

Schlussbericht zum DZIF-Vorhaben

Projektnummer - Projekttitlel

TI 07.001_Renk

Aufstockung TI 07.001_Renk_01: Technical support during parental leave

Clinical leave programme: „Eine Pilotstudie der intestinalen Mikrobiota von Neugeborenen mit angeborenen Herzfehlern - prospektive Studie mit serieller Mikrobiomentnahme vor und nach einer kardiopulmonalen Bypasschirurgie“

Koordinierende Einrichtung:

Apl. Prof. Dr. med. Silke Peter
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Elfriede-Aulhorn-Straße 6
72076 Tübingen
Silke.Peter@med.uni-tuebingen.de

Beteiligte Einrichtung(en):

Prof. Dr. med. M. Hofbeck
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
Abteilung für Kinderkardiologie, Pneumologie und Pädiatrische Intensivmedizin
Hoppe-Seyler Str. 1-3
72076 Tübingen
Michael.Hofbeck@med.uni-tuebingen.de

Apl. Prof. Dr. med. Silke Peter
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Elfriede-Aulhorn-Straße 6
72076 Tübingen
Silke.Peter@med.uni-tuebingen.de

NGS Competence Center Tübingen (NCCT)
Prof. Olaf Riess, Coordinator
Apl. Prof. Silke Peter, Clinical Microbiology
Dr. Sven Nahnsen, Quantitative Biology Center (QBiC)
Calwerstraße 7
72076 Tübingen

Executive Summary/Abstract

Introduction: Infants with congenital heart defects (CHD) are at increased risk for infection, especially necrotizing enterocolitis. Nosocomial pathogens may affect the gut microbiota during a stay in the pediatric cardiac intensive care unit, a possibly “hostile environment”. The administration of antibiotics, impaired intestinal perfusion and mesenteric hypoxia during and after cardiopulmonary bypass surgery (CPBS) may alter the intestinal microbial balance. This potentially leads to colonization with pathogenic or resistant bacteria, impaired development of the infant immune system and susceptibility to infection. This pilot study aimed to get insight into the composition, alteration and functional capacity of the intestinal microbiota of neonates with CHD undergoing CPBS.

Method: In a cross-sectional analysis, we determined taxonomic abundance, diversity metrics and functional capacity of the intestinal microbiota by Next Generation Sequencing analysis of stool samples of healthy neonates compared to neonates with CHD. Additionally, we performed a serial microbiota analysis by collecting stool samples from neonates with CHD at five timepoints before and after CPBS. Key clinical variables (e.g. antibiotic treatment, type of nutrition, vasopressors) were recorded and intestinal perfusion and oxygenation was assessed by doppler interrogation and the O2C method.

Preliminary Results: Within this project we were able to establish a Workflow from clinical sample collection, storage, DNA/RNA parallel purification with Microbial Community Standard Control samples and Spike-in Controls, Library Prep, Quality Control, Next-Generation Sequencing and a Bioinformatic Pipeline for taxonomic and functional analysis. In total, we were able to sequence DNA and RNA from a total of 22 control patients (each at one time point) and 62 stool samples from 13 children with congenital heart disease (at 5 different time points). The taxonomic and functional analysis is currently running and the development of a bioinformatic pipeline for Metatranscriptomics is under way.

Preliminary Conclusion: Fecal microbiota DNA and RNA shotgun sequencing of neonatal samples is feasible in clinical routine and standardized protocols, including quality control and spike-in organisms can be developed for clinical use. Final Metagenomics and Metatranscriptomics results of our cohort are under way and will be published soon.

Deutsche Fassung:

Einleitung: Säuglinge mit angeborenem Herzfehler haben ein erhöhtes Risiko für Infektionen, insbesondere für nekrotisierende Enterokolitis. Nosokomiale Erreger können die Darmmikrobiota während eines Aufenthalts auf der pädiatrischen, kardiologischen Intensivstation, einer "feindlichen Umgebung", beeinflussen. Die Verabreichung von Antibiotika, eine beeinträchtigte intestinale Perfusion und mesenteriale Hypoxie während und nach einer Operation am kardiopulmonalen Bypass (CPBS) können das mikrobielle Gleichgewicht im Darm verändern. Dies kann zu einer Besiedlung mit pathogenen oder resistenten Bakterien, einer beeinträchtigten Entwicklung des kindlichen Immunsystems und einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen führen. Ziel dieser Pilotstudie war es, einen Einblick in die Zusammensetzung, Veränderung und Funktionsfähigkeit der intestinalen Mikrobiota von Neugeborenen mit angeborenem Herzfehler zu erhalten, die sich einer Operation unterziehen.

Methode: In einer Querschnittsanalyse werden taxonomische Häufigkeit, die Diversitätsmetriken und die funktionelle Kapazität der intestinalen Mikrobiota durch Next Generation Sequencing-Analyse von Stuhlproben gesunder Neugeborener im Vergleich zu Neugeborenen mit angeborenem Herzfehler bestimmt. Zusätzlich führen wir eine serielle Mikrobiota-Analyse durch, indem wir Stuhlproben von Neugeborenen mit angeborenem Herzfehler zu fünf Zeitpunkten vor und nach CPBS sammeln. Wichtige klinische Variablen (z. B. Antibiotikabehandlung, Art der Ernährung, Vasopressoren) wurden aufgezeichnet, und die Darmperfusion und -oxygenierung wurde mittels Dopplerabfrage und der O₂C-Methode beurteilt.

