

Bakterielle Untermieter in der menschlichen Nase



Die Nasenhöhle ist natürlicherweise durch eine Vielzahl, teilweise noch unbekannter Mikroorganismen besiedelt, deren Interaktionen untereinander und mit dem menschlichen Wirt von bisher unverstandener Komplexität und Dynamik sind. Sie stellt jedoch auch das Habitat für *Staphylococcus aureus*, eines gefürchteten, oft multiresistenten Erregers schwerer Infektionen in und außerhalb des Krankenhauses, dar. Mittels metagenomischer/metatranskriptomischer Methodik soll die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft (Mikrobiota) der Nase und ihre medizinische Bedeutung umfassend analysiert und alternative Interventionsstrategien zur Eliminierung der nasalen Besiedlung mit Methicillin-resistenten *S. aureus*-Stämmen (MRSA) mittels neuartiger Phagenproteine entwickelt und überprüft werden.

Karsten Becker, Wolfgang Mutter, Rolf Daniel, Claudia Rudack, Andreas Peschel, Dietmar H. Pieper

Die menschliche Haut und die Schleimhäute sind mit komplexen bakteriellen Gemeinschaften besiedelt, die vor Infektionen schützen, aber auch selbst zum Problem werden können. In dem vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen der Förderung „Medizinische Infektionsgenomik“ unterstützten Projektes MENAGE (Metagenomische Analyse der nasalen Habitate) soll die physiologische mikrobielle Gemeinschaft (Mikrobiota) der Nase des Menschen untersucht werden. Über eine einfache Katalogisierung der bakteriellen nasalen Mikrobiota hinausgehend stehen die Rolle der Nasenflora für den gesunden und erkrankten Menschen sowie die Suche nach Wegen zur ihrer gezielten Beeinflussung im Zentrum der gemeinsamen Forschungsarbeit von universitären Partnern aus Münster, Braunschweig, Göttingen und Tübingen sowie einer Biotechnologiefirma aus Regensburg.

Die Kombination von drei Hauptforschungsausrichtungen der Partner, der Infektionsmedizin, der mikrobiellen Ökologie und der Phagenbiologie, führte zur Entstehung des gemeinsamen Forschungsvorhabens „MENAGE“.

Schon in den BMBF-geförderten Vorgängerverbänden PathoGenoMik und PathoGenoMik-Plus stand der opportunistische Erreger *Staphylococcus aureus* im Zentrum der Forschung des Münsteraner Projektpartners aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie des dortigen Universitätsklinikums. *S. aureus* ist für eine Vielzahl pyogener Infektionen von leichten oberflächlichen Infektionen der Haut und ihrer Anhangsgebilde (z.B. Haarfollikel), Infektionen von implantierten Fremdkörpern (z.B. Katheter, künstliche Herzklappen) bis hin zu schweren, lebensbedrohlichen Infektionen, wie z.B. Sepsis, Endokarditis, Osteomyelitis, Meningitis und Pneumonie verantwortlich. Angesichts dieser schweren, auch heute noch häufig tödlich verlaufenden Infektionen wiegt die in den vergangenen Jahren zu beobachtende, zunehmende Ausbreitung von multiresistenten Isolaten dieses Erregers, den sog. Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA)-Stämmen, im Krankenhaus, aber auch außerhalb des Krankenhauses und in der Tierzucht besonders schwer, da sie die Palette einsetzbarer Antibiotika drastisch einschränkt und zu erhöhter Morbidität und Mortalität führt. Hinzu kommen die enormen Kosten durch zusätzliche Hygienemaßnahmen (z.B. Isolierungsmaßnahmen), durch Therapie und Diagnostik, hauptsächlich jedoch durch verlängerte Liegezeiten der Patienten. Dieses Bakterium besiedelt zudem dauerhaft die vordere Nasenhöhle von ca. 20-30% der Menschen (der Rest wird nur zeitweise oder nie besiedelt), ohne dort vordergründig als Pathogen in Erscheinung zu treten. Diese körpereigene (endogene) *S. aureus*-Population bildet die Hauptquelle (ca. 80%) für sogenannte nosokomiale, d.h. im Krankenhaus erworbene Infektionen wie postoperative Wundinfektionen, Septikämien, Pneumonien und andere schwere Infektionen. Somit sind Strategien zum Nachweis und zur Elim-

nierung des Erregers als vorbeugende Maßnahme zur Verhinderung von Infektionen beim besiedelten Patienten und zur Unterbindung von MRSA-Übertragungen von Patient zu Patient im Krankenhaus oder pflegerischen Einrichtungen von großer Bedeutung.

