

**Aus der medizinischen Klinik III - Pulmologie
der Universität zu Lübeck
Ärztlicher Leiter: PD Dr. Daniel Drömann**

**Das Mikrobiom der oberen und unteren Atemwege bei
Patienten mit Raucher-assoziierten Erkrankungen –
eine vergleichende Untersuchung**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Andreas Möllering
aus Nordhorn

Lübeck 2021

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. Klaus Dalhoff

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. med. Dirk Hartwig

Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.2022

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 16.02.2022

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung	1
1.1. Definitionen	1
1.1.1. Mikrobiom	1
1.1.2. Diversität	1
1.1.3. Evenness	2
1.1.4. Richness	2
1.1.5. Abundanz	2
1.1.6. Dominanz	2
1.1.7. Core Taxa	3
1.1.8. Dysbiose	3
1.1.9. Read	3
1.1.10. OTU (Operational taxonomic unit)	3
1.2. Historie des Next-Generation-Sequencing	4
1.2.1. Von den Anfängen der DNA/RNA basierten Nachweismethoden zur dritten Generation der Next-Generation-Sequencing-Methoden	4
1.2.2. Das Human Microbiom Project (HMP)	5
1.3. Bisherige Forschungsergebnisse	6
1.4. Das pulmonale Mikrobiom	7
1.4.1. Geringe Beachtung und das Problem der Probengewinnung	7
1.4.2. Die Zusammensetzung des pulmonalen Mikrobioms beim gesunden Menschen	8
1.4.3. Veränderungen des „gesunden“ pulmonalen Mikrobioms durch Risikofaktoren und Komorbiditäten	10
1.5. Zielsetzung und Fragestellung	14
2. Material und Methoden	15
2.1. Verwendete Materialien	15
2.1.1. Verbrauchsmaterial	15

2.1.2. Bronchoskopie-Lösungen	15
2.1.3. Reagenzien, Lösungen und Enzyme	16
2.1.4. Verwendete Kits.....	17
2.1.5. Primer	17
2.1.6. Geräte.....	17
2.2. Das Kollektiv der Versuchspersonen	18
2.3. Ethikvotum und Aufklärung der Studienteilnehmer	23
2.4. Materialgewinnung	24
2.4.1. Sterilisation und Vorbereitung der Probenentnahmematerialien.....	24
2.4.2. Rachenabstrich und Rachenspülwasser.....	24
2.4.3. Supraglottische Absaugung und bronchoalveoläre Lavage	24
2.4.5. Weitere Verarbeitung der Materialien	27
2.5. Vorbereitung des Probenmaterials zur Mikrobiomanalyse	27
2.5.1. DNA-Extraktion aus dem Probenmaterial	27
2.5.2. Amplifizierung der DNA.....	28
2.5.3. Gelelektrophorese der DNA-Proben	28
2.6. Mikrobiomanalyse mittels Next-Generation Sequencing.....	30
2.6.1. DNA-Sequenzierung	30
2.6.2. Datenprozessierung.....	30
2.6.3. Dekontaminierung des Datensets und Core-Taxa	31
2.7. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	33
2.8. SourceTracker.....	34
2.9. Statistische Analyse	34
3. Ergebnisse	36
3.1. Abnahme der bakteriellen Biomasse von den oberen zu den unteren Atemwegen.....	36
3.2. Vergleichende Untersuchungen der Zusammensetzung des Mikrobioms der oberen und unteren Atemwege anhand von Rachenabstrich und BAL.....	36
3.2.1. α -Diversität.....	37

3.2.2. Relative mikrobielle Zusammensetzung der oberen und unteren Atemwege.....	37
3.2.3. Dissimilarität (PCoA und Heatmap)	41
3.2.4. Source Tracker	43
3.3. Respiratorische Risikofaktoren und Komorbiditäten.....	44
3.3.1. Einfluss von Rauchen auf das Mikrobiom der unteren Atemwege	45
3.3.2. COPD	46
3.3.3. Emphysem	48
3.3.4. Lungenkarzinome	49
4. Diskussion.....	51
4.1. Mikrobielle Veränderung zwischen oberen und unteren Atemwegen.....	51
4.1.1. Nachweis eines identischen Core-Mikrobioms in oberen und unteren Atemwegen.....	51
4.1.2. Einfluss von Taxa unterschiedlicher primärer Habitate auf die Zusammensetzung des Mikrobioms der unteren Atemwege mit Veränderung der alpha-Diversität.....	52
4.2. Einfluss von pulmonalen Risikofaktoren und Komorbiditäten auf die mikrobielle Zusammensetzung der unteren Atemwege	56
4.2.1. Das Rauchen als führender Risikofaktor für pulmonale Erkrankungen nimmt keinen direkten Einfluss auf das Mikrobiom der unteren Atemwege ..	56
4.2.2. Der Schweregrad der COPD beeinflusst die Kolonisation der unteren Atemwege mit potentiell pathogenen Erregern	57
4.2.3. Emphysematöse Lungenveränderungen zeigen keinen Einfluss auf die mikrobielle Zusammensetzung der unteren Atemwege	59
4.2.4. Lungenkarzinome	60
5. Zusammenfassung.....	62
6. Literaturverzeichnis	64
7. Anhang.....	74
7.1. Verwendete Primer	74
7.2. Aufklärungsbogen	77

7.3. Einverständniserklärung.....	80
7.4. Patientenfragebogen.....	81
7.5. Radiologisches Auswertungsschema.....	82
7.6. Relative Abundanzen in den 3 COPD Subgruppen.....	83
8. Danksagung	84
9. Publikation.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1. Einleitung und Fragestellung

1.1. Definitionen

Zum besseren Verständnis dieser Arbeit sollen zu Beginn relevante und häufig verwandte Begriffe der Mikrobiomforschung definiert werden. Diese wurden zunächst vorwiegend für ökologische Fragestellungen entwickelt und kennzeichnen vorwiegend Parameter der Zusammensetzung und Vielfalt mikrobiologischer Taxa in unterschiedlichen Habitaten[1]. Hieraus ergibt sich eine Akzentverschiebung gegenüber der herkömmlichen, klinisch geprägten Mikrobiologie, der es seit Ende des 19. Jahrhunderts vor allem um die Identifikation einzelner Pathogene zur Aufklärung der Ätiologie der großen Seuchen wie Tuberkulose, Milzbrand und Cholera ging. Hieraus resultierten die klassischen Koch'schen Postulate, die die Bedeutung des verursachenden Erregers betonten[2-4], im Rahmen der aktuellen Mikrobiomforschung aber nur noch eingeschränkt verwendbar sind. Es gibt inzwischen deutliche Hinweise dafür, dass auch bei respiratorischen Infektionen neben einem bisher als „potentiell pathogen“ definierten Erreger wie *Hämophilus influenzae* die gesamte „physiologische“ Standortflora den Infektionsverlauf maßgeblich mitbestimmt[5-7].

1.1.1. Mikrobiom

Das Mikrobiom beschreibt die Gesamtheit aller mikrobiellen DNA im menschlichen Organismus, währenddessen der Begriff Mikrobiota als die Gesamtheit der den Menschen besiedelnden Mikroorganismen wie z.B.: Bakterien, Viren und Pilze definiert ist. Beides wird in der medizinischen und naturwissenschaftlichen Fachliteratur häufig synonym verwendet[8]. Der Begriff Mikrobiom wurde durch den US-Molekularbiologen Joshua Lederberg geprägt. Er postulierte, dass die Mikroflora den Menschen maßgeblich beeinflussen und bei der Entstehung von Gesundheit und Krankheit eine entscheidende Rolle spielen könne[9].

1.1.2. Diversität

Die Diversität beschreibt den Artenreichtum in einem bestimmten Lebensraum. Man unterscheidet nach Whittaker Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta- und Epsilon-Diversität[1].

Die α -Diversität, oder auch Punktdiversität, gibt die lokale Artenvielfalt (z. B. in einer Probe) wieder. Sie lässt sich anhand von Diversitätsindices nach Shannon-Wiener (Shannon-Index) oder Simpson berechnen.

Der Shannon-Index gibt das Verhältnis der Individuenzahl einer Art zur Summe aller Individuen in einem lokalen Ökosystem wieder [10, 11].

Die β -Diversität dient als Messgröße um lokale und regionale Effekte zu differenzieren. Die β -Diversität wird beim Vergleich von Proben unterschiedlicher Lebensräume umso größer, je weniger Arten diese Lebensräume gemeinsam haben. Bei identischer Artenvielfalt wird die β -Diversität minimal. Das Maß der β -Diversität lässt sich mit dem Bray-Curtis Dissimilaritäts-Index messen[11].

1.1.3. Evenness

Die Evenness beschreibt das Gleichheits- bzw. Ungleichheitsmaß der Artenverteilung innerhalb einer Probe und lässt sich aus dem Shannon-Index berechnen. Der Wert für die Evenness kann dabei zwischen 0 (völlige Ungleichverteilung der Individuen auf die einzelne Art) und 1 (völlige Gleichverteilung) liegen[10].

1.1.4. Richness

Die Richness gibt die Anzahl der Arten innerhalb einer Probe an. Sie ist eine einfache Zählung und lässt relative oder absolute Abundanzen außer Acht.

1.1.5. Abundanz

Die Abundanz beschreibt das Vorkommen einzelner Taxa innerhalb eines definierten Raumes[12]. Der Begriff wird synonym für Häufigkeit verwendet. In dieser Arbeit halten wir uns an relative Abundanzen. Sie beschreiben die relative Häufigkeit eines Taxons in einer Probe in Bezug auf alle in der Probe gefundenen Taxa.

1.1.6. Dominanz

Spezies, die im Vergleich zu anderen Spezies eine hohe Abundanz in einem umschriebenen Habitat aufweisen und proportionale Auswirkungen auf die Umweltbedingungen, die Diversität und/oder die Ökosystemfunktionen haben[13].

1.1.7. Core Taxa

Ein Core Taxon ist ein Taxon, welches sich in der überwiegenden Zahl aller Proben mit einer relativen Häufigkeit von über 1% findet.

In der Literatur lassen sich unterschiedlich stringente Definitionen eines Core-Taxons finden. Diese reichen ab einem Vorkommen in 50-75%[14] der Proben bis hin zu 90%[15].

1.1.8. Dysbiose

Veränderung einer „physiologischen“ Standortflora (Eubiose) zugunsten eines oder mehrerer sich ausbreitender, potentiell pathogener Erreger. Eine Dysbiose geht mit abnehmender Diversität einher und wird in klinischen Studien häufig mit akuten Krankheitsexazerbationen oder fortgeschrittenen Grunderkrankungen assoziiert[16-18].

1.1.9. Read

In der Sequenzierung (hier Illumina®-Sequenzierung) gelesenes RNA-Fragment (read), welches einem Referenzgenom zugeordnet werden kann.

1.1.10. OTU (Operational taxonomic unit)

OTUs dienen der Gruppierung von DNA-, bzw. RNA-Sequenzen anhand von Markergenen, welche mithilfe von Next-Generation-Sequencing Methoden (NGS) gewonnen werden[19]. Anhand der Ähnlichkeit der Markergene werden die Sequenzen zu OTUs zusammengefasst. Es handelt sich um eine Clusteringmethode. OTUs lassen sich anhand von phylogenetischen Datenbanken nach taxonomischen Leveln wie z.B. Stämme, Genera oder Species einteilen. Da es sich bei der OTU um ein DNA-, bzw. RNA Fragment und nicht um z.B. eine komplette Sequenz eines Bakteriums handelt, erfolgt die Klassifizierung immer mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit.

1.2. Historie des Next-Generation-Sequencing

1.2.1. Von den Anfängen der DNA/RNA basierten Nachweismethoden zur dritten Generation der Next-Generation-Sequencing-Methoden

Einer der Vorreiter der DNA und RNA basierten mikrobiellen Nachweismethoden war Frederick Sanger (1918-2013). Er entwickelte im Jahre 1975 die Methode zur Sequenzierung von Nukleinsäuren (Didesoxymethode nach Sanger)[20]. Im Jahr 1983 gelang Kary Mullis (geb. 1944) mit der Polymerase-Kettenreaktion, einer Methode zur Vervielfältigung von DNA *in vitro*[21], der nächste Meilenstein. Durch diese Verfahren war es möglich den bakteriellen Nachweis von vorab schwer oder nicht kultivierbaren Bakterien zu führen. Beide Methoden etablierten sich bis heute in der Forschung bzw. dem klinischen Erregernachweis. Als Grundlage für die Entwicklung der High-Output Sequenzierungen waren beide Methoden elementar wichtig.

Dauerte die vollständige Entschlüsselung des menschlichen Genoms zu Beginn des Humanen Genom Projektes (HGP), als Vorgänger des Humanen Mikrobiom Projektes (HMP), noch unter Mithilfe von hunderten internationalen Laboren mehrere Jahre und verschlang in etwa 3 Milliarden US-Dollar, kann das komplette menschliche Genom inzwischen von einem einzigen Labor in nur wenigen Tagen sequenziert werden. Grundlage dieser rasanten Entwicklung sind Next-Generation-Sequencing-Methoden (NGS), auch High-output-Sequenzierungen genannt[22, 23].

Die Ergebnisse der Sequenzierung werden in einer aufwendigen, rechenintensiven Datenverarbeitung aufbereitet. Arbeitet man mit mikrobiologischer rRNA, lassen sie sich mit phylogenetischen Datenbanken (z.B. Greengenes, Ribosomal Database (RDP)-Datenbank von Silva) abgleichen.

In der inzwischen 3. Generation können 16S-rRNA Fragmente in voller Länge sequenziert werden. Dies ermöglicht eine größere Sequenziertiefe bis hin zu den Spezies und Subspezieslevel, sowie Aussagen über funktionelle Aspekte der einzelnen Taxa, wie z.B. Antibiotikaresistenzen[24]. Weiterhin werden neben bakterieller rRNA auch virale, eukaryote und Bestandteile aus Archaeen mit jeweiliger Stoffwechselleistung detektiert. Somit können funktionale Analysen über alle Domänen durchgeführt werden, wodurch weniger Pathogene unentdeckt bleiben[25-27]. Diese sogenannte Shotgun Metagenom Sequenzierung lässt auf vielversprechende

Erkenntnisse mit Implementierung in den klinischen Alltag in den nächsten Jahren hoffen.

Bei allen Möglichkeiten der NGS-Methoden fallen Kontaminationen gerade bei Proben mit geringer DNA-Menge, wie sie besonders in der Lunge zu finden sind, stärker ins Gewicht. Daher sollten die Ergebnisse stets mit der Frage nach Kontamination kritisch überprüft werden. Ein Leitfaden zum Umgang mit unvermeidlichen Kontaminationen findet sich bei Eisenhofer et al.[28].

1.2.2. Das Human Microbiom Project (HMP)

Im Jahr 2008 wurde das Human Microbiom Project vom US-amerikanischen National Institute of Health (NIH) ins Leben gerufen. Ziel des Projektes war die Erfassung des mikrobiellen Genoms in verschiedenen Körperarealen am Menschen. Untersucht wurden folgende Punkte:

1. Vorteile von neuen Sequenzierungsmethoden für die Charakterisierung des humanen Mikrobioms.
2. Feststellung von Assoziationen zwischen Veränderungen im Mikrobiom bei Gesundheit und Krankheit.
3. Einführung von standardisierten Datensätzen und technologischen Neuerungen zur Nutzung durch die wissenschaftliche Gemeinschaft[29].

Von insgesamt 242 gesunden Erwachsenen wurde das Mikrobiom aus dem Darm, der Vagina, der Haut und dem Mund untersucht. Die Probenentnahme erfolgte dabei aus 15 Körperregionen bei Männern bzw. 18 bei den Frauen. 131 der Probanden wurden zu einem späteren Zeitpunkt nochmals untersucht.

Bei der Auswertung der Ergebnisse zeigten sich sowohl intra- als auch interindividuelle Unterschiede. Es wurde eine große interindividuelle Variabilität der mikrobiellen Zusammensetzung festgestellt. Zwischen den einzelnen Körperregionen unterschied sich die Anzahl und Häufigkeit der OTU deutlich voneinander[30].

Zum Zeitpunkt der Publikation umfasste der Datensatz 5177 mikrobielle taxonomische Profile von 16S rRNA Genen und über 3,5 Terabyte von metagenomischen Sequenzen. Parallel wurden über 800 humane Referenzgenome sequenziert. Ziel war es eine Referenzdatenbank mit 3000 isolierten mikrobiellen Genomsequenzen zu generieren[31, 32].

Das Human Microbiom Project schuf somit die Grundlage für weitere Erforschung des Mikrobioms.

1.3. Bisherige Forschungsergebnisse

An Grenzregionen des Körpers wie Haut, Schleimhäuten wie der Vagina, der Mundhöhle oder auch dem Darmmikrobiom gibt es zunehmend Hinweise darauf, dass eine Veränderung der mikrobiellen Zusammensetzung pathogene Effekte auf den menschlichen Körper haben und somit eine Rolle bei der Entstehung von Krankheiten spielen kann. Gleichzeitig wirkt eine ausgeglichene Standortflora protektiv auf den Organismus und verhindert Erkrankungen.

An der Haut gelten die zu den Pilzen gehörigen *Malassezia* Spezies zur normalen Hautflora und wirken protektiv. Bei der seborrhoischen Dermatitis kommt es zu einer Reduktion dieser Spezies[33], während eine Überwucherung mit *Malassezia furfur* zu einer Pityriasis versicolor führen kann.

Der Darm ist, bezogen auf das Mikrobiom, die meist betrachtete Region des menschlichen Körpers. Schon vor Zeiten der NGS-Methoden war bekannt, dass der Darm bis zu 1000 Spezies beherbergt. In einer Arbeit von Frank et al. aus dem Jahr 2007 wurden bereits zwischen 15000 und 36000 Spezies beschrieben[34]. Die Richness nimmt von oral nach aboral zu. Das Core Mikrobiom bilden dabei Bakterien der Phyla *Bacteroidetes* und *Firmicuten*.

Das adulte Darmmikrobion entwickelt sich mit dem Heranwachsen. Verschiedenste Einflussfaktoren spielen dabei eine Rolle[35]. Mittlerweile geht man davon aus, dass Volkskrankheiten wie Diabetes mellitus, Fettleibigkeit und das Metabolische Syndrom mit Veränderungen des gastrointestinalen Mikrobioms vergesellschaftet sind[36]. Im Falle des Diabetes mellitus Typ II konnte für *Bifidobacterien* in vitro und im Maus Modell, sowie für *Lactobacillen* im Maus Modell einen direkten Einfluss auf den Glukosestoffwechsel nachgewiesen und eine protektive Wirkung gezeigt werden[37-39].

Bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurde das Vorkommen einer Dysbiose mit einer Zunahme von *Proteobacterien* und *Bacteroidetes* beschrieben, währenddessen *Firmicuten* weniger häufig nachgewiesen werden konnten. Dieses führt zu einer vermehrten immunvermittelten lokalen Entzündungsreaktion[40].

Seit ihrer Erstbeschreibung durch Albert Sigmund Gustav Döderlein im Jahr 1892 wurden Lactobazillen in der Vagina erforscht. Sie gelten mit ihrem Einfluss auf den pH-Wert und die Produktion von Wasserstoffperoxyd als protektiver Faktor gegen-

über pathologischen Erregern[41]. Man fand heraus, dass sich das gesunde Mikrobiom durchaus unterscheiden kann. So spielt zum Beispiel die ethnische Herkunft eine Rolle[42]. Ähnlich zum Darmmikrobiom, führt auch in der Vagina eine Abnahme der mikrobiellen Diversität mit Abnahme der Lactobazillen und Zunahme von Anaerobiern zur erhöhten Krankheitsprävalenz[43]. Dieses konnte anhand der bakteriellen Vaginose durch PCR basierte Analysen von Vaginalabstrichen gezeigt werden[44]

1.4. Das pulmonale Mikrobiom

1.4.1. Geringe Beachtung und das Problem der Probengewinnung

Über das pulmonale Mikrobiom war lange Zeit wenig bekannt. Ursächlich dafür ist zum einen, dass eine Untersuchung im „Human Microbiom Projekt“ ausblieb. Proben aus dem unteren Respirationstrakt wurden nicht gewonnen[30]. Zum anderen ging man aufgrund von Beobachtungen aus kulturabhängigen Studien davon aus, dass die Lunge ein steriler Raum ist, der ausschließlich bei Infektionen oder strukturellen Erkrankungen der Lunge bakteriell kolonisiert oder infiziert wird[45, 46]. Quantitativ sind in der Lunge im Vergleich zum Darm erheblich weniger Bakterien zu finden[47-49].

Im Gegensatz zu den Proben aus den Regionen des „Human Microbiom Projekt“ (Stuhlproben, Haut-, Vaginalabstriche) ist die kontaminationsarme Gewinnung von Material aus den unteren Atemwegen mit einem höheren Maß an Invasivität und technischem Aufwand verbunden. Der einfachste Weg zur Gewinnung von Material aus den unteren Atemwegen ist das expektorierte Sputum. Es handelt sich hierbei allerdings um ein Gemisch von Material aus oberen und unteren Atemwegen, aus bronchiale, trachealem, nasalem und oralem Sekret. Folgerichtig findet sich eine erhebliche Überlappung von oralem und Sputummikrobiom[50, 51]. Dadurch ist die Zuordnung von Probenanteilen aus den unteren Atemwegen erschwert. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Keimzahlen im Oropharynx bei kulturellen Untersuchungen um mehrere Zehnerpotenzen höher als in den unteren Atemwegen liegen, selbst wenn dort eine Infektion vorliegt[52, 53]. Zur gezielten, kontaminationsarmen Probengewinnung aus den unteren Atemwegen hat sich daher die bronchoskopische Probengewinnung per bronchoalveolärer Lavage (BAL), alternativ im Einzelfall auch als Bürstenzytologie, etabliert[54].

1.4.2. Die Zusammensetzung des pulmonalen Mikrobioms beim gesunden Menschen

Die ersten Arbeiten zum pulmonalen Mikrobiom wurden von einem Großteil der wissenschaftlichen Gemeinschaft in Frage gestellt. Die Zusammensetzung der gefundenen Mikroorganismen im oberen und unteren Respirationstrakt ähnelte sich in einem solchen Ausmaß, dass eine Kontamination aus den oberen Atemwegen bei der Probengewinnung in den unteren Atemwegen als wahrscheinlich angesehen wurde[52]. Durch Arbeiten von Bassis et al. [55] und Segal et al.[53] gilt die Theorie der Kontamination als weitgehend widerlegt. In beiden Arbeiten wurden 2 BAL aus unterschiedlichen Lungenlappen ohne zwischenzeitliches Entfernen des Bronchoskopes aus den unteren Atemwegen durchgeführt. Segal et al. nutzte dabei zum Vergleich 2 Bronchoskope. Beide wurden über einen nasalen Zugangsweg platziert, da dieser bei einer geringeren bakteriellen Besiedlung gegenüber dem Oropharynx, weniger Kontamination versprach[56]. Mit dem ersten Bronchoskop wurde eine supraglottische Probe entnommen, mit dem Zweiten dann die beiden Proben aus unterschiedlichen Lungenlappen. Der Vergleich der beiden BAL Proben zeigte keinen Unterschied in der mikrobiellen Zusammensetzung oder der bakteriellen Biomasse. Dem gegenüber konnten Unterschiede zu den supraglottischen und oralen Proben nachgewiesen werden. Die Autoren schlossen daraus, dass es sich bei den BAL Proben nicht um Kontaminationen aus den oberen Atemwegen handele.

Die Lunge wird mit den oberen Atemwegen, wie Nase, Mund und Trachea zu einem größeren Ökosystem zusammengefasst, wobei die einzelnen Subsysteme durch unterschiedliche Haupttaxa besiedelt werden. Zum oralen Core Mikrobiom zählen *Prevotella*, *Streptococcus* und *Veillonella*[57-59], nasal finden sich bei Erwachsenen vermehrt *Corynebakterien*, *Propionibakterien* als auch *Staphylokokken*, manchmal auch *Moraxella* und *Pneumokokken*[60, 61].

Das pulmonale Mikrobiom unterliegt dynamischen Schwankungen. Sie werden beeinflusst von Faktoren wie:

- Immigration (Inhalation, Mikroaspiration etc.)
- Elimination (Hustenreflex, mukoziliäre Clearance etc.)
- lokale Wachstumsbedingungen (Oxygenierung, Temperatur etc.)[62, 63].

Kommen diese Faktoren aus dem Gleichgewicht, z.B. durch Unterbindung des Hustenreflexes im Rahmen einer Intubation, veränderten Wachstumsbedingungen durch strukturelle Lungenveränderungen, Aspirationen bei Schluckstörungen oder

unter Einfluss von Alkohol/Medikamenten, wird die Homöostase durchbrochen und die natürliche mikrobielle Zusammensetzung verändert. Die Folge können Pneumonien oder strukturelle Lungenerkrankungen sein[64].

In Arbeiten, die sich an BAL-Proben und bronchialen Bürstenzytologien von Gesunden orientieren, finden sich am häufigsten auf Phylum-Ebene *Bacteroidetes*, *Firmicutes* und *Proteobacterien*[14, 52, 65-67]. Wird auf Ebene der Genera sequenziert, trifft man vorwiegend *Prevotellen*, *Veillonellen* und *Streptokokken* an[53, 55].

Die Hauptgenera in den bisher durchgeführten Studien stimmen größtenteils überein. Intra- wie interindividuell lassen sich in der Verteilung der Taxa jedoch Unterschiede nachweisen. Dickson et al. zeigten eine Abnahme der Richness mit steigender Distanz vom supraglottischen Raum zur Peripherie[68]. Diese Ergebnisse konnten von Charlson et al.[52] und Segal et al. [53] untermauert werden.

Aus solchen Beobachtungen heraus wurden verschiedene Modelle der bakteriellen Besiedlung der Lunge entwickelt. Das bekannteste ist das „Adapted Island Modell“ nach Dickson et al.[62, 64, 68], in Anlehnung an das ökologische Modell „Equilibrium model of island biogeography“ von MacArthur und Wilson aus dem Jahre 1963[69]. Man schlussfolgerte darin, dass die Richness auf Speziesebene ohne Selektionsdruck nur durch die Immigration und das Aussterben determiniert ist. Dickson passte dieses Modell an die Gegebenheiten der Anatomie des Respirationstraktes und die mikrobielle Zusammensetzung an und postulierte, dass das Verhältnis von Immigration und Elimination in der gesunden Lunge stabil ist. Ob es bei Gesunden zu einer echten Kolonisation kommt oder ob es sich um eine transiente Immigration mit rasch folgender Elimination handelt, bleibt bislang unklar.