Vorläufige Ergebnisse: Im Rahmen dieses Projekts konnten wir einen Arbeitsablauf von der Entnahme klinischer Proben, der Lagerung, der parallelen Aufreinigung von DNA/RNA mit mikrobiellen Standardkontrollproben und Spike-in-Kontrollen, der Library-Prep, der Qualitätskontrolle, der Next-Generation-Sequenzierung bis zu einer bioinformatischen Auswertungspipeline für die taxonomische und funktionelle Analyse etablieren. Insgesamt konnten wir DNA und RNA von insgesamt 22 Kontrollpatienten (jeweils zu einem Zeitpunkt) und 62 Stuhlproben von 13 Kindern mit angeborenem Herzfehler (zu 5 verschiedenen Zeitpunkten) sequenzieren. Die taxonomische und funktionelle Analyse läuft derzeit, und die Entwicklung einer bioinformatischen Pipeline für Metatranskriptomik ist ebenfalls im Gange.

Vorläufige Schlussfolgerung: DNA- und RNA-Shotgun-Sequenzierung von Neugeborenenstuhlproben ist in der klinischen Routine durchführbar. Standardisierte Protokolle, einschließlich Qualitätskontrolle und Spike-in-Organismen können für den klinischen Einsatz entwickelt werden. Die endgültigen Metagenomics- und Metatranscriptomics-Ergebnisse unserer Kohorte sind in Arbeit und werden nach statistischer Auswertung veröffentlicht.

Kapitel 1: Kurzbericht (wird veröffentlicht)

a) Ursprüngliche Aufgabenstellung und wissenschaftlicher/technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Ziel dieser Pilotstudie war es einerseits die Zusammensetzung (taxonomische Häufigkeiten und Diversitätsmetrik) der intestinalen Mikrobiota von Neugeborenen mit angeborenem Herzfehler zu untersuchen und mit der Zusammensetzung der Mikrobiota von gesunden Säuglingen zu vergleichen. Zum Anderen führten wir eine serielle Mikrobiota-Analyse der Säuglinge mit angeborenem Herzfehler an fünf verschiedenen Zeitpunkten (vor/nach der chirurgischen Korrektur des Herzfehlers) durch, um die Veränderung der intestinalen Mikrobiota über die Zeit und deren Funktionsfähigkeit zu beobachten.

Die ursprünglichen Vorhabenziele waren wie folgt benannt:

1. Bestimmung der taxonomischen Häufigkeiten und Diversitätsmetriken der Darmmikrobiota von Neugeborenen mit angeborenem Herzfehler in einer Querschnittsstudie und Vergleich mit Daten von gesunden Neugeborenen.
2. Verständnis der taxonomischen Entwicklung und Veränderung der Darmmikrobiota während der Behandlung eines angeborenen Herzfehlers auf einer pädiatrischen Intensivstation, einschließlich des möglichen Einflusses einer kardiopulmonalen Bypass-Operation in einer Längsschnittanalyse.
3. Bestimmung der Auswirkungen von Art und Dauer der Antibiotikabehandlung, der Ernährung auf die Zusammensetzung der Darmmikrobiota sowie anderer klinischer Variablen, die möglicherweise in Behandlungsentscheidungen einfließen könnten.
4. Bestimmung der Durchführbarkeit und des Stichprobenumfangs für eine größere Studie zur selektiven Beeinflussung der Darmmikrobiota bei kritisch kranken Neugeborenen mit angeborenem Herzfehler.

Abweichungen von den ursprünglichen Vorhabenzielen:

Die ursprünglichen Vorhabenziele wurden verfolgt (1-4). Zusätzlich wurde die intestinale Perfusion und Oxygenierung mittels Dopplerflußmessung und Messung der Gewebeoxygenierung (O₂C-Methode) als weitere externe, klinische Schlüsselvariablen erfasst, da potentiell ein Zusammenhang zwischen einer veränderten Darmperfusion, der intestinalen Oxygenierung und dem intestinalen mikrobiellen Gleichgewicht, dem Resistom und infektiösen Komplikationen besteht.

Durch eine zusätzlich Förderung über einen DZIF Sequencing – Grant konnte die Studie um eine Metatranskriptomanalyse erweitert werden, um die funktionelle Komponente, u.a. das inflammatorische Potential der intestinalen Mikrobiota in unserem Kollektiv zu untersuchen.

Eigenanteil:

Der Eigenanteil an dieser Pilotstudie durch die DZIF Clinical leave Stipendiaten bestand in

- (a) Literaturrecherche (PubMed), Planung, Entwicklung und Konzeption der Studie inclusive der Einholung statistischer und methodischer Beratung
- (b) Einreichung des Prüfplans für das Ethikvotum zum Vorhaben
- (c) Rekrutierung der Patienten, Probensammlung, Datenerhebung der klinischen Daten mit Aufbau einer Datenbank (EpiInfo/Microsoft Access). Betreuung, Anleitung und Unterstützung einer medizinischen Doktorandin.
- (d) Adaptation der Methode inclusive Vorversuchen zur Probenverarbeitung (Präanalytik) und DNA/RNA Parallelextraktion mittels eines kommerziell verfügbaren Kits. Vorversuche zur Bestimmung des DNA/RNA Gehalts (qPCR und Gelelektrophorese). Auswahl der adäquaten Menge und Art von Spike-in Organismen.
- (e) Sequenzierung eines Probensets als „Vorversuch“ unter Anleitung mit Unterstützung des Know-Hows in der aufnehmenden Einrichtung.
- (f) Anleitung und Zusammenarbeit mit einer technischen Assistentin (Aufstockung TI 07.001_Renk_01: Technical support during parental leave), die die Proben anhand der entwickelten Methode verarbeitete.
- (g) Bioinformatische Auswertung des „Vorversuch“ mittels kommerzieller Auswertungssoftware (Kaiju/QIAGEN CLC Workbench). Prüfung der Plausibilität der Ergebnisse.
- (h) Leitung der bioinformatisch/statistischen Auswertung und Festlegung des Vorgehens in Zusammenarbeit mit einer Bioinformatikerin und einem Data Management Scientist (Genutzte Programme zur taxonomischen und funktionellen Annotation: DIAMOND/MEGAN)

