

Aus der Medizinischen Klinik III
der Universität zu Lübeck
Leitung: PD Dr. med. D. Drömann

**Das respiratorische Mikrobiom:
Unterschiede zwischen Atemwegen und
Lungenparenchym**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zur Lübeck
- aus der Sektion Medizin –

vorgelegt von
Lena Reinhold
aus Paderborn

Lübeck 2020

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Klaus Dalhoff
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Cordula Stamme
Tag der mündlichen Prüfung:	16.12.2020
Zum Druck genehmigt: Lübeck, den	16.12.2020
- Promotionskommission der Sektion Medizin -	

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung	1
1.1. Von den Anfängen der Mikrobiologie bis zur modernen Mikrobiomforschung....	1
1.2. Das Mikrobiom des Menschen	5
1.3. Das Mikrobiom der Lunge.....	7
1.4. Die angeborene Immunität der Lunge	9
1.5. Die Rolle der mikrobiellen Flora für chronische Erkrankungen	11
1.6. Zielsetzung und Fragestellung	14
2. Material und Methoden	15
2.1. Material	15
2.2. Patientenkollektiv und Ethikvotum	19
2.3. Die Datenerhebung	20
2.4. Probengewinnung aus den oberen und unteren Atemwegen	22
2.5. Humanes Lungengewebsmodell	23
2.6. Vorbereitung der Proben zur Mikrobiomanalyse	24
2.7. DNA-Sequenzierung.....	26
2.8. Datenprozessierung und Analyse.....	26
2.9. Dekontamination.....	27
2.10. qPCR.....	28
2.11. SourceTracker	29
2.12. Quantitative Immunoassays	30
2.13. Vorversuche	32
2.14. Statistische Analyse	34
3. Ergebnisse	36
3.1. Die bakterielle DNA-Menge nimmt Verlauf des Respirationstrakts.....	36
3.2. Die mikrobielle Zusammensetzung in den Atemwegen und im Lungengewebe .	37
3.3. α -Diversität in den Atemwegen und dem Lungengewebe.....	41
3.4. Die Ungleichheit zwischen den Atemwegen und dem Lungengewebe.....	42
3.5. Die Herkunft bakterieller Taxa der unteren Atemwege und des Lungengewebes	44
3.6. Zytokin-Expression im humanen Lungengewebe	45
3.7. Die Bedeutung lungenpathogener Taxa für das Mikrobiom und die Inflammation im Lungengewebe.....	47
3.8. Proinflammatorisches Zytokinprofil und Diversität in Abhängigkeit einer stattgehabten Antibiotikatherapie	47

4. Diskussion	49
4.1. Die mikrobielle Zusammensetzung der Atemwege und des humanen Lungengewebes im Vergleich	49
4.2. Der Einfluss chronischer Atemwegsschädigung auf das Mikrobiom.....	62
4.3. Die Inflammation im Lungengewebe ist bei einer Dysbiose des Mikrobioms gesteigert.....	64
5. Zusammenfassung.....	66
6. Literaturverzeichnis.....	68
7. Anhang	82
8. Danksagung	89
9. Lebenslauf.....	90
10. Publikation.....	91

1. Einleitung und Fragestellung

1.1. Von den Anfängen der Mikrobiologie bis zur modernen Mikrobiomforschung

Meilensteine der Mikrobiologie

Bis ins 17. Jahrhundert hinein glaubte man, Infektionen und Epidemien wie die Pest (1347) entstünden durch ein krankmachendes, fauliges Sekret in der Luft, das so genannte Miasma (gr. = Verunreinigung) [1]. Widerlegt werden konnte diese Theorie erst einige hundert Jahre später durch Louis Pasteur (1822-1895), welcher Mikroorganismen für die Entstehung und Verbreitung von Krankheiten verantwortlich machte [2]. Einen weiteren Meilenstein konnte Robert Koch (1843-1910) mit der Entwicklung von Medien zur Kultivierung von Mikroorganismen legen. Mit dieser neuen mikrobiologischen Methode gelang ihm die erste Isolierung eines Pathogens: *Bacillus anthracis*, dem Erreger des Milzbrands [3]. Durch Weiterentwicklung der Kultur- und Färbemethoden konnte er 1882 das stäbchenförmige Bakterium *Mycobacterium tuberculosis* als Erreger der Tuberkulose, einer der häufigsten Todesursachen zu dieser Zeit, identifizieren [4].

Die Ergebnisse seiner Forschung formulierte Koch schließlich in den Koch'schen Postulaten, mithilfe derer er beweisen konnte, dass bestimmte Bakterien die Ursache für verschiedene Erkrankungen sind [5].

Die Möglichkeit der gezielten Behandlung von Infektionserkrankungen ergab sich jedoch erst mit der Entdeckung von Antibiotika wie dem Penicillin durch Alexander Fleming (1881-1955) Mitte des 20. Jahrhunderts [6].

Der Weg zur modernen Metagenomik

Bis heute besitzen Kulturmethoden einen großen Stellenwert in der Diagnostik von Infektionserkrankungen wie der Lungenentzündung. Hier ist vor allem bei schweren Formen ein Erregernachweis zur gezielten Antibiotikatherapie nötig. Dass es jedoch Pathogene gibt, die sich den traditionellen Kulturmethoden entziehen, zeigte bereits 1987 eine Studie an Patienten mit klinischem und radiologischem Nachweis einer Lungenentzündung. Trotz des mikroskopischen Bakteriennachweises durch eine Gram-Färbung ließen sich nur in einem Drittel der Fälle Bakterien auch in einer Kultur nachweisen [7].

Aus diesem Problem heraus entwickelten sich molekularbiologische Methoden, die das Ziel hatten, den Erreger auf Ebene der DNA oder RNA nachzuweisen. Ein Grundstein wurde

1977 mit der von Frederick Sanger (1918-2013) entwickelten DNA-Sequenzierung (Sanger-Sequenzierung, Kettenabbruch-Methode) gelegt, gefolgt von der Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR), mit Hilfe derer 1995 schließlich die erste Sequenzierung eines Bakteriums (*Haemophilus influenzae*) gelang [8].

Durch Weiterentwicklung dieser Methoden haben sich in den letzten Jahren die sogenannten *Next-Generation-Sequencing*-(NGS)-Technologien entwickelt, die im Vergleich zur Methode von Sanger durch parallele Sequenzierung mehrere Millionen DNA-Sequenzen in extrem kurzer Zeit generieren können.

Gängige Sequenzierungsmethoden wie das *454 pyrosequencing*, die Halbleitersequenzierung mittels *Ion Torrent* oder die *sequencing-by-synthesis*-(SBS)-Methode von Illumina variieren durch ihre unterschiedlichen Funktionsprinzipien in der Anzahl und Länge der generierten Sequenzen, der Lesegenauigkeit, der Laufzeit sowie der Kosten [9].

Neuere Sequenzierungsmethoden der dritten Generation wie die *„single-molecule real-time*-(SMRT)-Sequenzierung (Fa. Pacific Biosciences of California) oder die Nanopore-Sequenzierung (Fa. Oxford Nanopore Technologies) versuchen durch die Generierung von noch längeren Sequenzen die anschließende Assemblierung der Fragmente zu verbessern [10].

Durchführung einer Mikrobiomanalyse

Um diese Methoden für eine Mikrobiomanalyse verwenden zu können, müssen zunächst repräsentative Proben der zu untersuchenden Region gewonnen werden. Dabei sollte auf eine einfache, sichere sowie reproduzierbare Probengewinnung geachtet werden [11]. Aufgrund der hochsensiblen DNA-Nachweisverfahren muss eine Kontamination bei der Probengewinnung und Verarbeitung weitestgehend vermieden werden. Zum Umgang mit einer unvermeidlichen Kontamination gibt es bereits Standards in der aktuellen Literatur, an der man sich orientieren sollte [12].

Nachdem die bakterielle DNA aus den gewonnenen Proben extrahiert worden ist, können mithilfe der Amplikon-Sequenzierung (z.B. 16S-rRNA Sequenzierung) oder des *Whole-Genome-Sequencing* (WGS), mikrobielle Profile der untersuchten Proben erstellt werden.

Bei der sehr weit verbreiteten und häufig verwendeten 16S-rRNA Analyse wird das hochkonservierte Gen der kleinen ribosomalen Untereinheiten von Bakterien (16S-rRNA) mittels geeigneter Primer in einer PCR amplifiziert, fragmentiert und anschließend sequenziert. Die nach Assemblierung der Fragmente entstandenen Sequenzen enthalten

verschiedene hochvariable Regionen des 16S-rRNA Gens (V1-V9), mithilfe derer phylogenetische Analysen möglich sind [13].

Zuvor müssen die gewonnenen Daten jedoch prozessiert werden. Hierbei werden nach gängigen Verfahrensanweisungen wie *Qiime* [14] oder *Mothur* [15] fehlerhafte Sequenzen entfernt und die Daten auf eine vergleichbare Anzahl von Sequenzen normalisiert [11]. Ähnliche Sequenzen (Übereinstimmung 95-99%) werden zu sogenannten *operational taxonomic units* (OTU)/Taxa zusammengefasst. Zur anschließenden Identifizierung der mikrobiellen DNA ist ein Vergleich mit bereits bekannten bakteriellen Sequenzen nötig, welche in Datenbanken wie SILVA [16], *Greengenes* [17] oder dem *Ribosomal Database Project* (RDP) [18] gesammelt sind.

Beim Whole-Genome-Sequencing (WGS, *shotgun-sequencing*, Schrotschusssequenzierung) wird hingegen nicht nur ein Gen, sondern die ganze in einer Probe enthaltene DNA sequenziert, wodurch nicht nur Bakterien, sondern auch Viren, Pilze und Parasiten phylogenetisch untersucht werden können. Darüber hinaus ermöglicht das WGS funktionelle Analysen von metabolischen Stoffwechselwegen [19]. Dabei ist der umfassende Informationsgewinn über die mikrobielle Gemeinschaft derzeit jedoch noch mit einem deutlich erhöhten Aufwand verbunden, da im Vergleich zur Amplikon-Sequenzierung noch größere Datenmengen entstehen, welche eine äußerst komplexe bioinformatische Analyse erfordern [19].

Diese neuen, kulturunabhängigen Methoden führen mittlerweile zu der Annahme, dass mindestens 70% der aus humanen Proben nachweisbaren Bakterien nicht kultivierbar sind [20-22]. Damit sind molekularbiologische Methoden zu essenziellen Bestandteilen des in den letzten Jahren neu entstandenen Forschungsgebiets der Metagenomik geworden. Die Metagenomik versucht die Erbinformation von allen Mikroorganismen, die in einer Gemeinschaft leben zu erfassen, zu analysieren und zu vergleichen. Zur Analyse einer solchen Gemeinschaft gehört zunächst die Untersuchung der relativen Häufigkeiten identifizierter Taxa. Dies kann sowohl auf höheren taxonomischen Ebenen wie der Stammebene (*Phylum*) als auch auf niedrigeren Ebenen wie der der Gattung (*Genus*) und Spezies (*Species*) erfolgen.

Durch Verknüpfung der Parameter der relativen Häufigkeit und des ubiquitären Auftretens sowie einer Definition der Grenzen dieser Parameter können *Core-Taxa* definiert werden [23]. *Core-Taxa* charakterisieren folglich ein Habitat, in dem sie regelmäßig zu finden sind und mit einer gewissen Abundanz auftreten [24].

Zur Untersuchung der Diversität innerhalb einzelner Proben dienen Parameter der α -Diversität. Dazu zählen der Reichtum (*Richness*) und die Verteilung (*Evenness*) verschiedener Taxa. Durch Verknüpfung dieser Parameter mit den relativen Häufigkeiten werden Diversitätsindices berechnet, mithilfe derer Aussagen über die Vielfalt einer Gemeinschaft getroffen werden können [11]. Häufig verwendete Indices sind der *Shannon*- und der *Simpson*-Index.

Die β -Diversität dient der Untersuchung von Ähnlichkeit oder Unähnlichkeit verschiedener Probengruppen (z.B. verschiedene Habitate). Dazu können Distanz- oder Ähnlichkeitsmaße wie der *Bray-Curtis*-Index, der *Jaccard*-Index, der *Sørensen*-Index oder die *UniFrac*-Distanz berechnet und anhand verschiedener Ordinationsmethoden (Hauptkoordinatenanalyse, Hauptkomponentenanalyse, nichtmetrische Multidimensionale Skalierung) grafisch dargestellt werden.

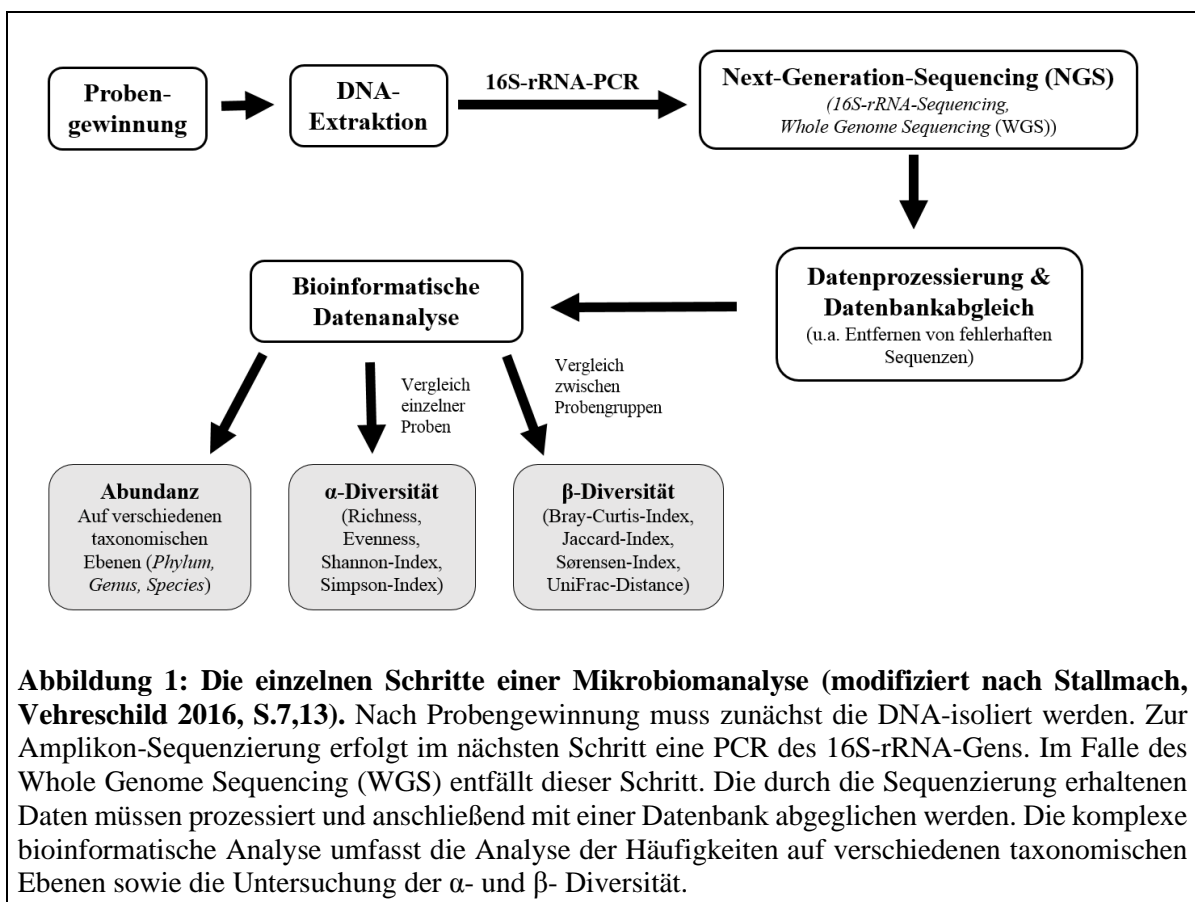


Abbildung 1: Die einzelnen Schritte einer Mikrobiomanalyse (modifiziert nach Stallmach, Vehreschild 2016, S.7,13). Nach Probengewinnung muss zunächst die DNA isoliert werden. Zur Amplikon-Sequenzierung erfolgt im nächsten Schritt eine PCR des 16S-rRNA-Gens. Im Falle des Whole Genome Sequencing (WGS) entfällt dieser Schritt. Die durch die Sequenzierung erhaltenen Daten müssen prozessiert und anschließend mit einer Datenbank abgeglichen werden. Die komplexe bioinformatische Analyse umfasst die Analyse der Häufigkeiten auf verschiedenen taxonomischen Ebenen sowie die Untersuchung der α - und β -Diversität.

Limitationen der Mikrobiomanalyse

Trotz der rasanten Entwicklung der Metagenomik in den letzten Jahren und der scheinbar grenzenlosen Möglichkeiten sowie revolutionären Fortschritten in der Mikrobiomforschung gibt es auch Limitationen.

Im Vergleich zu den traditionellen Kultur-basierten Methoden können die modernen Sequenziermethoden nicht zwischen vitalen und nicht vitalen Bakterien unterscheiden.

Die klassische taxonomische Einteilung der Bakterien in *Phylum*, *Genus* und *Spezies* ist mittels Sequenzierung des 16S-rRNA-Gens häufig nicht bis auf Spezies-Ebene möglich, da die Einteilung in OTUs (*operational taxonomic units*) anhand von Clustern ähnlicher Sequenzen erfolgt und sich so der klassischen Taxonomie nur annähert [25]. Bislang sind jedoch keine anderen Genabschnitte bekannt, die bezüglich der Speziesdifferenzierung eine höhere Genauigkeit erreichen.

Da es sich bei den verwendeten Methoden um äußerst empfindliche Verfahren zur Detektion und Sequenzierung genetischen Materials handelt, spielt das Thema der Kontamination vor allem bei Proben mit geringer Biomasse wie in der Lunge eine große Rolle [26]. Dabei treten Kontaminationen nicht nur durch unsteriles Arbeiten während der Probengewinnung auf, sondern auch, wie Forscher kürzlich zeigen konnten, durch die verwendeten Kits und Reagenzien bei der Probenverarbeitung [27]. Dabei fällt eine Kontamination mit geringer werdendem Anteil an Biomasse der untersuchten Proben stärker ins Gewicht und kann die Ergebnisse verfälschen. Im Gegensatz zum Gastrointestinaltrakt, welcher reich an Biomasse ist, stellt dieses Thema für die Mikrobiomanalyse aus pulmonalen Materialien eine Herausforderung dar.

Zur Erkennung einer Kontamination empfiehlt es sich, Kontrollen mitzuführen und die DNA-Menge zu quantifizieren [27]. Ein kürzlich veröffentlichter Standard bietet Hilfestellung zum Umgang mit einer unvermeidlichen Kontamination [12]. Eine exakte Differenzierung zwischen „echten“ und kontaminierenden Taxa sollte Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

1.1. Das Mikrobiom des Menschen

Definition

Als Mikrobiom wird die Gesamtheit der Genome aller Mikroorganismen in einem bestimmten Milieu bezeichnet [28, 29]. Zu den Mikroorganismen zählen Bakterien, Viren, Pilze und Protozoen. Als Milieu dienen alle Organsysteme des Menschen, die Kontakt zur

Außenwelt haben: die Haut, der Gastrointestinaltrakt, der Urogenitaltrakt und der Respirationstrakt.

Das “Human Microbiome Project (HMP)”

Um das menschliche Mikrobiom zu charakterisieren und dessen Rolle für Gesundheit und Krankheit zu untersuchen, wurde 2008 das „*Human Microbiome Project (HMP)*“ vom *NIH (National Institute of Health) Common Fund* gegründet. Die Forscher untersuchten die mikrobiellen Gemeinschaften in der Nase, der Mundhöhle, der Haut, dem Gastrointestinaltrakt und dem Urogenitaltrakt, indem sie bei 242 gesunden Männern und Frauen jeweils 15 (Männer) bis 18 (Frauen) Proben zu ein bis drei Zeitpunkten entnahmen. Durch diese groß angelegte Studie konnten mittlerweile 1.300 Referenzgenome sequenziert werden [30].

Metagenomische Daten, welche durch 16S-rRNA-Sequenzierung sowie WGS gewonnen wurden, zeigen, dass sich die mikrobielle Gemeinschaft sowohl interindividuell zwischen gesunden Individuen als auch intraindividuell in den einzelnen Körperregionen unterscheidet. Über die Zeit gesehen ist das Mikrobiom bei jedem Einzelnen jedoch relativ stabil, was die Vermutung zulässt, dass jeder Mensch sein eigenes, einzigartiges Mikrobiom besitzt [31].

Die Komplexität der Ergebnisse zeigt zum Beispiel die mikrobielle Zusammensetzung der neun untersuchten Regionen von Mundhöhle und Oropharynx: Diese werden alle von der Gattung *Streptococcus* dominiert, die übrige Zusammensetzung unterscheidet sich jedoch stark in den einzelnen Habitaten. Interindividuell besteht dabei zum Beispiel im hinteren Zungenabschnitt eine hohe Variation der über elf verschiedenen Streptokokkenspezies [31].

Die Entwicklung des menschlichen Mikrobioms

Die Entwicklung des Mikrobioms unterliegt in den ersten Lebensmonaten einer starken Variabilität, bevor sich nach etwa ein bis drei Jahren eine Stabilität und hohe Diversität, die der von Erwachsenen ähnelt, einstellt [32].

Bislang konnten eine Reihe von Einflussfaktoren ausgemacht werden, welche eine Veränderung im Mikrobiom von Neugeborenen und Kleinkindern bewirken. So unterscheidet sich die mikrobielle Flora vaginal entbundener Säuglinge von der per Kaiserschnitt geborener Kinder [33]. Die Darmflora von gestillten Säuglingen ist reich an *Bifidobakterien* und *Lactobacillus spp.*, welche mit einem günstigen Effekt auf gastrointestinale Beschwerden von Säuglingen verbunden werden [34], während sich frühe

und lange Antibiotikatherapien negativ auf die Diversität des Mikrobioms auswirken und mit der Entwicklung von Adipositas, Allergien, Asthma bronchiale sowie Diabetes mellitus und vermehrten Infektionen assoziiert werden [35-37].

Ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Einfluss dieser Faktoren auf das Mikrobiom und der Entstehung von späteren Erkrankungen konnte bislang jedoch nicht sicher hergestellt werden.

1.3. Das Mikrobiom der Lunge

Warum hat sich das Mikrobiom der Lunge so lange der Forschung entzogen?

Während Habitate wie der Gastrointestinaltrakt bereits seit Ende des 20. Jahrhunderts im Fokus der Mikrobiomforschung stehen, wird der Respirationstrakt und die Lunge erst seit etwa 2010 genauer untersucht. Dabei fokussieren sich die Arbeiten fast ausschließlich auf das Mikrobiom der Atemwege, sodass es bislang nur sehr wenige Studien gibt, welche die mikrobielle Zusammensetzung in der humanen Lunge anhand von Lungengewebsproben untersucht und analysiert haben. Die erste Arbeit hierzu ist erst 2011 veröffentlicht worden [38].

Dass die Lunge so lange vernachlässigt worden ist, lag an der auf traditionellen, kulturabhängigen Verfahren basierten Annahme, die gesunde Lunge sei steril [7]. Nach Beginn der Durchführung Nukleinsäure-basierter Analysen (z.B. Nachweis von 16S-rRNA) konnte diese Annahme im Jahr 2010 erstmals durch den Nachweis von Bakterien in den unteren Atemwegen von Gesunden widerlegt werden [39].

Ein weiterer Grund dafür, dass die Lunge im Vergleich zu anderen Habitaten nur selten untersucht wurde, ist die schwierige Probengewinnung. Eine Gewinnung von humanem Lungengewebe ist ohne medizinische Indikation nicht zu vertreten und deshalb nur im Rahmen einer Lungenresektion, wie es bei operablen Lungentumoren oder Lungentransplantationen der Fall ist, möglich. Diese Schwierigkeit spiegelt sich auch in der geringen Anzahl der untersuchten Proben in den bisher veröffentlichten Studien wider. Nur zwei Studien haben Lungengewebe von über 30 Patienten gewinnen können [40, 41]. Die Analyse der anderen Studien bezieht sich lediglich auf einige wenige Patienten [38, 42-44]. Hinzu kommt, dass häufig nur Proben von Patienten in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium einer chronischen Lungenerkrankung wie der COPD [38] oder der Zystischen Fibrose [44] untersucht wurden, sodass bislang keine verlässliche Aussage über das Lungenmikrobiom beim Gesunden getroffen werden kann.

Dagegen gibt es diverse Studien über die mikrobielle Zusammensetzung in den oberen und unteren Atemwegen, indem das Mikrobiom durch Nasen- oder Rachenabstriche, Mundraumspülungen, Sputumproben, Bronchialbürstenabstrichen oder bronchoalveolärer Lavage (BAL) untersucht wurde [39, 45-48]. Es stellt sich die Frage, ob diese Proben aus den oberen und unteren Atemwegen auch das Lungengewebe repräsentieren; dazu fehlen bislang vergleichende Studien.

Die mikrobielle Zusammensetzung in den Atemwegen und der humanen Lunge

Im Vergleich zu anderen Barriere-Organen wie der Haut oder dem Gastrointestinaltrakt wird die Lunge kaum von Mikroorganismen kolonisiert. In allen Kompartimenten des Respirationstrakts bilden die Stämme *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* und *Actinobacteria* den größten Teil des Mikrobioms [38, 39, 41, 49]. Die oberen und unteren Atemwege ähneln sich in ihrer bakteriellen Zusammensetzung. In beiden Kompartimenten konnten Bakterien der Gattungen *Veillonella*, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Neisseria* und *Fusobacterium* nachgewiesen werden [38, 39, 48, 50-52], die bakterielle Biomasse nahm jedoch von den oberen zu den unteren Atemwegen hin ab [48]. Im Lungengewebe konnten hingegen häufig Taxa wie *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Ralstonia*, *Staphylococcus* und *Streptococcus* nachgewiesen werden [38, 41].

Als Erklärung für die Ähnlichkeit der oberen und unteren Atemwege liegt die Annahme nahe, dass es während der Probengewinnung durch die Passage mit dem Bronchoskop zu einer Kontamination der unteren Atemwege mit Taxa der oberen Atemwege kommt.

Vergleichende Studien konnten jedoch wahrscheinlich machen, dass diese Kontamination keinen relevanten Anteil an der Zusammensetzung hat. Vielmehr wird eine auch bei Gesunden physiologisch auftretende Mikroaspiration für die ähnliche mikrobielle Zusammensetzung dieser beiden Kompartimente verantwortlich gemacht [51, 53]. Einen weiteren, jedoch geringeren Anteil hat die direkte mukosale Ausbreitung bakterieller Taxa entlang der Atemwege [51].

Während die unteren Atemwege Lungengesunder also zu einem großen Teil durch eine transiente Flora der oberen Atemwege charakterisiert werden kann, bleibt es unklar, inwieweit das Mikrobiom des Lungengewebes ebenfalls durch transiente Taxa oder aufgrund von organspezifischen Wachstumsbedingungen und lokalen Immunmechanismen durch eine residente Flora repräsentiert wird.

Im Gegensatz zu den bislang besser untersuchten Atemwegen variieren die Ergebnisse zur mikrobiellen Zusammensetzung des Lungengewebes aufgrund sehr unterschiedlich zusammengesetzter Kollektive (Ex-Raucher, Raucher, milde-moderate-schwere COPD, Krebspatienten) und nicht einheitlicher Methoden zur Probengewinnung und Verarbeitung [11].

Aufgrund fehlender Standards in der Durchführung, Datenprozessierung und Analyse sowie der kontinuierlichen Weiterentwicklung der Methoden ist die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit dieser Studien bislang erschwert.

1.4. Die angeborene Immunität der Lunge

Mit einer inneren Oberfläche von etwa 30 m² sind die Atemwege und die Lunge der Umwelt permanent ausgesetzt [54]. Dabei gelangen Mikroorganismen durch das Einatmen von Luft, Mikroaspiration oder kontinuierliche Ausbreitung über die Schleimhaut in die unteren Atemwege und werden beim Gesunden durch Mechanismen der angeborenen und erworbenen Immunantwort wieder eliminiert.

Eine lokale Reproduktion der Mikroorganismen wird darüber hinaus durch Wachstumsbedingungen wie Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffangebot oder inflammatorische Zellen beeinflusst; diese scheinen in den gesunden Atemwegen das regionale Wachstum von Bakterien zu inhibieren [55, 56]. Im Vergleich zu den Atemwegen sind die Wachstumsbedingungen der alveolären Umgebung durch hoch spezialisierte Epithelzellen, residente Immunzellen wie die Alveolarmakrophagen, Surfactant und fehlenden Mucus charakterisiert [57].

Die angeborene Immunität dient der ersten Abwehr von eingedrungenen Mikroorganismen. Das charakteristische respiratorische Flimmerepithel der oberen und unteren Atemwege stellt zunächst eine Barrierefunktion dar und ermöglicht durch zilientragende Zellen und Schleimproduktion die mukoziliäre Clearance von Mikroorganismen und eingeatmeten Partikeln. Die Epithelzellen und weitere Immunzellen wie die Alveolarmakrophagen exprimieren Rezeptoren (*pattern recognition receptor*, PRR), welche mikrobielle Bestandteile (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) erkennen und über verschiedene Signalwege zur Phagozytose, Expression proinflammatorischer Zytokine oder Aktivierung der erworbenen Immunantwort führen [58].

Ergänzt werden diese Mechanismen durch antimikrobielle Peptide, die in dem von Becherzellen gebildeten Schleim oder dem von Pneumozyten produziertem Surfactant vorhanden sind [59].

Die von Immunzellen sezernierten Zytokine dienen der Aufrechterhaltung und Verstärkung der Immunreaktion, indem sie weitere Immunzellen rekrutieren und die Ausschüttung von weiteren Zytokinen stimulieren. Gleichzeitig stellen sie ein Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem dar. Einige wichtige Zytokine sollen im Folgenden vorgestellt werden.

