rats. *Carcinogenesis* **2007**, *28*, 240–245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## IV. DISKUSSION

Alleine im Jahr 2019 wurden in Deutschland laut dem Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft 1.438.336 Mäuse in Tierversuchen verwendet (BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT, 2020). Für Tierversuche gelten als generelles Ziel die drei R (Refinement, Reduction, Replacement). Nach dem Aspekt Refinement sollen Tierversuche so vergleichbar wie möglich gestaltet werden (LAS INTERACTIVE, 2019). Dass in Hinblick auf Mausversuche und deren Fütterung noch Verbesserungsbedarf besteht haben bereits frühere Studien herausgefunden (DESMARCHELIER *et al.*, 2013; CLAVEL *et al.*, 2014; DANIEL *et al.*, 2014). Die Forscher um Desmarchelier fütterten Kontrollfutter und fettreiches Futter in den Konfektionierungen Pellet und Mehl an Mäuse und bemerkten, dass die Textur des Futters sich auf die Gewichtsentwicklung der Mäuse auswirkte. Insbesondere konnte in diesem Versuch gezeigt werden, dass ein pelletiertes kohlenhydratreiches Futter kein Übergewicht induzierte, dasselbe Futter als Mehl jedoch zur Entwicklung von Übergewicht führte (DESMARCHELIER *et al.*, 2013). Daniel *et al.* übernahmen den Versuchsaufbau von Desmarchelier und analysierten die Auswirkung der Futter auf das Mikrobiom von Mäusen mittels 16S-rRNA-Gensequenzierung (DANIEL *et al.*, 2014). Zu diesem Versuch untersuchten Clavel *et al.* die Auswirkung von pelletiertem oder gemahlenem Futter auf das Mikrobiom der Mäuse. Es stellte sich heraus, dass eine veränderte Zubereitung des Futters einen Einfluss auf das intestinale Mikrobiom der untersuchten Mäuse hatte (CLAVEL *et al.*, 2014).

Ziel dieser Arbeit war es festzustellen, ob sich verschieden verarbeitete kommerzielle Futtermittel für Labormäuse in ihrer Nährstoffzusammensetzung und ihrem Stärkeaufschlussgrad unterscheiden und ob sich dieser Unterschied auf Gewichtsentwicklung, Verdaulichkeit und das Mikrobiom von Mäusen auswirkt.

# 1 Veränderung der Nährstoffzusammensetzung

Kommerziell erhältliche Labortierfutter für Mäuse werden vom Hersteller in verschiedenen Konfektionierungen angeboten: Pellet, Extrudat, Mehl und Hybridpellet. All diese Herstellungsformen werden gleichwertig deklariert und erscheinen demnach beliebig einsetzbar und austauschbar (Abbildung 16).

## Haltungsdiät für Ratten und Mäuse

Die Rezeptur ist eine Fixed formula auf Getreidebasis (Soja, Weizen, Mais), die frei von Luzerne, Fisch- und Tiermehl und nitrosaminarm ist. Diese Haltungsdiät ist ein Alleinfuttermittel, empfohlen für Ratten/Mäuse ab einem Alter von 8 Wochen.

### Verfügbar als

- Mehlfutter     
  - 10mm Pellets     
  - Hybridpellet     
  - Extrudat

### Produktvariationen

Die Rezeptur ist optional auch in einer oder einer Kombination der folgenden Varianten verfügbar.

#### Variante P

Phytoöstrogenfrei

#### Variante Fortified

autoklavierbar, erhöhter Vitamingehalt, bei Bedarf gepudert

#### Variante Bestrahlt

bestrahlt mit 5 bis 50kGy

#### Variante TPF

Total Pathogen Frei

*Für diese Varianten können die o.g. Inhaltsstoffe leicht variieren.*

### Umgesetzte Energie

Inhaltsstoff	Wert	Einheit
Fett	367 (11%)	kcal/kg
Protein	768 (24%)	kcal/kg
Kohlenhydrate	2.091 (65%)	kcal/kg

### Rohnährstoffe und Feuchtigkeit

Inhaltsstoff	Wert	Einheit
Feuchtigkeit	113.426 (11,3%)	mg/kg
Rohasche	58.553 (5,9%)	mg/kg
Rohfaser	60.744 (6,1%)	mg/kg
Rohfett	40.791 (4,1%)	mg/kg
Rohprotein	192.111 (19,2%)	mg/kg
Stickstofffreie Extraktstoffe	534.374 (55%)	mg/kg

Abbildung 16: Beispiel einer Haltungsdiät für Labormäuse - Produktdatenblatt

Eine Weender-Analyse und die Bestimmung der Stärkegelatinisierung ließ im Falle der hier verwendeten Chargen deutliche Unterschiede zwischen den pelletierten und extrudierten Futtern erkennen. Überraschenderweise unterschieden sich insbesondere die beiden pelletierten Futter beim Nachkauf der zweiten Charge in einem sechsmonatigen Zeitintervall deutlich voneinander. Insbesondere hinsichtlich des Stärkegehalts wich das Futtermittel P2 deutlich von allen anderen in diesem Versuch verwendeten Chargen ab (Publikation 1, Tabelle 1).



**Abbildung 17: Mauskäfige**

**Links:** Gruppe mit pelletiertem Futter, **Rechts:** Gruppe mit extrudiertem Futter

Es konnte zudem eine Abweichung der gemessenen Nährstoffzusammensetzung von dem auf der Packung deklarierten Inhalt festgestellt werden, die die gesetzlichen Toleranzen der Verordnung (EG) Nr. 767/2009 und deren Änderung, Verordnung (EU) Nr. 939/2010 überschritt (Publikation 2, Tabelle 1). Dabei ist für Rohproteine mit einem angegebenen Gehalt von 8 - 24 % eine Toleranz von  $\pm 12,5$  % gesetzlich zugestanden, für Rohfett mit einem Gehalt von weniger als 8 % eine gesetzliche Toleranz von  $\pm 1$  %, sowie für Rohfaser mit einem angegebenen Gehalt von weniger als 10 % eine gesetzliche Toleranz von  $\pm 1,7$  % erlaubt ((EU) NR. 939/2010).

Bei natürlichen Futtermitteln ist eine Veränderung des Nährstoffgehalts und damit eine gewisse Abweichung der Zusammensetzung des Futters nicht ungewöhnlich. Dementsprechend ist es dringend notwendig, dass neue Chargen unter ständiger Kontrolle der Nährstoffzusammensetzung und Evaluierung der Formulierung des Futtermittels stehen sollten, damit der Nährstoffgehalt in kommerziellen Labortierfuttermitteln so konstant wie möglich gehalten wird. Dabei stellen die gesetzlichen Toleranzen keine ernährungswissenschaftlichen Spielräume dar, sie berücksichtigen lediglich die generell mögliche Fehlerfreiheit der Produktion und Analyse von Futtermitteln. Eine größere Veränderung der Zusammensetzung des Futtermittels wirkt sich dabei nicht zwingend negativ auf das Tier aus. Allerdings können derartige Abweichungen der Inhaltsangaben für Wissenschaftler und deren Arbeiten störend sein. Insbesondere bei der Verwendung von Versuchstierfuttern ist eine Standardisierung von höchster Wichtigkeit für die Reproduktion von Experimenten. Die Abweichung der von uns analysierten Futtermittel macht eine Reproduktion des Experiments unmöglich, da sogar ein exakt identisch deklariertes Futtermittel eine starke Abweichung zwischen den zwei in diesem Versuch verwendeten Chargen aufwies (P1 vs. P2) (Publikation 2, Tabelle 1).

Ebenso erscheint die alleinige Angabe der Stickstofffreien Extraktstoffe (NfE) irreführend, wenn Angaben wie Stärke oder Nicht-Stärke Polysaccharide (NSP) nicht verfügbar sind. In den hier untersuchten Futtermitteln zeigte sich für P2 ein niedrigerer Gehalt an Ballaststoffen bei erhöhtem Stärkegehalt (Publikation 2, Tabelle 1).

## 2 Verdaulichkeit

Entsprechend des höheren Stärkeaufschlussgrades in E1 war die scheinbare Verdaulichkeit der Bruttoenergie und die scheinbare Verdaulichkeit der Kohlenhydrat- und Faserfraktion in E1 signifikant höher als in P1 (Tabelle 2). Es ist davon auszugehen, dass eine geringere präcaecale Verdaulichkeit der Stärke den Einstrom der Stärke in den Dickdarm und damit eine stärkere bakterielle Fermentation in P1 bedingt hat. Diese Annahme wird durch den geringeren pH im Koloninhalt und ein höheres Acetat zu Propionat Verhältnis in P1 bestärkt. Beide Parameter zeigen die mikrobielle Aktivität in diesem Bereich an (HALD *et al.*, 2016; JIANG *et al.*, 2020). Während in einem Vergleich der Verdaulichkeiten von E1 und P1 ein deutlicher Unterschied festzustellen war, zeigte sich zwischen E2 und P2 ein geringerer Unterschied (Tabelle 2).

**Tabelle 2: Scheinbare Verdaulichkeit von Bruttoenergie und Nährstoffen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (%)) der Mäuse mit pelletierter (P) und extrudierter (E) Fütterung**

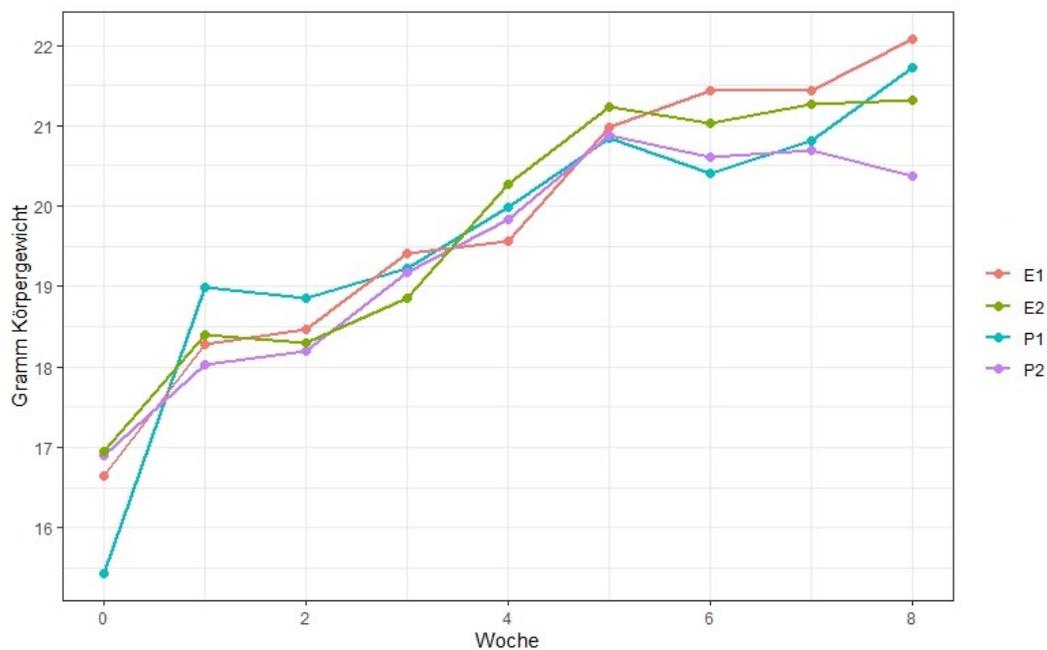
Scheinbare Verdaulichkeit (%)	P1	E1	p-Wert	P2	E2	p-Wert
<b>Bruttoenergie</b>	74,8 $\pm$ 0,5	80,9 $\pm$ 0,6	<0,001	84,4 $\pm$ 0,3	81,9 $\pm$ 0,6	<0,001
<b>Trockenmasse</b>	70,8 $\pm$ 0,8	77,2 $\pm$ 0,7	<0,001	81,3 $\pm$ 0,2	77,6 $\pm$ 0,8	<0,001
<b>Organische Substanz</b>	73,7 $\pm$ 0,6	80,3 $\pm$ 0,5	<0,001	84,7 $\pm$ 0,2	80,8 $\pm$ 0,7	<0,001
<b>Rohprotein</b>	82,2 $\pm$ 0,5	81,7 $\pm$ 0,9	0,31	83,8 $\pm$ 0,3	85,1 $\pm$ 0,4	<0,001
<b>Ätherextrakte</b>	91,2 $\pm$ 0,7	92,0 $\pm$ 0,5	0,09	92,9 $\pm$ 1,4	93,4 $\pm$ 1,0	0,71
<b>Kohlenhydrat- und Faserfraktion</b>	69,2 $\pm$ 0,7	79,1 $\pm$ 0,4	<0,001	85,1 $\pm$ 1,7	81,7 $\pm$ 4,5	<0,05

Eine mögliche Erklärung für die fast ähnliche Verdaulichkeit von P2 und E2 wäre der höhere Gehalt an Gesamtballaststoffen in E2, der die geringere Stärkeverdaulichkeit in P2 ausbalanciert hat. Die Verdaulichkeit von E1 war ähnlich zu der Verdaulichkeit von E2, die Verdaulichkeiten von P1 und P2 unterschieden sich jedoch stark. P2 war besser verdaulich wie P1, was durch den höheren Stärkeanteil in P2 und die geringeren gesamten Ballaststoffe (Tabelle 2) bedingt sein kann. Pelletierte Stärke hat vermutlich eine bessere präcaecale Verdaulichkeit als Nicht-Stärke-Polysaccharide (NSP) (HAIDAR *et al.*, 2016), wobei NSP die Verdaulichkeit eines Futters verringern (SPILLER *et al.*, 1980; HÖGBERG & LINDBERG, 2004).

Die Unterschiede in Stärkegehalt und NSP-Gehalt eines Futters sind essenziell für dessen quantitative Verdaulichkeit. Gelatinisierte Stärke ist hochverdaulich, wohingegen wenig verarbeitete Stärke langsamer verdaut wird (SASAKI & KOHYAMA, 2012). Zusätzlich beeinflussen NSP die Viskosität des Darminhalts, was zu verzögerter Glukoseabsorption führt und den Verbleib des Futters im Verdauungstrakt verlängert (LATTIMER & HAUB, 2010). Diese verlängerte Verweilzeit wirkt sich auch auf die mikrobielle Fermentation aus (SPILLER *et al.*, 1980).