b) Ablauf des Vorhabens

Die ursprüngliche Vorhabenlaufzeit für die praktische Umsetzung war von 01.10.2019 – 01.09.2020 geplant. Es erfolgte eine Laufzeitverlängerung wegen Unterbrechung durch Mutterschutz und Elternzeit sowie eines Stopps der Probensammlung (keine Zugang für nicht-klinisches Personal zur Kinderintensivstation) und Sequenzierung von 04/2020 bis ca. 04/2021 aufgrund der Coronaviruspandemie. Das Vorhaben wurde dadurch auf die Laufzeit von 01.10.2019 bis zum 31.03.2022 verlängert.

Das Vorhaben konnte in der Laufzeit bis zum letzten WP: Bioinformatics and Data Analyses durchgeführt, die bioinformatische und statistische Auswertung ist noch nicht vollständig abgeschlossen.

Änderungen zum ursprünglichen Arbeitsprogramm bestehen in folgenden Bereichen:

- (1) Klinische Daten: Zusätzliche Erhebung weiterer externer, klinischer Schlüsselvariablen:
Erfassung der intestinalen Perfusion und Oxygenierung mittels Dopplerflußmessung und Messung der Gewebeoxygenierung (O2C-Methode).
- (2) Zusätzliche Arbeitspakete:
Zusätzliche RNA Extraktion aus den Stuhlproben und Durchführung einer Metatranskriptomanalyse.
- (3) Finanzierung:
 - (a) Erweiterung der Extraktionsmethode um eine RNA Extraktion und zusätzliche Metatranskriptomanalyse der Proben (ermöglicht durch DZIF Sequenzierungsgrant 2020).
 - (b) Genehmigung TI 07001_Renk_01: Technician during maternity leave und Durchführung der weiteren Probenverarbeitung (DNA/RNA Extraktion, Library Prep) gemäß der entwickelten Methode durch Technische Assistentin.
- (4) Kooperationspartner:
Zusammenarbeit mit der Abteilung „Center for bioinformatics, Algorithms in bioinformatics“ wurde durch eine in der Zwischenzeit in-house im Institut für Mikrobiologie und Hygiene verfügbare Bioinformatikerin und einen Data Scientist ersetzt.

c) Wesentliche Ergebnisse und ggf. Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen

Studienpopulation: Die Gruppe der Patienten mit angeborenem Herzfehler (n=24) verteilt sich etwa 1:1 in Kinder, bei denen der Herzfehler durch die Operation am kardiopulmonalen Bypass korrigiert werden konnte und in Kinder, bei denen postoperativ weiterhin eingeschränkte Perfusions- und Oxygenierungsverhältnisse bestehen. Es wurden im Studienzeitraum 30 gesunde Kontrollpatienten rekrutiert.

Klinische Datenerfassung: Es wurde eine Datenbank aufgebaut, in der insgesamt 133 klinische Variablen/Parameter, bei 20 auswertbaren Patienten und 30 auswertbaren gesunden Kontrollpatienten enthalten sind.

Entwicklung des Workflows bzw. Methode zur DNA/RNA Extraktion und Library Prep:

Es wurde zunächst ein Workflow für die Probensammlung, Asservierung und Verarbeitung und die DNA/RNA Extraktion entworfen und anhand eines Testlaufs (es wurden Reservepatientenproben verwendet) erprobt. Durch Verwendung eines kommerziellen Standards (ZymoBIOMICS Microbial Community Standard) konnten die generelle Validität des entwickelten Protokolls (Probenverarbeitung, Spike-In Methode, DNA und RNA Extraktion, Library-Prep und Sequenzierung) mittels Anwendung einer kommerziellen Auswertungssoftware (Kajiu/Qiagen CLC Workbench) überprüft werden. Anschließend fand eine Beratung durch das „Quantitative Biology Center (QBiC) -“, um eine möglichst optimale und repräsentative Methode zu entwickeln, wie gepoolte Proben/biologische/technische Replikaten für die Sequenzierung der Studienproben verwendet werden konnten.

Next-Generation Sequencing: Die Sequenzierung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Tübinger NGS Competence Center (NCCT) am Institut für Humangenetik (Professor Dr. Olaf Riess). Wir konnten DNA bzw. RNA von insgesamt 22 Kontrollpatienten (jeweils zu einem Zeitpunkt) und 62 Stuhlproben von 13 Kindern mit angeborenem Herzfehler (im Rahmen von Visit 1-5) sequenzieren.

Bioinformatics pipeline development

Die Bioinformatische Pipeline zur Auswertung wurde durch eine im NCCT tätige Bioinformatikerin in Zusammenarbeit mit der Clinical Leave Stipendiatin und einem Data Scientist etabliert.

