

Roland Ernst Stiftung für Gesundheitswesen
Geschäftsführung
Naumannstr. 8
01309 Dresden

Abschlussbericht

Pathomechanismen der Ureaplasmen-vermittelten pulmonalen Entzündungsreaktion und chronischen Lungenerkrankung Frühgeborener

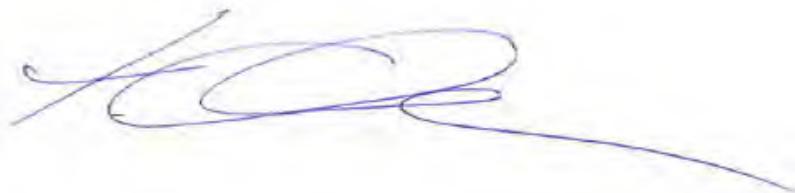
Kurzbezeichnung: **Ureaplasmen-vermittelte Lungenerkrankung Frühgeborener**

Projekt 4/21

Name, Vorname:	Priv.-Doz. Dr. med. Glaser, Kirsten
Dienstbezeichnung/Funktion:	Oberärztin, Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Projektleiterin
Hochschule:	Universität Leipzig
Telefon:	0341/9720382
Email:	kirsten.glaser@medizin.uni-leipzig.de
Name, Vorname:	Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Laube, Mandy
Dienstbezeichnung/Funktion:	Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Projektleiterin
Hochschule:	Universität Leipzig
Telefon:	0341/9720988
Email:	mandy.laube@medizin.uni-leipzig.de

Leipzig, 27.02.2025

Projektleiter:





Abschlussbericht

1.1. Thema

Pathomechanismen der Ureaplasmen-vermittelten pulmonalen Entzündungsreaktion und chronischen Lungenerkrankung Frühgeborener

1.2. Forschungsziele

Ziel unseres Projekts war es, die **Mechanismen der Ureaplasmen-vermittelten pulmonalen Entzündungsreaktion und Gewebeschädigung aufzuklären**. So sollte das Verständnis von Risikofaktoren der chronischen Lungenerkrankung Frühgeborener und die Kenntnis von Hauptmechanismen der Krankheitsentstehung erweitert werden. Die Ergebnisse sollen die Entwicklung gezielter therapeutischer, ggf. anti-infektiöser und anti-inflammatorischer, Strategien ermöglichen.

Unter Verwendung fetaler Lungen- Epithel- und Endothelzellen sowie neonataler Monozyten, als wesentlichen Abwehrzellen des angeborenen Immunsystems, sollten Pathomechanismen der Ureaplasmen-vermittelten Immunantwort, der pulmonalen Erreger-Zell-Interaktion und daraus resultierender Einschränkungen der zellulären Lungenfunktion *in vitro* und *ex vivo* dargestellt werden (**Abb. 1**).



Abb. 1: Vereinfachte Darstellung potentieller direkter und indirekter Schädigung der unreifen Lunge durch eine prä- und perinatale Ureaplasmen-Exposition.

1.3. Hintergrund der erzielten Ergebnisse

Klinische und experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass Ureaplasmen-Infektionen bei Frühgeborenen einen unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung der chronischen Lungenerkrankung, Bronchopulmonale Dysplasie (BPD), darstellen. Die zugrundeliegenden Mechanismen einer Ureaplasmen-vermittelten Entzündungsreaktion bei Früh- und Neugeborenen und der schädigenden Wirkung auf Gewebe- und/oder Zellebene sind bisher kaum verstanden. Vor dem Hintergrund einer unverändert hohen BPD-Rate insbesondere bei sehr unreifen Frühgeborenen ist die Untersuchung von Pathogenitätsmechanismen der Ureaplasmen-vermittelten pulmonalen Entzündungsreaktion von besonderer Bedeutung.

Die Lunge ist vor der Geburt mit Flüssigkeit gefüllt, um das fetale Lungenwachstum zu ermöglichen. Im Zuge der Geburt wird die Flüssigkeit durch die alveolare Flüssigkeitsabsorption beseitigt. Eine vermehrte Flüssigkeitsansammlung in unreifen Lungen behindert den Gasaustausch und trägt wesentlich zur Entwicklung pulmonaler Komplikationen bei. Die alveolare Flüssigkeitsabsorption wird durch den gerichteten Transport von Na^+ über die Alveolarepithelzellen vermittelt [1]. Studien haben gezeigt, dass Frühgeborene, die ein



Roland Ernst Stiftung für Gesundheitswesen - Abschlussbericht
**Pathomechanismen der Ureaplasmen-vermittelten pulmonalen
Entzündungsreaktion und chronischen Lungenerkrankung Frühgeborener**

Atemnotsyndrom (RDS, *respiratory distress syndrome*) entwickeln, einen verminderten **epithelialen Na^+ -Transport** aufweisen [2] und dass die Überlebenswahrscheinlichkeit Frühgeborener und Erwachsener mit akutem RDS mit der alveolaren Flüssigkeitsabsorption korreliert [3]. Der Na^+ -Transport über das Alveolarepithel wird durch zwei Ionentransporter vermittelt. Der epitheliale Na^+ -Kanal (**ENaC**) ist an der apikalen Zellmembran lokalisiert und vermittelt den passiven Einstrom von Na^+ aus dem Alveolarlumen in die Lungenepithelzellen. Anschließend wird Na^+ basolateral von der **Na^+/K^+ -ATPase** ins Interstitium gepumpt (**Abb. 2**). Durch diesen gerichteten Na^+ -Transport entsteht ein osmotischer Gradient, dem das intraalveolare Wasser folgt und so ins Gewebe absorbiert wird. Eine verminderte ENaC-Expression [4] stellt neben der mangelnden Surfactant-Produktion in unreifen Lungen die Hauptursache für die RDS-Entwicklung bei Frühgeborenen dar [5].

Diverse Faktoren, einschließlich **intrauteriner Infektionen**, beeinflussen und beeinträchtigen die Mechanismen der alveolären Flüssigkeitsabsorption und vermitteln eine weitere Schädigung der noch unreifen Lunge. Der Einfluss von bestimmten Erregern bzw. speziellen Virulenzeigenschaften auf das Ausmaß dieser Schädigung wird diskutiert [6, 7].

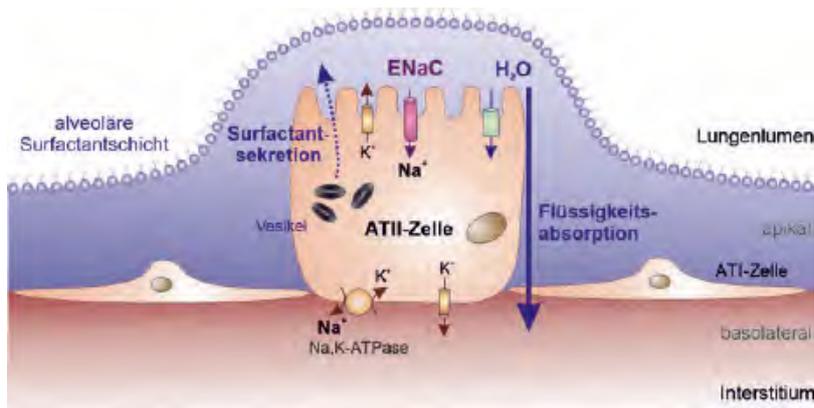


Abb. 2: Mechanismus der alveolären Flüssigkeitsabsorption. Na^+ wird auf der apikalen Seite durch den ENaC in die Alveolarzellen aufgenommen und basolateral durch die Na^+/K^+ -ATPase ins Interstitium gepumpt. Diesem gerichteten Ionentransport folgt passiv das Wasser und wird so ins Gewebe absorbiert.

In **primären fetalen Lungenzellen** und **neonatalen Monozyten** wurden erstmal die **direkten und indirekten Auswirkungen einer Ureaplasmen-Exposition** dargestellt. Nach einer kurzen methodischen Einführung stellt das folgende Kapitel die erzielten Ergebnisse des Projekts dar.

Methodik: Die Ussing-Kammer Messung

Die funktionelle Untersuchung des alveolären epithelialen Na^+ -Transports wird mit Hilfe der Ussing-Kammer durchgeführt. Die Ussing-Kammer ermöglicht die Messung der Barriere- und Transportfunktion eines Epithels. Die Barrierefunktion des Epithels wird durch Messung des elektrischen Widerstands über das Epithel (transepithelialer Widerstand, R_{te}) bestimmt. Um eine elektrophysiologische Messung des Ionentransports durchführen zu können, werden die verwendeten primären fetalen distalen Lungenepithelzellen (FDLE-Zellen) auf permeablen Membranfiltern ausgesät. Dadurch kommt es zur Polarisierung der Zellen in ein apikales und basolaterales Membrankompartiment, und zur Ausbildung von Tight Junctions. Zur Messung werden die FDLE-Zellfilter in die Ussing-Kammer eingesetzt und das apikale bzw. basolaterale Kompartiment der Kammern mit einer Elektrolytlösung befüllt. Die transepitheliale Spannung (V_{te}) wird durch das Anlegen eines Stromes auf 0 mV reguliert, und der Kurzschlussstrom I_{sc} (*short-circuit current*) gemessen. Nachdem der I_{sc} ein stabiles Niveau erreicht hat (I_{base}), werden 10 μM



Amilorid zur Inhibition des ENaC in die apikale Kammerhälfte hinzugegeben. Aus der Differenz von I_{base} und dem nach Zugabe von Amilorid noch vorhandenen Amilorid-insensitiven I_{SC} (I_{amil}) wird der Amilorid-sensitive I_{SC} (ΔI_{amil}) berechnet, welcher die Aktivität des ENaC widerspiegelt.

Da der epitheliale Na^+ -Transport durch zwei Iontentransporter vermittelt wird, ist es auch möglich, die Aktivität des einen Transporters ohne den jeweils anderen in der Ussing-Kammer zu messen. Dies wird als maximale Aktivität des jeweiligen Transporters bezeichnet. Um die maximale apikale Na^+ -Leitfähigkeit zu bestimmen, wird durch die verwendeten Elektrolytlösungen ein Na^+ -Gradient (145:5 mM) generiert und die basolaterale Membran mit Amphotericin B permeabilisiert. Anschließend wird analog Amilorid apikal appliziert und der maximale Amilorid-sensitive I_{SC} ($amil_{max}$) berechnet. Die maximale Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase, unabhängig von der ENaC-Aktivität, wird nach permeabilisierter apikaler Membran durch die Zugabe von 1 mM Ouabain bestimmt. Der maximale Ouabain-sensitive I_{SC} ($ouab_{max}$) entspricht der maximalen Na^+/K^+ -ATPase Aktivität.

1.4. Ergebnisdarstellung

Die Kolonisierung der Atemwege Frühgeborener mit Ureaplasmen ist mit pulmonaler Kurz- und Langzeit-Morbidität assoziiert. In klinischen und experimentellen Studien konnte eine Ureaplasmen-vermittelte pulmonale und systemische Inflammationsreaktion gezeigt werden. Weitere Pathomechanismen der Ureaplasmen-vermittelten Lungenerkrankung sind nicht nur nicht beschrieben, es existieren nur wenige *in-vitro*-Daten zu möglichen direkten Effekten einer Ureaplasmen-Exposition auf die Funktion von pulmonalen Zellen. Da der Na^+ -Transport wesentlich an der Anpassung der Lunge an die Luftatmung beteiligt ist, ist es essenziell, den Einfluss der Ureaplasmen-Kolonisierung auf die Zellfunktionen des fetalen Alveolarepithels zu bestimmen.

Die akute Ureaplasmen-Infektion verringert den Na^+ -Transport in fetalen Alveolarzellen

Die 24-stündige Infektion von FDLE-Zellen mit Ureaplasmen (*U. urealyticum*, Uu8) reduzierte den epithelialen Na^+ -Transport deutlich um 70–90%. Ussing-Kammer-Analysen zeigten, dass I_{base} durch die Ureaplasmen-Infektion im Vergleich zu nicht-infizierten Medium-Kontrollen signifikant verringert wurde (**Abb. 3A**). Auch die ENaC-Aktivität (ΔI_{amil}) wurde durch die Ureaplasmen-Infektion deutlich, um mehr als 90%, verringert. Im Gegensatz dazu wurde die epitheliale Barrierefunktion (R_{te}) durch die Ureaplasmen-Infektion nicht beeinträchtigt (**Abb. 3B**). Darüber hinaus wurde I_{amil} , welches zumindest teilweise auf den epithelialen Cl^- -Transport zurückgeht, durch die Ureaplasmen-Infektion reduziert (**Abb. 3A**). Insgesamt resultierte die akute Ureaplasmen-Infektion in einer signifikanten Reduktion des Na^+ -Transports.