### 3 Gewichtsentwicklung und Phänotyp

In Versuchsteil 1 gab es zu Beginn des Versuchs keinen signifikanten Unterschied des Körpergewichts zwischen P1 und E1. In beiden Gruppen nahm das Gewicht im Verlauf des Experiments zu, wobei die Gruppe E1 am Ende des Versuchs etwas mehr wog als die Gruppe P1. Auch im zweiten Versuchsteil zeigte sich zu Beginn des Experiments kein signifikanter Unterschied des Körpergewichts der Gruppen E2 und P2. Auch in diesem Versuch nahmen beide Versuchsgruppen im Verlauf des Experiments an Gewicht zu. In diesem Versuchsteil war jedoch zu beobachten, dass die Gruppe E2 zum Ende des Versuchs signifikant mehr wog als die Gruppe P2 (Abbildung 18).



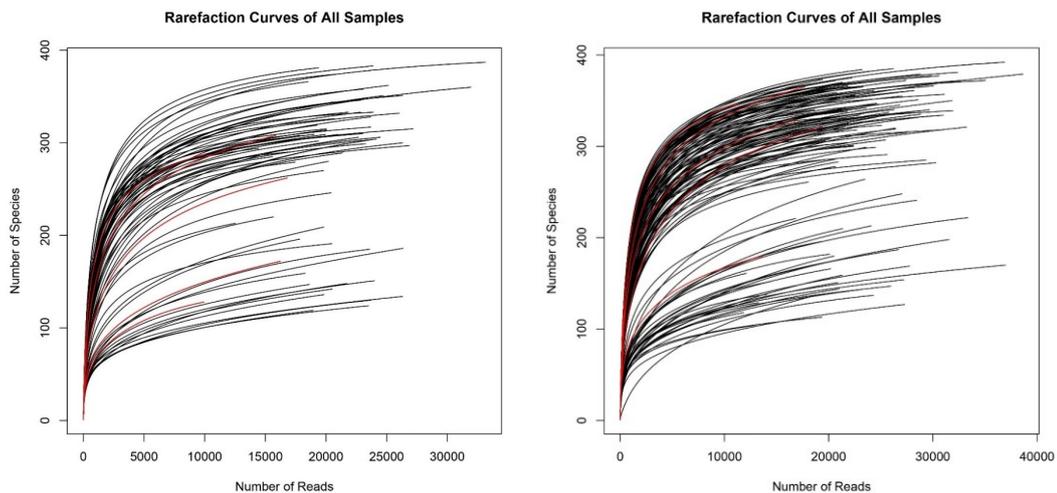
**Abbildung 18: Gewichtsentwicklung aller Versuchsgruppen (E = Extrudat, P = Pellet)**

Auffällig war bei der Analyse der Mäusekadaver von Versuchsteil 2, dass P2 trotz geringerem Körpergewicht einen höheren Körperfettgehalt aufwies als E2. Der Phänotyp der P2-Mäuse ähnelt der Beschreibung des Phänotyps *skinny fat* (BJORNVAD *et al.*, 2011; FOULIS *et al.*, 2020). Dabei sind Individuen dieses Phänotyps meist insgesamt schlank und haben eine geringe Körpermasse, der Fettanteil ist jedoch erhöht. Neben einem erhöhten Körperfettanteil zeigten die Lebern der P2-Mäuse auch einen erhöhten Energiegehalt bei geringerem Gewicht als die Lebern der E2-Mäuse. Diese Beobachtung lässt die Annahme zu, dass die Lebern der P2-Mäuse einen höheren Fettgehalt aufwiesen. Zu ähnlichen Ergebnissen kam ein

koreanisches Forschungsteam bei der Fütterung eines Weizenstärkefutters (vergleichbar mit. P2) (DO *et al.*, 2020). Eine Kombination aus höherer Körperfettmasse in Körper und Leber bei geringem Körpergewicht kann zudem ein Indikator für eine unzureichende Proteinversorgung sein (STEWART *et al.*, 1975). Analysen des Futters können diese Vermutung unterstützen (Publikation 2, Tabelle 1) und werden durch eine geringere Proteinverdaulichkeit der Gruppe P2 gestützt (Tabelle 2). Das Verhältnis von verdaulichem Protein zu verdaulicher Energie (P2: 1,12/1; E2 1,35/1) in P2 im Vergleich zu E2 könnte den höheren Fettgehalt der P2-Mäusekadaver in diesem Versuch erklären.

## 4 Mikrobiom

Die verwendeten Proben aus Magen, Dünndarm, Caecum und Kolon wurden nach standardisierten Protokollen entnommen und zeigten vergleichbare Ergebnisse für *Read*-Anzahl, Normalisierung (Abbildung 19) und  $\alpha$ -Diversität (Publikation 1, Tabellen 1 und 2).



**Abbildung 19: Rarefaction-Curves beider Versuchsteile**

**Links:** *Rarefaction-Curve* Versuchsteil 1

**Rechts:** *Rarefaction-Curve* Versuchsteil 2

rot: fünf am meisten unterrepräsentierte Proben

Der Kot aus diesem Versuch wurde nicht standardisiert entnommen, da kurze, festgelegte Probennahmen nicht durchführbar waren und das Material nicht sofort nach dem Kotabsatz aus dem Käfig entnommen wurde. Somit könnten Umweltfaktoren zu einer weiteren Fermentierung und Reorganisation des Mikrobioms geführt haben. Diese Beobachtung unterstreicht die Wichtigkeit einer standardisierten Probennahme und der Verwendung von frisch abgesetztem Kot. Neue Arbeiten haben zudem ergeben, dass das Mikrobiom im Kot nicht mit dem Mikrobiom des Gastrointestinaltraktes vergleichbar ist. Zudem scheint der Umwelteinfluss und das Absinken des pH-Wertes innerhalb von zwei Stunden zu genügen, um das Mikrobiom des Kots als nicht mehr repräsentativ für den Gastrointestinaltrakt zu werten (LKHAGVA *et al.*, 2021). Somit ergeben sich aus dem Kot keine für die Verstoffwechslung des Futters im Darm repräsentativen Parameter. Ebenso ist die Zusammensetzung des Mikrobioms in diesem Versuch in den verschiedenen Regionen vergleichbar mit der Beobachtung von Lkhagava (LKHAGVA *et al.*, 2021).

Im Kapitel Veränderung der Nährstoffzusammensetzung wurden die Unterschiede zwischen den Futtermitteln, die in diesem Versuch verwendet wurden, bereits ausführlich beschrieben (siehe Veränderung der Nährstoffzusammensetzung). Es ist kaum überraschend, dass die in diesem Versuch festgestellten Unterschiede bzgl. Nährstoffzusammensetzung und Verdaulichkeit auch zu Veränderungen im Mikrobiom führen können. Die deutlichen Unterschiede zwischen den beiden pelletierten Chargen hatten einen Einfluss auf das Mikrobiom und verhinderten eine Reproduktion der Ergebnisse aus Versuchsteil 1 in Versuchsteil 2. Diese veränderte Nährstoffzusammensetzung der beiden Chargen des pelletierten Futtermittels ließ deutliche Veränderungen im Mikrobiom zwischen den Gruppen P1 und P2 erkennen (Publikation 1 Abbildungen 4b und 6b).

Das Mikrobiom in Versuch 1 zeigte einen höheren relativen Reichtum der Familie Muribaculaceae in E1 als P1. *Limosilactobacillus reuteri* war demgegenüber reicher in P1 als E1 vorhanden (Publikation 1 Abbildung 4b).

In Versuch 2 zeigten sich im Mikrobiom ähnliche Unterschiede im Genus *Limosilactobacillus reuteri* mit einem höheren Reichtum in P2 als E2 im Dünndarminhalt. Die Mitglieder der Familie Muribaculaceae zeigten im Vergleich zum Versuch 1 jedoch gegensätzliche Ergebnisse in Versuch 2. Einige Spezies dieser Familie, die in Versuch 1/ E1 vermehrt vorkamen, zeigten in Versuch 2 einen signifikant höheren Reichtum in P2 im Vergleich zu E2. Einige Spezies dieser Familie aus dem Genus *Duncaniella* zeigten einen signifikant höheren Reichtum in der Gruppe E2, jedoch keine signifikanten Unterschiede im Versuch 1 (Publikation 1, Abbildungen 4b und 6b).

Der Einfluss der Zusammensetzung des Futters und verschiedener Konfektionierungen des Futters auf das Mikrobiom wurde für Caecumproben bereits beschrieben. Desmarchelier *et al.* haben eine Veränderung in der Entwicklung des Körpergewichts bei der Fütterung mit pelletiertem oder gemahlenem Futter feststellen können (DESMARCHELIER *et al.*, 2013). Clavel *et al.* beschrieb für einen Versuch zum Mikrobiom, entsprechend dem Versuchsaufbau von Desmarchelier *et al.* (DANIEL *et al.*, 2014), die Veränderungen im Mikrobiom zwischen Labormäusen, die mit pelletiertem oder gemahlenem Futter ernährt wurden. Dabei konnte er feststellen, dass bei dem pelletierten Futter der Stamm Firmicutes erhöht war, bedingt durch eine erhöhte Anzahl an Lachnospiraceae und Ruminococcaceae. Ebenso ließ

sich ein Rückgang des Stammes *Verrucomicrobia* auf Grund geringerer Anzahlen von Akkermansiaceae feststellen. Dabei vermuteten die Autoren, dass Unterschiede in der Futteraufnahme, sowie eine Veränderung des Mikrobioms mit Veränderungen der Gewichtsentwicklung der Mäuse in Verbindung stehen könnten (CLAVEL *et al.*, 2014). In der vorgestellten Arbeit ließen sich diese Unterschiede im Caecum der Mäuse mit pelletiertem Futter nachvollziehen. Gruppe P1 zeigte einen Anstieg an Lachnospiraceae und eine geringere Zahl an Akkermansiaceae im Vergleich zu E1. Dabei scheint der Grad der Stärkegelatinisierung in diesem Fall ein großer Einflussfaktor für das Reichtum von Lachnospiraceae und Akkermansiaceae zu sein, da E1 und P1 außer in ihrem Stärkeaufschlussgrad in ihrer Zusammensetzung fast identisch waren (BÖSWALD *et al.*, 2021) (Publikation 2, Abbildung 3c).

Eine erst kürzlich publizierte Arbeit von Do *et al.* beschrieb den Effekt eines gelatinisierten Weizenstärkefutters (GWF) im Vergleich zu einem nicht gelatinisierten Weizenstärkefutter (WF) auf das Mikrobiom im Kot von Mäusen. Dabei fanden sie heraus, dass ein GWF zu einem Anstieg des molekularen Genus *Muribaculum* und einem Rückgang der molekularen Genera *Lactobacillus* und *Desulfovibrio* führt. Im Gegensatz dazu zeigte sich im Mikrobiom der Mäuse, die mit einem WF gefüttert wurden, ein Anstieg der molekularen Genera *Lactobacillus*, *Desulfovibrio*, *Faecalibaculum* und ein Rückgang der molekularen Genera *Muribaculum* und *Alistipes* (DO *et al.*, 2020).

In unserem Versuch zeigten sich im Inhalt des Kolons ähnliche Ergebnisse wie die von Do *et al.* (DO *et al.*, 2020). Es konnte bei den Mäusen mit der E2 Fütterung ein Anstieg des Genus *Muribaculum* beobachtet werden, sowie ein niedrigerer Gehalt an *Lactobacillus*. Bei den Mäusen mit P2 Fütterung ließ sich ein niedrigeres Niveau des Genus *Muribaculum* und ein höherer Anteil des Genus *Lactobacillus* feststellen (Publikation 1, Abbildung 5). Die anderen Probenahmestellen (Magen, Dünndarm, Caecum) zeigten diesen Unterschied jedoch nicht. Da Do *et al.* (DO *et al.*, 2020) in ihrem Versuch Kotproben nahmen, ist davon auszugehen, dass diese Ergebnisse ausschließlich in Kot und Kolon nachzuvollziehen sind. Leider wurden die Futtermittel in der Arbeit von Do *et al.* (DO *et al.*, 2020) nicht näher beschrieben, was einen direkten Vergleich der Daten verhindert.

## 5 Metabolische Eigenschaften der gefundenen molekularen Spezies

*Muribaculum* und *Duncaniella* sind erst kürzlich beschriebene Genera (LAGKOUVARDOS *et al.*, 2016a; LAGKOUVARDOS *et al.*, 2019). Auch der Metabolismus dieser Genera ist noch nicht gänzlich beschrieben und ihr Einfluss auf den Wirt ist noch weitestgehend unbekannt. Lagkouvardos *et al.* beschrieben für die Mitglieder der S24-7-Familie, die inzwischen Muribaculaceae genannt wird, die Fähigkeit zum Abbau komplexer Kohlenhydrate. Zu diesen Kohlenhydraten gehören Wirtsglykane,  $\alpha$ -Glukane und Pflanzenpolysaccharide. Neben dem Kohlenhydratstoffwechsel sind für diese Familie die Produktion der metabolischen Endprodukte Vitamin B7 und die Aminosäure Ornithin beschrieben (LAGKOUVARDOS *et al.*, 2019).