Zusammenfassend lässt sich zum Mikrobiom in der gesunden Lunge folgendes sagen:

- Unklar bleibt ob die Lunge von gesunden Menschen steril ist. Sie scheint allerdings einer bakteriellen Besiedlung zu unterliegen.
- Es lassen sich mindestens 3 führende Erregerphyla bzw. Genera nachweisen.
- Die Zusammensetzung des pulmonalen Mikrobioms befindet sich in einem dynamischen Gleichgewicht (Homöostase).
- Es wird beeinflusst durch Immigration, Elimination und lokale Wachstumsbedingungen.

- Eine Störung dieses Gleichgewichts kann zur Ausbildung von Krankheiten beitragen.

1.4.3. Veränderungen des „gesunden“ pulmonalen Mikrobioms durch Risikofaktoren und Komorbiditäten

Da die Erkenntnis einer transienten oder permanenten Besiedlung des Respirationstraktes mit Mikroorganismen Einzug in die Wissenschaft gefunden hat, stellt sich im Folgenden die Frage, wie diese durch exogene Noxen und pulmonale Erkrankungen verändert werden. Ein Verständnis dieser Vorgänge ist die Voraussetzung für klinische Fortschritte im Hinblick auf Diagnostik und gezielte Therapieoptionen.

1.4.3.2. Auswirkungen von inhalativem Nikotinkonsum

Das Rauchen ist weltweit mit dem Genuss von Alkohol die am meisten verbreitetste legale Droge. Der inhalative Konsum von Tabak stellt in den Industrienationen das bedeutendste Gesundheitsrisiko und die führende Ursache vorzeitiger Sterblichkeit dar. Darüber hinaus sind Erkrankungen und vorzeitige Todesfälle durch Passivrauchen zu berücksichtigen[70]. Rauchen gilt als gesicherter Risikofaktor für Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems und der Lunge, wie der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) und dem Lungenemphysem, diverser Krebserkrankungen, allen voran dem Lungenkarzinom[71], sowie malignen Erkrankungen der Mundhöhle, des Kehlkopfs und der Speiseröhre.

In der pulmonalen Mikrobiomforschung wird das Rauchen in der Regel im Zusammenhang mit den jeweiligen Grunderkrankungen wie COPD oder Krebserkrankungen betrachtet (s. 1.4.3.3 und 1.4.3.4.).

Mehrere Studien konnten Effekte des Rauchens auf die Architektur der Lunge und das angeborene Immunsystem im Respirationstrakt nachweisen. So steigt bei Rauchern die Anzahl und Aktivität von inflammatorischen Zellen wie Makrophagen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, sowie von Mastzellen[72, 73]. Die Funktion von Makrophagen und neutrophilen Zellen wird ebenfalls gestört[74]. Die immunologische Antwort auf Bakterien ist beeinträchtigt. Diese wiederum begünstigt Erkrankungen der Atemwege wie die COPD, die Cystische Fibrose oder das Asthma bronchiale einhergehend mit einer erhöhten Exazerbationsfrequenz, sowie

schließlich den strukturellen Umbau der Lunge mit Verlust von intaktem Lungengewebe und Ausbildung eines Lungenemphysems sowie eines fibrotischen Umbaus[75, 76].

In einer der ersten Arbeiten zum pulmonalen Mikrobiom von Erb-Downward et al. ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Zusammensetzung des Mikrobioms zwischen Rauchern und Nichtrauchern mit normaler Lungenfunktion in den unteren Atemwegen nachweisen[14]. Zum gleichen Ergebnis kamen Morris et al. in einer größer angelegten Multicenterstudie[77].

Die Frage der Veränderung der mikrobiellen Zusammensetzung von den oberen zu den unteren Atemwegen in Abhängigkeit von aktivem oder stattgehabtem inhalativem Tabakkonsum bleibt dabei unklar. Diese Arbeit soll einen Beitrag zum Verständnis dieser Veränderungen bei aktivem und terminiertem Rauchen liefern.

1.4.3.3. COPD und Lungenemphysem

Ausgehend vom Raucherstatus als wichtigstem Risikofaktor haben wir uns mit den daraus resultierenden strukturellen Lungenerkrankungen COPD und dem Lungenemphysem befasst.

Die COPD ist eine häufige, weitgehend vermeidbare und behandelbare Erkrankung, welche durch persistierende respiratorische Symptome bei vermindertem Atemfluss charakterisiert ist. Ursächlich sind Atemwegs- und alveoläre Veränderungen, die in der Regel durch eine übermäßige Exposition gegenüber Noxen und Gasen hervorgerufen werden kann[78].

Aktuell befindet sich die COPD weltweit unter den TOP 3 Erkrankungen der häufigsten Todesursachen. 90% der Todesfälle sind auf Länder mit mittlerem und niedrigem Einkommen zurückzuführen[79].

Pathophysiologisch kommt es schadstoffbedingt zu einer Störung der Zilienfunktion und Verlust der zilientragenden Zellen. Daraus folgt eine verminderte mukoziliäre Clearance, sowie eine Hyperplasie der schleimbildenden Becherzellen mit vermehrter Viskosität des Sputums. Eine Aktivierung von Makrophagen und Granulozyten führt zu einer lokal erhöhten inflammatorischen Reaktion und zu einem Ungleichgewicht von Proteasen und Antiproteasen mit einer Freisetzung von Sauerstoffradikalen und einer negativen Beeinflussung des Surfactant-Systems. Das Resultat ist eine Dyskrie mit bakterieller, als auch viraler Besiedlung des Bronchialsystems,

sowie eine Zerstörung der Alveolarsepten in der Lungenperipherie mit einem konsekutiven Lungengerüstumbau (zentrilobuläres Lungenemphysem)[80].

In dieser Arbeit finden sich Patienten mit und ohne COPD in stabilen Krankheitsstadien.

Bisherige Arbeiten zeigen bei COPD Patienten ohne Exazerbation in fortgeschrittenen Krankheitsstadien eine Zunahme von *Proteobakterien* wie *Haemophilus influenzae*[81]. Gleiche Beobachtungen konnten für die Verschiebung von einem stabilen zu einem exazerbierten Krankheitsverlauf gemacht werden[82, 83]. Im Gegensatz zur stabilen COPD wurde in der Exazerbation *Moraxella catarrhalis* und *Pseudomonas aeruginosa* signifikant häufiger nachgewiesen[82, 84, 85]. Die Diversität sinkt in allen Arbeiten mit zunehmendem Krankheitsstadium bzw. in der Exazerbation[86]. Bei allen genannten Mikroorganismen in der fortgeschrittenen oder exazerbierten COPD handelt es sich um uns aus den kulturellen Nachweismethoden bekannte fakultativ pathogene Erreger. Das erscheint zunächst wenig überraschend, da es zu einem überproportionalen Wachstum in den exazerbierten Krankheitsverläufen kommt. Dementsprechend lassen sie sich auch in einer höheren relativen Abundanz in den NGS-Methoden nachweisen.

Diese Arbeit soll überprüfen, in wie fern sich diese Erkenntnisse auf ein pulmonal krankheitsstabiles Kollektiv aus Versuchspersonen mit und ohne nachgewiesener struktureller Lungenerkrankung reproduzieren lassen.

Das im Rahmen der COPD auftretende zentrilobuläre Lungenemphysem oder das durch einen Alpha-1-Antitrypsinmangel verursachte panlobuläre Lungenemphysem[87] sind in Bezug auf Veränderung der mikrobiellen Zusammensetzung der unteren Atemwege kaum untersucht. In unserer Arbeit unterzogen sich alle Versuchspersonen einem Computertomogramm des Thorax. Damit kann in dieser Arbeit auch eine Aussage über einen Zusammenhang von mikrobiellen Veränderungen in den unteren Atemwegen und dem Vorliegen eines Lungenemphysems getätigt werden.

1.4.3.4. Lungenkarzinome

Lungenkarzinome oder auch Bronchialkarzinome stellen 25 % aller bösartigen Tumorerkrankungen. 2016 waren sie deutschlandweit beim Mann nach dem Prostatakarzinom die zweithäufigste, bei der Frau nach Brustdrüse und Darm die dritthäufigste Krebserkrankung. Weltweit gesehen ist es die häufigste Krebserkrankung. Bezüglich der krebsbedingten Todesfälle steht das Lungenkarzinom bei Männern an erster, bei Frauen an zweiter Stelle[88]. Hauptrisikofaktor ist das Rauchen. Lungenkarzinome können in kleinzellige und den größeren Anteil der nichtkleinzelligen Karzinome unterteilt werden. Diese wiederum werden in Plattenepithel-, Adeno-, großzellige und seltenere Karzinome mit adenosquamöser, sarkomatoider und neuroendokriner Histologie differenziert[89].

Basierend auf der Annahme, dass die pulmonale Kanzerogenese neben genetischen Faktoren in erster Linie auf die Exposition gegenüber exogenen Noxen zurückgeführt wurde, fand ein Zusammenhang mit dem pulmonalen Mikrobiom erst spät Beachtung in der Krebsforschung. Bis dahin war nur für *Mycobacterium tuberculosis* ein Zusammenhang bekannt. Zurückgeführt wurde dieser auf eine mit chronischer Inflammation assoziierte Kanzerogenese [90, 91].

Aktuelle Arbeiten deuten auf Unterschiede der mikrobiellen Zusammensetzung bei an Lungenkrebs erkrankten gegenüber nicht an Lungenkrebs erkrankten Individuen hin. So konnte eine signifikant erhöhte relative Abundanz von *Veillonella* und *Megasphaera* in Karzinompatienten nachgewiesen werden[92]. *Actinomyces* und *Arthrobacter* wurden häufiger in Plattenepithelkarzinomen gegenüber Adenokarzinomen detektiert[93]. Weiterhin konnte ein vermehrtes Auftreten von *Acidovorax*, *Comamonas*, *Klebsiella*, *Rhodoferrax*, und *Polaromonas* bei kleinzelligen Karzinomen im Gegensatz zu Adenokarzinomen gezeigt werden[94].

1.5. Zielsetzung und Fragestellung

Mit Einführung der NGS-Methoden kam es zu einem rasanten Erkenntniszuwachs über den Einfluss mikrobieller Flora auf den humanen Organismus in verschiedenen Organsystemen. Mit Verspätung wuchs im letzten Jahrzehnt auch zum pulmonalen Mikrobiom die Anzahl der wissenschaftlichen Arbeiten und das Verständnis der Bedeutung eines Mikrobioms in den unteren Atemwegen. Die Übertragbarkeit von Befunden aus den leichter zugänglichen oberen Atemwegen und der Einfluss des Rauchens und häufiger Raucher-assoziiierter Lungenerkrankungen ist jedoch noch unvollständig untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es daher, in einem Kollektiv aus Rauchern und Ex-Rauchern mit und ohne raucherassoziierten Lungenerkrankungen die mikrobielle Zusammensetzung in den oberen und unteren Atemwegen vergleichend zu charakterisieren.

Im Einzelnen sollen folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Gibt es Unterschiede in der bakteriellen Zusammensetzung zwischen den Kompartimenten der oberen und unteren Atemwege?
2. Haben Ausmaß und Dauer des inhalativen Tabakkonsums Auswirkung auf das Mikrobiom der unteren Atemwege?
3. Lassen sich Unterschiede der mikrobiellen Zusammensetzung bei Patienten mit raucherassoziierten Erkrankungen wie der COPD, dem Lungenemphysem und dem Lungenkarzinome nachweisen?

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Materialien

2.1.1. Verbrauchsmaterial

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

2.1.2. Bronchoskopie-Lösungen

Lösung	Hersteller, Firmensitz
Sterile Natriumchlorid (NaCl) 0,9%-Lösung	Fa. Berlin Chemie, Berlin

Vorbereitende Inhalation (2,5ml Inhalationslösung) aus:	
170ml NaCl 0,9%	Fa. Berlin Chemie, Berlin
7ml NaCl 10%	Fa. B. Braun, Melsungen
20 ml Atrovent® 250µg/ml	Fa. Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein
10ml Salbutamol Inhalationslösung	Fa. Ratiopharm, Ulm
Xylocain®-Lösung 2%	Fa. AstraZenecaGmbH, London

2.1.3. Reagenzien, Lösungen und Enzyme

	Hersteller, Firmensitz
Mikrobac® forte (Flächendesinfektionsreiniger)	Fa. BODE, Hamburg
80% Ethanol	Fa. BrüggemannAlcohol, Heilbronn
RPMI 1640 Medium, w. 2.0 g/l NaHCO ₃ , LE (Low Endotoxin)	Fa. Biochrom GmbH, Berlin
FCS (Fetal Calf Serum)	GE Healthcare, Buckinghamshire (Großbritannien)
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
Phusion Hot Start II High fidelity Taq 500 U	Thermo Fisher Scientific, Waltham (Massachusetts, USA)
OB Protease 30 mg	Peqlab, Erlangen

2.1.4. Verwendete Kits

	Hersteller, Firmensitz
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)
Qubit® dsDNA BR (Broad Range) Assay Kits	Thermo Fisher Scientific, Waltham (Massachusetts, USA)
Sybr Green I Master Kit	Roche, Rotkreuz (Schweiz)

2.1.5. Primer

Primer	Hersteller, Firmensitz
16S rRNA V3/V4	Metabion, Planegg/Steinkirchen
qPCR 16S und 18S	qPCR 16S und 18S

Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang unter 7.1. aufgelistet.

2.1.6. Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller, Firmensitz
Sterile Werkbank	Class II A/B3, Biosafety Cabinet	Fa. Nuair™, Plymoth (USA)
Videobronchoskop	BF 1TQ180, BF 1T180	Fa. Olympus, Hamburg
Autoklave	Laboklav	Fa. SHP, Detzel Schloss/Satuelle
Zentrifuge	Rotina 38R, Rotina 35R	Fa. Hettich, Tuttlingen
Brutschrank	New Brunswick™ Galaxy® 170S	Fa. Eppendorf, Hamburg

Gefrierschrank	Gallenkamp Super Cold 85	Fa. Thermo Scientific (ehem. Gebr. Haake), Karlsruhe
Waage	AG204 Delta Range®	Fa. 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)
Transilluminator	TFX 20M	Vilber Lourmat, Col-légien (Frankreich)
Fluorometer	Qubit® 2.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham (Massachusetts, USA)

2.2. Das Kollektiv der Versuchspersonen

Über einen Beobachtungszeitraum von 14 Monaten wurden fortlaufend Versuchspersonen mit Verdacht auf pulmonale Raumforderungen in die Studie eingeschlossen. Diese unterzogen sich im Rahmen der weiteren Abklärung bei klinischer Indikation einer Bronchoskopie. Die anatomische und funktionelle Operabilität war Voraussetzung für die Aufnahme in die Studie, da das Kollektiv auch im Hinblick auf eine zusätzliche Gewebentnahme (s. Dissertation Frau Dr. Lena Roos, geb. Reinhold, im Folgenden L.R.) ausgewählt wurde. Das Vorliegen von Fernmetastasen oder ein lokoregionär fortgeschrittenes Stadium führten zum Ausschluss aus der Studie. Das Gesamtkollektiv der Studienteilnehmer setzte sich aus 34 Versuchspersonen zusammen, die eine diagnostische Bronchoskopie mit BAL erhielten (n=34). Dabei wurden Proben der Versuchspersonen 1 (erste Versuchsperson BAL)

und 14 (Lungengewebsprobe ohne vorherige BAL) zur Etablierung des methodischen Vorgehens genutzt. Beide Versuchspersonen schlossen wir nicht in die Studie ein. Bei der Versuchsperson 23 wurde vor der BAL kein Rachenabstrich gewonnen. Aufgrund der zentralen Rolle der Probenentnahme aus dem Rachenraum in dieser Arbeit, kam es ebenfalls zum Ausschluss aus der Studie. Insgesamt ergab sich also ein Gesamtkollektiv von $n=31$ nach Protokoll vollständig untersuchten Versuchspersonen. Dies umfasste 19 männliche und 12 weibliche Versuchspersonen in einem Alter von 45 bis 82 Jahren. 17 von ihnen waren aktive Raucher mit einer durchschnittlichen Anzahl von 37,2 pack years, 14 Ex-Raucher mit einer durchschnittlichen Anzahl von 40 pack years.

Um eine durch akute Exazerbationen oder Infekte bedingte Veränderung des Mikrobioms innerhalb des Zeitraums der Probengewinnung zu minimieren, wurde ein infektfreies Intervall von 90 Tagen vor Bronchoskopie angestrebt. Eine systemische Antibiotikatherapie fand bei 8 Versuchspersonen innerhalb der letzten 90 Tage statt. Von diesen befanden sich 2 zum Zeitpunkt der BAL in einer antibiotischen Therapie. Anhand eines standardisierten Patientenfragebogens wurden weitere Parameter ermittelt: Alter, Geschlecht, BMI, Raucherstatus mit kumulativen Packungsjahren (pack years, abgekürzt py), Medikation inklusive stattgehabter Antibiotika- und Steroidtherapien, Vorliegen einer pulmonalen Grunderkrankung, ggf. mit Exazerbationen. Weiterhin wurden Ergebnisse von Voruntersuchungen wie: Lungenfunktions-tests, Computertomographie und Labordiagnostik dokumentiert (Patientenfragebogen s. Anhang 7.4).

Die Einteilung der COPD erfolgte anhand der zu Studienbeginn gültigen Fassung der GOLD-Klassifikation (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease[95, 96]). Im Verlauf der Datenerhebung änderten sich die GOLD-Guidelines unter Einbeziehung der Symptomatik und der Exazerbationsfrequenz. Die forcierte Einsekundenkapazität (FEV_1) und der Tiffeneau-Index (FEV_1 im Verhältnis zur forcierten Vitalkapazität (FVC)) bildeten weiterhin die Basis der Diagnostik und Einteilung, sodass wir für die weitere Datenerhebung an diesem Schema festhielten. Im Rahmen der präoperativen Diagnostik unterzogen sich alle Patienten vor der bronchoalveolären Lavage einer Lungenfunktionsprüfung, anhand derer mittels der spirometrisch ermittelten FEV_1 und des Tiffeneau-Index das jeweilige GOLD Stadium festgelegt

wurde. Die FEV1 betrug im Gesamtkollektiv im Mittel 65,7% mit einer Schwankungsbreite von 25-99%, der Tiffeneau-Index lag zwischen 39-108% bei einem Mittelwert von 67,1%. Hieraus ermittelten wir 17 an COPD erkrankte Versuchspersonen mit einem durchschnittlichen Stadium von 2,5 nach GOLD. Bei den Versuchspersonen 4 (vorbefundlich langjährig spirometrisch gesicherte COPD), 10 und 12 (Heimsauerstofftherapie) wurde eine Abweichung von der Einteilung der COPD anhand der aktuellen Spirometrie vorgenommen (s. Tabelle 1). Die Anzahl nicht an COPD erkrankten Versuchspersonen betrug 12.

Die Auswertung aller radiologischen Untersuchungen erfolgte durch die Klinik für Radiologie des UKSH Lübeck. Hierbei wurden Emphyseausprägung, Bronchiektasen, als auch Bronchialwandverdickungen betrachtet und definiert (befundet durch Dr. Fabian Jacob, Klinik für Radiologie des UK-SH Lübeck). Diese Beurteilung erfolgte in Ober-, Mittel- und Unterlappen jeweils seitengetreunt (siehe Anhang 7.5). Somit konnte im Folgenden unter Kenntnis der Probenlokalisierung der BAL, eine fachgerechte Aussage über morphologische Veränderungen des jeweiligen Probenlappens getätigt werden. Da das Vorliegen von Bronchiektasen (n=2) und Bronchialwandverdickungen (n=1) im Probenlappen kaum eine Rolle spielte, werden diese beiden Parameter aufgrund der geringen Anzahl von Übereinstimmungen in dieser Arbeit nicht weiter erörtert. Hinsichtlich des Emphysemnachweises stimmten bei insgesamt 15 von insgesamt 16 Versuchspersonen mit radiologisch nachgewiesenem Emphysem die BAL Probenlokalisierungen mit dem betroffenen Lappen überein.

Die Rekrutierung des Versuchspersonenkollektivs, Planung der Versuchsreihen als auch Verarbeitung des Untersuchungsmaterials erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau L.R. (Doktorandin der medizinischen Klinik III des UK-SH Lübeck).

L.R. hat in ihrer Dissertation[15] eine durch Lungenteilresektion behandelte Subgruppe des hier geschilderten Versuchspersonenkollektivs bearbeitet (n=13) mit dem Fokus auf Veränderungen des Mikrobioms im Lungengewebe im Vergleich zu den unteren Atemwegen. Der Schwerpunkt dieser Arbeit hingegen liegt in dem Vergleich der mikrobiellen Zusammensetzung in den oberen und unteren Atemwegen des Gesamtkollektivs und deren Assoziation mit Grunderkrankungen, der radiologischen Lungenmorphologie sowie exogenen Einflussfaktoren (n=31).

Die klinischen Daten aller in die Studie eingeschlossenen Versuchspersonen sind in den folgenden beiden Tabellen aufgelistet.

Tabelle 1: Klinische Daten und bronchopulmonale Grunderkrankungen

Versuchs-person	Ge-schlecht	Alter	Raucherstatus/ py	FEV1%	FEV1/ FVC%	COPD Ja/Nein Stadium	Lungenem- physem im Probenlappen
2	m	68	Ex-R/50	66	63	Ja, 2	Ja
3	w	73	R/50	49	64	Ja, 3	k.A.
4	m	58	R/68	70	71*	Ja, 2*	Ja
5	m	50	R/30	62	61	Ja, 2	Nein
6	m	82	Ex-R/35	72	75	Nein	Nein
7	w	45	R/25	Fehlt	Fehlt	Fehlt	Nein
8	m	61	Ex-R/60	36	54	Ja, 3	Ja
9	m	61	Ex-R/110	42	52	Ja, 3	Nein
10	w	74	Ex-R/50	31	55*	Ja, 4*	Nein
11	w	62	R/22	51	51	Ja, 2	Ja
12	m	74	Ex-R/30	25	72*	Ja, 4*	Ja
13	m	63	Ex-R/40	72	62	Ja, 2	k.A.
15	w	74	R/25	77	55	Ja, 2	Nein
16	w	82	Ex-R/5	Fehlt	Fehlt	Fehlt	Ja
17	m	73	R/60	50	51	Ja, 2	Nein
18	w	56	R/9	72	78	Nein	k.A.
19	w	77	Ex-R/30	41	59	Ja, 3	Ja
20	m	51	R/18	77	69	Ja, 2	Nein
21	m	74	Ex-R/30	69	69	Ja, 2	Nein
22	m	58	R/40	35	39	Ja, 3	Ja
24	w	68	R/40	74	81	Nein	Nein
25	m	61	R/40	75	78	Nein	Ja
26	m	59	R/40	60	78	Nein	Nein
27	m	58	Ex-R/5	94	75	Nein	Nein
28	w	72	R/fehlt	90	108	Nein	Nein
29	w	67	Ex-R/30	86	72	Nein	Nein
30	m	73	Ex-R/60	87	76	Nein	Nein
31	m	61	R/30	79	77	Nein	Ja
32	m	50	R/43	99	74	Nein	Ja
33	w	63	Ex-R/25	88	74	Nein	Ja
34	m	69	R/50	76	53	Ja, 2	Ja

Alter zum Untersuchungszeitpunkt, w = weiblich, m = männlich, R = Raucher, Ex-R = Ex-Raucher, py = packyears (Packungsjahre), FEV1 = Einsekundenkapazität (forciertes expiratorisches Volumen; FEV1% = FEV1 bezogen auf Referenzkollektiv, FEV1/FVC%= Tiffeneau Index, *= In der Vorbefunden nachgewiesene COPD, bzw. Heimsauerstoffbedarf, k.A.= keine Angabe

In der histologischen Aufarbeitung wurde bei 24 Versuchspersonen ein Lungenkarzinom nachgewiesen, darunter 12 Adenokarzinome, 9 Plattenepithelkarzinome und 3 kleinzellige neuroendokrine Karzinome. In 3 Fällen konnte eine benigne Tumorentität nachgewiesen werden. In je einem Fall wurde der Tumor nicht erfasst, ein pleuraler solitärer Tumor, eine unspezifische Entzündung und eine Aspergillose nachgewiesen.

Tabelle 2: Histologie

Versuchsperson	Histologie	Tumorstadium (UICC)
2	n.e.	*
3	Adenokarzinom	IIIA
4	Plattenepithelkarzinom	IA2
5	Kein Tumornachweis	
6	Adenokarzinom	IVA (ple)
7	Adenokarzinom	IVB
8	Adenokarzinom	IVB
9	fibröser pleuraler solitärer Tumor	
10	kleinzelliges neuroendokrines Karzinom	IIIA
11	Adenokarzinom	IIA
12	Plattenepithelkarzinom	IB
13	Plattenepithelkarzinom	IIB
15	Plattenepithelkarzinom	IA
16	Plattenepithelkarzinom	IIB
17	Plattenepithelkarzinom	IB
18	Adenokarzinom	IIB
19	kleinzelliges neuroendokrines Karzinom	IIIA
20	unspezifische Entzündung	
21	Adenokarzinom	IIB
22	Adenokarzinom	IB
24	Adenokarzinom	IIA
25	Plattenepithelkarzinom	IIA
26	Lipom	

27	Lipom	
28	Adenokarzinom	IA
29	Adenokarzinom	IIIA
30	Plattenepithelkarzinom	IIA
31	Plattenepithelkarzinom	IA
32	Aspergillose	
33	großzelliges neuroendokrines Karzinom	IIA
34	Adenokarzinom	IVB

n.e.= Tumor in transbronchialer Probeexzision nicht erfasst; ple= pleuraler Befall; * aus weiterer Abklärung entzogen

2.3. Ethikvotum und Aufklärung der Studienteilnehmer

Alle Studienteilnehmer wurden vor der Probengewinnung in mündlicher und schriftlicher Form mittels Aufklärungsbogen (s. Anhang 7.2.) über das Studienvorhaben, die Probengewinnung, die Ziele der Studie und die Verwendung des Materials informiert. Die Aufklärung über die Studie erfolgte sowohl von den Doktoranden des Projektes, als auch separat nochmals von Ärzten der Medizinischen Klinik III des UK-SH Lübeck. Die Krankengeschichte der Studienteilnehmer vervollständigten wir mit Hilfe pro- und retrospektiv erhobener Befunde. Alle Studienteilnehmer willigten schriftlich in das Vorhaben ein (Einverständniserklärung s. Anhang 7.3.). Die Speicherung der Daten erfolgte in pseudonymisierter Form auf einem Computer des Forschungslabors der Medizinischen Klinik III des UK-SH Lübeck.