Roland Ernst Stiftung für Gesundheitswesen - Abschlussbericht
**Pathomechanismen der Ureaplasmen-vermittelten pulmonalen
 Entzündungsreaktion und chronischen Lungenerkrankung Frühgeborener**

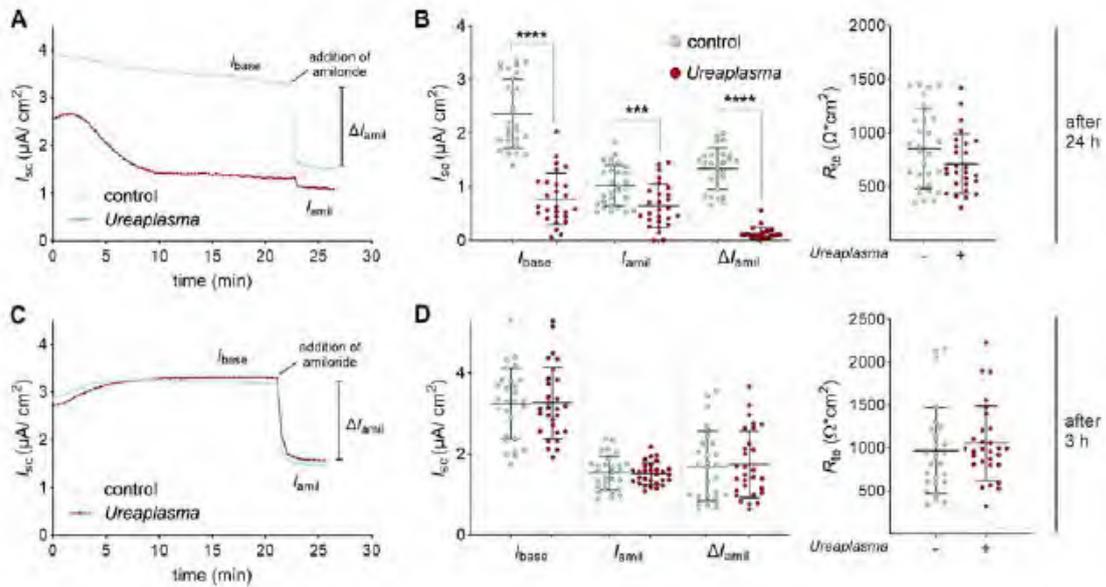


Abb. 3: Eine Ureaplasmen-Infektion reduzierte den epithelialen Na^+ -Transport in FDLE-Zellen nach 24-stündiger Inkubation signifikant. FDLE-Zellen wurden vor der Analyse 24 h (A, B) oder 3 h (C, D) mit *U. urealyticum* (Uu8) infiziert. (A) Repräsentative Ussing-Kammer-Stromspur von Uu8-infizierten FDLE-Zellen im Vergleich zu Kontrollen. (B) Eine Uu8-Infektion verringerte den Na^+ -Transport und die ENaC-Aktivität (I_{base} , I_{amil} und ΔI_{amil}) signifikant. Die Barriereintegrität (R_{te}) infizierter FDLE-Zellen ($n=29$) war im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollen ($n=27$) nicht signifikant verändert. (C) Repräsentative Ussing-Kammer-Stromspur von Uu8-infizierten FDLE-Zellen im Vergleich zu Kontrollen. (D) Eine 3-stündige Infektion von FDLE-Zellen mit Uu8 hatte keinen Einfluss auf I_{base} , I_{amil} , ΔI_{amil} oder R_{te} ($n=29$) im Vergleich zu Kontrollzellen ($n=28$). *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; t-Test.

Um festzustellen, ob die beobachteten Effekte der Infektion mit dem Isolat Uu8 auf den Na^+ -Transport auch für ein anderes *Ureaplasma*-Serovar zutreffen, wurden die Ussing-Kammer Messungen mit dem Isolat *U. parvum* (Up3) wiederholt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Versuche mit Uu8, verringerte die Infektion mit Up3 sowohl I_{base} als auch I_{amil} und ΔI_{amil} in FDLE-Zellen signifikant verglichen mit nicht-infizierten Kontrollen (Abb. 4). R_{te} wurde von der Up3-Infektion nicht verändert. Durch die Infektion mit Up3 wurde die ENaC-Aktivität in FDLE-Zellen um etwa 30 % reduziert.

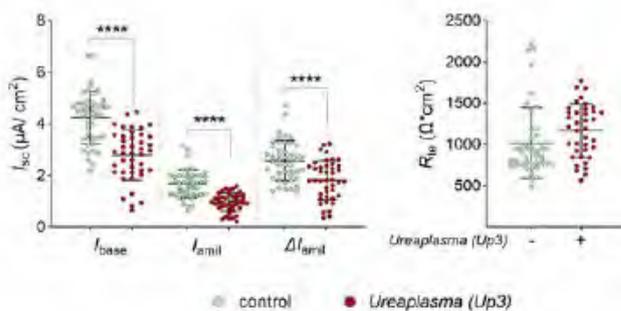


Abb. 4: Eine Infektion mit *U. parvum* (Up3) verringerte den epithelialen Na^+ -Transport in FDLE-Zellen. Die Zellen wurden vor der Analyse 24 h mit Up3 infiziert. Im Einklang mit der Uu8-Infektion verringerte die Up3-Infektion den Na^+ -Transport und die ENaC-Aktivität (I_{base} , I_{amil} und ΔI_{amil}) signifikant, während R_{te} nicht beeinträchtigt wurde (Up3: $n=45$; Kontrolle: $n=42$). **** $p < 0,0001$; t-Test.

Um die beiden Na^+ -Transporter getrennt voneinander zu betrachten, wurde die jeweils gegenüberliegende Membran permeabilisiert. Die maximale ENaC-Aktivität ($amil_{\text{max}}$) wurde durch die Uu8-Infektion signifikant auf etwa 35% verringert (Abb. 5A). In einer anderen Serie von



Roland Ernst Stiftung für Gesundheitswesen - Abschlussbericht
**Pathomechanismen der Ureaplasmen-vermittelten pulmonalen
Entzündungsreaktion und chronischen Lungenerkrankung Frühgeborener**

Experimenten wurde die apikale Membran permeabilisiert, wodurch das Zellinnere und die Na^+/K^+ -ATPase mit Na^+ beladen und die maximale Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität ($ouab_{\text{max}}$) bestimmt werden. Auch $ouab_{\text{max}}$ wurde durch eine Ureaplasmen-Infektion deutlich verringert, wenn auch nicht im gleichen Ausmaß (**Abb. 5B**). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Ureaplasmen-Infektion von FDLE-Zellen nach 24-stündiger Inkubation die apikale ENaC-Aktivität um mehr als 60% und die basolaterale Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität um etwa 20% reduzierte.

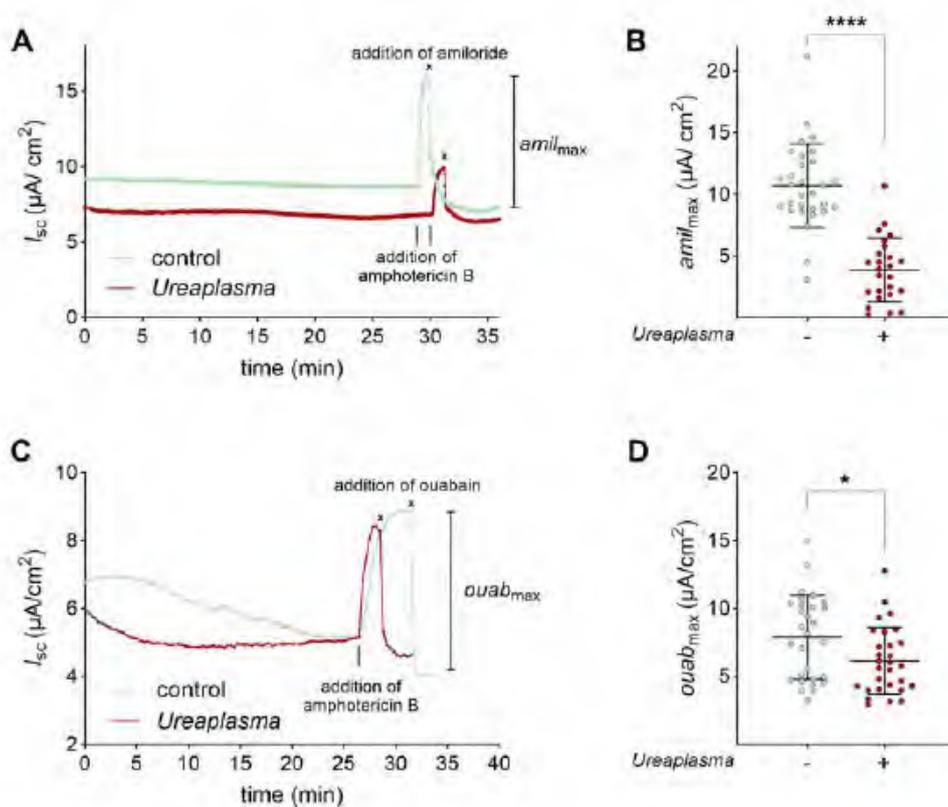


Abb. 5: Die akute Ureaplasmen-Infektion verringerte die ENaC- und Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität bei Messungen mit permeabilisierten Membranen. FDLE-Zellen wurden 24 h mit *U. urealyticum* (Uu8) infiziert. Die maximale Aktivität jedes Na^+ -Transporters wurde separat durch Permeabilisierung der gegenüberliegenden Membran bestimmt. **(A)** Repräsentative Stromspur basolateral-permeabilisierter Uu8-infizierter Zellen und Kontrollzellen. **(B)** Eine Uu8-Infektion reduzierte die durch ENaC ($amil_{\text{max}}$) vermittelte maximale apikale Na^+ -Permeabilität signifikant (n=30) im Vergleich zu Kontrollen (n=25). **(C)** Repräsentative Stromspur von apikal-permeabilisierten Uu8-infizierten Zellen und Kontrollzellen. **(D)** Die maximale Na,K -ATPase-Aktivität ($ouab_{\text{max}}$) wurde durch eine Ureaplasmen-Infektion (n=29) im Vergleich zu nicht-infizierten FDLE-Zellen (n=30) signifikant reduziert. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$, t-Test.

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmals eine funktionelle Beeinträchtigung fetaler alveolärer Epithelzellen induziert durch eine akute, 24-stündige Ureaplasmen-Infektion. Beide Ureaplasmen-Isolate inhibierten signifikant den epithelialen Na^+ -Transport. Der vektorielle Na^+ -Transport intakter Zellen wird durch die Zusammenarbeit von apikalen und basolateralen Transportern erreicht. Wir konnten den Einfluss auf die basolaterale Na^+/K^+ -ATPase und apikale Na^+ -Kanäle durch selektive Permeabilisierung trennen und beobachteten eine signifikante Verringerung der maximalen apikalen ENaC-Aktivität und eine geringere Abnahme der Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität. Bei Frühgeborenen wurde ein verminderter epithelialer Na^+ -Transport bereits nachgewiesen [2]



Roland Ernst Stiftung für Gesundheitswesen - Abschlussbericht
**Pathomechanismen der Ureaplasmen-vermittelten pulmonalen
Entzündungsreaktion und chronischen Lungenerkrankung Frühgeborener**

was zur Entwicklung von RDS beiträgt [8]. Die Ergebnisse der vorliegenden *in-vitro*-Studie lassen uns diskutieren, dass eine Ureaplasmen-Infektion und die nachfolgende Ureaplasmen-vermittelte Verringerung des Na^+ -Transports die perinatale alveoläre Flüssigkeitsabsorption weiter beeinträchtigen und die pulmonale Funktion insbesondere sehr unreifer Frühgeborener weiter verschlechtern könnte.

Zusätzlich zu den FDLE-Zellen wurden humane Calu-3-Zellen des Bronchialepithels mit Ureaplasmen infiziert. Durch die Infektion wurde der Ionentransport in Calu-3-Zellen signifikant reduziert (**Abb. 6**). Da eine Ureaplasmen-Infektion in FDLE-Zellen auch den I_{amil} reduzierte, was eine Hemmung des Cl^- -Transports vermuten lässt, ist davon auszugehen, dass eine Ureaplasmen-Infektion nicht nur den ENaC-vermittelten Na^+ -Transport reduziert, sondern den Ionentransport im Allgemeinen beeinflussen könnte. In Calu-3-Zellen, die hauptsächlich Cl^- transportieren, beeinträchtigte die Ureaplasmen-Infektion den Ionentransport, indem der basale I_{sc} reduziert wurde. So konnten wir zeigen, dass Ureaplasmen auch die Ionenkanalfunktionen in einer Zelllinie humanen Ursprungs zu beeinflussen.

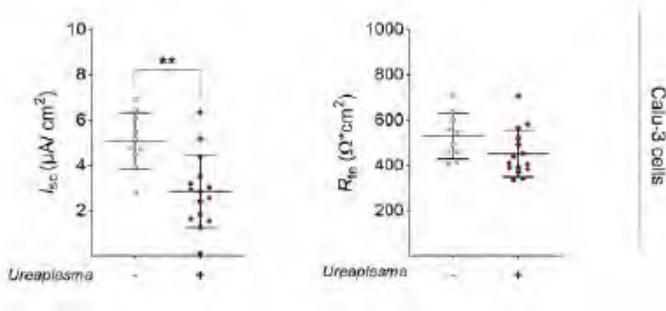


Abb. 6: Eine Ureaplasmen-Infektion verringerte den Ionentransport in humanen Calu-3-Zellen. Die Zellen wurden vor der Analyse 24 h lang mit Uu8 infiziert. Eine Uu8-Infektion verringerte auch Ionentransport (I_{sc}) in Calu-3-Zellen signifikant und hatte keinen Einfluss auf den R_{te} ($n=15$) im Vergleich zu Kontrollzellen ($n=10$). ** $p < 0,01$; t-Test.

Die Ureaplasmen-Infektion verändert die mRNA-Expression der Na^+ -Transporter und der Surfactantproteine

Überraschenderweise erhöhte eine 24-stündige Infektion mit Ureaplasmen (Uu8) die mRNA-Expression der ENaC-Untereinheit α -ENaC signifikant um etwa 30% und die von γ -ENaC um fast das Neunfache, während die β -ENaC mRNA-Expression unbeeinflusst blieb (**Abb. 7**). Darüber hinaus erhöhte die Ureaplasmen-Infektion die mRNA-Expression der Na^+/K^+ -ATPase- β_1 Untereinheit signifikant um fast 50% (**Abb. 7**), während die Expression der α_1 -Untereinheit nicht verändert wurde. Im Gegensatz dazu wurde die mRNA-Expression zweier Surfactantproteine deutlich reduziert. *Sftpa* wurde um etwa 70% und *Sftpb* um etwa 30% verringert (**Abb. 7**). Der gegenteilige Effekt wurde für die *Sftpc* mRNA beobachtet, die durch die Ureaplasmen-Infektion um fast 40% erhöht wurde (**Abb. 7**). Insgesamt erhöhte die Ureaplasmen-Infektion die mRNA-Expression mehrerer Na^+ -Transporter-Untereinheiten, im Gegensatz zu dem verringerten Na^+ -Transport, der in Ussing-Kammern beobachtet wurde. Andererseits verringerte eine Ureaplasmen-Infektion die mRNA-Spiegel von Surfactantproteinen mit Ausnahme von *Sftpc*.