Zu den proinflammatorischen Zytokinen zählen unter anderem IL-1 β , IL-18, TNF α , IL-6 und auch das Chemokin IL-8. Diese wirken entzündungsfördernd. Die inflammasomabhängigen Interleukine IL-1 β und IL-18 gehören zur Interleukin-1 Superfamilie und werden in der Lunge zum Beispiel durch das NLRP3-Inflammasom als inaktive Vorstufe sezerniert und Caspase-1 abhängig aktiviert [60-62]. Im Gegensatz zu IL-1 β wird IL-18 jedoch in den meisten menschlichen Zellen auch konstitutiv exprimiert [63]. IL-6, IL-8 und TNF- α werden von vielen Immunzellen der Atemwege sezerniert und sind wichtige proinflammatorische Mediatoren, indem sie die Immunreaktion verstärken und neutrophile Granulozyten anlocken [64, 65]. Durch ihre systemische Wirkung stimulieren die Zytokine IL-6 und TNF- α außerdem die Produktion des Akute-Phase-Proteins CRP in der Leber. Durch seine Wirkung auf die Antikörperproduktion stellt IL-6 eine Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunität dar [66]. IL-8 hat die stärksten chemotaktische Wirkungen auf neutrophile Granulozyten [65].

Da eine überschießende Entzündungsantwort zu massiven Gewebeschädigungen führen würde, bilden Makrophagen und andere Immunzellen antiinflammatorische Zytokine (z.B. IL10), welche die Wirkung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α regulieren und so eine inflammatorische Gewebeerstörung verringern [67].

Neben den pro- und antiinflammatorischen Zytokinen spielen auch Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle bei der Homöostase der Immunreaktion. G-CSF und GM-CSF stimulieren das Wachstum von Granulozyten und Monozyten/ Makrophagen und zeigen darüber hinaus auch proinflammatorische Wirkungen [68, 69].

Das komplexe Zusammenspiel von Mikrobiom und Immunsystem

Durch den Nachweis eines Mikrobioms in den Atemwegen und der Lunge geht man davon aus, dass eine ständige Interaktion zwischen dem Mikrobiom und dem Immunsystem herrscht.

Sowohl kolonisierende als auch pathogene Mikroorganismen stimulieren Immunzellen, wodurch über verschiedene Signalkaskaden die Ausschüttung von Zytokinen sowie Rekrutierung weiterer Abwehrzellen erfolgt [70].

Dass diese ständige Aktivierung des Immunsystems eine positive Rolle für die Gesundheit spielt, haben Versuche an keimfreien Mäusen gezeigt, welche eine verminderte Fähigkeit zur Eliminierung von Pathogenen zeigen [71]. Folglich scheint das Mikrobiom die Abwehr pathogener Keime in der Lunge verstärken zu können. Jedoch haben nicht alle Mikroorganismen den gleichen Effekt auf das Immunsystem. Pathogene lösen eine verstärkte Immunantwort aus, welche bei gleichzeitiger Anwesenheit von kommensalen Bakterien jedoch verringert werden kann [72]. Ebenso wird ein vermehrtes Vorkommen von Bakterien der oralen Standortflora (*Prevotella*, *Veillonella*) in der Lunge mit einer erhöhten Anzahl inflammatorischer Zellen assoziiert und scheint darüber hinaus eine Rolle in der Regulation der Th17-Zellen zu spielen [50, 73]. Eine reduzierte Immunantwort auf Pathogene zeigt sich hingegen bei Patienten mit fortgeschrittener COPD [74, 75].

Es reicht folglich nicht mehr aus, die pathogenen Mechanismen einzelner Bakterien isoliert zu betrachten. Vielmehr muss die Interaktion aller in einem Milieu lebenden Mikroorganismen untereinander und mit der Wirtsabwehr berücksichtigt werden, um herauszufinden, welche Faktoren die Pathogenität dieser komplexen Gemeinschaft determinieren [76].

1.5. Die Rolle der mikrobiellen Flora für chronische Erkrankungen

Bei der Entdeckung klassischer Infektionskrankheiten wie der Tuberkulose ging man von einer Monokausalität aus: Ein bestimmter Erreger ist Ursache einer bestimmten Erkrankung. Die Pathogenese vieler chronisch entzündlicher Erkrankungen wie M. Crohn, Colitis ulcerosa, rheumatoide Arthritis oder die COPD lässt sich durch dieses Modell jedoch nicht erklären.

Die neuen molekulargenetischen Methoden ermöglichen nicht nur den Nachweis von Pathogenen, sondern der gesamten mikrobiellen Flora. Zu dieser Flora zählen kommensale Bakterien, die dem Wirt nicht schaden, sowie fakultativ pathogene Bakterien, welche unter bestimmten Umständen, wie zum Beispiel einer Schwächung des Immunsystems oder Vorschädigung des Gewebes durch einen anderen Erreger, pathogen werden können.

In den letzten Jahren stand vor allem die bakterielle Besiedlung des Gastrointestinaltrakts im Zentrum der Forschung. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass der Darm von Bakterien kolonisiert wird und dies zu einer symbiontischen Interaktion führt: Unverdauliche Nahrungsbestandteile dienen Bakterien zur Energiegewinnung, während ihre Vermehrung den Menschen vor Kolonisierung durch pathogene Erreger schützt [77].

Bei Störung dieser Homöostase können Krankheitsprozesse in Gang gesetzt werden, die zu Veränderungen der mikrobiellen Flora führen und eine chronische Entzündungsreaktion hervorrufen [78].

Ein Beispiel dafür sind chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED), zu denen der M. Crohn sowie die Colitis ulcerosa gehören. Ihre Ätiologie ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Es gibt keinen spezifischen Erreger als Ursache der Erkrankung, sondern vielmehr wird von einer multifaktoriellen Genese ausgegangen. Sowohl genetische Faktoren, Umweltfaktoren (z.B. Ernährung oder Rauchen) als auch Antibiotika-Expositionen scheinen Einfluss auf Entstehung und Verlauf chronisch entzündlicher Darmerkrankungen zu haben [79].

Während bei der Untersuchung von Stuhlproben Gesunder etwa hundert verschiedene bakterielle Spezies beobachtet wurden, fiel bei CED-Patienten eine Reduktion dieser bakteriellen Vielfalt auf [80, 81]. Darüber hinaus besteht für den M. Crohn eine Assoziation mit einer genetischen Mutation im NOD2-Gen [82]. NOD2 gehört zu den sogenannten Pattern Recognition Rezeptoren (PRR) der angeborenen Immunität, welche pathogene Strukturen erkennen und daraufhin eine Immunantwort auslösen. Die Mutation dieses Rezeptors führt zu einer Störung der Homöostase zwischen der Immunabwehr und der mikrobiellen Flora und ermöglicht auf diese Weise Pathogenen die Kolonisation, welche schließlich eine Entzündungsreaktion im Darm hervorruft [83].

Neben den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen werden heute auch Adipositas, rheumatoide Arthritis, Diabetes sowie Asthma bronchiale und Allergien mit einer veränderten mikrobiellen Flora assoziiert.

Auch die Atemwege scheinen bei chronischer Atemwegserkrankungen durch ein verändertes Mikrobiom charakterisiert zu sein. Dabei wird das Zigarettenrauchen, welches den Hauptrisikofaktor für die Entstehung einer COPD darstellt, mit einer Veränderung des oralen Mikrobioms assoziiert – nicht jedoch mit Veränderungen in der Zusammensetzung des Mikrobioms der unteren Atemwege [47, 84]. In fortgeschrittenen Stadien der chronisch obstruktiver Lungenerkrankung wurde eine verminderte Diversität und/oder ein vermehrtes Auftreten von Proteobakterien, einschließlich der potenziell pathogenen Taxa *Haemophilus* und *Pseudomonas*, beobachtet [38, 85, 86]. Ebenso wurden Veränderungen des Mikrobioms im Rahmen einer Behandlung akuter Exazerbationen mit Antibiotika und Glukokortikoiden beschrieben [87].

Daneben wird bei den ebenfalls Raucher-assoziierten Lungenneoplasien eine signifikante Rolle des Mikrobioms vermutet, welche in neueren Studien mit histologischen Subtypen

assoziiert ist [41, 88-91]. Andere Autoren beobachteten darüber hinaus, dass das Mikrobiom möglicherweise eine Rolle in der Kanzerogenese spielt [92].

Antibiotikatherapie führt zur Dysbiose des Mikrobioms

Unter Dysbiose wird ein gestörtes Gleichgewicht der Mikroorganismen in einem Milieu aufgrund von Veränderungen der Lebensbedingungen verstanden [11]. Eine Dysbiose kann zum Fortschreiten oder zur Exazerbation einer chronischen Erkrankung führen. Ein häufiger Faktor, welcher mit einer Störung der mikrobiellen Zusammensetzung und verminderter Diversität einhergeht, ist eine Antibiotika-Therapie [93-96]. Dabei kommt es zur Eliminierung Antibiotika-sensibler Bakterien, welche anderen Bakterien ein Wachstum erst ermöglicht [97]. Ein Beispiel hierfür stellt das Überwuchern von *Clostridium difficile* nach einer Antibiotikatherapie dar, was zur *Clostridium difficile* assoziierten Diarrhöe führen kann [98]. Entscheidend im Kontext einer Dysbiose ist der Grad der Unempfindlichkeit gegenüber einer Störung von außen (Resistenz) und inwieweit sich die Zusammensetzung nach einer Störung wieder erholt und den ursprünglichen Zustand erreicht (Resilienz) [11, 99, 100].

1.6. Zielsetzung und Fragestellung

Das wissenschaftliche Interesse am Mikrobiom der Lunge wächst zunehmend, trotzdem werden häufig nur bestimmte Kompartimente des Respirationstrakts untersucht. Durch die vergleichende Untersuchung des Lungengewebes sollte in dieser Arbeit neben der Charakterisierung der mikrobiellen Zusammensetzung herausgefunden werden, ob das Mikrobiom der Atemwege mit dem des Lungengewebes gleichgesetzt werden kann.

Daneben wurde zur Charakterisierung der Immunantwort ein Zytokinprofil des Lungengewebes erstellt.

Folgende Fragen wurden gestellt:

1. Gibt es Unterschiede zwischen dem Mikrobiom des Lungenparenchyms und der mikrobiellen Zusammensetzung in den Atemwegen ?
2. Wird das pulmonale Mikrobiom durch eine residente Flora gebildet oder ist von dessen Herkunft aus den Atemwegen auszugehen ?
3. Welche Bedeutung, gemessen an der Biomasse, hat das Mikrobiom des Lungengewebes im Vergleich zu den oberen und unteren Atemwegen?
4. Gibt es Faktoren, welche zu einer Dysbiose im Lungengewebe führen und welchen Einfluss haben diese auf das Lungenmikrobiom?

2. Material und Methoden

2.1. Material

Verbrauchsmaterial

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Produktname	Firma
Röhrchen (15 und 50ml)	Cellstar®Tubes	Greiner bio-one, Frickenhausen
Abstrichtupfer	transystem®	Hain Lifescience, Nehren
20ml Spritzen	BD Discardit™	Becton Dickinson, Franklin Lakes (New Jersey, USA)
Sterile Stopfen	Combination Cap	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg
Mundschutz	Standard Earloop Face Mask	3M Health Care, St. Paul (Minnesota, USA)
Schutzkittel	Vlies-Einwegkittel	ASID BONZ GmbH, Herrenburg
Sterile Handschuhe	Gentle Skin® Premium OP	Meditrade, Kiefersfelden
Steriles Tuch	Foliodrape Protect	Hartmann, Heidenheim
Absaugfalle	Tracheal Saugset	Unomedical, Birkerød (Dänemark)
Einwegskalpell	Feather Disposable Scalpel DEEP, steril	Feather, Osaka (Japan)
24-Loch-Platte	Zellkultur Testplatte 24	TPP, Günzburg
96-Loch-Platte	Corning™ Costar™ 96-Well-Platte	Corning Incorporated, Corning (New York, USA)
Pipettenspitzen	epT.I.P.S.®	Eppendorf, Hamburg
1,5ml Reaktionsgefäße	Eppendorf Tubes® 3810X	Eppendorf, Hamburg
Bandenpickerspitzen (6,5 x 1mm)	GeneCatcher	Gelcompany, San Francisco (California, USA)

Lösungen und Reagenzien, Medien, Enzyme

Tabelle 2: Verwendete Lösungen, Reagenzien, Medien und Enzyme

Bronchoskopie	Firma
Sterile Natriumchlorid (NaCl) 0,9%-Lösung	Berlin Chemie, Berlin
Vorbereitende Inhalation (2,5ml Inhalationslösung) bestehend aus:	
170ml NaCl 0,9%	Berlin Chemie, Berlin
7ml NaCl 10%	B. Braun, Melsungen
20 ml Atrovent® 250µg/ml	Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein
10ml Salbutamol Inhalationslösung	Ratiopharm, Ulm
Lokalanästhetikum: Xylocain®-Lösung 2%	AstraZeneca GmbH, London
Kulturmedium und Zusätze	
RPMI 1640 Medium, w. 2.0 g/l NaHCO ₃ , LE (Low Endotoxin)	Biochrom GmbH, Berlin
FCS (Fetal Calf Serum)	GE Healthcare, Buckinghamshire (Großbritannien)
Desinfektionslösungen	
Mikrobac® forte	BODE, Hamburg
80% Ethanol	Brüggemann Alcohol, Heilbronn
Enzyme	
Phusion Hot Start II High fidelity Taq 500 U	Thermo Fisher Scientific, Waltham (Massachusetts, USA)
OB Protease 30 mg	Peqlab, Erlangen
Reagenzien	
dNTP-Set, 4 x 0,25 ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham (Massachusetts, USA)
RT PCR grade Water (10 x 1,5 ml)	Life technologies, Carlsbad (Kalifornien, USA)
Agarose	VWR Life Science (ehem. PEQLAB GmbH), Erlangen
GeneRuler 100bp 50µg	Thermo Fisher Scientific, Waltham (Massachusetts, USA)
RedSafe	iNtron Biotechnology, Korea

Kits

Tabelle 3: Verwendete Kits

Kit	Firma
PowerSoil®DNA Isolation Kit	MO BIO Laboratories, Carlsbad (California, USA)
UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation Kit	MO BIO Laboratories, Carlsbad (California, USA)
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen, Venlo (Niederlande)
MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycles)	Illumina®, San Diego (Kalifornien, USA)
Human IL-18 ELISA Kit	Medical & Biological Laboratories Co., LTD., Nagoya (Japan)
Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 17-plex Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Cytotoxicity Detection Kit	Roche, Rotkreuz (Schweiz)
Qubit® dsDNA BR (Broad Range) Assay Kits	Thermo Fisher Scientific, Waltham (Massachusetts, USA)
Sybr Green I Master Kit	Roche, Rotkreuz (Schweiz)

Primer

Tabelle 4: Verwendete Primer

Primer	Firma
16S rRNA V3/V4	Metabion, Planegg/Steinkirchen
qPCR 16S und 18S	TIB MOLBIOL, Berlin

Die Sequenzen der verwendeten Primer für die Amplifikation der V3/V4 Region der 16S rRNA und für die Amplifikation der 16S rRNA und 18S rRNA der qPCR sind im Anhang aufgelistet.

Geräte und Software

Tabelle 5: Verwendete Geräte und Software

Gerät	Bezeichnung	Firma
Sterile Werkbank	Class II A/B3, Biosafety Cabinet	Nuaire™, Plymouth (Massachusetts, USA)
Videobronchoskop	BF 1TQ180, BF 1T180	Olympus, Hamburg
Autoklave	Laboklav	SHP, Detzel Schloss/Satuelle
Zentrifuge	Rotina 38R, Rotina 35R, X	Hettich, Tuttlingen
Brutschrank	New Brunswick™ Galaxy® 170S	Eppendorf, Hamburg
Gefrierschrank	Gallenkamp Super Cold 85	ThermoScientific (ehem. Gebr. Haake), Karlsruhe
Waage	AG204 Delta Range®	Mettler Toledo, Columbus (Ohio, USA)
Schüttler	MS2 Minishaker	IKA®, Staufen
Pipetten	Eppendorf Research® plus	Eppendorf, Hamburg
Homogenisator	PowerLyzer®	Qiagen, Venlo (Niederlande)
Sequenzierer	MiSeq sequencer	Illumina®, San Diego (Kalifornien, USA)
Mikroplate Reader	iMark Microplate Absorbance Reader,	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
qPCR Platform	Light Cycler 480 II	Roche, Rotkreuz (Schweiz)
Multiplex Reader	Bio-Plex® MAGPIX™ Multiplex Reader	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Magnetplatte	Bio-Plex® Handheld Magnetic Washer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Transilluminator	TFX 20M	Vilber Lourmat, Collégien (Frankreich)
Fluorometer	Qubit® 2.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham (Massachusetts, USA)
Software	Firma	
Bio-Plex Data Pro™ Software	Bio-Rad Laboratories GmbH, München	
Microplate Manager® Software	Bio-Rad Laboratories GmbH, München	
R Studio Version 1.0.153	RStudio Inc., Boston (Massachusetts, USA)	
SPSS Version 23	IBM, Armonk (New York, USA)	

Bio1D	Vilber Lourmat, Collégien (Frankreich)
Mothur	Mothur project
Word	Microsoft Corporation, Redmond (Washington, USA)

2.2. Patientenkollektiv und Ethikvotum

Das Kollektiv wird von Patienten gebildet, die sich zunächst mit radiologischem Verdacht auf eine pulmonale Raumforderung in der Medizinischen Klinik III des UKSH Campus Lübeck vorstellten. Zur Klärung der Entität und Operabilität wurde eine diagnostische Bronchoskopie durchgeführt (n=32). Im Anschluss daran erfolgte bei positivem Befund und Operabilität (n=16) eine Resektion in der Thoraxchirurgischen Abteilung der Klinik für Chirurgie des UKSH Campus Lübeck; 16 der insgesamt 32 untersuchten Patienten konnten aufgrund von Inoperabilität bei zu fortgeschrittenem Tumorstadium (n=6) und/oder zu fortgeschrittener COPD (n=7), negativem Malignitätsnachweis (n=6) oder Untersuchung außerhalb des Beobachtungszeitraums (n=3) nicht für das spätere Lungengewebsmodell berücksichtigt werden. In 13 Fällen konnte eine ausreichende Menge von tumorfreiem Material für diese Studie gewonnen werden, sodass der Einschluss erfolgte. Ein Fall musste wegen Ausschlusskriterien (Vorliegen eines begleitenden Pleuraempyems) und zwei Fälle aufgrund der Durchführung der Operation außerhalb des Beobachtungszeitraums ausgeschlossen werden.

Im Rahmen der Interventionen wurden Materialien aus den oberen und unteren Atemwegen sowie Lungengewebsproben gewonnen und weiter untersucht.

In die Studie eingeschlossen wurden Raucher und Ex-Raucher mit und ohne COPD, die CT-morphologisch operabel erschienen. Patienten mit radiologischem Nachweis von infiltrativem Tumorwachstum in das Mediastinum und/oder Fernmetastasen wurden daher primär ausgeschlossen. Eine stattgehabte Chemo- oder Strahlentherapie vor der Operation führte ebenfalls zum Ausschluss. Weitere Ausschlusskriterien waren aktive Infektionen sowie Kontraindikationen gegen die Durchführung der Bronchoskopie mit bronchoalveolärer Lavage (BAL). Tumorstadium und Histologie sind in Tabelle 5 aufgelistet. Am häufigsten handelte es sich um Plattenepithelkarzinome (SCC, engl. *squamous cell carcinoma*) und Adenokarzinome (AC, engl. *adenocarcinoma*). In 11 der 13 Fälle konnte ein maligner Tumor histologisch bestätigt werden; in den anderen beiden Fällen handelte es sich um einen gutartigen Tumor und eine Aspergillose.

Die Rekrutierung der Patienten erstreckte sich über einen Zeitraum von 14 Monaten.

Die Patienten wurden zunächst durch Doktoranden identifiziert und durch ÄrztInnen der Medizinischen Klinik III schriftlich und mündlich über die Durchführung und Ziele der Studie informiert (Aufklärungsbogen im Anhang). Nachdem die Zustimmung mittels schriftlicher Einverständniserklärung gegeben wurde, wurden klinische Daten der Patienten erhoben und in pseudonymisierter Form auf einem Wissenschafts-Computer der Medizinischen Klinik III gespeichert.

Die Datenerhebung, die Gewebeentnahme und alle weiteren Untersuchungen sind von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck geprüft, am 4. Mai 2014 genehmigt worden (Ethikantrag: AZ 14-061) und entsprechen den Forderungen der aktuellen Fassung der Deklaration von Helsinki (Oktober 2013).

Die gesamte Planung und Durchführung der Studie erfolgte zusammen mit Andreas Möllering (Doktorand der Medizinischen Klinik III). Dabei werden in der Arbeit von Herrn Möllering die Daten aus den oberen und unteren Atemwegen für das gesamte Patientenkollektiv (n=32) mit Schwerpunkt auf den Einfluss pulmonaler Grunderkrankungen betrachtet, während sich diese Arbeit auf den Vergleich der Daten aus den Atemwegen und dem Lungengewebe für die Subgruppe der operierten Patienten (n=13) fokussiert.

2.3. Die Datenerhebung

Die Datenerhebung erfolgte im Patientengespräch mittels eines Dokumentationsbogens (s. Anhang) und wurde durch Einsicht in die Patientenakte vervollständigt. Die klinischen Daten der Patienten beziehen sich insbesondere auf das Vorhandensein und die Schwere einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) und im Zusammenhang damit den Raucherstatus (Raucher, Ex-Raucher, Nichtraucher), die Anzahl der Packungsjahre (*packyears* (py), gerauchte Zigarettenpackungen pro Tag x Anzahl der Raucherjahre) und die Exazerbationsfrequenz pro Jahr. Die Schweregradeinteilung der COPD erfolgt mittels der GOLD-Klassifikation (*Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*) anhand des spirometrisch ermittelten Tiffeneau-Index (FEV₁ im Verhältnis zur forcierten Vitalkapazität (FVC)), sowie der forcierten Einsekundenkapazität (FEV₁).

Zum Untersuchungszeitpunkt waren die Patienten klinisch infektfrei. In einigen Fällen erfolgte innerhalb der letzten 90 Tage eine Therapie mit inhalativen (n=2) oder oralen (n=1) Steroiden und/oder eine antibiotische Therapie (n=3). Ergänzend sind die

Entzündungsparameter CRP und Leukozyten vor den beiden Untersuchungszeitpunkten (Bronchoskopie und OP) dokumentiert worden (s. Anhang). Weiterhin wurden die Patienten zu anderen Vorerkrankungen und ihrer Medikamenteneinnahme befragt.

Tabelle 6: Klinische Daten der Patienten (Alter zum Untersuchungszeitpunkt, w = weiblich, m = männlich, R = Raucher, Ex-R = Ex-Raucher, py = packyears (Packungsjahre), FEV1 = Einsekundenkapazität (forciertes expiratorisches Volumen, welches sich innerhalb einer Sekunde ausatmen lässt; FEV1% = FEV1 bezogen auf Referenzkollektiv, FEV1/FVC%= Tiffeneau Index, SCC = squamous cell carcinoma (Plattenepithelkarzinom), AC = adenocarcinoma (Adenokarzinom), LCNEC = large cell neuroendocrine carcinoma (großzelliges neuroendokrines Karzinom), ¹fibröser pleuraler solitärer Tumor, ²Aspergillose)

	Alter	w/m	Raucherstatus/ py	FEV1%	FEV1/ FVC%	COPD Stadium	Histologie	Stadium (UICC)
1	74	w	R/25	77	74	Nein	SCC	IA
2	62	w	R/22	51	66	GOLD II	AC	IIA
3	80	m	R/60	50	68	GOLD II	SCC	IB
4	68	w	R/40	74	106	Nein	AC	IIA
5	63	m	Ex-R/40	72	82	Nein	SCC	IIIB
6	58	m	R/40	35	50	GOLD III	AC	IIB
7	73	m	Ex-R/60	87	102	Nein	SCC	IIA
8	61	m	R/40	75	102	Nein	SCC	IIA
9	63	w	Ex-R/25	88	96	Nein	LCNEC	IIA
10	72	w	R/fehlt	90	108	Nein	AC	IA
11	61	m	Ex-R/110	42	68	GOLD III	andere ¹	-
12	61	m	R/30	79	101	Nein	SCC	IA
13	50	m	R/43	99	87	Nein	andere ²	-

2.4. Probengewinnung aus den oberen und unteren Atemwegen

Nach der schriftlichen Einverständniserklärung wurde bei den Patienten vor der Bronchoskopie zunächst ein Rachenabstrich mit einem Abstrichtupfer an der Rachenhinterwand entnommen.

Danach begann der Patient die vorbereitende Inhalation für die anschließende Bronchoskopie.

Der Arbeitstisch für die Bronchoskopie wurde mit einem sterilen Tuch abgedeckt und alle verwendeten Materialien (NaCl für die Lavage, Lidocain zur Lokalanästhesie, Absaugfalle) wurden steril geöffnet und aufgezogen. Der Untersucher trug sterile Handschuhe und einen sterilen Kittel. Alle verwendeten Röhrchen wurden vor der Verwendung durch UV-Strahlung unter der sterilen Werkbank sterilisiert.

Mit einem ersten Bronchoskop wurde eine supraglottische Absaugung im Recessus piriformis durch Spülen mit steriler Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) und Auffangen mit einer Absaugfalle gewonnen. Wenn nötig wurden mit diesem Bronchoskop ebenfalls die Stimmlippen mit einem Lokalanästhetikum betäubt. Danach erfolgte der Wechsel auf ein zweites Bronchoskop (Two-scope Technik [48]). Um eine bakterielle Kontamination des Arbeitskanals vor Untersuchungsbeginn auszuschließen, wurde dieses Bronchoskop zunächst mit steriler Kochsalzlösung gespült. Die Lösung wurde in einem sterilem 50 ml Röhrchen aufgefangen und diente als Negativkontrolle.

Anschließend erfolgte mit dem zweiten Bronchoskop die bronchoalveoläre Lavage (BAL) auf Segment- oder Subsegment-Ebene in Verschlussstechnik, indem sterile Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) durch das Bronchoskop in das distale Bronchialsystem gespült und im Anschluss wieder aspiriert wurde. Die Spritzen mit dem aspirierten Material wurden sofort mit einem sterilen Stopfen verschlossen und anschließend im Labor unter der Sterilbank in ein steriles Röhrchen umgefüllt.

Die BAL erfolgte in einem nicht vom Tumor befallenen Abschnitt der Lunge, meist im Mittellappen oder der Lingula. Diese Lungenlappen zeichnen sich aus anatomischen Gründen bei der BAL durch die höchste recovery (Rücklaufquote) aus.

Eine Ausnahme von diesem Ablauf liegt bei 2 Patienten (ID 9 und 13) vor, bei denen präoperativ keine Bronchoskopie erfolgte. Diese erfolgte nach Intubation vor Operationsbeginn, weshalb auf eine supraglottische Absaugung verzichtet wurde. Nach Einführen des Bronchoskops über den Tubus wurde die BAL aus einem nicht vom Tumor befallenen Segment entnommen.

Nach Probengewinnung wurden die Flüssigproben (BAL, Bronchoskopspülung) zentrifugiert (30 min 16.000 g) und der Überstand jeweils ohne das Pellet zu berühren abpipettiert. Alle Proben wurden für die folgenden Analysen bei -80°C eingefroren.

2.5. Humanes Lungengewebsmodell

Die Gewinnung von humanem Lungengewebe erfolgte während der Operation durch Ärzte der Klinik für Chirurgie des UKSH, Campus Lübeck (Bereich Thoraxchirurgie, PD Dr. med E. Palade und Mitarbeiter). Es handelte sich um anatomische oder atypische Resektionen, die mittels minimalinvasiven oder offenen-chirurgischen Verfahren erfolgten. Nach Entnahme des Gewebes wurde dieses in einem zuvor desinfizierten (Flächendesinfektionsreiniger, Ethanol 80%) und durch UV-Bestrahlung und Autoklavierung sterilisierten Behälter in das Institut für Pathologie transportiert. Nach vorheriger Desinfektion des Arbeitsplatzes mit Ethanol 80% wurden unter möglichst sterilen Bedingungen (sterile Handschuhe, sterile Instrumente) Gewebestreifen vom tumorfreien Anteil des Resektats, welches nach fachpathologischer Begutachtung keiner pathologischen Untersuchung mehr bedurfte und makroskopisch kein Hinweis für eitrig-infektiöse oder emphysematöse Veränderungen zeigte, abgeschnitten und in ein steriles 50ml Röhrchen gebracht. Dies erfolgte durch einen Pathologen des Instituts für Pathologie des UKSH, Campus Lübeck. Für die spätere Mikrobiomanalyse wurden die Gewebestücke in etwa 25 mg Stücke portioniert und bei -80°C eingefroren.

Für die quantitative Zytokinbestimmung erfolgte der Zuschnitt der Gewebestreifen unter sterilen Bedingungen mit einem Skalpell in 0,3-0,4g schwere Stücke. Diese wurden in 24-Loch-Platten gebracht und mit 2 ml Medium (500 ml RPMI 1640 + 50 ml FCS) bedeckt. Die Inkubation erfolgte für 1h, 4h, 24h und 48h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank. Zu jedem Zeitpunkt wurde eine Mediumkontrolle von je 2ml mitgeführt.

Die Überstände wurden nach der jeweiligen Inkubationszeit gesammelt, in 1,5ml Reaktionsgefäße aliquotiert und für spätere Versuche bei -80° eingefroren. Um zelluläre Reste von den Überständen zu trennen, wurden diese zuvor zentrifugiert (10 min, 1500 revolutions per minute (rpm)).

2.6. Vorbereitung der Proben zur Mikrobiomanalyse

DNA-Extraktion

Für die Sequenzierung der bakteriellen DNA musste diese zunächst aus den Proben extrahiert und anschließend mittels PCR vervielfältigt werden.