Insbesondere im Versuchsteil 2 dieser Arbeit wurden Veränderungen verschiedener Mitglieder der Familie Muribaculaceae zwischen den Mäusen mit pelletiertem und extrudiertem Futter gefunden. Dabei zeigte sich bei E2 eine höhere Anzahl an Muribaculaceae im Dünndarm- und Koloninhalt. Einige *Duncaniella*-Arten (zOTU 8, zOTU 12 und zOTU 26) waren dabei signifikant stärker in der E2 Gruppe vorhanden. Für *Duncaniella muris* (zOTU 8 mit 99,5 % Ähnlichkeit) ist beschrieben, dass diese Spezies komplexe Pflanzenpolysaccharide wie Hemicellulosen oder Pektin verdauen kann (LAGKOUVARDOS *et al.*, 2019). zOTU 12 war mit einer Ähnlichkeit von 99,8 % als *Duncaniella dubosii* zu identifizieren (MIYAKE *et al.*, 2020) und konnte mit der Spezies *Candidatus* Homeothermaceae Stamm H5 (ORMEROD *et al.*, 2016) in Verbindung gebracht werden. Diese Spezies ist Teil der Pflanzenpolysaccharid-verdauenden Gruppe (LAGKOUVARDOS *et al.*, 2019). Weitere Mitglieder dieser Gruppe sind zOTU 26 aus der Familie Muribaculaceae, das eine 99,3 % Ähnlichkeit mit dem Isolat-110 (HZI) hat und zOTU 29 aus der Familie Muribaculaceae mit einer 99,5 % Ähnlichkeit zu Isolat-36 (Harlan) (LAGKOUVARDOS *et al.*, 2019). Für andere Spezies aus diesem Versuch war eine Zuordnung zu den von Lagkouvardos *et al.* beschriebenen Spezies nicht möglich.

In der Arbeit „Processing Matters in Nutrient-Matched Laboratory Diets for Mice – Energy and Nutrient Digestibility“ von Böswald *et al.* wird beschrieben, dass der Grad der Stärkegelatinisierung in extrudierten Futtern höher ist als in pelletierten Futtern. Dies führt zu einer besseren Verdaulichkeit bei ähnlichem Stärkegehalt. Nicht gelatinisierte Stärke ist kaum präcaecal verdaulich. Bei Mäusen, die mit pelletiertem Futter versorgt werden, ist der Anteil an unverdauter Stärke im Dickdarm für die mikrobielle Fermentation größer als bei Mäusen, die ein extrudiertes Futter bekommen. Das Futter E2 enthielt merklich mehr Faser als das pelletierte Futter (P2), was mit einem Anstieg von faserfermentierenden Bakterienspezies wie *Duncanella* in dieser Gruppe in Verbindung gebracht werden kann (BÖSWALD *et al.*, 2021).

Eine Spezies, die in P2 stärker vertreten war als in E2 ist *Paramuribaculum intestinale*. Diese Spezies wird als Verdauer von Wirtsglykanen beschrieben (LAGKOUVARDOS *et al.*, 2019). Die Verdauung von Glykanen wie Mukus wurde bereits für andere Bakterienspezies wie z.B. *Bacteroides* spp. beschrieben (MACFARLANE & GIBSON, 1991). Obwohl es nicht gänzlich klar ist, wieso *Paramuribaculum intestinale* stärker in P2 vertreten ist, wäre ein möglicher Grund die hohe Verdaulichkeit des P2 Futters und dessen niedriger Fasergehalt. Dies könnte zu einer geringeren Verfügbarkeit unverdaulicher Nährstoffe für das Mikrobiom im Dickdarm und damit zu einem verstärkten Wachstum von Wirtsglykan-verdauenden Spezies geführt haben. Die Verdauung von Wirtsglykanen an der Darmwand könnte zu einer Störung der intestinalen Mukusbarriere führen. Interessanterweise wurde ein Mangel an Ballaststoffen in Verbindung mit Wirtsglykan-verdauenden Bakterien, wie *Paramuribaculum intestinale*, mit einem besseren epithelialen Zugang für pathogene Bakterien wie *Citrobacter rodentium* in Verbindung gebracht (DESAI *et al.*, 2016).

Für die Familie Muribaculaceae wurde ein Rückgang im Zusammenhang mit *high-fat* Futtern (DO *et al.*, 2018) und eine Resistenz gegen Übergewicht in der Maus beschrieben (CAO *et al.*, 2020). Im Versuchsteil 2 zeigte sich in E2 eine höhere Anzahl an Muribaculaceae im Dünndarm, Caecum und Kolon im Vergleich zu P2. Die Mäuse der Gruppe P2 zeigten einen signifikant erhöhten Körperfettanteil bei signifikant geringerem Körpergewicht als E2 Mäuse (*skinny-fat* Phänotyp). Die Entwicklung dieses Phänotyps könnte mit einem reduzierten Gehalt an Muribaculaceae in P2 zusammenhängen. Da der genaue Metabolismus der hier gefundenen Muribaculaceae Spezies jedoch zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht bekannt ist, bedarf es weiterer Forschung auf diesem Gebiet, bevor eine genaue Interpretation der Ergebnisse möglich ist.

Neben verschiedenen Spezies der Familie Muribaculaceae, die in ihrem Anteil Unterschiede in den verschiedenen Darmregionen zeigten, ließen sich weitere Spezies mit variierendem Reichtum in beiden Versuchsteilen identifizieren. Eine dieser Spezies, die in beiden pelletiert gefütterten Gruppen vermehrt zu finden war, ist *Limosilactobacillus reuteri* JCM 1112 (zOTU 25). Diese *Lactobacillus*-Art ist obligat heterofermentativ und metabolisiert vorrangig Glukose über den Pentose-Phosphat-Weg zu Kohlenstoffdioxid, Acetat, Ethanol und Laktat. Ein weiteres Enzym, das bei dieser Spezies beschrieben wurde, ist das Phosphoenolpyruvat:Carbohydrat Phosphotransferase System (PTS) Untereinheit IIC, die Cellobiose und Galacitol verstoffwechselt. *L. reuteri* JCM 1112 ist außerdem in der Lage Vitamin B12 zu synthetisieren, da es die *cbi*, *cobi* und *hem* Gene besitzt (MORITA *et al.*, 2008). Zusammengefasst ist davon auszugehen, dass *Limosilactobacillus reuteri* JCM 1112 eine Syntrophie mit stärkeverdauenden Bakterien eingeht.

Wie bereits in früheren Arbeiten vermutet (CLAVEL *et al.*, 2014; RAUSCH *et al.*, 2016) führen pelletierte und extrudierte Konfektionierungen eines kommerziell erhältlichen Labortierfutters mit denselben Inhaltsstoffen durch eine Veränderung der Futtermittelverarbeitung zu Veränderungen des gastrointestinalen Mikrobioms. Unerwartet war dabei, dass sich die beiden pelletierten Futter in ihrer Nährstoffzusammensetzung zwischen zwei Chargen desselben Herstellers unterschieden und damit einen Anstieg der Familie Muribaculaceae in P2 bewirkten, der so in P1 nicht beobachtet werden konnte.

Kommerzielle Labortierfutter sind in verschiedenen Konfektionierungen erhältlich und werden als identische Produkte vermarktet. Durch Veränderungen in der Futterzusammensetzung ist die Reproduktion von Ergebnissen in aufeinanderfolgenden Tierversuchen nicht möglich, sogar wenn die Experimente im selben Forschungsinstitut mit identischem Personal, wie in unserem Versuch, durchgeführt werden. Die Veränderung der pelletierten Futter war insofern überraschend, da anscheinend identische Futtermittel in einem sechsmonatigen Zeitintervall beim selben Hersteller gekauft wurden. Nichtsdestotrotz ist eine Standardisierung von größter Wichtigkeit. Die hier festgestellten Einflüsse eines veränderten Mikrobioms durch unterschiedliche Futterverarbeitungsformen (Pellet, Extrudat, Mehl, Hybridpellet), wie in unserem Experiment, haben Auswirkungen auf Mausversuche, die bereits publiziert wurden und die zukünftig geplant sind. Bestimmte Verarbeitungsformen von Nahrung könnten ebenfalls das menschliche Mikrobiom beeinflussen, demnach muss dieser Effekt als Störfaktor berücksichtigt werden.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Das Mikrobiom und dessen Zusammensetzung ist abhängig von der Ernährung des Wirtes. Kommerzielle Labormausfutter sind in verschiedenen Verarbeitungsformen (Pellet, Extrudat, Mehl, Hybridpellet) erhältlich und werden dabei identisch deklariert und als gleichwertig vermarktet. Bei Analysen verschiedener Futtermittel für Labormäuse konnte festgestellt werden, dass sich die verschiedenen Verarbeitungsformen in ihrem Stärkeaufschlussgrad voneinander unterscheiden (BÖSWALD & KIENZLE, 2019). Bei Tierversuchen ist eine Reproduzierbarkeit im Sinne der 3R eines der obersten Ziele. Diese Reproduzierbarkeit erreicht man nur durch eine konsequente Standardisierung der Tierversuche.

Ziel unserer Studie war es zu untersuchen, inwiefern sich diese Abweichungen in Nährstoffzusammensetzung und Stärkeaufschlussgrad auf die Verdaulichkeit des Futters und dementsprechend auf das Mikrobiom der Mäuse auswirken. Analysen des Futters zeigten, dass sich verschiedene Verarbeitungsformen in ihrer Nährstoffzusammensetzung und ihrem Stärkeaufschlussgrad voneinander unterscheiden. Zudem war festzustellen, dass sich sogar zwei Chargen derselben Verarbeitungsform (Pellet) voneinander unterscheiden und in ihrer Nährstoffzusammensetzung und insbesondere dem Stärkegehalt voneinander abwichen. Es zeigte sich des Weiteren, dass die extrudierte Verarbeitungsform besser verdaulich ist als die pelletierte, in Versuch zwei war die pelletierte Diät auf Grund des hohen Stärkegehalts besser verdaulich. Das extrudierte Futter zeigte ähnliche Ergebnisse wie im ersten Versuch.

In Versuchsteil 1 unterschied sich das Mikrobiom in der  $\alpha$ -Diversität signifikant im Magen und Caecum. Die  $\beta$ -Diversität zeigte lediglich geringe Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die Analyse der molekularen Spezies auf dem Niveau der zOTU zeigte eine signifikant erhöhte Anzahl an Muribaculaceae in E1 in allen Lokalisationen außer dem Kot. Lachnospiraceae waren insbesondere im Caecum im Mikrobiom der pelletierten Gruppe signifikant vermehrt vorhanden. *Limosilactobacillus reuteri* war im Mikrobiom der pelletierten Gruppe im Magen und Dünndarm signifikant häufiger zu finden. *Ligilactobacillus animalis* war im Kolon der Gruppe E1 signifikant vermehrt. In Versuchsteil 2 unterschied sich die  $\beta$ -Diversität

in allen Regionen außer dem Kolon signifikant zwischen P2 und E2. Interessanterweise waren diese Unterscheide jedoch nicht in der  $\alpha$ -Diversität erkennbar. Auf zOTU Level waren verschiedene molekulare Spezies der Familie Muribaculaceae im Magen und Kot in der pelletierten Gruppe signifikant stärker vertreten, im Dünndarm und Kolon in der extrudierten Gruppe, im Caecum war das Verhältnis eher ausgewogen. Die molekulare Spezies des Genus *Duncaniella* waren in Dünndarm, Caecum und Kolon in der extrudierten Gruppe signifikant vermehrt zu finden, in den Faeces zeigte sich ein signifikant häufigeres Auftreten in der pelletierten Gruppe. Die molekulare Spezies der Familie Lachnospiraceae waren in der extrudierten Gruppe in allen Regionen vermehrt vorhanden, einzelne zOTUs waren jedoch in der pelletierten Gruppe signifikant erhöht. *Limosilactobacillus reuteri* und *Ligilactobacillus animalis* waren in diesem Versuch in Gruppe P2 signifikant stärker im Dünndarm vertreten.

Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigen, dass die Verarbeitung von Futtermitteln zu einer Veränderung der Nährstoffzusammensetzung und des Stärkeaufschlussgrads führte. Es konnte gezeigt werden, dass es in der Fütterung von Labormäusen noch einen Mangel an Standardisierung gibt. Die hier beobachteten Veränderungen der Futter hatten Einfluss auf die Verdaulichkeit der Futtermittel und auf Entwicklung des Mikrobioms im Gastrointestinaltrakt der Maus. Forscher sollten daher beachten, dass unterschiedliche Chargen und verschiedene Verarbeitungsformen einer Labormausdiät das Mikrobiom beeinflussen können. Ebenso sollten daraus resultierende metabolische Veränderungen in Betracht gezogen werden. Im Moment ist die biologische Reproduktion und ein Vergleich von Mausversuchen bezüglich des Mikrobioms nicht gewährleistet.

## VI. SUMMARY

The microbiome and its composition are subject to the host's diet. Commercial laboratory mouse diet is available in different physical forms (pelleted, extruded, powdered, semipelleted) and is declared to contain identical ingredients and nutrient composition and are marketed as equal products. After the analysis of different laboratory mouse feeds, it could be shown, that product processing leads to variation in starch gelatinization (BÖSWALD & KIENZLE, 2019). In animal experiments a reproduction according to the goals of the 3R is of utmost importance. This reproduction will only be achieved following a consistent standardization.

The aim of this study was to investigate, how far this divergence in nutrient content and starch gelatinization influences the digestibility of this diet and thus the microbiome of the mice used in this experiment. Analysis of the diets used in this experiment showed, that different product processing leads to a change in nutrient's composition and starch gelatinization. Furthermore, two batches of the same product processing (pelleted) differed in their nutrient's composition and in their starch content. It could be seen that the extruded form had a higher digestibility than the pelleted form. In trial two the pelleted diet was more digestible due to its high starch content, the extruded diet showed results similar to those in trial 1.

The samples were analyzed using the 16S rRNA gene amplicon sequencing. In trial 1 the microbiome significantly differed in the  $\alpha$ -diversity in the stomach and caecum.  $\beta$ -diversity displayed only minor differences between the groups. An analysis of molecular species showed a significantly higher richness of Muribaculaceae in E1 in all regions beside the feces. Lachnospiraceae were especially in the caecal content of the pelleted fed group significantly stronger than in the extruded fed group. *Limosilactobacillus reuteri* was in the microbiome of stomach and small intestine in group P1 significantly higher than in group E1. *Ligilactobacillus animalis* was significantly more abundant in the colon of E1. In trial 2  $\beta$ -diversity differed significantly in almost all sampled regions between P2 and E2, except for the colon. Interestingly, these differences were not noticeable in the  $\alpha$ -diversity. At zOTU level the molecular species of the family Muribaculaceae were significantly stronger in the stomach and feces of P2 than E2, however in the small intestine and colon species of this family were significantly more abundant in E2 than P2, in the

caecum the relative abundance was similar in both groups. Molecular species of the genus *Duncaniella* were significantly more abundant in the small intestine, caecum and colon in the extruded group. In the feces this genus was significantly more abundant in the pelleted group. The family Lachnospiraceae was more abundant in the extruded group in all regions sampled, however some zOTUs were significantly stronger in the pelleted group. *Limosilactobacillus reuteri* and *Ligilactobacillus animalis* were significantly more abundant in the small intestine of P2.