Die Nase selbst und ihr angeschlossenes Höhlensystem (z.B. die Nasenneben- und Stirnhöhlen) können auch direkt durch *S. aureus* in Mitleidenschaft gezogen werden. So untersucht der klinische Partner des Kooperationsprojektes aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenkrankheiten des Universitätsklinikums Münster seit Jahren die Ursache und Pathogenese chronischer Entzündungen der Nase- und Nasennebenhöhlen (Rhinosinusitis). Hier konnte nachgewiesen werden, daß *S. aureus* bei chronischen Rhinosinusitiden mit nasaler Polypenbildung in das respiratorische Epithel eindringt. *In vitro* Untersuchungen belegen, dass der Erreger unabhängig von einer extra- oder intrazellulären Lokalisation eine lokale Immunantwort induziert.

Der zweite Ausgangspunkt für das Vorhaben resultiert aus der Analyse von mikrobiellen Gemeinschaften durch den Braunschweiger Partner vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung. Nicht nur Böden, Gewässer und Umweltoberflächen, sondern auch der Mensch als multizellulärer Wirtsorganismus stellt mit seinen inneren und äußeren Oberflächen ein Biotop für eine immense An- und Vielzahl von Mikroorganismen dar. Die Frage nach der Zusammensetzung dieser den Menschen besiedelnden Mikroorganismen, ihrer Interaktionen untereinander sowie mit dem menschlichen Wirt und ihrer Bedeutung für die menschliche Gesundheit und Prädisposition für Erkrankungen stellt eine der derzeitigen Topthemen in Medizin und Mikrobiologie dar.

Mit der Verfügbarkeit von Hochdurchsatztechnologien für metagenomische (Analyse der Gesamtheit der genomischen Information der Mikroorganismen eines Biotops) und metatranskriptomische Studien (Analyse der Gesamtheit der von Mikroorganismen in einem Biotop gebildeten mRNA) an den Partnerstandorten Braunschweig und Göttingen eröffnet sich zum ersten Mal die Möglichkeit, die Biodiversität der den menschlichen Makroorganismus besiedelnden, mikrobiellen Gemeinschaften in ihrer ganzen Komplexität und Dynamik zu untersuchen und nicht – wie in der Vergangenheit – auf den Bruchteil der im Labor *in vitro* kultivierbaren Mikroorganismen beschränkt zu bleiben. Zudem können hiermit die Aktivitäten und mögliche Interaktionen am Ort studiert und müssen nicht in artifiziellen Laborsystemen charakterisiert werden. So konnten die Braunschweiger und Münsteraner Partner kürzlich die Bestandteile der nasalen Mikrobiota von gesunden Probanden inventarisieren, bisher unbekannte Kolonisierungsmuster aufdecken, natürliche Variationen in der Zusammensetzung der Flora belegen und insbesondere erste Rückschlüsse auf Interaktionen zwischen verschiedenen Arten der Nasenflora ziehen.