Hierzu wurde ein kommerziell erhältliches Kit verwendet (MoBio PowerSoil[®] Kit). Die Versuchsdurchführung erfolgte nach Herstellerangaben. In dieser Arbeit wurde ergänzend im ersten Schritt zur Proteolyse 20µl Proteinkinase K zugegeben, bei 50°C für 2 h inkubiert und anschließend homogenisiert (MoBio PowerLyzer[®]), bevor die erste Zentrifugation stattfand. Als Negativkontrolle wurden die Kit Reagenzien ohne Zugabe der Probe sowie die vor Nutzung der Endoskope nach Spülung der Arbeitskanäle asservierte Kochsalzlösung verwendet.

Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Im Anschluss an die Extraktion der DNA erfolgte durch eine Polymerase Ketten Reaktion (*engl. polymerase chain reaction*, PCR) die Amplifizierung der V3/V4 hypervariablen Region der bakteriellen 16S rRNA-Gene mittels geeigneter Primer [101] (s. Anhang). Durch eine genspezifische Sequenz der V3/V4-Region binden diese an die konservierte Region der bakteriellen DNA. Sie sind außerdem mit einer Adapter-Sequenz zur Anlagerung der Amplikons an die Flusszelle und einer Index-Sequenz zur Identifizierung der jeweiligen Probe versehen. Eine pad-Sequenz dient der Erhöhung der Schmelztemperatur auf 65°C und eine Link-Sequenz verbindet diese drei Sequenzen mit der genspezifischen Sequenz der Primer.

Der Reaktionsansatz zur Amplifikation setzte sich folgendermaßen zusammen:

RT-PCR grade water	8,25 µl
5 x HF Puffer	5 µl
10 µM dNTPs	0,5 µl
2 mM Primer	je 5 µl
DNA	1 µl
Phusion Polymerase	0,25 µl
Gesamt	25 µl

Die PCR erfolgte nach folgendem Protokoll:

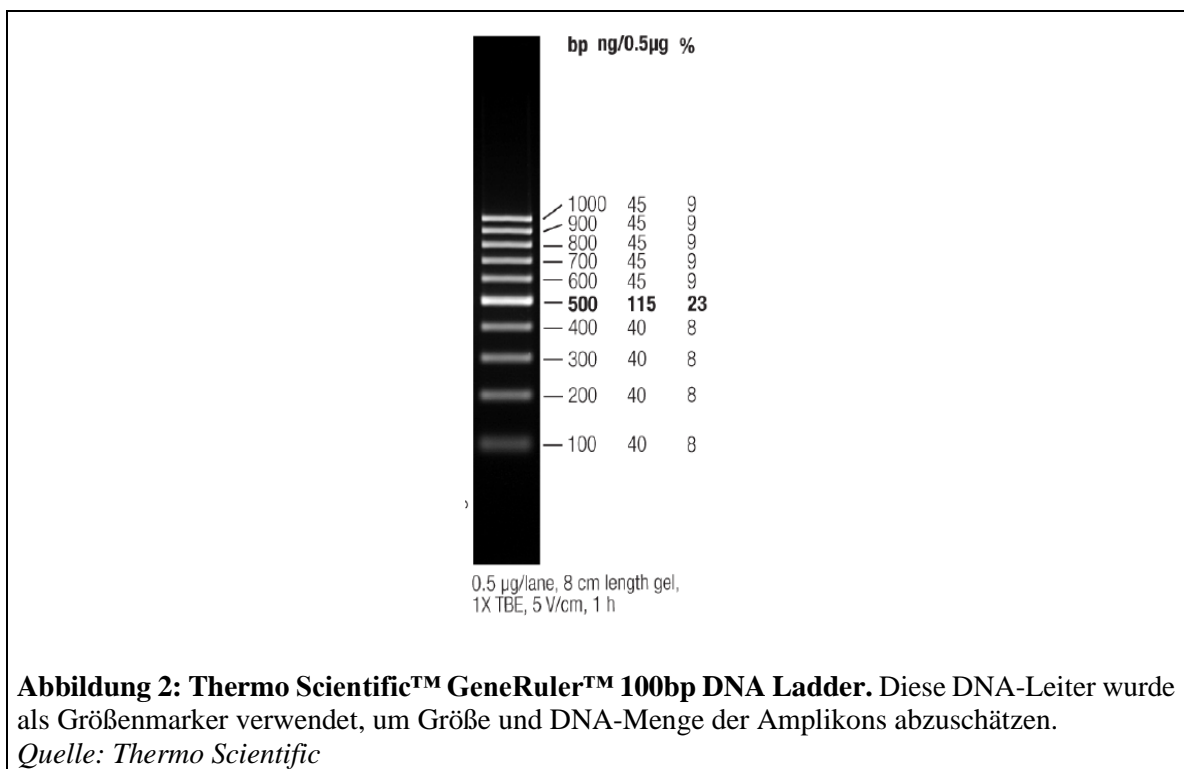
Denaturierung:	98 °C	5 min	
Amplifizierung:	30 Zyklen	98 °C 9 sek	Denaturierung
		55 °C 60 sek	Primer Anlagerung
		72 °C 90 sek	Elongation
Elongation:	72 °C	10 min	

Danach wurden die Proben bei -20°C eingefroren.

Abweichend wurden bei den Proben des humanen Lungengewebes aufgrund einer Vielzahl unspezifischer Fragmente und nur geringer Menge an Fragmenten korrekter Größe 35 PCR-Zyklen durchgeführt. Anschließend wurde das korrekte Fragment ausgestochen und als Template für eine erneute PCR mit 35 Zyklen verwendet.

Gel Elektrophorese und DNA Elution

Im Anschluss wurden die DNA-Fragmente auf einem Agarose-Gel versetzt mit 1:20.000 RedSafe der Größe nach aufgetrennt. Die DNA-Fragmente im Gel wurden mittels eines Transilluminators visualisiert und die Konzentration des jeweiligen Amplifikats durch Abgleich einer Bande ungefähr gleicher Größe und gleicher Intensität einer definierten Konzentration einer DNA-Leiter ermittelt (Abb. 2). Mit der Bio1D Software wurden Konzentrationsmessungen durchgeführt.



PCR Amplifikate äquimolarer Mengen wurden vereint und erneut per Gelelektrophorese aufgetrennt und die Bande mit der korrekten Größe mit Hilfe von Bandenpickerspitzen aus dem Gel ausgestochen und mittels MinElute Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben eluiert. Die Endkonzentration der Probe wurde mittels eines Fluorometers unter Verwendung des Qubit[®] dsDNA BR (Broad Range) Assay Kits ermittelt. Die DNA wurde bei -20 °C eingefroren.

2.7. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde auf einem MiSeq-Sequenzierer der Firma Illumina[®] durchgeführt und erfolgte durch unsere Kollegen im Forschungszentrum Borstel.

Mittels sogenannter „*Bridge amplification*“ wurden die Fragmente auf einer Durchflusszelle amplifiziert und Cluster identischer Moleküle gebildet. Die anschließende Sequenzierung erfolgte mit der *Sequencing-by-synthesis* Methode. Mithilfe von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden wurde dabei eine *paired-end* Sequenzierung durchgeführt, sodass am Ende jeweils eine *forward*- und eine *reverse*-Sequenz entstehen.

2.8. Datenprozessierung und Analyse

Die Prozessierung der *fastq* Dateien, welche die 16S-rRNA-Sequenzen enthalten, erfolgte mithilfe der *Mothur* version 1.35.0 [15]. Durch die Verknüpfung der zusammengehörenden forward- und reverse-Sequenzen wurden Contigs erstellt, welche die genetische Information der jeweiligen 16S-rRNA-Sequenz enthalten. Im Anschluss wurden alle Sequenzen, die nicht eindeutige Basen enthalten, deren Homopolymere eine Länge > 9 besitzen und die, die länger als das amplifizierte Fragment sind, entfernt. Die so verbliebenen Sequenzen wurden mit der SILVA [102] Referenzdatenbank abgeglichen. Chimäre Sequenzen konnten mit dem UCHIME Algorithmus [103] detektiert und entfernt werden. Mithilfe der Greengenes Version gg_13_8_99 [17] konnten die Sequenzen mit einem Bootstrap-Wert von 80 klassifiziert und alle nicht-bakteriellen Sequenzen entfernt werden. Anschließend erfolgte die Einteilung in operational taxonomic units (OTU) auf verschiedenen Ebenen. Für statistische Analysen wurden die Abundanz-basierten Daten für unterschiedliche Sequenziertiefe mittels GMPR (*Geometric Means of Pairwise Ratios*), implementiert in R, korrigiert [104].

Die Analyse der Daten erfolgte mithilfe R Studio Version 1.0.153 sowie SPSS und wird im Abschnitt „Statistische Analyse“ genauer beschrieben.

2.9. Dekontamination

Zum Umgang mit einer unvermeidlichen Kontamination während Probengewinnung und -verarbeitung orientiert sich diese Arbeit an in der aktuellen Literatur empfohlenen Standards [12]. Dazu wurden neben den bereits erwähnten Negativkontrollen auch Isolationskontrollen während der DNA-Extraktion mitgeführt und anschließend gemeinsam mit den Proben der späteren Sequenzierung zugeführt. Mittels qPCR erfolgte außerdem eine Quantifizierung der bakteriellen DNA-Menge in den Kontrollen, in der sich im Mittel eine $2 \times \log^{10}$ geringere Menge an Bakterien im Vergleich zu den Lungengewebsproben zeigte. Zur Abschätzung einer Kontamination sowie zur Dekontamination der Daten vor der anschließenden Analyse wurde der decontam-Algorithmus mithilfe des in R implementierten Frequenzverfahrens angewendet [105]. Tabelle 7 zeigt die anhand des decontam-Algorithmus als kontaminierend identifizierten Taxa, welche vor den weiteren Analysen aus dem Datenset entfernt wurden.

Tabelle 7: Entfernte Taxa, welche durch den decontam Algorithmus als Kontaminanden identifiziert wurden

Entfernte Taxa
Hymenobacter
Chryseobacterium
Comamonas
Solirubrobacterales_unclassified
Cytophagales_unclassified
Pseudonocardia

Tabelle 8: Die 20 häufigsten Taxa in den Isolationskontrollen nach Entfernung der Taxa in Tabelle 7 (Proben mit > 100 reads wurden berücksichtigt)

Taxa der Kontrollproben
Veillonella
Pseudomonas
Corynebacterium
Staphylococcus
Streptococcus
Enterobacter
Rothia
Enhydrobacter
Anaerococcus
Paucibacter
Enterobacteriae_unclassified
Granulicatella
Kocuria
Actinomyces
Paracoccus
Neisseria
Garciella
Lachnoanaerobaculum
Capnocytophaga
Micrococcus

2.10. qPCR

Um die DNA-Menge in den untersuchten Proben zu quantifizieren, wurde eine quantitative Polymerase Ketten Reaktion (qPCR) basierend auf der SYBR Green Methode durchgeführt. Eine Standardkurve anhand von *E.coli* Kolonien-bildenden Einheiten wurde zur Quantifizierung der absoluten bakteriellen Biomasse verwendet. Außerdem erfolgte eine weitere relative Quantifizierung der bakteriellen Biomasse im Verhältnis zur humanen Menge an Biomasse mittels 18S-rRNA spezifischer Primer und eine Normalisierung der Menge an 18S Gen Sequenzen.

Der Reaktionsansatz erfolgte nach folgendem Pipettierschema:

SYBR GREEN I Master 2x conc.	10 µl
Primer F	0,5 µl
Primer R	0,5 µl
H2O	7 µl
DNA	2 µl
Gesamt	20 µl

Die anschließende PCR erfolgte nach folgendem Schema:

Denaturierung:	98 °C	10 min		
Amplifizierung:	45 Zyklen	98 °C	9 sek	Denaturierung
		55 °C	30 sek	Primer Anlagerung
		72 °C	30 sek	Elongation
Kühlung:	40 °C			

Im Anschluss erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse.

Zur Quantifizierung wurde die Fluoreszenz in der exponentiellen Phase der Amplifikation nach Überschreiten des vordefinierten Schwellenwerts gemessen und die 16S CP-Werte auf die 18S CP-Werte normalisiert.

Aufgrund mangelnden Probenmaterials (ID11) konnte eine Probe nicht mit in diese Analyse aufgenommen werden.

2.11.SourceTracker

Zur Abschätzung der Herkunft bakterieller Taxa in einer Probe wurde der *SourceTracker* Algorithmus [106] verwendet, welcher anhand von Häufigkeitstabellen den Anteil einer Probe („source“) an der Zusammensetzung einer anderen Probe („sink“) abschätzt. Mithilfe des R-Scripts (Version 0.9.1) konnte so der Anteil von OTUs aus der BAL in den Lungengewebsproben und der Anteil der im Rachenabstrich detektierten OTUs an der Zusammensetzung der BAL untersucht werden.

Die Durchführung der Versuche und Analysen der Abschnitte 2.6-2.11. erfolgte unter Anleitung von Dr. rer. nat. S. Graspeuntner (Institut für Infektiologie und Mikrobiologie, UKSH Campus Lübeck).

2.12. Quantitative Immunoassays

Von 11 der 13 Lungengewebsproben konnte nach pathologischer Begutachtung und Asservierung von ausreichend Gewebe genügend Material für immunologische Versuche verwendet werden, sodass eine quantitative Zytokinbestimmung durchgeführt werden konnte.

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zum quantitativen Nachweis von IL-18 in den zellfreien Überständen des Lungengewebes wurde ein ELISA durchgeführt. Es wurde ein kommerziell erhältliches Kit (Fa. MBL) verwendet und die Versuchsdurchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die verwendete Methode beruht auf dem Prinzip des Sandwich Assays. Ein erster Antikörper ist an den Boden einer 96-Loch-Platte gebunden und dient als Fängerantikörper, indem er das gesuchte Antigen in der Probe bindet. Ein Detektionsantikörper bindet dieses Antigen ebenfalls und ist mit dem Enzym Peroxidase konjugiert. Bei beiden Antikörpern handelt es sich um monoklonale Antikörper gegen humanes IL-18. Durch Waschvorgänge werden ungebundene Stoffe entfernt. Als Substrat dient TMB/H₂O₂, welches in einer enzymatischen Farbreaktion umgesetzt. Nach Stoppen dieser Reaktion mit 0,5 M H₂SO₄ wurde die Extinktion bei 450nm im Mikroplate-Reader gemessen. Da die Konzentration des Analyten proportional zur gemessenen Extinktion ist, konnte durch Erstellen einer Standardkurve durch Proben mit bekannten Konzentrationen die Konzentrationsbestimmung der Analyten mittels Interpolation erfolgen. Der Messbereich erstreckte sich über einen Bereich von 12,6 – 1000 pg/ml.

Jede Probe wurde doppelt in eine 96-Loch-Platte pipettiert, um anschließend einen Mittelwert zu bilden. Zu jedem gemessenen Zeitpunkt wurde eine Mediumkontrolle als Negativkontrolle mitgeführt.

Partikel-Immunoassay (PIA)

Zur Konzentrationsbestimmung von IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, G-CSF, GM-CSF und TNF α wurde das Format des Multiplex-Assays verwendet, welches den quantitativen Nachweis

von mehreren Analyten in einer Probe gleichzeitig ermöglicht. Die Methode beruht ebenfalls auf dem Prinzip des Sandwich Assays. Hierbei werden die Fängerantikörper an Partikel, in diesem Fall magnetische Kügelchen (sog. *Beads*), gebunden. Die *Beads* in einem Assay unterscheiden sich in ihrer spezifischen Eigenfluoreszenz. Fänger- und Detektionsantikörper binden jeweils ihre spezifischen Antigene. Waschvorgänge entfernen nichtgebundene Stoffe. Die Detektionsantikörper sind ebenfalls fluoreszenzmarkiert und durch Zugabe von Streptavidin-Phycoerythrin werden diese sichtbar gemacht. Im Durchflusszytometer lässt sich mithilfe eines ersten Lasers durch die Eigenfluoreszenz der Antikörper-markierten *Beads* der Analyt charakterisieren. Die Konzentration des Analyten ist proportional zur Fluoreszenz-Intensität und kann so durch einen zweiten Laser bestimmt werden.

Für jeden Analyten wird eine Standardkurve ermittelt anhand der durch Interpolation die Konzentration der Proben bestimmt wird.

Es wurde ein kommerziell erhältliches Kit verwendet (Fa. Bio-Rad). Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Proben wurden jeweils doppelt in eine 96-Loch-Platte pipettiert und anschließend ein Mittelwert gebildet. Zu jedem gemessenen Zeitpunkt wurde eine Mediumkontrolle als Negativkontrolle mitgeführt. Der Messbereich der Konzentrationen der gemessenen Zytokine ist in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Messbereich der Zytokinkonzentrationen im Multiplex-Assay

Analyt	Messbereich
IL-1 β	0,53 - 8608 pg/ml
IL-6	2,3 – 37680 pg/ml
IL-8	2,57 – 42150 pg/ml
IL-10	2,15 – 35170 pg/ml
G-CSF	2,44 – 40049 pg/ml
GM-CSF	0,78 – 12844 pg/ml
TNF- α	3,88 64803 pg/ml

2.13. Vorversuche

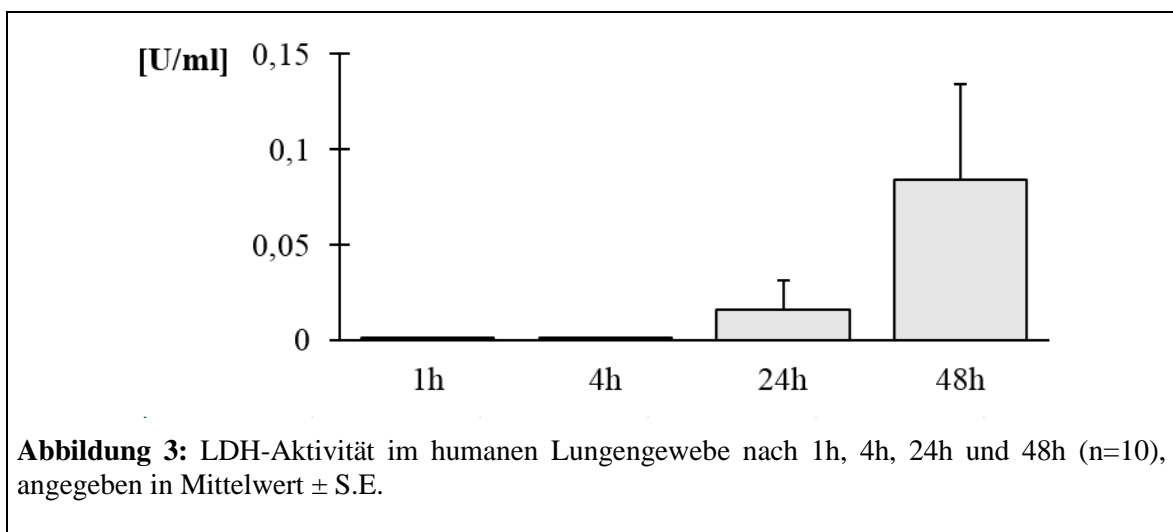
Zytotoxizitätstest

Um eine relevante Zytotoxizität im humanen Lungengewebe zu erkennen, wurde die LDH-Aktivität im zellfreien Überstand nach 1h, 4h, 24h und 48h gemessen. Dazu wurde ein kommerziell erhältliches Kit (Cytotoxicity Detection Kit (LDH), Fa. Roche) verwendet.

Nach Zugabe des Substrats zur Probe und Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln erfolgte eine enzymatische Reaktion mit anschließendem Farbumschlag. Durch Hinzufügen von 1M HCL wurde die Reaktion gestoppt und die Extinktion bei 490nm im Mikroplate Reader gemessen. Anhand einer mitgeführten Standardkurve konnte die LDH-Aktivität in jeder Probe bestimmt werden. Der Messbereich erstreckte sich über den Bereich von 0,03125 – 2,0 U/ml.

Nach 1h und 4h lag die LDH-Aktivität jeweils unter der Nachweisgrenze, nach 24h erreichte sie im Mittel 0,016 U/ml nach 48h im Mittel 0,084 U/ml (Abb. 3).

Aufgrund des LDH-Anstiegs nach 48 Stunden muss von einer höheren Zytotoxizität im Gewebe ausgegangen werden, weshalb für spätere Analysen der Zeitpunkt $t=24h$ verwendet wurde.



Nachweis der Kinetik in der Zytokinproduktion im humanen Lungengewebe

Um eine Kinetik der Zytokinproduktion im noch vitalen Lungengewebe nachzuweisen, analysierten wir die Zytokinkonzentrationen nach 1h, 4h, 24h und 48h (Tab. 10).

Nach 4h konnte bereits ein Anstieg der Konzentration beobachtet werden. Mit Ausnahme von IL-18 zeigte sich nach 24h ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Zytokinkonzentration. Ein weiterer Anstieg der Konzentration nach 48h blieb aus, weshalb auch im

Zusammenhang mit der ansteigenden LDH-Aktivität dieser Zeitpunkt in den späteren Analysen nicht mehr berücksichtigt wird.

Tabelle 10 zeigt die Kinetik der Zytokine. Für die meisten Zytokine lässt sich nach 24h ein signifikanter Anstieg beobachten, während hingegen IL-18 als einziges Zytokin mit konstitutiver Expression ein hohes basales Level und nach 24h einen Abfall der Konzentration zeigt.

Nach 48 h zeigt sich in allen Fällen kein relevanter Abfall oder Anstieg der Konzentration.

Tabelle 10: Zytokinkonzentrationen nach 1h, 4h, 24h und 48h im humanen Lungengewebe. Die Konzentrationen sind angegeben in Mittelwert \pm S.E.

	Basale Konzentration nach 1h [pg/ml]	Konzentration nach 4h [pg/ml]	Konzentration nach 24h [pg/ml]	Konzentration nach 48h [pg/ml]	n	p Vergleich 1h und 24h
IL1β	5,07 \pm 2,00	25,11 \pm 12,05	163,53 \pm 42,73	229,34 \pm 63,12	9	p<0,05
IL18	645,92 \pm 163,24	705,24 \pm 105,65	434,07 \pm 106,35	354,82 \pm 96,86	11	n.sig.
IL6	313,67 \pm 122,22	14707,95 \pm 3493,41	155823,26 \pm 36026,52	209407,78 \pm 47787,44	9	p<0,01
IL8	44,12 \pm 14,25	1508,01 \pm 492,36	60694,20 \pm 18937,79	110346,06 \pm 33330,42	8	p<0,01
TNFα	7,44 \pm 3,66	78,48 \pm 12,99	666,93 \pm 105,29	719,22 \pm 115,01	9	p<0,01
IL10	2,79 \pm 0,72	8,36 \pm 1,88	29,45 \pm 3,22	31,18 \pm 3,62	9	p<0,001
G- CSF	49,24 \pm 22,64	2887,30 \pm 839,88	24345,91 \pm 6057,97	41984,65 \pm 8427,03	9	p<0,01
GM- CSF	14,10 \pm 2,60	47,10 \pm 4,47	442,67 \pm 46,40	404,07 \pm 58,23	6	p<0,01

2.14. Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mit SPSS Statistics (Version 23.0 für Microsoft Windows, Fa. IBM) sowie R Studio (Version 1.0.153 für Microsoft Windows, Fa. RStudio, Inc.) Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Microsoft Excel® 2013.

Die deskriptiven Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler (S.E.) dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha \leq 0,05$ festgelegt.

Innerhalb einer Probe wurden zunächst die relativen Häufigkeiten der dort vorkommenden Taxa berechnet. Bei Mehrfachvergleichen (Rachenabstrich, BAL, HLT) wurde ein Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben bei signifikanten Ergebnissen durchgeführt (mit anschließender Holm Korrektur bei Mehrfachvergleichen).

Für die Analyse der relativen Readanzahlen und α -Diversität in der BAL und im Lungengewebe wurde ein Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben mit Benjamini Hochberg Korrektur für multiples Testen durchgeführt. Die Parameter der α -Diversität (*Evenness*, *Shannon-Diversity-Index*, *Simpson-Diversity-Index*) wurden mithilfe des *vegan*-package für R berechnet [107].

Als Distanzmaß der β -Diversität wurde der Bray-Curtis-Index berechnet und einer Hauptkoordinatenanalyse zugeführt. Es wurde eine Multivariate Varianzanalyse (ADONIS) durchgeführt und es erfolgte eine Visualisierung mittels Heatmap und Biplot.

Mittels hierarchischer Clusteranalyse (Average-Linkage Methode basierend auf der euklidischen Distanz) wurden die proinflammatorischen Zytokine visuell in zwei Gruppen unterteilt. Diese unterschieden sich in der Anamnese einer vorausgegangenen Antibiotikatherapie.

Mittels des ebenfalls bestimmtem Silhouetten-Quotient konnte die optimale Anzahl von zwei Clustern bestätigt werden (Tab. 11).

Tabelle 11: Silhouetten Koeffizient für die Anzahl an Clustern (k)

k (Anzahl an Clustern)	Silhouettenkoeffizient
2	0.46
3	0.33
4	0.35

Bei Signifikanztest unverbundener Proben erfolgte ein Wilcoxon Test für unabhängige Stichproben.

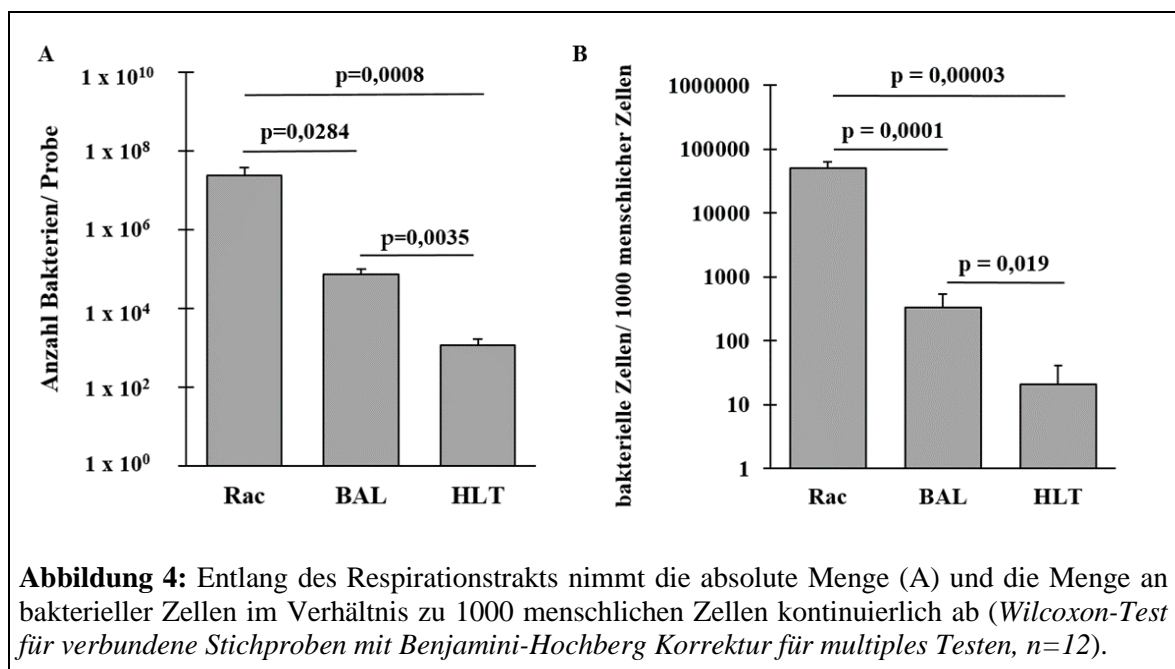
Beim Vergleich der Zytokinkonzentrationen wurde ein t-Test mit Holm Korrektur für multiples Testen angewandt.

Bei Korrelationsanalysen zwischen zwei Zytokinen und zwischen Zytokinen und klinischen Daten wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet. Bei Korrelationen mit Parametern der Mikrobiomanalyse wurde der Spearman-Korrelationskoeffizient verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Die bakterielle DNA-Menge nimmt Verlauf des Respirationstrakts

Mittels qPCR wurde die bakterielle DNA-Menge in Rachenabstrich, BAL und Lungengewebe absolut und in Relation zu humaner 18S DNA quantifiziert. Abbildung 4 zeigt die schrittweise Abnahme der bakteriellen Dichte von den oberen Atemwegen (Rac) über die unteren Atemwege (BAL) bis zum Lungengewebe (HLT).



3.2. Die mikrobielle Zusammensetzung in den Atemwegen und im Lungengewebe

Um die mikrobielle Zusammensetzung in Atemwegen und Gewebe zu analysieren, wurden die relativen Readanzahlen auf taxonomischer Basis im Rachenabstrich (Rac, obere Atemwege), der bronchoalveolären Lavage (BAL, untere Atemwege) und dem humanen Lungengewebe (HLT) bestimmt.

Zu den am häufigsten identifizierten Taxa auf Stammebene (*Phylum*) zählen *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* und *Fusobacteria* (Abb. 5).