Pathomechanismen der Ureaplasmen-vermittelten pulmonalen Entzündungsreaktion und chronischen Lungenerkrankung Frühgeborener

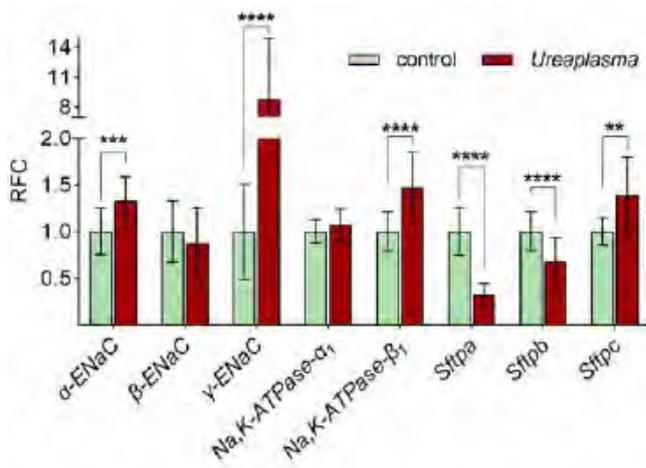


Abb. 7: Die 24-stündige Infektion mit Ureaplasmen (Uu8) veränderte die mRNA-Expression der Na^+ -Transporter und Surfactantproteine. Eine Uu8-Infektion erhöhte die mRNA-Expression von α - und γ -ENaC, Na^+/K^+ -ATPase- β_1 und *Sftpc* signifikant. Im Gegensatz dazu regulierte die Uu8-Infektion die *Sftpa* und *Sftpb* mRNA-Expression herunter (n = 12–18). Relative Vervielfachung (RFC). **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001; t-Test

Die verringerte Aktivität beider Na^+ -Transporter war nicht auf eine verminderte mRNA-Expression zurückzuführen. Stattdessen war die mRNA-Expression der α - und γ -ENaC-Untereinheiten erhöht, was möglicherweise einen positiven Rückkopplungsmechanismus widerspiegelt. In der fetalen Schaflunge wurde gezeigt, dass die mRNA-Expression der α - und γ -ENaC-Untereinheit während der Wehen ihren Höhepunkt erreicht – jener Zeitpunkt, an dem physiologisch die alveoläre Flüssigkeitsabsorption erfolgt [9]. Darüber hinaus zeigt diese Studie eine erhöhte mRNA-Expression der Na^+/K^+ -ATPase- β_1 -Untereinheit durch die Ureaplasmen-Infektion. Es wurde zuvor gezeigt, dass die Überexpression der β_1 -Untereinheit allein den vektoriiellen Na^+ -Transport erhöht [10], da die β_1 -Untereinheit die geschwindigkeitsbestimmende Komponente beim Zusammenbau der Na^+/K^+ -ATPase ist [11]. Dies unterstützt weiter die Hypothese, dass eine Erhöhung der mRNA-Expression den durch eine Ureaplasmen-Infektion verursachten verminderten Na^+ -Transport entgegenwirken soll.

Die Genexpression der Surfactantproteine wurde durch eine Ureaplasmen-Infektion in FDLE-Zellen unterschiedlich reguliert. Bei der *Sftpa*- und *Sftpb*-mRNA-Expression wurde eine Abnahme durch eine Ureaplasmen-Infektion beobachtet, während *Sftpc* erhöht wurde. *Sftpa* trägt durch Oponisierungsprozesse zum angeborenen Immunsystem bei und fördert die Aufnahme von Mikroorganismen durch phagozytische Zelltypen [12]. Darüber hinaus schützt *Sftpa* die Alveolen vor einer unkontrollierten Entzündungsreaktion, indem es die zugrundeliegende Toll-like-Rezeptor-vermittelte Signalübertragung reduziert [12]. Die Ureaplasmen-vermittelte Reduktion der Expression von *Sftpa* in ATII-Zellen könnte damit wesentliche immunologische Funktionen in Alveolen schwächen. Die akute Ureaplasmen-Infektion von FDLE-Zellen reduzierte darüber hinaus die Expression von *Sftpb*. Die Surfactantproteine *Sftpb* und *Sftpc* sind wesentlich an der Oberflächenausbreitung des Surfactant beteiligt, und ein Fehlen von *Sftpb* ist mit dem Leben unvereinbar [12]. Damit resultiert eine akute Ureaplasmen-Infektion Frühgeborener möglicherweise in einer weiteren funktionellen Beeinträchtigung der unreifen Lunge durch Störung der Surfactant-Homöostase.

Die Stimulation mit Lipopolysaccharid erhöht den Na^+ -Transport in fetalen Alveolarzellen

Um zu untersuchen, ob die dargestellten Beeinträchtigungen des epithelialen Na^+ -Transports spezifisch für eine Ureaplasmen-Infektion sind oder auch durch die Infektion mit einem gramnegativen Erreger verursacht werden, wurden die FDLE-Zellen mit *E. coli* Lipopolysaccharid (LPS)



Roland Ernst Stiftung für Gesundheitswesen - Abschlussbericht
**Pathomechanismen der Ureaplasmen-vermittelten pulmonalen
Entzündungsreaktion und chronischen Lungenerkrankung Frühgeborener**

inkubiert. Die 24-stündige Inkubation mit LPS erhöhte den epithelialen Na^+ -Transport signifikant. Ussing-Kammer Analysen zeigten, dass LPS I_{base} im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöhte (**Abb. 8A**). I_{base} stieg bei 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS auf 130% bzw. bei 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS auf 138%. Die ENaC-Aktivität (ΔI_{amil}) wurde durch LPS in FDLE-Zellen ebenfalls signifikant auf 120% bei 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS erhöht. R_{te} wurde durch LPS nicht beeinflusst (**Abb. 8B**). I_{amil} wurde durch LPS stark erhöht, auf 138% bei 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 167% bei 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS (**Abb. 8A**). Zusammenfassend erhöhte LPS den epithelialen Na^+ -Transport nach 24 h signifikant, was in gravierendem Gegensatz zu einer Ureaplasmen-Infektion von FDLE-Zellen steht.

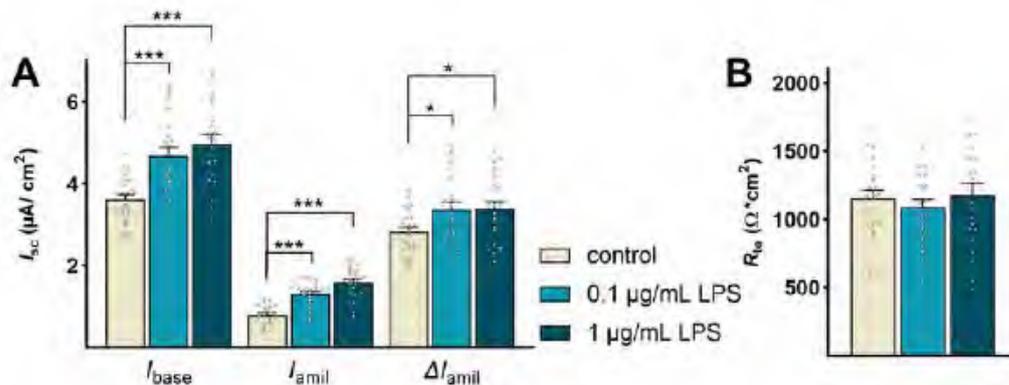


Abb. 8: Die 24-stündige Inkubation mit LPS stimulierte den epithelialen Na^+ -Transport in FDLE-Zellen. LPS erhöhte (A) I_{base} , I_{amil} und ΔI_{amil} signifikant. (B) R_{te} wurde durch LPS nicht signifikant verändert. (n = 21–23). *p < 0,05, ***p < 0,001, ANOVA mit Dunnetts *post-hoc*-Test.

LPS ist ein Hauptbestandteil der Außenmembran gram-negativer Bakterien und fungiert als prototypisches Endotoxin. Es handelt sich um *den* wesentlichen Virulenzfaktor gram-negativer Bakterien, die eine oft fulminante Infektion verursachen. Im Gegensatz zu den beschriebenen Ureaplasmen-vermittelten Effekten erhöhte LPS den Na^+ -Transport und die ENaC-Aktivität in FDLE-Zellen nach 24 h signifikant. Bislang existieren keine Studien zum Einfluss von LPS auf den Na^+ -Transport fetaler alveolärer Zellen.

Die akute Ureaplasmen-Infektion verringert die Stoffwechselaktivität/Viabilität der FDLE-Zellen

In weiteren Untersuchungen wurde die Stoffwechselaktivität von FDLE-Zellen mittels WST-1 Assay bestimmt, um festzustellen, ob die Reduktion des Na^+ -Transport mit einer reduzierten Stoffwechselaktivität der FDLE-Zellen einhergeht. Dazu wurden Formazan-Produkte in Uu8-infizierten FDLE-Zellen, in nicht-infizierten, Medium-exponierten Zellen (Kontrollen) und in einem Ureaplasmen-Ansatz ohne FDLE-Zellen gemessen. Beim Vergleich von Uu8-infizierten FDLE-Zellen mit Kontrollzellen wurde kein signifikanter Unterschied beobachtet (**Abb. 9**). Der Test zeigte jedoch, dass im Ureaplasmen-Ansatz ebenfalls Tetrazoliumsalze zu Formazan reduziert wurde, ohne dass FDLE-Zellen vorhanden waren. Aufgrund dieses Beitrags zur gemessenen Stoffwechselaktivität haben wir die für Ureaplasmen erhaltenen Ergebnisse von denen für Uu8-infizierte FDLE-Zellen subtrahiert. Der Vergleich dieser Ergebnisse mit nicht-infizierten Kontrollzellen zeigte eine deutlich geringere Stoffwechselaktivität durch die Ureaplasmen-



Roland Ernst Stiftung für Gesundheitswesen - Abschlussbericht
**Pathomechanismen der Ureaplasmen-vermittelten pulmonalen
 Entzündungsreaktion und chronischen Lungenerkrankung Frühgeborener**

Infektion. Diese Daten könnten auf eine erhöhte Zytotoxizität in Ureaplasmen-infizierten FDLE-Zellen hinweisen.

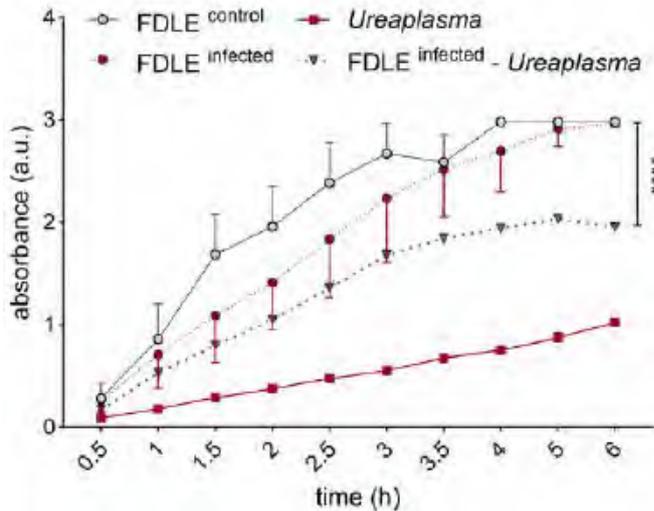


Abb. 9: Darstellung der Stoffwechselaktivität von Uu8-infizierten FDLE-Zellen, nicht-infizierten Zellen und einem Ureaplasmen-Ansatz ohne FDLE-Zellen. Die metabolische Aktivität wurde alle 30 min bis 1 h gemessen. Die gepunktete Linie stellt die Stoffwechselaktivität von Uu8-infizierten FDLE-Zellen abzüglich der Stoffwechselaktivität von Uu8 selbst dar. Basierend auf dieser Berechnung war die Stoffwechselaktivität in Uu8-infizierten FDLE-Zellen signifikant geringer als in nicht-infizierten Kontrollen (n=8–12 pro Gruppe und Zeitpunkt). ****p<0,0001; ANOVA mit Geisser-Greenhouse-Korrektur.

Nicotinamidadenindinukleotid (NAD) ist an Redoxreaktionen beteiligt und NADPH reduziert das Tetrazoliumsalm WST-1 zu Formazan, was spektrometrisch gemessen wird. Das Gleichgewicht zwischen oxidierten und reduzierten Formen von NAD (NAD⁺/NADH-Verhältnis) spiegelt sowohl die Stoffwechselaktivität als auch die Viabilität der Zellen wider. Gemäß der vollständigen Sequenz von *U. urealyticum* kann vermutet werden, dass NADH an mehreren Enzymreaktionen in den bakteriellen Stoffwechselwegen beteiligt ist [13]. Die vorliegenden Ergebnisse des WST1-Assay haben gezeigt, dass Ureaplasmen selbst Tetrazoliumsalm zu Formazan reduzieren, ohne dass eukaryotische Zellen vorhanden sind. Aus diesem Grund wurden die für Ureaplasmen erhaltenen Ergebnisse von denen von Uu8-infizierten FDLE-Zellen abgezogen.

Die akute Ureaplasmen-Infektion von FDLE-Zellen beeinflusst zentrale Kinase-Signalwege, die an der ENaC-Regulation beteiligt sind

Um zu überprüfen, ob die Funktion zentraler Signalwege in FDLE-Zellen durch eine Ureaplasmen-Infektion beeinflusst wird, wurde die Phosphorylierung von Kinasen, die an der ENaC-Hemmung beteiligt sind, mittels Western Blots analysiert. Die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde durch die Uu8-Infektion um mehr als das Dreifache gesteigert (Abb. 10).