Die Ethikkommission der Universität zu Lübeck hat den Ethikantrag (Nummer des Ethikantrag: AZ 14-061) hinsichtlich der durchgeführten Maßnahmen zur Materialgewinnung und der Verwendung des Patientenmaterials am 04.05.2014 geprüft und genehmigt.

Entsprechend des Ethikvotums stimmt diese Studie mit der geltenden Fassung der Deklaration von Helsinki (Oktober 2013) überein.

2.4. Materialgewinnung

Um eine mögliche Keimverschleppung von den oberen in die unteren Atemwege zu vermeiden und eine Vergleichbarkeit zu schaffen, etablierten wir ein stufenweises Vorgehen bei der Materialgewinnung und Verarbeitung. Beides soll im Folgenden weiter erläutert werden.

2.4.1. Sterilisation und Vorbereitung der Probenentnahmematerialien

Zur Vorbereitung der Materialgewinnung wurden sämtliche 15ml und 50ml Röhren unter der Sterilbank im Forschungslabor der Medizinischen Klinik III des UK-SH Lübeck 10 Minuten lang mit UVC-Licht der Länge 200-280nm und 1.7 W bestrahlt. Die Dekantierung der sterilen Natriumchlorid (NaCl) 0,9%-Lösung in die jeweiligen Röhren führten wir ebenfalls unter o.g. Sterilbank durch. Diese wurde vor und nach jeder Nutzung mit 80% Ethanol und 10 minütiger UV-Licht-Bestrahlung gereinigt, desinfiziert und sterilisiert.

2.4.2. Rachenabstrich und Rachenspülwasser

Zu Beginn der Probengewinnung führten wir einen Rachenabstrich durch. Der Abstrich wurde mittels sterilem Abstrichtupfer von der Rachenhinterwand genommen. Nicht immer konnte eine einwandfreie Probengewinnung der Rachenhinterwand erfolgen, da der Studienteilnehmer z.B. unwillkürliche Zungenbewegungen und Abwehrbewegungen ausführte. Aus diesem Grund veranlassten wir im Verlauf der Phase der Materialgewinnung eine zusätzliche Rachenspülung. Die Patienten wurden aufgefordert mit 10ml steriler NaCl 0,9%-Lösung den Mund auszuspülen. Diese wurde zuvor in einem 15 ml Röhren abgefüllt. Anschließend gurgelte der Studienteilnehmer eine größere Menge NaCl 0,9%-Lösung. Die Rachenspülung überführte er in ein steriles 50ml Röhren. Beides wurde vor der vorbereitenden Inhalation zur Bronchoskopie durchgeführt.

2.4.3. Supraglottische Absaugung und bronchoalveoläre Lavage

Zu Beginn bereiteten wir alle Materialien steril vor. Als erstes wurde ein steriles Abdecktuch auf einem zuvor desinfizierten Metalltisch ausgebreitet. Zehn Spritzen a 20 ml sind mit Hilfe eines Spikes mit 10 ml steriler NaCl 0,9%-Lösung aufgezogen und mit einem sterilen Stopfen verschlossen worden. Alle verschlossenen Spritzen wurden dann auf den steril abgedeckten Tisch platziert. Die vorbereitende Person

trug hierbei einen Mundschutz, sowie einen Schutzkittel und sterile Handschuhe. Der bronchoskopierende Arzt trug während der Bronchoskopie die gleiche Schutzkleidung.

Zu Beginn der Bronchoskopie führte dieser eine supraglottische Absaugung aus den Recessus piriformis durch. Das abgesaugte Material wurde über einen Absaugschlauch mit einer Absaugfalle aufgefangen.

Nach der supraglottischen Absaugung wurde das verwendete Bronchoskop zwecks Vermeidung der Verschleppung von Keimen von den oberen in die unteren Atemwege gegen ein Videobronchoskop ausgetauscht (Two scope Technik[52]). Das Videobronchoskop wurde mit einem sterilen Saugventil und einem sterilen Verschluss des Biopsiekanals bestückt.

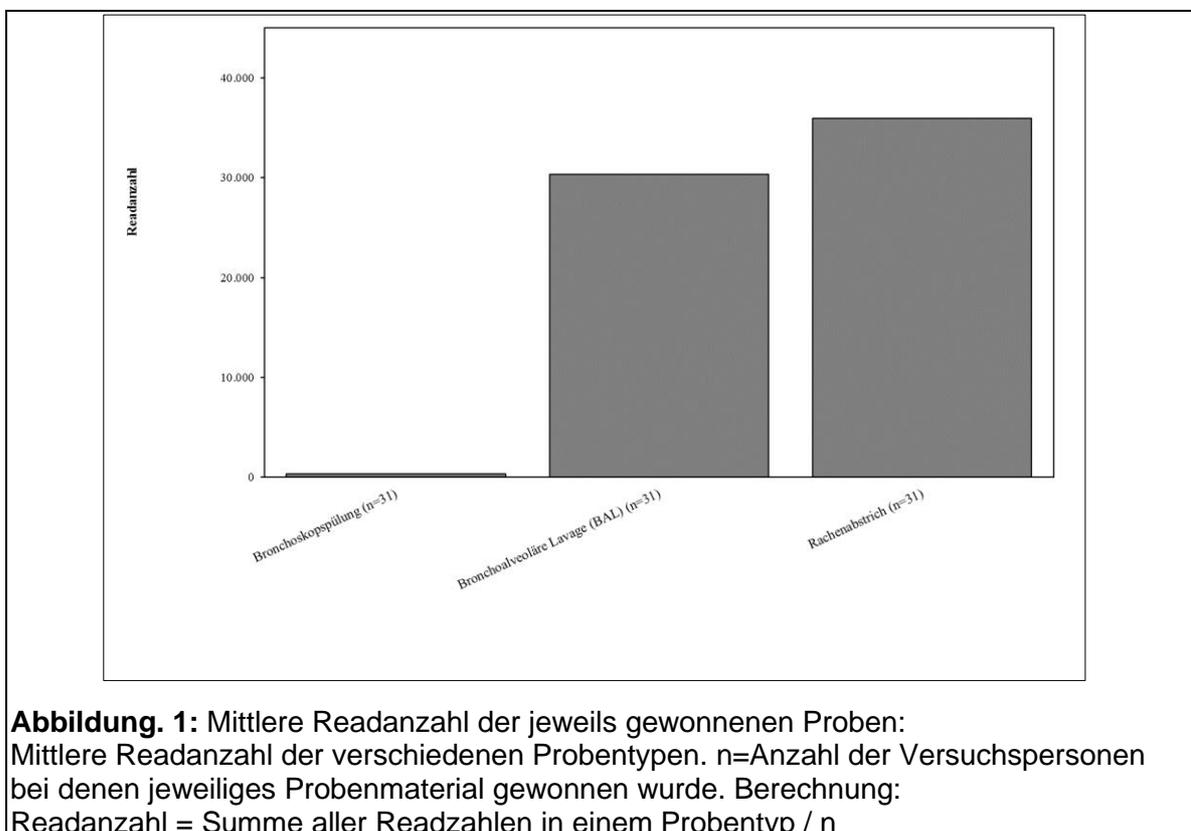
Zur Negativkontrolle spülte der Arzt vor Insertion das Videobronchoskop zunächst mit 10 ml der vorbereiteten NaCl 0,9%-Lösung und fing sie in einem 50 ml Röhrchen auf. Anschließend erfolgte die transorale Vorspiegelung direkt in einen vom Tumor makroskopisch nicht befallenen Lungenlappen und führte dort die BAL durch. Bei den Studienteilnehmern VP 32 und VP 33 wurde die BAL unmittelbar präoperativ durchgeführt. Nacheinander wurden die vorbereiteten 20 ml Spritzen in den Lungenlappen injiziert und mit der gleichen Spritze aspiriert. Die Spritzen mit dem gewonnenen Material verschlossen wir umgehend wieder mit den Stopfen.

Tabelle 3: Übersicht gewonnenes Probenmaterial

Versuchsperson	BAL	Rachenabstrich
2	x	x
3	x	x
4	x	x
5	x	x
6	x	x
7	x	x
8	x	x
9	x	x
10	x	x
11	x	x
12	x	x
13	x	x
15	x	x
16	x	x

17	x	x
18	x	x
19	x	x
20	x	x
21	x	x
22	x	x
24	x	x
25	x	x
26	x	x
27	x	x
28	x	x
29	x	x
30	x	x
31	x	x
32	x	x
33	x	x
34	x	x
Gesamt	n=31	n=31

X= Probe vorhanden



Der Rachenabstrich, die BAL, sowie die Bronchoskopspülung wurden bei allen Versuchspersonen durchgeführt. Die Bronchoskopspülung wies als Negativkontrolle kaum Readzahlen auf. Hiernach ist von einer relevanten Kontamination aus dem Oropharynx im Rahmen der Untersuchung nicht auszugehen.

2.4.5. Weitere Verarbeitung der Materialien

Vorbereitend für den Transport von der Bronchoskopie zum Forschungslabor wurde ein Metallbehälter mit einem Flächendesinfektionsmittel gereinigt, mit 80% Ethanol benetzt und unter UV-Bestrahlung getrocknet. Anschließend erfolgte die Sterilisierung in der Autoklave.

Alle Proben brachten wir in dem gedeckelten Metallbehälter zur Sterilbank des Forschungslabors und verarbeiteten sie dort weiter. Die Sterilbank war, wie in 2.4.1. beschrieben, vorbereitet. Die Spritzen mit den BAL-Proben überführten wir hier mit desinfizierten und behandschuhten Händen in 50 ml Röhrchen. Alle so gewonnenen Flüssigproben (Rachenspülwasser, supraglottische Absaugung, BAL und Sputum) wurden in einer Zentrifuge mit 11000 revolutions per minute (rpm) 30 Minuten lang zentrifugiert. Den Überstand dekantierten wir unter der Sterilbank und verwarfen ihn. Lediglich der Überstand der BAL wurde asserviert. Die verbleibenden Pellets, der BAL-Überstand und der Abstrichtupfer wurden bei -80°C eingefroren.

2.5. Vorbereitung des Probenmaterials zur Mikrobiomanalyse

2.5.1. DNA-Extraktion aus dem Probenmaterial

In Vorbereitung zur DNA Sequenzierung musste aus allen gewonnenen Proben zunächst die DNA isoliert und mittels PCR vervielfältigt werden.

Für das Extrahieren der DNA wurde ein handelsübliches Kit verwandt (MoBio PowerSoil® Kit). Die Extraktion erfolgte anhand der Herstellerangaben. Zusätzlich wurde vor der ersten Zentrifugation zur Proteolyse 20 µl Proteinkinase K hinzugegeben, bei 50 °C für 2 Stunden inkubiert und anschließend homogenisiert (MoBio PowerLyzer®). Parallel erfolgten negative Kontrollen anhand der Kitreagenzien ohne Zugabe der Probe, sowie der Kochsalzlösung aus der Endoskopspülung vor Bronchoskopie.

2.5.2. Amplifizierung der DNA

Die in 2.5.1 extrahierte DNA wurde nun mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Dieses erfolgte durch Amplifizierung der V3/V4 hypervariablen Region der bakteriellen 16S-rRNA Gene mittels geeigneter Primer (siehe 7.1.)[97]. Sie binden spezifisch die konservierten Regionen, die die hypervariablen Regionen flankieren. Darüber hinaus enthalten sie eine Adaptersequenz zur Anlagerung der Amplikons an die Flusszelle und eine Indexsequenz zur Identifizierung der jeweiligen Probe. Eine pad-Sequenz dient der Erhöhung der Schmelztemperatur auf 65°C und eine Link-Sequenz verbindet diese Sequenzen mit der genspezifischen Sequenz der Primer.

Reaktionsansatz:

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

PCR-Protokoll:

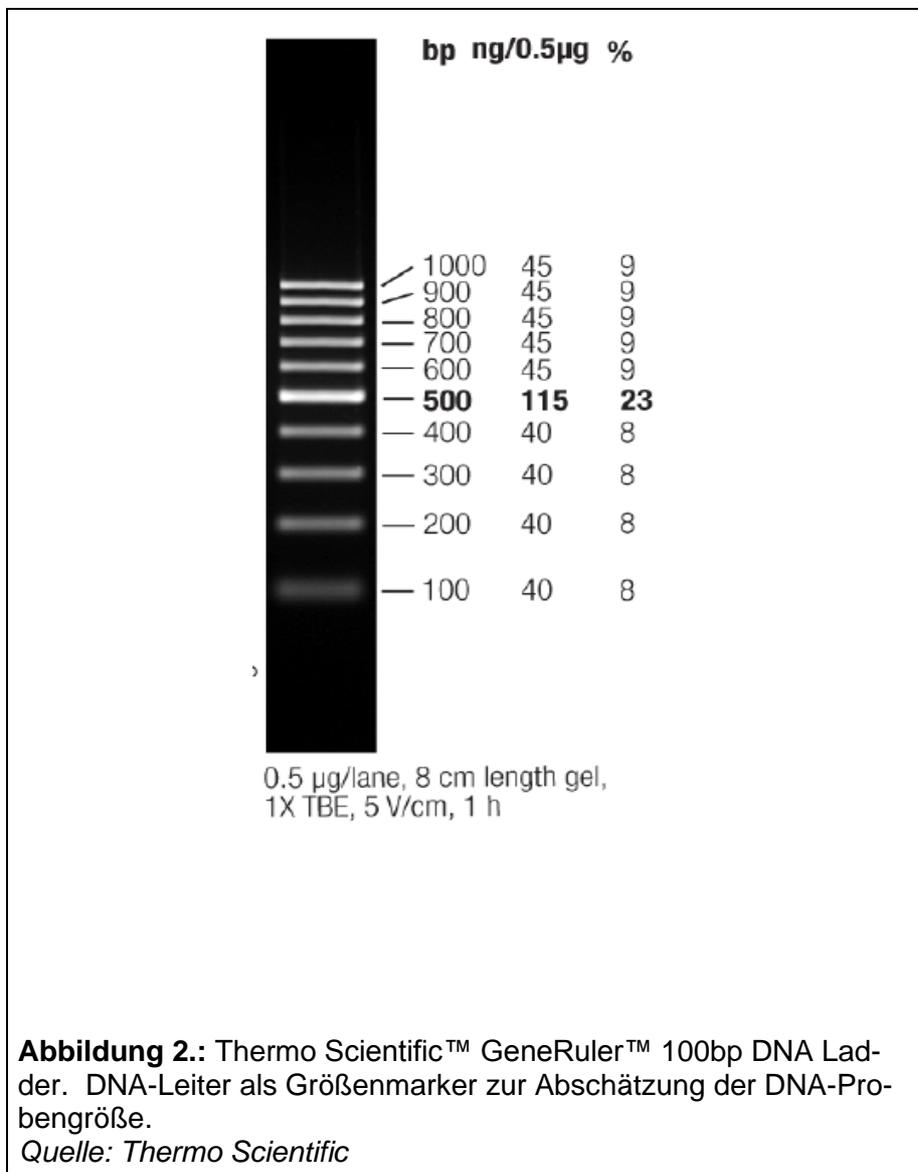
Denaturierung:	98 °C	5 min	
Amplifizierung:	30 Zyklen	98 °C 9 sek	Denaturierung
		55 °C 60 sek	Primer Anlagerung
		72 °C 90 sek	Elongation
Elongation:	72 °C	10 min	
Einfrieren der DNA bei -20°C			

2.5.3. Gelelektrophorese der DNA-Proben

Die so vervielfältigte DNA wurde nun der Größe nach aufgetrennt. Hierzu verwendeten wir ein Agarose-Gel versetzt mit 1:20.000 RedSafe. Die optische Darstellung erfolgte durch einen Transilluminator. Anhand dessen konnte die Konzentration des jeweiligen Amplifikats durch den Abgleich einer Bande mit ungefähr gleicher Größe und gleicher Intensität durch eine definierten DNA Leiter ermittelt werden. Konzentrationsmessungen erfolgten anhand der BioID Software.

Die Amplifikate wurden im Anschluss nach äquimolaren Mengen zusammengeführt und erneute mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Banden wurden mittels Ban-

denspickerspitzen aus dem Gel herausgestochen und mittels MinElute Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben eluiert. Durch ein Fluorometer unter Verwendung des Qubit® dsDNA BR (Broad Range) Assay Kits wurde die Konzentration der Probe ermittelt. Die DNA wurde bei -20 °C eingefroren.



2.6. Mikrobiomanalyse mittels Next-Generation Sequencing

2.6.1. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA erfolgte mittels einer sogenannten Next-Generation Sequencing Methode. Durch eine sogenannte „bridge Amplification“ wurden die DNA Fragmente auf einer Durchflusszelle amplifiziert und anschließend ein Cluster aus identischen Molekülen gebildet. Die darauffolgende Sequenzierung erfolgte nach der Methode Sequencing-by-synthesis, anhand dessen mithilfe von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden eine paired-end Sequenzierung durchgeführt wird. Das Ergebnis dieser Sequenzierung ist jeweils eine forward- und eine reverse-Sequenz. Die Sequenzierung erfolgte durch unsere Kollegen im Forschungszentrum Borstel mit Hilfe eines MiSeq-Sequenzierers der Firma Illumina®.

2.6.2. Datenprozessierung

Die aus der Illuminasequenzierung gewonnenen Rohdaten mussten nun zur weiteren Analyse prozessiert (aufbereitet) werden. Die Rohdaten lagen in Form von sogenannten fastq-Dateien, welche die 16S-rRNA Sequenzen enthielten, vor. Die Prozessierung dieser Daten erfolgte mithilfe der Software Mothur Version 1.35.0[98]. Zunächst wurden Contigs aus den zusammengehörigen forward- und reverse-Sequenzen erstellt. Alle Sequenzen mit uneindeutigen Basen und einer Homopolymerlänge von > 9 , sowie alle Sequenzen die länger als das amplifizierte Fragment waren, wurden entfernt. Das reference Alignment erfolgte anhand der SILVA Referenzdatenbank[99]. Chimäre Sequenzen wurden unter Anwendung des UCHIME Algorithmus entfernt[100]. Die übrig gebliebenen Sequenzen klassifizierten wir unter Anwendung eines Bootstrap Wertes von 80 und Entfernung aller nicht bakteriellen DNA Sequenzen mithilfe der Greengenes Version gg_13_8_99[101]. Die so aufbereiteten Datenmengen wurden nun anhand von taxonomischen Level (Phyla, Genera, Species) in sogenannte operational taxonomic units (OTU) eingeteilt. Für statistische Analysen wurden die Abundanz-basierten Daten für unterschiedliche Sequenziertiefe mittels GMPR (Geometric Means of Pairwise Ratios), enthalten in R, korrigiert[102].

2.6.3. Dekontaminierung des Datensets und Core-Taxa

Bereits während des Prozesses der Probenakquierung, Verarbeitung und späteren Prozessierung der Rohdaten unternahmen wir vermehrt Anstrengungen um unsere späteren Daten zur Analyse vor Kontaminationen zu bewahren. Hierzu zählen:

- Verwenden von sterilen Materialien und Verarbeitung der Proben an sterilisierten Flächen
- Two-scope-Technik während der Bronchoskopie
- Negativkontrollen mit steriler NaCl-Lösung vor Bronchoskopie
- Isolationskontrollen während der DNA-Extraktion, welche mit in die Sequenzierung geführt wurden
- Quantifizierung der bakteriellen DNA-Menge in den mitgeführten Kontrollen mittels quantitativer PCR (qPCR)

Da in den unteren Atemwegen teilweise, aber vor allem in den Lungengewebsproben, eine geringe Dichte an bakterieller DNA herrscht, konnte eine Kontamination in unseren Proben durch die Vervielfältigung der DNA anhand der PCR erhebliche Auswirkungen auf das zu analysierende Datenset haben. Wir orientierten uns deshalb an den aktuell in der Literatur beschriebenen Standards[28]. Des Weiteren erfolgte nach Abschluss der Prozessierung eine erneute Prüfung auf Dekontaminationen durch den decontam-Algorithmus welches ein in R implementiertes Frequenzverfahren darstellt[103].

Tabelle 4: Entfernte Taxa bei n=31 Versuchspersonen, welche durch den decontam Algorithmus als Kontamination identifiziert wurden

Entfernte Taxa
Hymenobacter
Chryseobacterium
Comamonas
Solirubrobacterales_unclassified
Cytophagales_unclassified
Pseudonocardia

Tabelle 5: Die 20 häufigsten Taxa in den Isolationskontrollen nach Entfernung der Taxa in Tabelle 4 (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

Nach Bereinigung des Rohdatensatzes konnten die Core-Taxa bestimmt werden. Hierbei handelt es sich um Taxa, die in über 90% der untersuchten Proben in mindestens 1 % der Readanzahl vorkamen.

2.7. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Zur Quantifizierung der DNA-Menge in den oberen und unteren Atemwegen erfolgte eine quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) anhand von Teilen des Gesamtkollektivs. Hier wurden alle BAL und Rachenabstrichproben der Versuchspersonen untersucht, die sich einer Lungenteilresektion unterzogen hatten (vgl. Dissertation L.R.). Dieses Teilkollektiv spiegelt repräsentativ das Gesamtkollektiv wider (Tab. 6). Sowohl Geschlechterverteilung, Altersverteilung, der Raucherstatus, die spirometrisch ermittelten FEV1%-Werte, als auch die 5 häufigsten Taxa auf Phylum- und Genusniveau unterscheiden sich in beiden Kollektiven nicht. Lediglich das Verhältnis von an COPD erkrankten zu nicht an COPD erkrankten Versuchspersonen ist umgekehrt. Es beträgt im Gesamtkollektiv 17 zu 12 und im Teilkollektiv 4 zu 9. Dies lässt sich auf die Inoperabilität von 7 Versuchspersonen bei fortgeschrittener COPD im Gesamtkollektiv zurückführen.

Es wurde eine absolute Quantifizierung auf der Basis von Escherichia coli Gemeinheiten, sowie eine relative Quantifizierung durch den Vergleich relativer bakterieller und humaner Biomasse anhand von 18S-rRNA durchgeführt. Abschließend erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse. Anhand der Intensität der Fluoreszenz erfolgte die quantitative Analyse (exaktes Pipettierschema vgl. Dissertation L.R.).

Tabelle 6: Vergleich Gesamtkollektiv zum Teilkollektiv aus der Dissertation von L.R.

	Gesamtkollektiv (n=31)	Teilkollektiv (n=13)	Signifikanz
Verhältnis Geschlecht w:m Anzahl (n)	1:1,58 (12:18)	1:1,6 (5:8)	p=0,99
Alter (Mittelwert)	82-45 Jahre (65,06 Jahre)	74-50 Jahre (65,07 Jahre)	p=1
Raucherstatus Raucher: Ex-Raucher Anzahl (n)	1,21:1 (17:14)	2,25:1 (9:4)	p=0,38
FEV1% (Mittelwert)	99-25 (65,7)	99-35 (70,7)	p=0,46
COPD erkrankt:nicht erkrankt Anzahl (n)	1,42:1 (17:12) Fehlt (n=2)	1:2,25 (4:9)	p=0,027
Lungenkarzinom erkrankt:nicht erkrankt Anzahl (n)	4:1 (24:6) Nicht erfasst (n=1)	5,5:1 (11:2)	p=0,72

5 häufigste Taxa auf Phylumebene	Bacteroidetes Firmicutes Proteobacteria Actinobacteria Fusobacteria	Bacteroidetes Firmicutes Proteobacteria Actinobacteria Fusobacteria	
5 häufigste Taxa auf Genusebene	Prevotella Streptococcus Veillonella Haemophilus Rothia	Prevotella Streptococcus Veillonella Haemophilus Leptotrichiaceae	

Ermittlung des Signifikanzniveau zwischen Gesamt- und Teilkollektiv:

Alter und FEV1% (*T-Test für verbundene Stichproben*)

Geschlechtsverteilung, Raucherstatus, COPD, Lungenkarzinom (*Chi-Quadrat-Test*)

2.8. SourceTracker

Die Herkunft der Taxa aus der BAL wurde durch den *SourceTracker* Algorithmus (R-Skript Version 0.9.1)[104] ermittelt. Es konnte somit anhand von Verteilungen und Häufigkeiten von Taxa aus dem Rachenabstrich, welche als Quelle („source“) diente, die Herkunft der Taxa in der BAL („sink“) abgeschätzt werden. Dementsprechend wurde der Anteil der gefundenen Taxa in der BAL mit der Herkunft Rachenabstrich oder „unknown“ gekennzeichnet.

Die Durchführung der Versuche und Analysen der Abschnitte 2.5-2.8. erfolgte unter Anleitung von Dr. rer. nat. S. Graspeuntner (Klinik für Infektiologie und Mikrobiologie, UKSH Campus Lübeck). Sämtliche Schritte der Patienten- und Probenakquirierung, Weiterverarbeitung, sowie die qPCR erfolgte gemeinsam mit L.R..

2.9. Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit R Studio (Version 3.2.2)[105].

Die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde anhand der Basis Pakete zur graphischen Darstellung in R[105], sowie dem R Graphikpaket ggplot2[106] und Microsoft® Excel® 2016 durchgeführt.

Die Analyse von Gesamt- und Teilkollektiv erfolgte anhand des gepaarten T-Tests und des Chi-Quadrat-Tests. Die Normalverteilung wurde anhand des Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft.

Unter Anwendung des R-package vegan[107] wurden sowohl Bestimmungen der α -Diversität wie Evenness, Shannon-Diversitäts-Index, Simpson-Diversitäts-Index, als auch der β -Diversität durchgeführt.

Die detektierten Taxa berechneten wir anhand ihres relativen Vorkommens in der jeweiligen Probe. Die Analyse der α -Diversität in Rachenabstrich und BAL wurde bei verbundenen Stichproben anhand des Wilcoxon-Tests mit Benjamini Hochberg Korrektur für multiples Testen ermittelt.