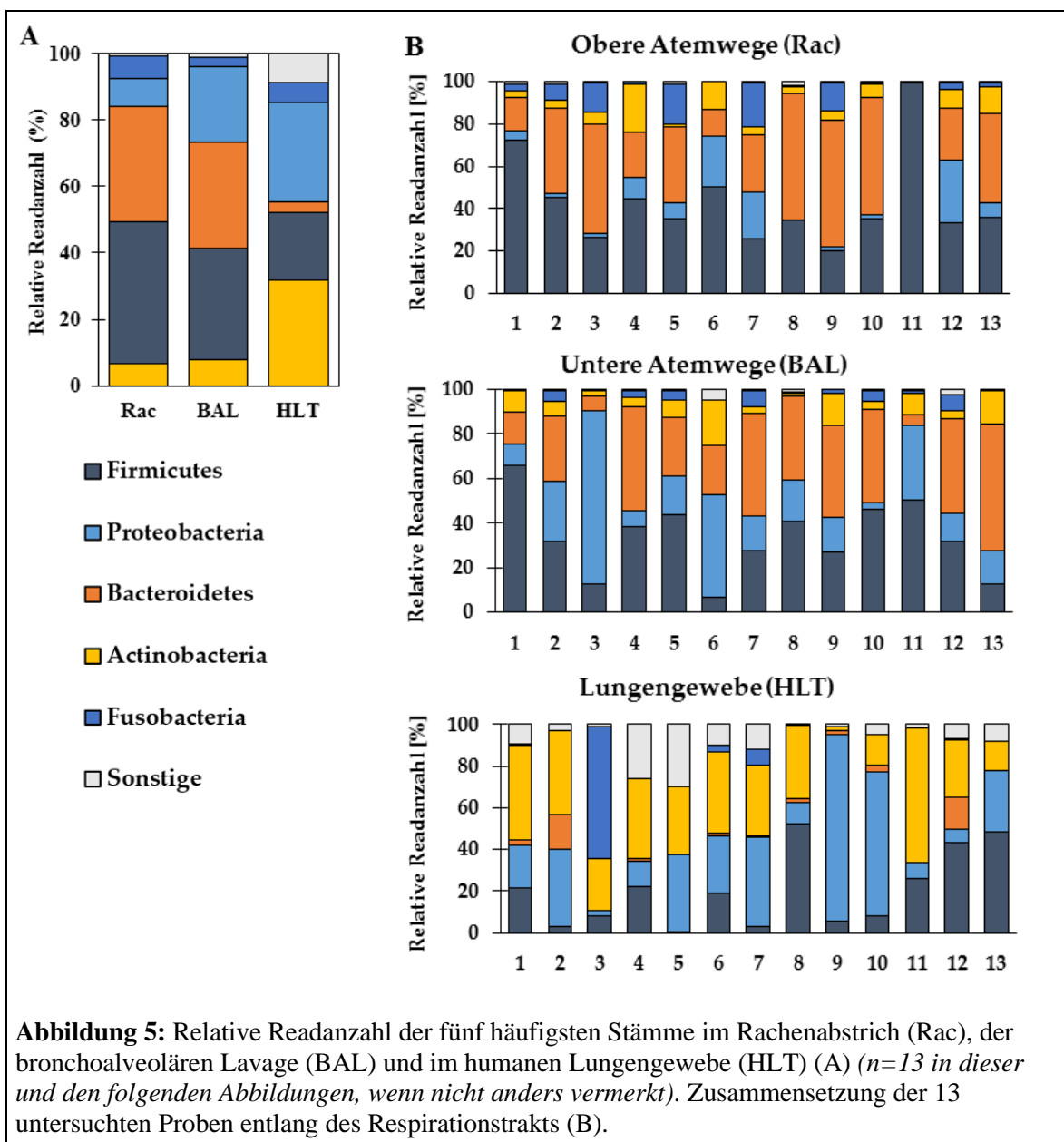
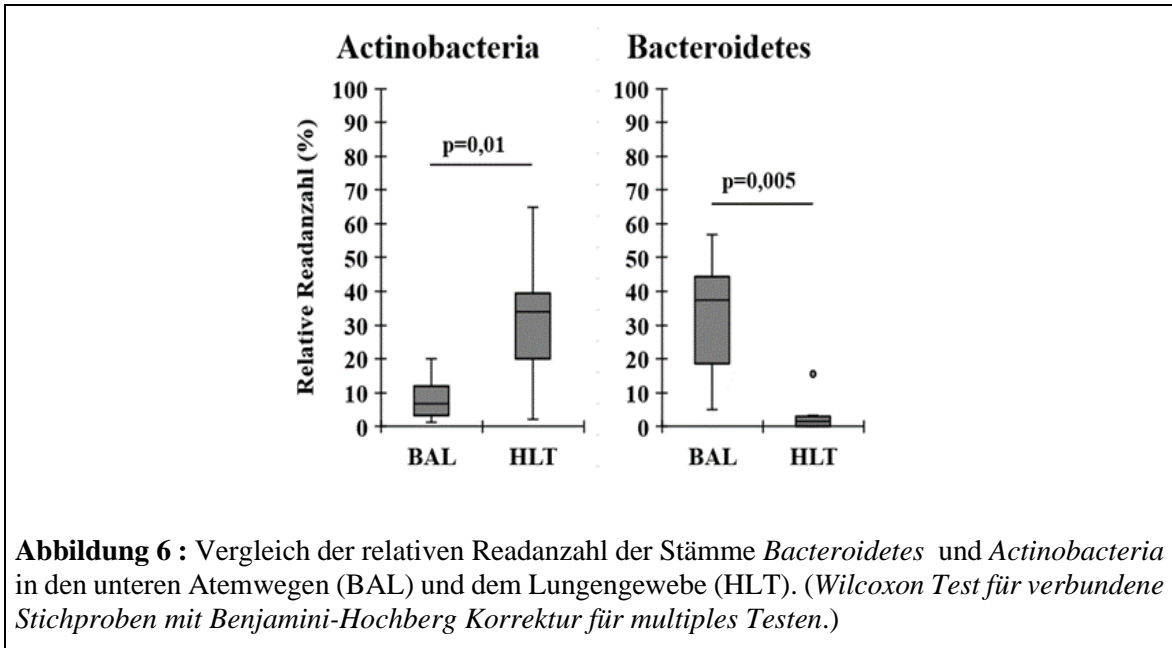


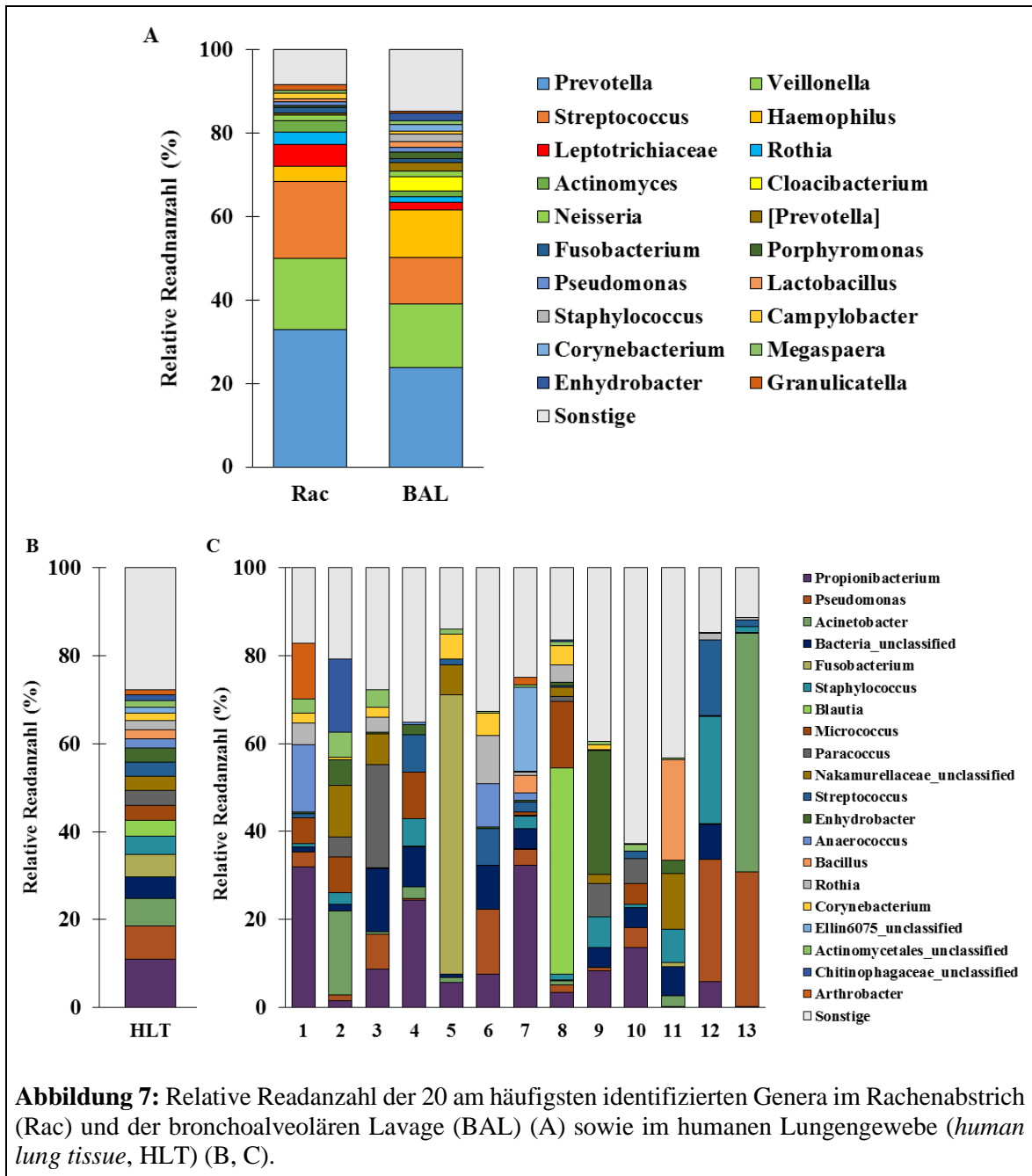
Abbildung 5: Relative Readanzahl der fünf häufigsten Stämme im Rachenabstrich (Rac), der bronchoalveolären Lavage (BAL) und im humanen Lungengewebe (HLT) (A) ($n=13$ in dieser und den folgenden Abbildungen, wenn nicht anders vermerkt). Zusammensetzung der 13 untersuchten Proben entlang des Respirationstrakts (B).

Die fünf häufigsten Stämme zeigen in der BAL und im Rachenabstrich eine ähnliche Verteilung, während sich deren Zusammensetzung im Lungengewebe unterscheidet. Hier finden sich signifikant mehr *Actinobacteria* und signifikant weniger *Bacteroidetes* (Abb. 6).



Zur genaueren Untersuchung der mikrobiellen Zusammensetzung wurde anschließend die relative Readanzahl auf taxonomischer Ebene der Gattung (*Genus*) bestimmt. Die Verteilung zwischen Atemwegen und Lungengewebe zeigt Abbildung 7; die vergleichende Analyse zwischen oberen und unteren Atemwegen im Gesamtkollektiv erfolgt in der Arbeit von Andreas Möllering und soll hier nicht weiter betrachtet werden.

Die Zusammensetzung im Lungengewebe unterscheidet sich von den Atemwegen in der relativen Abundanz gemeinsamer Taxa und im Auftreten neuer Taxa im Lungengewebe. Im Einzelnen handelt es sich hierbei um die Genera *Prevotella*, *Veillonella*, *Streptococcus* und *Haemophilus*, welche sich signifikant häufiger in den unteren Atemwegen finden, während *Pseudomonas* und *Propionibacterium* signifikant häufiger im Lungengewebe nachzuweisen sind (Abb. 8).



Für die Atemwege und das Lungengewebe ließen sich jeweils drei *Core*-Taxa abgrenzen. Als *Core*-Taxa wurden OTUs bezeichnet, die in über 90% (BAL) beziehungsweise in über 60% (HLT) der untersuchten Proben mit einer relativen Readanzahl von über 1% vorkamen. Hierzu zählen im Rachenabstrich und der BAL *Prevotella*, *Veillonella* und *Streptococcus* und im Lungengewebe *Propionibacterium*, *Pseudomonas* sowie *Staphylococcus* (Tab.12).

Tabelle 12: Core-Taxa in der BAL (Auftreten in > 90% der Proben mit einer relativen Häufigkeit > 1%) und im HLT (Auftreten in > 60% mit einer relativen Häufigkeit > 1%) auf Ebene der Gattung (*Genus*).

Rachenabstrich	BAL	HLT
Prevotella	Prevotella	Propionibacterium
Veillonella	Veillonella	Pseudomonas
Streptococcus	Streptococcus	Staphylococcus

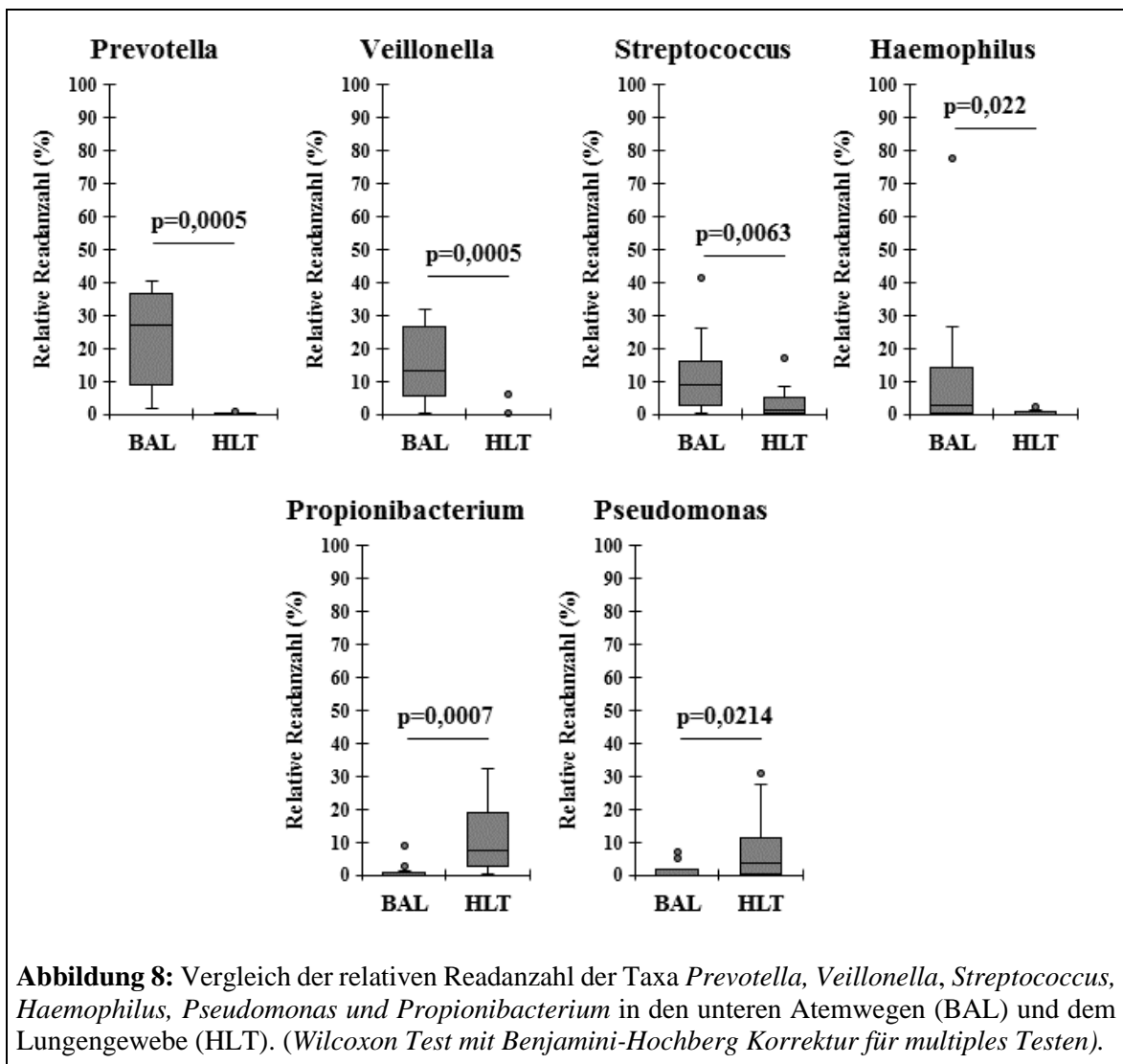


Abbildung 8: Vergleich der relativen Readanzahl der Taxa *Prevotella*, *Veillonella*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Pseudomonas* und *Propionibacterium* in den unteren Atemwegen (BAL) und dem Lungengewebe (HLT). (Wilcoxon Test mit Benjamini-Hochberg Korrektur für multiples Testen).

3.3. α -Diversität in den Atemwegen und dem Lungengewebe

Zur Analyse der mikrobiellen Vielfalt innerhalb der Atemwege und dem Lungengewebe wurde zunächst die α -Diversität in den einzelnen Proben bestimmt. Dazu wurden die Anzahl (*Richness*) und Verteilung (*Evenness*) der OTUs sowie der *Shannon-* und *Simpson-Diversitäts-Index* berechnet.

Hier zeigte sich, dass sich das Mikrobiom des Lungengewebes hinsichtlich der α -Diversität nicht von den unteren Atemwegen unterscheidet (Abb. 9).

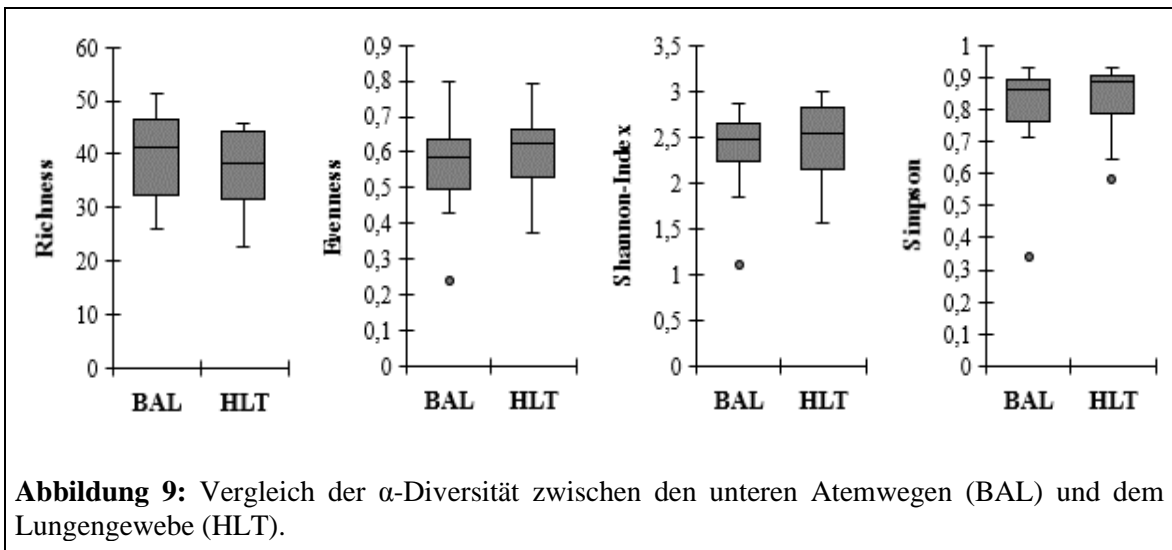


Abbildung 9: Vergleich der α -Diversität zwischen den unteren Atemwegen (BAL) und dem Lungengewebe (HLT).

3.4. Die Ungleichheit zwischen den Atemwegen und dem Lungengewebe

Durch Berechnung der β -Diversität anhand des Bray-Curtis-Index konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der mikrobiellen Zusammensetzung in den Atemwegen und dem Lungengewebe gezeigt werden.

Mittels Hauptkoordinatenanalyse wurden diese Ergebnisse graphisch dargestellt (Abb. 10).

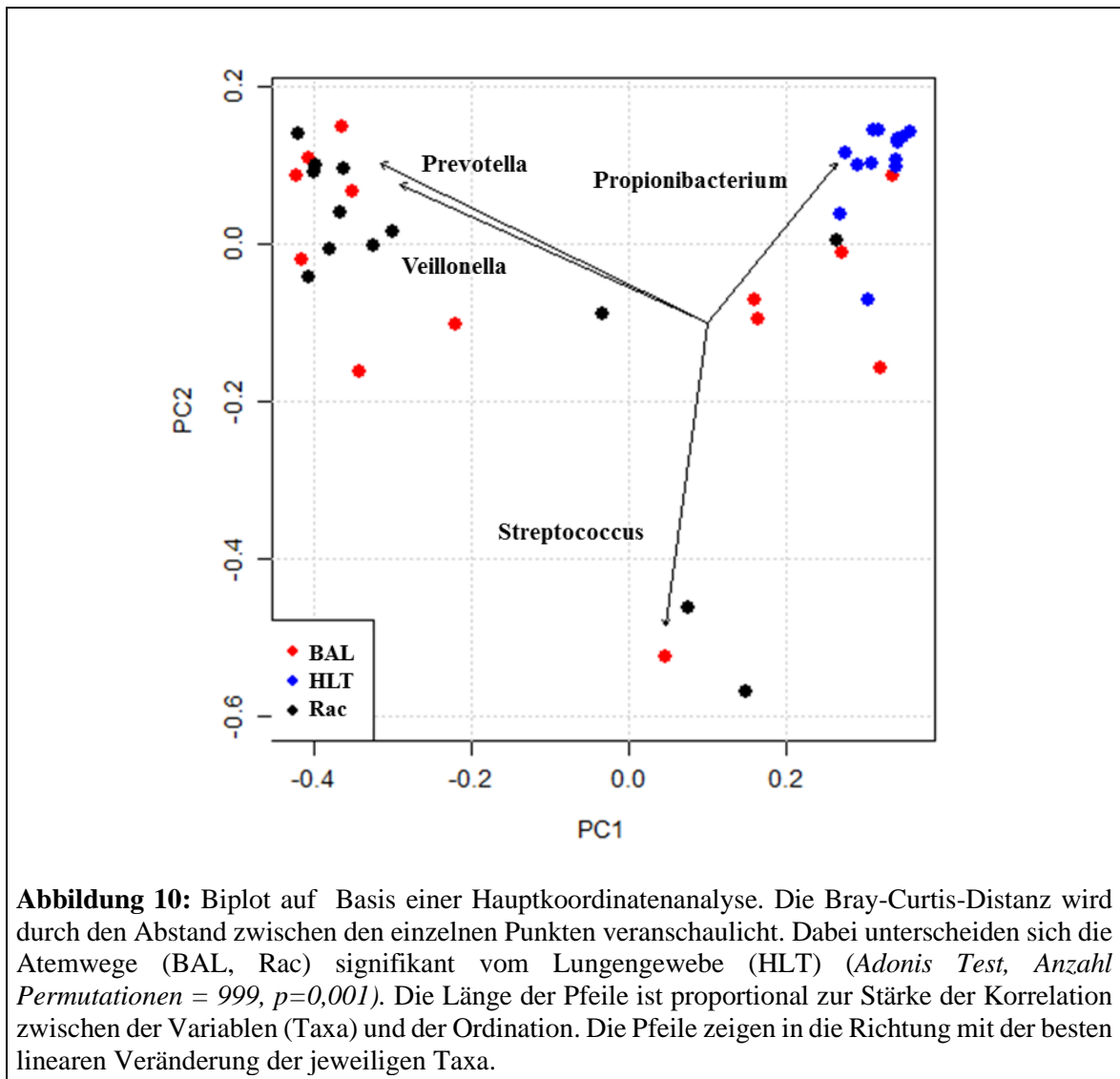
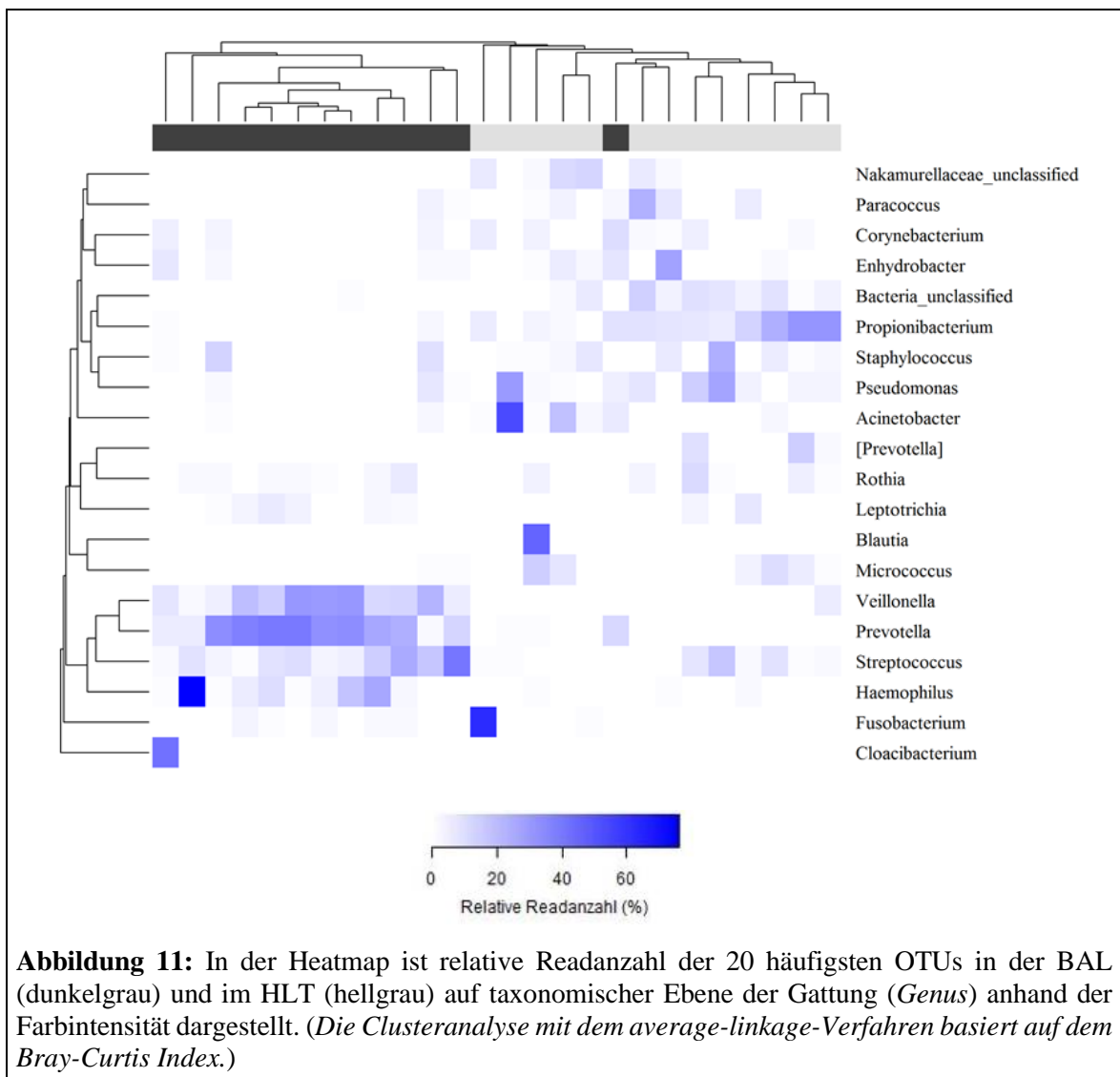


Abbildung 10: Biplot auf Basis einer Hauptkoordinatenanalyse. Die Bray-Curtis-Distanz wird durch den Abstand zwischen den einzelnen Punkten veranschaulicht. Dabei unterscheiden sich die Atemwege (BAL, Rac) signifikant vom Lungengewebe (HLT) (*Adonis Test, Anzahl Permutationen = 999, $p=0,001$*). Die Länge der Pfeile ist proportional zur Stärke der Korrelation zwischen der Variablen (Taxa) und der Ordination. Die Pfeile zeigen in die Richtung mit der besten linearen Veränderung der jeweiligen Taxa.

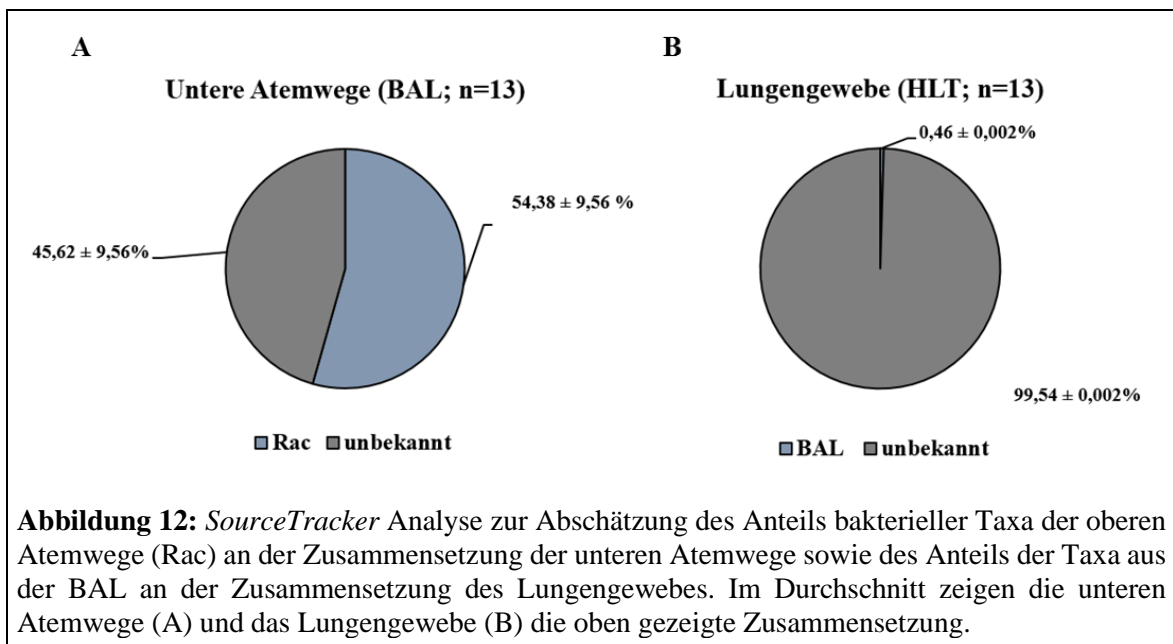
Zur Visualisierung der Zusammensetzung in den unteren Atemwegen und dem Lungengewebe erfolgte anschließend die Erstellung einer *Heatmap*, in der die relative Readanzahl der häufigsten 20 OTUs anhand ihrer Farbintensität dargestellt wird. Eine hierarchische Clusteranalyse zeigt eine Differenzierung der BAL-Proben von den HLT-Proben (Abb. 11).



3.5. Die Herkunft bakterieller Taxa der unteren Atemwege und des Lungengewebes

Um die Herkunft der Zusammensetzung der unteren Atemwege und des Lungengewebes zu differenzieren, wurde im nächsten Schritt eine *SourceTracker* Analyse durchgeführt.

