

Einfluss des Atemwegmikrobioms auf Immunantworten und Infektionen durch *Pseudomonas aeruginosa* bei Zystischer Fibrose

Beteiligte Wissenschaftler:	Prof. Dr. A. Dalpke, Technische Universität Dresden Dr. S. Boutin, Universitätsklinik Heidelberg PD Dr. O. Sommerburg, Universitätsklinik Heidelberg
Projektnummer:	1805
Laufzeit:	geplant 24 Monate; 01. März 2019 – 28. Februar 2021 kostenneutral verlängert bis 30. April 2021
Fördervolumen:	100.000 €

Ziel des Projekts:

In den letzten Jahren konnte mit neuen Sequenzieretechniken gezeigt werden, dass Infektionen der Atemwege bei Patienten mit Mukoviszidose polymikrobieller Natur sind, d.h. häufig sind viele verschiedene Keime in unterschiedlicher Zusammensetzung zu detektieren. Es hat sich gezeigt, dass Patienten, bei denen Keime, die sich natürlicherweise im Mund-Rachenraum – sogenannte kommensale Bakterien - befinden, auch das Mikrobiom in den Atemwegen dominieren, einen bessere klinischen Verlauf bezüglich der Lungenfunktion und weniger Entzündung durch klassische Pathogene wie z.B. *Pseudomonas aeruginosa* haben. Daraus ist die Hypothese entstanden, dass diese kommensalen Erreger, möglicherweise sogar eine schützende Funktion vor Infektionen oder Entzündung durch *P. aeruginosa* haben könnten. Dies sollte in dem geförderten Projekt in drei Arbeitspaketen geprüft werden:

- (i) Kommensale Erreger sollten hinsichtlich der Beeinflussung von Wachstum und Immunstimulation durch *P. aeruginosa* untersucht werden.
- (ii) Einflüsse des Mikrobioms auf Entzündungsreaktionen der Atemwege bei Mukoviszidose Patienten sollten untersucht werden.
- (iii) Eventuelle vorhandene schützende Effekte von kommensalen Bakterien sollten in einem Organoidmodell auch in komplexeren biologischen Situationen näher untersucht werden.

Projektdurchführung:

Das Projekt konnte erfolgreich durchgeführt werden. Die Laufzeit verlängerte sich um 2 Monate, was durch die Corona-Pandemie bedingt war, da diagnostische Labor- und Gerätekapazitäten beengt waren und durch Lock-Down Maßnahmen auch nicht wie gewohnt gearbeitet werden konnte.

Die Ergebnisse der durchgeführten Ko-Kolonisationsexperimente sind zunächst eher qualitativ als quantitativ zu bewerten, eine Validierung der Methode zur Quantifizierung ist in Arbeit und beruht auf der Verwendung eines anderen Fluoreszenzfarbstoffs. Die Messbarkeit und damit Quantifizierung von anaeroben, d. h. unter Sauerstoffabschluss wachsende Bakterien ist hingegen schwieriger, da die Analyse incl. Apparatur nicht einfach unter Sauerstoffabschluss durchgeführt werden kann.

Im Laufe des Projekts und auch aus einer Gutachterempfehlung leitete sich ab, dass die Untersuchungen am Lungenmodell etwas angepasst werden mussten. So wurden statt des zunächst geplanten Organoid-Modells feinste Schnitte von Maus-Lungen eingesetzt, um Ko-Kulturen in einem Modell zu untersuchen, welches die natürliche Umgebung der Lunge besser nachstellt als herkömmliche Kulturen in flüssigem oder festem Nährmedium.

Ergebnisse:

Es wurden 147 kommensale Bakterien („Kommensale“) aus Atemwegsproben von Patienten mit Mukoviszidose isoliert und Proben für verschiedene Untersuchungen gesichert, d. h. in der Regel für spätere Verwendung eingefroren.

Die verschiedenen Kommensalen wurden dann systematisch auf die Hemmung des Wachstums von *P. aeruginosa* im Labor, d. h. in vitro, untersucht. Es zeigte sich, dass speziell Stämme von *Streptococcus mitis*, *S. oralis* und *S. cristatus* das Wachstum des Lungenpathogens *P. aeruginosa* hemmen konnten. Ein solcher inhibitorischer Effekt konnte auch auf andere krankmachende Keime der Lunge beobachtet werden.