Kapitel 2: Eingehende Darstellung (wird veröffentlicht)

a) Ausführliche Darstellung der erzielten Ergebnisse im Einzelnen

Einrichtung

Rekrutierte Studienpopulation

Diese Studie wurde auf der kardiologischen, pädiatrischen Intensivstation und auf der Entbindungsstation des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt. Das Studienprotokoll wurde vorab von der unabhängigen Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Tübingen genehmigt (496/2018BO1). Von allen Eltern oder Erziehungsberechtigten wurde im Namen ihrer Kinder eine schriftliche Einwilligungserklärung zur Studienteilnahme eingeholt.

Gemäß des Studienprotokolls und einer primär geplanten Patienten und Probandenzahl von jeweils 15 pro Gruppe konnten wir das Rekrutierungsziel erreichen und sogar übertreffen. Bis zum 19.04.2021 (Visit 5 am 27.07.2021) konnten primär 24 Patienten mit angeborenem Herzfehler und 30 gesunde Kontrollpatienten (bis zum 24.12.2020), die auf die kardiologische Kinderintensivstation des Universitätsklinikums Tübingen aufgenommen wurden, eingeschlossen werden. Dies entspricht der im Studienprotokoll und der Vorhabenbeschreibung geplanten Mindestzahl (n=15 pro Gruppe) um im hypothesengenerierenden Teil der Studie Unterschiede mit einer intra-individuellen Varianz von 0.8 zu detektieren.

Die bisherige Auswertung der intestinalen Perfusionsparameter ergab in den beiden Patientenuntergruppen präoperativ keinen Unterschied der Perfusions- und Oxygenierungsparameter, während sich postoperativ bei den Kindern mit Korrekturoperation eine signifikant gebesserte Perfusion und Oxygenierung ergab.

Untersuchungsablauf, Probengewinnung

Der Untersuchungsablauf und die Probengewinnung erfolgten wie in der ursprünglichen Vorhabenbeschreibung geplant wie folgt:

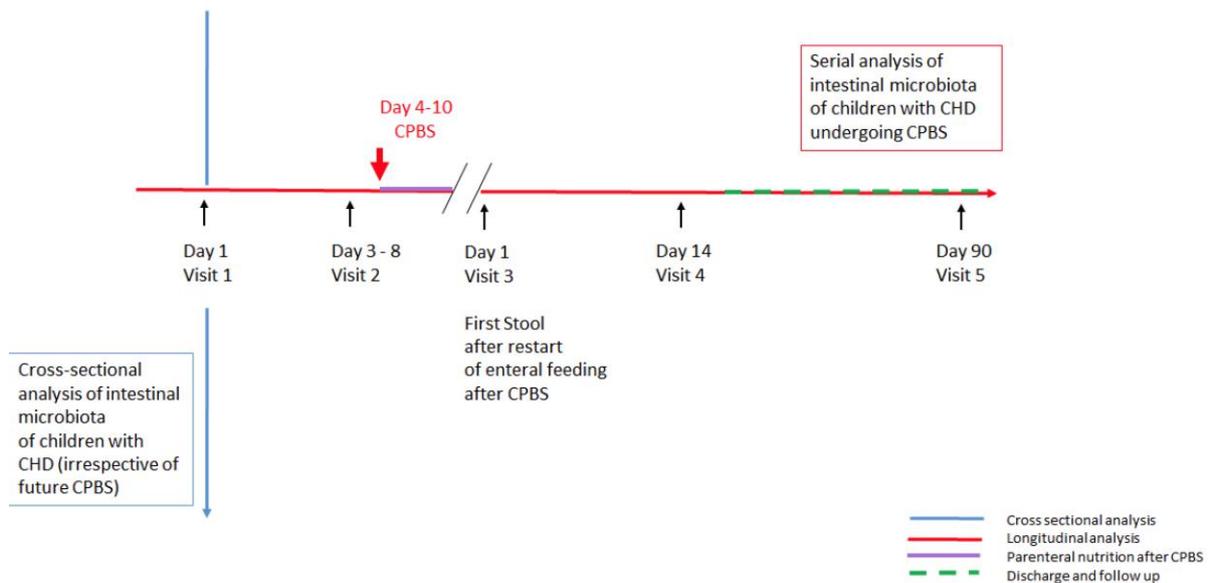


Abb. 1: Beschreibung des Studienaufbaus und -verlaufs sowie der mikrobiologischen Probenentnahme. Vor Visit 1: Screening (Ein/Ausschlusskriterien, Informed Consent). Visit 1-5: Baseline-Untersuchung, mikrobiologische Probe (Stuhl) und klinische Daten. Ergänzung in Abweichung zum Ursprünglichen Vorhaben: bei Visit 1-4 wurden zusätzlich Dopplerflußmessungen und Gewebeoxygenierung gemessen.

Die **Datenerfassung** der 133 klinischen Variablen erfolgte mittels einer in Epi Info™ (<https://www.cdc.gov/epiinfo/index.html>) angelegten Datenbank und wurde anschließend durch einen Clinical Data Scientist für einen Import in eine Microsoft Access Datenbank aufbereitet. Der Gesamtdatensatz ist validiert und zur statistischen Auswertung vorbereitet.