Es zeigte sich, dass über die Hälfte (54%) der Zusammensetzung des Mikrobioms der unteren Atemwege durch Taxa aus dem Rachenraum repräsentiert werden, während nur ein sehr geringer Anteil (0,46%) der Taxa des Lungengewebes von den Taxa der unteren Atemwege abstammt. Der überwiegende Teil der Zusammensetzung des Lungengewebes kann nicht durch Migration von Taxa aus den der oberen oder unteren Atemwege erklärt werden. (Abb. 12).



3.6. Zytokin-Expression im humanen Lungengewebe

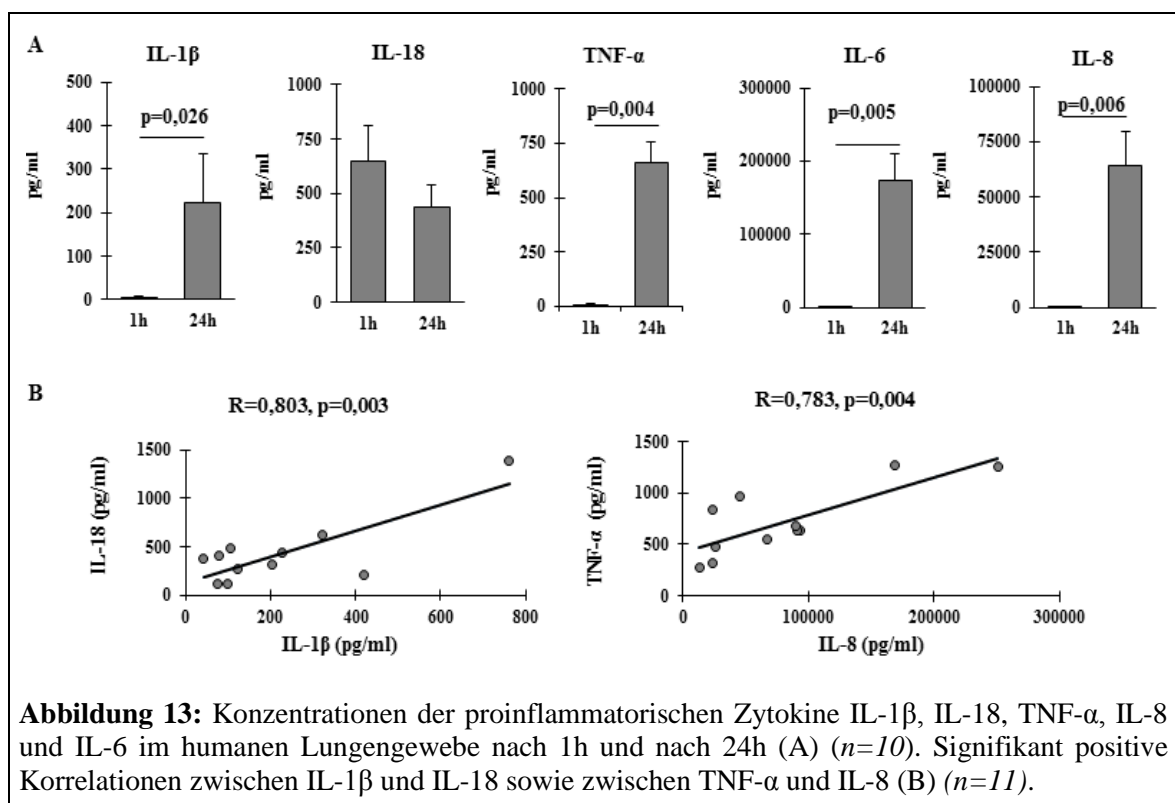
Um die *ex-vivo* Inflammation im humanen Lungengewebe zu untersuchen, wurden quantitative Zytokinbestimmungen mittels Partikel-Immunoassays und ELISA durchgeführt. Es wurden jeweils die basalen Konzentrationen nach 1h Inkubation sowie die Freisetzung nach 24h Inkubation der Lungengewebsproben analysiert (s. Vorversuche). Für die Auswertung erfolgte die Unterteilung der untersuchten Zytokine in drei verschiedene Gruppen: Proinflammation, Antiinflammation und Wachstumsfaktoren.

Proinflammation (IL-1 β , IL-18, TNF- α , IL-6, IL-8)

Bei den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β , TNF- α , IL-6 und IL-8 zeigten sich nach 1h Inkubation jeweils geringe basale Konzentrationen und ein signifikanter Konzentrationsanstieg nach 24h. Dabei wiesen IL-6 und IL-8 im Vergleich deutlich höhere Konzentrationen als IL-1 β , TNF- α und IL-18 auf.

Bei dem konstitutiv exprimierten IL-18 konnten hohe basale Konzentrationen nach 1h und ein Konzentrationsabfall nach 24h beobachtet werden (Abb. 13A).

Zwischen den inflammasomabhängigen Zytokinen IL-1 β und IL-18 sowie dem Tumornekrosefaktor TNF- α und IL-8 zeigte sich nach 24h Inkubation jeweils eine signifikant positive Korrelation (Abb. 13B).



Antiinflammation (IL-10)

Zur Abschätzung der antiinflammatorischen Reaktion im Lungengewebe wurde die Konzentration des Interleukins IL-10 bestimmt. Hier zeigten sich nach 24h ein signifikanter Konzentrationsanstieg im Vergleich zur basalen Konzentration sowie eine signifikant positive Korrelation mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF- α (Abb. 14).

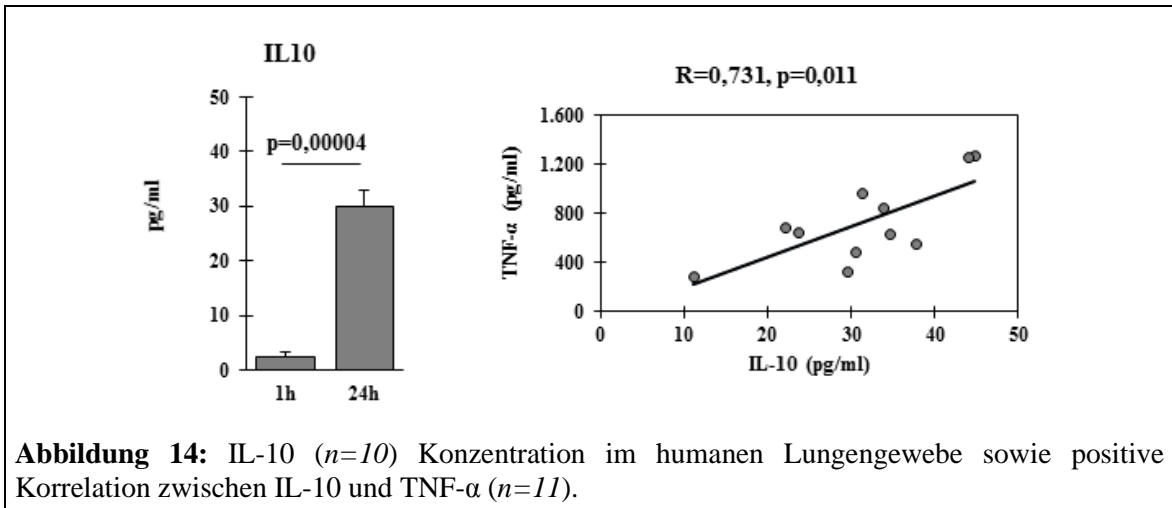


Abbildung 14: IL-10 ($n=10$) Konzentration im humanen Lungengewebe sowie positive Korrelation zwischen IL-10 und TNF- α ($n=11$).

Wachstumsfaktoren (G-CSF, GM-CSF)

Die koloniestimulierenden Faktoren G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*) und GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating factor*) zeigten nach 24h ebenfalls einen signifikanten Anstieg der Konzentration. Dabei zeigte G-CSF im Vergleich zu GM-CSF nach 24h einen höheren Anstieg (Abb. 15).

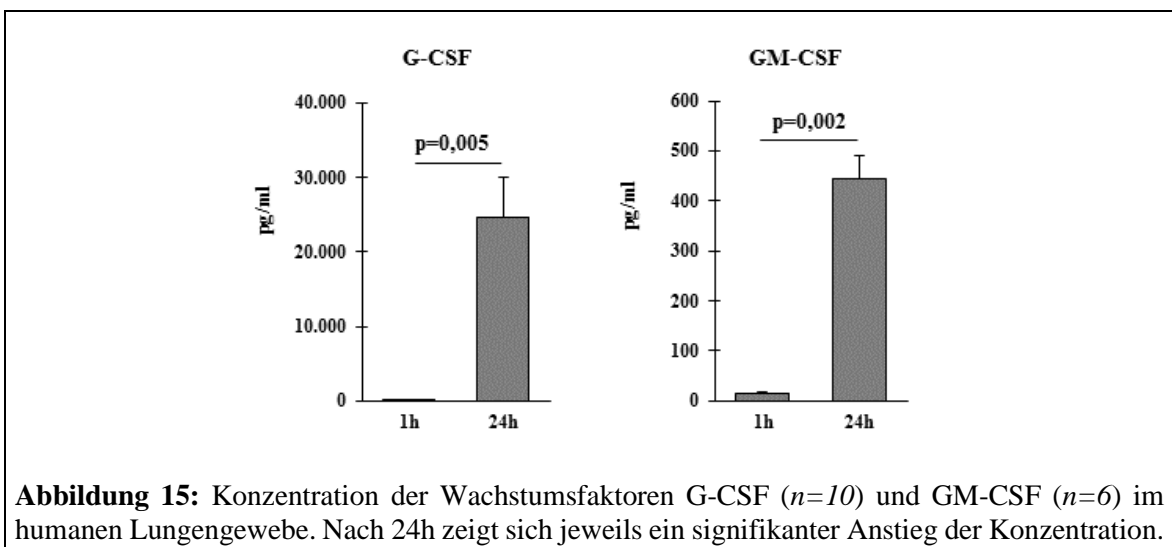


Abbildung 15: Konzentration der Wachstumsfaktoren G-CSF ($n=10$) und GM-CSF ($n=6$) im humanen Lungengewebe. Nach 24h zeigt sich jeweils ein signifikanter Anstieg der Konzentration.

3.7. Die Bedeutung lungenpathogener Taxa für das Mikrobiom und die Inflammation im Lungengewebe

Die Untersuchung der relativen Readanzahlen der beiden COPD-assoziierten Erreger *Haemophilus* und *Pseudomonas* konnte bereits zeigen, dass *Haemophilus* signifikant häufiger in der BAL und *Pseudomonas* signifikant häufiger im HLT zu finden war (Abb. 8). Im Hinblick auf die Inflammation im Lungengewebe wurde eine positive Korrelation zwischen *Haemophilus influenzae* und dem proinflammatorischen Zytokin TNF- α beobachtet, zwischen *Pseudomonas* und TNF- α zeigte sich hingegen eine negative Korrelation (Tab. 12).

Tabelle 12: Signifikante Korrelation zwischen dem proinflammatorischen Zytokin TNF- α und *Haemophilus influenzae* und *Pseudomonas* im Lungengewebe (- negative Korrelation)

TNF- α	Korrelationskoeffizient (Spearman)	p-Wert	n
<i>Haemophilus influenzae</i>	0,610	0,046	11
<i>Pseudomonas</i>	-0,827	0,002	11

3.8. Proinflammatorisches Zytokinprofil und Diversität in Abhängigkeit einer stattgehabten Antibiotikatherapie

In einer hierarchischen Clusteranalyse konnte das Kollektiv anhand der Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18 und TNF- α nach 24h in zwei natürliche Gruppen eingeteilt werden (Abb. 16).

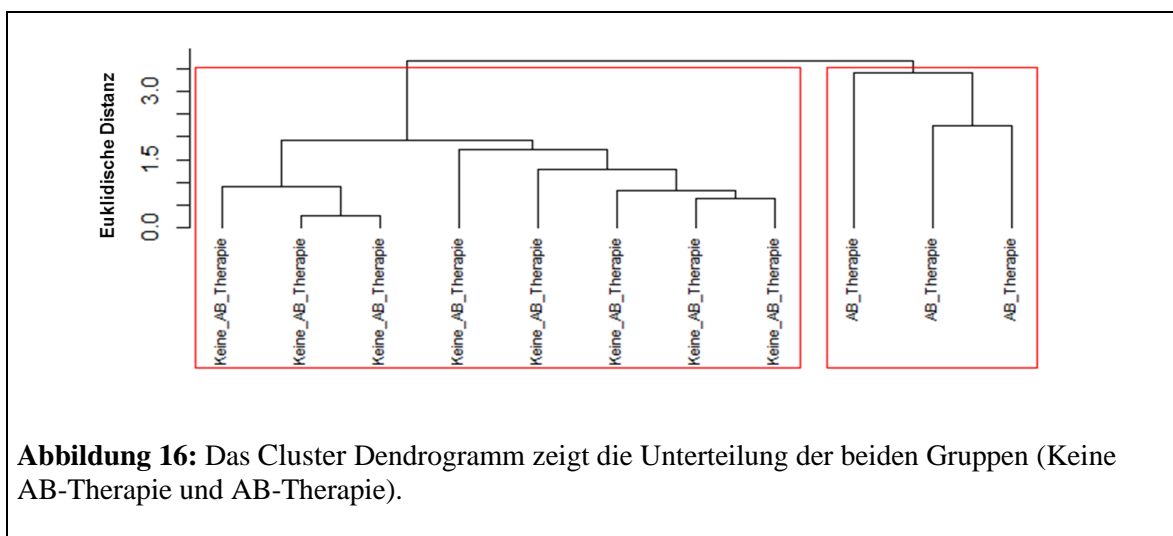


Abbildung 16: Das Cluster Dendrogramm zeigt die Unterteilung der beiden Gruppen (Keine AB-Therapie und AB-Therapie).

Diese beiden Gruppen unterscheiden sich im Merkmal einer vorangegangenen Antibiotika-Therapie, während das Vorliegen einer COPD, der Raucherstatus sowie eine Steroidtherapie kein differenzierendes Merkmal ergaben. Dabei zeichnete sich die Gruppe, die in den letzten 90 Tagen eine Antibiotikatherapie erhalten hatte, durch erhöhte Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine aus (Abb.17). Es zeigte sich außerdem, dass in dieser Gruppe der Shannon-Diversitäts-Index signifikant verringert ist ($2,64 \pm 0,13$ vs. $2,46 \pm 0,14$).

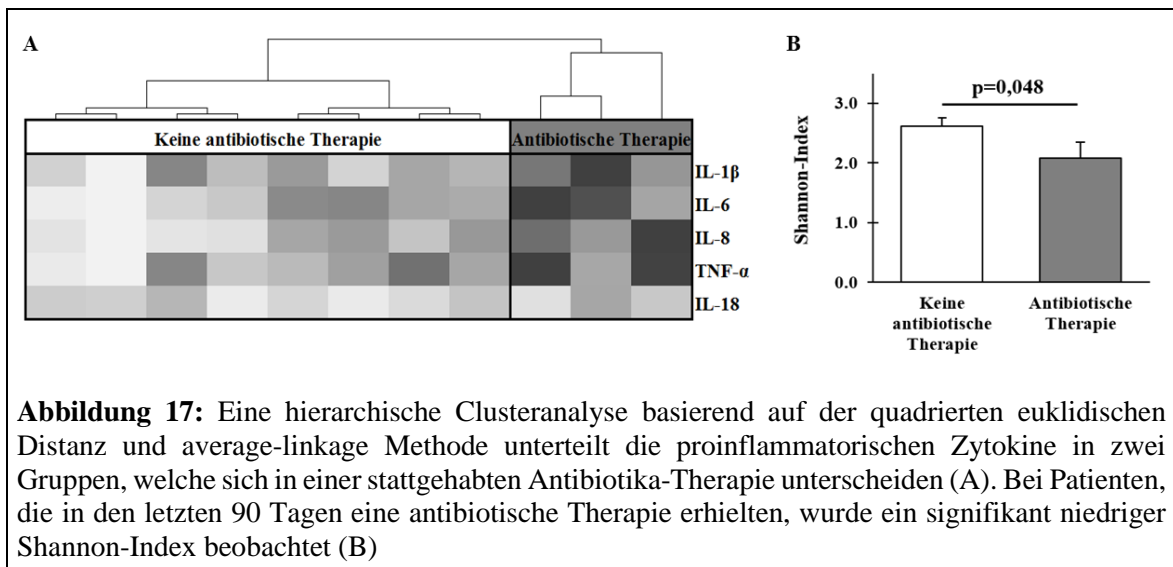


Abbildung 17: Eine hierarchische Clusteranalyse basierend auf der quadrierten euklidischen Distanz und average-linkage Methode unterteilt die proinflammatorischen Zytokine in zwei Gruppen, welche sich in einer stattgehabten Antibiotika-Therapie unterscheiden (A). Bei Patienten, die in den letzten 90 Tagen eine antibiotische Therapie erhielten, wurde ein signifikant niedriger Shannon-Index beobachtet (B)

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde erstmals das Mikrobiom in den Atemwegen und dem Lungengewebe vergleichend untersucht. Es zeigte sich eine schrittweise Abnahme der Menge an bakterieller Biomasse entlang der untersuchten Kompartimente. Während im Verlauf der Atemwege eine Kontinuität des Mikrobioms beobachtet wurde, ist die dortige Zusammensetzung jedoch nicht repräsentativ für das Mikrobiom des Lungengewebes, welches eine einzigartige Zusammensetzung durch das Auftreten von Taxa, welche nicht aus den Atemwegen entstammen, aufweist.

4.1. Die mikrobielle Zusammensetzung der Atemwege und des humanen Lungengewebes im Vergleich

Bakterielle DNA-Menge im Verlauf des Respirationstrakts

Frühere Arbeiten konnten bereits zeigen, dass sich in den unteren Atemwegen eine geringere Menge an Biomasse befindet als in den oberen Atemwegen [48, 108]. Dieser Befund konnte in dieser Arbeit reproduziert und darüber hinaus auf das Lungengewebe ausgeweitet werden, wo eine deutlich geringere Menge an bakterieller DNA als in den Atemwegen zu finden war. Bislang erfolgte eine Quantifizierung der bakteriellen DNA-Menge jedoch nur in wenigen Arbeiten, welche das Mikrobiom des Lungengewebes untersuchten [40, 43]. Während *Sze et al.* mit etwa 10-100 bakteriellen Zellen pro 1000 humanen Zellen eine ähnliche Menge bakterieller Biomasse im Lungengewebe nachweisen konnte [40], gelang es Pragman et al. nicht, die unteren Atemwege und das Lungengewebe anhand der bakteriellen DNA-Menge zu differenzieren: die Autoren fanden eine ähnliche Menge bakterieller DNA in beiden Kompartimenten [43]. Dieses Ergebnis führen wir auf die von Pragman et al. gewählte Art der Probenentnahme zurück. Nach der Lungenresektion im Rahmen einer onkologischen Resektion bei Lungenkarzinom erfolgte in der genannten Arbeit postoperativ eine Abstrichentnahme aus den Hauptbronchien sowie nach entsprechendem Zuschnitt ein Abstrich von der Alveolaroberfläche von makroskopisch tumorfreiem Gewebe [43]. Im Vergleich dazu wird in dieser Arbeit durch die bronchoalveoläre Lavage, durch Instillation und Aspiration von etwa 20 ml Flüssigkeit, eine repräsentative Menge der *epithelial lining fluid* aus den peripheren Atemwegen und dem alveolaren Kompartiment gewonnen. Daraus resultiert mit hoher Wahrscheinlichkeit eine größere Menge bakterieller DNA als durch die Abstrichentnahme, welche an den Hauptbronchien auf eine geringe Fläche lokalisiert ist und

zudem weniger standardisiert erfolgt. Daher scheint die bakterielle DNA- Menge bei Pragman et al. in den unteren Atemwegen unterrepräsentiert zu sein. Eine ähnliche Abstrichentnahme der unteren Atemwege wurde bislang in keiner anderen Arbeit, welche dieses Kompartiment untersucht, verwendet. Der Vergleich verschiedener Probenmaterialien (Abstrich, BAL, Lungengewebe) stellt auch in dieser Arbeit eine Limitation dar. Um diesem Problem bestmöglich zu begegnen, quantifizierten wir die Menge bakterieller Biomasse nicht nur absolut, sondern auch in Relation zur humanen 18S DNA. Beide Methoden zeigen eine kontinuierliche Abnahme der bakteriellen Biomasse entlang des Respirationstrakts.

Im Gegensatz zum Gastrointestinaltrakt, welcher etwa 10-100 Bakterien pro humaner Zelle beherbergt, handelt es sich bei der Lunge jedoch um ein Kompartiment mit sehr geringer Biomasse. Salter et al. konnten zeigen, dass vor allem bei Proben aus Kompartimenten mit geringer Biomasse eine Kontamination während der DNA-Extraktion durch Kit Reagenzien die Ergebnisse der Mikrobiomanalyse gravierend beeinflussen kann und eine Unterscheidung zwischen echten Taxa und kontaminierenden Taxa erschwert [27].

Da bei der Mikrobiomuntersuchung in solchen Kompartimenten eine Kontamination während der Probengewinnung und Probenverarbeitung unvermeidlich ist, orientierten wir uns an in der aktuellen Literatur empfohlenen aktuellen Standards zum Umgang mit diesem Problem [12]. Die während der DNA-Extraktion mitgeführten Isolationskontrollen wurden für eine anschließende Dekontamination des Datensets verwendet und ebenfalls mittels qPCR quantifiziert. Aufgrund der deutlich geringeren Menge bakterieller Zellen in den Negativkontrollen im Vergleich zu den Lungengewebsproben (etwa zwei \log^{10}) gehen wir nicht von einem relevanten Einfluss der Kontamination als Erklärung unserer Ergebnisse aus.

Trotz der sehr geringen Menge an Biomasse im Lungengewebe ergeben aktuelle Studien Hinweise, dass die dort gefundenen Taxa, welche bislang häufig als kommensal eingeschätzt werden, klinisch relevant werden können. So wird *Propionibacterium acnes* mit der Ausbildung von Granulomen bei der Sarkoidose assoziiert [109-111] und konnte dabei nicht nur aus dem Lungengewebe von Patienten mit Sarkoidose, sondern auch bei „Lungengesunden“ sowohl kulturell angezüchtet als auch mittels kulturunabhängiger Methoden identifiziert werden [111]. Da *P. acnes* auch in unserer Arbeit als Core-Taxon im Lungengewebe identifiziert wurde, nicht jedoch in den Atemwegen auftrat, sprechen diese

Ergebnisse dafür, dass die quantitativ sehr spärliche Flora in der humanen Lunge trotzdem klinische Relevanz erlangen kann.

Andere Autoren beobachteten zuletzt ein häufigeres Auftreten von *Propionibacterium* im Lungengewebe bei Patienten mit malignen Lungentumoren und hier speziell beim Adenokarzinom [91]. Die geringe Anzahl an Adenokarzinomen (n=4) im untersuchten Kollektiv lässt anhand unserer keine Aussage zu dieser Assoziation zu.

Verantwortlich für die geringe Bakterienmenge in der Lunge sind am ehesten distinkte, vom bronchialen Milieu abweichende Wachstumsbedingungen im alveolären Kompartiment, welche ein bakterielles Wachstum für die meisten respiratorischen Erreger einschränken oder ganz verhindern. Im Vergleich zu den Atemwegen bilden die Alveolen ein Milieu, welches durch hoch spezialisierte Epithel- und Immunzellen, einen hohen Surfactantgehalt sowie das Fehlen von Mukus charakterisiert wird [112, 113]. Im Bronchialsystem herrscht im Gegensatz zum alveolaren Kompartiment ein bidirektionaler Fluss, inhalierte oder aspirierte Partikel werden unter physiologischen Bedingungen durch Hustenstoß und die mukoziliäre Clearance weitgehend eliminiert. Dieser Transport wird durch die dem Epithel aufliegende Mukusschicht erleichtert, in der sich aspirierte Mikroorganismen häufig verfangen. Im nährstoffreichen Mukus können sich andererseits anoxische Nischen bilden [114], welche die Persistenz mikroaerophiler und anaerober Keime fördern. Sekretorisches Immunglobulin A und Defensine spielen als Schleimhaut-spezifische Mechanismen der Immunität eine wichtige Rolle [115]. Dagegen ist das alveoläre Kompartiment durch das Fehlen einer Mukusschicht charakterisiert; durch die lokale Surfactantproduktion wird die für das Offenhalten der Alveolen notwendige Oberflächenspannung erzeugt. Die Surfactant Proteine A und D erleichtern die Phagozytose pathogener Erreger wie Pneumokokken durch Oponisierung [116] und zeigen darüber hinaus direkte antimikrobielle Effekte gegen gram-negative Bakterien [59]. Alveolarmakrophagen stellen als residente Immunzellen die erste Linie der Erregerabwehr im Alveolartrakt. Um unnötige Schäden vom gasaustauschenden Gewebe abzuhalten, verfügen sie über ein reiches Repertoire zur Orchestrierung einer fein abgestuften Immunantwort auf Kontakt mit Fremdanitigenen [117]. Dieses besteht neben der basalen Funktion der Phagozytose bei ausschließlichem Kontakt gegen Fremdanitigene häufig in einer Downregulation der angeborener und spezifischer Immunreaktionen und reicht ansonsten von einer minimalen lokalen Antwort auf Kontakt mit avitalen oder wenig virulenten Bakterien bis zu einer massiven Response unter Einbeziehung systemischer Immunmechanismen bei Invasion pathogener Mikroorganismen [118].

Im Hinblick auf die tiefgreifenden Differenzen der Wirts-Pathogen Interaktion in den beiden respiratorischen Kompartimenten erscheint eine entsprechend unterschiedliche Zusammensetzung des lokalen Mikrobioms nicht überraschend. Eine genauere Analyse der Bedeutung einzelner Faktoren steht aus und setzt einen umfassenderen metagenomischen Ansatz voraus.

Das Mikrobiom der unteren Atemwege

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass es in den unteren Atemwegen von Rauchern mit und ohne COPD ein Mikrobiom gibt, welches sich in der Zusammensetzung nicht von den oberen Atemwegen unterscheidet und durch die Core Taxa *Prevotella*, *Veillonella* und *Streptococcus* charakterisiert werden kann.

Damit konnte diese Arbeit das Ergebnis von ebenfalls an den Atemwegen durchgeführten Studien reproduzieren [47, 48, 51, 119]. Zwar wurde ein relativ kleines Kollektiv (n=13) untersucht, jedoch konnten auch in einer größeren Studie von Morris et al. an insgesamt 64 Rauchern und Nichtrauchern diese drei o.g. Core Taxa am häufigsten in den Atemwegen nachgewiesen werden [47].

Erschwert ist die Vergleichbarkeit mit anderen Arbeiten zum Mikrobiom der Atemwege aufgrund fehlender Standards der Probenentnahme sowie unterschiedlicher Patientenkollektive, was häufig für eine Diskrepanz der Ergebnisse verantwortlich ist.

Zum Beispiel zählten Hilty et al. neben den o.g. Taxa außerdem *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Haemophilus* und *Neisseria* zu den am häufigsten in den oberen und unteren Atemwegen nachgewiesenen Taxa [39]. *Corynebacterium* und *Staphylococcus* wurden in dieser Arbeit nur mit sehr geringer relativer Häufigkeit in den Atemwegen nachgewiesen. Dieses Ergebnis beruht auf den von Hilty et al. neben Rachenabstrichen und bronchialen Bürstenabstrichen ebenfalls untersuchten Nasenabstrichen. Im nasalen Kompartiment machen *Corynebacterium* und *Staphylococcus* den größten Anteil aus und erklären so die Häufigkeit in der Gesamtzusammensetzung der Atemwege im Vergleich zu dieser Arbeit, in der das nasale Kompartiment nicht berücksichtigt wurde.

Interessanterweise konnte Hilty et al. außerdem ein signifikant häufigeres Auftreten von *Haemophilus* in den unteren Atemwegen nachweisen, während *Haemophilus* in dieser Arbeit zwar auch häufiger in den unteren Atemwegen zu finden, das Ergebnis jedoch im Vergleich zu den oberen Atemwegen nicht signifikant war.

Dies führen wir auf das untersuchte Kollektiv zurück. Hilty et al. untersuchte neben 8 Patienten ohne Lungenerkrankung 5 COPD-Patienten und 11 Patienten mit Asthma

bronchiale, sodass das Kollektiv im Vergleich zu dieser Arbeit aus einem größeren Anteil an Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen bestand. Dass dies relevant ist, zeigte das Ergebnis, dass *Haemophilus* im Vergleich zum Kontrollkollektiv häufiger bei Patienten mit Asthma und COPD in den unteren Atemwegen zu finden war [39].

Es konnte bereits gezeigt werden, dass *Haemophilus influenzae* (NTHi) eine bedeutende pathogene Spezies dieser Gattung ist und nicht nur für Exazerbationen der chronischen Lungenerkrankungen Asthma und COPD verantwortlich, sondern auch mit einer chronischen Infektion der unteren Atemwege von Erkrankten assoziiert ist [120, 121]. Da in dieser Arbeit nur ein Drittel des Kollektivs von COPD-Patienten gebildet wird, konnte im Vergleich zu den oberen Atemwegen keine signifikante Häufung von *Haemophilus* in den unteren Atemwegen nachgewiesen werden.

Erb-Downward et al. untersuchten das Mikrobiom der unteren Atemwege anhand von bronchoalveolären Lavagen von Nichtrauchern und Rauchern mit und ohne COPD und konnten *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Prevotella* und *Fusobacterium* als Core-Taxa definieren. *Pseudomonas* wurde weder in dieser noch in anderen Arbeiten in dieser Häufigkeit in den unteren Atemwegen nachgewiesen. Vor allem in fortgeschrittenen Stadien der COPD wird ein vermehrtes Auftreten von *Pseudomonas* beobachtet. Die *Pseudomonas*infektion bei struktureller Lungenerkrankung ist durch die Fähigkeit zur Bildung von Biofilmen charakterisiert und gewinnt mit Fortschreiten der Erkrankung und beeinträchtigtem Immunsystem an Bedeutung [122].