Unverbundene Stichproben wurden mit dem Kruskal Wallis Test und post hoc Testung mit anschließender Bonferroni Korrektur für multiples Testen bei Mehrfachvergleichen durchgeführt.

Die Korrelationsanalysen von Anzahl der kumulativen pack years und dem Shannon-Index bestimmten wir anhand des Pearson-Korrelationskoeffizienten.

Die β -Diversität berechneten wir durch das Distanzmaß mithilfe des Bray-Curtis-Index und visualisierten es anhand einer Hauptkoordinatenanalyse (englisch: Principal Coordinates Analysis (PCoA)) als Verfahren der multivariaten Statistik.

Darüber hinaus wurde anhand des R-package adonis eine permutative multivariate Varianzanalyse durchgeführt. Die graphische Darstellung erfolgte mittels Biplot und Heatmap.

Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha \leq 0,05$ festgelegt. Die visualisierten Daten wurden mit Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Abnahme der bakteriellen Biomasse von den oberen zu den unteren Atemwegen

Mittels qPCR wurde die Menge der bakteriellen Biomasse sowohl absolut auf Basis von Escherichia coli Genomeinheiten, als auch in Relation zur humanen Biomasse erhoben (vgl. 2.7).

Zwischen Rachenabstrich und bronchoalveolärer Lavage zeigt sich eine signifikante Abnahme des Verhältnisses von menschlichen zu bakteriellen Zellen, als auch der Anzahl bakterieller Zellen von den oberen zu den unteren Atemwegen.

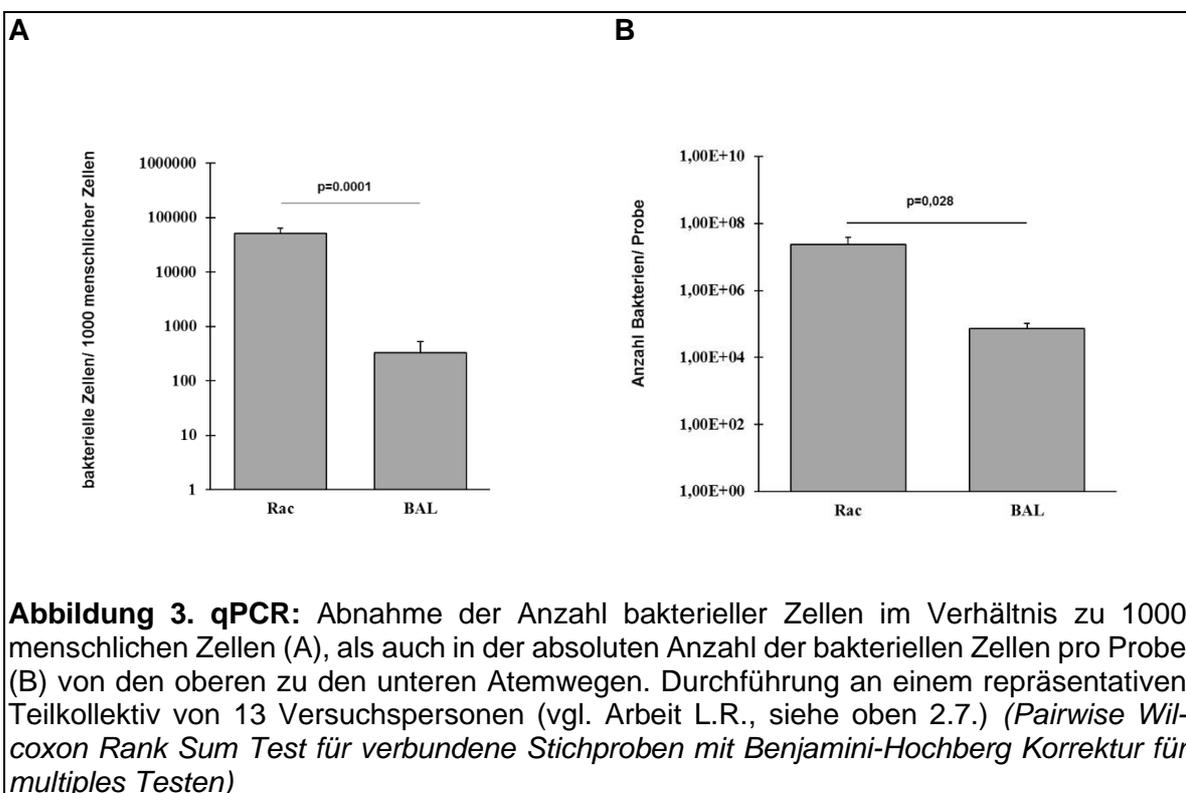
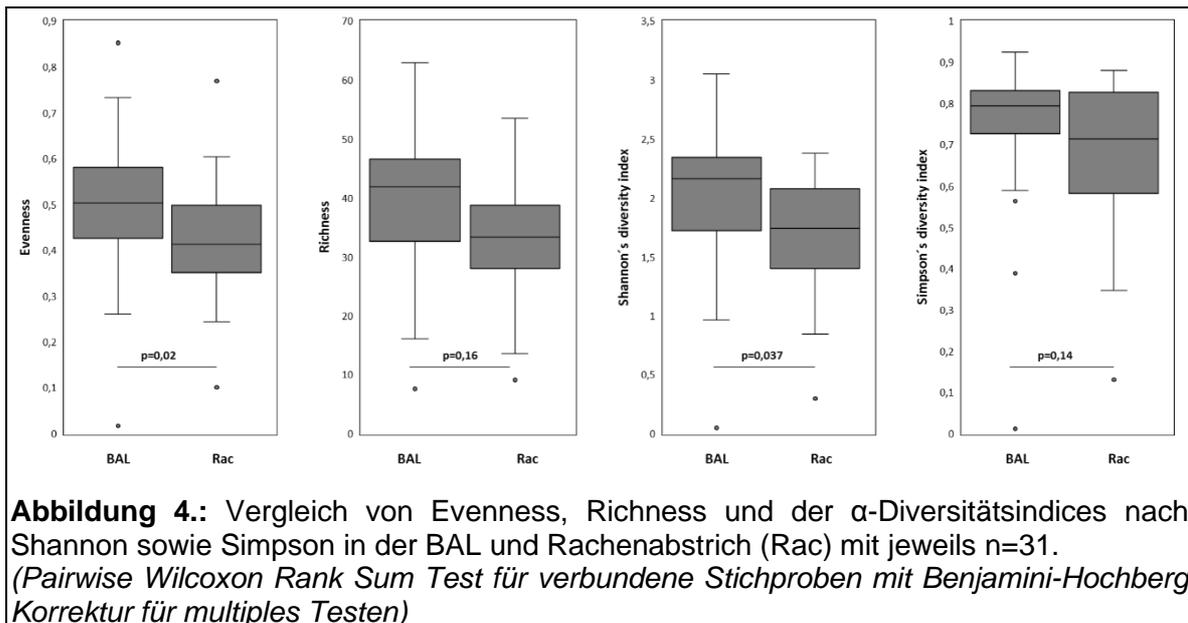


Abbildung 3. qPCR: Abnahme der Anzahl bakterieller Zellen im Verhältnis zu 1000 menschlichen Zellen (A), als auch in der absoluten Anzahl der bakteriellen Zellen pro Probe (B) von den oberen zu den unteren Atemwegen. Durchführung an einem repräsentativen Teilkollektiv von 13 Versuchspersonen (vgl. Arbeit L.R., siehe oben 2.7.) (Pairwise Wilcoxon Rank Sum Test für verbundene Stichproben mit Benjamini-Hochberg Korrektur für multiples Testen)

3.2. Vergleichende Untersuchungen der Zusammensetzung des Mikrobioms der oberen und unteren Atemwege anhand von Rachenabstrich und BAL

Zum Vergleich des Mikrobioms der oberen und unteren Atemwege untersuchten wir zunächst die taxonomische Zusammensetzung sowie Parameter der Diversität und Dissimilarität zwischen Rachenabstrich und BAL.

3.2.1. α -Diversität

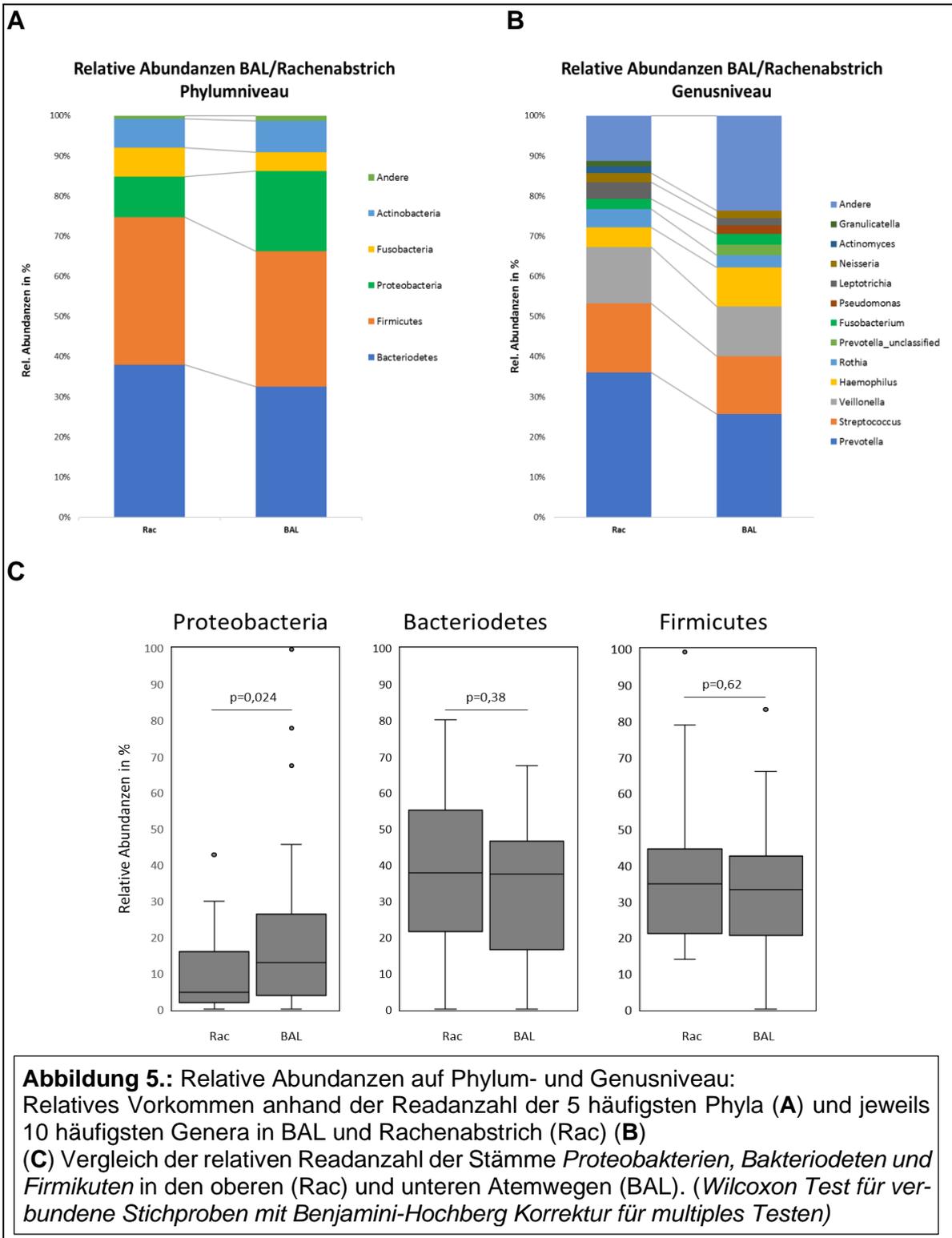


In Abbildung 4 ist die α -Diversität des Mikrobioms in Rachenabstrich und der bronchoalveolären Lavage dargestellt. Es zeigt sich eine signifikant höhere Diversität im Shannon-Index in der BAL gegenüber dem Rachenabstrich. Darüber hinaus findet man in der BAL auch eine höhere *Evenness*, ein Indikator, der die Gleichmäßigkeit der Verteilung der bakteriellen Taxa innerhalb einer untersuchten Probe misst.

3.2.2. Relative mikrobielle Zusammensetzung der oberen und unteren Atemwege

Zur Bestimmung der Zusammensetzung des Mikrobioms der oberen und unteren Atemwege wurde zunächst die relative Verteilung auf Stamm- (Phylum) und Gattungsebene (Genus) betrachtet.

3.2.2.1. Vergleich von Rachenabstrich und BAL auf Phylum- und Genusniveau



Zu den 5 häufigsten Stämmen in beiden Kompartimenten zählen *Bacteriodetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* und *Actinobacteria*. Sie bilden 99% aller nachgewiesenen Stämme. Insgesamt ähneln sich Rachenabstrich und BAL. Ein

signifikant größerer Anteil an *Proteobacteria* konnte allerdings in der BAL nachgewiesen werden (Abb. 5.: A+C).

Auf Gattungsebene zeigt sich auf den ersten Blick ebenfalls eine vergleichbare Verteilung. Im Einzelnen fällt auf, dass sich *Pseudomonas* unter den 10 häufigsten Gattungen nur in der BAL findet, während *Actinomyces* und *Granulicatella* nur im Rachenabstrich zur Darstellung kommen (Abb. 5.: B).

3.2.2.2. Core-Taxa

Ausgehend von BAL und Rachenabstrich (n=31) ließen sich für beide Probenotypen jeweils drei, in der Zusammensetzung identische Core Taxa, definieren. Im Einzelnen sind es die für das Mikrobiom des Rachenraums charakteristischen Taxa *Prevotella*, *Streptococcus* und *Veillonella*.

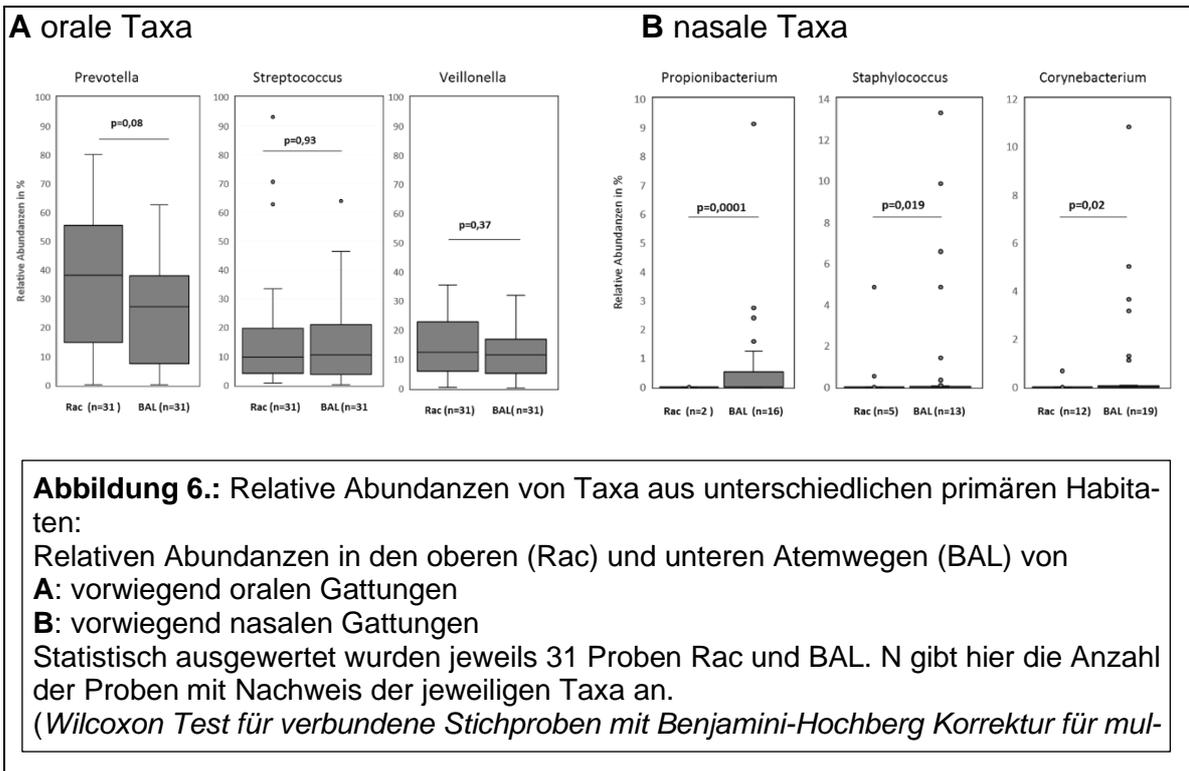
BAL	Rachenabstrich
Prevotella	Prevotella
Streptococcus	Streptococcus
Veillonella	Veillonella
Tabelle 7.: Core Taxa auf Gattungsebene. (Auftreten in > 90% der Proben mit einer relativen Häufigkeit > 1%)	

3.2.2.3. Einteilung anhand primärer Habitate

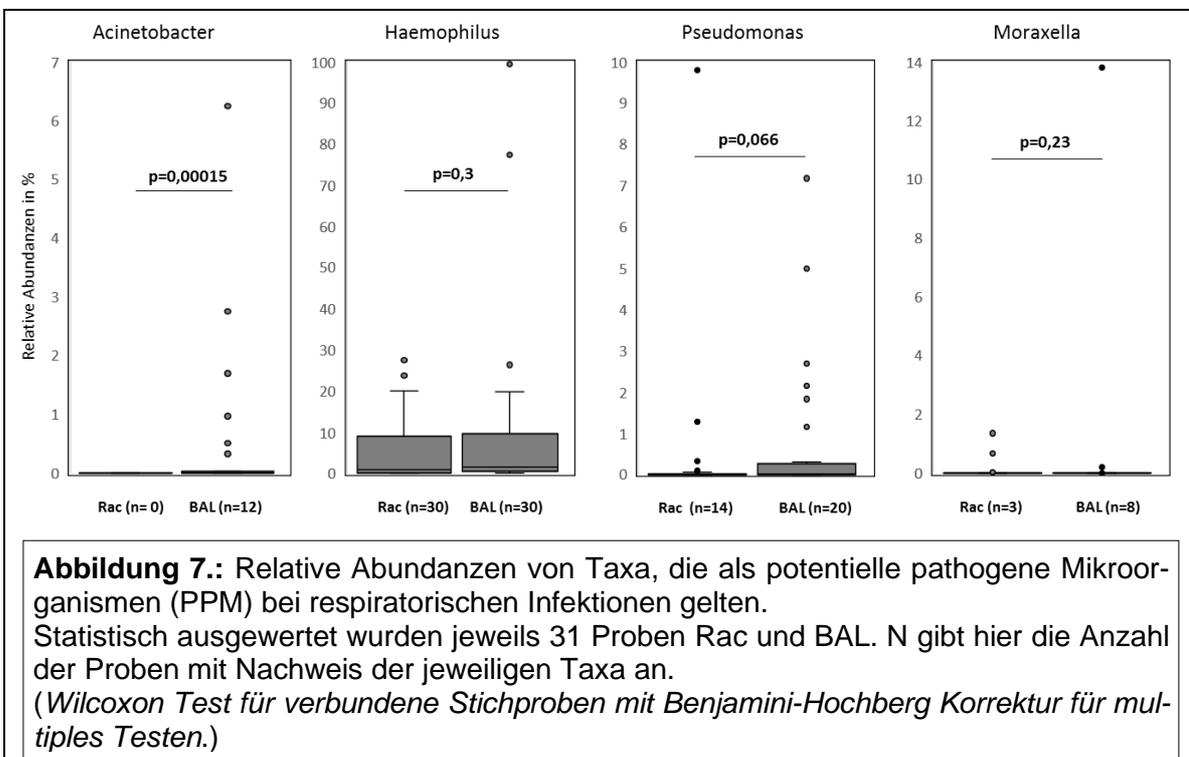
Zur detaillierteren Analyse bildeten wir unabhängig von der relativen Abundanz Subgruppen anhand primärer Habitate und der klinischen Einstufung als potentiell pathogene Mikroorganismen (PPM).

Die am häufigsten vorkommenden primär oralen Taxa (vgl. Abb.: 6.) *Prevotella*, *Streptococcus* und *Veillonella* zeigen keine Unterschiede zwischen den oberen und unteren Atemwegen.

Vorwiegend nasale Taxa sind insgesamt in einer deutlich geringeren Abundanz vorzufinden. *Corynebacterium*, *Staphylococcus* und *Propionibacterium* sind jedoch in der BAL signifikant häufiger nachweisbar.



Unter den PPM zeigt *Acinetobacter* eine signifikant erhöhte relative Abundanz in den unteren Atemwegen. *Pseudomonas* tendiert ebenfalls zu einem vermehrten Vorkommen in der BAL.



3.2.3. Dissimilarität (PCoA und Heatmap)

Die Bestimmung der Dissimilarität erfolgte anhand der β -Diversitätsanalyse mittels *Bray-Curtis-Index*. Als Maß der Ungleichheit, lassen sich so die verschiedenen Proben auf ihre Unterschiedlichkeit in der Zusammensetzung überprüfen. Zur Visualisierung wurde zunächst ein Biplot auf der Basis einer Hauptkoordinatenanalyse erstellt. Jeder Probe wird in einem zweidimensionalen Raum eine Koordinate zugewiesen. Der Abstand der Punkte untereinander spiegelt die Unterschiedlichkeit als Distanzmaß wider (Abb.: 8).

Weiterhin wurde eine Heatmap erstellt. Das relative Vorkommen der Taxa (hier Genusebene) in einer Probe wird anhand der Farbintensität kenntlich gemacht. Die Gruppierung erfolgte anhand einer hierarchischen Clusteranalyse durch das *Average-linkage-Verfahren* ebenfalls nach *Bray-Curtis-Index* (Abb.: 9).

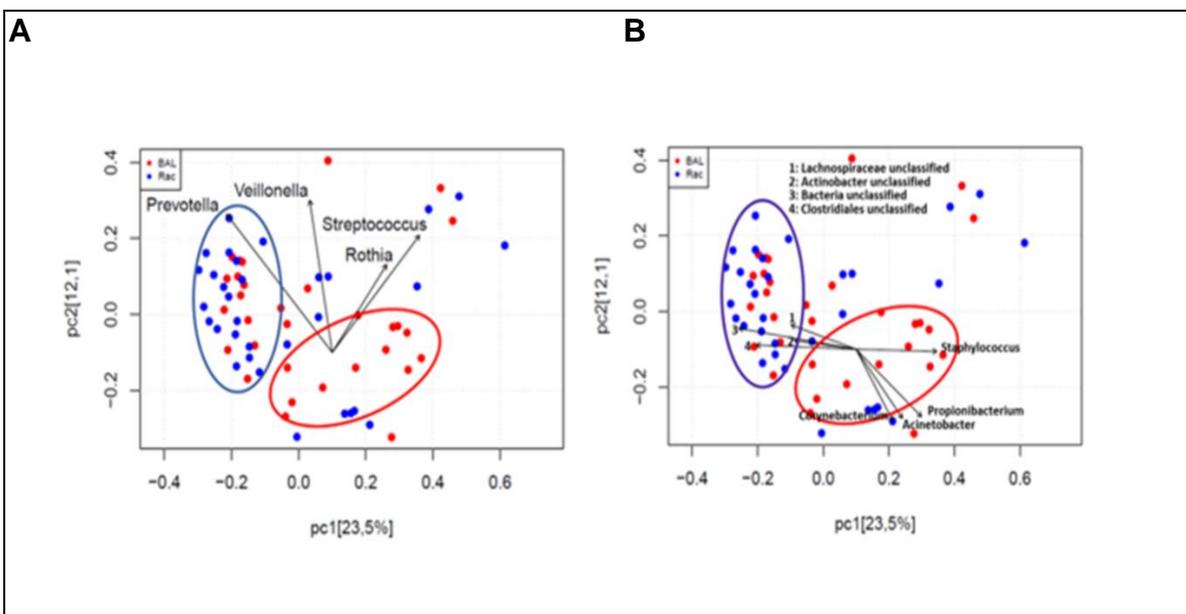
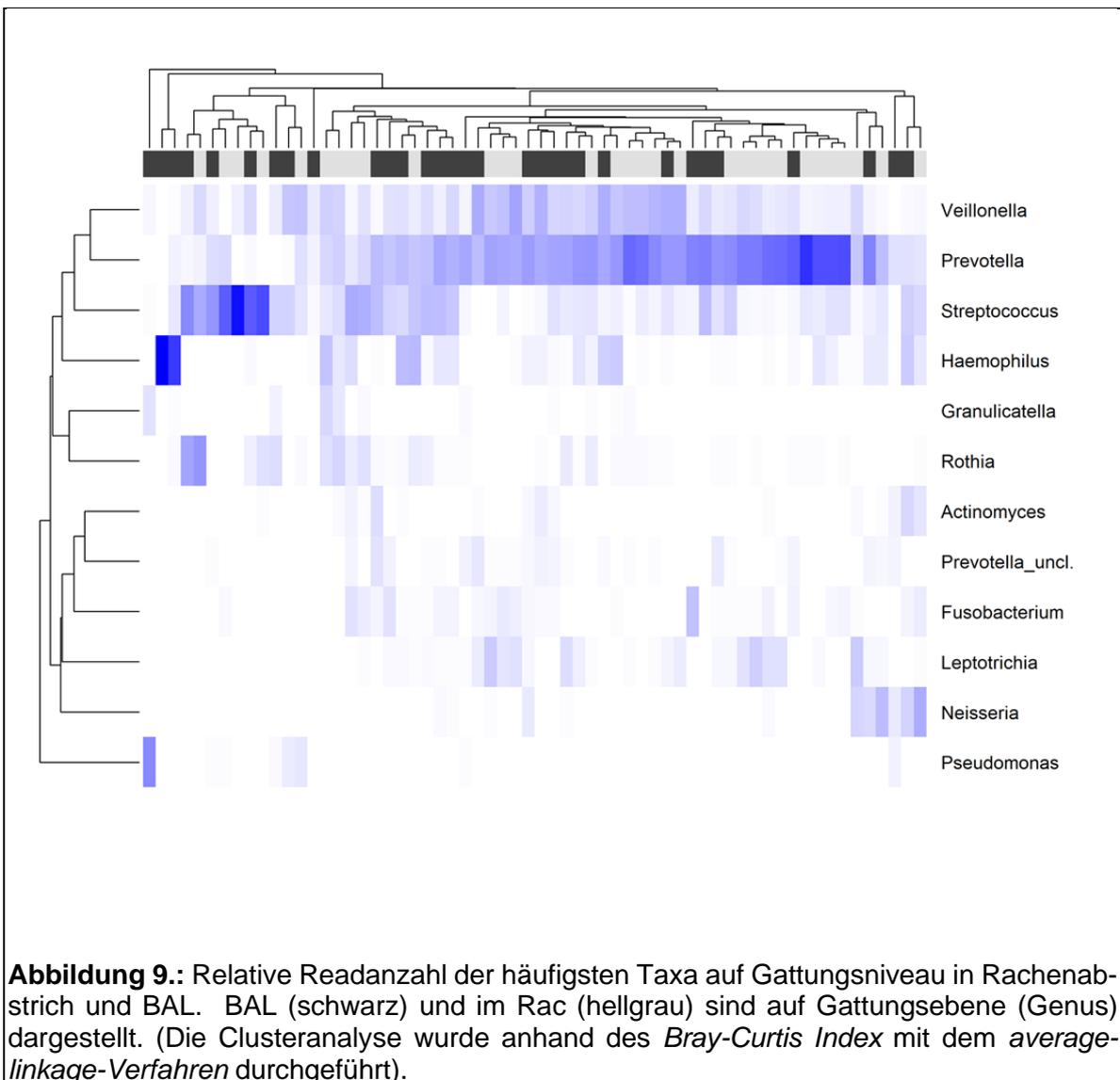


Abbildung 8.: Biplot auf Basis einer Hauptkoordinatenanalyse. Die Bray-Curtis-Distanz wird durch den Abstand zwischen den einzelnen Punkten veranschaulicht. Dabei unterscheiden sich die Atemwege (BAL, Rac) nicht signifikant voneinander (Adonis Test, Anzahl Permutationen = 999, $p=0,214$, $r^2=0,02$). 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. Es erfolgte eine Einteilung in 2 Cluster (blaues Cluster->Rac, rotes Cluster->BAL)

BAL und Rachenabstrich stellen sich ähnlich in der PCoA dar. Die Signifikanzprüfung zeigt insgesamt keinen Nachweis einer Dissimilarität. Qualitativ fallen dennoch einige Schwerpunkte auf: So befinden sich in dem blauen Cluster vorwiegend Rac-Proben. *Prevotella* projiziert sich in dieses Cluster hinein. In einem weiteren, besser abzugrenzenden roten Cluster finden sich vornehmlich BAL Proben. Dementsprechend werden die in der BAL signifikant vermehrt nachgewiesenen nasalen Taxa

Staphylococcus, *Propionibacterium* und *Corynebacterium*, sowie der potentiell pathogene Erreger *Acinetobacter* in dieses Cluster, bzw. in dessen Richtung projiziert (Abb.: 8). Die Vektoren von primär oralen und nasalen Taxa verlaufen entgegengesetzt.