Die **Probensammlung** erfolgte mit Hilfe kommerziell erhältlicher Stuhlsammelgefäße, die eine vordefinierte Menge an DNA/RNA-Shield enthalten (DNA/RNA Shield Fecal Collection Tubes (Zymo Research)) und für die Konservierung von Nukleinsäuren aus Stuhlproben bestimmt sind. Das in diesen Sammelröhrchen aufbewahrte fäkale Material ist bei Raumtemperatur stabil und kann zur längerfristigen Aufbewahrung eingefroren werden. Die Proben wurden bis zu 6 Wochen bei Raumtemperatur (4°) im Kühlschrank aufbewahrt. Nach Eingang im Labor wurden die Proben homogenisiert und 2-5 ml Aliquots vor der Extraktion bei -80°C gelagert.

Bei gesunden Neugeborenen auf der Entbindungsstation wurde ein einziges biologisches Replikat gewonnen. Bei Neugeborenen mit angeborenem Herzfehler wurden mindestens 2(-3) biologische Replikate entweder aus derselben Stuhlprobe oder aus einer konsekutiven Stuhlprobe pro Visit gewonnen.

Zeitlich, inhaltlich und finanziell wurde der Hauptteil der Zuwendungen des Clinical leave Stipendiums auf die Entwicklung und Durchführung von WP 1 und WP 2 verwendet. Im folgenden werden die entwickelten Methoden dargestellt.

WP 1: Next-Generation Sequencing Analyse der Stuhlproben zu jedem Studienvisit

Zunächst wurde innerhalb eines Testlaufs die DNA/RNA Extraktionsmethode aus Stuhl von Neugeborenen optimiert. Dabei gestaltete sich die Extraktion v.a. bei gesunden Neugeborenen, die teilweise noch mekoniumhaltigen Stuhl absetzten schwierig. Um genügend Kontrollproben mit ausreichendem DNA/RNA Gehalt auswerten zu können, wurden daher weit mehr gesunde Neugeborene rekrutiert als ursprünglich geplant (30 vs 15 im ursprünglichen Vorhaben). Die Extraktionsmethode wurde optimiert und DNA und RNA Gehalt bzw. Qualität des Testlaufs mittels Gelelektrophorese und quantitativer PCR überprüft. Zusätzlich wurde getestet, welche Spike-In Organismen in welcher Konzentration zugesetzt werden sollten um am Ende die absolute Quantifizierung der in den Studienproben enthaltenen Organismen vornehmen zu können.

Zusammenfassend wurden DNA und RNA parallel mit dem ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep Kit (Zymo Research) extrahiert. Für jede DNA/RNA-Probenextraktion wurden mindestens 4 und maximal 6 Aliquots (technische Replikate) verwendet. Die Proben wurden mit ZR BashingBead™ Lysis Tubes und Lysepuffer bearbeitet und über eine Spin-Säule gereinigt und gefiltert, um PCR-Inhibitoren zu entfernen. Für RNA-Proben führten wir eine DNase-I-Behandlung in der Säule gemäß den Anweisungen des Herstellers durch.

Die gereinigte DNA und RNA wurde mit einem Qubit-Fluorometer unter Verwendung der Invitrogen Qubit DNA and RNA Broad Range (BR) Assay Kits quantifiziert.

Um die Qualität und Reproduzierbarkeit des Extraktionsverfahrens zu verbessern, wurde bei jeder Extraktion von DNA/RNA aus fäkalen Proben eine ZymoBIOMICS Microbial Community Standard Probe mitgeführt. Dieser mikrobielle Standard besteht aus einer vordefinierten Zusammensetzung von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien und Hefen mit unterschiedlicher Größe und Zellwandzusammensetzung. Das breite Spektrum an Organismen mit unterschiedlichen Eigenschaften ermöglicht die Charakterisierung, Optimierung und Validierung von Lyseverfahren wie dem Bead Beating.

Anschließend wurde die DNA und RNA Library Prep, Quality Control und Pooling nach einem in der aufnehmenden Abteilung und im NCCT bereits etablierten und standardisierten Verfahren durchgeführt. Die Sequenzierung der DNA erfolgte mittels NovaSeq 6000 S2 Rgt Kit v1.5 (300 cycles) mit 2x150 bp, paired-end Reads sowie eine Nachsequenzierung mittels NextSeq 500 Mid Output Kit v2.5 (300 cycles) mit 2x150 bp, paired-end Reads. Die Sequenzierung der RNA erfolgte mittels NovaSeq 6000 S2 Rgt Kit v1.5 (300 cycles) mit 2x150 bp, paired-end Reads im Institut für Humangenetik (NCCT) der Universität Tübingen.

Insgesamt konnten wir DNA bzw. RNA von insgesamt 22 Kontrollpatienten (jeweils zu einem Zeitpunkt) und 62 Stuhlproben von 13 Kindern mit angeborenem Herzfehler (im Rahmen von Visit 1-5) sequenzieren.

WP 2: Bioinformatische und statistische Auswertung

Die Entwicklung einer bioinformatischen Pipeline zur computergestützten Auswertung der Next Generation Sequencing Daten erfolgte, abweichend zur ursprünglichen Vorhabenbeschreibung durch eine in der Abteilung angestellte Bioinformatikerin und unter ständiger Beratung durch einen Data Scientist. Die in der ursprünglichen Vorhabenbeschreibung erwähnte Auswertungssoftware für die taxonomische und funktionelle Analyse (DIAMOND und MEGAN) wurde beibehalten, die gesamte Bioinformatische Pipeline aber wie folgt adaptiert:

Zusammenfassend wurden die Daten mit fastp (v0.20.1) qualitätsgeprüft und getrimmt. Um einen ersten Eindruck von der Komplexität der Daten zu erhalten, führten wir eine erste taxonomische Analyse mit kraken2 (v2.0.7-beta) durch. Anschließend wurden die Daten mit kneaddata (v0.10.0) gefiltert, um alle menschlichen und Spike-in-Reads zu entfernen. Kneaddata verwendete Trimmomatic (v0.39) für das Qualitätstrimming und bowtie2 (v2.4.5) für die Read-Filterung.