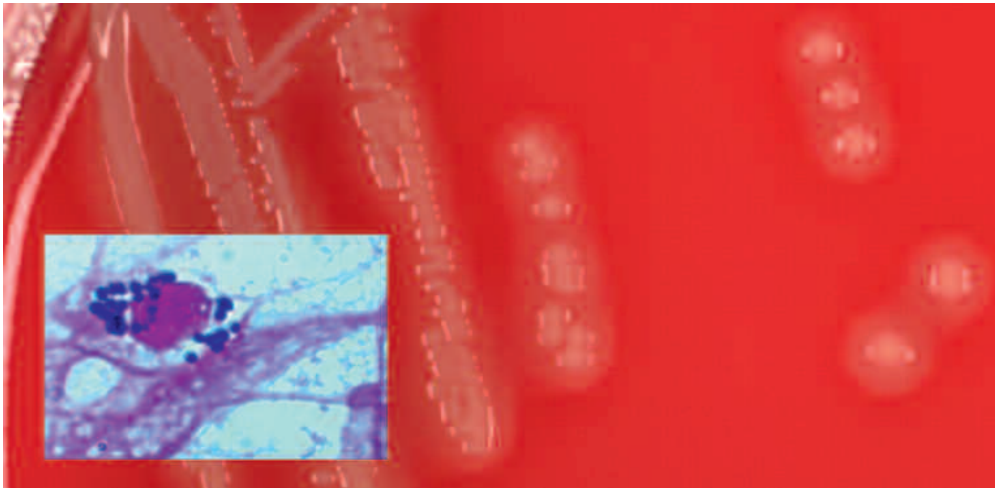


Fig. 1: *Staphylococcus aureus* auf einer Blutagarplatte mit typischer gelblicher Pigmentierung und Hämolysezone wachsend (großes Bild) sowie lichtmikroskopische Aufnahme ($\times 1.000$) von Furunkeliter mit namensgebender „traubenartiger“ (σταφυλή [Griech., Traube] Lagerung des grampositiven Erregers in Form von Haufenkokken (kleines Bild).

Der dritte Ausgangspunkt ergab sich durch Forschungen und Entwicklungen des Partners aus der Wirtschaft, dem Regensburger Biotechnologieunternehmen Hyglos GmbH. Dieser Partner entwickelte in der Vergangenheit eine Palette unterschiedlicher Phagenproteine u.a. zum Nachweis von Bakterien, zur Bindung und Eliminierung von Toxinen bzw. zur Lyse von Bakterien. Letzteres eröffnete Perspektiven zur alternativen Therapie bakterieller Infektionen bzw. der Eliminierung bakterieller Besiedlungen. Eine konventionelle antimikrobielle Chemotherapie verursacht – auch beim Einsatz von „Schmalband“-Antibiotika – diverse „Kollateralschäden“, beispielsweise Störungen der Zusammensetzung der physiologischen Flora und einen Selektionsdruck auf die Entwicklung und Verbreitung resistenter Erregerstämme. Im Gegensatz hierzu könnten Phagenproteine nahezu speziesspezifisch wirken und somit nur den Erreger eliminieren, der potentiell eine Infektion auslösen könnte. Entsprechend könnte auch eine unerwünschte Kolonisierung mit einem bakteriellen Erreger wie mit MRSA unterbunden werden. Von Hyglos konnte nun ein ganzer „Bausatz“ von mehr als 200 zellwandbindenden und lytischen Phagenproteinen etabliert werden, die modulartig die Zusammensetzung der unterschiedlichsten Phagenbausteine mit diverser Wirtsspezifität und Funktion erlauben.

Die umfangreichen Erfahrungen des Regensburger Projektpartners mit Phagenproteinen finden ihre optimale Ergänzung in Vorarbeiten des Tübinger universitären Partners vom Interfakultären Institut für Mikrobiologie und Infektionsmedizin, der grundlegend zu Erkenntnissen zum Aufbau und zur Zusammensetzung der Staphylokokken-Zellwand beitragen konnte, wobei im Fokus die Rolle der Zellwandpolymere und weiterer nicht-proteinärer Bestandteile steht.