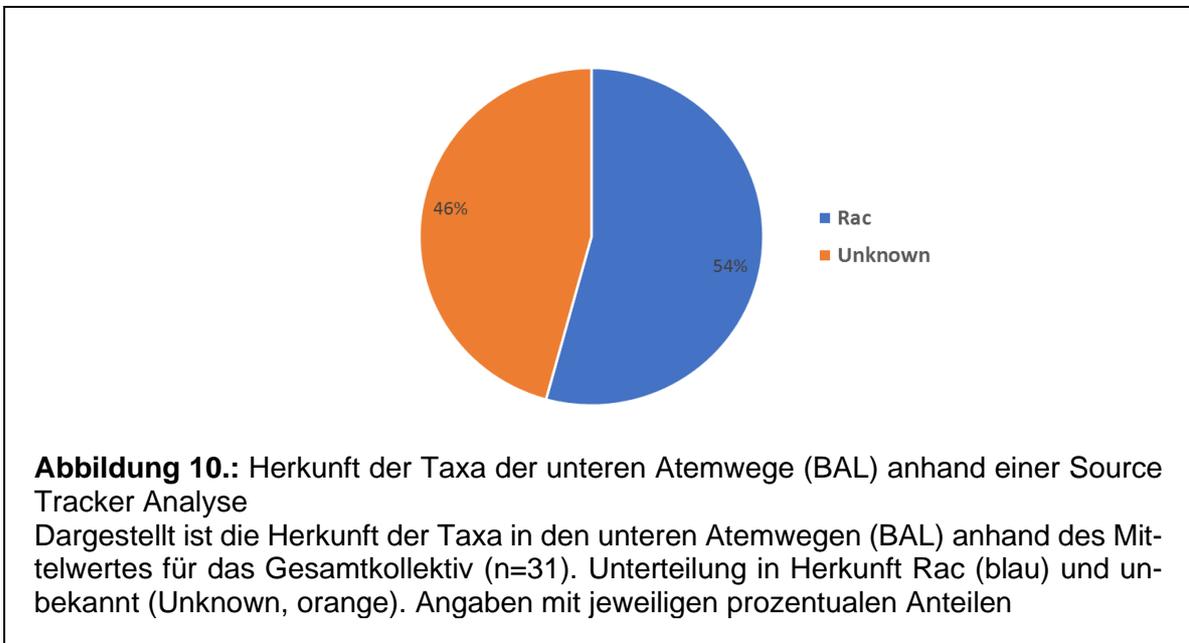
In dem vertikalen Clustering der Heatmap ergeben sich 3 größere Cluster.

1. Oberes Cluster: relativ häufigste Genera 1-4 (inklusive der drei Core-Taxa)
2. mittleres Cluster: Granulicatella und Rothia
3. unteres Cluster: relativ häufigste Genera an den Positionen 6-11

Auch hier ergibt das Gesamtbild keine Differenzierung anhand der Probenlokalisation in oberen und unteren Atemwegen. Die Core Taxa *Prevotella*, *Veillonella* und *Streptococcus* clustern erwartungsgemäß in einem vertikalen Cluster. Man erkennt,

dass alle 3 Taxa in der Mehrzahl der Proben hoch abundant vorkommen. PPM aus der Gruppe der Proteobacteria wie Hämophilus und Pseudomonas sind dagegen deutlich diskordanter verteilt.

3.2.4. Source Tracker



Zur Bestimmung der Herkunft der in der BAL nachgewiesenen Taxa wurde eine Source Tracker Analyse durchgeführt. Hierbei ergab sich, dass mehr als die Hälfte der Taxa in den unteren Atemwegen den oberen Atemwegen entstammt. 46% ließen sich dagegen keiner bekannten Quelle zuordnen, blieben also unbekannter Herkunft.

3.3. Respiratorische Risikofaktoren und Komorbiditäten

Nach Einordnung der Ergebnisse anhand der Unterteilung in obere und untere Atemwege untersuchten wir einzelne Faktoren, die zur Beeinflussung des pulmonalen Mikrobioms beitragen könnten. Hierzu gehören in unserem Kollektiv vor allem das Tabakrauchen und Raucher-assoziierte Erkrankungen wie die COPD und das Lungenkarzinom.

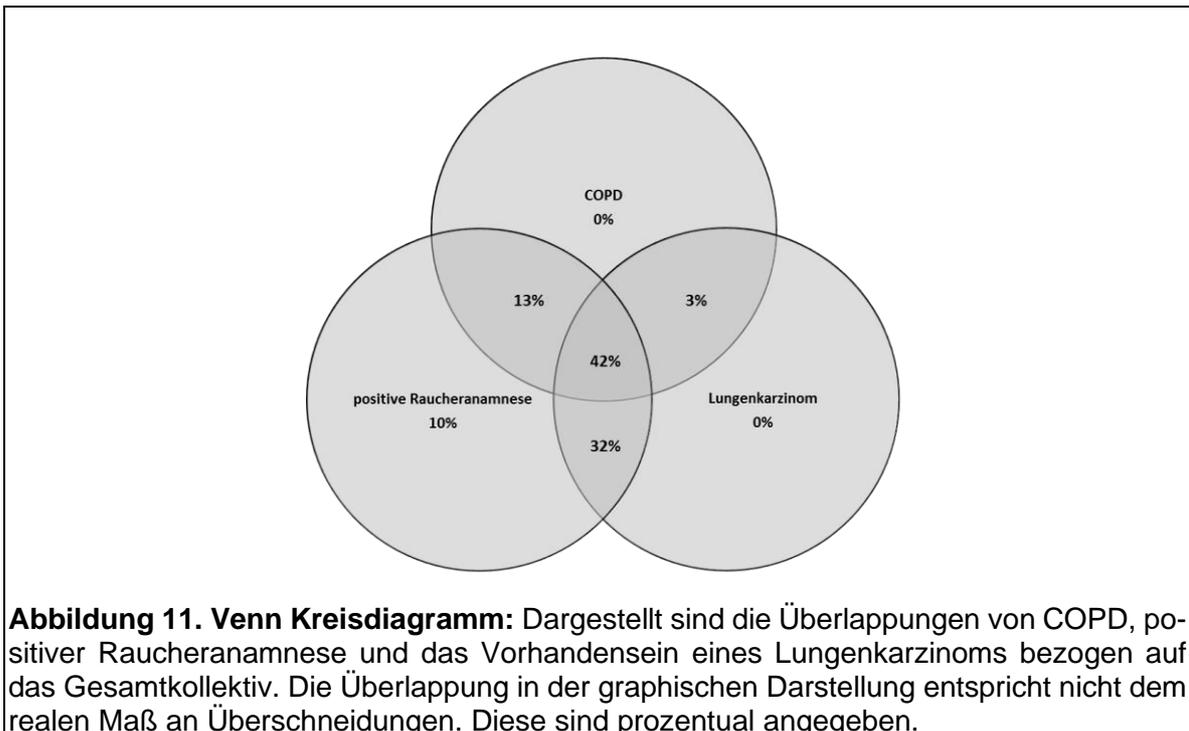
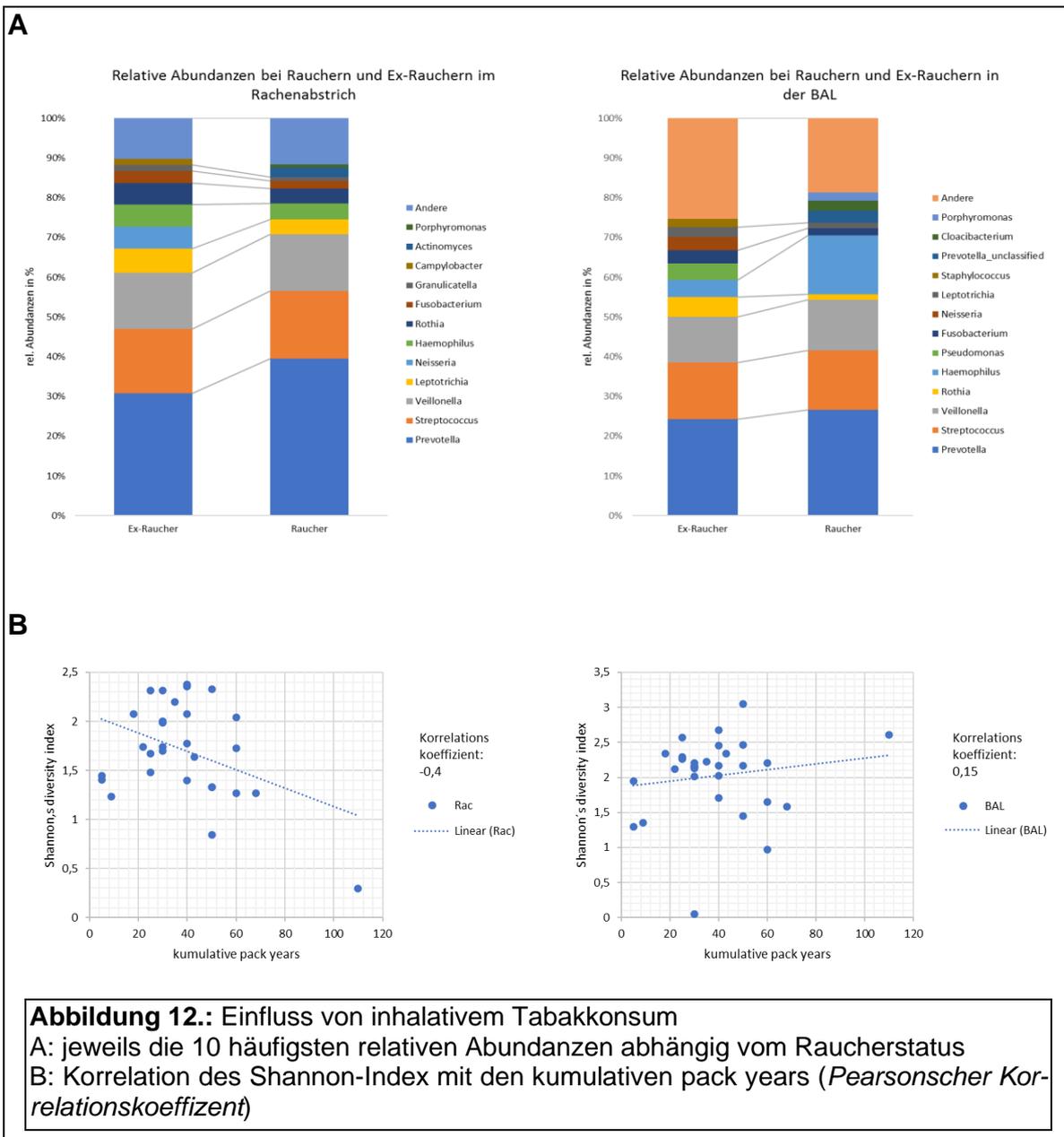


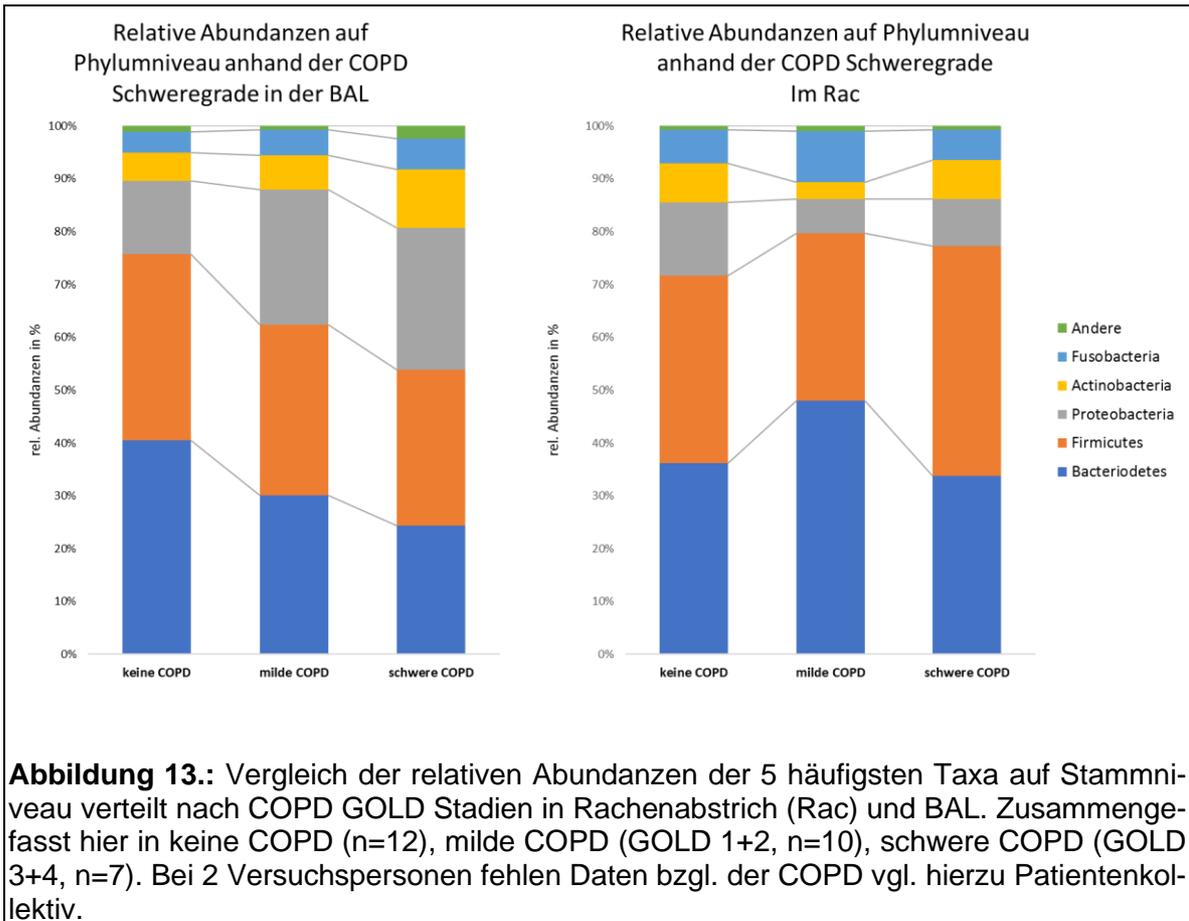
Abbildung 11 zeigt, dass diese Faktoren in großem Umfang untereinander vernetzt sind: so war mit 42 Prozent der größte Anteil des Patientenkollektivs von allen 3 Parametern betroffen, gefolgt von 32 % mit positiver Raucheranamnese und Karzinomnachweis. Ein alleiniges Vorkommen von COPD oder eines Lungenkarzinoms konnte nicht beobachtet werden, da alle Patienten im Kollektiv eine stattgehabte oder aktive Raucheranamnese aufweisen.

3.3.1. Einfluss von Rauchen auf das Mikrobiom der unteren Atemwege

In der vergleichenden Untersuchung von Rauchern und Ex-Rauchern erkennt man in den relativen Abundanzen eine homogene Verteilung. Auch die Korrelationsanalyse von Anzahl der kumulativen pack years gegenüber dem Shannon-Index lässt keinen Zusammenhang zwischen Intensität der Tabakexposition und der Diversität erkennen. (Abb. 12.: A+B).



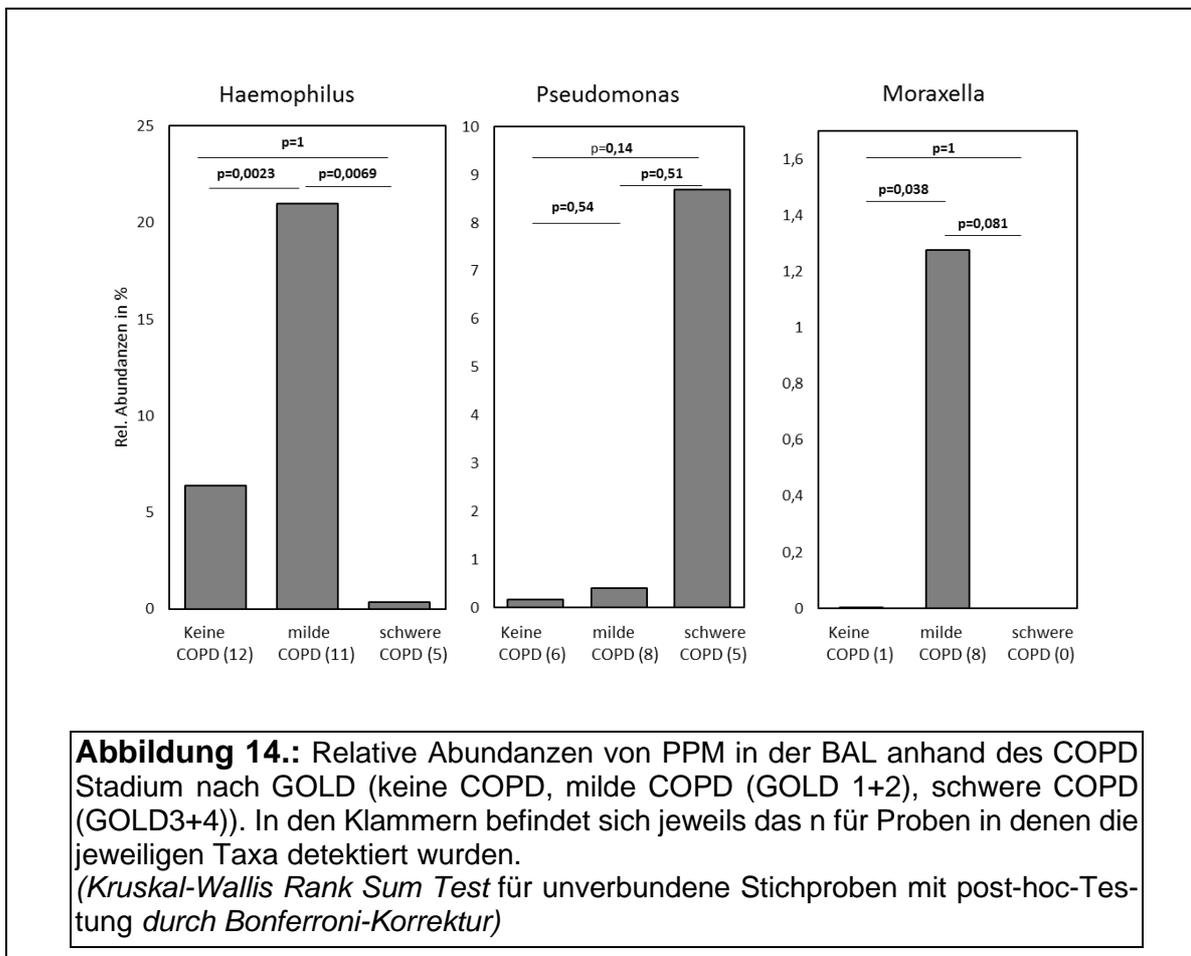
3.3.2. COPD



Zur Untersuchung der COPD bedingten Veränderungen auf die mikrobielle Zusammensetzung der oberen und unteren Atemwege wurden 3 Subgruppen ohne COPD, mit milder bis mäßiggradiger (Stadium 1-2), bzw. schwerer COPD (Stadium 3-4) nach der GOLD-Einteilung, gebildet. Auf Phylumniveau finden sich im Rachenabstrich keine Veränderungen der Zusammensetzung der Taxa.

In der BAL finden sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede, auch wenn numerisch ein höherer Anteil von *Proteobacteria* bei COPD vorliegt (12% keine COPD, 25-26% bei COPD).

Weiterführend prüften wir die Abundanz von PPM bei COPD, sowie die oralen und nasalen Taxa (vgl. Abb.: 14) auf signifikante Unterschiede bzgl. des Vorkommens in verschiedenen COPD Stadien in der BAL. Auf Seite der PPM lässt sich ein signifikant häufigeres Vorkommen von *Haemophilus* in der mild ausgeprägten COPD im Vergleich zur schweren COPD und den Versuchspersonen ohne COPD nachweisen. Auch *Moraxella* zeigt ein signifikant häufigeres Vorkommen in der milden COPD gegenüber den nicht an COPD erkrankten Studienteilnehmern.



Bei *Pseudomonas*, sowie den nasalen Taxa (Daten nicht gezeigt) lässt sich kein Unterschied nachweisen.

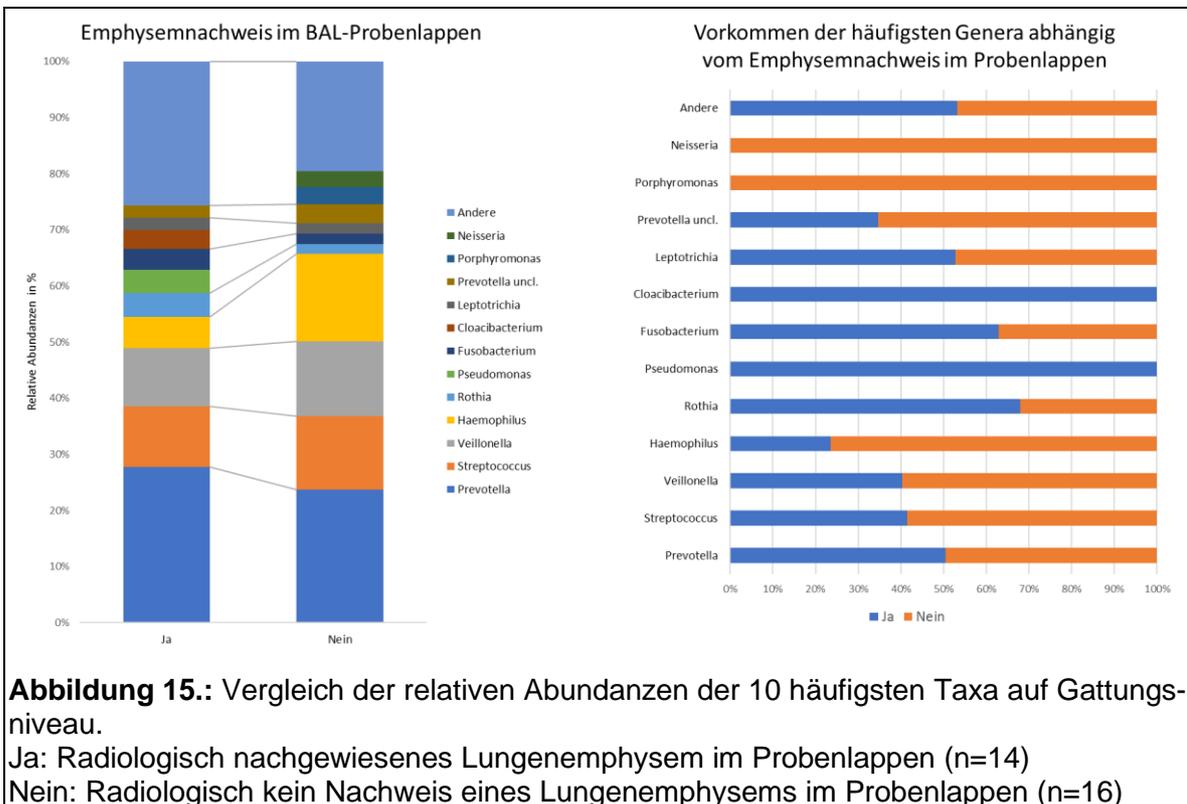
Bei der Überprüfung der Diversität nach dem Shannon-Index findet sich kein Unterschied in Rachenabstrich und BAL in Bezug auf das COPD Stadium, bzw. das Vorhandensein einer COPD. Zum selben Ergebnis kommen wir für den Vergleich aller an COPD erkrankten Studienteilnehmer gegenüber nicht erkrankten Studienteilnehmern (Daten nicht gezeigt).