The results of this study show, that the processing of feed leads to changes in nutrient's content and starch gelatinization. These results reveal that standardization in the feeding of laboratory mice may lack. The changes observed in this study influenced the digestibility of the diets and the development of the microbiome in the gastrointestinal tract of mice. Researchers should keep in mind, that different batches and different product processing of laboratory mouse diet could influence the mouse microbiome. Likewise, possible metabolic changes due to changes in the microbiome should be considered. At the moment biological reproducibility and comparison of mouse experiments is not given, and future research will be helpful here.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

(EU) Nr. 939/2010 Verordnung (Eu) Nr. 939/2010 Der Kommission

Vom 20. Oktober 2010

Zur Änderung Des Anhangs IV Der Verordnung (EG) Nr. 767/2009 Betreffend Zulässige Toleranzen Für Die Angabe Der Zusammensetzung Von Einzelfuttermitteln Oder Mischfuttermitteln Nach Artikel 11 Absatz 5

Aagaard K, Riehle K, Ma J, Segata N, Mistretta TA, Coarfa C, Raza S, Rosenbaum S, Van den Veyver I, Milosavljevic A, Gevers D, Huttenhower C, Petrosino J, Versalovic J. A Metagenomic Approach to Characterization of the Vaginal Microbiome Signature in Pregnancy. *PLoS One* 2012; 7: e36466.

Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The Placenta Harbors a Unique Microbiome. *Science Translational Medicine* 2014; 6: 237ra65.

Abellan-Schneyder I, Matchado MS, Reitmeier S, Sommer A, Sewald Z, Baumbach J, List M, Neuhaus K. Primer, Pipelines, Parameters: Issues in 16S rRNA Gene Sequencing. *mSphere* 2021; 6

Abusleme L, Hong BY, Hoare A, Konkel JE, Diaz PI, Moutsopoulos NM. Oral Microbiome Characterization in Murine Models. *Bioprotocol* 2017; 7

Alam M, Midtvedt T, Uribe A. Differential Cell Kinetics in the Ileum and Colon of Germfree Rats. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1994; 29: 445-51.

Albenberg LG, Wu GD. Diet and the Intestinal Microbiome: Associations, Functions, and Implications for Health and Disease. *Gastroenterology* 2014; 146: 1564-72.

Almeida A, Nayfach S, Boland M, Strozzi F, Beracochea M, Shi ZJ, Pollard KS, Sakharova E, Parks DH, Hugenholtz P, Segata N, Kyrpides NC, Finn RD. A Unified Catalog of 204,938 Reference Genomes from the Human Gut Microbiome. *Nature Biotechnology* 2021; 39: 105-14.

Amaral FA, Sachs D, Costa VV, Fagundes CT, Cisalpino D, Cunha TM, Ferreira SH, Cunha FQ, Silva TA, Nicoli JR, Vieira LQ, Souza DG, Teixeira MM. Commensal Microbiota Is Fundamental for the Development of Inflammatory Pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008; 105: 2193-7.

Andersen A, Lund A, Knop FK, Vilsbøll T. Glucagon-Like Peptide 1 in Health and Disease. *Nature Reviews Endocrinology* 2018; 14: 390-403.

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and Organization of the Human Mitochondrial Genome. *Nature* 1981; 290: 457-65.

Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. The Gut Microbiota as an Environmental Factor That Regulates Fat Storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101: 15718-23.

Baez S, Gordon HA. Tone and Reactivity of Vascular Smooth Muscle in Germfree Rat Mesentery. *Journal of Experimental Medicine* 1971; 134: 846-56.

Barker N. Adult Intestinal Stem Cells: Critical Drivers of Epithelial Homeostasis and Regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2014; 15: 19-33.

Bearfield C, Davenport ES, Sivapathasundaram V, Allaker RP. Possible Association between Amniotic Fluid Micro-Organism Infection and Microflora in the Mouth. *BJOG* 2002; 109: 527-33.

Benakis C, Brea D, Caballero S, Faraco G, Moore J, Murphy M, Sita G, Racchumi G, Ling L, Pamer EG, Iadecola C, Anrather J. Commensal Microbiota Affects Ischemic Stroke Outcome by Regulating Intestinal  $\Gamma\delta$  T Cells. *Nature Medicine* 2016; 22: 516-23.

Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès MC, Charles T, Chen X, Cocolin L, Eversole K, Corral GH, Kazou M, Kinkel L, Lange L, Lima N, Loy A, Macklin JA, Maguin E, Mauchline T, McClure R, Mitter B, Ryan M, Sarand I, Smidt H, Schelkle B, Roume H, Kiran GS, Selvin J, de Souza RSC, van Overbeek L, Singh BK, Wagner M, Walsh A, Sessitsch A, Schloter M. Correction To: Microbiome Definition Re-Visited: Old Concepts and New Challenges. *Microbiome* 2020; 8: 119.

Berg JM, Held A, Stryer L, Lange C, Mahlke K, Maxam G, Seidler L, Zellerhoff N, Häcker B, Jarosch B (2015) *Stryer Biochemie*. Springer Berlin Heidelberg

Berg RD. The Indigenous Gastrointestinal Microflora. *Trends in Microbiology* 1996; 4: 430-5.

Berry CS. Resistant Starch: Formation and Measurement of Starch That Survives Exhaustive Digestion with Amylolytic Enzymes During the Determination of Dietary Fibre. *Journal of Cereal Science* 1986; 4: 301-14.

Bibiloni R, Simon MA, Albright C, Sartor B, Tannock GW. Analysis of the Large Bowel Microbiota of Colitic Mice Using PCR/DGGE. *Letters in Applied Microbiology* 2005; 41: 45-51.

Bingham SA. Diet and Colorectal Cancer Prevention. *Biochemical Society Transactions* 2000; 28: 12.

Biswas S, Xin L, Panigrahi S, Zimman A, Wang H, Yakubenko VP, Byzova TV, Salomon RG, Podrez EA. Novel Phosphatidylethanolamine Derivatives Accumulate in Circulation in Hyperlipidemic ApoE<sup>-/-</sup> Mice and Activate Platelets Via TLR2. *Blood* 2016; 127: 2618-29.

Bjornvad CR, Nielsen DH, Armstrong PJ, McEvoy F, Hoelmkjaer KM, Jensen KS, Pedersen GF, Kristensen AT. Evaluation of a Nine-Point Body Condition Scoring System in Physically Inactive Pet Cats. *American Journal of Veterinary Research* 2011; 72: 433-7.

Böswald L, Kienzle E (2019) Are There Differences in Starch Gelatinisation between Differently Processed Laboratory Rodent Maintenance Feedstuffs Marketed as Identical?

Böswald L, F., Wenderlein J, Straubinger R, K., Ulrich S, Kienzle E. Processing Matters in Nutrient Matched Laboratory Diets for Mice – Energy and Nutrient Digestibility. *Animals* 2021; 11: 523.

Brandtzaeg LHP. Development and Function of Intestinal B and T Cells. *Microbial Ecology in Health and Disease* 2000; 12: 110-27.

Branka JE, Vallette G, Jarry A, Bou-Hanna C, Lemarre P, Van PN, Laboisse CL. Early Functional Effects of Clostridium Difficile Toxin a on Human Colonocytes. *Gastroenterology* 1997; 112: 1887-94.

Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft. Verwendung Von Versuchstieren Im Jahr 2019. 2020; 08.12.2020: <https://www.bmel.de/DE/themen/tiere/tierschutz/versuchstierzahlen2019.html>. 08.03.

Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E, Mira A. The Human Milk Microbiome Changes over Lactation and Is Shaped by Maternal Weight and Mode of Delivery. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2012; 96: 544-51.

Caesar R, Fåk F, Bäckhed F. Effects of Gut Microbiota on Obesity and Atherosclerosis Via Modulation of Inflammation and Lipid Metabolism. *Journal of Internal Medicine* 2010; 268: 320-8.

Caesar R, Reigstad CS, Bäckhed HK, Reinhardt C, Ketonen M, Lundén G, Cani PD, Bäckhed F. Gut-Derived Lipopolysaccharide Augments Adipose Macrophage Accumulation but Is Not Essential for Impaired Glucose or Insulin Tolerance in Mice. *Gut* 2012; 61: 1701-7.

Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* 2007; 56: 1761-72.

Cao W, Chin Y, Chen X, Mi Y, Xue C, Wang Y, Tang Q. The Role of Gut Microbiota in the Resistance to Obesity in Mice Fed a High Fat Diet. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2020; 71: 453-63.

Carini P, Marsden PJ, Leff JW, Morgan EE, Strickland MS, Fierer N. Relic DNA Is Abundant in Soil and Obscures Estimates of Soil Microbial Diversity. *Nature Microbiol* 2016; 2: 16242.

Cario E. Bacterial Interactions with Cells of the Intestinal Mucosa: Toll-Like Receptors and NOD2. *Gut* 2005; 54: 1182-93.

Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-Like Receptor 2 Controls Mucosal Inflammation by Regulating Epithelial Barrier Function. *Gastroenterology* 2007; 132: 1359-74.

Cherbuy C, Bellet D, Robert V, Mayeur C, Schwiertz A, Langella P. Modulation of the Caecal Gut Microbiota of Mice by Dietary Supplement Containing Resistant Starch: Impact Is Donor-Dependent. *Frontiers in Microbiology* 2019; 10: 1234.

Clavel T, Charrier C, Braune A, Wenning M, Blaut M, Haller D. Isolation of Bacteria from the Ileal Mucosa of TNFdeltaARE Mice and Description of *Enterorhabdus Mucosicola* Gen. Nov., Sp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2009; 59: 1805-12.

Clavel T, Desmarchelier C, Haller D, Gérard P, Rohn S, Lepage P, Daniel H. Intestinal Microbiota in Metabolic Diseases: From Bacterial Community Structure and Functions to Species of Pathophysiological Relevance. *Gut Microbes* 2014; 5: 544-51.

Clavel T, Lagkouravdos I, Blaut M, Stecher B. The Mouse Gut Microbiome Revisited: From Complex Diversity to Model Ecosystems. *International Journal of Medical Microbiology* 2016; 306: 316-27.

Coleman OI, Haller D. Microbe-Mucus Interface in the Pathogenesis of Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* 2021; 13

Collado MC, Gueimonde M, Hernández M, Sanz Y, Salminen S. Adhesion of Selected *Bifidobacterium* Strains to Human Intestinal Mucus and the Role of Adhesion in Enteropathogen Exclusion. *Journal of Food Protection* 2005; 68: 2672-8.

Collado MC, Rautava S, Aakko J, Isolauri E, Salminen S. Human Gut Colonisation May Be Initiated in Utero by Distinct Microbial Communities in the Placenta and Amniotic Fluid. *Scientific Reports* 2016; 6: 23129.

Collins SM, Bercik P. The Relationship between Intestinal Microbiota and the Central Nervous System in Normal Gastrointestinal Function and Disease. *Gastroenterology* 2009; 136: 2003-14.

Colonna P, Doublier J, Melcion J, De Monredon F, Mercier C. Extrusion-Cooking and Drum Drying of Wheat Starch. Physical and Macromolecular Modifications. *Cereal Chemistry* 1984; 61: 538-43.

Cong Y, Weaver CT, Lazenby A, Elson CO. Bacterial-Reactive T Regulatory Cells Inhibit Pathogenic Immune Responses to the Enteric Flora. *Journal of Immunology* 2002; 169: 6112-9.

Copeland L, Blazek J, Salman H, Tang MC. Form and Functionality of Starch. *Food Hydrocolloids* 2009; 23: 1527-34.

Cornick S, Tawiah A, Chadee K. Roles and Regulation of the Mucus Barrier in the Gut. *Tissue Barriers* 2015; 3: e982426.

Correa P, Houghton J. Carcinogenesis of *Helicobacter Pylori*. *Gastroenterology* 2007; 133: 659-72.

Costabile A, Kolida S, Klinder A, Gietl E, B auerlein M, Froberg C, Landsch tze V, Gibson GR. A Double-Blind, Placebo-Controlled, Cross-over Study to Establish the Bifidogenic Effect of a Very-Long-Chain Inulin Extracted from Globe Artichoke (*Cynara Scolymus*) in Healthy Human Subjects. *British Journal of Nutrition* 2010; 104: 1007-17.

Coyne MJ, Reinap B, Lee MM, Comstock LE. Human Symbionts Use a Host-Like Pathway for Surface Fucosylation. *Science* 2005; 307: 1778-81.

Cuevas-Ramos G, Petit CR, Marcq I, Boury M, Oswald E, Nougayr de JP. *Escherichia Coli* Induces DNA Damage in Vivo and Triggers Genomic Instability in Mammalian Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107: 11537-42.

Culpepper T, Ukhanova M, Wang X, Sun Y, Mai V. Associations between Diet, Gut Microbiota and Markers of CRC Risk. *Cancer & Metabolism* 2014; 2: 1-.

Cummings JH, Macfarlane GT. The Control and Consequences of Bacterial Fermentation in the Human Colon. *Journal of Applied Bacteriology* 1991; 70: 443-59.

Cummings JH, Beatty ER, Kingman SM, Bingham SA, Englyst HN. Digestion and Physiological Properties of Resistant Starch in the Human Large Bowel. *British Journal of Nutrition* 1996; 75: 733-47.

Cummings JH, Macfarlane GT. Role of Intestinal Bacteria in Nutrient Metabolism. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 1997; 21: 357-65.