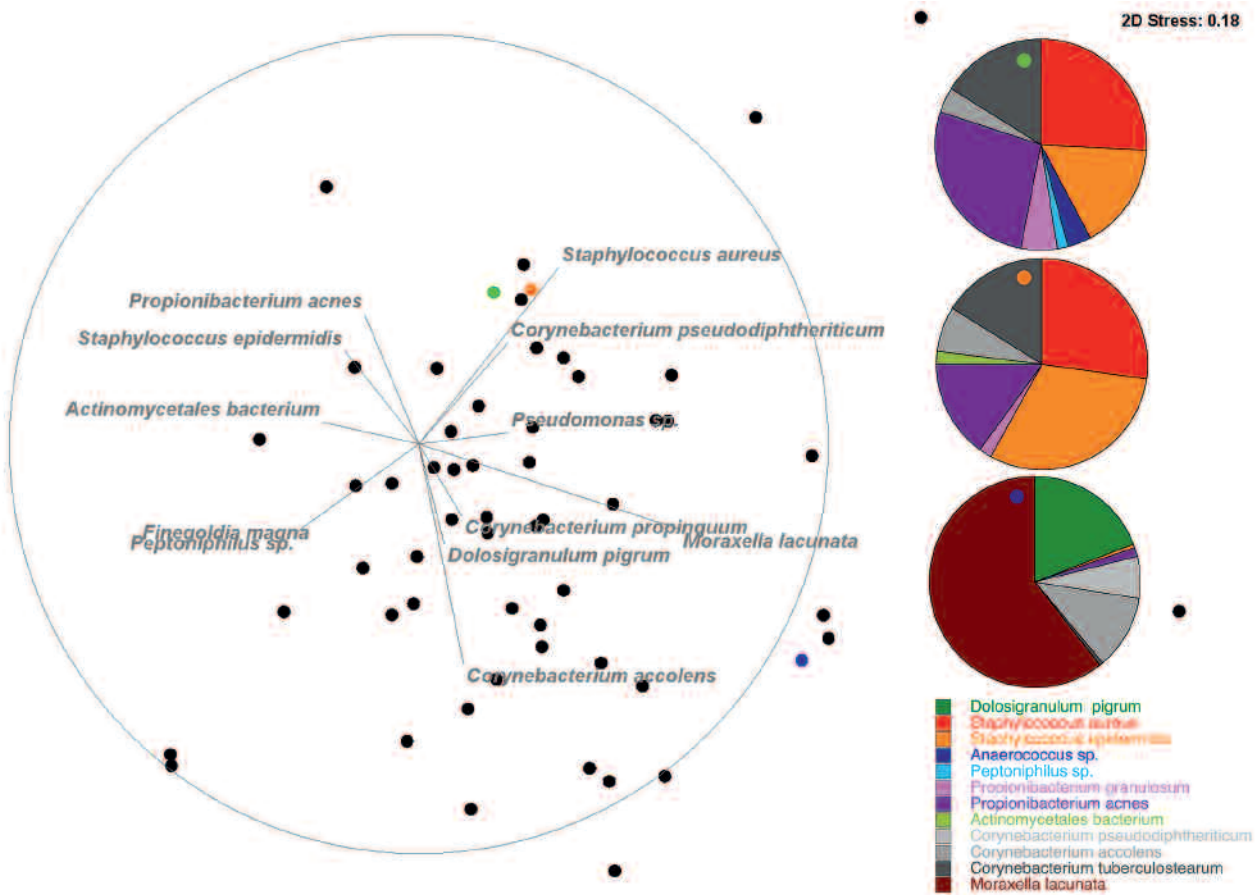
Das gemeinsame Ziel des Verbundprojekts ist, aufbauend auf oben skizzierten Vorarbeiten, die Charakterisierung und nachfolgende gezielte Beeinflussung der Nasen-Mikrobiota zur Ausschaltung von *S. aureus* als Verursacher lokaler und systemischer Infektionen sowie die Verhinderung einer nosokomialen Ausbreitung von MRSA-Stämmen ausgehend von der nasalen Besiedlung.

Von besonderer wissenschaftlicher Bedeutung für das Projekt ist hierbei die anatomische Besonderheit der Nase, histologisch unterschiedliche Oberflächen auf engstem Raum zu vereinen. So werden wir im Projekt die Mikrobiota der einzelnen Nasenhäute anhand von Untersuchungsmaterialien von Individuen ohne Anzeichen von Entzündungen im Nasenbereich bestimmen, um interindividuelle Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Zusammensetzung zu erkennen. Zusätzlich wird den bereits in Vorarbeiten beschriebenen Hinweisen auf bisher unbekannte bakterielle Spezies der physiologischen Nasenflora nachgegangen werden. Mit präziser anatomischer Zuordnung soll ebenfalls der Einfluss von Entzündungen der Nasenschleimhäute bei akuter und chronischer Rhinosinusitis auf die Zusammensetzung der