Eine detaillierte Darstellung der relativen Abundanz von Taxa in den 3 Subgruppen findet sich im Anhang 7.6.

3.3.3. Emphysem

Die COPD geht häufig mit einer strukturellen Veränderung der Lungenarchitektur einher. Wir überprüften, inwieweit sich die in der COPD gezeigten Ergebnisse beim Vorliegen eines radiologisch gesicherten Lungenemphysems im BAL-Probenlappen reproduzieren ließen.

In den 10 am häufigsten nachzuweisenden Taxa mit und ohne Emphysem im BAL-Probenlappen erkennt man ein ähnliches Verteilungsmuster. *Pseudomonas* und *Cloacibacterium* finden sich allerdings nur in den von Emphysem befallenen Probenlappen unter den 10 häufigsten Taxa, *Neisseria* und *Porphyromonas* in den nicht befallenen Probenlappen. In der weiteren Überprüfung können weder bei diesen Taxa, noch bei der Verteilung der PPM signifikante Unterschiede nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).



3.3.4. Lungenkarzinome

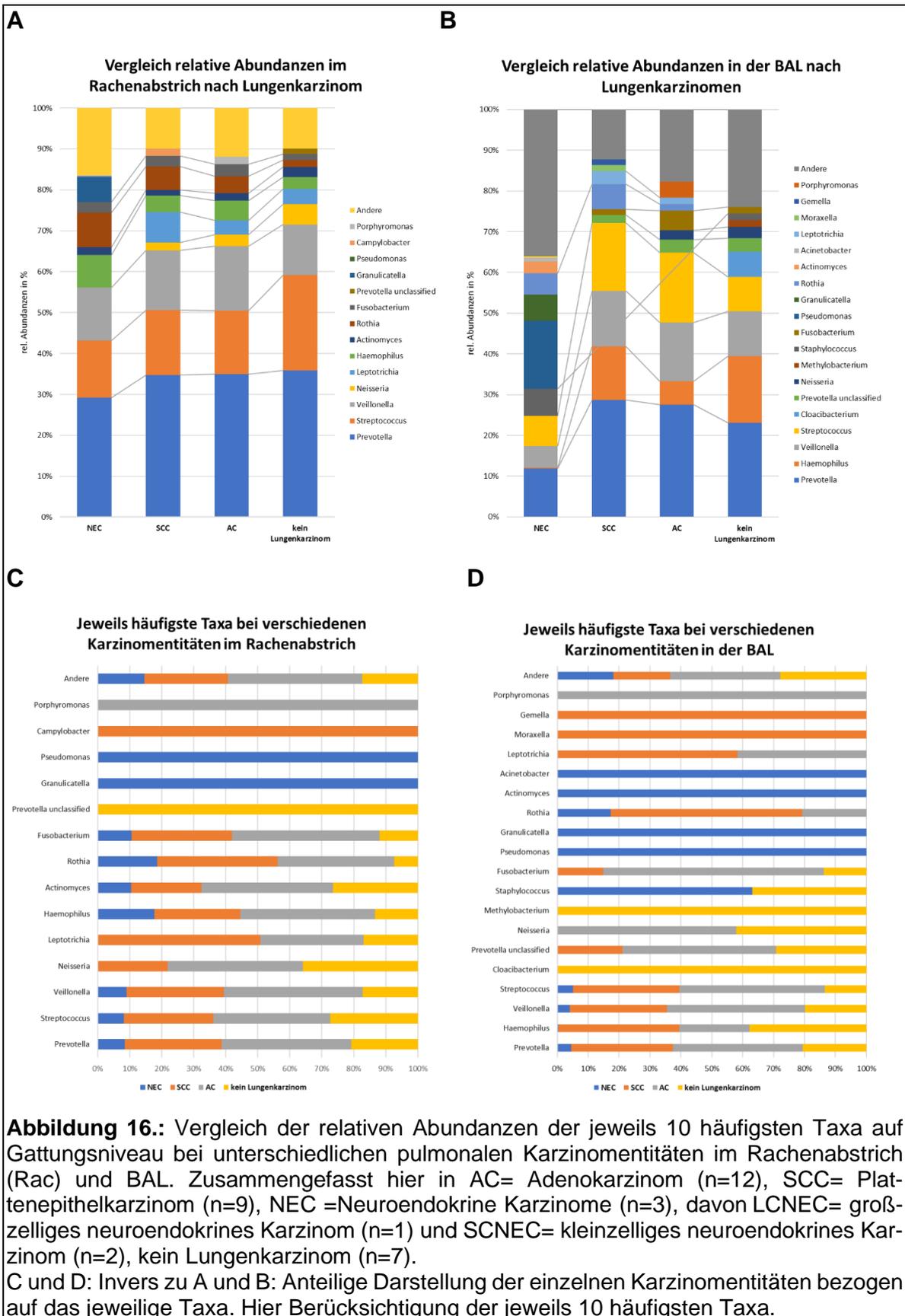
Das Kollektiv umfasste Versuchspersonen mit der Erstdiagnose einer pulmonalen Raumforderung.

Bei 24 Versuchspersonen wurde in der Histologie ein Lungenkarzinom nachgewiesen, in 3 Fällen konnte eine benigne Tumorentität nachgewiesen werden. In je einem Fall wurde der Tumor nicht erfasst, ein pleuraler solitärer Tumor, eine unspezifische Entzündung und eine Aspergillose nachgewiesen. Um zu überprüfen ob die Diagnose der Raumforderung in unserem Kollektiv Einfluss auf das Mikrobiom hatte, wurden die 3 größeren Subgruppen des Lungenkarzinoms und die Gruppe ohne Lungenkarzinom getrennt analysiert. Wegen der Heterogenität und geringen Fallzahlen in diesen Subgruppen wurde ausschließlich eine deskriptive Analyse dieser Daten vorgenommen.

In Abbildung 16 erkennt man sowohl im Rachenabstrich, als auch in der BAL das Vorhandensein der drei Core-Taxa in allen Entitäten. Im Rachenabstrich überwiegen sie in allen Karzinomentitäten (jeweils > 55%). Den größten Anteil erkennt man bei der Subgruppe ohne Lungenkarzinom (72%), der geringste Anteil ist bei den neuroendokrinen Karzinomen zu finden (55%).

In der BAL erscheinen die Core Taxa unterrepräsentiert, so finden sie sich in der Subgruppe der neuroendokrinen Karzinome bei 25 %. Die neuroendokrinen Karzinome weisen im Vergleich zu Adenokarzinomen, Plattenepithelkarzinomen und der Versuchspersonen ohne Karzinomnachweis eine unterschiedliche mikrobielle Signatur auf. Auffällig ist, dass sich 4 Taxa (*Actinomyces*, *Acinetobacter*, *Granulicatella* und *Pseudomonas*) singulär unter den 10 häufigsten Nachgewiesenen befinden. Allerdings nehmen die neuroendokrinen Karzinome mit n=3 den kleinsten Teil des Kollektivs ein.

Adeno- und Plattenepithelkarzinome bilden in der Zusammensetzung ein gleichartiges Bild. *Gemella* und *Moraxella* (jeweils 1%) finden sich bei den Plattenepithelkarzinomen, *Porphyromonas* (5%) in den Adenokarzinomen singulär unter den häufigsten Taxa.



4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde in einem Kollektiv aus Rauchern und Ex-Rauchern mit und ohne raucherassoziierten Lungenerkrankungen die mikrobielle Zusammensetzung der oberen und unteren Atemwege anhand von Rachenabstrichen und BAL vergleichend untersucht.

Wir fanden in den beiden Kompartimenten ein identisches Core-Mikrobiom mit einer signifikanten Abnahme der bakteriellen Biomasse von den oberen zu den unteren Atemwegen. Die Diversität und Evenness verzeichneten eine Zunahme absteigend entlang des Respirationstraktes.

Bei genauerer Betrachtung zeigten sich nach Unterteilung in primäre Habitats und weitere Charakteristika der Mikrobiota allerdings eine Reihe von Unterschieden zwischen den Kompartimenten: so konnten wir eine signifikant höhere Abundanz primär nasaler Taxa in den unteren Atemwegen nachweisen. Hier fand sich unter den PPM auch der zu den multiresistenten Problemkeimen gehörige *Acinetobacter* häufiger.

Ausgehend von raucherassoziierten Lungenerkrankungen zeigte sich bei Patienten mit COPD ein stadienabhängig vermehrtes Vorkommen der für diese Erkrankung charakteristischen Pathogene *Haemophilus* und *Moraxella* in den unteren Atemwegen.

4.1. Mikrobielle Veränderung zwischen oberen und unteren Atemwegen

4.1.1. Nachweis eines identischen Core-Mikrobioms in oberen und unteren Atemwegen

Der Nachweis eines Core-Mikrobioms in verschiedenen Kompartimenten der Atemwege kann als Hinweis für eine permanente bakterielle Besiedlung gewertet werden und wurde in mehreren Arbeiten erbracht [14, 15, 108]. Je nach untersuchtem Kompartiment der Atemwege, Definition des Begriffes Core-Mikrobiom und Art der Probenengewinnung variieren die als Core-Mikrobiom definierten Taxa.

In unserer Arbeit wurden *Prevotella*, *Streptococcus* und *Veillonella* als Core Taxa identifiziert. Eine frühe Multicenterstudie von Morris et. al mit einem Kollektiv von 46 Versuchspersonen bestehend aus Rauchern und Nichtrauchern und Entnahme der gleichen Probenmaterialien wie in dieser Arbeit bestätigt das verbreitete Vorkommen der 3 oralen Taxa in den Proben der oberen und unteren Atemwege [109]. Dass in dieser Studie im Gegensatz zu unserem Patientenkollektiv auch Nichtraucher

eingeschlossen waren, spricht dafür, dass die Core-Taxa unabhängig vom Raucherstatus die oberen und unteren Atemwege besiedeln.

Auch die Arbeit von Erb-Downward beschäftigte sich mit der Frage nach einem Core-Mikrobiom der unteren Atemwege von Rauchern und Nichtrauchern mit und ohne COPD anhand von BAL. Als Core-Taxa wurden zusätzlich zu den bereits erwähnten Taxa *Pseudomonas*, *Fusobacterium*, *Haemophilus* und *Porphyromonas* genannt. Anders als in unserer Arbeit gab es bis auf einen schwer an COPD erkrankten Studienteilnehmer (Tiffeneau-Index 41%; FEV1 25%) nur pulmonal gesunde Personen und weitere mit einem milden bis moderaten Stadium der COPD. Daher können unterschiedliche Ergebnisse durch die Auswahl des Teilnehmerkollektivs bedingt sein. Zudem wurden *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Prevotella* und *Fusobacterium* nur bei über 75% der Proben, *Haemophilus*, *Veillonella* und *Porphyromonas* lediglich bei über 50% der Proben nachgewiesen[14]. Dementsprechend wären diese Taxa nach unserer stringenteren Definition ($\geq 90\%$) nicht als Core-Taxa zu werten.

4.1.2. Einfluss von Taxa unterschiedlicher primärer Habitate auf die Zusammensetzung des Mikrobioms der unteren Atemwege mit Veränderung der alpha-Diversität

Wie in der Einleitung ausgeführt gilt die Theorie der Sterilität der Lunge inzwischen als überholt[53, 55]. Dickson et al. entwickelten das Modell des „*adapted island model of lung biogeography*“, wonach Mikroaspirationen als Quelle der mikrobiellen Besiedlung der Lunge auch bei gesunden Individuen anzusehen sind. Das Verhältnis von Immigration und Elimination bakterieller Taxa ist danach als maßgeblich für die bakterielle Zusammensetzung in den unteren Atemwegen anzusehen; lokale Wachstumsfaktoren sind weiterhin bedeutsam für eine permanente Besiedlung des Kompartiments, die bei chronischen Atemwegserkrankungen in den Vordergrund tritt[68]. Entnommen wurden in dieser Arbeit Bürstenabstriche aus dem supraglottischen Raum und BAL-Proben von 15 Individuen an mehreren Entnahmeorten. Je näher die Probenlokalisierung der BAL den oberen Atemwegen war, desto größer war die Ähnlichkeit der Proben zueinander. Die interindividuellen Unterschiede waren signifikant größer gegenüber den intraindividuellen Unterschieden. Diese Arbeit gibt somit Hinweise für die Bedeutung des „microenvironment“, ein Mikrohabitat, welches durch seine unmittelbaren Umgebungseinflüsse wie Temperatur, Oxyge-

nierung, immunologische Antwort des Wirtes etc. spezifische Wachstumsbedingungen für Mikroorganismen bereitstellt. Weiterhin zeigte diese Arbeit eine Abnahme der OTU-Richness in Richtung der peripheren Atemwege.

Auch Venkataraman et al. kamen in vergleichenden Untersuchungen mit Mundspülungen und BAL bei 64 gesunden Individuen zur gleichen Schlussfolgerung, dass die mikrobielle Komposition der unteren Atemwege in erster Linie aus immigrierten Taxa durch Mikroaspirationen aus dem Oropharynx stammt[110]. Mit der Source-Tracker-Analyse haben wir diese Annahme methodisch weiterführend untersucht. Unsere Ergebnisse konnten die vorherigen Erkenntnisse tendenziell bestätigen, zeigten aber auch, dass es zusätzliche Einflüsse geben muss, die die Zusammensetzung des Mikrobiom der unteren Atemwege mitbedingen.

In unserer Arbeit konnten wir eine signifikant größere Diversität und Evenness in den unteren Atemwegen nachweisen. Diese Beobachtung verhält sich konträr zur alleinigen Mikroaspirationstheorie, da ein überwiegender Einfluss der mikrobiellen Flora aus den oberen Atemwegen zu einer sehr ähnlichen Diversität in den unteren Atemwegen führen müsste. Gerade bei einer deutlichen Reduktion der bakteriellen Biomasse in den unteren Atemwegen um etwa zwei Zehnerpotenzen, die wir übereinstimmend mittels qPCR zu Arbeiten von Charlson et al. und Segal et al. zeigen konnten[52, 53], ist es naheliegend, dass entsprechend der Mikroaspirationstheorie ein Eintrag von Mikroorganismen in einen mikrobiell nur spärlich besiedelten Raum wie den unteren Atemwegen, einen umso größeren Einfluss auf die mikrobielle Zusammensetzung nehmen sollte.

Zu berücksichtigen ist, dass bei schwindender bakterieller Biomasse und folglich geringer bakterieller rRNA die Gefahr der Probenkontamination steigt. Salter et al. konnten Kontaminationen durch DNA Extraktions-Kits nachweisen[111, 112]. Weitere typische Kontaminationsquellen werden von Weiss et al. beschrieben[113]. Zur Vermeidung von Kontaminationen hielten wir uns an die aktuellen Standards in der Literatur[28]. Wir gehen deshalb bei unseren Ergebnissen von weitestgehend kontaminationsfreien Ergebnissen aus.

Es stellte sich daher die Frage wie die größere α -Diversität in den unteren Atemwegen in unserem Kollektiv zu erklären ist. In der Source Tracker Analyse konnten wir zeigen, dass 54% der Taxa der unteren Atemwege dem Rachenabstrich als Quelle zuzuordnen ist, was wiederum mit der Mikroaspirationstheorie erklärt werden

kann. 46% hingegen blieben in Ihrer Quelle unbekannt. Diese Ergebnisse spiegeln exakt die Ergebnisse des Teilkollektivs der Lungenteilresektionen aus der Arbeit von L.R wider[15] und deuten darauf hin, dass neben der Mikroaspirationstheorie weitere maßgebliche Faktoren an der Zusammensetzung der mikrobiellen Zusammensetzung der unteren Atemwege beteiligt sind.

Zur weiteren Klärung dieser Frage analysierten wir die taxonomische Verteilung im Rahmen der relativen Abundanzen auf Phylum- und Genusniveau. Wie in den Arbeiten von Bassis et al. und Venkataraman et al.[55, 110] konnten wir jeweils eine insgesamt vergleichbare Verteilung der Taxa in den oberen und unteren Atemwegen zeigen. Proteobakterien ließen sich in unserer Arbeit allerdings signifikant häufiger in den unteren Atemwegen nachweisen.

Auf Genusniveau fand eine Reduktion des Anteils der aus Vertretern des oralen Mikrobioms bestehenden Core-Taxa von 68% in den oberen Atemwegen zu 52% in den unteren Atemwegen statt, während der Anteil an „anderen“ Taxa um den gleichen Anteil zunimmt (vgl. 3.2.2.1.). Diese anteilmäßige Verschiebung passt zur von uns beobachteten Zunahme der Diversität und Evenness, da die von uns detektierten Core-Taxa sich vorwiegend dem oralen Raum als primäres Habitat zuordnen lassen und somit in der Mikroaspirationstheorie eine entscheidende Rolle spielen.

Bei näherer Betrachtung der von uns nachgewiesenen Unterschiede der α -Diversität fällt auf, dass der Simpson Diversitätsindex im Gegensatz zum Shannon-Index keinen signifikanten Unterschied zwischen oberen und unteren Atemwegen zeigt. Die scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse lassen sich bei näherer Betrachtung über die jeweilige Messmethode erklären. Im Shannon-Index finden wenig abundante Taxa eine bessere Gewichtung. Der Simpson Index wird stattdessen von den dominanten Taxa maßgeblich beeinflusst[114].

Aus diesen Überlegungen ergeben sich für unser Kollektiv folgende Schlüsse:

- Durch die Mikroaspirationstheorie lässt sich die Präsenz der Mehrzahl der detektierten Taxa in den unteren Atemwegen erklären
- Die erhöhte α -Diversität in den unteren Atemwegen erklärt sich am ehesten durch das Vorhandensein niedrig abundanter Taxa außerhalb des Spektrums oraler Core-Taxa.

Wir bildeten daher unabhängig von den relativen Abundanzen Subgruppen anhand primärer Habitats, sowie eine Subgruppe von PPM, die in dem von uns untersuch-

ten Kollektiv eine größere Rolle spielen könnten. Die Definition respiratorischer Erreger als PPM erfolgte in Zeiten kulturbasierter mikrobiologischer Diagnostik zur Kennzeichnung von Spezies, deren Nachweis bei Grunderkrankungen wie der COPD häufiger mit chronischer Besiedlung, aber auch akuten Infektionen assoziiert ist. Hierdurch konnten wir eine signifikante Zunahme der primär dem nasalen Mikrobiom zuzuordnenden Taxa *Propionibacterium*, *Staphylococcus* und *Corynebacterium*, sowie dem PPM *Acinetobacter* in den unteren Atemwegen nachweisen. Bassis et. al beschrieben zwar in Ihrer Arbeit zum Einfluss von nasalen, oralen und gastrointestinalen Bakterien auf das Mikrobiom der unteren Atemwege bei 28 gesunden Individuen einen geringen Einfluss der nasalen Taxa, konnten allerdings keinen signifikanten Nachweis einzelner Taxa führen[55]. Ein Unterschied in beiden Arbeiten besteht einerseits im betrachteten Patientenkollektiv, andererseits in der Probengewinnung. Während Bassis et al. ausschließlich gesunde Raucher und Nichtraucher untersuchten, sowie gezielte nasopharyngeale Abstriche entnahmen finden sich in unserer Studie zu 58% an COPD erkrankte Versuchspersonen, 77% Lungenkarzinompatienten und in 41% Emphysematiker mit Probenentnahmen von der Rachenhinterwand. In beiden Kollektiven gab es keine akuten Atemwegserkrankungen oder Exazerbationen der Grunderkrankung zum Untersuchungszeitpunkt. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten dementsprechend auf das Vorhandensein der strukturellen Lungenerkrankung zurückzuführen sein. Durch beeinträchtigte mukoziliäre Clearance und veränderte Wachstumsbedingungen könnte die Inhalation nasaler Taxa in unserem Kollektiv erleichtert und die Elimination erschwert worden sein. Die Auswirkungen sich ändernder lokaler Wachstumsbedingungen wurden in den Arbeiten von Dickson et al. ausführlich beschrieben[62, 63]. Zusammenfassend stellen wir in unserer Arbeit eine im Wesentlichen einheitliche mikrobielle Signatur der oberen und unteren Atemwege fest. Der Großteil der Taxa in den unteren Atemwegen lässt sich über eine die Mikroaspirationstheorie mit den überwiegenden oralen Core-Taxa erklären. Bei genauerer Betrachtung fällt jedoch eine größere Diversität in den unteren Atemwegen auf. Wir konnten zeigen, dass diese unter anderem durch primär nasale Taxa unabhängig von der Mikroaspiration detektiert werden können. In wie fern diese Taxa die Lunge permanent besiedeln oder die Immigration, mangelnde Elimination oder die lokalen Wachstumsverhältnisse bei einer stattgefunden oder aktiven Raucheranamnese begünstigt werden, lässt sich in dieser Arbeit nicht klären. Ein Argument für die Bedeutung der mikrobiellen Besiedlung der unteren Atemwege liefert L.R. et al in ihrer Arbeit. Hier konnte

anhand von vergleichenden Untersuchungen von BAL und Lungengewebe in einem Teilkollektiv eine unterschiedliche mikrobielle Komposition beider Probenmaterialien ausgemacht werden. Während in der BAL die gleichen Bakterien wie in dieser Arbeit detektiert wurden, konnten im Lungengewebe auf Phylumebene *Actinobacteria*, sowie auf Genusebene *Propionibacterium* und *Pseudomonas* nachgewiesen werden. Diese Befunde unterstreichen die Bedeutung des vermehrten Nachweises der nasalen Taxa und der Proteobakterien in den unteren Atemwegen und weisen auf deren mögliche Rolle als Filter vor dem alveolären Kompartiment hin[15].

4.2. Einfluss von pulmonalen Risikofaktoren und Komorbiditäten auf die mikrobielle Zusammensetzung der unteren Atemwege

4.2.1. Das Rauchen als führender Risikofaktor für pulmonale Erkrankungen nimmt keinen direkten Einfluss auf das Mikrobiom der unteren Atemwege

Das Rauchen, als auch das Passivrauchen sind als Risikofaktoren für eine Vielzahl an Erkrankungen bekannt. Neben zahlreichen Malignomkrankungen unterschiedlicher Organsysteme, unter anderem der Lunge[115], sind auch strukturelle Organschäden z.B. auf das kardiovaskuläre System[116] oder der Lunge, allen voran die COPD[117], auf das Rauchen zurückzuführen. Aus aktuellem Anlass können auch im Zuge der COVID-19-Pandemie erste Studien ein schlechteres Outcome der betroffenen Patienten mit einer positiven Raucher- und COPD Anamnese belegen[118].

In wie fern das Rauchen bzw. der Raucherstatus einen direkten Einfluss auf das pulmonale Mikrobiom nehmen ist nur in wenigen Arbeiten beschrieben. In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass es keine direkte Assoziation eines aktiven im Vergleich zu terminierten inhalativen Tabakkonsums auf das Mikrobiom der unteren Atemwege gibt. Auch die kumulative Zahl der pack years zeigt keine Assoziation zur Diversität des Mikrobioms in den unteren Atemwegen. Diese Erkenntnisse decken sich mit den wenigen vorangegangenen Arbeiten. BAL-Proben von 29 gesunden Individuen mit einem aktiven (9), stattgehabten (14) und niemals (9) erfolgten Tabakkonsum untersuchten Segal et al.. Rauchen hatte übereinstimmend zu unserer Arbeit keine Verbindung zu der mikrobiellen Zusammensetzung der Atemwege, α - oder β Diversität [53]. Auch Morris et al. konnten in einer Multicenter-Studie mit 46 pulmonal gesunden Rauchern und Nichtrauchern keine Veränderung der mikrobiellen Zusammensetzung in BAL-Proben aus den unteren Atemwegen nachwei-

sen[77]. Obwohl in unserem Kollektiv keine Nichtraucher vorhanden waren und damit die Analyse des Einflusses des Rauchens auf das Mikrobiom der unteren Atemwege eingeschränkt ist, lassen unsere, als auch die vorangegangenen Arbeiten den Schluss zu, dass der Raucherstatus für sich betrachtet nicht mit Veränderungen der mikrobiellen Komposition der unteren Atemwege assoziiert ist.

Aus diesen Befunden ergibt sich die Frage, welche Faktoren bei Raucher-assoziierten Erkrankungen zur Veränderung des Mikrobioms in den unteren Atemwegen beitragen. Erb-Downward et al. lieferten hierzu in ihrer Arbeit erste Hinweise. Sie untersuchten anhand von BAL-Proben in einem kleinen Kollektiv von 3 Nichtrauchern mit normaler Lungenfunktion, 7 Rauchern mit normaler Lungenfunktion und 4 Rauchern mit einer COPD im exazerbationsfreien Intervall die mikrobielle Zusammensetzung der unteren Atemwege. Sie fanden keinen Unterschied zwischen der Subgruppe der Raucher und Nichtraucher. Die COPD Subgruppe wies hingegen eine geringere Diversität gegenüber den anderen Subgruppen auf[14]. Obwohl das Rauchen die Immunabwehr in den unteren Atemwegen beeinträchtigt[72-74], scheint also erst eine strukturelle Veränderung einen prägenden Einfluss auf das Mikrobiom der unteren Atemwege bei Rauchern zu haben. Eine Liste von Faktoren, die diese Bedingungen determinieren findet sich in der Arbeit von O´Dwyer et al.[7].

4.2.2. Der Schweregrad der COPD beeinflusst die Kolonisation der unteren Atemwege mit potentiell pathogenen Erregern

Wir konnten bereits bei der vergleichenden Analyse des Mikrobioms in den oberen und unteren Atemwegen im Gesamtkollektiv signifikante Unterschiede im Vorkommen von nasalen Taxa, als auch PPM nachweisen. Für chronische Atemwegs- und Lungenerkrankungen sowie deren Exazerbationen konnte in mehreren Studien eine Veränderung der mikrobiellen Signatur der Atemwege nachgewiesen werden. Eine starke Korrelation von PPM wie *Moraxella catarrhalis* oder auch *Haemophilus spp.* konnte mit dem Vorliegen von Asthma bronchiale gezeigt werden[65, 119, 120]. Bei der COPD konnte ebenfalls der Eintrag von PPM in die unteren Atemwege bei fortgeschrittenem Stadium der Erkrankung sowie mit dem Auftreten akuter Exazerbationen nachgewiesen werden[82, 121, 122]. Wir untersuchten, in wie fern sich diese Veränderungen bei COPD im exazerbationsfreien Intervall in unterschiedlichen Stadien widerspiegeln.