Daniel H, Gholami AM, Berry D, Desmarchelier C, Hahne H, Loh G, Mondot S, Lepage P, Rothballer M, Walker A, Bohm C, Wenning M, Wagner M, Blaut M, Schmitt-Kopplin P, Kuster B, Haller D, Clavel T. High-Fat Diet Alters Gut Microbiota Physiology in Mice. *The ISME Journal* 2014; 8: 295-308.

Dejea CM, Fathi P, Craig JM, Boleij A, Taddese R, Geis AL, Wu X, DeStefano Shields CE, Hechenbleikner EM, Huso DL, Anders RA, Giardiello FM, Wick EC, Wang H, Wu S, Pardoll DM, Housseau F, Sears CL. Patients with Familial Adenomatous Polyposis Harbor Colonic Biofilms Containing Tumorigenic Bacteria. *Science* 2018; 359: 592-7.

den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The Role of Short-Chain Fatty Acids in the Interplay between Diet, Gut Microbiota, and Host Energy Metabolism. *Journal of Lipid Research* 2013; 54: 2325-40.

Deng Z, Luo XM, Liu J, Wang H. Quorum Sensing, Biofilm, and Intestinal Mucosal Barrier: Involvement the Role of Probiotic. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2020; 10: 538077.

Derrien M, van Hylekama Vlieg JE. Fate, Activity, and Impact of Ingested Bacteria within the Human Gut Microbiota. *Trends in Microbiology* 2015; 23: 354-66.

Desai MS, Seekatz AM, Koropatkin NM, Kamada N, Hickey CA, Wolter M, Pudlo NA, Kitamoto S, Terrapon N, Muller A, Young VB, Henrissat B, Wilmes P, Stappenbeck TS, Núñez G, Martens EC. A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell* 2016; 167: 1339-53.e21.

Desmarchelier C, Ludwig T, Scheundel R, Rink N, Bader BL, Klingenspor M, Daniel H. Diet-Induced Obesity in Ad Libitum-Fed Mice: Food Texture Overrides the Effect of Macronutrient Composition. *British Journal of Nutrition* 2013; 109: 1518-27.

Deutsche Adipositas Gesellschaft e.V. Definition Von Übergewicht Und Adipositas. 2020: <https://adipositas-gesellschaft.de/ueber-adipositas/definition-von-adipositas/>. 25.02.2021.

Deutsche Forschungsgemeinschaft (2019) Tierversuche in Der Forschung: Das 3R-Prinzip Und Die Aussagekraft Wissenschaftlicher Forschung. Ed. Deutsche Forschungsgemeinschaft

Diaz-Ropero MP, Martin R, Sierra S, Lara-Villoslada F, Rodriguez JM, Xaus J, Olivares M. Two *Lactobacillus* Strains, Isolated from Breast Milk, Differently Modulate the Immune Response. *Journal of Applied Microbiology* 2007; 102: 337-43.

Djouzi Z, Andrieux C. Compared Effects of Three Oligosaccharides on Metabolism of Intestinal Microflora in Rats Inoculated with a Human Faecal Flora. *British Journal of Nutrition* 1997; 78: 313-24.

Do MH, Lee E, Oh MJ, Kim Y, Park HY. High-Glucose or -Fructose Diet Cause Changes of the Gut Microbiota and Metabolic Disorders in Mice without Body Weight Change. *Nutrients* 2018; 10

Do MH, Lee HB, Lee E, Park HY. The Effects of Gelatinized Wheat Starch and High Salt Diet on Gut Microbiota and Metabolic Disorder. *Nutrients* 2020; 12

Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R. Delivery Mode Shapes the Acquisition and Structure of the Initial Microbiota across Multiple Body Habitats in Newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107: 11971-5.

Drouin-Chartier JP, Côté JA, Labonté M, Brassard D, Tessier-Grenier M, Desroches S, Couture P, Lamarche B. Comprehensive Review of the Impact of Dairy Foods and Dairy Fat on Cardiometabolic Risk. *Advances in Nutrition* 2016; 7: 1041-51.

Dubos RJ, Schaedler RW. The Effect of the Intestinal Flora on the Growth Rate of Mice, and on Their Susceptibility to Experimental Infections. *Journal of Experimental Medicine* 1960; 111: 407-17.

Duncan SH, Belenguer A, Holtrop G, Johnstone AM, Flint HJ, Lobley GE. Reduced Dietary Intake of Carbohydrates by Obese Subjects Results in Decreased Concentrations of Butyrate and Butyrate-Producing Bacteria in Feces. *Applied and Environmental Microbiology* 2007; 73: 1073-8.

Duncan SH, Lobley GE, Holtrop G, Ince J, Johnstone AM, Louis P, Flint HJ. Human Colonic Microbiota Associated with Diet, Obesity and Weight Loss. *International Journal of Obesity* 2008; 32: 1720-4.

Dupré J, O'Malley MA. Varieties of Living Things: Life at the Intersection of Lineage and Metabolism. 2009;

Ellis RP, Cochrane MP, Dale MFB, Duffus CM, Lynn A, Morrison IM, Prentice RDM, Swanston JS, Tiller SA. Starch Production and Industrial Use. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1998; 77: 289-311.

Epstein SE, Zhu J, Burnett MS, Zhou YF, Vercellotti G, Hajjar D. Infection and Atherosclerosis: Potential Roles of Pathogen Burden and Molecular Mimicry. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2000; 20: 1417-20.

Erdem AL, Avelino F, Xicohtencatl-Cortes J, Girón JA. Host Protein Binding and Adhesive Properties of H6 and H7 Flagella of Attaching and Effacing *Escherichia Coli*. *Journal of Bacteriology* 2007; 189: 7426-35.

Fardini Y, Chung P, Dumm R, Joshi N, Han YW. Transmission of Diverse Oral Bacteria to Murine Placenta: Evidence for the Oral Microbiome as a Potential Source of Intrauterine Infection. *Infection and Immunity* 2010; 78: 1789-96.

Ferreya JA, Wu KJ, Hryckowian AJ, Bouley DM, Weimer BC, Sonnenburg JL. Gut Microbiota-Produced Succinate Promotes *C. Difficile* Infection after Antibiotic Treatment or Motility Disturbance. *Cell Host Microbe* 2014; 16: 770-7.

Forsythe P, Sudo N, Dinan T, Taylor VH, Bienenstock J. Mood and Gut Feelings. *Brain, Behaviour and Immunity* 2010; 24: 9-16.

Foulis SA, Hughes JM, Friedl KE. New Concerns About Military recruits with Metabolic Obesity but Normal Weight ("Skinny Fat"). *Obesity (Silver Spring)* 2020; 28: 223.

Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-Phylogenetic Characterization of Microbial Community Imbalances in Human Inflammatory Bowel Diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; 104: 13780-5.

Fry SC. Primary Cell Wall Metabolism: Tracking the Careers of Wall Polymers in Living Plant Cells. *New Physiologist* 2004; 161: 641-75.

Ganesh BP, Klopfleisch R, Loh G, Blaut M. Commensal *Akkermansia Muciniphila* Exacerbates Gut Inflammation in *Salmonella* Typhimurium-Infected Gnotobiotic Mice. *PLoS One* 2013; 8: e74963.

Ganz T. Defensins: Antimicrobial Peptides of Innate Immunity. *Nature Reviews Immunology* 2003; 3: 710-20.

Garrett WS, Lord GM, Punit S, Lugo-Villarino G, Mazmanian SK, Ito S, Glickman JN, Glimcher LH. Communicable Ulcerative Colitis Induced by T-bet Deficiency in the Innate Immune System. *Cell* 2007; 131: 33-45.

Garsin DA. Ethanolamine Utilization in Bacterial Pathogens: Roles and Regulation. *Nature Reviews Microbiology* 2010; 8: 290-5.

Gibbons DL, Spencer J. Mouse and Human Intestinal Immunity: Same Ballpark, Different Players; Different Rules, Same Score. *Mucosal Immunol* 2011; 4: 148-57.

Gibson GR, Probert HM, Loo JV, Rastall RA, Roberfroid MB. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Updating the Concept of Prebiotics. *Nutrition Research Reviews* 2004; 17: 259-75.

Gil-Campos M, Lopez MA, Rodriguez-Benitez MV, Romero J, Roncero I, Linares MD, Maldonado J, Lopez-Huertas E, Berwind R, Ritzenthaler KL, Navas V, Sierra C, Sempere L, Geerlings A, Maldonado-Lobon JA, Valero AD, Lara-Villoslada F, Olivares M. *Lactobacillus Fermentum* CECT 5716 Is Safe and Well Tolerated in Infants of 1-6 Months of Age: A Randomized Controlled Trial. *Pharmacological Research* 2012; 65: 231-8.

Gophna U, Sommerfeld K, Gophna S, Doolittle WF, Van Zanten SJV. Differences between Tissue-Associated Intestinal Microfloras of Patients with Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Journal of clinical microbiology* 2006; 44: 4136-41.

Gordon H, Wostmann B (1959) Responses of the Animal Host to Changes in the Bacterial Environment: Transition of the Albino Rat from Germfree to the Conventional State. *Recent Progress. Microbiol. VII International Congress for Microbiology, Symposium V. Stockolm, Almqvist and Wiksells*

Gordon HA. The Germ-Free Animal. Its Use in the Study of "Physiologic" Effects of the Normal Microbial Flora on the Animal Host. *The American Journal of Digestive Diseases* 1960; 5: 841-67.

Gordon HA, Bruckner-Kardoss E. Effect of Normal Microbial Flora on Intestinal Surface Area. *The American Journal of Physiology* 1961; 201: 175-8.

Gordon HA, Wostmann BS, Bruckner-Kardoss E. Effects of Microbial Flora on Cardiac Output and Other Elements of Blood Circulation. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1963; 114: 301-4.

Gordon JH, Dubos R. The Anaerobic Bacterial Flora of the Mouse Cecum. *Journal of Experimental Medicine* 1970; 132: 251-60.

Goto Y, Uematsu S, Kiyono H. Epithelial Glycosylation in Gut Homeostasis and Inflammation. *Nature Immunology* 2016; 17: 1244-51.

Gronenborn B, Messing J. Methylation of Single-Stranded DNA in Vitro Introduces New Restriction Endonuclease Cleavage Sites. *Nature* 1978; 272: 375-7.

Gustafsson BE, Einarsson K, Gustafsson J. Influence of Cholesterol Feeding on Liver Microsomal Metabolism of Steroids and Bile Acids in Conventional and Germ-Free Rats. *Journal of Biological Chemistry* 1975; 250: 8496-502.

Haidar MN, Petie M, Heinsbroek LTN, Verreth JAJ, Schrama JW. The Effect of Type of Carbohydrate (Starch Vs. Nonstarch Polysaccharides) on Nutrients Digestibility, Energy Retention and Maintenance Requirements in Nile Tilapia. *Aquaculture* 2016; 463: 241-7.

Hald S, Schioldan AG, Moore ME, Dige A, Lærke HN, Agnholt J, Bach Knudsen KE, Hermansen K, Marco ML, Gregersen S, Dahlerup JF. Effects of Arabinoxylan and Resistant Starch on Intestinal Microbiota and Short-Chain Fatty Acids in Subjects with Metabolic Syndrome: A Randomised Crossover Study. *PLoS One* 2016; 11: e0159223.

Harris MA, Reddy CA, Carter GR. Anaerobic Bacteria from the Large Intestine of Mice. *Applied and Environmental Microbiology* 1976; 31: 907-12.

Herrmann E, Young W, Reichert-Grimm V, Weis S, Riedel CU, Rosendale D, Stoklosinski H, Hunt M, Egert M. In Vivo Assessment of Resistant Starch Degradation by the Caecal Microbiota of Mice Using RNA-Based Stable Isotope Probing-a Proof-of-Principle Study. *Nutrients* 2018; 10

Hitch TCA, Afrizal A, Riedel T, Kioukis A, Haller D, Lagkouvardos I, Overmann J, Clavel T. Recent Advances in Culture-Based Gut Microbiome Research. *International Journal of Medical Microbiology* 2021; 311: 151485.

Högberg A, Lindberg JE. Influence of Cereal Non-Starch Polysaccharides and Enzyme Supplementation on Digestion Site and Gut Environment in Weaned Piglets. *Animal Feed Science and Technology* 2004; 116: 113-28.

Holm J, Lundquist I, Björck I, Eliasson AC, Asp NG. Degree of Starch Gelatinization, Digestion Rate of Starch in Vitro, and Metabolic Response in Rats. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1988; 47: 1010-6.

Hooper LV, Gordon JI. Commensal Host-Bacterial Relationships in the Gut. *Science* 2001; 292: 1115-8.

Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular Analysis of Commensal Host-Microbial Relationships in the Intestine. *Science* 2001; 291: 881-4.

Hope ME, Hold GL, Kain R, El-Omar EM. Sporadic Colorectal Cancer-Role of the Commensal Microbiota. *FEMS Microbiology Letters* 2005; 244: 1-7.

Hotamisligil GS, Erbay E. Nutrient Sensing and Inflammation in Metabolic Diseases. *Nature Reviews Immunology* 2008; 8: 923-34.

Hungate RE. The Anaerobic Mesophilic Cellulolytic Bacteria. *Bacteriological Reviews* 1950; 14: 1-49.

Hunt KM, Foster JA, Forney LJ, Schutte UM, Beck DL, Abdo Z, Fox LK, Williams JE, McGuire MK, McGuire MA. Characterization of the Diversity and Temporal Stability of Bacterial Communities in Human Milk. *PLoS One* 2011; 6: e21313.

Husebye E, Hellström PM, Midtvedt T. Intestinal Microflora Stimulates Myoelectric Activity of Rat Small Intestine by Promoting Cyclic Initiation and Aboral Propagation of Migrating Myoelectric Complex. *Digestive Diseases and Sciences* 1994; 39: 946-56.

Huycke MM, Abrams V, Moore DR. *Enterococcus Faecalis* Produces Extracellular Superoxide and Hydrogen Peroxide That Damages Colonic Epithelial Cell DNA. *Carcinogenesis* 2002; 23: 529-36.