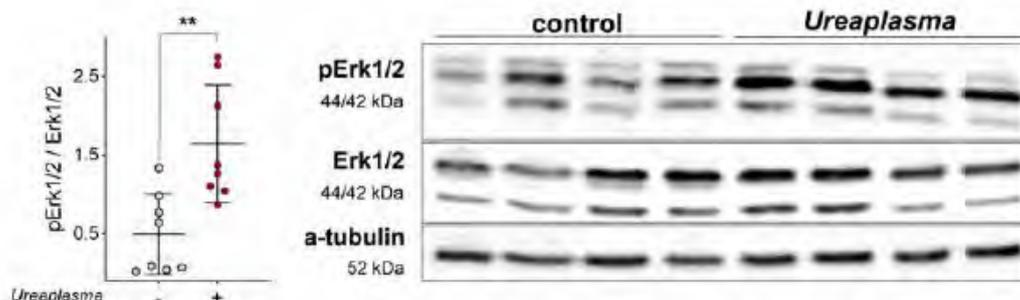


Abb. 10: Die 24-stündige Uu8-Infektion von FDLE-Zellen erhöhte die Phosphorylierung des zentralen Signalmoleküls ERK1/2 signifikant. (n = 8, **p<0,01 t-Test). ERK1/2, extrazelluläre signalregulierte Kinasen.



Roland Ernst Stiftung für Gesundheitswesen - Abschlussbericht
**Pathomechanismen der Ureaplasmen-vermittelten pulmonalen
Entzündungsreaktion und chronischen Lungenerkrankung Frühgeborener**

Es wurden mehrere Regulierungsmechanismen für die ENaC-Stimulation beschrieben, darunter die Translokation von intrazellulären Pools zur Plasmamembran [14], die Verhinderung des ENaC-Abbaus durch Phosphorylierung der Ubiquitin-Ligase NEDD4L (*neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 4*) [15] und eine Kanalaktivierung durch direkte Phosphorylierung des ENaC [16]. Es wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von ERK1/2 die Amilorid-sensitiven Na⁺-Ströme in Nierenzellen verringert [17, 18]. Darüber hinaus wurde vermutet, dass ERK1/2 die β- und γ-ENaC-Untereinheiten direkt phosphoryliert, was zu einer verstärkten Interaktion mit NEDD4L und dem anschließenden Kanalabbau führt [19]. In unseren Versuchen war die Phosphorylierung von Erk1/2 durch eine *Ureaplasmen*-Infektion signifikant erhöht. Zusammengefasst deuten diese Daten auf einen Anstieg der ENaC-hemmenden Erk1/2-Phosphorylierung hin.

Zusammenfassend weisen unsere Ergebnisse erstmals auf eine signifikante Ureaplasmen-vermittelte Beeinträchtigung der Schlüsselmechanismen der alveolären Flüssigkeitsabsorption in der unreifen Lunge hin. Unsere Daten zeigen eine signifikante Hemmung des transepithelialen Na⁺-Transports, des ENaC und der Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität in primären fetalen Lungenepithelzellen der Ratte durch *Ureaplasma spp.* – wahrscheinlich aufgrund einer Modifikation der Erk1/2-Aktivierung. Nach unserem Wissen ist dies die erste Studie, die eine funktionelle Beeinträchtigung fetaler Lungenepithelzellen durch Ureaplasmen zeigt und damit einen Ureaplasmen-spezifischen Mechanismus der pulmonalen Beeinträchtigung Frühgeborener aufdeckt, der durch alveolare Flüssigkeitsansammlung zur akuten und chronischen Lungenerkrankung Frühgeborener beitragen kann.

Mechanismen der Ureaplasmen-induzierten Reduktion des Na⁺-Transports

Bislang ist nur wenig über Virulenzfaktoren von Ureaplasmen und Mechanismen der Erreger-Wirt-Interaktion bekannt [20, 21]. Ureaplasmen erzeugen durch Harnstoffabbau mittels des essentiellen Enzyms Urease Adenosintriphosphat (ATP), bilden dabei Ammoniak und verschieben den pH-Wert ins Alkalische, was beides als Virulenzfaktoren diskutiert wurde. Eine 24-stündige Infektion von FDLE-Zellen mit Ureaplasmen führte ebenfalls aufgrund der Metabolisierung von Harnstoff und zu einer Alkalisierung des Kulturmediums (**Abb. 11A**). Untersucht wurde, ob die pH-Verschiebung oder das produzierte NH₃ für die beobachteten Effekte in Ureaplasmen-infizierten FDLE-Zellen verantwortlich sind. Die pH-Verschiebung auf 8,0 unter Verwendung von NaOH hatte keinen Einfluss auf den Na⁺-Transport oder die ENaC-Aktivität, wohingegen die Zugabe von NH₃ den Na⁺-Transport stark reduzierte (**Abb. 11B**). Zusammengefasst hemmte Ureaplasmen-induziertes NH₃ und nicht die begleitende pH-Verschiebung den Na⁺-Transport und die ENaC-Aktivität.



Roland Ernst Stiftung für Gesundheitswesen - Abschlussbericht
**Pathomechanismen der Ureaplasmen-vermittelten pulmonalen
 Entzündungsreaktion und chronischen Lungenerkrankung Frühgeborener**

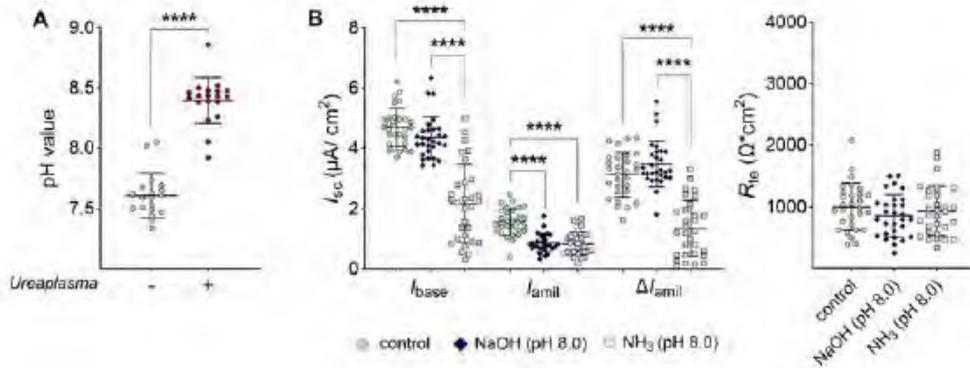


Abb. 11: NH₃ imitierte die Wirkungen einer akuten Ureaplasmen-Infektion auf den epithelialen Na⁺-Transport. Durch die Ureaplasmen-Infektion verschob sich der pH-Wert aufgrund der NH₃-Produktion in infizierten FDLE-Zellen. Diese NH₃-Akkumulation imitierte die Wirkungen einer Ureaplasmen-Infektion. **(A)** Uu8 erhöhte den pH-Wert des FDLE-Zellmediums nach 24 h signifikant (n=19). **(B)** Der pH-Wert des FDLE-Zellmediums wurde entweder durch Zugabe von NaOH oder NH₃ auf 8,0 verschoben und für 24 h beibehalten. Die Exposition von FDLE-Zellen gegenüber NH₃ (n = 30) verringerte den Na⁺-Transport und die ENaC-Aktivität (*I*_{base}, *I*_{amil} und Δ*I*_{amil}) im Vergleich zu Kontrollzellen (n = 29) signifikant, während die NaOH-bedingte pH-Verschiebung (n = 29) nur *I*_{amil} beeinflusste. *R*_{te} wurde weder von der NaOH-bedingten pH-Verschiebung noch von NH₃ beeinflusst. ****p<0,0001; t-Test **(A)** oder ANOVA mit Tukey's *post-hoc*-Test **(B)**.

Darüber hinaus wurde die Phosphorylierung von Erk1/2 durch die NaOH- und NH₃-bedingte pH-Verschiebung erhöht, die Auswirkungen der NH₃-Exposition waren jedoch deutlich ausgeprägter (**Abb. 12A**). Im Gegensatz dazu wurde der durch Ureaplasmen verursachte Anstieg der *α*-ENaC-, *γ*-ENaC- und *Sftpc*-mRNA-Expression sowohl durch die NaOH-bedingte pH-Verschiebung als auch durch die Exposition gegenüber NH₃ imitiert (**Abb. 12B**). Darüber hinaus regulierten sowohl die NaOH-bedingte pH-Verschiebung als auch die NH₃-Exposition die *Sftpa*-mRNA-Expression herunter (**Abb. 12B**).

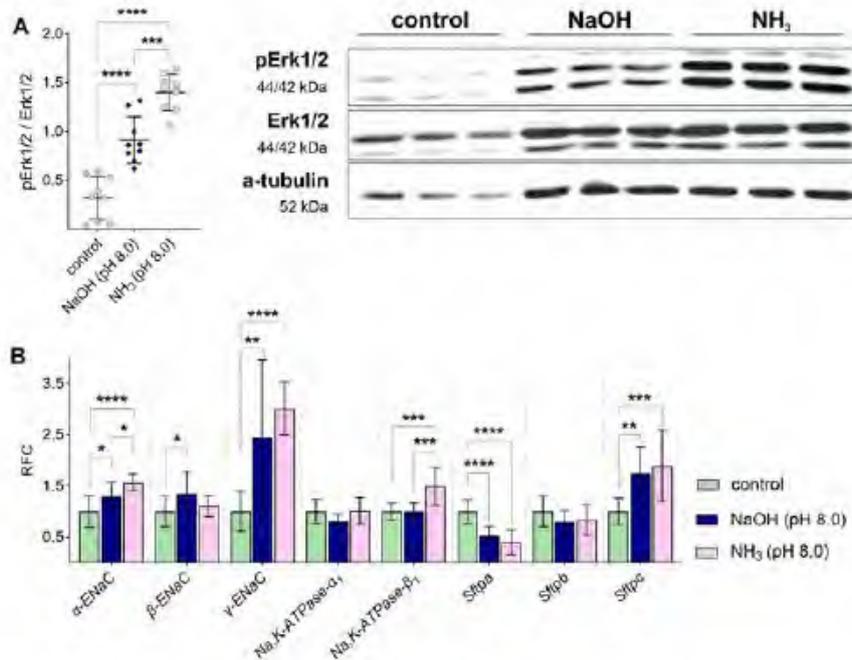


Abb. 12: Die NaOH- und NH₃-bedingte pH-Verschiebung beeinflusste den Erk1/2-Signalweg und modulierte die mRNA-Expression signifikant. FDLE-Zellen wurden vor den Analysen 24 h mit NaOH- oder NH₃-haltigen



Roland Ernst Stiftung für Gesundheitswesen - Abschlussbericht
**Pathomechanismen der Ureaplasmen-vermittelten pulmonalen
Entzündungsreaktion und chronischen Lungenerkrankung Frühgeborener**

Medien bei einem pH-Wert von 8,0 inkubiert. **(A)** Eine NaOH- und NH₃-bedingte pH-Verschiebung auf 8,0 erhöhte die Erk1/2-Phosphorylierung signifikant (n = 9). Repräsentative Western Blots von pErk1/2, Gesamt-Erk1/2 und α -Tubulin sind abgebildet. **(B)** Die NaOH- und NH₃-bedingte pH-Verschiebung auf 8,0 erhöhte die mRNA-Expression von *a*- und *γ*-ENaC, *Na,K-ATPase-β₁* und *Sfftpc* signifikant. Im Gegensatz dazu wurde durch NaOH und NH₃ die mRNA-Expression von *Sfftpa* herunterreguliert (n=11-12). Relative Vervielfachung (RFC). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 ANOVA mit Tukey's *post-hoc*-Test.

Ein potenzieller Virulenzfaktor von Ureaplasmen, der häufig im Zusammenhang mit der Wechselwirkung zwischen Ureaplasmen und der Wirtszelle diskutiert wird, ist die Urease-vermittelte Produktion von Ammoniak und die damit einhergehende pH-Verschiebung [20, 21]. Obwohl dieser potenzielle Virulenzfaktor häufig in Betracht gezogen wird, wurde er bisher nicht umfassend untersucht. Die vorliegende Studie zeigte, dass eine NaOH-vermittelte pH-Verschiebung die ENaC-Aktivität nicht beeinflusste, wohingegen die Exposition von FDLE-Zellen gegenüber NH₃ den epithelialen Na⁺-Transport erheblich reduzierte und damit die Ureaplasmen-induzierten Effekte imitierte. Darüber hinaus beeinflusste die NH₃-Exposition die mRNA-Expression von Na⁺-Transportern und Surfactantproteinen und induzierte die Erk1/2-Phosphorylierung, wie sie bei der Inkubation von FDLE-Zellen mit vitalen Ureaplasmen-Isolaten beobachtet wurde. In einer früheren Studie wurden zwei Ammoniak-spezifische hochregulierte Phosphorylierungsstellen auf Thr202 und Tyr204 identifiziert, von denen bekannt ist, dass sie durch MAP2K1/2 phosphoryliert werden, was zur Aktivierung von ERK1 führt [22]. Diese Studie zeigte, dass ERK als Reaktion auf die Ammoniakbehandlung in MCF-7-Brustkrebszellen aktiviert wird. Eine weitere Studie stützte diesen Befund und zeigte eine erhöhte ERK1/2-Phosphorylierung als Reaktion auf Ammonium (NH₄⁺ und NH₃) in MCF-7-Zellen [23]. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die durch Ureaplasmen-verursachte NH₃-Akkumulation einen wichtigen Virulenzfaktor in der Ureaplasmen-Alveolen-Interaktion darstellt und die Funktion des Alveolarepithels beeinträchtigt.

Der Urease-Inhibitor Flurofamid negiert die Ureaplasmen-induzierten Veränderungen in FDLE-Zellen

Flurofamid ist ein bekannter Inhibitor der Urease und könnte somit das Wachstum von Ureaplasmen behindern, indem es deren Energieversorgung einschränkt. Um die Eignung von Flurofamid zu testen, den Na⁺-Transport in Ureaplasmen-infizierten FDLE-Zellen wiederherzustellen, wurde der Urease-Inhibitor in Verbindung mit der Infektion (Uu8) von FDLE-Zellen 24 h vor der elektrophysiologischen Analyse eingesetzt. Wie zuvor gezeigt, reduzierte die Ureaplasmen-Infektion von FDLE-Zellen I_{base} signifikant (**Abb. 13**). Die Anwesenheit von Flurofamid stellte I_{base} von Ureaplasmen-infizierten Zellen wieder her. Darüber hinaus verbesserte Flurofamid auch ΔI_{amil} , vergleichbar mit Kontrollzellen. Des Weiteren wurde I_{amil} durch Flurofamid erhöht, während Flurofamid den R_{te} in Ureaplasmen-infizierten Zellen nicht veränderte und den pH-Wert senkte (**Abb. 13**).