Die restlichen Reads wurden für das Mapping auf eine Proteindatenbank (Download: 27.01.2021) mit Diamond (v2.0.13) verwendet. Das Diamond-Ergebnis wurde für die taxonomische und „Pathwayanalyse“ mit Megan (v6.20.19) verwendet. Wir verwendeten die Community-Version von Megan sowie den daa-meganizer, um das Diamond-Ergebnis in ein Megan-kompatibles Format mit der Mapping-Datei vom Januar 2021 zu konvertieren.

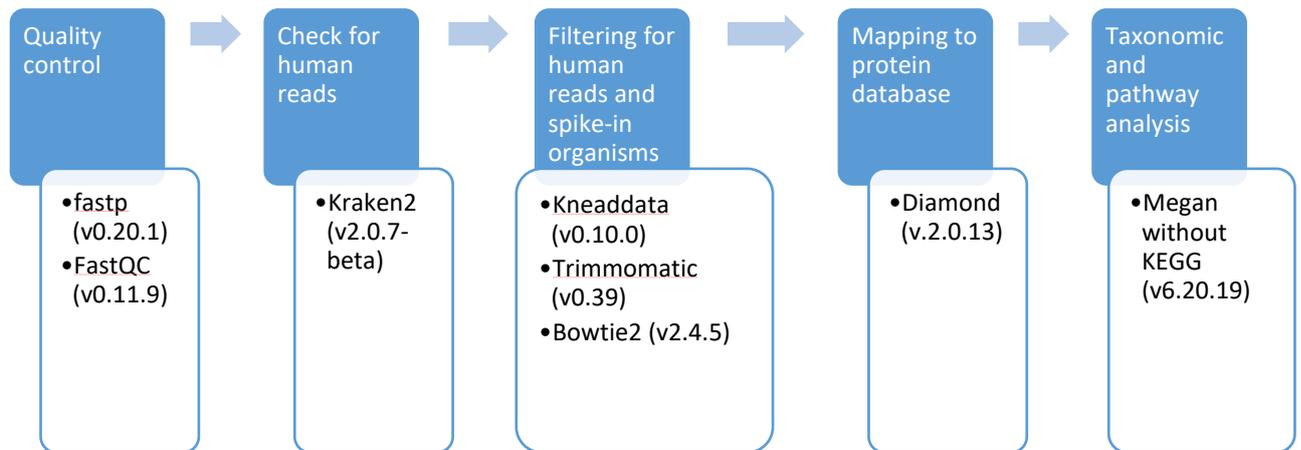


Abb. 2: *Bioinformatische Pipeline für Metagenomics.*

Weitere Abweichungen vom ursprünglichen Arbeitsprogramm

- (a) Immunologische Daten wie IgA, IgM und IgG sowie Lymphozytensubpopulationen und Humaner Zytokinassay wurden nicht erhoben, da dies in den meisten Fällen eine nicht im Studienprotokoll erwähnte zusätzliche Blutabnahme erfordert hätte.
- (b) Es wird aktuell noch eine Bioinformatische Pipeline entwickelt um die Metatranskriptomdaten auszuwerten. Eine Metatranskriptomanalyse der Proben wurde durch einen zusätzlichen Sequenzierungs-Grant ermöglicht und war ursprünglich nicht im Rahmen des Clinical Leave Arbeitsprogramms geplant.
- (c) Die taxonomische und funktionelle Analyse der Metagenomicsdaten ist noch nicht abgeschlossen (Stand: Mapping to protein database mit DIAMOND am 31.05.2022), da die zunächst entwickelte Pipeline nach dem Mapping die Spike-In Organismen nur ungenau identifizieren konnte. Eine Optimierung der Filtermethode war daher Ende März 2022 notwendig um valide Ergebnisse zu erhalten.

Die Ergebnisse im Einzelnen sind in Kapitel 3a, Abb. 3 dieses Berichts dargestellt.

b) Meilensteine und Liefergegenstände

Meilensteine

Nr.	Titel	Arbeitspaket	Einrichtung	Datum lt. Vorhabenbeschreibung	Korrigiertes Datum	Status	Kommentar
1	Start sample collection	1	University Children's Hospital, Dep. Paediatric Cardiology	01.10.2019		erfüllt	Nachweis der Erfüllung: "SOP for Sample collection and Inclusion of first patient" SOP wurde erstellt, erster Patient am 04.09.2019 eingeschlossen.
2	Analysis of one year preliminary results	1	Institute of Medical Microbiology and Hygiene, Tübingen	01.05.2020		erfüllt	Nachweis der Erfüllung: "Microbiota analysis results (short report of first patients results)" Siehe Bericht bei Antrag für Aufstockung TI 07.001_Renk_01: Technical support during parental leave.
3	Presentation of 1 year results	1	Institute of Medical Microbiology and Hygiene, Tübingen	01.05.2020 01.09.2020		erfüllt	Nachweis der Erfüllung: "Powerpoint presentation of 1 year results at Institute of Medical Microbiology", liegt vor.
4	Analysis of study	2	Center for bioinformatics, Algorithms in bioinformatics, Tübingen	01.06.2020 01.01.2021		erfüllt	Nachweis der Erfüllung: "Description of analysis methods (short report)" Die Beschreibung der Methoden liegt diesem Abschlußbericht bei.