Während die meisten Arbeiten häufig auftretende Taxa im jeweiligen Kompartiment des untersuchten Kollektivs identifizieren konnten, gelang es Pragman et al. [46] trotz eines relativ großen Kollektivs (n=32) nicht, ein Core-Mikrobiom der unteren Atemwege zu definieren. Stattdessen beobachteten die Autoren ein Auftreten von vielen verschiedenen Taxa entlang der untersuchten Kompartimente, welche häufig bislang nicht mit den Atemwegen und der Lunge assoziiert wurden. Dies erklären wir zum einen durch die heterogene Zusammensetzung des untersuchten Kollektivs. Es bestand neben Patienten mit moderater (n=14) und schwerer (n=8) COPD auch aus einem Kontrollkollektiv (n=10) ohne Lungenfunktionseinschränkung, welches im Durchschnitt fast 30 Jahre jünger als die COPD-Patienten war. Zum anderen wurde in der Arbeit von Pragman et al. ein Teil der Patienten nasal und der andere Teil oral bronchoskopiert und anschließend die BAL-Flüssigkeit für die weiteren Analysen verwendet. In dieser Arbeit wurde hingegen ausschließlich der orale Weg gewählt und anschließend, wie auch in anderen Studien, welche mittels BAL die unteren Atemwegen untersuchten [38, 48], die BAL-Flüssigkeit

zentrifugiert und die DNA aus dem Pellet extrahiert. Der nicht einheitliche Zugangsweg (oral vs. nasal) sowie ein wahrscheinlich erhöhtes Hintergrundrauschen durch nicht-zelluläre Bestandteile aufgrund der fehlenden Zentrifugation (und damit Beeinträchtigung der Qualität der DNA-Extraktion) könnte die diskrepanten Ergebnisse erklären. Darüber hinaus wurde nur 0,5 ml der gesamten BAL-Flüssigkeit untersucht, was es bei bereits niedrigem Biomaterial der Probe wahrscheinlich macht, dass der Anteil der sequenzierten Kontamination der Kitreagenzien steigt und bakterielle DNA aus den Atemwegen übersehen wird. Einen Hinweis darauf geben von den Autoren identifizierte Umweltkeime wie *Nocardioides*, *Humicoccus* und *Balneimonas*, sowie weitere in bislang durchgeführten Arbeiten nicht mit der Lunge und den unteren Atemwege assoziierte Taxa wie *Jonquetella*, *Kingella*, *Citrobacter*, *Dysgonomonas* und *Phocaeicola* [46].

Zum Umgang mit dem Problem der Kontamination bei Mikrobiomstudien an Kompartimenten mit geringer Biomasse hat sich in den letzten Jahren ein Feld entwickelt, was Empfehlungen formuliert hat, an denen sich heutige Arbeiten orientieren sollten [12].

Anschließend wurde eine Source-Tracker Analyse zur Abschätzung des Anteils der Taxa aus den oberen Atemwegen („source“) an der Zusammensetzung der unteren Atemwegen („sink“) durchgeführt. Diese ergab, dass über 50% der mikrobiellen Zusammensetzung der unteren Atemwege durch Taxa der oberen Atemwege repräsentiert wird. Die Ähnlichkeit der oberen und unteren Atemwege führte zu der Vermutung, dass es durch die Passage der oberen Atemwege bei der bronchoskopischen Probenentnahme aus den unteren Atemwegen zu einer Verschleppung von Bakterien der Mund- und Rachenflora kommt. Um dieses Risiko zu minimieren, wurden in dieser Arbeit angelehnt an die Methode von Charlson et al. [48] zwei Bronchoskope verwendet.

Wahrscheinlicher scheint, dass eine Mikroaspiration aus den oberen Atemwegen, welche in subklinischem Ausmaß auch bei Gesunden beobachtet wird, für die Zusammensetzung der unteren Atemwege eine entscheidende Rolle spielt und die beobachtete Ähnlichkeit erklärt [48, 53, 123, 124].

Dies wurde bereits im von Dickson et al. entworfenen Modell des „*adapted island model of lung biogeography*“ beschrieben, in dem die Mikroaspiration sowie die direkte mukosale Ausbreitung als wichtige Faktoren der Immigration bakterieller Taxa aus den oberen Atemwegen charakterisiert sind. Durch ein Gleichgewicht mit der Eliminierung (z.B. Husten, mukoziliäre Clearance und weitere Mechanismen der Immunabwehr) scheint eine transiente Flora in den Atemwegen zu entstehen [53, 55, 112].

Die mikrobielle Zusammensetzung im Lungengewebe

Trotz geringer Menge bakterieller DNA im Lungengewebe wurde anschließend die mikrobielle Zusammensetzung untersucht, um die mögliche Relevanz des Lungenmikrobioms für den Menschen abzuschätzen. Damit ist diese Arbeit eine der wenigen Studien, welche sich mit dem Mikrobiom des Lungengewebes beschäftigt [38, 40-44].

Die bislang so geringe Anzahl an Studien ist vor allem durch die schwierige Probengewinnung zu begründen. Um Lungengewebe zu untersuchen, ist eine operative Gewebeentnahme nötig, deren Indikation jedoch nur selten gestellt wird. So ist es nicht verwunderlich, dass bislang nur wenige Autoren Lungengewebe von mehr als dreißig Patienten untersuchen konnten [40, 41] und sich viele auf ein Kollektiv mit weniger als zehn Patienten beschränken [38, 42-44].

Dabei unterscheiden sich die untersuchten Patientenkollektive in ihrer Zusammensetzung deutlich. Bei den nach Lungentransplantation untersuchten Explantaten handelt es sich ausschließlich um Patienten in Endstadien von chronischen Lungenerkrankungen wie der COPD und der Cystischen Fibrose [38, 40, 42, 44]. In den Arbeiten, welche Lungengewebe im Rahmen einer operativen Tumoresektion untersuchten, handelte es sich im Gegensatz dazu meist ausschließlich um Raucher und Patienten mit COPD in milden bis moderaten Stadien, sowie vorliegender Tumorerkrankung in unterschiedlichen Stadien [40, 41, 43]. Auch in dieser Arbeit wurde das Lungengewebe im Rahmen einer operativen Tumoresektion gewonnen, weshalb dieses Kollektiv überwiegend von Tumorpatienten gebildet wird. Auch wenn es sich bei dem untersuchten Gewebe um tumorfreies Gewebe handelte, stellt sich die Frage, ob die Tumorerkrankung die Ergebnisse beeinflussen.

Dazu konnten in verschiedenen Arbeiten beim Vergleich von tumorfreiem Lungengewebe und Tumorgewebe charakteristische Mikrobiome beobachtet werden, welche mit einer Veränderung der Häufigkeit von *Proteobacteria*, *Actinobacteria* [41, 90] und/oder *Firmicutes* assoziiert werden [88, 90]. Dabei könnten die Unterschiede in der mikrobiellen Zusammensetzung mit den unterschiedlichen histologischen Subtypen begründet werden: zum Beispiel wurde bei Plattenepithelkarzinomen eine verminderte α -Diversität beobachtet [41]. Darüber hinaus zeigten sich hier häufiger Enterobacteriaceae, während bei Adenokarzinomen häufiger *Acinetobacter*, *Brevundimonas* und *Propionibacteria* im Tumorgewebe identifiziert wurden [91]. Aufgrund des kleinen Kollektivs können bezüglich der Tumorhistologie in dieser Arbeit jedoch wie bereits erwähnt keine Aussagen getroffen werden.

Erste Studien, welche die Interaktion zwischen Rauchen, Raucher-assoziierten TP53 Mutationen in pulmonalen Zellen und vermehrten Mikrobiota in dieser Umgebung untersuchten, ergeben Hinweise auf eine mögliche Rolle des Mikrobioms in der Karzinogenese [92].

Während für das Magenkarzinom bereits eine Assoziation mit *Helicobacter pylori* besteht [125], benötigt es noch weitere Forschungsarbeit um zu klären, ob das pulmonale Mikrobiom als Biomarker für die Entwicklung eines Lungenkarzinoms und somit als Screeningmarker klinische Relevanz gewinnen könnte.

Insgesamt ist es in der Lunge im Vergleich zu anderen Kompartimenten wie dem Gastrointestinaltrakt schwierig, ein gesundes „Kontrollkollektiv“ zu untersuchen, weshalb entweder auf Tumorpatienten oder Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen im Endstadium zurückgegriffen werden muss. In wenigen Fällen wurde Lungengewebe von Organspendern, dessen Gewebe sich als ungeeignet zur Transplantation erwies, untersucht. Doch auch dieses Gewebe kann nicht als „gesund“ betrachtet werden, da einer etwaigen Organspende häufig ein Polytrauma vorausgeht, in dessen Rahmen es regelmäßig zur Makroaspiration kommt.

In der bislang größten Studie untersuchten Yu et al. das Lungengewebe von 165 Tumorpatienten nach operativer Resektion und konnten auf taxonomischer Ebene der Phyla ebenfalls die Stämme *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* und *Actinobacteria* am häufigsten identifizieren [41]. Dabei konnte in dem untersuchten Kollektiv jedoch eine Dominanz der *Proteobacteria* mit einer relativen Häufigkeit von etwa 60% nachgewiesen werden, während diese in unserer Arbeit einen Anteil von etwa 30% an der Zusammensetzung ausmachen. Eine ähnliche Dominanz an *Proteobacteria* konnte bislang nur im Lungengewebe von COPD-Patienten im Endstadium beobachtet werden [38, 42].

Das in dieser Arbeit untersuchte Kollektiv besteht zu einem Drittel aus COPD-Patienten im GOLD-Stadium II-III. Der Anteil von COPD-Patienten an dem Kollektiv von Yu et al. liegt mit 45% etwas höher, Krankheitsstadium, Exazerbationen oder stattgehabte Antibiotikatherapien sind nicht bekannt. Auch wenn sich der Anteil der *Proteobacteria* in den untersuchten Subgruppen (COPD/keine COPD) nicht signifikant unterscheidet [41], kann das möglicherweise insgesamt kränkere Kollektiv Grund für den höheren *Proteobacteria* Anteil im Vergleich zu dieser Arbeit sein. Darüber hinaus zählen zu den von Yu et al. nachgewiesenen *Proteobacteria* neben *Pseudomonas* und *Acinetobacter*, welche auch in unserer Arbeit nachgewiesen werden konnten, außerdem *Ralstonia* und nicht weiter klassifizierbare Taxa der Familie *Comamonadaceae* und *Oxalobacteraceae*. Diese Taxa

fanden sich in unserer Arbeit nicht; ihr Vorkommen erklärt jedoch vermutlich den höheren *Proteobacteria*-Anteil in der Arbeit von Yu et al. Die Herkunft dieser Taxa und deren Bedeutung im Lungengewebe ist jedoch nicht bekannt. Ein intraindividueller Vergleich mit Proben aus den Atemwegen fand nicht statt. Auch eine Quantifizierung der bakteriellen DNA-Menge erfolgte nicht, sodass eine weitere Vergleichbarkeit mit dieser Arbeit kaum möglich ist.

In der Arbeit von Pragman et al. konnte die Gattung *Streptococcus* als das am häufigsten auftretende Taxon im Lungengewebe wie in den vergleichend untersuchten oberen und unteren Atemwegen detektiert werden [43]. Daneben wurden außerdem die Taxa *Corynebacterium*, *Alloiococcus*, *Prevotella* und *Veillonella* (in absteigender relativer Häufigkeit) in den mittels Abstrichen untersuchten nasalen, oralen, bronchialen und alveolären Kompartimenten nachgewiesen. Die Dominanz von *Streptococcus* konnte bislang allerdings weder in dieser noch in einer anderen Arbeit beobachtet werden.

Bei der 16S-rDNA-Amplikon Sequenzierung ist es bislang schwierig, eine verlässliche Speziesdifferenzierung zu erreichen. Nach DNA-Extraktion wird die DNA fragmentiert und anschließend eine variable Sequenz des bakteriellen 16Sr-RNA-Gens (z.B. V1-3 oder V3-V5) sequenziert. Folglich wird nicht das gesamte Gen sequenziert, da dies für die aktuellen Sequenzmethoden (z.B. Illumina) zu lang wäre. Darüber hinaus besitzen einige Bakterien eine sehr hohe Homologie des 16S-rRNA-Gens, was eine Speziesdifferenzierung nicht ermöglicht. Hierzu zählt unter anderem die Gattung *Streptococcus* [126].

Dass mit der von Pragman et al. verwendeten Abstrichentnahme auch weniger zell-assoziierte Bakterien nachgewiesen wurden, kann darüber hinaus Grund für die im Vergleich zu dieser Arbeit seltener in den unteren Atemwegen nachgewiesenen *Prevotella* und im Lungengewebe nachgewiesenen *Pseudomonas* sein. Dass dies relevant ist, konnten Dickson et al. zeigen. In ihrer Arbeit zum Mikrobiom der unteren Atemwege konnten die Autoren anhand von zellfreien BALs nachweisen, dass zell-assoziierte Bakterien wie Taxa der Gattung *Prevotella* und *Pseudomonas* einen großen Teil des respiratorischen Mikrobioms ausmachen [127]. Diese beiden Taxa zählen in dieser und anderen Arbeiten zu den Core-Taxa der Atemwege (*Prevotella*) und des Lungengewebes (*Pseudomonas*), konnten von Pragman et al. allerdings mit nur geringer Häufigkeit in den jeweiligen Kompartimenten nachgewiesen werden.

Die Herkunft des pulmonalen Mikrobioms

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass sich ein allerdings sehr spärliches pulmonales Mikrobiom nachweisen lässt. Um dessen Entstehung genauer zu charakterisieren, formulierten wir drei mögliche Hypothesen zum Ursprung dieses Mikrobioms:

1. Das Lungenmikrobiom entsteht durch Mikroaspiration bakterieller Taxa aus den oberen und unteren Atemwegen.
2. Beim Lungenmikrobiom handelt es sich um eine genuine Flora, die sich aus einer distinkten Population residenter Bakterien zusammensetzt, die an die lokal herrschenden Wachstumsbedingungen angepasst sind.
3. Das Lungenparenchym ist steril und die nachgewiesene Zusammensetzung entsteht durch eine Kontamination von „außen“.

Im Folgenden sollen diese Hypothesen anhand der weiteren Ergebnisse dieser Arbeit sowie auf dem Stand der aktuellen Literatur diskutiert werden.

Während diese Arbeit bereits zeigen konnte, dass das Mikrobiom der unteren Atemwege dem der oberen Atemwege ähnelt und wahrscheinlich zu einem Großteil durch Mikroaspiration entsteht, kann dieses Modell nicht auf das Mikrobiom des Lungengewebes übertragen werden. Das signifikant geringere Auftreten von *Veillonella*, *Prevotella* und *Streptococcus* im Lungengewebe als auch die hier signifikant häufiger nachweisbaren Taxa *Pseudomonas* und *Propionibacterium* verdeutlichen, dass das Lungengewebe nicht durch orale Taxa repräsentiert wird. Dieses Ergebnis wird durch die Source-Tracker-Analyse bekräftigt, welche zeigte, dass lediglich 5 % der mikrobiellen Zusammensetzung des Lungengewebes durch Taxa der unteren Atemwege repräsentiert wird.

In den bisher durchgeführten Mikrobiomstudien am Lungengewebe fehlt es meist an intraindividuellen Vergleichen des Gewebes mit den Atemwegen [38, 40, 42]. Stattdessen erfolgte von einigen Autoren der Vergleich der Daten des Lungengewebes von Tumorpatienten mit und ohne COPD mit der Datenbank des HMP. Dabei zeigten sie, dass sich das Lungengewebe in seiner Zusammensetzung von derjenigen in der Mundhöhle unterscheidet. Da jedoch kein direkter intraindividueller Vergleich erfolgte, könnte auch das Kollektiv selbst (welches beim HMP aus gesunden Probanden bestand) den Unterschied erklären, sodass die Ergebnisse keine verlässliche Aussage hierzu erlauben. Dies gilt ebenso

für die Arbeit von Erb-Downward et al., welche die Dominanz von *Pseudomonas* im Lungengewebe von Patienten mit COPD im Endstadium auch in den unteren Atemwegen anderer Patienten mit schwerer COPD fanden und somit eine Ähnlichkeit der beiden Kompartimente bei fortgeschrittener COPD postulierten. Da dies jedoch ein Einzelfallvergleich an einem insgesamt kleinen Kollektiv (Lungengewebe n=6, BAL n=14) war und ebenfalls kein intraindividueller Vergleich derselben Patienten vorliegt, sind auch diese Daten nicht verlässlich.

Bei dem bislang neben dieser Arbeit einzigem intraindividuellen Vergleich an einem kleineren Kollektiv (n=9) ähnelt sich die bronchiale und alveoläre Zusammensetzung desselben Patienten mehr als die beiden Kompartimente interindividuell, sodass diese Autoren zu dem Schluss kommen, dass das Mikrobiom der Lunge durch Aspiration oraler Taxa entsteht [43].

Grund für die Diskrepanz dieser Ergebnisse ist die bereits diskutierte Methodik der Abstrichentnahme aus den Atemwegen und vom Lungengewebe selbst. Das in dieser Arbeit verwendete Gewebe repräsentiert das gesamte Parenchym anhand von Gewebsstücken, die unter fachpathologischer Aufsicht ausgewählt und komplett der DNA-Analyse zugeführt wurden. Die zell-assoziierten Bakterien *Prevotella* und *Pseudomonas* wurden im Vergleich zu dieser Arbeit von Pragman et al. wesentlich seltener gefunden, stellen jedoch zwei wichtige Taxa zur Differenzierung der beiden Kompartimente dar.

Daher lassen die Ergebnisse dieser Arbeit den Schluss zu, dass das Mikrobiom des Lungengewebes nicht durch Immigration von Taxa aus den oberen und unteren Atemwegen entsteht und führen zu der Vermutung, dass besondere regionale Wachstumsbedingungen der Lunge bestimmten Bakterien eine Besiedlung dieser Nische ermöglichen. Diese 2. Hypothese soll im Folgenden diskutiert werden.

Neben den mikroanatomischen Veränderungen im Verlauf der Atemwege, ändern sich auch physikochemische Eigenschaften wie Temperatur, pH-Wert und Sauerstoffpartialdruck [55]. Möglichkeiten zur Besiedlung einer solchen Nische bestehen unter anderem durch die an die Umgebung angepassten Wachstumsbedingungen oder durch Bildung eines Biofilms und diesen speziellen Bedingungen.

Ein Beispiel für solch eine Anpassung bildet *Pseudomonas fluorescens*. *P. fluorescens* ließ sich sowohl mittels kulturbasierter als auch mittels kulturunabhängiger Methoden in geringen Mengen in der humanen Lunge nachweisen, bislang ohne eindeutig pathogenen Charakter [128, 129].

Dabei zeigten *P.fluorescens*-Stämme, die von Säugetieren isoliert werden konnten, im Vergleich zu anderen Umweltstämmen bei Temperaturen zwischen 34 und 37°C optimale Wachstumsbedingungen [128]. Diese Temperaturen sind ebenfalls im Lungengewebe zu finden – nicht jedoch in den Atemwegen. Dieses der Körperkerntemperatur ähnliche Temperaturoptimum ist außerdem mit der Bildung eines Biofilms assoziiert und könnte so einen Überlebensvorteil in diesem Kompartiment darstellen [128].

In der in dieser Arbeit als Core-Taxon des Lungengewebes definierte Gattung *Pseudomonas*, könnte *P. fluorescens* folglich Bestandteil einer residenten Flora des Lungengewebes sein. Eine verlässliche Speziesdifferenzierung fehlt jedoch auch hier, da *Pseudomonas* ähnlich wie die bereits angesprochene Gattung *Streptococcus* eine sehr hohe Homologie des 16S-rRNA-Gens aufweist [126]. Da diese beiden Genera sowohl lungenpathogene Spezies, als auch kolonisierende Taxa aufweisen, ist eine verlässliche Speziesdifferenzierung mit neuen Methoden umso wichtiger.

Die dritte Hypothese, dass die pulmonale Flora durch Kontamination von „außen“ während der Probenentnahme und Verarbeitung vorgetäuscht wird, wäre vor allem unter dem Aspekt der geringen Menge an Biomasse im humanen Lungengewebe plausibel. Eine gewisse Kontamination ist unvermeidbar, kann jedoch bei der Untersuchung von Kompartimenten mit geringer Biomasse die Ergebnisse gravierend verfälschen. Daher ist ein methodisch sorgfältiges Vorgehen und Untersuchung von Negativkontrollen sowie Extraktionskontrollen während der DNA-Extraktion sehr wichtig.

Salter et al. konnten durch die Sequenzierung von PCR-Reagenzien und DNA-Extraktionskits zeigen, dass sich in diesen Proben Erreger wie *Streptococcus*, *Propionibacterium*, *Pseudomonas* und *Corynebacterium* nachweisen lassen und die Mikrobiomergebnisse stärker beeinflussen, je geringer die Biomasse der untersuchten Proben ist [27].

In dieser Arbeit wurden sowohl Negativkontrollen während der Probengewinnung (Bronchoskopspülung) als auch Extraktionskontrollen, welche die Kit-Reagenzien enthielten, sequenziert.

Schwierig an dieser Stelle ist es, zwischen „echten“ Taxa und einem „Hintergrundrauschen“ zu unterscheiden, denn viele der vermeintlich kontaminierenden Taxa sind sowohl als Umweltkeime, als auch als lungenpathogene Keime bekannt und eine Kolonisierung dieser Taxa wird häufig bei chronischen Lungenerkrankungen beobachtet. Dies gilt zum Beispiel für *Pseudomonas* oder *Staphylococcus*, die von Salter et al. als kontaminierende Taxa

klassifiziert werden, deren Spezies aber bereits durch kulturabhängige und kulturunabhängige Verfahren bei akuten und chronischen Erkrankungen der Lunge nachgewiesen wurden [27].

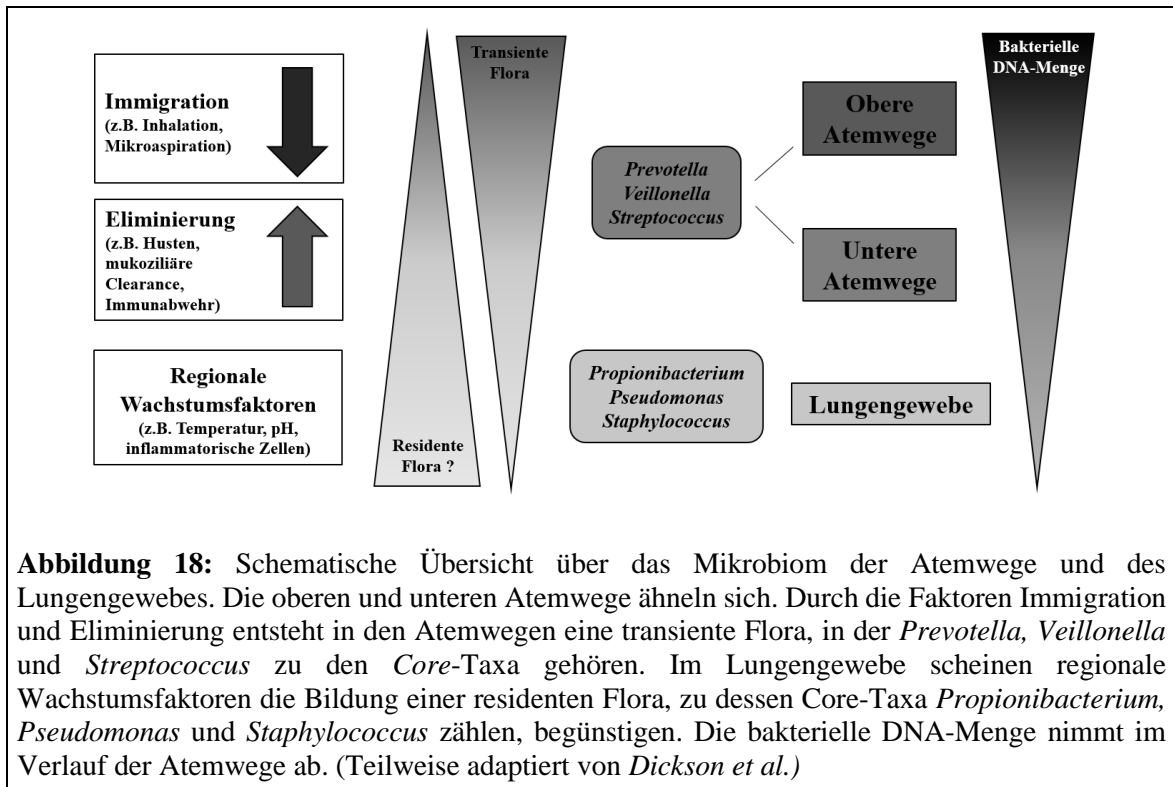
Auch das bereits erwähnte und als Haut- und Schleimhautkeim bekannte Taxon *P. acnes* wurde in dieser Arbeit als Core-Taxa des humanen Lungengewebes identifiziert. Studien, welche *P. acnes* in der Rolle der Granulombildung bei der Sarkoidose genauer untersuchten, konnten jedoch zeigen, dass es sich bei dem im humanen Lungengewebe nachgewiesenen *P. acnes* um andere Stämme als die der Haut- und Schleimhautflora handelt [110].

Neben den aktuell in der Literatur empfohlenen Standards zur Dekontamination des Daten mittels geeigneter Algorithmen [105] ist auch der kritische Umgang mit den in den Isolationskontrollen identifizierten Taxa von Bedeutung. In den Kontrollen wurden Taxa gefunden, welche auch in den untersuchten Proben auftraten (u.a. *Veillonella*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*). Diese Taxa wurden vom angewendeten decontam-Algorithmus nicht als Kontamination identifiziert. Ihre Verteilung in Kontrollen und Proben spricht allerdings dagegen, dass es sich um rein kontaminierende Taxa handelt. Zum Beispiel ist *Prevotella* eines der dominierenden Taxa in den Atemwegen, kommt in den Kontrollen hingegen nur sehr selten vor. Dagegen werden *Pseudomonas* und *Corynebacterium* regelmäßiger in den Kontrollen gefunden, zeigen aber in den Atemwegen ein deutlich geringeres Auftreten. *Propionibacterium*, eines der Core-Taxa des Lungengewebes, konnte in den Kontrollen ebenfalls nur sehr selten gefunden werden. Da die bakterielle DNA-Menge in den Kontrollen außerdem 2 log Stufen geringer als in den Proben ist, gehen wir insgesamt davon aus, dass es sich bei den in unseren Proben gefundenen Taxa nicht um Kontaminanden handelt (3. Hypothese).

Während die Source-Tracker Analyse ergab, dass die unteren Atemwege zu 45% aus Taxa unbekannter Herkunft zusammengesetzt sind, macht diese Fraktion im Lungengewebe den weit überwiegenden Anteil aus. Ähnliche Ergebnisse konnten *Pragman et al.* zeigen, deren *SourceTracker*-Analyse ergab, dass 70% der Taxa des Lungengewebes unbekannt sind [43]. Bei diesem unbekanntem Teil kann es sich um inkomplett sequenzierte oder tatsächlich unbekannte Taxa handeln. Ein Teil dieser Taxa kann aber auch Ausdruck einer in ihrer Zusammensetzung einzigartigen Flora im Lungengewebe sein, was in Anbetracht der bereits diskutierten Wachstumsbedingungen in dieser besonderen Nische plausibel erscheint.

Auch wenn die Herkunft des pulmonalen Mikrobioms noch nicht abschließend geklärt werden konnte, lässt sich durch die Ergebnisse dieser Arbeit festhalten, dass sich das

Mikrobiom des Lungengewebes von dem der unteren Atemwege unterscheidet und diese beiden Kompartimente somit nicht wie in früheren Arbeiten gleichgesetzt werden sollten [43, 47, 48, 112].



4.2. Der Einfluss chronischer Atemwegsschädigung auf das Mikrobiom

Bisherige Studien ließen vermuten, dass die Wachstumsbedingungen in der gesunden Lunge nur wenig bakterielle Besiedlung zulassen und diese hauptsächlich durch eine von Immigration und Eliminierung determinierte transiente Flora gebildet wird [53]. Die Ergebnisse dieser und anderer Arbeiten führen zu der Annahme, dass vor allem in chronisch geschädigten Atemwegen regionale Wachstumsbedingungen die Bildung einer residenten Flora ermöglichen [112]. Bakterien der Gattungen *Haemophilus* und *Pseudomonas* scheinen an die Wachstumsbedingungen der unteren Atemwege und des Lungengewebes besonders gut adaptiert zu sein und sind bei prädisponierenden Erkrankungen Teil der residenten Flora. Dies zeigt sich besonders deutlich bei Patienten mit obstruktiven Atemwegs- und Lungenerkrankungen wie Asthma bronchiale [39], der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) [86, 130, 131] sowie Lungenfibrose (IPF) [132] und cystischer Fibrose [133], bei denen in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium beide Erreger zu den „Leitkeimen“ gehören. Wichtige Einflussfaktoren sind dabei Raucherstatus, Exazerbationen

sowie Antibiotikatherapien, die insbesondere bei akut exazerbierter COPD und Cystischer Fibrose notwendig werden.

Hinsichtlich des Raucherstatus zeigen Voruntersuchungen anderer Autoren, dass regelmäßiges Tabakrauchen die mikrobielle Zusammensetzung in den oberen Atemwegen, nicht jedoch in den unteren Atemwegen verändern [84]. Dabei konnte im Rachenraum von Rauchern eine Abnahme der Taxa *Gemella*, *Neisseria* und *Porphyromonas* beobachtet werden, während sich in den unteren Atemwegen keine Unterschiede in der Zusammensetzung oder Diversität zeigten [38, 47]. In dieser Arbeit ist aufgrund des ausschließlich aus Rauchern und Ex-Rauchern bestehenden Kollektivs ein Vergleich zu Nichtrauchern nicht möglich. Es konnte aber wie in anderen Arbeiten ein häufiges Auftreten von *Acinetobacter* im Lungengewebe beobachtet werden [41, 91]. Dabei konnten Zigaretten selbst als eine mögliche externe Quelle des pulmonalen Mikrobioms identifiziert werden, da im Tabak unter anderem *Acinetobacter* nachgewiesen werden konnte [134]. Studien an Mäusen konnten bereits zeigen, dass im Lungengewebe von Zigarettenrauch exponierten Mäusen eine Zunahme von *Acinetobacter* zu finden war [135].