Roland Ernst Stiftung für Gesundheitswesen - Abschlussbericht
**Pathomechanismen der Ureaplasmen-vermittelten pulmonalen
 Entzündungsreaktion und chronischen Lungenerkrankung Frühgeborener**

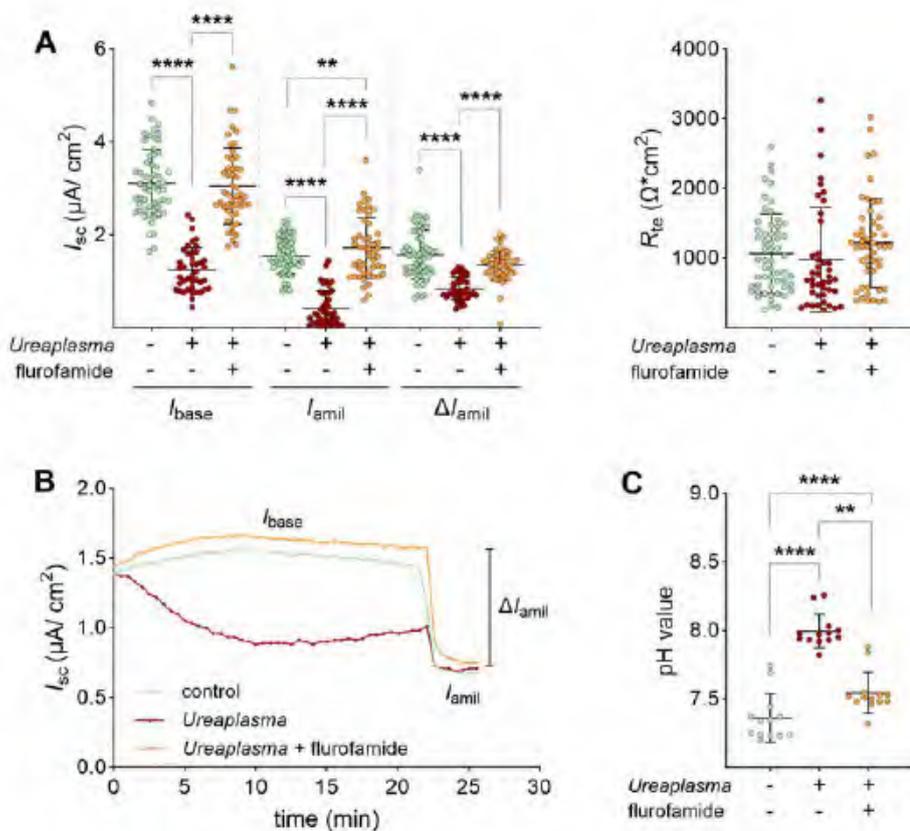


Abb. 13: Fluorofamid stellte den durch Ureaplasmen reduzierten epithelialen Na^+ -Transport wieder her. FDLE-Zellen wurden mit Ureaplasmen infiziert und 24 h vor der Analyse in Gegenwart oder Abwesenheit von Fluorofamid (10 μM) kultiviert. Eine Ureaplasmen-Infektion verringerte **(A)** I_{base} , I_{amil} und ΔI_{amil} signifikant, was durch die Zugabe von Fluorofamid vollständig wiederhergestellt wurde. R_{te} wurde durch eine Ureaplasmen-Infektion oder Fluorofamid nicht signifikant verändert. (n = 42–57) **(B)** Repräsentative Ussing-Kammer Stromkurve von FDLE-Zellen. **(C)** Fluorofamid senkte den pH-Wert des Mediums in Uu8-infizierten FDLE-Zellen signifikant (n = 13). (**p<0,01, ****p<0,0001 ANOVA mit Tukey's *post-hoc*-Test).

Die Ureaplasmen-vermittelten Effekte auf die Genexpression der Na^+ -Transporter und der Surfactantproteine in FDLE-Zellen wurden durch die Zugabe von Fluorofamid ebenfalls beeinflusst. Die durch eine Ureaplasmen-Infektion erhöhte mRNA-Expression der α - und γ -*ENaC*-Untereinheiten wurde durch Fluorofamid signifikant reduziert (**Abb. 14**). Jedoch war die Expression beider Untereinheiten weiterhin signifikant höher als in Kontrollzellen. Die erhöhte mRNA-Expression der Na^+/K^+ -ATPase- β_1 -Untereinheit durch die Ureaplasmen-Infektion wurde durch Fluorofamid nicht wesentlich verändert. Im Gegensatz dazu wurde die Expression der Na^+/K^+ -ATPase- α_1 -Untereinheit durch Fluorofamid signifikant reduziert, im Vergleich mit Kontrollzellen, als auch verglichen mit Ureaplasmen-infizierten FDLE-Zellen.

Die Genexpression der Surfactantproteine wurde durch Fluorofamid nicht signifikant beeinflusst. Zwar fand eine Erhöhung der *Sftpa* mRNA-Expression in Ureaplasmen-infizierten Zellen durch Fluorofamid statt (**Abb. 14**), jedoch lag die *Sftpa*-Expression weiterhin erheblich unter dem Expressionsniveau in Kontrollzellen. Die mRNA-Expression von *Sftpb* wurde durch Fluorofamid nicht beeinflusst, und auch der Einfluss auf die *Sftpc*-Expression war nicht signifikant.



Roland Ernst Stiftung für Gesundheitswesen - Abschlussbericht
**Pathomechanismen der Ureaplasmen-vermittelten pulmonalen
 Entzündungsreaktion und chronischen Lungenerkrankung Frühgeborener**

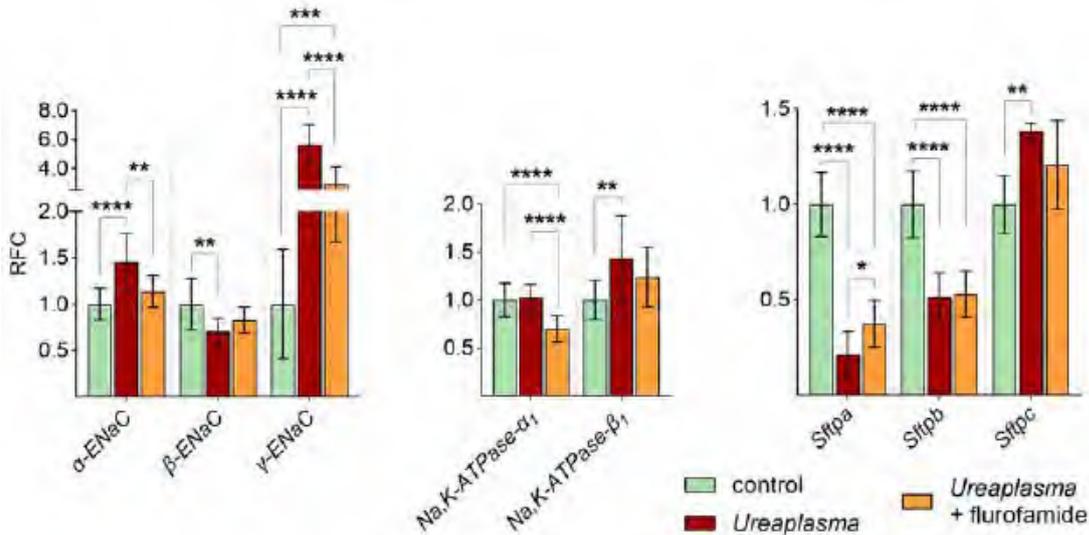


Abb. 14: Die 24-stündige Ureaplasmen-Infektion veränderte die mRNA-Expression von Na^+ -Transportern und Surfactantproteinen. Die Inkubation in Anwesenheit von Flurofamid hob die Ureaplasmen-vermittelten Effekte in FDLE-Zellen zum Teil auf. Eine Ureaplasmen-Infektion erhöhte die mRNA-Expression von α - und β -ENaC, Na^+/K^+ -ATPase- β_1 und *Sftpc* signifikant. Andererseits regulierte eine Ureaplasmen-Infektion die mRNA-Expression von *Sftpa* und *Sftpb* herunter. Flurofamid reduzierte die Wirkung von Ureaplasmen auf die ENaC-Expression ($n = 12$). Relative Vervielfachung (RFC). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ ANOVA mit Tukey's *post-hoc*-Test.

Zusätzlich wurde der Einfluss von Flurofamid auf die Phosphorylierung von Erk1/2 in Ureaplasmen-infizierten FDLE-Zellen untersucht. Dabei zeigte sich eine komplette Inhibition der durch Ureaplasmen-induzierten Phosphorylierung von Erk1/2 durch Flurofamid (Abb. 15). Da sowohl der Na^+ -Transport als auch die ENaC-reduzierende Erk1/2-Phosphorylierung durch Ureaplasmen mit Hilfe von Flurofamid wiederhergestellt werden konnte, wird ein kausaler Zusammenhang angenommen, der jedoch in weiteren Versuchen bestätigt werden muss.

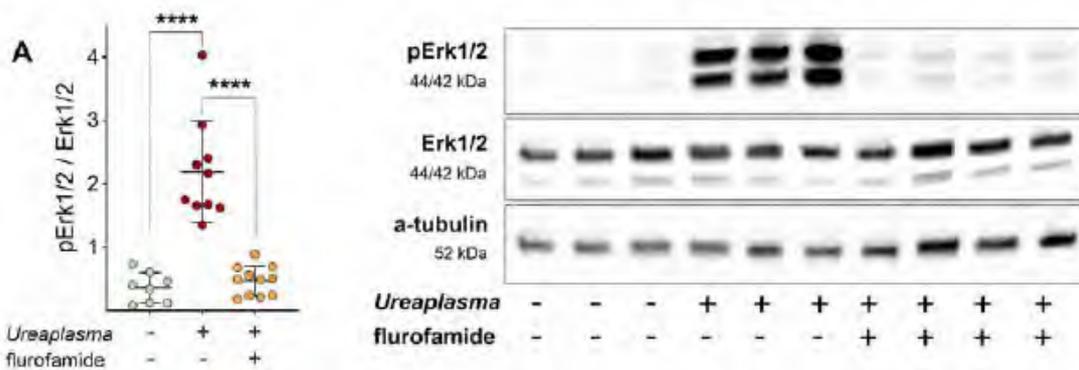


Abb. 15: Die Infektion von FDLE-Zellen mit Ureaplasmen modulierte den Erk-Signalweg. FDLE-Zellen wurden 24 h vor der Analyse mit Ureaplasmen \pm Flurofamid inkubiert. Eine Ureaplasmen-Infektion erhöhte die Erk1/2-Phosphorylierung signifikant, was durch Flurofamid vollständig verhindert wurde ($n = 8$). **** $p < 0,0001$ ANOVA mit Tukey's *post-hoc*-Test.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen, dass der Urease-Inhibitor Flurofamid den Na^+ -Transport in Ureaplasmen-infizierten FDLE-Zellen wiederherstellt. Dies ist die erste Untersuchung, die mögliche funktionelle Beeinträchtigungen alveolärer Epithelzellen bei einer akuten Ureaplasmen-Infektion untersucht und eine globale Hemmung des epithelialen Na^+ -Transports in fetalen Alveolarzellen nachweist (Abb. 16), möglicherweise aufgrund eines



Roland Ernst Stiftung für Gesundheitswesen - Abschlussbericht
**Pathomechanismen der Ureaplasmen-vermittelten pulmonalen
Entzündungsreaktion und chronischen Lungenerkrankung Frühgeborener**

veränderten Erk1/2-Signalweges. In diesem Zusammenhang wurde die durch Ureaplasmen verursachte Akkumulation von NH_3 als zentraler Mechanismus identifiziert, der die meisten durch Ureaplasmen verursachten Auswirkungen auf die FDLE-Zellfunktion imitiert. Im Einklang mit dieser Beobachtung stellte der Urease-Inhibitor Flurofamid den Na^+ -Transport, die ENaC-Aktivität und die Erk1/2-Aktivität vollständig wieder her, was eine relevante Rolle des Ureaplasmen-spezifischen Enzyms Urease bestätigt. Nach unserem Wissen, ist dies die erste Studie, die eine funktionelle Beeinträchtigung fetaler Lungenepithelzellen bei einer Ureaplasmen-Infektion zeigt und mögliche Mechanismen einer durch Ureaplasmen verursachten Lungenerkrankung Frühgeborener aufdeckt. Wir beschreiben Ureaplasmen-vermitteltes NH_3 und nicht die damit einhergehende pH-Verschiebung als ursächlichen Virulenzfaktor (**Abb. 16**).