			Institute of Medical Microbiology and Hygiene, Tübingen				Änderung: die bioinformatische Analyse und statistische Auswertung nun in Zusammenarbeit mit einer Institutsinternen Bioinformatikerin des NCCTs und einem Data Management Scientist des Instituts für Medizinische Mikrobiologie durchgeführt.
--	--	--	---	--	--	--	---

Liefergegenstände

Nr.	Titel	Arbeitspaket	Einrichtung	Datum lt. Vorhabenbeschreibung	Korrigiertes Datum	Status	Kommentar
1	Next Generation Sequencing analysis of stool samples at every visit	1	Institute of Medical Microbiology and Hygiene, Tübingen, NCCT Tübingen	01.10.2020 31.11.2021	31.03.2022	Erfüllt	“Results of intestinal Microbiota analysis of 15 patients and control.” Die DNA/RNA Sequenzierung von 62 Patienten und 22 Kontrollproben ist abgeschlossen. Für jede Probe liegt die Gesamtzahl an Reads vor (Abb. 3).
2	Bioinformatics and Data Analyses	2	Center for bioinformatics, Algorithms in bioinformatics, Tübingen Institute of Medical	01.09.2020 01.09.2021		In Laufzeit nicht erreichbar	“Association of microbiota alteration with clinical data and interpretation of significance.” Die Gesamtauswertung konnte noch nicht abgeschlossen werden, da die Bioinformatische Auswertungsmethode nach einer

			<i>Microbiology and Hygiene, Tübingen</i>				ersten Auswertung nochmals angepasst werden musste. Aktueller Stand ist die laufende taxonomische Annotation der Proben mit Diamond, nach Abzug der humanen Reads und Ganzgenommapping auf die Spike- In Organismen.
--	--	--	---	--	--	--	---

c) Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Personalmittel

Einsatz: Clinical leave Stipendiatin, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Tübingen, AG Peter

Sachverhalt: Frau Dr. Hanna Renk wurde mit Hilfe der DZIF-Mittel seit 10/2019-11/2021 für die gesamte Durchführung und Leitung der Studie am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Tübingen, AG Peter als aufnehmende Einrichtung beschäftigt (E12-E15, variabel von 100%-20% Beschäftigungsumfang in Absprache mit dem DZIF). Die Verlängerung der Projektlaufzeit bzw. Reduktion der Arbeitszeit war bedingt durch Mutterschutz und Elternzeit ab 04/2020, sowie durch einen Sequenzierungs- und Rekrutierungsstopp in Studien am Universitätsklinikum Tübingen während der Coronaviruspandemie.

Einsatz: Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Tübingen, AG Peter

Sachverhalt: Frau Mareike Walenta wurde mit Hilfe der DZIF-Mittel ab 10/2020 bis 03/2022 als Technische Assistentin (E8, 50%) für die Durchführung von WP1 (Probenasservierung, DNA/RNA Extraktion, Library Prep) im Rahmen der Aufstockung TI 07.001_Renk_01: Technical support during parental leave beschäftigt.

Sachmittel (auch Aufträge)

Einsatz: Probenasservierung, DNA und RNA Extraktion, Library Prep, Next-Generation Sequencing

Sachverhalt: Die im Rahmen des Clinical Leave Programms genehmigten Sachmittel von 15.000€ wurden vollständig im Rahmen des WP1 eingesetzt: u.a. für die Probenasservierung (Zymo DNA/RNA Shield Fecal Collection Tube), die Spike-In Organismen und MOC Standards (Zymo Spike-In Control I, Zymo Microbial Community Standard), die Extraktion der Nukleinsäuren (ZymoBIOMICS DANN/RNA Miniprep Kit und Zubehör) das Library Prep Kit sowie die Sequenzierchemie und Flow Cell verwendet.

Investitionsmittel

Einsatz: keine
Sachverhalt: keine

Reisekosten

Einsatz: keine
Sachverhalt: keine

d) Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeiten

Das vorliegende Projekt wurde durch das DZIF mit einem Clinical-Leave-Stipendium über 12 Monate mit Personal- und Sachmitteln gefördert. Der Einsatz der Ressourcen war für die geleistete Arbeit bzw. die erzielten Ergebnisse notwendig und adäquat. Die verfügbaren Sachmittel wurden vollständig ausgeschöpft. Die Förderung Durch die Notwendigkeit der Entwicklung bzw. Adaptation des methodischen Vorgehens waren Testläufe und Wiederholungen notwendig, die mit Einsatz von zusätzlichen Sachmitteln über die geplante Probenverarbeitung hinaus einhergingen. Zusätzlich zeigte sich, dass einzelne Patientenproben doch einen sehr geringen DNA / RNA Gehalt aufwiesen, so dass primär ein erhöhtes Probenvolumen asserviert werden musste um auswertbare Ergebnisse zu erhalten. Aufgrund des erhöhten Probenaufkommens im Gegensatz zur ursprünglichen Planung trug die Unterstützung des Projektes durch den Flex Fund (Technical support during parental leave) eindeutig zur Erreichung der Ziele dieses Projektes bei. Die Umsetzung des Gesamtprojektes hätte durch die Stipendiatin ohne das Clinical leave Programm und die Freistellung von klinischer Tätigkeit nicht erreicht werden können.