Andere Autoren konnten bei COPD Patienten mit häufigen Exazerbationen ebenfalls eine Assoziation zu den Leitkeimen *Pseudomonas* und *Haemophilus* beobachten [130, 131, 136]. In dieser Arbeit zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der Abundanz einzelner Taxa oder der Diversität bei Patienten mit und ohne COPD. Aufgrund des relativ kleinen Kollektivs ist eine Aussage diesbezüglich jedoch nicht sicher möglich. Eine größer angelegte Studie konnte jedoch ebenfalls keine Unterschiede in der Diversität sowie relativen Häufigkeit einzelner Taxa zwischen Patienten mit und ohne COPD identifizieren [41]. Auch Arbeiten an Lungengewebe von Patienten mit COPD im Endstadium konnten keine Unterschiede in der Diversität im Vergleich zu Nichtrauchern und Rauchern ohne COPD finden [40].

Neben den oben genannten Leitkeimen spielen auch Viren (z.B. *Influenzavirus*, *Coronavirus*, *RSV*) als Trigger von Exazerbationen und Ko-Infektionen mit Pilzen (z.B. *Aspergillus*, *Candida*) bei chronischen Atemwegserkrankungen eine wichtige Rolle [130]. In dieser und anderen bislang durchgeführten Arbeiten zum Mikrobiom des Lungengewebes wurde die Methode der 16S-rDNA-Amplikon Sequenzierung, welche nur bakterielle DNA identifiziert, verwendet; eine Aussage über den Anteil der relevanten Viren und Pilze am Mikrobiom der Lunge ist daher nicht möglich.

Die Metagenomsequenzierung, welche die gesamte DNA der untersuchte Probe analysiert, wurde bislang nur in einigen wenigen Arbeiten an Sputumproben genutzt [137-140]. Dabei

wurden Kollektive geringer Größe von 2-18 Patienten mit Cystischer Fibrose oder COPD untersucht und mittels der Shotgun-Sequenzierung neben der bakteriellen Zusammensetzung auch Viren, Bakteriophagen und Pilze sowie metabolische Prozesse analysiert. Die geringe Anzahl an Studien sowie geringe Kollektivgröße lässt aktuell jedoch noch keine verlässlichen Aussagen zu.

Während die Metagenomsequenzierung zwar die Analyse von Viren, Phagen, Pilzen und Bakterien sowie metabolische Stoffwechselwegen zulässt, weist auch diese Methodik Nachteile auf. Durch die größere Menge an generierten Sequenzen entstehen zum einen größere Kosten, zum anderen wird eine sehr große Menge an komplexen Daten generiert, was die bioinformatische Analyse erschwert [19]. Auch die Zuordnung der Sequenzen bereitet vor allem bei Viren noch methodische Probleme [141].

4.3. Die Inflammation im Lungengewebe ist bei einer Dysbiose des Mikrobioms gesteigert

Zur Frage des Einflusses des residenten Mikrobioms auf die lokale Inflammation führten wir eine Clusteranalyse durch. Die Beobachtung, dass eine Antibiotika-Vortherapie mit höherem Niveau der Zytokine und reduzierter Diversität korreliert, unterstreicht die Bedeutung der Antibiotika-Historie für die Entwicklung der Dysbiose.

Am bislang intensiver untersuchten Darmmikrobiom konnte bereits gezeigt werden, dass eine Antibiotikatherapie eine der häufigsten Ursachen für eine anhaltende Dysbiose des Mikrobioms darstellt, indem sie die mikrobielle Zusammensetzung im Darm durch eine Abnahme der Diversität verändert [94, 97]. Erste Untersuchungen an den Atemwegen konnten bei Patienten mit Cystischer Fibrose und Asthma eine Abnahme der Diversität nach einer stattgehabten Antibiotikatherapie in Sputum- und BAL-Proben beobachten [142, 143]. Für das Lungengewebe hingegen ist dies die erste Arbeit, welche eine Antibiotika-induzierte Dysbiose zeigen konnte. Die klinische Relevanz ergibt sich zunehmend aus Daten, die eine inverse Beziehung zwischen Diversität und Mortalität bei Patienten mit unterschiedlichen Grunderkrankungen zeigen. Erkrankungen wie COPD, Pneumonien, ARDS (engl. *Acute respiratory distress syndrom*), welche sowohl die Atemwege als auch das Lungengewebe betreffen, gehen meist mit einem erheblichen Gebrauch von Breitspektrumantibiotika einher.

Aufgrund fehlender Längsschnittstudien bleibt an dieser Stelle offen, wann und inwieweit sich das Mikrobiom nach stattgehabten antibiotischen Therapien im Rahmen der o.g.

Erkrankungen wieder erholt und zur ursprünglichen Zusammensetzung zurückkehrt (Resilienz).

Auch das Querschnittsdesign dieser Arbeit stellt eine Limitation dar. Da zwischen dem Untersuchungszeitpunkt der Bronchoskopie und der operativen Resektion im Schnitt sieben Wochen lagen, stellt sich die Frage, wie stabil das Mikrobiom über diese Zeit ist. Die dazu bislang vorliegenden Untersuchungen an Sputumproben von Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen konnten jedoch über einen Zeitraum von 6 Monaten keine Veränderung in der bakteriellen Menge und Diversität der mikrobiellen Zusammensetzung zeigen [144], andere Autoren konnten sogar über einen Zeitraum von mehreren Jahren eine konstante Zusammensetzung des Mikrobioms in den Atemwegen beobachten [145].

Ausblick

In dieser Arbeit konnte an einem begrenzten Kollektiv gezeigt werden, dass die mikrobielle Zusammensetzung im Lungengewebe einzigartig ist und nicht durch das Mikrobiom der Atemwege repräsentiert wird. Eine Erweiterung dieser Beobachtung in einem größeren Kollektiv und eine Evaluation ihrer funktionellen Bedeutung durch zukünftige Studien ist wünschenswert.

Insgesamt steht die Mikrobiomforschung in den Atemwegen für wichtige klinische Anwendungsbereiche wie CF, COPD, Lungenneoplasien und Pneumonien allerdings immer noch am Anfang. Im Hinblick auf die aktuelle COVID-19-Pandemie zeigt sich dies daran, dass ein bisher als wenig pathogenes Atemwegsvirus eingeschätzter Mikroorganismus durch Invasivität mit Ausbildung distinkter peripherer Lungeninfiltrate zu einer globalen Bedrohung werden kann. Neben der Rolle erregerspezifischer Mutationen erscheint die Interaktion mit dem lokalen Mikrobiom bislang völlig unklar.

5. Zusammenfassung

In den letzten 10 Jahren ist die Lunge zunehmend in den Fokus der modernen Mikrobiomforschung gerückt. Wegen der besseren Erreichbarkeit wurden bisher fast ausschließlich Atemwegsproben untersucht. Die bisherigen Ergebnisse legen bei Gesunden ein Gleichgewicht aus Immigration (z.B. Mikroaspiration) und Elimination (z.B. durch Husten, mukoziliäre Clearance) bakterieller Taxa nahe, während bei chronischen Lungenerkrankungen eine Dauerkolonisation mit potentiell pathogenen Mikroorganismen anzunehmen ist. Über die Präsenz, den Ursprung sowie die Zusammensetzung des Mikrobioms im Lungengewebe ist dagegen bislang nur wenig bekannt. Diese Frage ist deshalb von zentraler Bedeutung, weil die meisten schweren respiratorischen Erkrankungen sowohl die Atemwege als auch das Lungenparenchym betreffen. Die Fragestellung dieser Arbeit lag daher in der vergleichenden Charakterisierung der bakteriellen Dichte und ihrer Zusammensetzung zwischen dem bronchialen und alveolären Kompartiment. Hierzu wurden das Mikrobiom der Atemwege sowie des Lungengewebes von 13 Rauchern mit und ohne COPD, welche sich aufgrund eines pulmonalen Herdbefunds einer operativen Therapie unterzogen, vergleichend durch eine 16S-rRNA-Amplikon-Sequenzierung untersucht. Außerdem wurde die Menge an bakterieller Biomasse mittels qPCR quantifiziert. Auf diese Weise konnte eine schrittweise Abnahme der bakteriellen Biomasse entlang der untersuchten Kompartimente gezeigt werden. Während sich auf taxonomischer Ebene in den Atemwegen durch das Auftreten der Core-Taxa *Prevotella*, *Veillonella* und *Streptococcus* eine vor allem durch Mikroaspiration geprägte Zusammensetzung der Mikrobiota zeigte, beobachteten wir im Lungengewebe deutliche Abweichungen mit einer Dominanz von Proteobakterien, Staphylokokken und Actinobacteria. Das Phänomen der Mikroaspiration erklärt folglich nicht die Entstehung des Mikrobioms im Lungenparenchym; dieses kann aufgrund seiner Einzigartigkeit nicht mit dem der Atemwege gleichgesetzt werden. Trotz der im Vergleich zu anderen Barriere-Organen wie der Haut oder dem Gastrointestinaltrakt quantitativ sehr geringen Menge an bakterieller Biomasse ergaben sich Hinweise, dass es sich bei den im Lungengewebe gefundenen Taxa um ein relevantes Mikrobiom handelt. Hierzu gehört ein Anhalt für den Einfluss vorangegangener Antibiotikatherapie auf die Entwicklung einer Dysbiose sowie der häufige Nachweis von Taxa wie *Propionibacterium* und *Pseudomonas*. Dieser steht in Einklang mit früheren, Kultur-basierten Untersuchungen. Welche Rolle dabei die im Lungengewebe gegenüber dem bronchialen Kompartiment

abweichenden Wachstumsbedingungen sowie Immunmechanismen spielen, sollte Gegenstand zukünftiger Studien sein, um neue Therapiestrategien entwickeln zu können.

6. Literaturverzeichnis

1. Korn, M., Infectious Diseases. In: Encyclopedia of Public Health, W. Kirch. 2008: 759-777, Volume 1, Springer Netherlands.
2. Pasteur L., J.C., Chamberland C., La theorie des germes et ses applications a la medicine et a la chirurgie. . Vol. 86. 1878, C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. : G. Masson. 23p.
3. Blevins, S.M.;Bronze, M.S., Robert Koch and the 'golden age' of bacteriology. Int J Infect Dis 2010, 14, e744-51.
4. Koch, R., Die Ätiologie der Tuberkulose, Berliner Klinische Wochenschrift. 1882: Berlin.
5. Koch, R., Über bakteriologische Forschung. Verhandlungen des X. Internationalen Medizinischen Kongresses, Berlin 1890. Vol. Bd. 1. 1891, Berlin: von August Hirschwald.
6. Fleming, A., Die Geschichte des Penicillins. Wien Klin Wochenschr 1947, 59, 337-40.
7. Thorpe, J.E.;Baughman, R.P.;Frame, P.T.;Wesseler, T.A.;Staneck, J.L., Bronchoalveolar lavage for diagnosing acute bacterial pneumonia. J Infect Dis 1987, 155, 855-61.
8. Fleischmann, R.D.;Adams, M.D.;White, O.;Clayton, R.A.;Kirkness, E.F.;Kerlavage, A.R.;Bult, C.J.;Tomb, J.F.;Dougherty, B.A.;Merrick, J.M., et al., Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd. Science 1995, 269, 496-512.
9. Liu, L.;Li, Y.;Li, S.;Hu, N.;He, Y.;Pong, R.;Lin, D.;Lu, L.;Law, M., Comparison of next-generation sequencing systems. J Biomed Biotechnol 2012, 2012, 251364.
10. Rhoads, A.;Au, K.F., PacBio Sequencing and Its Applications. Genomics Proteomics Bioinformatics 2015, 13, 278-89.
11. Rogers, G.B.;Shaw, D.;Marsh, R.L.;Carroll, M.P.;Serisier, D.J.;Bruce, K.D., Respiratory microbiota: addressing clinical questions, informing clinical practice. Thorax 2015, 70, 74-81.
12. Eisenhofer, R.;Minich, J.J.;Marotz, C.;Cooper, A.;Knight, R.;Weyrich, L.S., Contamination in Low Microbial Biomass Microbiome Studies: Issues and Recommendations. Trends Microbiol 2019, 27, 105-117.

13. Chakravorty, S.;Helb, D.;Burday, M.;Connell, N.;Alland, D., A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods* 2007, 69, 330-9.
14. Caporaso, J.G.;Kuczynski, J.;Stombaugh, J.;Bittinger, K.;Bushman, F.D.;Costello, E.K.;Fierer, N.;Pena, A.G.;Goodrich, J.K.;Gordon, J.I., et al., QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 2010, 7, 335-6.
15. Schloss, P.D.;Westcott, S.L.;Ryabin, T.;Hall, J.R.;Hartmann, M.;Hollister, E.B.;Lesniewski, R.A.;Oakley, B.B.;Parks, D.H.;Robinson, C.J., et al., Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 2009, 75, 7537-41.
16. Quast, C.;Pruesse, E.;Yilmaz, P.;Gerken, J.;Schweer, T.;Yarza, P.;Peplies, J.;Glockner, F.O., The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 2013, 41, D590-6.
17. DeSantis, T.Z.;Hugenholtz, P.;Larsen, N.;Rojas, M.;Brodie, E.L.;Keller, K.;Huber, T.;Dalevi, D.;Hu, P.;Andersen, G.L., Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 2006, 72, 5069-72.
18. Cole, J.R.;Wang, Q.;Fish, J.A.;Chai, B.;McGarrell, D.M.;Sun, Y.;Brown, C.T.;Porras-Alfaro, A.;Kuske, C.R.;Tiedje, J.M., Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 2014, 42, D633-42.
19. Sharpton, T.J., An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. *Front Plant Sci* 2014, 5, 209.
20. Suau, A.;Bonnet, R.;Sutren, M.;Godon, J.J.;Gibson, G.R.;Collins, M.D.;Dore, J., Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* 1999, 65, 4799-807.
21. Hayashi, H.;Sakamoto, M.;Benno, Y., Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiol Immunol* 2002, 46, 535-48.
22. Langendijk, P.S.;Schut, F.;Jansen, G.J.;Raangs, G.C.;Kamphuis, G.R.;Wilkinson, M.H.;Welling, G.W., Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 1995, 61, 3069-75.

23. Li, K.;Bihan, M.;Methe, B.A., Analyses of the stability and core taxonomic memberships of the human microbiome. *PLoS One* 2013, 8, e63139.
24. van der Gast, C.J.;Walker, A.W.;Stressmann, F.A.;Rogers, G.B.;Scott, P.;Daniels, T.W.;Carroll, M.P.;Parkhill, J.;Bruce, K.D., Partitioning core and satellite taxa from within cystic fibrosis lung bacterial communities. *Isme j* 2011, 5, 780-91.
25. Moffatt, M.F.;Cookson, W.O., The lung microbiome in health and disease. *Clin Med (Lond)* 2017, 17, 525-529.
26. Tanner, M.A.;Goebel, B.M.;Dojka, M.A.;Pace, N.R., Specific ribosomal DNA sequences from diverse environmental settings correlate with experimental contaminants. *Appl Environ Microbiol* 1998, 64, 3110-3.
27. Salter, S.J.;Cox, M.J.;Turek, E.M.;Calus, S.T.;Cookson, W.O.;Moffatt, M.F.;Turner, P.;Parkhill, J.;Loman, N.J.;Walker, A.W., Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol* 2014, 12, 87.
28. Lederberg J, M.A., 'Ome sweet 'omics - a genealogical treasury of words. *Scientist* 2001, 15, 8-8.
29. Marchesi, J.R.;Ravel, J., The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome* 2015, 3, 31.
30. <http://hmpdacc.org/overview/highlights.php>. (Tag des Zugriffs: 25.08.2017).
31. Human Microbiome Project, C., Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012, 486, 207-14.
32. Palmer, C.;Bik, E.M.;DiGiulio, D.B.;Relman, D.A.;Brown, P.O., Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* 2007, 5, e177.
33. Dominguez-Bello, M.G.;Costello, E.K.;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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, 107, 11971-5.
34. Videhult, F.K.;West, C.E., Nutrition, gut microbiota and child health outcomes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2016, 19, 208-13.
35. Malik, U.;Armstrong, D.;Ashworth, M.;Dregan, A.;L'Esperance, V.;McDonnell, L.;Molokhia, M.;White, P., Association between prior antibiotic therapy and subsequent risk of community-acquired infections: a systematic review. *J Antimicrob Chemother* 2018, 73, 287-296.

36. Langdon, A.;Crook, N.;Dantas, G., The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. *Genome Med* 2016, 8, 39.
37. Dardas, M.;Gill, S.R.;Grier, A.;Pryhuber, G.S.;Gill, A.L.;Lee, Y.H.;Guillet, R., The impact of postnatal antibiotics on the preterm intestinal microbiome. *Pediatr Res* 2014, 76, 150-8.
38. Erb-Downward, J.R.;Thompson, D.L.;Han, M.K.;Freeman, C.M.;McCloskey, L.;Schmidt, L.A.;Young, V.B.;Toews, G.B.;Curtis, J.L.;Sundaram, B., et al., Analysis of the lung microbiome in the "healthy" smoker and in COPD. *PLoS One* 2011, 6, e16384.
39. Hilty, M.;Burke, C.;Pedro, H.;Cardenas, P.;Bush, A.;Bossley, C.;Davies, J.;Ervine, A.;Poulter, L.;Pachter, L., et al., Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One* 2010, 5, e8578.
40. Sze, M.A.;Dimitriu, P.A.;Hayashi, S.;Elliott, W.M.;McDonough, J.E.;Gosselink, J.V.;Cooper, J.;Sin, D.D.;Mohn, W.W.;Hogg, J.C., The lung tissue microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2012, 185, 1073-80.
41. Yu, G.;Gail, M.H.;Consonni, D.;Carugno, M.;Humphrys, M.;Pesatori, A.C.;Caporaso, N.E.;Goedert, J.J.;Ravel, J.;Landi, M.T., Characterizing human lung tissue microbiota and its relationship to epidemiological and clinical features. *Genome Biol* 2016, 17, 163.
42. Sze, M.A.;Dimitriu, P.A.;Suzuki, M.;McDonough, J.E.;Campbell, J.D.;Brothers, J.F.;Erb-Downward, J.R.;Huffnagle, G.B.;Hayashi, S.;Elliott, W.M., et al., Host Response to the Lung Microbiome in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2015, 192, 438-45.
43. Pragman, A.A.;Lyu, T.;Baller, J.A.;Gould, T.J.;Kelly, R.F.;Reilly, C.S.;Isaacson, R.E.;Wendt, C.H., The lung tissue microbiota of mild and moderate chronic obstructive pulmonary disease. *Microbiome* 2018, 6, 7.
44. Willner, D.;Haynes, M.R.;Furlan, M.;Schmieder, R.;Lim, Y.W.;Rainey, P.B.;Rohwer, F.;Conrad, D., Spatial distribution of microbial communities in the cystic fibrosis lung. *ISME J* 2012, 6, 471-4.
45. Cabrera-Rubio, R.;Garcia-Nunez, M.;Seto, L.;Anto, J.M.;Moya, A.;Monso, E.;Mira, A., Microbiome diversity in the bronchial tracts of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Microbiol* 2012, 50, 3562-8.

46. Pragman, A.A.;Kim, H.B.;Reilly, C.S.;Wendt, C.;Isaacson, R.E., The lung microbiome in moderate and severe chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* 2012, 7, e47305.
47. Morris, A.;Beck, J.M.;Schloss, P.D.;Campbell, T.B.;Crothers, K.;Curtis, J.L.;Flores, S.C.;Fontenot, A.P.;Ghedini, E.;Huang, L., et al., Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2013, 187, 1067-75.
48. Charlson, E.S.;Bittinger, K.;Haas, A.R.;Fitzgerald, A.S.;Frank, I.;Yadav, A.;Bushman, F.D.;Collman, R.G., Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med* 2011, 184, 957-63.
49. Bassis, C.M.;Erb-Downward, J.R.;Dickson, R.P.;Freeman, C.M.;Schmidt, T.M.;Young, V.B.;Beck, J.M.;Curtis, J.L.;Huffnagle, G.B., Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals. *MBio* 2015, 6, e00037.
50. Segal, L.N.;Clemente, J.C.;Tsay, J.C.;Koralov, S.B.;Keller, B.C.;Wu, B.G.;Li, Y.;Shen, N.;Ghedini, E.;Morris, A., et al., Enrichment of the lung microbiome with oral taxa is associated with lung inflammation of a Th17 phenotype. *Nat Microbiol* 2016, 1, 16031.
51. Dickson, R.P.;Erb-Downward, J.R.;Freeman, C.M.;McCloskey, L.;Falkowski, N.R.;Huffnagle, G.B.;Curtis, J.L., Bacterial Topography of the Healthy Human Lower Respiratory Tract. *MBio* 2017, 8,
52. Charlson, E.S.;Chen, J.;Custers-Allen, R.;Bittinger, K.;Li, H.;Sinha, R.;Hwang, J.;Bushman, F.D.;Collman, R.G., Disordered microbial communities in the upper respiratory tract of cigarette smokers. *PLoS One* 2010, 5, e15216.
53. Venkataraman, A.;Bassis, C.M.;Beck, J.M.;Young, V.B.;Curtis, J.L.;Huffnagle, G.B.;Schmidt, T.M., Application of a neutral community model to assess structuring of the human lung microbiome. *MBio* 2015, 6,
54. Hasleton, P.S., The internal surface area of the adult human lung. *J Anat* 1972, 112, 391-400.
55. Dickson, R.P.;Erb-Downward, J.R.;Huffnagle, G.B., Towards an ecology of the lung: new conceptual models of pulmonary microbiology and pneumonia pathogenesis. *Lancet Respir Med* 2014, 2, 238-46.

56. Dickson, R.P.;Martinez, F.J.;Huffnagle, G.B., The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases. *The Lancet* 2014, 384, 691-702.
57. Huffnagle, G.B.;Dickson, R.P., The bacterial microbiota in inflammatory lung diseases. *Clin Immunol* 2015, 159, 177-82.
58. Gandhi, V.D.;Vliagoftis, H., Airway epithelium interactions with aeroallergens: role of secreted cytokines and chemokines in innate immunity. *Front Immunol* 2015, 6, 147.
59. Wu, H.;Kuzmenko, A.;Wan, S.;Schaffer, L.;Weiss, A.;Fisher, J.H.;Kim, K.S.;McCormack, F.X., Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability. *J Clin Invest* 2003, 111, 1589-602.
60. Schroder, K.;Tschopp, J., The inflammasomes. *Cell* 2010, 140, 821-32.
61. Chaput, C.;Sander, L.E.;Suttorp, N.;Opitz, B., NOD-Like Receptors in Lung Diseases. *Front Immunol* 2013, 4, 393.
62. Rotta Detto Loria, J.;Rohmann, K.;Droemann, D.;Kujath, P.;Rupp, J.;Goldmann, T.;Dalhoff, K., Nontypeable *Haemophilus Influenzae* Infection Upregulates the NLRP3 Inflammasome and Leads to Caspase-1-Dependent Secretion of Interleukin-1beta - A Possible Pathway of Exacerbations in COPD. *PLoS One* 2013, 8, e66818.
63. Dinarello, C.A.;Novick, D.;Kim, S.;Kaplanski, G., Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Front Immunol* 2013, 4, 289.
64. Khair, O.A.;Devalia, J.L.;Abdelaziz, M.M.;Sapsford, R.J.;Tarraf, H.;Davies, R.J., Effect of *Haemophilus influenzae* endotoxin on the synthesis of IL-6, IL-8, TNF-alpha and expression of ICAM-1 in cultured human bronchial epithelial cells. *Eur Respir J* 1994, 7, 2109-16.
65. Soler, N.;Ewig, S.;Torres, A.;Filella, X.;Gonzalez, J.;Zaubet, A., Airway inflammation and bronchial microbial patterns in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1999, 14, 1015-22.
66. Kishimoto, T.;Hibi, M.;Murakami, M.;Narazaki, M.;Saito, M.;Taga, T., The molecular biology of interleukin 6 and its receptor. *Ciba Found Symp* 1992, 167, 5-16; discussion 16-23.
67. Delclaux, C.;Azoulay, E., Inflammatory response to infectious pulmonary injury. *Eur Respir J Suppl* 2003, 42, 10s-14s.
68. Shiomi, A.;Usui, T., Pivotal roles of GM-CSF in autoimmunity and inflammation. *Mediators Inflamm* 2015, 2015, 568543.

69. Morrissey, P.J.;Bressler, L.;Park, L.S.;Alpert, A.;Gillis, S., Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments the primary antibody response by enhancing the function of antigen-presenting cells. *J Immunol* 1987, 139, 1113-9.
70. Clarke, T.B., Early innate immunity to bacterial infection in the lung is regulated systemically by the commensal microbiota via nod-like receptor ligands. *Infect Immun* 2014, 82, 4596-606.
71. Fagundes, C.T.;Amaral, F.A.;Vieira, A.T.;Soares, A.C.;Pinho, V.;Nicoli, J.R.;Vieira, L.Q.;Teixeira, M.M.;Souza, D.G., Transient TLR activation restores inflammatory response and ability to control pulmonary bacterial infection in germfree mice. *J Immunol* 2012, 188, 1411-20.
72. Larsen, J.M.;Steen-Jensen, D.B.;Laursen, J.M.;Sondergaard, J.N.;Musavian, H.S.;Butt, T.M.;Brix, S., Divergent pro-inflammatory profile of human dendritic cells in response to commensal and pathogenic bacteria associated with the airway microbiota. *PLoS One* 2012, 7, e31976.
73. Segal, L.N.;Rom, W.N.;Weiden, M.D., Lung microbiome for clinicians. New discoveries about bugs in healthy and diseased lungs. *Ann Am Thorac Soc* 2014, 11, 108-16.
74. Martin, C.;Burgel, P.R.;Lepage, P.;Andrejak, C.;de Blic, J.;Bourdin, A.;Brouard, J.;Chanez, P.;Dalphin, J.C.;Deslee, G., et al., Host-microbe interactions in distal airways: relevance to chronic airway diseases. *Eur Respir Rev* 2015, 24, 78-91.
75. Fan, V.S.;Gharib, S.A.;Martin, T.R.;Wurfel, M.M., COPD disease severity and innate immune response to pathogen-associated molecular patterns. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2016, 11, 467-77.
76. Vayssier-Taussat, M.;Albina, E.;Citti, C.;Cosson, J.F.;Jacques, M.A.;Lebrun, M.H.;Le Loir, Y.;Ogliastro, M.;Petit, M.A.;Roumagnac, P., et al., Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome: new concepts in the light of meta-omics. *Front Cell Infect Microbiol* 2014, 4, 29.
77. Ley, R.E.;Peterson, D.A.;Gordon, J.I., Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006, 124, 837-48.
78. Pedron, T.;Sansonetti, P., Commensals, bacterial pathogens and intestinal inflammation: an intriguing menage a trois. *Cell Host Microbe* 2008, 3, 344-7.
79. Bouma, G.;Strober, W., The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003, 3, 521-33.

80. Eckburg, P.B.;Bik, E.M.;Bernstein, C.N.;Purdom, E.;Dethlefsen, L.;Sargent, M.;Gill, S.R.;Nelson, K.E.;Relman, D.A., Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005, 308, 1635-8.
81. Scanlan, P.D.;Shanahan, F.;O'Mahony, C.;Marchesi, J.R., Culture-independent analyses of temporal variation of the dominant fecal microbiota and targeted bacterial subgroups in Crohn's disease. *J Clin Microbiol* 2006, 44, 3980-8.
82. Hampe, J.;Cuthbert, A.;Croucher, P.J.;Mirza, M.M.;Mascheretti, S.;Fisher, S.;Frenzel, H.;King, K.;Hasselmeyer, A.;MacPherson, A.J., et al., Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001, 357, 1925-8.
83. Petnicki-Ocwieja, T.;Hrncir, T.;Liu, Y.J.;Biswas, A.;Hudcovic, T.;Tlaskalova-Hogenova, H.;Kobayashi, K.S., Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106, 15813-8.
84. Faner, R.;Sibila, O.;Agusti, A.;Bernasconi, E.;Chalmers, J.D.;Huffnagle, G.B.;Manichanh, C.;Molyneaux, P.L.;Paredes, R.;Perez Brocal, V., et al., The microbiome in respiratory medicine: current challenges and future perspectives. *Eur Respir J* 2017, 49,
85. Garcia-Nunez, M.;Millares, L.;Pomares, X.;Ferrari, R.;Perez-Brocal, V.;Gallego, M.;Espasa, M.;Moya, A.;Monso, E., Severity-related changes of bronchial microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Microbiol* 2014, 52, 4217-23.
86. Einarsson, G.G.;Comer, D.M.;McIlreavey, L.;Parkhill, J.;Ennis, M.;Tunney, M.M.;Elborn, J.S., Community dynamics and the lower airway microbiota in stable chronic obstructive pulmonary disease, smokers and healthy non-smokers. *Thorax* 2016, 71, 795-803.
87. Huang, Y.J.;Sethi, S.;Murphy, T.;Nariya, S.;Boushey, H.A.;Lynch, S.V., Airway microbiome dynamics in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Microbiol* 2014, 52, 2813-23.
88. Liu, Y.;O'Brien, J.L.;Ajami, N.J.;Scheurer, M.E.;Amirian, E.S.;Armstrong, G.;Tsavachidis, S.;Thrift, A.P.;Jiao, L.;Wong, M.C., et al., Lung tissue microbial profile in lung cancer is distinct from emphysema. *Am J Cancer Res* 2018, 8, 1775-1787.