Iacob S, Iacob DG, Luminos LM. Intestinal Microbiota as a Host Defense Mechanism to Infectious Threats. *Frontiers in Microbiology* 2018; 9: 3328.

Illumina Inc. An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology. 2017: <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing.html>. 19.01.2021.

Illumina Inc. Illumina Adapter Portfolio 2020: <https://emea.support.illumina.com/bulletins/2020/06/illumina-adapter-portfolio.html>. 21.04.2021.

Illumina Inc. Images for General Use. 2021a: <https://emea.illumina.com/company/news-center/multimedia-images.html>. 21.04.2021.

Illumina Inc. Sequencing: Introduction to Sequencing by Synthesis (SBS). 2021b: <https://www.youtube.com/embed/oIJJaA6h2bFM?autoplay=1&rel=0>. 21.04.2021.

Jäckel S, Kiouptsi K, Lillich M, Hendrikx T, Khandagale A, Kollar B, Hörmann N, Reiss C, Subramaniam S, Wilms E, Ebner K, Brühl MV, Rausch P, Baines JF, Haberichter S, Lämmle B, Binder CJ, Jurk K, Ruggeri ZM, Massberg S, Walter U, Ruf W, Reinhardt C. Gut Microbiota Regulate Hepatic Von Willebrand Factor Synthesis and Arterial Thrombus Formation Via Toll-Like Receptor-2. *Blood* 2017; 130: 542-53.

Jakobsson HE, Rodríguez-Piñeiro AM, Schütte A, Ermund A, Boysen P, Bemark M, Sommer F, Bäckhed F, Hansson GC, Johansson ME. The Composition of the Gut Microbiota Shapes the Colon Mucus Barrier. *EMBO Reports* 2015; 16: 164-77.

Jasarevic E, Howerton CL, Howard CD, Bale TL. Alterations in the Vaginal Microbiome by Maternal Stress Are Associated with Metabolic Reprogramming of the Offspring Gut and Brain. *Endocrinology* 2015; 156: 3265-76.

Jiang F, Du C, Jiang W, Wang L, Du SK. The Preparation, Formation, Fermentability, and Applications of Resistant Starch. *International Journal of Biological Macromolecules* 2020; 150: 1155-61.

Jiménez E, Fernandez L, Marin ML, Martín R, Odriozola JM, Nueno-Palop C, Narbad A, Olivares M, Xaus J, Rodriguez JM. Isolation of Commensal Bacteria from Umbilical Cord Blood of Healthy Neonates Born by Cesarean Section. *Current Microbiology* 2005; 51: 270-4.

Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Olivares M, Xaus J, Fernández L, Rodríguez JM. Is Meconium from Healthy Newborns Actually Sterile? *Research in Microbiology* 2008; 159: 187-93.

Johnson JS, Spakowicz DJ, Hong BY, Petersen LM, Demkowicz P, Chen L, Leopold SR, Hanson BM, Agresta HO, Gerstein M, Sodergren E, Weinstock GM. Evaluation of 16S rRNA Gene Sequencing for Species and Strain-Level Microbiome Analysis. *Nat Commun* 2019; 10: 5029.

Joseph S, Aduse-Opoku J, Hashim A, Hanski E, Streich R, Knowles SCL, Pedersen AB, Wade WG, Curtis MA. A 16S rRNA Gene and Draft Genome Database for the Murine Oral Bacterial Community. *mSystems* 2021; 6

Jung C, Hugot JP, Barreau F. Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine. *International Journal of Inflammation* 2010; 2010: 823710.

Karbach SH, Schönfelder T, Brandão I, Wilms E, Hörmann N, Jäckel S, Schüler R, Finger S, Knorr M, Lagrange J, Brandt M, Waisman A, Kossmann S, Schäfer K, Münzel T, Reinhardt C, Wenzel P. Gut Microbiota Promote Angiotensin II-Induced Arterial Hypertension and Vascular Dysfunction. *Journal of the American Heart Association* 2016; 5

Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, Bergström G, Behre CJ, Fagerberg B, Nielsen J, Bäckhed F. Gut Metagenome in European Women with Normal, Impaired and Diabetic Glucose Control. *Nature* 2013; 498: 99-103.

Kienzle E (1989) Untersuchungen Zum Intestinal- Und Intermediärstoffwechsel Von Kohlenhydraten (Stärke Verschiedener Herkunft Und Aufbereitung, Mono- Und Disaccharide) Bei Der Hauskatze (*Felis Catus*) In: Institut für Tierernährung. Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover

Kimura I, Ozawa K, Inoue D, Imamura T, Kimura K, Maeda T, Terasawa K, Kashihara D, Hirano K, Tani T, Takahashi T, Miyauchi S, Shioi G, Inoue H, Tsujimoto G. The Gut Microbiota Suppresses Insulin-Mediated Fat Accumulation Via the Short-Chain Fatty Acid Receptor GPR43. *Nature Communications* 2013; 4: 1829.

Kleessen B, Stoof G, Proll J, Schmiedl D, Noack J, Blaut M. Feeding Resistant Starch Affects Fecal and Cecal Microflora and Short-Chain Fatty Acids in Rats. *Journal of Animal Science* 1997; 75: 2453-62.

Kleessen B, Hartmann L, Blaut M. Oligofructose and Long-Chain Inulin: Influence on the Gut Microbial Ecology of Rats Associated with a Human Faecal Flora. *British Journal of Nutrition* 2001; 86: 291-300.

Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, Britt EB, Fu X, Wu Y, Li L, Smith JD, DiDonato JA, Chen J, Li H, Wu GD, Lewis JD, Warrier M, Brown JM, Krauss RM, Tang WH, Bushman FD, Luskis AJ, Hazen SL. Intestinal Microbiota Metabolism of L-Carnitine, a Nutrient in Red Meat, Promotes Atherosclerosis. *Nature Medicine* 2013; 19: 576-85.

Kullberg MC, Andersen JF, Gorelick PL, Caspar P, Suerbaum S, Fox JG, Cheever AW, Jankovic D, Sher A. Induction of Colitis by a CD4<sup>+</sup> T Cell Clone Specific for a Bacterial Epitope. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003; 100: 15830-5.

Kuperman AA, Zimmerman A, Hamadia S, Ziv O, Gurevich V, Fichtman B, Gavert N, Straussman R, Rechnitzer H, Barzilay M, Shvalb S, Bornstein J, Ben-Shachar I, Yagel S, Haviv I, Koren O. Deep Microbial Analysis of Multiple Placentas Shows No Evidence for a Placental Microbiome. *BJOG – An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2020; 127: 159-69.

Kurashima Y, Kiyono H. Mucosal Ecological Network of Epithelium and Immune Cells for Gut Homeostasis and Tissue Healing. *Annual Review of Immunology* 2017; 35: 119-47.

Lagkouvardos I, Pukall R, Abt B, Foesel BU, Meier-Kolthoff JP, Kumar N, Bresciani A, Martinez I, Just S, Ziegler C, Brugiroux S, Garzetti D, Wenning M, Bui TP, Wang J, Hugenholtz F, Plugge CM, Peterson DA, Hornef MW, Baines JF, Smidt H, Walter J, Kristiansen K, Nielsen HB, Haller D, Overmann J, Stecher B, Clavel T. The Mouse Intestinal Bacterial Collection (miBC) Provides Host-Specific Insight into Cultured Diversity and Functional Potential of the Gut Microbiota. *Nature Microbiology* 2016a; 1: 16131.

Lagkouvardos I, Joseph D, Kapfhammer M, Giritli S, Horn M, Haller D, Clavel T. Imngs: A Comprehensive Open Resource of Processed 16S rRNA Microbial Profiles for Ecology and Diversity Studies. *Scientific Reports* 2016b; 6: 33721-.

Lagkouvardos I, Fischer S, Kumar N, Clavel T. Rhea: A Transparent and Modular R Pipeline for Microbial Profiling Based on 16S rRNA Gene Amplicons. *PeerJ* 2017; 5: e2836-e.

Lagkouvardos I, Lesker TR, Hitch TCA, Gálvez EJC, Smit N, Neuhaus K, Wang J, Baines JF, Abt B, Stecher B, Overmann J, Strowig T, Clavel T. Sequence and Cultivation Study of Muribaculaceae Reveals Novel Species, Host Preference, and Functional Potential of This yet Undescribed Family. *Microbiome* 2019; 7: 28.

Lai LS, Kokini JL. Physicochemical Changes and Rheological Properties of Starch During Extrusion (a Review). *Biotechnology Progress* 1991; 7: 251-66.

Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, Al-Soud WA, Sørensen SJ, Hansen LH, Jakobsen M. Gut Microbiota in Human Adults with Type 2 Diabetes Differs from Non-Diabetic Adults. *PLoS One* 2010; 5: e9085.

Larsson E, Tremaroli V, Lee YS, Koren O, Nookaew I, Fricker A, Nielsen J, Ley RE, Bäckhed F. Analysis of Gut Microbial Regulation of Host Gene Expression Along the Length of the Gut and Regulation of Gut Microbial Ecology through MyD88. *Gut* 2012; 61: 1124-31.

LAS Interactive. Ersatz- & Ergänzungsmethoden Und Das 3R Konzept. 2019: <https://www.las-interactive.de/index.php?id=4452&L=0>. 22.07.2019

Lattimer JM, Haub MD. Effects of Dietary Fiber and Its Components on Metabolic Health. *Nutrients* 2010; 2: 1266-89.

Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, Almeida M, Arumugam M, Batto JM, Kennedy S, Leonard P, Li J, Burgdorf K, Grarup N, Jørgensen T, Brandslund I, Nielsen HB, Juncker AS, Bertalan M, Levenez F, Pons N, Rasmussen S, Sunagawa S, Tap J, Tims S, Zoetendal EG, Brunak S, Clément K, Doré J, Kleerebezem M, Kristiansen K, Renault P, Sicheritz-Ponten T, de Vos WM, Zucker JD, Raes J, Hansen T, Bork P, Wang J, Ehrlich SD, Pedersen O. Richness of Human Gut Microbiome Correlates with Metabolic Markers. *Nature* 2013; 500: 541-6.

Lennon JT, Muscarella ME, Placella SA, Lehmkuhl BK. How, When, and Where Relic DNA Affects Microbial Diversity. *mBio* 2018; 9

Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity Alters Gut Microbial Ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005; 102: 11070-5.

Liu C, Zhou N, Du MX, Sun YT, Wang K, Wang YJ, Li DH, Yu HY, Song Y, Bai BB, Xin Y, Wu L, Jiang CY, Feng J, Xiang H, Zhou Y, Ma J, Wang J, Liu HW, Liu SJ. The Mouse Gut Microbial Biobank Expands the Coverage of Cultured Bacteria. *Nature Communications* 2020; 11: 79.

Liu Z, Wang Y, Liu S, Sheng Y, Rueggeberg KG, Wang H, Li J, Gu FX, Zhong Z, Kan B, Zhu J. *Vibrio Cholerae* Represses Polysaccharide Synthesis to Promote Motility in Mucosa. *Infection and Immunity* 2015; 83: 1114-21.

Lkhagva E, Chung HJ, Hong J, Tang WHW, Lee SI, Hong ST, Lee S. The Regional Diversity of Gut Microbiome Along the GI Tract of Male C57BL/6 Mice. *BMC Microbiology* 2021; 21: 44.

Luo Q, Kumar P, Vickers TJ, Sheikh A, Lewis WG, Rasko DA, Sistrunk J, Fleckenstein JM. Enterotoxigenic *Escherichia Coli* Secretes a Highly Conserved Mucin-Degrading Metalloprotease to Effectively Engage Intestinal Epithelial Cells. *Infection and Immunity* 2014; 82: 509-21.

Lupp C, Robertson ML, Wickham ME, Sekirov I, Champion OL, Gaynor EC, Finlay BB. Host-Mediated Inflammation Disrupts the Intestinal Microbiota and Promotes the Overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host Microbe* 2007; 2: 119-29.

Lutgendorff F, Akkermans LMA, Söderholm JD. The Role of Microbiota and Probiotics in Stress-Induced Gastro-Intestinal Damage. *Current Molecular Medicine* 2008; 8: 282-98.

Macfarlane GT, Gibson GR. Formation of Glycoprotein Degrading Enzymes by *Bacteroides Fragilis*. *FEMS Microbiology Letters* 1991; 61: 289-93.

Macfarlane GT, Gibson GR. Carbohydrate Fermentation, Energy Transduction and Gas Metabolism in the Human Large Intestine. In: *Gastrointestinal Microbiology: Volume 1 Gastrointestinal Ecosystems and Fermentations*. Mackie RI, White BA, eds. Boston, MA: Springer US 1997: 269-318.

Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between Commensal Intestinal Bacteria and the Immune System. *Nature Reviews Immunology* 2004; 4: 478-85.

Madsen D, Beaver M, Chang L, Bruckner-Kardoss E, Wostmann B. Analysis of Bile Acids in Conventional and Germfree Rats. *Journal of Lipid Research* 1976; 17: 107-11.

Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, Nalin R, Jarrin C, Chardon P, Marteau P. Reduced Diversity of Faecal Microbiota in Crohn's Disease Revealed by a Metagenomic Approach. *Gut* 2006; 55: 205-11.

Marchesi JR, Holmes E, Khan F, Kochhar S, Scanlan P, Shanahan F, Wilson ID, Wang Y. Rapid and Noninvasive Metabonomic Characterization of Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Proteome Research* 2007; 6: 546-51.

Marchesi JR, Ravel J. The Vocabulary of Microbiome Research: A Proposal. *Microbiome* 2015; 3: 31.

Marques FZ, Nelson E, Chu PY, Horlock D, Fiedler A, Ziemann M, Tan JK, Kuruppu S, Rajapakse NW, El-Osta A, Mackay CR, Kaye DM. High-Fiber Diet and Acetate Supplementation Change the Gut Microbiota and Prevent the Development of Hypertension and Heart Failure in Hypertensive Mice. *Circulation* 2017; 135: 964-77.

Marshman E, Booth C, Potten CS. The Intestinal Epithelial Stem Cell. *Bioessays* 2002; 24: 91-8.