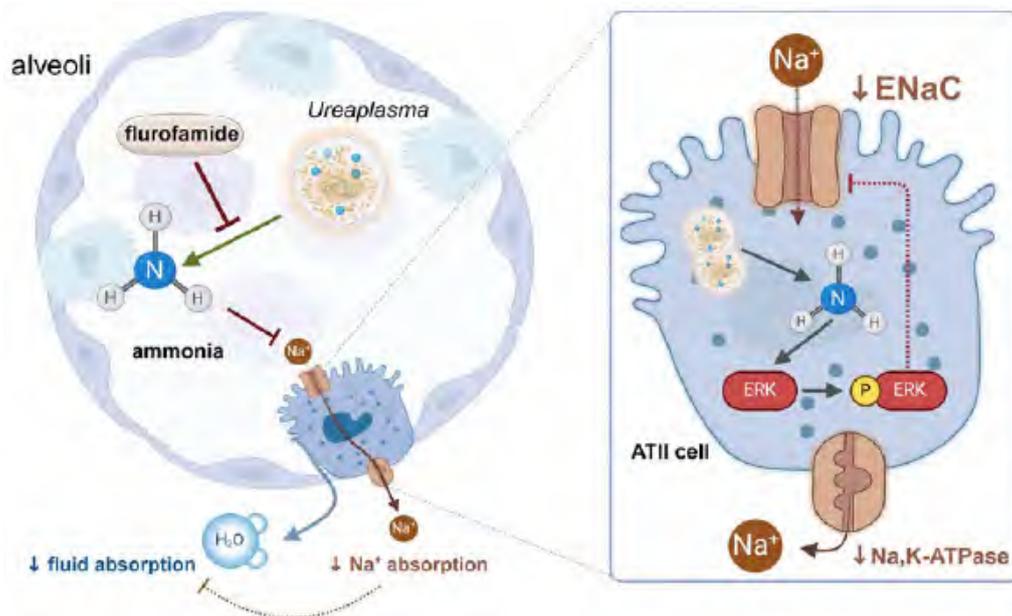


Abb. 16: Vorgeschlagerener Mechanismus der Ureaplasmen-bedingten Hemmung des Na^+ -Transports und der Beeinträchtigung der Lungenfunktion Frühgeborener. Nach unseren Ergebnissen induziert die Ureaplasmen-bedingte Ammoniakproduktion die Erk1/2-Phosphorylierung und hemmt die ENaC-Aktivität und den Na^+ -Transport in Alveolarepithelzellen. Flurofamid hemmt die Ureaplasmen-spezifische Urease-Aktivität und die anschließende Ammoniakbildung und stellt dadurch den Na^+ -Transport in FDLE-Zellen wieder her. Erstellt in BioRender. Laube, M. (2024) BioRender.com/x30p361.

Die vorliegenden Ergebnisse könnten erhebliche Auswirkungen auf die klinische Translation haben, da eine durch Ureaplasmen-vermittelte Hemmung des epithelialen Na^+ -Transports zur Ansammlung von Lungenflüssigkeit beitragen und den Übergang zur Luftatmung und die Funktion der Lunge weiter beeinträchtigen würden, insbesondere bei sehr unreifen Frühgeborenen. Letztendlich unterstreichen diese Daten die Relevanz von Ureaplasmen als echte Krankheitserreger in dieser Kohorte und geben Aufschluss über die Rolle von Urease-hemmenden Arzneimitteln als potenzielle therapeutische Strategien bei kolonisierten Frühgeborenen als Alternative zu antimikrobiellen Ansätzen. Zukünftige Studien sollten die beschriebenen Mechanismen *in vivo* bestätigen. Um die Eignung der Urease-hemmenden Arzneimittel weiter zu eruieren, wurde im letzten Teil (S. 22ff.) deren Wirkung auf das bakterielle Wachstum und die Aktivität im Vergleich zu gängigen Antibiotika untersucht.



Mechanismen der Ureaplasmen-vermittelten pro-inflammatorischen Immunantwort in primären neonatalen Monozyten

Eine Vielzahl von klinischen Studien und Untersuchungen in Tiermodellen deuten darauf hin, dass neben einer möglichen direkten Ureaplasmen-Zell-Interaktion die Induktion einer Inflammationsreaktion eine wichtige Rolle in der Pathogenese Ureaplasmen-vermittelter Erkrankungen bei Frühgeborenen, insbesondere der akuten und chronischen Lungenerkrankung, spielen. In Vorarbeiten der Antragstellerinnen konnte gezeigt werden, dass *U. parvum* und *U. urealyticum* eine relevante proinflammatorische Immunantwort in neonatalen Monozyten stimulieren (Abb. 17) [24–26]. Erkenntnisse über zugrundeliegende Mechanismen oder assoziierte Virulenzfaktoren von Ureaplasmen fehlen jedoch weitgehend [20, 27].

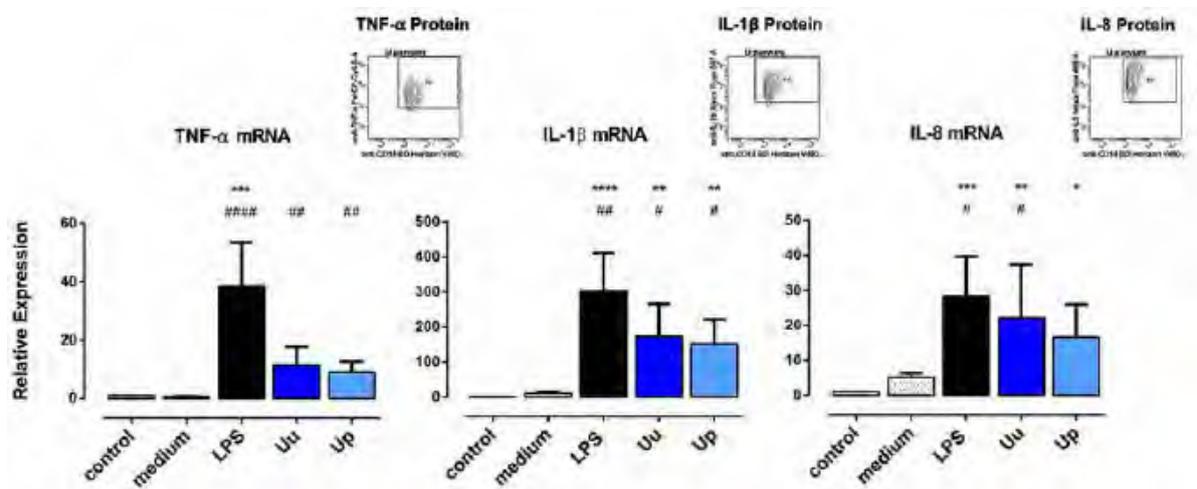


Abb. 17: Darstellung der Ureaplasmen-vermittelten proinflammatorischen Zytokinantwort in neonatalen Monozyten gemessen auf mRNA- und Protein-Ebene. Abgebildet ist die mRNA-Expression von TNF- α , IL-1 β und IL-8 sowie die mittels Mehrfarbenfluoreszenzanalyse gemessene intrazelluläre Zytokin-Expression in *U. urealyticum* (Uu) und *U. parvum* (Up)-stimulierten Monozyten versus unstimulierten Zellen (*control*) und Zellen, die gegenüber *E. coli* LPS exponiert wurden. Mean \pm SEM (Positivkontrolle) (n=6) * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001 vs. control; # p < 0.05, ## p < 0.01, ### p < 0.001, #### p < 0.0001 vs. Medium; Kruskal-Wallis Test mit Dunn's *post hoc*-Test.

Die Urease-vermittelte Produktion von Ammoniak und der assoziierte pH-Shift stellen keinen Virulenzfaktor von Ureaplasmen in der Interaktion mit neonatalen Monozyten dar

Nachdem die Projektleiterinnen im *in vitro*-Modell mit FDLE-Zellen die Urease-vermittelte Produktion von Ammoniak als Virulenzfaktor von Ureaplasmen beschreiben konnten, wurde auch im Modell mit primären neonatalen Monozyten untersucht, ob die Urease-vermittelte Produktion von Ammoniak und/oder der damit einhergehende pH-Shift für die Induktion einer proinflammatorischen Immunantwort in Ureaplasmen-exponierten Monozyten verantwortlich ist. Wie in Abbildung 18 dargestellt, induzierte weder eine NaOH-generierte pH-Wert-Verschiebung auf 8,0 noch die Zugabe von NH₃ eine proinflammatorische TNF- α , IL-1 β oder IL-8-Antwort (Abb. 18). Anders als in FDLE-Zellen scheint der Urease-vermittelte Hydrolyse von Harnstoff mit Produktion von NH₃ und begleitendem pH-Shift in der Interaktion von Ureaplasmen mit Monozyten keine Rolle als Virulenzfaktor zuzukommen.



Roland Ernst Stiftung für Gesundheitswesen - Abschlussbericht
**Pathomechanismen der Ureaplasmen-vermittelten pulmonalen
 Entzündungsreaktion und chronischen Lungenerkrankung Frühgeborener**

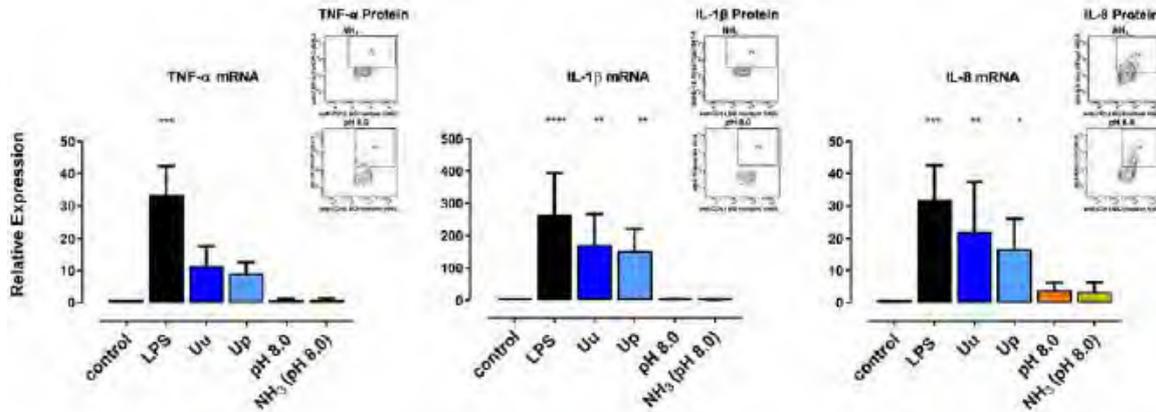


Abb. 18: Weder NH₃ noch der NaOH-vermittelte pH-Shift (pH 8,0) induzierte eine proinflammatorische Zytokinantwort in neonatalen Monozyten wie stattdessen nachgewiesen für *U. urealyticum* (Uu) und *U. parvum* (Up). Die Zytokinantwort wurde auf mRNA-Ebene gemessen. Ergänzend dargestellt sind exemplarische Messungen der intrazellulären TNF-α, IL-1β und IL-8-Expression nach Exposition der Zellen gegenüber NH₃ und NaOH-vermitteltem pH-Shift, gemessen mittels Mehrfarben-Durchflusszytometrie (n=7) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. control; Kruskal-Wallis Test mit Dunn's *post hoc*-Test.

Im Folgenden wurde der in FDLE-Zellen eingesetzte Urease-Inhibitor Fluorofamid im *in vitro*-Modell mit neonatalen Monozyten eingesetzt. In diesem Versuchsansatz wurde nochmals überprüft, ob der Ureaplasmen-spezifischen Urease mit nachfolgender Produktion von NH₃ in Interaktion mit neonatalen Monozyten eine Rolle als Virulenzfaktor zukommt. Daneben wurde untersucht, ob die Exposition von Ureaplasmen-stimulierten neonatalen Monozyten gegenüber Fluorofamid möglicherweise mit einer verstärkten und damit im Organismus eines Frühgeborenen nicht erwünschten verstärkten Inflammationsreaktion einhergeht. Neonatale Monozyten sind die Vorläuferzellen von Alveolarmakrophagen, die *in vivo* als lokale Abwehrzellen eine Reaktion gegenüber einer alveolären Fluorofamid-Applikation aufweisen könnten. Wie in Abbildung 3 dargestellt, führte die Ko-Exposition von Monozyten gegenüber *U. urealyticum* oder *U. parvum* und Fluorofamid nicht zu einer verminderten TNF-α, IL-1β oder IL-8-Antwort (**Abb. 19**). Umgekehrt zeigten ko-exponierte Monozyten keine verstärkte Zytokinantwort.

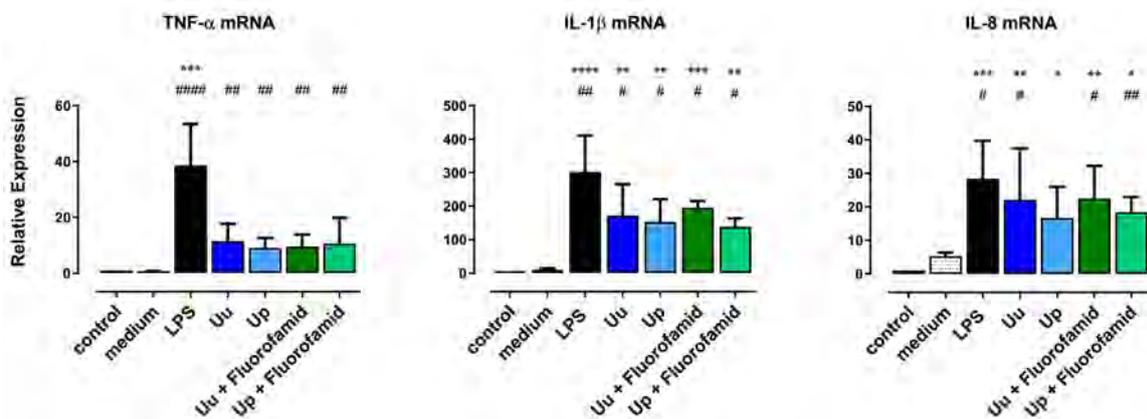


Abb. 19: Die Ko-Exposition von neonatalen Monozyten gegenüber *U. urealyticum* (Uu) oder *U. parvum* (Up) und Fluorofamid führte nicht zu einer reduzierten Zytokinexpression verglichen mit der Stimulation mit Uu oder Up allein. Umgekehrt verstärkte Fluorofamid die Ureaplasmen-induzierte pro-inflammatorische TNF-α, IL-1β und IL-8 Antwort nicht. Dargestellt sind die Ergebnisse der qPCR. Mean ± SEM (n=6) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. control; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, #### $p < 0.0001$ vs. Medium; Kruskal-Wallis Test mit Dunn's *post hoc*-Test.