89. Ramirez-Labrada, A.G.;Isla, D.;Artal, A.;Arias, M.;Rezusta, A.;Pardo, J.;Galvez, E.M., The Influence of Lung Microbiota on Lung Carcinogenesis, Immunity, and Immunotherapy. *Trends Cancer* 2020, 6, 86-97.
90. Zheng, X.;Sun, X.;Liu, Q.;Huang, Y.;Yuan, Y., The Composition Alteration of Respiratory Microbiota in Lung Cancer. *Cancer Invest* 2020, 38, 158-168.
91. Gomes, S.;Cavadas, B.;Ferreira, J.C.;Marques, P.I.;Monteiro, C.;Sucena, M.;Sousa, C.;Vaz Rodrigues, L.;Teixeira, G.;Pinto, P., et al., Profiling of lung microbiota discloses differences in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Sci Rep* 2019, 9, 12838.
92. Greathouse, K.L.;White, J.R.;Vargas, A.J.;Bliskovsky, V.V.;Beck, J.A.;von Muhlinen, N.;Polley, E.C.;Bowman, E.D.;Khan, M.A.;Robles, A.I., et al., Interaction between the microbiome and TP53 in human lung cancer. *Genome Biol* 2018, 19, 123.
93. Jernberg, C.;Lofmark, S.;Edlund, C.;Jansson, J.K., Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *Isme j* 2007, 1, 56-66.
94. Dethlefsen, L.;Huse, S.;Sogin, M.L.;Relman, D.A., The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. *PLoS Biol* 2008, 6, e280.
95. Jakobsson, H.E.;Jernberg, C.;Andersson, A.F.;Sjolund-Karlsson, M.;Jansson, J.K.;Engstrand, L., Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome. *PLoS One* 2010, 5, e9836.
96. Dethlefsen, L.;Relman, D.A., Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, 108 Suppl 1, 4554-61.
97. Costello, E.K.;Stagaman, K.;Dethlefsen, L.;Bohannan, B.J.;Relman, D.A., The application of ecological theory toward an understanding of the human microbiome. *Science* 2012, 336, 1255-62.
98. Kelly, C.P.;LaMont, J.T., *Clostridium difficile*--more difficult than ever. *N Engl J Med* 2008, 359, 1932-40.
99. Shade, A.;Peter, H.;Allison, S.D.;Baho, D.L.;Berga, M.;Burgmann, H.;Huber, D.H.;Langenheder, S.;Lennon, J.T.;Martiny, J.B., et al., Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Front Microbiol* 2012, 3, 417.

100. Allison, S.D.;Martiny, J.B., Colloquium paper: resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105 Suppl 1, 11512-9.
101. Kozich, J.J.;Westcott, S.L.;Baxter, N.T.;Highlander, S.K.;Schloss, P.D., Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol* 2013, 79, 5112-20.
102. Pruesse, E.;Quast, C.;Knittel, K.;Fuchs, B.M.;Ludwig, W.;Peplies, J.;Glockner, F.O., SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res* 2007, 35, 7188-96.
103. Edgar, R.C.;Haas, B.J.;Clemente, J.C.;Quince, C.;Knight, R., UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 2011, 27, 2194-200.
104. Chen, L.;Reeve, J.;Zhang, L.;Huang, S.;Wang, X.;Chen, J., GMPR: A robust normalization method for zero-inflated count data with application to microbiome sequencing data. *PeerJ* 2018, 6, e4600.
105. Davis, N.M.;Proctor, D.M.;Holmes, S.P.;Relman, D.A.;Callahan, B.J., Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome* 2018, 6, 226.
106. Knights, D.;Kuczynski, J.;Charlson, E.S.;Zaneveld, J.;Mozer, M.C.;Collman, R.G.;Bushman, F.D.;Knight, R.;Kelley, S.T., Bayesian community-wide culture-independent microbial source tracking. *Nat Methods* 2011, 8, 761-3.
107. Jari Oksanen, F.G.B., Michael Friendly, Roeland Kindt, Pierre Legendre, Dan McGlenn, Peter R. Minchin, R.;B. O'Hara, G.L.S., Peter Solymos, M. Henry H. Stevens, Eduard Szoecs and Helene Wagner, *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.4-3. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>. 2017.
108. Segal, L.N.;Alekseyenko, A.V.;Clemente, J.C.;Kulkarni, R.;Wu, B.;Gao, Z.;Chen, H.;Berger, K.I.;Goldring, R.M.;Rom, W.N., et al., Enrichment of lung microbiome with supraglottic taxa is associated with increased pulmonary inflammation. *Microbiome* 2013, 1, 19.
109. Homma, J.Y.;Abe, C.;Chosa, H.;Ueda, K.;Saegusa, J.;Nakayama, M.;Homma, H.;Washizaki, M.;Okano, H., Bacteriological investigation on biopsy specimens from patients with sarcoidosis. *Jpn J Exp Med* 1978, 48, 251-5.

110. Eishi, Y., Etiologic aspect of sarcoidosis as an allergic endogenous infection caused by *Propionibacterium acnes*. *Biomed Res Int* 2013, 2013, 935289.
111. Ishige, I.;Eishi, Y.;Takemura, T.;Kobayashi, I.;Nakata, K.;Tanaka, I.;Nagaoka, S.;Iwai, K.;Watanabe, K.;Takizawa, T., et al., *Propionibacterium acnes* is the most common bacterium commensal in peripheral lung tissue and mediastinal lymph nodes from subjects without sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2005, 22, 33-42.
112. Dickson, R.P.;Erb-Downward, J.R.;Freeman, C.M.;McCloskey, L.;Beck, J.M.;Huffnagle, G.B.;Curtis, J.L., Spatial Variation in the Healthy Human Lung Microbiome and the Adapted Island Model of Lung Biogeography. *Ann Am Thorac Soc* 2015, 12, 821-30.
113. Marsland, B.J.;Gollwitzer, E.S., Host-microorganism interactions in lung diseases. *Nat Rev Immunol* 2014, 14, 827-35.
114. Dickson, R.P.;Erb-Downward, J.R.;Martinez, F.J.;Huffnagle, G.B., The Microbiome and the Respiratory Tract. *Annu Rev Physiol* 2016, 78, 481-504.
115. Huffnagle, G.B.;Dickson, R.P.;Lukacs, N.W., The respiratory tract microbiome and lung inflammation: a two-way street. *Mucosal Immunol* 2017, 10, 299-306.
116. Kasahara, K.;Matsumura, Y.;Ui, K.;Kasahara, K.;Komatsu, Y.;Mikasa, K.;Kita, E., Intranasal priming of newborn mice with microbial extracts increases opsonic factors and mature CD11c+ cells in the airway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012, 303, L834-43.
117. Hussell, T.;Bell, T.J., Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat Rev Immunol* 2014, 14, 81-93.
118. Blander, J.M.;Sander, L.E., Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat. *Nat Rev Immunol* 2012, 12, 215-25.
119. Huffnagle, G.B.;Dickson, R.P.;Lukacs, N.W., The respiratory tract microbiome and lung inflammation: a two-way street. *Mucosal Immunol* 2016,
120. Ahearn, C.P.;Gallo, M.C.;Murphy, T.F., Insights on persistent airway infection by non-typeable *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease. *Pathog Dis* 2017, 75,
121. Chung, K.F., Potential Role of the Lung Microbiome in Shaping Asthma Phenotypes. *Ann Am Thorac Soc* 2017, 14, S326-s331.
122. Mulcahy, L.R.;Isabella, V.M.;Lewis, K., *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microb Ecol* 2014, 68, 1-12.

123. Gleeson, K.;Eggl, D.F.;Maxwell, S.L., Quantitative aspiration during sleep in normal subjects. *Chest* 1997, 111, 1266-72.
124. Huxley, E.J.;Viroslav, J.;Gray, W.R.;Pierce, A.K., Pharyngeal aspiration in normal adults and patients with depressed consciousness. *Am J Med* 1978, 64, 564-8.
125. Ye, W.;Held, M.;Lagergren, J.;Engstrand, L.;Blot, W.J.;McLaughlin, J.K.;Nyren, O., Helicobacter pylori infection and gastric atrophy: risk of adenocarcinoma and squamous-cell carcinoma of the esophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia. *J Natl Cancer Inst* 2004, 96, 388-96.
126. Janda, J.M.;Abbott, S.L., 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol* 2007, 45, 2761-4.
127. Dickson, R.P.;Erb-Downward, J.R.;Prescott, H.C.;Martinez, F.J.;Curtis, J.L.;Lama, V.N.;Huffnagle, G.B., Cell-associated bacteria in the human lung microbiome. *Microbiome* 2014, 2, 28.
128. Scales, B.S.;Dickson, R.P.;LiPuma, J.J.;Huffnagle, G.B., Microbiology, genomics, and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, an unappreciated colonizer of humans. *Clin Microbiol Rev* 2014, 27, 927-48.
129. Dickson, R.P.;Erb-Downward, J.R.;Freeman, C.M.;Walker, N.;Scales, B.S.;Beck, J.M.;Martinez, F.J.;Curtis, J.L.;Lama, V.N.;Huffnagle, G.B., Changes in the lung microbiome following lung transplantation include the emergence of two distinct *Pseudomonas* species with distinct clinical associations. *PLoS One* 2014, 9, e97214.
130. Bouquet, J.;Tabor, D.E.;Silver, J.S.;Nair, V.;Tovchigrechko, A.;Griffin, M.P.;Esser, M.T.;Sellman, B.R.;Jin, H., Microbial burden and viral exacerbations in a longitudinal multicenter COPD cohort. *Respir Res* 2020, 21, 77.
131. Pragman, A.A.;Knutson, K.A.;Gould, T.J.;Isaacson, R.E.;Reilly, C.S.;Wendt, C.H., Chronic obstructive pulmonary disease upper airway microbiota alpha diversity is associated with exacerbation phenotype: a case-control observational study. *Respir Res* 2019, 20, 114.
132. Molyneaux, P.L.;Cox, M.J.;Willis-Owen, S.A.;Mallia, P.;Russell, K.E.;Russell, A.M.;Murphy, E.;Johnston, S.L.;Schwartz, D.A.;Wells, A.U., et al., The role of bacteria in the pathogenesis and progression of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2014, 190, 906-13.
133. Chmiel, J.F.;Aksamit, T.R.;Chotirmall, S.H.;Dasenbrook, E.C.;Elborn, J.S.;LiPuma, J.J.;Ranganathan, S.C.;Waters, V.J.;Ratjen, F.A., Antibiotic management of lung

- infections in cystic fibrosis. II. Nontuberculous mycobacteria, anaerobic bacteria, and fungi. *Ann Am Thorac Soc* 2014, 11, 1298-306.
134. Sapkota, A.R.;Berger, S.;Vogel, T.M., Human pathogens abundant in the bacterial metagenome of cigarettes. *Environ Health Perspect* 2010, 118, 351-6.
 135. Li, K.J.;Chen, Z.L.;Huang, Y.;Zhang, R.;Luan, X.Q.;Lei, T.T.;Chen, L., Dysbiosis of lower respiratory tract microbiome are associated with inflammation and microbial function variety. *Respir Res* 2019, 20, 272.
 136. Millares, L.;Pascual, S.;Monton, C.;Garcia-Nunez, M.;Lalmolda, C.;Faner, R.;Casadevall, C.;Seto, L.;Capilla, S.;Moreno, A., et al., Relationship between the respiratory microbiome and the severity of airflow limitation, history of exacerbations and circulating eosinophils in COPD patients. *BMC Pulm Med* 2019, 19, 112.
 137. Willner, D.;Furlan, M.;Haynes, M.;Schmieder, R.;Angly, F.E.;Silva, J.;Tammadoni, S.;Nosrat, B.;Conrad, D.;Rohwer, F., Metagenomic analysis of respiratory tract DNA viral communities in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis individuals. *PLoS One* 2009, 4, e7370.
 138. Lim, Y.W.;Schmieder, R.;Haynes, M.;Willner, D.;Furlan, M.;Youle, M.;Abbott, K.;Edwards, R.;Evangelista, J.;Conrad, D., et al., Metagenomics and metatranscriptomics: windows on CF-associated viral and microbial communities. *J Cyst Fibros* 2013, 12, 154-64.
 139. Hauser, P.M.;Bernard, T.;Greub, G.;Jaton, K.;Pagni, M.;Hafen, G.M., Microbiota present in cystic fibrosis lungs as revealed by whole genome sequencing. *PLoS One* 2014, 9, e90934.
 140. Cameron, S.J.;Lewis, K.E.;Huws, S.A.;Lin, W.;Hegarty, M.J.;Lewis, P.D.;Mur, L.A.;Pachebat, J.A., Metagenomic Sequencing of the Chronic Obstructive Pulmonary Disease Upper Bronchial Tract Microbiome Reveals Functional Changes Associated with Disease Severity. *PLoS One* 2016, 11, e0149095.
 141. Reyes, A.;Haynes, M.;Hanson, N.;Angly, F.E.;Heath, A.C.;Rohwer, F.;Gordon, J.I., Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature* 2010, 466, 334-8.
 142. Slater, M.;Rivett, D.W.;Williams, L.;Martin, M.;Harrison, T.;Sayers, I.;Bruce, K.D.;Shaw, D., The impact of azithromycin therapy on the airway microbiota in asthma. *Thorax* 2014, 69, 673-4.

143. Zhao, J.;Murray, S.;Lipuma, J.J., Modeling the impact of antibiotic exposure on human microbiota. *Sci Rep* 2014, 4, 4345.
144. Cox, M.J.;Turek, E.M.;Hennessy, C.;Mirza, G.K.;James, P.L.;Coleman, M.;Jones, A.;Wilson, R.;Bilton, D.;Cookson, W.O., et al., Longitudinal assessment of sputum microbiome by sequencing of the 16S rRNA gene in non-cystic fibrosis bronchiectasis patients. *PLoS One* 2017, 12, e0170622.
145. Woo, T.E.;Lim, R.;Heirali, A.A.;Acosta, N.;Rabin, H.R.;Mody, C.H.;Somayaji, R.;Surette, M.G.;Sibley, C.D.;Storey, D.G., et al., A longitudinal characterization of the Non-Cystic Fibrosis Bronchiectasis airway microbiome. *Sci Rep* 2019, 9, 6871.

7. Anhang

Aufklärungsbogen für die Studie „Die Bedeutung des Mikrobioms der unteren Atemwege bei COPD und im humanen Lungeninfektionsmodell“

Sehr geehrte Studieninteressentin, sehr geehrter Studieninteressent,

hiermit möchten wir Sie zusätzlich zum persönlichen Gespräch über das geplante Vorhaben informieren. Bitte lesen Sie dieses Informationsblatt sorgfältig durch. Bitte sprechen Sie uns an, wenn Sie etwas nicht verstehen oder wenn Sie zusätzlich etwas wissen möchten.

Die Studie „Die Bedeutung des Mikrobioms der unteren Atemwege bei COPD und im humanen Lungeninfektionsmodell“ wird unter Leitung von Professor Zabel und Professor Dalhoff durchgeführt. Sie können sich jederzeit an den aufklärenden Arzt wenden oder direkt an die Medizinische Klinik III, Station 43L, UK-SH, Campus Lübeck, Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck, Tel.: 0451-5002334.

Für diese Studie zu Mechanismen des Immunsystems in der Lunge führen wir Untersuchungen durch, bei denen es darum geht, die Bedeutung von Krankheitserregern für die Aktivierung des Immunsystems herauszufinden. Außerdem soll geklärt werden, welche Krankheitserreger überhaupt bei chronisch kranken und auch lungengesunden Patienten eine Rolle spielen und ob es Unterschiede in der bakteriellen Besiedelung der Lunge („Mikrobiom“) gibt.

Man vermutet, dass Infektionen mit bestimmten Krankheitserregern (z.B. Bakterien oder Viren) auch dafür verantwortlich sind, dass chronische Umbauprozesse in Gang gesetzt werden oder schneller ablaufen als im gesunden Lungengewebe. Die genauen Mechanismen sind jedoch noch unklar.

Als Teilnehmerin/ Teilnehmer an dieser Studie bitten wir Sie darum, entsprechende Untersuchungen in bestimmten Lungenzellen (Alveolarmakrophagen, Bronchialepithelzellen) sowie im entnommenen Lungengewebe durchführen zu dürfen.

Wenn bei Ihnen eine Lungenspiegelung durchgeführt wird, möchten wir mit einer kleinen Spülung (Brochoalveoläre Lavage, BAL) Zellen entnehmen und diese im Labor untersuchen. Während der Lungenspiegelung wollen wir auch versuchen, mit einem kleinen Mikroskop direkt auf der Schleimhaut der Bronchien Bakterien oder Schäden an den Zellen nachzuweisen.

Sollte bei Ihnen eine Lungen-Operation durchgeführt werden, bei der Gewebe entnommen wird, möchten wir Sie bitten, das Gewebe, das nicht für Ihre Untersuchungen benötigt wird, für unsere Studie nutzen zu dürfen.

Außerdem bitten wir Sie darum, Daten aus Ihrer Vorgeschichte sowie Befunde, die während Ihres Krankenhausaufenthaltes erhoben werden, für die Studie dokumentieren zu dürfen.

Aus Ihren Patientendaten und den Experimenten mit Ihren Zellen und Ihrem Lungengewebe erhoffen wir uns, einen Zusammenhang zwischen einer bakteriellen Besiedelung der Lunge, Schäden durch

Rauchen und der Erkrankung COPD aufdecken zu können. Die entnommenen Lungenzellen und das Lungengewebe, das für die Diagnostik nicht benötigt wird, werden auf Krankheitserreger und aktivierte Abwehrmechanismen untersucht. Die gewonnenen Erkenntnisse sind dabei eher von allgemeinem Interesse; neue Untersuchungsergebnisse für Sie persönlich werden sich nicht daraus ergeben. Das Material wird bis zum Abschluss der Studie aufbewahrt, eine kommerzielle Verwertung wird nicht erfolgen.

Natürlich führen wir die Materialentnahme bei Ihrer Untersuchung nur durch, wenn hierdurch kein erhöhtes Risiko für Sie besteht. Risiken der Lungenspiegelung, mit denen grundsätzlich gerechnet werden muss, ergeben sich aus dem beigefügten Aufklärungsformular zur Bronchoskopie oder Lungen-Operation, welches wir Sie bitten möchten, aufmerksam durchzulesen. Durch unsere Untersuchungen verlängert sich die Bronchoskopie-Zeit um etwa 5-10min, der Verlauf einer Lungen-Operation ändert sich durch unsere Studie nicht. Es bestehen keine zusätzlichen Risiken über die bekannten Bronchoskopie- und OP-Risiken hinaus, da für die Untersuchungen kein zusätzliches Material invasiv entnommen wird.

Als Studienteilnehmerin/ Studienteilnehmer besteht für Sie kein zusätzlicher zeitlicher oder finanzieller Aufwand. Mit Abschluss der Untersuchung endet für Sie die Studie, über die Routine hinausgehende zusätzliche Nachuntersuchungen sind nicht erforderlich. Tritt im Rahmen der Studiendurchführung ein Schaden auf, der den Studienteilnehmern durch das schuldhafte Verhalten eines Beschäftigten des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UK-SH) zugefügt wurde, haftet die gesetzliche Haftpflicht des UK-SH.

Ihre Teilnahme an dieser Studie ist freiwillig. Natürlich können Sie jederzeit ohne Angabe von Gründen Ihre Teilnahme an der Studie beenden, ohne dass Ihnen dadurch Nachteile im Hinblick auf die Behandlung oder Ihr Verhältnis zu Ihrer behandelnden Ärztin bzw. Ihrem Arzt entstehen. Nach Beendigung Ihrer Teilnahme werden keine weiteren Daten von Ihnen erhoben.

Datenschutzrechtliche Informationen

Für die Datenverarbeitung verantwortlich ist Professor Dalhoff, der Studienleiter. Die Datenerhebung erfolgt zum Zweck des oben genannten Forschungsvorhabens. Zu den Daten, die wir erheben, gehören Alter, Allergien, Raucherstatus, Vorerkrankungen, Medikamenteneinnahme und aktuelle medizinische Befunde (z.B. Blutwerte). Ihre Daten werden in pseudonymisierter Form, d.h. ohne direkten Bezug zu Ihrem Namen, elektronisch gespeichert und ausgewertet. Die Bestimmungen des Datenschutzgesetzes werden eingehalten. Zugriff auf Ihre Daten haben nur Mitarbeiter der Studie. Diese Personen sind zur Verschwiegenheit verpflichtet. Ihre Daten sind somit vor fremdem Zugriff geschützt.

Einverständniserklärung
(zum Verbleib beim Prüfarzt)

zur Studie: **Die Bedeutung des Mikrobioms der unteren Atemwege bei COPD und im humanen Lungeninfektionsmodell**



Ich bin heute über die Studie „Die Bedeutung des Mikrobioms der unteren Atemwege bei COPD und im humanen Lungeninfektionsmodell“ mündlich und schriftlich informiert worden.

Ich hatte Gelegenheit, alle meine Fragen zu stellen. Diese wurden zufriedenstellend und vollständig beantwortet. Ich habe aktuell keine weiteren Fragen. Ich habe die schriftliche Patienteninformation zur oben genannten Studie erhalten, gelesen und verstanden. Ich wurde ausführlich – mündlich und schriftlich – über das Ziel und den Verlauf der Studie, Chancen und Risiken der Behandlung, meine Rechte und Pflichten, den mir zustehenden Versicherungsschutz und die Freiwilligkeit der Teilnahme aufgeklärt.

Ich erkläre hiermit meine Teilnahme an der oben genannten Studie. Ich wurde darauf hingewiesen, dass meine Teilnahme freiwillig ist und dass ich das Recht habe, diese jederzeit ohne Angabe von Gründen zu beenden, ohne dass mit dadurch Nachteile entstehen.

Ich wurde über meine Datenschutzrechte informiert. Mit der Erhebung, Verarbeitung und Speicherung meiner Daten, sowie der Übermittlung im Rahmen der Studie bin ich einverstanden.

Lübeck, den

Unterschrift des Patienten

Unterschrift des aufklärenden Arztes (+ Name in Druckbuchstaben + Telefon)

Dokumentationsbogen Patientendaten

Patienten-Identifikation:

Untersuchungsdatum:

Raucherstatus:

Raucher Nichtraucher Ex-Raucher seit

Packyears (kumulativ):

COPD:

nein ja, Stadium _____

FEV₁:

FEV₁% VC:

Medikation:

Steroide:

Antibiotika:

weitere Vormedikation:

Vorerkrankungen und aktuelle Erkrankungen (insbesondere Infektionen):

Ergänzendes Material

Tabelle 1: Liste aller verwendeten Primer für die Amplifikation der V3/V4-Region der bakteriellen 16S rRNA

Primer	Nukleotid-Sequenz (5' – 3')
V3F_Seq	TATGGTAATT GG CCTACGGGAGGCAGCAG
V4R_Seq	AGTCAGTCAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
Index_V3V4	ATTAGAWACCCBDGTAGTCC GG CTGACTGACT
V3F_MID1	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC ATCGTACG TATGGTAATT GG CCTACGGGAGGCAGCAG
V3F_MID2	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC ACTATCTG TATGGTAATT GG CCTACGGGAGGCAGCAG
V3F_MID3	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC TAGCGAGT TATGGTAATT GG CCTACGGGAGGCAGCAG
V3F_MID4	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC CTGCGTGT TATGGTAATT GG CCTACGGGAGGCAGCAG
V3F_MID5	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC TCATCGAG TATGGTAATT GG CCTACGGGAGGCAGCAG
V3F_MID6	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC CGTGAGTG TATGGTAATT GG CCTACGGGAGGCAGCAG
V3F_MID7	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC GGATATCT TATGGTAATT GG CCTACGGGAGGCAGCAG
V3F_MID8	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC GACACCGT TATGGTAATT GG CCTACGGGAGGCAGCAG
V3F_MID9	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC CTACTATA TATGGTAATT GG CCTACGGGAGGCAGCAG
V3F_MID10	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC CGTTACTA TATGGTAATT GG CCTACGGGAGGCAGCAG
V3F_MID11	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC AGAGTCAC TATGGTAATT GG CCTACGGGAGGCAGCAG
V3F_MID12	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC TACGAGAC TATGGTAATT GG CCTACGGGAGGCAGCAG
V3F_MID13	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC ACGTCTCG TATGGTAATT GG CCTACGGGAGGCAGCAG
V3F_MID14	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC TCGACGAG TATGGTAATT GG CCTACGGGAGGCAGCAG
V3F_MID15	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC GATCGTGT TATGGTAATT GG CCTACGGGAGGCAGCAG
V3F_MID16	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC GTCAGATA TATGGTAATT GG CCTACGGGAGGCAGCAG
V4R_MID_A	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT AACTCTCG AGTCAGTCAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_B	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT ACTATGTC AGTCAGTCAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_C	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT AGTAGCGT AGTCAGTCAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_D	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT CAGTGAGT AGTCAGTCAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT

V4R_MID_E	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT CGTACTCA AGTCAGTCAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_F	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT CTACGCAG AGTCAGTCAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_G	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT GGAGACTA AGTCAGTCAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_H	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT GTCGCTCG AGTCAGTCAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_I	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT GTCGTAGT AGTCAGTCAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_J	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TAGCAGAC AGTCAGTCAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_K	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TCATAGAC AGTCAGTCAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_L	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TCGCTATA AGTCAGTCAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_M	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT AAGTCGAG AGTCAGTCAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_N	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT ATACTTCG AGTCAGTCAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_O	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT AGCTGCTA AGTCAGTCAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_P	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT CATAGAGA AGTCAGTCAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_Q	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT CGTAGATC AGTCAGTCAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT CTCGTTAC AGTCAGTCAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_S	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT GCGCACGT AGTCAGTCAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_T	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT GGTACTAT AGTCAGTCAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_U	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT GTATACGC AGTCAGTCAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_V	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TACGAGCA AGTCAGTCAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_W	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TCAGCGTT AGTCAGTCAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_X	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TCGCTACG AGTCAGTCAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT

Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten Primer für die qPCR

16Sr Forward	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
16Sr Reverse	TGCTGCCTCCCGTAGGAGT
18s Forward	TCAAGAACGAAAGTCCGAGG
18s Reverse	GGACATCTAAGGGCATACA

Tabelle 3: CRP und Leukozyten vor der Bronchoskopie und der Operation.

Bronchoskopie		OP	
CRP (mg/l)	Leukozyten ($\times 10^9/L$)	CRP (mg/l)	Leukozyten ($\times 10^9/L$)
14,12 \pm 4,63	10,69 \pm 1,69	9,08 \pm 2,77	9,89 \pm 1,36

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit in einem besonderen Ausmaß unterstützt und begleitet haben.

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Klaus Dalhoff für die Bereitstellung des Themas und für die hervorragende Betreuung sowie uneingeschränkten Unterstützung bei der Durchführung und Umsetzung der gesamten Arbeit danken.

Ich danke außerdem dem ärztlichen Leiter der Medizinischen Klinik III Herrn PD Dr. Daniel Drömann für die Bereitstellung des Laborarbeitsplatzes und des Materials.

Großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Jan Rupp und Herrn Dr. Simon Graspeuntner für die Hilfestellung bei Problemen der experimentellen Arbeit, die konstruktiven Impulse und kurzfristig ermöglichten Treffen bei allen methodischen Fragen.

Darüber hinaus danke ich der Klinik für Chirurgie des UKSH, Campus Lübeck, besonders Herrn PD Dr. med. Palade, für die Unterstützung bei der Patientenrekrutierung und Materialgewinnung.

Für die Einarbeitung in die Laborarbeit und ihre praktische Mithilfe im Labor danke ich außerdem Frau Dr. med. Kristina Rohmann und Frau Dr. med. Hannah Schmieg. Für die technische Mithilfe im Labor danke ich Herrn Andreas Makurat und Frau Thara Tietz.

Ein besonderer Dank geht an meinen Mitdoktoranden Andreas Möllering für die kollegiale Zusammenarbeit und uneingeschränkte Zuverlässigkeit.

Zuletzt möchte ich meinem Freund danken, der mir durch seine Unterstützung, Geduld und Ermutigungen die Fertigstellung dieser Arbeit erleichtert hat.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Lena Reinhold
Geburtsdatum, -ort 21. März 1992, in Paderborn



Schulische Ausbildung

1998 –2002 Grundschule Kirchsule in Hövelhof
2002 –2011 Gymnasium Schloss Neuhaus, Europaschule

Studium der Humanmedizin und beruflicher Werdegang

10/2011 - 11/2017 Studium an der Universität zu Lübeck
Ärztliche Prüfung am 02.11.2017
03/2018 – heute Assistenzärztin Innere Medizin Segeberger Kliniken GmbH
06 – 08/2020 Rotation an die Medizinische Klinik Borstel, Leibniz Lungenzentrum

Promotion

Seit 03/2014 Experimentelle Doktorarbeit zum Thema: „Das respiratorische Mikrobiom“ bei Herrn Prof. Dr. med. K. Dalhoff, Medizinische Klinik III – Pulmologie, Universität zu Lübeck

Qualifikationen im medizinischen Bereich:

11/2011 – 04/2017 Kursleitung bei der „Studentischen Arbeitsgemeinschaft Notfallmedizin (StAN)“ der Universität zu Lübeck: Durchführung von Reanimationskursen für Studenten
04/2014 – 04/2016 Organisatorische Leitung des „Praktikum Notfallmedizin“ für Studenten an der Universität zu Lübeck
10/2013 – 03/2016 Studentische Hilfskraft in der Medizinischen Klinik III, UKSH Campus Lübeck im Bereich der NIV-Beatmung
09/2015 Organisation und Durchführung eines Notfallkurses (Primary Trauma Care Course) an der UNAM, School of Medicine, Windhoek, Namibia (Teilnahme am Primary Trauma Care Course, Teilnahme am Instructors‘ Course sowie anschließende Durchführung eines Primary Trauma Care Course für Studenten der UNAM)

10. Publikation

Dissimilarity of Airway and Lung Tissue Microbiota in Smokers undergoing Surgery for Lung Cancer.

Lena Reinhold, Andreas Möllering, Sönke Wallis, Emanuel Palade, Kathrin Schäfer, Daniel Drömann, Jan Rupp, Simon Graspentner, Klaus Dalhoff

Microorganisms 2020, 8(6), 794; <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060794>