Untersuchungen zu dem Mechanismus, der die hemmende Wirkung verursacht, zeigten, dass der Hemmeffekt über lösliche Substanzen übertragen wurde und dass pH Veränderungen und besonders reaktionsfreudige Sauerstoffhaltige Moleküle (reaktive Sauerstoffmetabolite, freie Radikale) beteiligt sind. Das sind hochreaktive Moleküle, die sowohl in höherer Konzentration direkt zellschädigend und daher eine abwehrende Wirkung haben können, oder auch in geringeren Konzentrationen als Signalmoleküle oder „Signaltrigger“ eine indirekte Wirkung haben können.

Weiter zeigte sich durch Ko-Kultivierungsexperimente, dass einige der untersuchten kommensalen Stämme auch die Immunstimulation von *P. aeruginosa* auf die bronchialen Epithelzellen unterdrücken konnten. Die Immunstimulation durch *P. aeruginosa* führt dazu, dass die körpereigenen Zellen Zytokine und Chemokine ausschütten und dadurch eine Entzündung verursachen, d. h. das zellschädigende Entzündungsgeschehen auslösen.

Diese Befunde aus den Ko-Kolonisationsexperimenten konnten im Modell der sog. Lungenpräzisionsschnitte bestätigt werden. Hier wurden feinste Schnittproben von Lungen aus Mäusen genutzt, um zu untersuchen, ob das in vitro beobachtete Verhalten der Bakterien so auch in komplexem Lungengewebe stattfindet. Auch dort zeigte sich eine Reduktion der Immunstimulation durch Ko-Kultivierung, d. h. auch hier der Hinweis, dass das durch *P. aeruginosa* initiierte Entzündungsgeschehen durch die Anwesenheit von Kommensalen möglicherweise abgeschwächt wird.

In Atemwegsproben von Mukoviszidose Patienten konnten wir beobachten, dass sich die mikrobiellen Gemeinschaften in sogenannte Ökotypen zusammenfassen ließen und dass Ökotypen, die dominiert waren durch kommensale Bakterien, mit niedrigeren Entzündungsparametern im Sputum korrelierten. Somit können kommensale Bakterien direkt und indirekt *P. aeruginosa* und/oder das durch das Bakterium ausgelöste Entzündungsreaktionen, beeinflussen.

Beurteilung des Abschlussberichts durch den wissenschaftlichen Beirat (Vorstand der Forschungsgemeinschaft Mukoviszidose; FGM):

Der FGM-Vorstand bewertet den Bericht und die dargestellten Ergebnisse hervorragend, es ist ein „Vorzeigeprojekt“ mit sehr guten Ergebnissen, die auch bereits als Publikation verfügbar sind. Die Arbeitsgruppe sollte unbedingt motiviert werden, weiter auf CF zu forschen.

Relationship between airway dysbiosis, inflammation and lung function in adults with cystic fibrosis

D. Frey, et al., J Cyst Fibros.2021 Sep;20(5):754-760.

doi: 10.1016/j.jcf.2020.12.022.Epub 2021 Jan 8.

DOI:[10.1016/j.jcf.2020.12.022](https://doi.org/10.1016/j.jcf.2020.12.022)

Changes in the Cystic Fibrosis Airway Microbiome in Response to CFTR Modulator Therapy

Yi, Dalpke, Boutin, Front Cell Infect Microbiol.2021 Mar 17;11:548613.doi:

10.3389/fcimb.2021.548613

DOI:[10.3389/fcimb.2021.548613](https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.548613)

Weitere Informationen zu dem Projekt:

In einem kürzlich durchgeführten Interview haben Prof. Dalpke und Dr. Boutin Einblick in ihre Forschung gegeben (Blog Beitrag vom 23.11.21):

<https://blog.muko.info/koennen-normale-bakterien-des-rachenraums-infektionen-durch-pseudomonas-aeruginosa-positiv-beeinflussen/>