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass bei mild-moderater COPD die PPM *Haemophilus* und *Moraxella* signifikant vermehrt auftreten. Es ist auf Basis kultureller

Untersuchungen seit langem bekannt, dass *Non-typeable Haemophilus influenzae* (*NTHi*) zu den häufigsten Erregern akuter Exazerbationen (AECB) der COPD zählt und auch persistierende entzündliche Prozesse der unteren Atemwege triggern kann [123, 124]. Auch in sputumbasierten Mikrobiomarbeiten von Huang et al., sowie Jubinville et al. konnten diese beiden Erreger während einer AECB häufiger nachgewiesen werden. Huang et al. konnte außerdem eine Zunahme von *Actinobacteria*, *Clostridien* und *Bacteroidetes* zeigen. Interessanterweise konnten neben *Haemophilus influenzae* auch dessen phylogenetisch eng verwandten Taxa vermehrt nachgewiesen werden[125]. Dementsprechend zeigt diese Arbeit, dass neben den Leitkeimen der exazerbierten COPD auch ein nicht unerheblicher Teil bislang nicht beachteter Taxa mitreagiert und eine vermutlich unterschätzte Rolle spielt. Jubinville et al. fanden einen mikrobiellen Shift, der in einer relativen Zunahme von *Proteobakterien*, *Firmicuten* oder *Bacteroideten* resultierte. *Streptokokken* und *Moraxella* wurden vor allem im Sputum in AECB von an schwer an COPD erkrankten Versuchspersonen vermehrt nachgewiesen[126]. Sethi et al. konnten ebenfalls *NTHi* und *Moraxella catarrhalis* bei AECB nachweisen[127]. In einer longitudinalen Studie mit einem follow up von 1 Jahr konnten Mayhew et al. anhand von Sputumproben zeigen, dass eine Dysbiose (s. 1.1.8.) zu vermehrten Exazerbationen führt. Diese werden jedoch von bereits im exazerbationsfreien Intervall vorhandenen und nicht von neu aufgetretenen Taxa verursacht. Zu diesen Taxa gehören *Moraxella* und *Haemophilus*[83].

In unserem Kollektiv handelt es sich allesamt um Versuchspersonen ohne aktuelle oder kürzlich stattgehabte Exazerbation. Unsere Ergebnisse bestätigen daher kulturabhängige Arbeiten [30, 31], dass sowohl *Haemophilus* als auch *Moraxella* die Lunge in stabilen Krankheitsverläufen kolonisieren. Bei näherer Betrachtung fällt jedoch auf, dass das vermehrte Vorkommen sich auf die milde Form der COPD bezieht, währenddessen *Moraxella* sich in der schweren Ausprägung der COPD nicht nachweisen und *Haemophilus* signifikant weniger finden lässt. Wir stellten uns daher die Frage welche Gründe es für diese Beobachtung gibt. Ein Hinweis kann die auf Lungengewebe basierende Arbeit von Sze et al liefern. Hier wurden 40 Lungengewebsproben von COPD Patienten im Stadium GOLD 4 gegen 28 Kontrollproben ohne COPD sowohl einer Mikrobiomanalyse, als auch einer quantitativen histopathologischen Untersuchung unterzogen. Es zeigte sich, dass *Haemophilus influenzae* mit der Anzahl der terminalen Bronchiolen korreliert und dementsprechend

in fortgeschrittenen Stadien kaum zu finden ist[128]. Dies deckt sich mit den Ergebnissen unserer Arbeit. Dementsprechend kann das Vorkommen von *Haemophilus influenzae* als Hinweis für die erhaltene bronchiale Feinstruktur, welche im Spätstadium mit zunehmendem emphysematösem Lungengewebsumbau verloren geht, gedeutet werden. Einen weiteren Hinweis dafür, dass *NTHi* eher in früheren Stadien der COPD die Lunge kolonisiert, liefert der Studienarm des Lungengewebes, welches von Frau L.R. untersucht wurde. *NTHi* ließ sich im Lungengewebe kaum nachweisen, währenddessen bei allerdings kleiner Subgruppe in Spätstadien *Pseudomonas* vermehrt nachgewiesen werden konnte[15].

Eine andere Erklärung für diese Beobachtung kann die immunologische Antwort des Wirtes auf das jeweilige Bakterium liefern. Bei Caramori et al. findet sich eine Übersicht immunologischer Mechanismen, die in der stabilen COPD mit zunehmendem Schweregrad und dementsprechend zunehmender Atemwegsobstruktion heraufreguliert werden[129].

4.2.3. Emphysematöse Lungenveränderungen zeigen keinen Einfluss auf die mikrobielle Zusammensetzung der unteren Atemwege

Das Lungenemphysem stellt eine strukturelle Lungenerkrankung dar und tritt bei Rauchern mit COPD meist als zentrilobuläres Lungenemphysem auf[87].

In der bislang nur spärlich vorhandenen Literatur konnte von Liu et al. anhand von Lungengewebsproben von 40 schweren Rauchern mit und ohne Lungenemphysem eine Abnahme der Evenness und dem Shannon-Index in der Gruppe mit nachgewiesenem Emphysem gezeigt werden[130]. In dieser Arbeit konnten wir keinen Unterschied in der mikrobiellen Zusammensetzung von einem emphysematös veränderten Probenlappen gegenüber einem Lappen ohne Emphysem nachweisen. Die unterschiedlichen Ergebnisse können insbesondere auf das unterschiedliche Probenmaterial (Lungengewebe vs. BAL) und unterschiedliche Kollektive (aktive Raucher vs. Raucher und Ex-Raucher) zurückzuführen sein.

Eine Limitation der Analyse dieser Arbeit besteht in der radiologischen Einteilung des Lungenemphysems. Sie wurde qualitativ anhand von Untersuchungen unterschiedlicher Einrichtungen im Rahmen der klinischen Diagnostik durch einen erfahrenen Radiologen des UK-SH Lübeck durchgeführt, was die Standardisierbarkeit erschwert.

Es bleibt daher Gegenstand zukünftiger Arbeiten diese Fragestellung anhand eines größeren Kollektivs und quantitativ unter standardisierten computertomographischen Bedingungen zu bearbeiten. Engel et al. und Subramanian et al. zeigen dieses anhand der quantitativen Computertomographie. Bei diesem Verfahren wertet eine Software nicht nur die durchschnittlichen Dichtewerte, sondern analysiert jedes einzelne dreidimensionale Pixel, ein sogenanntes Voxel[131, 132].

4.2.4. Lungenkarzinome

Die Analyse mikrobieller Besiedlung der unteren Atemwege bei unterschiedlichen Karzinomentitäten der Lunge und ihre mögliche pathogenetische Bedeutung ist ein neues Feld der pulmonalen Krebsforschung. Als potentielle Mechanismen der Mikrobiom-getriggerten Kanzerogenese beschreiben Maddi et al. 1. Die Schaffung eines inflammatorischen Milieus, 2. Metabolische Effekte einer Dysbiose und 3. Die mögliche Genotoxizität einzelner Taxa[133]. Aufgrund des hohen Anteils der Lungenkarzinome an allen Karzinomentitäten und der je nach histologischem Subtyp hohen Letalität fokussieren sich die wissenschaftlichen Erwartungen vornehmlich auf den Nachweis bakterieller Biomarker zur frühen Detektion maligner Lungenerkrankungen.

Die bisherige Literatur weist bezogen auf die mikrobielle Zusammensetzung der Atemwege bei Karzinomkrankungen der unteren Atemwege sehr heterogene Ergebnisse auf. Eine Vielzahl der auf BAL-Proben basierenden Arbeiten stammt aus dem asiatischen Raum und weist vor allem eine unterschiedliche β -Diversität zwischen Kontroll- und Karzinomgruppe auf[134, 135], währenddessen die α -Diversität sich nicht unterscheidet[136]. In der Arbeit von Cheng et al. ließ sich auf Phylumbene *TM7* und auf Genusebene *TM7-3*, *Capnocytophaga*, *Sediminibacterium*, *Gemmiger*, *Blautia* und *Oscillospira* signifikant häufiger in der Karzinomgruppe nachweisen[135]. Im US-amerikanischen Raum wurde zuletzt vermehrt auf Sputum und Lungengewebe basierten Studien zu diesem Thema gesetzt. Hier konnten mikrobielle Unterschiede je nach Karzinomentitäten beschrieben werden. Greathouse et al. konnten ein vermehrtes Auftreten von *Acidovorax*, *Comamonas*, *Klebsiella*, *Rhodoferrax* und *Polaromonas* bei kleinzelligen Karzinomen im Gegensatz zu Adenokarzinomen nachweisen[94].

In dieser Arbeit fanden wir bei kleinen Fallzahlen keine Hinweise auf spezifische mikrobielle Signaturen in den unteren Atemwegen in den Subgruppen der Adeno (AC)- und Plattenepithelkarzinome (SCC), wie auch im Vergleich zu Patienten ohne

Karzinomnachweis in der histologischen Aufarbeitung. Lediglich die kleinzelligen Karzinome wiesen eine differente mikrobielle Signatur gegenüber den anderen Subgruppen auf. Bei einer Subgruppengröße von $n=3$ lassen sich in dieser Arbeit die Ergebnisse nicht weiter statistisch aufarbeiten.

Mögliche Gründe für die Heterogenität der bisherigen Literatur, sowie die Unterschiede zu unseren Ergebnissen lassen sich durch Differenzen in der Zusammensetzung des Patientenkollektivs wie z.B. der ethnischen Herkunft, die Präanalytik (Sputum vs. BAL vs. Lungengewebe; Probenentnahme aus Tumorgewebe oder benachbarten Strukturen), Komorbiditäten (Einfluss struktureller Lungenerkrankungen wie der COPD) etc. erklären. Die Betrachtung des Venn-Diagramm (Abb.: 11) zeigt bereits in unserem verhältnismäßig kleinen Kollektiv eine hochgradige Überlappung wesentlicher Einflussfaktoren auf das pulmonale Mikrobiom, wodurch die Analyse der tumorbedingten Veränderungen auch unabhängig von deren histologischer Heterogenität erschwert ist.

Aufgrund der Komplexität bedarf es einer größeren Multicenterstudie mit ausreichender Fallzahl, die sowohl Lungengewebe, Sputum, als auch Material aus den unteren Atemwegen miteinander vergleicht.

Ausblick:

Alles in allem ist das Verständnis des pulmonalen Mikrobiom im letzten Jahrzehnt rasant gewachsen. Unsere Arbeit hat hierzu einen Beitrag in einem Kollektiv aus Rauchern und Ex-Rauchern mit und ohne COPD geleistet. Durch die Weiterentwicklung der Sequenziermethoden gelingt es seit kurzer Zeit, die Interaktion der mikrobiellen Taxa untereinander und mit dem Wirt genauer zu betrachten und zu verstehen. Damit werden sowohl die protektive Wirkung eines homöostatischen Mikrobioms als auch die Dysbiose und deren funktionelle Auswirkung auf Gesundheit und Krankheit besser verstanden. Mit diesen sogenannten *Third-Generation-Sequencing-Methoden* können zukünftige Forschungsergebnisse mit mehr Relevanz für Diagnostik und Therapie entzündlicher Lungenerkrankungen erwartet werden. Inwiefern sie die Erwartungen im Bereich der Früherkennung des karzinogenen Wachstums anhand von mikrobiellen Biomarkern oder folgend der Entwicklung therapeutischer Optionen erfüllen können, werden die zukünftigen Arbeiten zeigen müssen.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde das Mikrobiom der oberen und unteren Atemwege vergleichend anhand von Rachenabstrichen und bronchoalveolären Lavagen an einem Kollektiv aus 31 Rauchern und Ex-Rauchern mit und ohne Raucher-assoziierten Erkrankungen untersucht. Die Analyse der Proben erfolgte mit Hilfe des *MiSeq-Sequenzierers* der Firma *Illumina*[®], einer *Next-Generation-Sequencing-Methode*. Die Analyse der Herkunft von Taxa in den unteren Atemwegen wurde mittels Source-Tracker durchgeführt.

Beim Vergleich von oberen und unteren Atemwegen fand sich eine deutliche Abnahme der bakteriellen Biomasse nach distal. In den unteren Atemwegen konnten wir eine größere Diversität und Evenness nachweisen. Auf Phylumebene konnten wir *Proteobakterien* häufiger in der bronchoalveolären Lavage nachweisen. Sowohl in den oberen, als auch in den unteren Atemwegen konnten wir 3 identische Core Taxa isolieren, welche dem Oropharynx als primärem Habitat zuzuordnen sind. Diese Beobachtung stützt die sogenannte Mikroaspirationstheorie, welche Mikroaspirationen aus den oberen Atemwegen als Hauptquelle für die mikrobielle Besiedlung der unteren Atemwege ansieht. Die folgende Source-Tracker Analyse zeigte allerdings, dass nur 54% der nachgewiesenen Taxa den Mikrobiota der oberen Atemwege direkt als Quelle zuzuordnen sind. Gemeinsam mit der höheren α -Diversität aus den Proben der bronchoalveolären Lavage deuteten wir dieses Ergebnis als Hinweis für eine Besiedlung der unteren Atemwege auch durch Taxa außerhalb des oralen Mikrobioms. In den daraus folgenden Untersuchungen der relativen Abundanzen unter Betrachtung primärer Habitats zeigte sich ein vermehrtes Vorkommen nasaler Taxa und einigen potentiell pathogenen Mikroorganismen in den unteren Atemwegen, ein Hinweis auf eine Besiedlung der unteren Atemwege durch ein distinktes Mikrobiom, das sich nicht allein durch die Mikroaspirationstheorie erklären lässt.

In den Untersuchungen zu Risikofaktoren und Komorbiditäten fand sich bei Patienten mit COPD stadienabhängig ein vermehrter Nachweis der mit dieser Erkrankung assoziierten Genera *Haemophilus* und *Moraxella*. Da es sich in unserem Kollektiv um Patienten außerhalb akuter Exazerbationen handelte, interpretierten wir diesen Befund als Hinweis für eine permanente Besiedlung bei struktureller Lungenerkrankung. Die Überprüfung verschiedener Karzinomentitäten auf die mikrobielle Zusammensetzung der unteren Atemwege zeigte ein sehr heterogenes Bild. Unterschiede

zwischen den histologischen Subtypen des Lungenkarzinoms könnten hierbei eine Rolle spielen.

Inzwischen haben sich die Mikrobiom-Analysen weiterentwickelt. Da hier eine exaktere Sequenzierung unter Einschluss nichtbakterieller Erreger, als auch Analysen der Interaktion der Taxa untereinander und zwischen Mikrobiota und dem Wirt möglich sind, können innovative Erkenntnisse bezogen auf das pulmonale Mikrobiom bei entzündlichen und neoplastischen Lungenerkrankungen erwartet werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Whittaker, R.J., K.J. Willis, and R. Field, *Scale and Species Richness: Towards a General, Hierarchical Theory of Species Diversity*. Journal of Biogeography, 2001. 28(4): p. 453-470.
2. Münch, R., *Robert Koch*. Microbes Infect, 2003. 5(1): p. 69-74.
3. Blevins, S.M. and M.S. Bronze, *Robert Koch and the 'golden age' of bacteriology*. Int J Infect Dis, 2010. 14(9): p. e744-51.
4. Tabrah, F.L., *Koch's postulates, carnivorous cows, and tuberculosis today*. Hawaii Med J, 2011. 70(7): p. 144-8.
5. Wang, J., F. Li, and Z. Tian, *Role of microbiota on lung homeostasis and diseases*. Sci China Life Sci, 2017. 60(12): p. 1407-1415.
6. Huang, Y.J., et al., *Airway microbiome dynamics in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease*. J Clin Microbiol, 2014. 52(8): p. 2813-23.
7. O'Dwyer, D.N., R.P. Dickson, and B.B. Moore, *The Lung Microbiome, Immunity, and the Pathogenesis of Chronic Lung Disease*. J Immunol, 2016. 196(12): p. 4839-47.
8. Ursell, L.K., et al., *Defining the human microbiome*. Nutr Rev, 2012. 70 Suppl 1: p. S38-44.
9. Lederberg J, M.A., *'Ome sweet 'omics—a genealogical treasury of words*. Scientist, April 2001. 15(7).
10. Jöst, C., *Biodiversität für Fußgänger (I) – Der Shannon-Index*. 2014 [cited 2017 Juli]; Available from: <http://www.christopherjoest.de/meeresbiologie/biodiversitaet-fuer-fussgaenger-i-der-shannon-index/>.
11. Rogers, G.B., et al., *Respiratory microbiota: addressing clinical questions, informing clinical practice*. Thorax, 2015. 70(1): p. 74-81.
12. Spektrum-Akademischer-Verlag. *Kompaktlexikon der Biologie*. 2001 [21.04.2021]; Available from: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/abundanz/59>.
13. Avolio, M.L., et al., *Demystifying dominant species*. New Phytol, 2019. 223(3): p. 1106-1126.
14. Erb-Downward, J.R., et al., *Analysis of the lung microbiome in the "healthy" smoker and in COPD*. PLoS One, 2011. 6(2): p. e16384.
15. Reinhold, L., et al., *Dissimilarity of Airway and Lung Tissue Microbiota in Smokers undergoing Surgery for Lung Cancer*. Microorganisms, 2020. 8(6).

16. Yang, D., et al., *The impact of lung microbiota dysbiosis on inflammation*. Immunology, 2020. 159(2): p. 156-166.
17. Hufnagl, K., et al., *Dysbiosis of the gut and lung microbiome has a role in asthma*. Semin Immunopathol, 2020. 42(1): p. 75-93.
18. Xu, N., et al., *Microbiota dysbiosis in lung cancer: evidence of association and potential mechanisms*. Transl Lung Cancer Res, 2020. 9(4): p. 1554-1568.
19. Blaxter, M., et al., *Defining operational taxonomic units using DNA barcode data*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005. 360(1462): p. 1935-43.
20. Sanger, F., et al., *Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA*. Nature, 1977. 265(5596): p. 687-95.
21. Fleischmann, R.D., et al., *Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd*. Science, 1995. 269(5223): p. 496-512.
22. Green, E.D., J.D. Watson, and F.S. Collins, *Human Genome Project: Twenty-five years of big biology*. Nature, 2015. 526(7571): p. 29-31.
23. Muzzey, D., E.A. Evans, and C. Lieber, *Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling*. Curr Genet Med Rep, 2015. 3(4): p. 158-165.
24. Mac Aogáin, M., et al., *Metagenomics Reveals a Core Macrolide Resistome Related to Microbiota in Chronic Respiratory Disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2020. 202(3): p. 433-447.
25. Breitwieser, F.P., J. Lu, and S.L. Salzberg, *A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly*. Brief Bioinform, 2019. 20(4): p. 1125-1136.
26. Gu, W., S. Miller, and C.Y. Chiu, *Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection*. Annu Rev Pathol, 2019. 14: p. 319-338.
27. Barko, P.C., et al., *The Gastrointestinal Microbiome: A Review*. J Vet Intern Med, 2018. 32(1): p. 9-25.
28. Eisenhofer, R., et al., *Contamination in Low Microbial Biomass Microbiome Studies: Issues and Recommendations*. Trends Microbiol, 2019. 27(2): p. 105-117.
29. NIH HMP Working Group, et al., *The NIH Human Microbiome Project*. Genome Res, 2009. 19(12): p. 2317-23.
30. Human Microbiome Project, C., *Structure, function and diversity of the healthy human microbiome*. Nature, 2012. 486(7402): p. 207-14.

31. Human Microbiome Project, C., *A framework for human microbiome research*. Nature, 2012. 486(7402): p. 215-21.
32. NIH, *The Human Microbiom Project*. [cited 2017 Juli]; Available from: <http://hmpdacc.org/overview/about.php>.
33. Grice, E.A. and J.A. Segre, *The skin microbiome*. Nat Rev Microbiol, 2011. 9(4): p. 244-53.
34. Frank, D.N., et al., *Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(34): p. 13780-5.
35. Martinez, F.D., *The human microbiome. Early life determinant of health outcomes*. Ann Am Thorac Soc, 2014. 11 Suppl 1: p. S7-12.
36. Karlsson, F., et al., *Assessing the human gut microbiota in metabolic diseases*. Diabetes, 2013. 62(10): p. 3341-9.
37. Kim, S.H., et al., *The anti-diabetic activity of Bifidobacterium lactis HY8101 in vitro and in vivo*. J Appl Microbiol, 2014. 117(3): p. 834-45.
38. Kang, J.H., et al., *Anti-obesity effect of Lactobacillus gasseri BNR17 in high-sucrose diet-induced obese mice*. PLoS One, 2013. 8(1): p. e54617.
39. Zhang, Y., et al., *Lactobacillus casei reduces susceptibility to type 2 diabetes via microbiota-mediated body chloride ion influx*. Sci Rep, 2014. 4: p. 5654.
40. Nishida, A., et al., *Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Clin J Gastroenterol, 2018. 11(1): p. 1-10.
41. Aroutcheva, A., et al., *Defense factors of vaginal lactobacilli*. Am J Obstet Gynecol, 2001. 185(2): p. 375-9.
42. Fettweis, J.M., et al., *Differences in vaginal microbiome in African American women versus women of European ancestry*. Microbiology, 2014. 160(Pt 10): p. 2272-82.
43. Huang, B., et al., *The changing landscape of the vaginal microbiome*. Clin Lab Med, 2014. 34(4): p. 747-61.
44. Fredricks, D.N., T.L. Fiedler, and J.M. Marrazzo, *Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis*. N Engl J Med, 2005. 353(18): p. 1899-911.
45. Thorpe, J.E., et al., *Bronchoalveolar lavage for diagnosing acute bacterial pneumonia*. J Infect Dis, 1987. 155(5): p. 855-61.
46. Baughman, R.P., et al., *Use of the protected specimen brush in patients with endotracheal or tracheostomy tubes*. Chest, 1987. 91(2): p. 233-6.

47. Vandeputte, D., et al., *Quantitative microbiome profiling links gut community variation to microbial load*. Nature, 2017. 551(7681): p. 507-511.
48. Sender, R., S. Fuchs, and R. Milo, *Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body*. PLoS biology, 2016. 14(8): p. e1002533.
49. Charlson, E.S., et al., *Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract*. American journal of respiratory and critical care medicine, 2011. 184(8): p. 957-963.
50. Durack, J., et al., *Bacterial biogeography of adult airways in atopic asthma*. Microbiome, 2018. 6(1): p. 104.
51. Sulaiman, I., et al., *Evaluation of the airway microbiome in nontuberculous mycobacteria disease*. Eur Respir J, 2018. 52(4).
52. Charlson, E.S., et al., *Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. 184(8): p. 957-63.
53. Segal, L.N., et al., *Enrichment of lung microbiome with supraglottic taxa is associated with increased pulmonary inflammation*. Microbiome, 2013. 1(1): p. 19.
54. Carney, S.M., et al., *Methods in Lung Microbiome Research*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2020. 62(3): p. 283-299.
55. Bassis, C.M., et al., *Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals*. mBio, 2015. 6(2): p. e00037.
56. Segal, L.N., et al., *HIV-1 and bacterial pneumonia in the era of antiretroviral therapy*. Proc Am Thorac Soc, 2011. 8(3): p. 282-7.
57. Zhang, L., et al., *The Oral Microbiota May Have Influence on Oral Cancer*. Front Cell Infect Microbiol, 2019. 9: p. 476.
58. Chattopadhyay, I., M. Verma, and M. Panda, *Role of Oral Microbiome Signatures in Diagnosis and Prognosis of Oral Cancer*. Technol Cancer Res Treat, 2019. 18: p. 1533033819867354.
59. Tuominen, H. and J. Rautava, *Oral Microbiota and Cancer Development*. Pathobiology, 2020: p. 1-11.
60. Oh, J., et al., *Shifts in human skin and nares microbiota of healthy children and adults*. Genome Med, 2012. 4(10): p. 77.
61. Pereira, P.A.B., et al., *Oral and nasal microbiota in Parkinson's disease*. Parkinsonism Relat Disord, 2017. 38: p. 61-67.

62. Dickson, R.P., J.R. Erb-Downward, and G.B. Huffnagle, *Towards an ecology of the lung: new conceptual models of pulmonary microbiology and pneumonia pathogenesis*. *Lancet Respir Med*, 2014. 2(3): p. 238-46.
63. Dickson, R.P., F.J. Martinez, and G.B. Huffnagle, *The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases*. *The Lancet*, 2014. 384(9944): p. 691-702.
64. Dickson, R.P., J.R. Erb-Downward, and G.B. Huffnagle, *Homeostasis and its disruption in the lung microbiome*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015. 309(10): p. L1047-55.
65. Hilty, M., et al., *Disordered microbial communities in asthmatic airways*. *PLoS One*, 2010. 5(1): p. e8578.
66. Pragman, A.A., et al., *The lung microbiome in moderate and severe chronic obstructive pulmonary disease*. *PLoS One*, 2012. 7(10): p. e47305.
67. Beck, J.M., V.B. Young, and G.B. Huffnagle, *The microbiome of the lung*. *Transl Res*, 2012. 160(4): p. 258-66.
68. Dickson, R.P., et al., *Spatial Variation in the Healthy Human Lung Microbiome and the Adapted Island Model of Lung Biogeography*. *Ann Am Thorac Soc*, 2015. 12(6): p. 821-30.
69. MacArthur, R.H. and E.O. Wilson, *An Equilibrium Theory of Insular Zoogeography*. *Evolution*, 1963. 17(4): p. 373-387.
70. RKI, *Gesundheitsmonitoring Rauchen*. 2015 [20.11.2020]; Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Themen/Rauchen/Rauchen_node.html.
71. Deutsches Krebsforschungszentrum in der Helmholtz-Gemeinschaft, *Rauchen, Passivrauchen und Krebs: Gefährlicher Dunst Zigarette, Wasserpfeife und Tabakerhitzer steigern das Krebsrisiko*. 08.01.2018 20.11.2020]; Available from: <https://www.krebsinformationsdienst.de/vorbeugung/risiken/rauchen-und-passivrauchen.php>.
72. Mehta, H., K. Nazzal, and R.T. Sadikot, *Cigarette smoking and innate immunity*. *Inflamm Res*, 2008. 57(11): p. 497-503.
73. Arnson, Y., Y. Shoenfeld, and H. Amital, *Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity*. *J Autoimmun*, 2010. 34(3): p. J258-65.
74. Droemann, D., et al., *Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients*. *Respir Res*, 2005. 6(1): p. 68.