Die Ureaplasmen-vermittelte pro-inflammatorische Immunantwort neonataler Monozyten geht mit der Phosphorylierung der Signalmoleküle p38 und Erk1/2 einher

Einzelne experimentelle Studien, hauptsächlich in Zervix- und Amnion-Epithelzellen, weisen auf eine Bedeutung von Toll-like Rezeptoren (TLR) und eine Aktivierung zentraler Signalmoleküle wie Erk1/2 und c-Jun N-terminale Kinase (JNK) in der Generierung einer Immunantwort gegen Ureaplasmen hin [20, 28–30]. Daten aus Arbeiten mit primären humanen Abwehrzellen einschließlich neonatalen Zellen fehlen bislang. Ausgehend von den existierenden Vordaten, den Ergebnissen der Projektleiterinnen in FDLE-Zellen sowie Studien in LPS-stimulierten neonatalen Monozyten wurde im nachfolgenden die Phosphorylierung der zentralen Signalmoleküle p38, Erk1/2, p65, JNK und p70 in Ureaplasmen-stimulierten Monozyten, zu unterschiedlichen Zeitpunkten, untersucht. Diesen zentralen Signalmolekülen kommt in TLR-stimulierten neonatalen Monozyten eine zentrale Rolle zu [31]. Bei p65 handelt es sich um eine Untereinheit des zentralen Transkriptionsfaktors NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), bei p38, Erk1/2 und JNK um Mitogen-aktivierte Proteinkinasen [6, 32], bei p70 um eine ribosomale Proteinkinase.

Wie in Abbildung 20 dargestellt führte die Ko-Inkubation neonataler Ureaplasmen zu einer Phosphorylierung von p38 und Erk1/2 – ähnlich der Aktivierung durch Inkubation der Zellen mit *E. coli* LPS (**Abb. 20**, Ergebnisse für *U. parvum*). Während die Ureaplasmen-vermittelte Phosphorylierung von p38 und Erk1/2 zum Messzeitpunkt 90 min und 12h persistierte, zeigten LPS-stimulierte neonatale Monozyten eine differierende Dynamik dieser Phosphorylierung. In LPS-stimulierten Zellen war eine Aktivierung nach 30 min zu messen, hiernach fiel diese rasch wieder ab. In ko-stimulierten Monozyten war die LPS-vermittelte Phosphorylierung von p38 und Erk1/2 verstärkt.

Im Gegensatz zu p38 und Erk1/2 führte die Stimulation neonataler Monozyten mit Ureaplasmen nicht zu einer Phosphorylierung von p65, JNK und p70 (**Abb. 20**). Passend zu Vordaten aus anderen Studien wurden diese Signalmoleküle in neonatalen Monozyten aber durch LPS-Exposition aktiviert.



Roland Ernst Stiftung für Gesundheitswesen - Abschlussbericht
**Pathomechanismen der Ureaplasmen-vermittelten pulmonalen
 Entzündungsreaktion und chronischen Lungenerkrankung Frühgeborener**

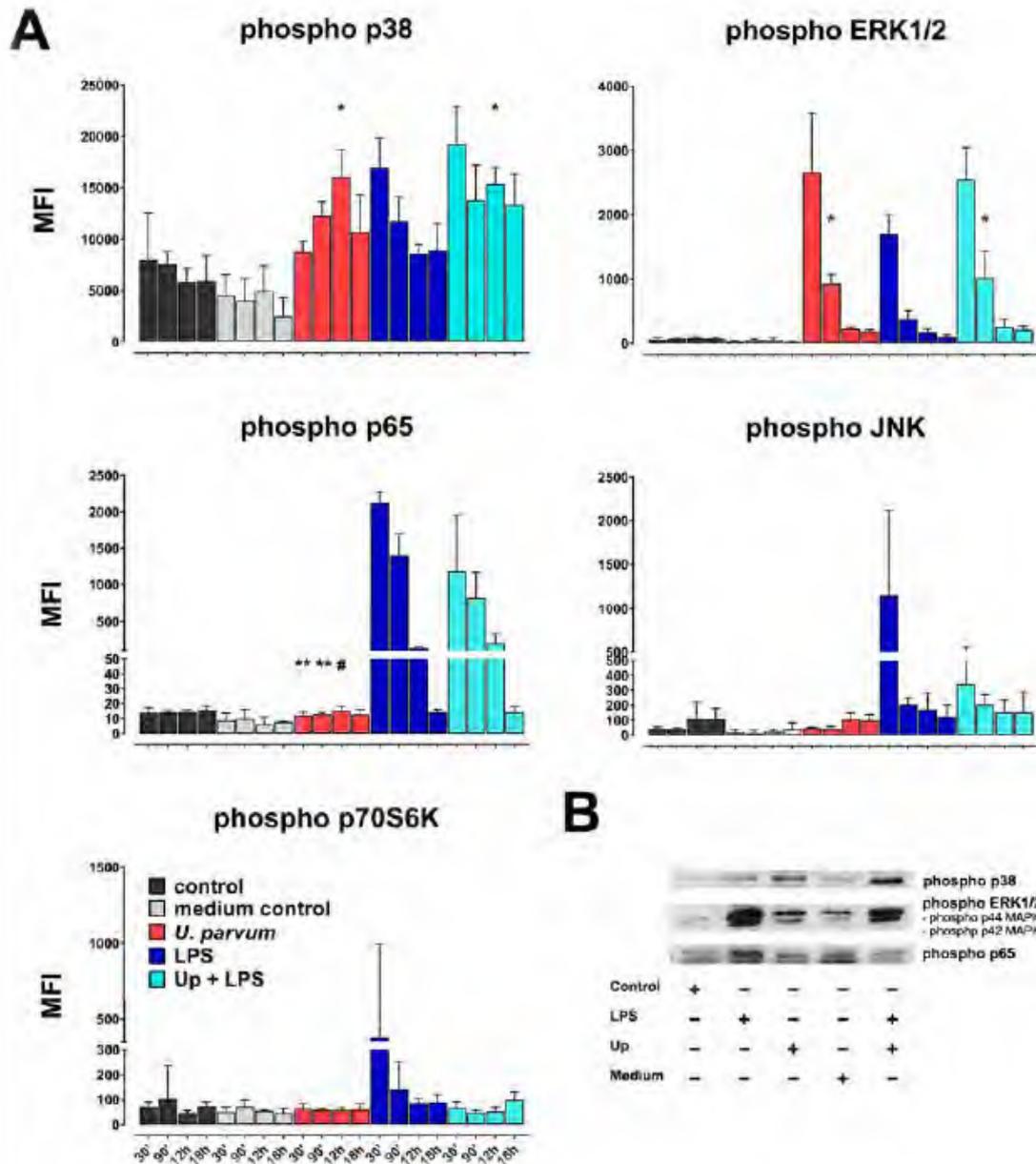


Abb. 20: (A) Analyse der Phosphorylierung der Signalmoleküle p38, Erk1/2, p65, JNK und p70S6K in *U. parvum* (Up)-, LPS- und Up+LPS-stimulierten neonatalen Monozyten mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) nach 30 min, 90 min, 12h und 18h Inkubation (n=6; *p<0.05 vs. LPS-stimulierte Monozyten; #p<0.05 vs. Up+LPS-stimulierte Monozyten). (B) Repräsentativer Western Blot von phospho-p38, phospho-ERK1/2 und phospho-p65 in Up-, LPS- und Up+LPS-kostimulierten neonatalen Monozyten nach 30-minütiger Inkubation der Zellen.

Im Weiteren wurden neonatale Monozyten gemeinsam mit Ureaplasmen und *small molecule*-Inhibitoren der Signalmoleküle p38, Erk1/2 und p65 ko-inkubiert und die proinflammatorische Immunantwort in ko-inkubierten Monozyten versus allein mit Ureaplasmen-stimulierten Zellen untersucht. Während die Inhibition von p65 keinen Einfluss auf die TNF- α , IL-1 β oder IL-8-Antwort der Zellen hatte, wurde nach Inhibition von Erk 1/2 und insbesondere von p38 eine signifikante Reduktion der Zytokin-Expression beobachtet (**Abb. 21**).



Roland Ernst Stiftung für Gesundheitswesen - Abschlussbericht
**Pathomechanismen der Ureaplasmen-vermittelten pulmonalen
 Entzündungsreaktion und chronischen Lungenerkrankung Frühgeborener**

Ein der Aktivierung von p38 und Erk1/2 nachgeschaltetes zentrales Signalmolekül stellt STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) dar. STAT3 moduliert die Transkription einer Vielzahl von Genen, die u.a. an der Regulierung wichtiger von Immunreaktionen beteiligt sind [32, 33]. Interessanterweise vermochte die Ko-Inkubation mit einem *small molecule*-Inhibitor von STAT3 in der vorliegenden Studie die Ureaplasmen-vermittelte Immunantwort in neonatalen Monozyten vollständig zu unterdrücken (**Abb. 21**).

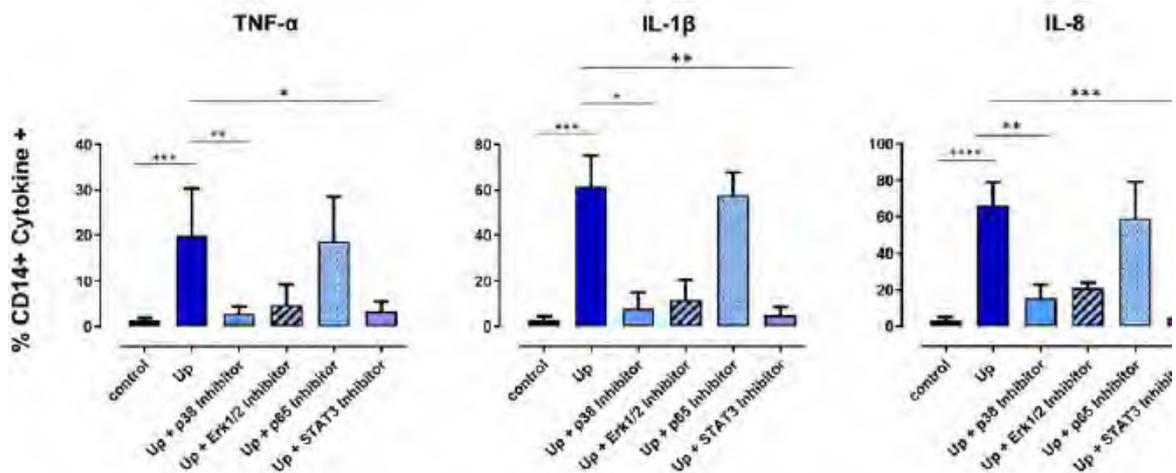


Abb. 21: Effekt einer Ko-Inkubation neonataler Monozyten mit Ureaplasmen (hier abgebildet für *U. parvum*, Up) und den *small molecule*-Inhibitoren der Signalmoleküle p38, Erk1/2, p65 und STAT3 auf die Ureaplasmen-vermittelte Zytokinantwort der Zellen. Dargestellt ist die quantitative Analyse der intrazellulären Zytokinexpression mittels Durchflusszytometrie ermittelt in Prozent positiver Zellen. Mean \pm SEM (n=4) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. Up-stimulierte Monozyten; Kruskal-Wallis Test mit Dunn's *post hoc*-Test.

Zusammenfassend konnte die pro-inflammatorische Immunantwort neonataler Monozyten nach Ureaplasmen-Stimulation durch Ko-Inkubation mit *small molecule*-Inhibitoren der Signalmoleküle p38, Erk1/2 sowie STAT3 signifikant reduziert bzw. vollständig inhibiert werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Ureaplasmen p38-, Erk1/2- und STAT3-vermittelte Signaltransduktionskaskaden in neonatalen Monozyten aktivieren und über diese Signalwege eine pro-inflammatorische Zytokin-Antwort vermitteln (**Abb. 22**).



Roland Ernst Stiftung für Gesundheitswesen - Abschlussbericht
**Pathomechanismen der Ureaplasmen-vermittelten pulmonalen
 Entzündungsreaktion und chronischen Lungenerkrankung Frühgeborener**

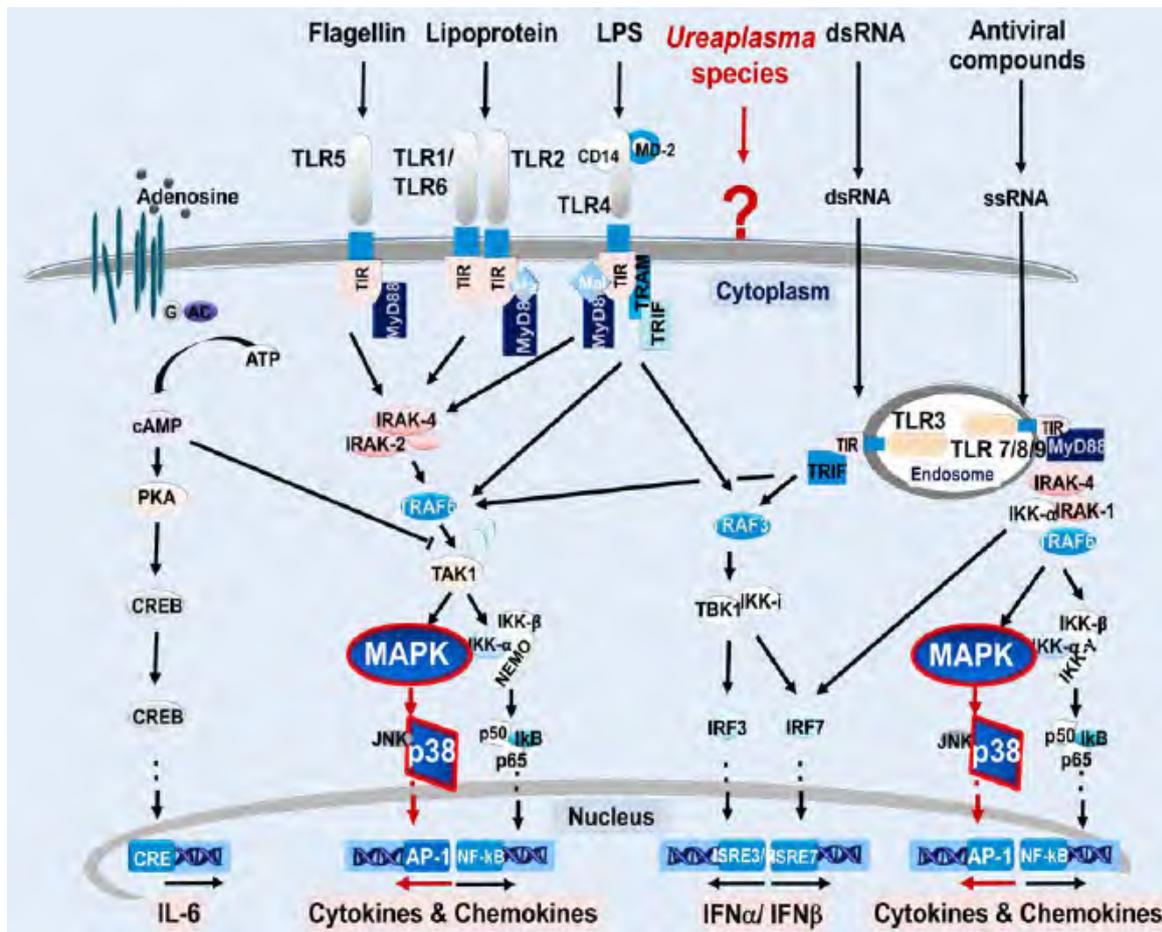


Abb. 22: Schematische Darstellung TLR-vermittelter Signalwege und Bedeutung der MAP-Kinasen p38 und Erk1/2 in diesem Kontext [6] [Modifizierte Graphik eines Übersichtsartikels der Projektleiterinnen]