nasalen Mikrobiota untersucht und Korrelationen mit der angeborenen und erworbenen Immunantwort des Wirtes aufgezeigt werden. Zur Bestimmung der mikrobiellen Gemeinschaften und ihrer Aktivität und Interaktionen werden moderne metagenomische und metatranskriptomische Methoden eingesetzt werden. Hierdurch kann in einer hohen Auflösung, die für die Beschreibung von Gemeinschaften, die aus einer Vielzahl von bakteriellen Arten bestehen notwendig ist, deren genaue Zusammensetzung charakterisiert werden. Da die den menschlichen Körper besiedelnden bakteriellen Gemeinschaften von Umweltfaktoren (z. B. Nahrung, Lebensstil) und der genetischen Ausstattung beeinflusst werden, ist aber auch die Analyse einer Vielzahl von Proben notwendig, um den Einfluss einzelner Faktoren auf die Zusammensetzung solcher Gemeinschaften zu erkennen. Am bedeutsamsten ist jedoch, dass diese molekularbiologischen Analysen Aussagen über Aktivität und Interaktionen der Mikroorganismen „vor Ort“ erlauben, ohne dass sie aus ihrer natürlichen Lebensumwelt entnommen werden müssen. Somit können wir die Unterschiede und Wechselwirkungen von unterschiedlich angepaßten, mikrobiellen Gemeinschaften am gesunden und erkrankten Menschen studieren und ihre Bedeutung für Krankheitsverläufe und/oder nachfolgende Infektionen untersuchen.

Für Interventions-Studien wird zusätzlich zu *in vitro*-Ansätzen mit einem Medium, welches das Milieu der vorderen Nasenhöhle simuliert, ein Tiermodell verwendet. Dieses bereits etablierte Kolonisierungsmodell der Baumwollratte kommt den Verhältnissen in der menschlichen Nase sehr nahe. Da es aber bisher keine Daten zur Nasenflora der Baumwollratte gibt, werden wir deren mikrobielle Gemeinschaften ebenfalls mittels kulturabhängiger sowie molekularer Verfahren bestimmen.

Für die Intervention, d.h. die gezielte, selektive Eliminierung von einzelnen Kernbestandteilen der nasalen Mikrobiota mit Fokus auf *S. aureus*, wird die weitere Entwicklung und der Einsatz von lytischen Bakteriophagen-Proteinen vorangetrieben. Basierend auf einer bereits existierenden Bibliothek modularer Phagenproteine sowie mittels Suche nach weiteren effektiven Molekülen anhand institutioneller Stammsammlungen sollen neue Moleküle mit verstärkter Aktivität und optimierter Anpassung an die physikochemischen Parameter in der Nasenhöhle maßgeschneidert und nachfolgend getestet werden. Hierzu wird neben der Analyse der Wirkstoffe in *in vitro*- und tierexperimentellen Versuchen eine Kohorte gesunder Probanden etabliert, die vor und in verschiedenen Abständen nach der Applikation der Phagenproteine kurz-, mittel- und langfristig auf die Zusammensetzung und Veränderungen der nasalen Flora und auf die Auswirkungen der Eliminierung einzelner Bestandteile der Mikrobiota untersucht werden. Vergleichend hierzu werden die Effekte bisher zur MRSA-Dekolonisierung eingesetzter topischer Antibiotika (z.B. Mupirocin) analysiert.