Martin R, Olivares M, Marin ML, Fernandez L, Xaus J, Rodriguez JM. Probiotic Potential of 3 Lactobacilli Strains Isolated from Breast Milk. *Journal of Human Lactation* 2005; 21: 8-17; quiz 8-21, 41.

Martin R, Jimenéz E, Olivares M, Marin ML, Fernandez L, Xaus J, Rodriguez JM. *Lactobacillus Salivarius* CECT 5713, a Potential Probiotic Strain Isolated from Infant Feces and Breast Milk of a Mother-Child Pair. *International Journal of Food Microbiology* 2006; 112: 35-43.

Martinez-Medina M, Aldeguer X, Gonzalez-Huix F, Acero D, Garcia-Gil JL. Abnormal Microbiota Composition in the Ileocolonic Mucosa of Crohn's Disease Patients as Revealed by Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Inflammatory Bowel Diseases* 2006; 12: 1136-45.

Martinez I, Kim J, Duffy PR, Schlegel VL, Walter J. Resistant Starches Types 2 and 4 Have Differential Effects on the Composition of the Fecal Microbiota in Human Subjects. *PLoS One* 2010; 5: e15046.

Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An Immunomodulatory Molecule of Symbiotic Bacteria Directs Maturation of the Host Immune System. *Cell* 2005; 122: 107-18.

McGinn S, Gut IG. DNA Sequencing - Spanning the Generations. *New Biotechnology* 2013; 30: 366-72.

McLoughlin RF, Berthon BS, Jensen ME, Baines KJ, Wood LG. Short-Chain Fatty Acids, Prebiotics, Synbiotics, and Systemic Inflammation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2017; 106: 930-45.

Metwaly A, Haller D. Multi-Omics in IBD Biomarker Discovery: The Missing Links. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019; 16: 587-8.

Miyake S, Ding Y, Soh M, Low A, Seedorf H. Cultivation and Description of *Duncaniella Dubosii* Sp. Nov., *Duncaniella Freteri* Sp. Nov. And Emended Description of the Species *Duncaniella Muris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2020; 70: 3105-10.

Moore WE, Holdeman LV. Special Problems Associated with the Isolation and Identification of Intestinal Bacteria in Fecal Flora Studies. *American Journal of Clinical Nutrition* 1974; 27: 1450-5.

Moore WE, Moore LH. Intestinal Floras of Populations That Have a High Risk of Colon Cancer. *Applied and Environmental Microbiology* 1995; 61: 3202-7.

Moore WEC. Techniques for Routine Culture of Fastidious Anaerobes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1966; 16: 173-90.

Moore WEC, Cato EP, Holdeman LV. Anaerobic Bacteria of the Gastrointestinal Flora and Their Occurrence in Clinical Infections. *Journal of Infectious Diseases* 1969; 119: 641-9.

Morita H, Toh H, Fukuda S, Horikawa H, Oshima K, Suzuki T, Murakami M, Hisamatsu S, Kato Y, Takizawa T, Fukuoka H, Yoshimura T, Itoh K, O'Sullivan DJ, McKay LL, Ohno H, Kikuchi J, Masaoka T, Hattori M. Comparative Genome Analysis of *Lactobacillus Reuteri* and *Lactobacillus Fermentum* Reveal a Genomic Island for Reuterin and Cobalamin Production. *DNA Research* 2008; 15: 151-61.

Morrison DJ, Preston T. Formation of Short Chain Fatty Acids by the Gut Microbiota and Their Impact on Human Metabolism. *Gut Microbes* 2016; 7: 189-200.

Mowat AM. Anatomical Basis of Tolerance and Immunity to Intestinal Antigens. *Nature Reviews Immunology* 2003; 3: 331-41.

Nelson J (1961) The Establishment and Maintenance of a Specific Pathogen-Free Colony of Swiss Mice. *Proceedings Animal Care Panel*. 65

Neufeld K-A, Foster JA. Effects of Gut Microbiota on the Brain: Implications for Psychiatry. *The Journal of Psychiatry & Neuroscience* 2009; 34: 230-1.

Ninonuevo MR, Park Y, Yin H, Zhang J, Ward RE, Clowers BH, German JB, Freeman SL, Killeen K, Grimm R, Lebrilla CB. A Strategy for Annotating the Human Milk Glycome. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006; 54: 7471-80.

Nougayrède JP, Homburg S, Taieb F, Boury M, Brzuszkiewicz E, Gottschalk G, Buchrieser C, Hacker J, Dobrindt U, Oswald E. *Escherichia Coli* Induces DNA Double-Strand Breaks in Eukaryotic Cells. *Science* 2006; 313: 848-51.

Nunn KL, Witkin SS, Schneider GM, Boester A, Nasioudis D, Minis E, Gliniewicz K, Forney LJ. Changes in the Vaginal Microbiome During the Pregnancy to Postpartum Transition. *Reproductive Sciences* 2021;

O'Callaghan A, van Sinderen D. *Bifidobacteria* and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota. *Frontiers in Microbiology* 2016; 7: 925.

O'Hara AM, Shanahan F. The Gut Flora as a Forgotten Organ. *EMBO Reports* 2006; 7: 688-93.

O'Keefe SJ. Nutrition and Colonic Health: The Critical Role of the Microbiota. *Current Opinion in Gastroenterology* 2008; 24: 51-8.

Olivares M, Díaz-Ropero M, Lara-Villoslada F, Rodriguez J, Xaus J. Effectiveness of Probiotics in Allergy: Child's Game or Adult Affair. *Nutrafoods* 2005; 4: 59-64.

Ormerod KL, Wood DL, Lachner N, Gellatly SL, Daly JN, Parsons JD, Dal'Molin CG, Palfreyman RW, Nielsen LK, Cooper MA, Morrison M, Hansbro PM, Hugenholtz P. Genomic Characterization of the Uncultured Bacteroidales Family S24-7 Inhabiting the Guts of Homeothermic Animals. *Microbiome* 2016; 4: 36.

Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in Inflammation and Metabolic Disease. *Nature Reviews Immunology* 2011; 11: 85-97.

Ouwehand A, Isolauri E, Salminen S. The Role of the Intestinal Microflora for the Development of the Immune System in Early Childhood. *European Journal of Nutrition* 2002; 41 Suppl 1: I32-7.

Pacheco AR, Curtis MM, Ritchie JM, Munera D, Waldor MK, Moreira CG, Sperandio V. Fucose Sensing Regulates Bacterial Intestinal Colonization. *Nature* 2012; 492: 113-7.

Parada J, Aguilera JM. Review: Starch Matrices and the Glycemic Response. *Food Science and Technology International* 2011; 17: 187-204.

Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A Human Gut Microbial Gene Catalogue Established by Metagenomic Sequencing. *Nature* 2010; 464: 59-65.

Rausch P, Basic M, Batra A, Bischoff SC, Blaut M, Clavel T, Glasner J, Gopalakrishnan S, Grassl GA, Gunther C, Haller D, Hirose M, Ibrahim S, Loh G, Mattner J, Nagel S, Pabst O, Schmidt F, Siegmund B, Strowig T, Volynets V, Wirtz S, Zeissig S, Zeissig Y, Bleich A, Baines JF. Analysis of Factors Contributing to Variation in the C57BL/6J Fecal Microbiota across German Animal Facilities. *International Journal of Medical Microbiology* 2016; 306: 343-55.

Reinhardt C. The Gut Microbiota as an Influencing Factor of Arterial Thrombosis. *Hamostaseologie* 2019; 39: 173-9.

Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-Mass Index and Incidence of Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Observational Studies. *Lancet* 2008; 371: 569-78.

Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic Cells Express Tight Junction Proteins and Penetrate Gut Epithelial Monolayers to Sample Bacteria. *Nature Immunology* 2001; 2: 361-7.

Rhee SH, Pothoulakis C, Mayer EA. Principles and Clinical Implications of the Brain-Gut-Enteric Microbiota Axis. *Nature reviews. Gastroenterology & Hepatology* 2009; 6: 306-14.

Russell WMS, Burch RL (1959) *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen

Russell WR, Gratz SW, Duncan SH, Holtrop G, Ince J, Scobbie L, Duncan G, Johnstone AM, Lobley GE, Wallace RJ, Duthie GG, Flint HJ. High-Protein, Reduced-Carbohydrate Weight-Loss Diets Promote Metabolite Profiles Likely to Be Detrimental to Colonic Health. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2011; 93: 1062-72.

Sajilata MG, Singhal RS, Kulkarni PR. Resistant Starch—a Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2006; 5: 1-17.

Samuel BS, Shaito A, Motoike T, Rey FE, Backhed F, Manchester JK, Hammer RE, Williams SC, Crowley J, Yanagisawa M, Gordon JI. Effects of the Gut Microbiota on Host Adiposity Are Modulated by the Short-Chain Fatty-Acid Binding G Protein-Coupled Receptor, GPR41. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008; 105: 16767-72.

Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes JC, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M. Nucleotide Sequence of Bacteriophage  $\Phi$ x174 DNA. *Nature* 1977; 265: 687-95.

Sanger F, Coulson AR. The Use of Thin Acrylamide Gels for DNA Sequencing. *FEBS Letters* 1978; 87: 107-10.

Sanger F. The Early Days of DNA Sequences. *Nature Medicine* 2001; 7: 267-8.

Sartor RB. Mechanisms of Disease: Pathogenesis of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology* 2006; 3: 390-407.

Sartor RB. Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 2008; 134: 577-94.

Sasaki T, Kohyama K. Influence of Non-Starch Polysaccharides on the in Vitro Digestibility and Viscosity of Starch Suspensions. *Food Chemistry* 2012; 133: 1420-6.

Satokari R, Gronroos T, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E. *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* DNA in the Human Placenta. *Letters in Applied Microbiology* 2009; 48: 8-12.

Scanlan PD, Shanahan F, Clune Y, Collins JK, O'Sullivan GC, O'Riordan M, Holmes E, Wang Y, Marchesi JR. Culture-Independent Analysis of the Gut Microbiota in Colorectal Cancer and Polyposis. *Environmental Microbiology* 2008; 10: 789-98.

Schaedler RW, Dubos R, Costello R. The Development of the Bacterial Flora in the Gastrointestinal Tract of Mice. *Journal of Experimental Medicine* 1965; 122: 59-66.

Schwartz A, Taras D, Schäfer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, Hardt PD. Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects. *Obesity (Silver Spring)* 2010; 18: 190-5.

Sekirov I, Finlay BB. The Role of the Intestinal Microbiota in Enteric Infection. *The Journal of Physiology* 2009; 587: 4159-67.

Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiological Reviews* 2010; 90: 859-904.

Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biology* 2016; 14: e1002533.

Shanahan F. The Host-Microbe Interface within the Gut. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2002; 16: 915-31.

Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and Insulin Resistance. *Journal of Clinical Investigation* 2006; 116: 1793-801.

Sicard JF, Le Bihan G, Vogeleer P, Jacques M, Harel J. Interactions of Intestinal Bacteria with Components of the Intestinal Mucus. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2017; 7: 387.

Silvi S, Rumney CJ, Cresci A, Rowland IR. Resistant Starch Modifies Gut Microflora and Microbial Metabolism in Human Flora-Associated Rats Inoculated with Faeces from Italian and UK Donors. *Journal of Applied Microbiology* 1999; 86: 521-30.

Spiller GA, Chernoff MC, Hill RA, Gates JE, Nassar JJ, Shipley EA. Effect of Purified Cellulose, Pectin, and a Low-Residue Diet on Fecal Volatile Fatty Acids, Transit Time, and Fecal Weight in Humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1980; 33: 754-9.

Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI. Developmental Regulation of Intestinal Angiogenesis by Indigenous Microbes Via Paneth Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; 99: 15451-5.

Stashenko P, Yost S, Choi Y, Danciu T, Chen T, Yoganathan S, Kressirer C, Ruiz-Tourella M, Das B, Kokaras A, Frias-Lopez J. The Oral Mouse Microbiome Promotes Tumorigenesis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *mSystems* 2019; 4

Stepankova R, Powrie F, Kofronova O, Kozakova H, Hudcovic T, Hrnecir T, Uhlig H, Read S, Rehakova Z, Benada O, Heczko P, Strus M, Bland P, Tlaskalova-Hogenova H. Segmented Filamentous Bacteria in a Defined Bacterial Cocktail Induce Intestinal Inflammation in SCID Mice Reconstituted with CD45RB<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> T Cells. *Inflammatory Bowel Diseases* 2007; 13: 1202-11.

Stewart RJ, Preece RF, Sheppard HG. Twelve Generations of Marginal Protein Deficiency. *British Journal of Nutrition* 1975; 33: 233-53.

Strober W, Fuss I, Mannon P. The Fundamental Basis of Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Clinical Investigation* 2007; 117: 514-21.

Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu X-N, Kubo C, Koga Y. Postnatal Microbial Colonization Programs the Hypothalamic–Pituitary–Adrenal System for Stress Response in Mice. *The Journal of Physiology* 2004; 558: 263-75.

Sudo N. Stress and Gut Microbiota: Does Postnatal Microbial Colonization Programs the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal System for Stress Response? *International Congress Series* 2006; 1287: 350-4.

Sun Y, Zhou L, Fang L, Su Y, Zhu W. Responses in Colonic Microbial Community and Gene Expression of Pigs to a Long-Term High Resistant Starch Diet. *Frontiers in Microbiology* 2015; 6: 877.

Swidsinski A, Loening-Baucke V, Lochs H, Hale LP. Spatial Organization of Bacterial Flora in Normal and Inflamed Intestine: A Fluorescence in Situ Hybridization Study in Mice. *World Journal of Gastroenterology* 2005a; 11: 1131-40.

Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H. Spatial Organization and Composition of the Mucosal Flora in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Journal of clinical microbiology* 2005b; 43: 3380-9.

Tachon S, Zhou J, Keenan M, Martin R, Marco ML. The Intestinal Microbiota in Aged Mice Is Modulated by Dietary Resistant Starch and Correlated with Improvements in Host Responses. *FEMS Microbiology Ecology* 2013; 83: 299-309.

Tang WHW, Kitai T, Hazen SL. Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *Circulation research* 2017; 120: 1183-96.