e) Voraussichtlicher Nutzen des Vorhabens, insb. die Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Die gewonnenen Erkenntnisse und die erzielten Ergebnisse dieser Pilotstudie sind auf verschiedenen Ebenen verwertbar:

- (1) Methodischer Erkenntnisgewinn: Im Rahmen dieser Studie und des Clinical Leave Programms konnte ich als Stipendiatin eine klinisch-translationalen Studie komplett von Anfang bis Ende planen und durchführen. Ich habe einen tiefen Einblick in die methodische Umsetzung von klinisch-experimentellen Next-Generation-Sequencing Projekten gewonnen. Diese Arbeit

fürhte zu einem Kompetenzgewinn im Bereich der Infektionsforschung. Zusätzlich konnte ich in Zusammenarbeit mit dem Team der aufnehmenden Einrichtung weiteres Know How schaffen, wie Stuhlproben von Säuglingen sinnvoll für eine Metagenom/transkriptomanalyse verarbeitet und analysiert (Work-Flow/Bioinformatische Pipeline) werden können.

- (2) Verbesserte Zusammenarbeit zwischen klinischer Infektiologie/Pädiatrie und mikrobiologisch-molekularbiologischer Forschungseinheit: Das Projekt führte zu einer deutlichen Intensivierung der translationalen Forschung und Kooperation der pädiatrischen klinischen Infektiologie, der Kinderintensivmedizin und der Arbeitsgruppe Klinische Mikrobiologie des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene (Prof. Dr. Silke Peter). Auf dieser Basis konnten bereits neue Forschungsprojekte im Bereich der molekularen Infektionsdiagnostik initiiert werden. Geplant ist auch, Next-Generation-Sequencing Workflows für weiteres Probenmaterial, welches für nosokomiale Infektionen klinisch relevant erscheint zu etablieren (z.B. BAL/Trachealsekret bei beatmungsassoziierte Pneumonie).
- (3) Heranbildung von wissenschaftlichem Nachwuchs: Der Ausbau der Zusammenarbeit mit einer klinisch-mikrobiologischen Forschungseinheit wird mir als pädiatrischer Infektiologin helfen auch weitere translationale Metagenom/transkriptomprojekte zu realisieren und mein Karriereziel eines Clinician Scientists weiter zu verfolgen.
- (4) Wissenschaftlicher Erkenntnisgewinn und mögliche klinische Anwendung: Die wissenschaftlichen Erkenntnisse über die taxonomische und funktionelle Zusammensetzung sowie die Veränderung der Darmmikrobiota von Kindern mit angeborenem Herzfehler über die Zeit können in Behandlungsentscheidungen einfließen und diese verbessern. So ist es durchaus denkbar, dass Erkenntnisse über eine z.B. durch bestimmte Antibiotikatherapien veränderte Darmmikrobiota bei Säuglingen mit angeborenem Herzfehler im Rahmen der pädiatrisch-infektiologischen Visite in Behandlungsentscheidungen von Infektiologen und pädiatrischen Intensivmedizinern im Sinne von Antibiotic Stewardship einfließen.
- (5) Fallzahlplanung in Folgestudien: Bisher ist völlig unklar, welche Fallzahlen notwendig sind, um statistisch valide Unterschiede in Mikrobiotazusammensetzung und -verschiebungen zu detektieren. Die Ergebnisse dieser Studie können einen Anhalt bieten, welche Fallzahlen ggf. in größer angelegten Studien notwendig sind.

(6) Folgevorhaben

In weiteren klinischen, randomisiert-kontrollierten Studien könnten analog zu Frühgeborenen, Probiotika in einem präventiven bzw. therapeutischen Ansatz getestet werden ob der „Ausgleich“ eines potentiell „dysbiotischen“ Mikrobioms durch bestimmte Probiotika bei Kindern mit angeborenem Herzfehler einen klinischen Vorteil bringt bzw. die Nekrotisierende Enterokolitis verhindern kann. Insgesamt werden unsere Ergebnisse Hinweise liefern, welche Ansätze sinnvoll erscheinen und in weiteren Studien untersucht werden sollten.

Langfristig sollen mit der entstandenen Kooperation in Folgevorhaben weitere innovative molekular diagnostische Verfahren für die Pathogendetektion von nosokomialen und antibiotika-resistenten Infektionen im Kindesalter, insbesondere in der Kinderintensivmedizin evaluiert und etabliert werden.

f) Während der Durchführung des Vorhabens dem Zuwendungsempfänger bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Es wurden für dieses DZIF-Vorhaben keine relevanten Forschungsergebnisse durch Dritte bekannt gemacht.

g) Erfolgte oder geplante Veröffentlichung der Ergebnisse nach Nr. 5 der Nebenbestimmungen für Zuwendungen (NABF/NKBF 2017)

Bisher erfolgten keine Veröffentlichungen. Die Ergebnisse sollen allerdings auf Fachkongressen präsentiert werden und in wissenschaftlichen Journalen (auch Open Access) publiziert werden. Bei Veröffentlichungen wird gemäß NABF/NKBF 2017 Nr. 5 auf die Förderung im Rahmen des Clinical Leave Stipendiums durch das Deutsche Zentrum für Infektionsforschung verwiesen.