Mittels neuer Methoden zur DNA-Sequenzierung kann die Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften mit großer Genauigkeit und an großen Probenmengen direkt analysiert werden, ohne dass die Mikroorganismen vorher in Kultur genommen werden müssen. In der Abbildung rechts ist beispielhaft die Zusammensetzung der Mikrobiota der vorderen Nasenhöhle von drei Testpersonen angegeben (Farbcode der einzelnen Gemeinschaftsmitglieder ist unten rechts aufgeführt), wie sie durch sogenanntes „Pyrosequenzierung“ analysiert wurde. Ist die Zusammensetzung verschiedener Gemeinschaften bekannt, so können diese mittels verschiedener Algorithmen miteinander verglichen werden. In der Abbildung links ist eine Ähnlichkeitsstrukturanalyse dargestellt, wobei jeder Punkt die gesamte mikrobielle Gemeinschaft der Nasenhöhle einer Testperson darstellt. Je größer die Entfernung zwischen zwei Punkten ist, desto größer ist der Unterschied zwischen den Gemeinschaften (siehe auch rechts: Die durch einen grünen und einen orange Punkt repräsentierten Gemeinschaften sind sehr ähnlich, aber deutlich unterschiedlich von der durch einen blauen Punkt dargestellten Gemeinschaft). Durch einen Vektor ist dargestellt, welche Mikroorganismen in welchen Gemeinschaften vermehrt vorhanden sind (z.B. *Staphylococcus aureus* vermehrt in Gemeinschaften, die in der Abbildung oben rechts dargestellt sind). Zeigt der Vektor in entgegengesetzte Richtungen (siehe *Finogoldia magna* – *Staphylococcus aureus*), so deutet dieses darauf hin, dass diese Mikroorganismen nicht die gleiche ökologische Nische teilen. Solchen Hinweisen kann dann mittels weiterer statistischer Analysen und praktischer Versuche nachgegangen werden.

Zusammenfassend bestehen die Ziele des Verbundprojektes darin, mittels metagenomischer/metatranskriptomischer Ansätze erstmals die Gesamtheit der mikrobiellen Gemeinschaften der nasalen Habitate und ihre Metagenome beim gesunden und erkrankten Menschen sowie im Tiermodell vergleichend und interventionell zu charakterisieren und damit Möglichkeiten einer gezielten Beeinflussung der Mikrobiota zu eröffnen. Unter Einbezug von Untersuchungen zur Wirtsantwort sollen insbesondere die Wechselwirkungen und Dynamiken innerhalb der nasalen mikrobiellen Gemeinschaften geklärt werden. Hierbei steht die Analyse der Auswirkungen einer Gabe von breit wirkenden, topischen Antibiotika im Vergleich zur Verabreichung von neuartigen, modular zusammengesetzten Phagenproteinen im Fokus. Die besondere Bedeutung der Bakteriophagenprotein-Wirkstoffe im Rahmen unseres Verbundprojektes liegen in der Genese und Testung alternativer Substanzen mit antibiotischer Wirkung, die im Vergleich zu den herkömmlichen Antibiotika (1.) hochspezifisch und damit zielgenau nur den zu therapierenden Erreger (z.B. MRSA) eliminieren; (2.) in kürzester Zeit, unabhängig vom Resistenzprofil hochwirksam auch gegen multiresistente Erreger sind; (3.) weniger Einfluß auf die physiologische, putativ gesundheitsförderliche Mikroflora haben und (4.) die Entstehung von Kollateralschäden durch die Selektion bzw. Genese von (multi-)resistenten Mikroorganismen vermeiden.

Referenzen

1. von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G (2001) Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *N Engl J Med* 344:11-16
2. Sachse F, Becker K, von Eiff C, Metz D, Rudack C (2010) *Staphylococcus aureus* invades the epithelium in nasal polyposis and induces IL-6 in nasal epithelial cells in vitro. *Allergy* 65:1430-1437
3. Wos-Oxley ML, Plumeier I, von Eiff C, Taudien S, Platzer M, Vilchez-Vargas R, Becker K, Pieper DH (2010) A poke into the diversity and associations within human anterior nare microbial communities. *ISME J* 4:839-851
4. Weidenmaier C, Kokai-Kun JF, Kristian SA, Chanturiya T, Kalbacher H, Gross M, Nicholson G, Neumeister B, Mond JJ, Peschel A (2004) Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nat Med* 10:243-245

Kontakt

Prof. Dr. Karsten Becker
 Universitätsklinikum Münster
 Institut für Medizinische Mikrobiologie
 E-Mail: kbecker@uni-muenster.de

Prof. Dr. Dietmar H. Pieper
 Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung
 Arbeitsgruppe Mikrobielle Interaktionen und Prozesse
 E-Mail: dpi@helmholtz-hzi.de