Tasteyre A, Barc MC, Collignon A, Boureau H, Karjalainen T. Role of FliC and FlidD Flagellar Proteins of *Clostridium Difficile* in Adherence and Gut Colonization. *Infection and Immunity* 2001; 69: 7937-40.

Tester RF, Karkalas J, Qi X. Starch Structure and Digestibility Enzyme-Substrate Relationship. *World's Poultry Science Journal* 2004; 60: 186-95.

Theis KR, Romero R, Greenberg JM, Winters AD, Garcia-Flores V, Motomura K, Ahmad MM, Galaz J, Arenas-Hernandez M, Gomez-Lopez N. No Consistent Evidence for Microbiota in Murine Placental and Fetal Tissues. *mSphere* 2020; 5

Tissier H (1900) *Recherches Sur La Flore Intestinale Des Nourrissons: (État Normal Et Pathologique)*

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; 444: 1027-31.

Turnbaugh PJ, Backhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome. *Cell Host & Microbe* 2008; 3: 213-23.

Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R, Gordon JI. A Core Gut Microbiome in Obese and Lean Twins. *Nature* 2009a; 457: 480-4.

Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. *Science Translational Medicine* 2009b; 1: 6ra14.

Tytgat HLP, Nobrega FL, van der Oost J, de Vos WM. Bowel Biofilms: Tipping Points between a Healthy and Compromised Gut? *Trends in Microbiology* 2019; 27: 17-25.

Umu OC, Frank JA, Fangel JU, Oostindjer M, da Silva CS, Bolhuis EJ, Bosch G, Willats WG, Pope PB, Diep DB. Resistant Starch Diet Induces Change in the Swine Microbiome and a Predominance of Beneficial Bacterial Populations. *Microbiome* 2015; 3: 16.

Van den Abbeele P, Gérard P, Rabot S, Bruneau A, El Aidy S, Derrien M, Kleerebezem M, Zoetendal EG, Smidt H, Verstraete W, Van de Wiele T, Possemiers S. Arabinoxylans and Inulin Differentially Modulate the Mucosal and Luminal Gut Microbiota and Mucin-Degradation in Humanized Rats. *Environmental Microbiology* 2011; 13: 2667-80.

van der Flier LG, Clevers H. Stem Cells, Self-Renewal, and Differentiation in the Intestinal Epithelium. *Annual Review of Physiology* 2009; 71: 241-60.

Waigh TA, Gidley MJ, Komanshek BU, Donald AM. The Phase Transformations in Starch During Gelatinisation: A Liquid Crystalline Approach. *Carbohydrate Research* 2000; 328: 165-76.

Walker AW, Ince J, Duncan SH, Webster LM, Holtrop G, Ze X, Brown D, Stares MD, Scott P, Bergerat A, Louis P, McIntosh F, Johnstone AM, Lobley GE, Parkhill J, Flint HJ. Dominant and Diet-Responsive Groups of Bacteria within the Human Colonic Microbiota. *The ISME Journal* 2011; 5: 220-30.

Wands AM, Fujita A, McCombs JE, Cervin J, Dedic B, Rodriguez AC, Nischan N, Bond MR, Mettlen M, Trudgian DC, Lemoff A, Quiding-Järbrink M, Gustavsson B, Steentoft C, Clausen H, Mirzaei H, Teneberg S, Yrlid U, Kohler JJ. Fucosylation and Protein Glycosylation Create Functional Receptors for Cholera Toxin. *eLife* 2015; 4: e09545.

Wang S, Copeland L. Molecular Disassembly of Starch Granules During Gelatinization and Its Effect on Starch Digestibility: A Review. *Food & Function* 2013; 4: 1564-80.

Wenderlein J, Boswald LF, Ulrich S, Kienzle E, Neuhaus K, Lagkouvardos I, Zenner C, Straubinger RK. Processing Matters in Nutrient-Matched Laboratory Diets for Mice-Microbiome. *Animals (Basel)* 2021; 11

Whipps J, Lewis K, Cooke R. Mycoparasitism and Plant Disease Control. *Fungi in Biological Control Systems* 1988: 161-87.

Woese CR. Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews* 1987; 51: 221-71.

Woo PC, Lau SK, Teng JL, Tse H, Yuen KY. Then and Now: Use of 16S rDNA Gene Sequencing for Bacterial Identification and Discovery of Novel Bacteria in Clinical Microbiology Laboratories. *Clinical Microbiology and Infection* 2008; 14: 908-34.

Wostmann BS, Knight PL, Keeley LL, Kan DF. Metabolism and Function of Thiamine and Naphthoquinones in Germfree and Conventional Rats. *Federation Proceedings* 1963; 22: 120-4.

Wostmann BS, Wiech NL, Kung E. Catabolism and Elimination of Cholesterol in Germfree Rats. *Journal of Lipid Research* 1966; 7: 77-82.

Wostmann BS, Larkin C, Moriarty A, Bruckner-Kardoss E. Dietary Intake, Energy Metabolism, and Excretory Losses of Adult Male Germfree Wistar Rats. *Laboratory Animal Science* 1983; 33: 46-50.

Wurm P, Dorner E, Kremer C, Spranger J, Maddox C, Halwachs B, Harrison U, Blanchard T, Haas R, Hogenauer C, Gorkiewicz G, Fricke WF. Qualitative and Quantitative DNA- and RNA-Based Analysis of the Bacterial Stomach Microbiota in Humans, Mice, and Gerbils. *mSystems* 2018; 3

Yatsunenکو T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Baldassano RN, Anokhin AP, Heath AC, Warner B, Reeder J, Kuczynski J, Caporaso JG, Lozupone CA, Lauber C, Clemente JC, Knights D, Knight R, Gordon JI. Human Gut Microbiome Viewed across Age and Geography. *Nature* 2012; 486: 222-7.

Young W, Roy NC, Lee J, Lawley B, Otter D, Henderson G, McCann MJ, Tannock GW. Changes in Bowel Microbiota Induced by Feeding Weanlings Resistant Starch Stimulate Transcriptomic and Physiological Responses. *Applied and Environmental Microbiology* 2012; 78: 6656-64.

Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, Kudrna D, Braidotti M, Yu Y, Parameswaran P, Crowell MD, Wing R, Rittmann BE, Krajmalnik-Brown R. Human Gut Microbiota in Obesity and after Gastric Bypass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009; 106: 2365-70.

Zhang S, Zhang S, Hu L, Zhai L, Xue R, Ye J, Chen L, Cheng G, Mruk J, Kunapuli SP, Ding Z. Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2 Receptor Is Expressed in Platelets and Enhances Platelet Activation and Thrombosis. *Circulation* 2015; 131: 1160-70.

Zhang X, Shen D, Fang Z, Jie Z, Qiu X, Zhang C, Chen Y, Ji L. Human Gut Microbiota Changes Reveal the Progression of Glucose Intolerance. *PLoS One* 2013; 8: e71108.

Zheng L, Kelly CJ, Battista KD, Schaefer R, Lanis JM, Alexeev EE, Wang RX, Onyiah JC, Kominsky DJ, Colgan SP. Microbial-Derived Butyrate Promotes Epithelial Barrier Function through IL-10 Receptor-Dependent Repression of Claudin-2. *Journal of Immunology* 2017; 199: 2976-84.

Zhu W, Gregory JC, Org E, Buffa JA, Gupta N, Wang Z, Li L, Fu X, Wu Y, Mehrabian M, Sartor RB, McIntyre TM, Silverstein RL, Tang WHW, Di Donato JA, Brown JM, Lusa AJ, Hazen SL. Gut Microbial Metabolite TMAO Enhances Platelet Hyperreactivity and Thrombosis Risk. *Cell* 2016; 165: 111-24.

---

Zivkovic AM, German JB, Lebrilla CB, Mills DA. Human Milk Glycobiome and Its Impact on the Infant Gastrointestinal Microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108 Suppl 1: 4653-8.

**VIII. ANHANG****WOLTERS KLUWER HEALTH, INC. LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS**

Apr 21, 2021

This Agreement between LMU Munich -- Jasmin Wenderlein ("You") and Wolters Kluwer Health, Inc. ("Wolters Kluwer Health, Inc.") consists of your license details and the terms and conditions provided by Wolters Kluwer Health, Inc. and Copyright Clearance Center.

License Number	5044241129709
License date	Apr 08, 2021
Licensed Content Publisher	Wolters Kluwer Health, Inc.
Licensed Content Publication	Circulation Research
Licensed Content Title	Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease
Licensed Content Author	W.H. Wilson Tang, Takeshi Kitai, Stanley L. Hazen
Licensed Content Date	Mar 31, 2017
Licensed Content Volume	120
Licensed Content Issue	7
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/College
Sponsorship	No Sponsorship
Format	Print and electronic
Will this be posted online?	Yes, on a secure website
Portion	Figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Author of this Wolters Kluwer article	No
Will you be translating?	No
Intend to modify/change the content	No
Title	Der Einfluss des Stärkeaufschlussgrads in kommerziellen Versuchstierfuttern auf das intestinale Mikrobiom von Mäusen
Institution name	Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie, Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen, Tierärztliche Fakultät, LMU München
Expected presentation date	Feb 2022
Portions	Figure on Page 1185
Requestor Location	LMU Munich Veterinärstraße 13
	Munich, 80539 Germany Attn: LMU Munich
Publisher Tax ID	EU826013006
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

**Abbildung A 1: Nutzungsrecht für Abbildung 3**

SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS	
Jul 15, 2021	
This Agreement between LMU Munich -- Jasmin Wenderlein ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.	
License Number	5110230524510
License date	Jul 15, 2021
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Nature Reviews Microbiology
Licensed Content Title	Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences
Licensed Content Author	Pablo Yarza et al
Licensed Content Date	Aug 14, 2014
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Will you be translating?	no
Circulation/distribution	1 - 29
Author of this Springer Nature content	no
Title	Der Einfluss des Stärkeaufschlussgrads in kommerziellen Versuchstierfuttern auf das intestinale Mikrobiom von Mäusen
Institution name	Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie, Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen, Tierärztliche Fakultät, LMU München
Expected presentation date	Feb 2022
Portions	Figure 1
Requestor Location	LMU Munich Veterinärstraße 13
Total	Munich, 80539 Germany Attn: LMU Munich
Terms and Conditions	0.00 EUR

Abbildung A 2: Nutzungsrecht für Abbildung 15

## IX. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Straubinger meinen großen Dank aussprechen. Das interessante Thema und die fortwährende Unterstützung haben mir eine Perspektive in einer schweren Zeit gegeben. Außerdem möchte ich mich für die ausgezeichnete Betreuung und den Glauben an meinen weiteren wissenschaftlichen Werdegang bedanken.

Mein besonderer Dank gilt außerdem all meinen Kollegen am Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie, die mir während der Dissertation mit Rat und Tat und natürlich auch vielen lieben Gesten und guten Gesprächen zur Seite gestanden haben. Insbesondere gilt dieser Dank Christoph, Stephanie, Astrid und Eva, sowie unseren Tierpflegern Axel, Patrizia, Uschi und Hans, sowie den beiden guten Seelen des Hauses Gunther und Angelika. Auch möchte ich mich bei meinen Kollegen Sophie, Anna, den drei Katharinas, und Sebastian für die großartige Zeit und den Spaß, den wir gemeinsam hatten, bedanken. In diesem Zuge möchte ich mich auch bei meiner Grundschulfreundin Jenny bedanken für die allwöchentlichen Kochabende, die Unterstützung seit der Grundschule und ihr Wissen um Interpunktation. Zudem möchte ich meiner Freundin und Reitlehrerin Egga für die vielen schönen Abende, die Diskussionen und ihre Geduld mit meinen durch die der Doktorarbeit beschäftigten Gedanken währen chaotischen Reitstunden danken. Ebenso möchte ich meinen Freunden Laura und Stephan für Ihre Unterstützung und tatkräftige Anwerbung von Korrekturlesern danken. Dieser Dank gilt insbesondere Herrn Dr. Heßler-Hammerstein.

Neben den Kollegen an meinem eigenen Lehrstuhl möchte ich mich bei verschiedenen Kollegen anderer Lehrstühle für die Unterstützung bei diesem Projekt bedanken. Den Kollegen vom Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik, Frau Prof. Kienzle und Frau Dr. Böswald, möchte ich für die Mitentwicklung und Mitwirkung an unserem Projekt danken. Für ihre Unterstützung in bioinformatischen Fragestellungen möchte ich Herrn PD. Dr. Neuhaus, Herrn Dr. Lagkouvardos und Frau Dr. Reitmeier vom ZIEL Institut der TUM und Herrn Dr. Zenner von Institut für Tierphysiologie danken. Ebenso möchte ich mich bei den technischen Assistenten am ZIEL Institut für die Bearbeitung der Proben und Einarbeitung in die DNA-Extraktion und Sequenzierung bedanken.

Für die finanzielle Unterstützung dieses Projekts möchte ich mich bei der H. Wilhelm-Schaumann-Stiftung bedanken.

Meinen Eltern möchte ich einen besonderen Dank aussprechen. Danke, dass ihr mich immer unterstützt habt und mich treu begleitet habt, wie steinig unser Weg auch gewesen sein mag. Danke, dass ihr mich ermutigt und unterstützt habt, ohne Euch hätte ich es nie so weit geschafft. Danke für Eure Liebe, Eure Geduld, Euren Zuspruch und Euren Glauben an mich während des Studiums und der Arbeit an dieser Dissertation. Danke auch für das Tausendfache Lesen und korrigieren dieser Arbeit.

Ebenso möchte ich meinem Onkel für seine Unterstützung und seinen Glauben an mich danken. Danke außerdem dafür, dass du meinen Computer immer wieder zum Laufen gebracht hast und mir in informatischen Fragestellungen zur Seite gestanden hast.

Zuletzt möchte ich Herrn PD Dr. Pohlig für seinen unermüdlichen Einsatz um meine Gesundheit danken. Ohne Ihre fachliche Expertise und ausgezeichneten Operationskünste wäre mir dieser Weg wohl verschlossen geblieben.