75. Huang, C. and G. Shi, *Smoking and microbiome in oral, airway, gut and some systemic diseases*. J Transl Med, 2019. 17(1): p. 225.
76. Garmendia, J., P. Morey, and J.A. Bengoechea, *Impact of cigarette smoke exposure on host-bacterial pathogen interactions*. Eur Respir J, 2012. 39(2): p. 467-77.
77. Morris, A., et al., *Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers*. Am J Respir Crit Care Med, 2013. 187(10): p. 1067-75.
78. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, I., *Global Strategy for the diagnosis, management and Prevention of chronic obstructive pulmonary disease (2021 Report)*. 2020, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, Inc. p. 164.
79. Halpin, D.M.G., et al., *The GOLD Summit on chronic obstructive pulmonary disease in low- and middle-income countries*. Int J Tuberc Lung Dis, 2019. 23(11): p. 1131-1141.
80. Böcker, W., et al., *Pathologie*, ed. 5. 2012: Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag. 488.
81. Dickson, R.P. and G.B. Huffnagle, *The Lung Microbiome: New Principles for Respiratory Bacteriology in Health and Disease*. PLoS Pathog, 2015. 11(7): p. e1004923.
82. Wang, Z., et al., *Lung microbiome dynamics in COPD exacerbations*. Eur Respir J, 2016. 47(4): p. 1082-92.
83. Mayhew, D., et al., *Longitudinal profiling of the lung microbiome in the AERIS study demonstrates repeatability of bacterial and eosinophilic COPD exacerbations*. Thorax, 2018. 73(5): p. 422-430.
84. Garcia-Nuñez, M., et al., *Severity-related changes of bronchial microbiome in chronic obstructive pulmonary disease*. J Clin Microbiol, 2014. 52(12): p. 4217-23.
85. Dy, R. and S. Sethi, *The lung microbiome and exacerbations of COPD*. Curr Opin Pulm Med, 2016. 22(3): p. 196-202.
86. Gupta, S., et al., *Comparative analysis of the alveolar microbiome in COPD, ECOPD, Sarcoidosis, and ILD patients to identify respiratory illnesses specific microbial signatures*. Sci Rep, 2021. 11(1): p. 3963.
87. Egger, B. and J.D. Aubert, *[Pulmonary emphysema: mechanisms and therapeutic perspectives]*. Rev Med Suisse, 2005. 1(41): p. 2665-72.

88. Zentrum für Krebsregisterdaten (Z.f.K.), 2016 17.12.2019 25.11.2020]; Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/ZfKD/zfkd_node.html.
89. Böcker, W., et al., *Pathologie*. 5 ed. 2012: Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag. 507-510.
90. Liang, H.Y., et al., *Facts and fiction of the relationship between preexisting tuberculosis and lung cancer risk: a systematic review*. *Int J Cancer*, 2009. 125(12): p. 2936-44.
91. Pallis, A.G. and K.N. Syrigos, *Lung cancer in never smokers: disease characteristics and risk factors*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2013. 88(3): p. 494-503.
92. Lee, S.H., et al., *Characterization of microbiome in bronchoalveolar lavage fluid of patients with lung cancer comparing with benign mass like lesions*. *Lung Cancer*, 2016. 102: p. 89-95.
93. Huang, D., et al., *The characterization of lung microbiome in lung cancer patients with different clinicopathology*. *Am J Cancer Res*, 2019. 9(9): p. 2047-2063.
94. Greathouse, K.L., et al., *Interaction between the microbiome and TP53 in human lung cancer*. *Genome Biol*, 2018. 19(1): p. 123.
95. Rabe, K.F., et al., *Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007. 176(6): p. 532-55.
96. Vogelmeier, C., et al., *[Guidelines for the diagnosis and therapy of COPD issued by Deutsche Atemwegsliga and Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin]*. *Pneumologie*, 2007. 61(5): p. e1-40.
97. Kozich, J.J., et al., *Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013. 79(17): p. 5112-5120.
98. Schloss, P.D., et al., *Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009. 75(23): p. 7537-7541.
99. Pruesse, E., et al., *SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB*. *Nucleic Acids Research*, 2007. 35(21): p. 7188-7196.

100. Edgar, R.C., et al., *UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection*. *Bioinformatics*, 2011. 27(16): p. 2194-2200.
101. DeSantis, T.Z., et al., *Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB*. *Appl Environ Microbiol*, 2006. 72(7): p. 5069-72.
102. Chen, L., et al., *GMPR: A robust normalization method for zero-inflated count data with application to microbiome sequencing data*. *PeerJ*, 2018. 6: p. e4600.
103. Davis, N.M., et al., *Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data*. *Microbiome*, 2018. 6(1): p. 226.
104. Knights, D., et al., *Bayesian community-wide culture-independent microbial source tracking*. *Nat Methods*, 2011. 8(9): p. 761-3.
105. R Core Team, *A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria*. 2015; Available from: <https://www.R-project.org/>.
106. Wickham, H., *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. 2016.
107. Jari Oksanen, F.G.B., Roeland Kindt, Pierre Legendre, Peter R. Minchin, R. B. O'Hara, Gavin L. Simpson, Peter Solymos, M. Henry H. Stevens and Helene Wagner. *vegan: Community Ecology Package. R package. version 2.3-4 2016* [cited 2016; Available from: <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>].
108. Cuthbertson, L., et al., *Lung function and microbiota diversity in cystic fibrosis*. *Microbiome*, 2020. 8(1): p. 45.
109. Morris, A., et al., *Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013. 187(10): p. 1067-75.
110. Venkataraman, A., et al., *Application of a neutral community model to assess structuring of the human lung microbiome*. *mBio*, 2015. 6(1).
111. Salter, S.J., et al., *Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses*. *BMC Biol*, 2014. 12: p. 87.
112. Dumont-Leblond, N., et al., *Development of a robust protocol for the characterization of the pulmonary microbiota*. *Commun Biol*, 2021. 4(1): p. 164.

113. Weiss, S., et al., *Tracking down the sources of experimental contamination in microbiome studies*. Genome Biol, 2014. 15(12): p. 564.
114. Hill, T.C., et al., *Using ecological diversity measures with bacterial communities*. FEMS Microbiol Ecol, 2003. 43(1): p. 1-11.
115. Kieseritzky, K.v., *Rauchen und Krebs*. 2018 [03.03.2021]; Available from: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/bewusst-leben/rauchen-und-krebs.html>.
116. Brown, J.C., T.E. Gerhardt, and E. Kwon, *Risk Factors For Coronary Artery Disease*, in *StatPearls*. 2021, StatPearls Publishing
Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
117. Labaki, W.W. and S.R. Rosenberg, *Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. Ann Intern Med, 2020. 173(3): p. Itc17-itc32.
118. Sanchez-Ramirez, D.C. and D. Mackey, *Underlying respiratory diseases, specifically COPD, and smoking are associated with severe COVID-19 outcomes: A systematic review and meta-analysis*. Respir Med, 2020. 171: p. 106096.
119. Durack, J., et al., *Features of the bronchial bacterial microbiome associated with atopy, asthma, and responsiveness to inhaled corticosteroid treatment*. J Allergy Clin Immunol, 2017. 140(1): p. 63-75.
120. Simpson, J.L., et al., *Airway dysbiosis: Haemophilus influenzae and Tropheryma in poorly controlled asthma*. Eur Respir J, 2016. 47(3): p. 792-800.
121. Mammen, M.J. and S. Sethi, *COPD and the microbiome*. Respirology, 2016. 21(4): p. 590-9.
122. Dima, E., et al., *The lung microbiome dynamics between stability and exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): Current perspectives*. Respir Med, 2019. 157: p. 1-6.
123. Murphy, T.F., *Vaccines for Nontypeable Haemophilus influenzae: the Future Is Now*. Clin Vaccine Immunol, 2015. 22(5): p. 459-66.
124. Saliu, F., et al., *Chronic infection by nontypeable Haemophilus influenzae fuels airway inflammation*. ERJ Open Res, 2021. 7(1).
125. Huang, Y.J., et al., *A persistent and diverse airway microbiota present during chronic obstructive pulmonary disease exacerbations*. Omics, 2010. 14(1): p. 9-59.

126. Jubinville, E., et al., *Exacerbation induces a microbiota shift in sputa of COPD patients*. PLOS ONE, 2018. 13(3): p. e0194355.
127. Sethi, S. and T.F. Murphy, *Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease*. N Engl J Med, 2008. 359(22): p. 2355-65.
128. Sze, M.A., et al., *Host Response to the Lung Microbiome in Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. Am J Respir Crit Care Med, 2015. 192(4): p. 438-45.
129. Caramori, G., et al., *COPD immunopathology*. Semin Immunopathol, 2016. 38(4): p. 497-515.
130. Liu, Y., et al., *Lung tissue microbial profile in lung cancer is distinct from emphysema*. Am J Cancer Res, 2018. 8(9): p. 1775-1787.
131. Engel, M., et al., *Influence of lung CT changes in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) on the human lung microbiome*. PLoS One, 2017. 12(7): p. e0180859.
132. Subramanian, D.R., et al., *Emphysema- and airway-dominant COPD phenotypes defined by standardised quantitative computed tomography*. Eur Respir J, 2016. 48(1): p. 92-103.
133. Maddi, A., et al., *The microbiome and lung cancer*. J Thorac Dis, 2019. 11(1): p. 280-291.
134. Tsay, J.J., et al., *Airway Microbiota Is Associated with Upregulation of the PI3K Pathway in Lung Cancer*. Am J Respir Crit Care Med, 2018. 198(9): p. 1188-1198.
135. Cheng, C., et al., *Characterization of the lung microbiome and exploration of potential bacterial biomarkers for lung cancer*. Transl Lung Cancer Res, 2020. 9(3): p. 693-704.
136. Jin, J., et al., *Diminishing microbiome richness and distinction in the lower respiratory tract of lung cancer patients: A multiple comparative study design with independent validation*. Lung Cancer, 2019. 136: p. 129-135.

7. Anhang

7.1. Verwendete Primer

Liste der 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 CTAATA 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 AGTCAGT-CAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_B	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT ACTATGTC AGTCAGT-CAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_C	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT AGTAGCGT AGTCAGT-CAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_D	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT CAGTGAGT AGTCAGT-CAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_E	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT CGTACTCA AGTCAGT-CAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_F	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT CTACGCAG AGTCAGT-CAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_G	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT GGAGACTA AGTCAGT-CAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_H	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT GTCGCTCG AGTCAGT-CAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_I	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT GTCGTAGT AGTCAGT-CAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_J	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TAGCAGAC AGTCAGT-CAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_K	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TCATAGAC AGTCAGT-CAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_L	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TCGCTATA AGTCAGT-CAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_M	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT AAGTCGAG AGTCAGT-CAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_N	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT AACTTTCG AGTCAGT-CAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_O	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT AGCTGCTA AGTCAGT-CAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_P	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT CATAGAGA AGTCAGT-CAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_Q	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT CGTAGATC AGTCAGT-CAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT

V4R_MID_R	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT CTCGTTAC AGTCAGT-CAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_S	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT GCGCACGT AGTCAGT-CAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_T	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT GGTACTAT AGTCAGT-CAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_U	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT GTATACGC AGTCAGT-CAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_V	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TACGAGCA AGTCAGT-CAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_W	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TCAGCGTT AGTCAGT-CAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT
V4R_MID_X	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT TCGCTACG AGTCAGT-CAG CC GGACTACHVGGGTWTCTAAT

Sequenzen der verwendeten Primer für die qPCR

16Sr Forward	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
16Sr Reverse	TGCTGCCTCCCGTAGGAGT
18s Forward	TCAAGAACGAAAGTCGGAGG
18s Reverse	GGACATCTAAGGGCATCACA

7.2. Aufklärungsbogen

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.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. med. K. Rohmann

Prof. Dr. med. K. Dalhoff

7.3. Einverständniserklärung

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)

7.4. Patientenfragebogen

Dokumentationsbogen Patientendaten

Patienten-Identifikation:

Untersuchungsdatum:

Alter, m/w, BMI

Raucherstatus:

Raucher Nichtraucher Ex-Raucher seit

Packyears (kumulativ):

Exacerbationen: nein <2/J. ≥2/J. +Hosp. +ICU

COPD:

nein ja, Stadium _____

FEV1: FEV1%VC: (Lufu kompl abheften)

CT: Emphysem? Bronchiektasen? Sonstige Befunde ? (Befund abheften)

Labor: BB, CRP, Krea, BGA (Kumulativbefund abheften)

Medikation:

Steroide : nein ja inh./p.o. ? po Dosis ?

Antibiotika < 90d: nein ja po/iv welche/warum?

weitere relevante Vormedikation:

Vorerkrankungen und aktuelle Erkrankungen (insbesondere Infektionen):

7.5. Radiologisches Auswertungsschema

Kennung	Kernel/Schichtdicke	Bronchiektasen						Bronchialwandverdickung							
		OL		ML		UL		zentral		OL		ML		UL	
		R	L:	R	L:	R	L:	R	L	R	L:	R	L:	R	L:
VP002	FC 35, 1mm	0	<5;kl	<5;kl	5-10;kl	<5;kl	<5;kl	1	1	0	0	0	0	0	0
VP003	B70, 5 mm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VP004	FC 14, 1 mm, low dose	0	0	0	0	0	<5; gr	0	0	0	0	0	0	0	0
VP005	FC 35, 1mm	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
VP006	b80, 1 mm	0	0	0	0	<5;kl	0	1	1	0	0	0	0	0	0
VP007	b80, 1 mm	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
VP008	FC 14, 1 mm	0	0	0	0	<5, kl	0	1	0	0	0	0	0	0	1
VP009	b80, 1 mm	0	0	0	0	<5, gr	0	1	1	0	0	0	0	1, MP	1, MP
VP010	FC 35, 1 mm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VP011	b80, 5 mm	0	0	0	0	<5;kl	0	0	0	0	0	0	0	1	0
VP012	b80, 5 mm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VP013	FC 35, 3 mm	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
VP015	FC 14, 0,5 mm	0	0	0	0	0	5-10, kl	0	0	0	0	0	0	0	0
VP016	i70f, 5 mm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VP017	FC 15, 3 mm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1, MP
VP018	b80, 1 mm	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
VP019	b80, 1 mm	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1, MP	0, MP
VP020	b80, 1 mm	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
VP021	b80, 1 mm	<5, kl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VP022	FC 14, 1 mm	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0, MP	0	0
VP024	FC 15, 5 mm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VP025	B30, 3 mm	0	0	0	0	<5, kl	0	1	1	0	0	0	0	0	0
VP026	2,5 mm	0	0	0	0	0	<5, kl	0	1	0	0	0	0	0	1, MP
VP027	b80, 5 mm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VP028	FC 35, 1 mm	0	0	<5, kl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VP029	FC 14, 1 mm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VP030	b80, 1 mm	<5, kl	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
VP031	FC 52, 2 mm	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
VP032	FC14, 1 mm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VP033	b80, 1 mm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VP034	i70f, 5 mm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Kennung	Emphysem						Pulmo		Gesamt	Besonderheiten
	OL		ML		UL		R	L		
	R	L:	R	L:	R	L:	R	L		
VP002	3	2	1	1	3	3	2,333	2	2,1667	Rundherd S8 re, Narbe UL bds. + Lingula
VP003	1	1	1	1	1	1	1	1	1	RF LOL mit Infiltration des bronchovaskulären Bündels; Narbe RUL
VP004	1	1	1	1	0	0	0,667	0,667	0,6667	Rundherd basales S3 re; Atemartefakte OF und MF
VP005	1	0	0	0	0	0	0,333	0	0,1667	Raumforderung LOL mit Infiltration des bronchovaskulären Bündels
VP006	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Rundherd LOL, Narben linke pulmo, UL Teilatelektase links, Pleuraerguss links
VP007	1	1	0	0	0	0	0,333	0,333	0,33333	Lobärpneumonie ML, Plattenatelektase RUL, Rundherd LUL, zentrale RF links mit V.a. Infiltration des bronchocaskulären Bündels
VP008	2	2	1	1	1	1	1,333	1,333	1,33333	RF LUL mit Infiltration des UL-Bronchus -> Teilatelektase
VP009	0	0	0	0	0	0	0	0	0	RF LUL, geringe Peribronchitis bds. Dorsobale UL; ML Teilatelektase, Plattenatelektase RUL
VP010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Rundherde ML, ML und Lingula Teilatelektase
VP011	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2 RF mit Kaverne im LOL, Umschriebene Peribronchitische Infiltrate RUL
VP012	3	3	3	3	3	2	3	2,667	2,83333	Rundherd LUL, kleiner Runherd Lingula, Plattenatelektase im ML
VP013	1	0	0	0	1	1	0,667	0,333	0,5	RF LOL mit Infiltration des bronchovaskulären Bündels -> OL-Atelektase
VP015	2	2	0	1	1	1	1	1,333	1,1667	RF RUL, Plattenatelektase LUL
VP016	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1 Rundherd LUL
VP017	1	1	0	0	0	1	0,333	0,667	0,5	RF ML, Rundherd LUL, Peribronchitis UL bds., linksseitig führend
VP018	2	2	1	1	1	1	1,333	1,333	1,33333	RF ML/OL
VP019	0	0	1	0	0	0	0,333	0	0,1667	RF ROL, Dystelektase Lingula
VP020	1	1	0	0	1	0	0,667	0,333	0,5	Rundherde LOL, ML-Teilatelektase, Dystelektase Lingula, pulmonalvenöse Stauung
VP021	1	1	0	0	0	0	0,333	0,333	0,33333	RF ROL, Rundherd ML & ROL
VP022	2	2	1	1	1	1	1,333	1,333	1,33333	Rundherd LOL, Narben linke pulmo, UL Teilatelektase links, Pleuraerguss links
VP024	0	0	0	0	0	0	0	0	0	RF ROL, Dystelektase RUL
VP025	1	1	1	1	2	2	1,333	1,333	1,33333	Links zentrale RF mit Infiltration des bronchovaskulären Bündels mit subtotaler LOL-Atelektase
VP026	0	1	0	0	0	0	0	0,333	0,1667	RF linker Hauptbronchus, LOL-Teilatelektase, Peribronchitis LUL
VP027	0	0	0	0	0	0	0	0	0	PE im obliquen Interlobium re, angrenzende Belüftungsstörung, DD: umschriebenes Infiltrat
VP028	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 Rundherd Lingula
VP029	0	0	0	0	0	0	0	0	0	RF RUL mit kleiner Kavitation und angrenzend geringem PE
VP030	1	1	0	0	1	1	0,667	0,667	0,6667	RF ROL
VP031	2	2	1	1	1	1	1,333	1,333	1,33333	Rundherd LUL mit Kavitation, Orthostase bds. Dorsobasal
VP032	3	2	1	1	1	1	1,667	1,333	1,5	Rundherd ROL, Narbe ROL
VP033	1	1	0	0	0	0	0,333	0,333	0,33333	RUL-Resektion, Narbe ML, Emphysembulla LUL
VP034	3	2	1	1	3	1	2,333	1,333	1,83333	Rundherd ROL, Orthostase bds. Dorsobasal

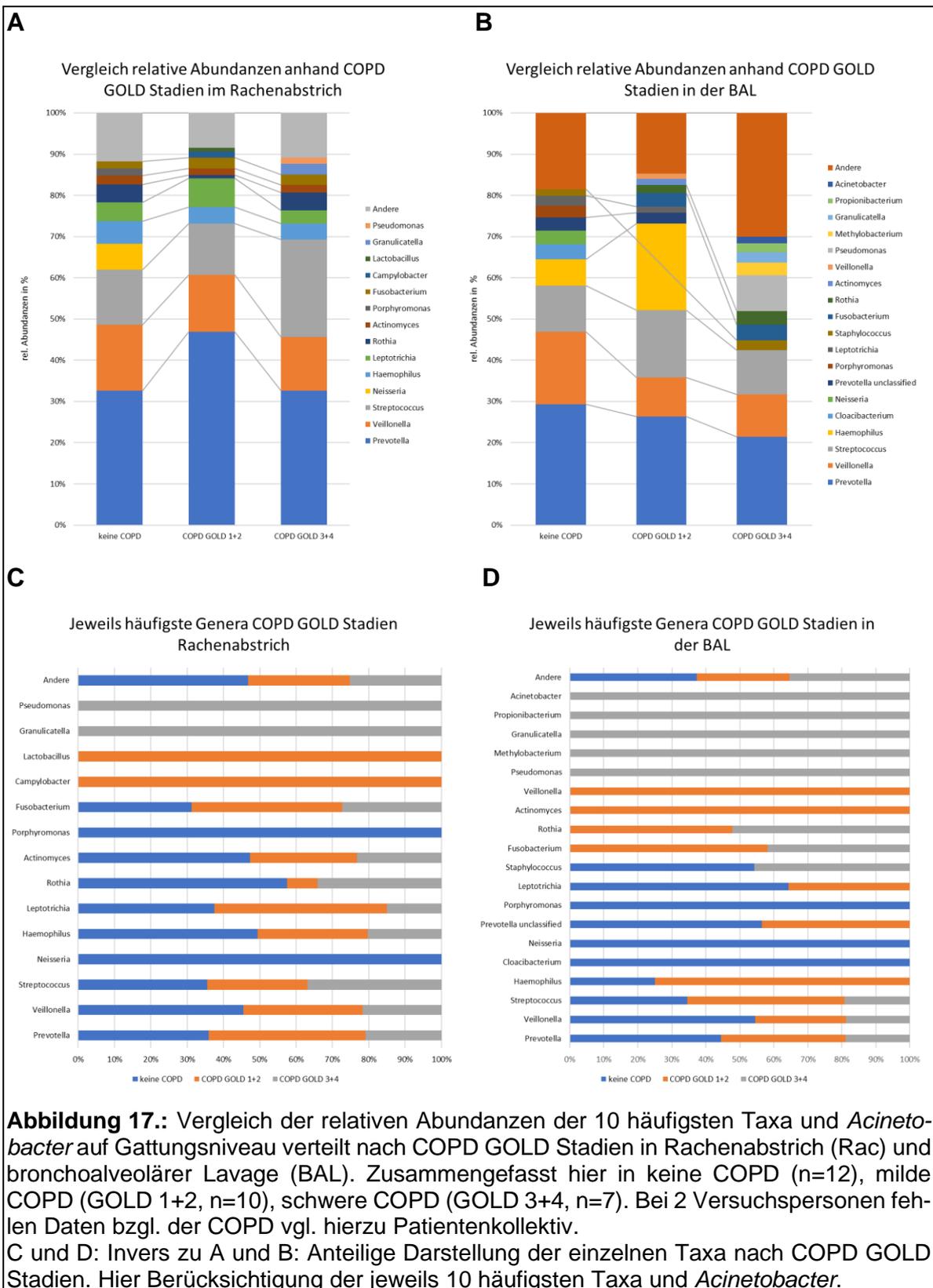
Legende:

- Emphysem: Grading 0-3 (kein, gering = bis 20%, mittel 20-40% & schwer 40-60%)
- Bronchiektasengröße: klein (kl) = (≤ 5 mm) oder groß (gr) = (> 5 mm)
- Anzahl der Bronchiektasen (<5; 5-10; >10)
- 1 oder 0 bei der Bronchialwandverdickung steht für vorhanden oder nicht
- MP= mucus plugging

Kommentar:

- Keine automatisierte Auswertung des Emphysems, da die Schichtdicke und die Rekonstruktionskernel fehlen.- Die Lingula wird als eigenständig gelten trotz unscharfer Grenze (Bronchus als Orientierung)
- Ausgewertet wird mit de dünnsten und schärfsten Rekonstruktionskernel, der vorhanden ist. Schichtdicke hat Vorrang vor Rekonstruktionskernel.

7.6. Relative Abundanzen in den 3 COPD Subgruppen



8. Danksagung

In erster Linie und vor allem möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Klaus Dalhoff für die Bereitstellung des Themas, hervorragende Betreuung und Unterstützung während des gesamten Projektes danken. Seiner Expertise, konstruktiven Kritik, Ideen und Motivation ist es zu verdanken, dass diese Arbeit letztendlich zu einem Abschluss gekommen ist. Ohne seinen Zuspruch, auch in einigen Schaffenskrisen, wäre dies wohl kaum möglich gewesen.

Außerdem danke ich dem ärztlichen Leiter der Medizinischen Klinik III, Herrn PD Dr. med. Daniel Drömann, für die Bereitstellung des Laborarbeitsplatzes und der Materialien.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Jan Rupp, sowie bei Herrn Dr. rer. nat. Simon Graspeuntner aus der Klinik für Infektiologie und Mikrobiologie des UK-SH Lübeck bedanken. Insbesondere Herr Graspeuntner erwies sich in jeglichen mikrobiombasierten Fragestellungen als kompetenter und verlässlicher Partner und Lehrer. Ich bedanke mich hier explizit für das tolle Verhältnis und die stets angenehme Atmosphäre die auch bei schwierig zu bearbeiteten Themen und hohem Arbeitsaufkommen herrschte.

Einen ganz besonderen Dank gilt Frau Dr. Lena Roos, geb. Reinhold. Gemeinsam mit ihr habe ich es geschafft unser Patientenkollektiv zu generieren und die Proben zu verarbeiten. An der konsequenten Bearbeitung Ihrer Thematik dieser Studie und der damit inzwischen erfolgreichen Dissertation konnte ich mir stets ein Beispiel nehmen und daran selbst motivieren.

Weiterhin möchte ich mich bei dem Ärzteteam der Klinik für Pulmologie des UKSH Lübeck für die komplikationslose und bereitwillige Zusammenarbeit bei der Durchführung der bronchoalveolären Lavagen bedanken. Weitere Danksagungen gelten Herrn Dr. Fabian Jacob aus der Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin des UKSH Lübeck, sowie dem Forschungszentrum Borstel für die technische Durchführung der Illumina-Sequenzierung.

Zu guter Letzt, aber deshalb nicht minder wichtig, möchte ich von Herzen meiner Familie mit meiner Frau Christiane, meinem Sohn Phil und meiner Tochter Enni danken. Vielen Dank, dass ihr mir den nötigen Freiraum zur Beendigung dieser Arbeit gewährt habt. Vielen Dank für eure Geduld und die Entbehrungen die ihr dadurch auf euch genommen habt.

9. 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>