Die vorliegenden Untersuchungen stellen die erste Studie zur Ureaplasmen-vermittelten Signaltransduktion in humanen Monozyten dar. Die Ergebnisse legen eine zentrale Bedeutung von p38 und Erk1/2 nahe und weisen zugleich auf eine möglicherweise Erreger-spezifische Kinetik mit persistierender Aktivierung hin. Die dargestellten Ergebnisse müssen in weiteren Studien auf ihre translationale Bedeutung – auch und besonders im Kontext einer Ko-Infektion – hin überprüft werden. Daneben bedarf die Identifizierung der vorgeschalteten Rezeptoren weiterer Untersuchungen. In den Arbeiten der Antragstellerinnen gelang die Inhibition ausgewählter Toll-like Rezeptoren mit monoklonalen Antikörpern nicht. Im Folgen sollen *small molecule*-TLR-Inhibitoren in Infektionsversuchen eingesetzt werden, um die zugrundeliegenden Mechanismen der Ureaplasmen-vermittelten neonatalen Immunantwort weiter zu charakterisieren.



Vergleich des inhibitorischen Potenzials der Urease-Inhibitoren Flurofamid und Pantoprazol im Vergleich zu Ureaplasmen-wirksamen Makrolid-Antibiotika und Fluorochinolonen

Die meisten empirischen Behandlungen für Neugeboreneninfektionen, die Beta-Lactam-Antibiotika mit oder ohne Glykopeptid einschließen, haben keinen Einfluss auf *Ureaplasma spp.*, da aufgrund der fehlenden Zellwand Beta-Lactam-Antibiotika keine Wirkung auf das Ureaplasmen-Wachstum haben. Eine wirksame Eradikation ist jedoch unerlässlich, um chronische Komplikationen zu reduzieren. Neonatale Ureaplasmen-Infektionen können mit Makroliden, wie Erythromycin, Clarithromycin, Azithromycin und Solithromycin behandelt werden, wobei letzteres nur auf experimenteller Ebene eingesetzt wurde. Aktuelle Behandlungen umfassen Antibiotika, wie Azithromycin, wobei sich zunehmend Resistenzen entwickeln. Es fehlen jedoch nach wie vor Leitlinien zur standardisierten Behandlung.

Für unsere Analysen haben wir drei verschiedene Makrolide verwendet. Diese sind aufgrund ihrer antiinfektiösen und entzündungshemmenden Eigenschaften besonders geeignet für die Behandlung von Lungenerkrankungen bei Frühgeborenen. Die Makrolide wirken bakteriostatisch, indem sie an die 50S-Untereinheit der bakteriellen 70S-Ribosomen binden und dadurch die Proteinsynthese hemmen. Zum Vergleich verwendeten wir außerdem Moxifloxacin, ein Fluorochinolon, das aufgrund seiner möglichen teratogenen Wirkung nur eingeschränkt eingesetzt wird. Moxifloxacin wirkt bakterizid, indem es die bakterielle Gyrase (Topoisomerase für die Transkription) hemmt.

Im Vergleich zu den genannten Antibiotika wurde das oben beschriebene Flurofamid verwendet. Als Wirkmechanismus wird eine nicht-klassische, nicht-kompetitive Inhibition der Urease vermutet. Die Hemmung scheint pH-abhängig zu sein. Vorangegangene Studien haben den Einsatz von Flurofamid bei Ureaplasmen-induzierter Hyperammonämie und infektionsbedingten Harnsteinen untersucht.

Zusätzlich wurde der Protonenpumpenhemmer Pantoprazol verwendet, der regelhaft zur Eradikation von *Helicobacter pylori* oder bei Magengeschwüren eingesetzt wird. Es wirkt durch irreversible Hemmung der H⁺/K⁺-ATPase im Magen und als Inhibitor der Urease bei *Helicobacter pylori*. Daher sollte untersucht werden, ob Pantoprazol durch die Hemmung der Urease auch das Wachstum von Ureaplasmen beeinflussen kann. Pantoprazol wird in der Praxis sowohl bei Schwangeren als auch bei Neugeborenen eingesetzt (Off-Label-Use).

Beide nicht-antibiotischen Medikamente würden eine vielversprechende Alternative zur Antibiotikatherapie darstellen, um die Entwicklung von Resistenzen zu reduzieren und das Risiko von Nebenwirkungen zu verringern.



Roland Ernst Stiftung für Gesundheitswesen - Abschlussbericht
**Pathomechanismen der Ureaplasmen-vermittelten pulmonalen
 Entzündungsreaktion und chronischen Lungenerkrankung Frühgeborener**

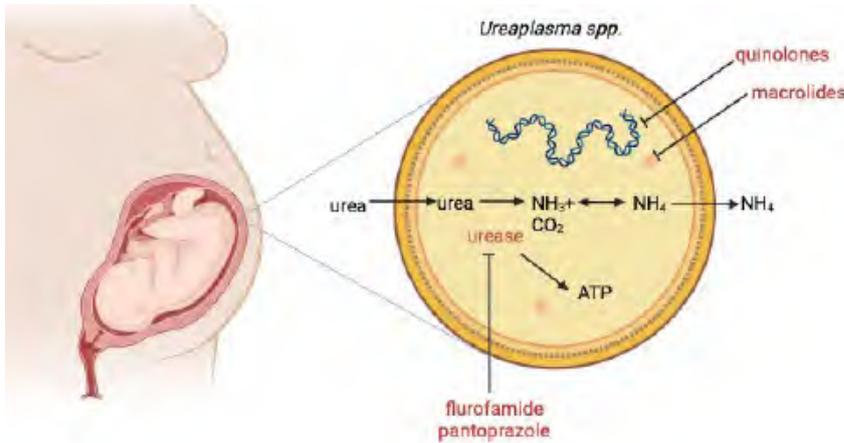
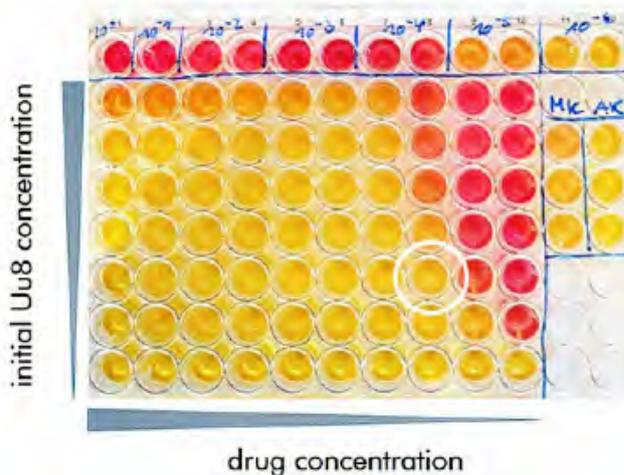


Abb. 23: Stoffwechsel von *Ureaplasma spp.*. Ureaplasmen besitzen keine Zellwand und erzeugen ATP durch das Enzym Urease, wodurch Ammoniak und CO₂ entstehen. Flurofamid und Pantoprazol hemmen das Bakterienwachstum durch Hemmung der Urease, Makrolide durch die Hemmung der Ribosomen und Chinolone durch die Hemmung der DNA-Gyrase. Erstellt in BioRender.

Minimale Hemmkonzentration (MHK)

Wie bereits beschrieben erzeugen Ureaplasmen durch Harnstoffabbau Ammoniak, was zu einer Verschiebung des pH-Wert führt. Durch die Verwendung von Phenolrot im Medium kann diese Änderung des pH-Werts visualisiert werden. Für den Vergleich der verschiedenen Medikamente wurde zunächst die jeweilige minimale Hemmkonzentration (MHK) unter Verwendung des pH Indikators bestimmt. Dazu wurden die Ureaplasmen mit 10 verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Medikaments in Medium versetzt. Von links nach rechts der 96-Well-Platte nimmt die Konzentration des Medikaments ab und von oben nach unten, ab Reihe 2, nimmt die Konzentration von Ureaplasmen ab (**Abb. 24**). Die Reihe A enthält eine Ureaplasmen-Verdünnungsreihe ohne Antibiotika als Kontrolle. Nach etwa 20 h wurde die Antibiotika-freie Reihe A überprüft und das Well mit dem optimalen Farbumschlag als Positivkontrolle gewählt. Entsprechend der gewählten Positivkontrolle wurde nun die minimale Medikamentenkonzentration abgelesen, bei der es zu keinem Farbumschlag des Mediums kam (kein Bakterienwachstum stattfand). Dadurch wurde die MHK für jedes der Medikamente bestimmt (**Abb. 24**). Basierend auf den Ergebnissen wurden die Medikamente in der jeweiligen MHK für die folgenden Analysen eingesetzt.



	MHK (µM)
Azithromycin	1
Clarithromycin	1
Solithromycin	1
Moxifloxacin	1
Flurofamid	5
Pantoprazol	500

Abb. 24: Beispielhafte MHK-Bestimmung von Flurofamid. Der Kreis zeigt die MHK an (5 µM). Rechte Tabelle: MHK der jeweiligen Medikamente.



Ureaplasmen-induzierte pH-Wertverschiebung

Verdünnungsreihen von Uu8 wurden entweder mit Antibiotika (Makrolide: Azithromycin (Azi), Clarithromycin (Cla), Solithromycin (Sol); Fluorchinolon: Moxifloxacin (Mox)), oder den Urease-Inhibitoren Flurofamid (Flu) oder Pantoprazol (Pan) kultiviert. Basierend auf jeder MHK wurde die pH-Verschiebung im Vergleich zu Medikamenten-negativen Kontrollen (Nc) nach 20 h analysiert. Flurofamid verhinderte die durch Ureaplasmen verursachte pH-Verschiebung ebenso wirksam wie die Antibiotika (Abb. 25). Pantoprazol zeigte eine geringere Wirkung.

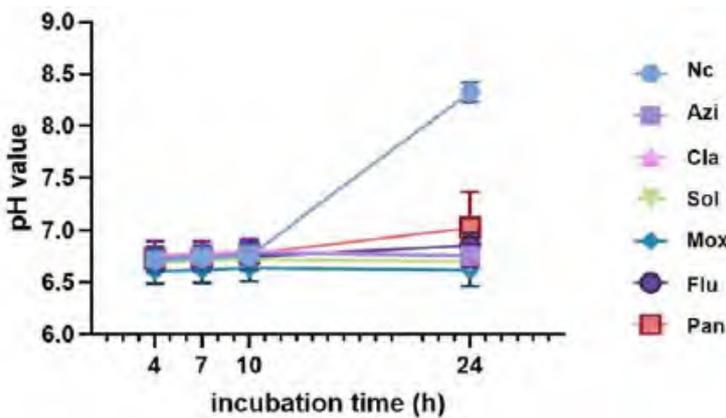


Abb. 25: Ureaplasmen-bedingte pH-Wertverschiebung bei der ermittelten MHK nach 20 h (n=2, Mittelwert ± SD). Alle Medikamente wurden bei MHK verwendet. Ausgenommen Pantoprazol verhinderten alle Medikamente eine pH-Wertverschiebung effektiv.

Negativkontrolle (Nc), Azithromycin (Azi), Clarithromycin (Cla), Solithromycin (Sol); Moxifloxacin (Mox), Flurofamid (Flu), Pantoprazol (Pan)

Bakterielle ATP-Produktion

Basierend auf der jeweiligen MHK wurde die ATP-Konzentrationen mit einem BacTiter™-Assay im Vergleich zu Medikamenten-negativen Kontrollen bestimmt. Azithromycin hemmte die bakterielle ATP-Freisetzung nicht, wohingegen Pantoprazol und Solithromycin den bakteriellen Stoffwechsel verzögerten (Abb. 26). Flurofamid, Clarithromycin und Solithromycin reduzierten die maximale ATP-Produktion am effektivsten.

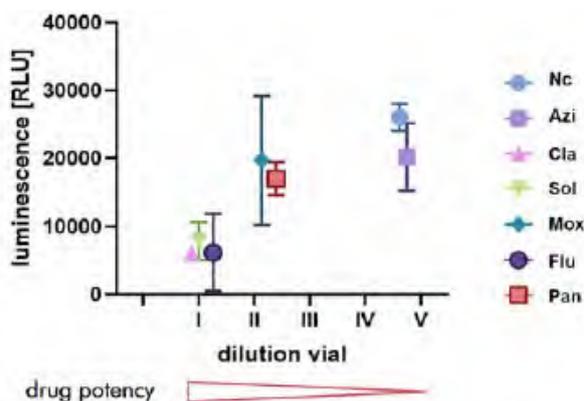


Abb. 26: Die bakterielle ATP-Freisetzung ist proportional zur beobachteten Lumineszenzintensität (n=2, Mittelwert ± SD). Bedeutung: die Reaktion in Tube V zeigt keine/schwache Hemmung an, die Reaktion in Tube II eine mittlere Hemmung, die Reaktion in Tube I eine effektive Hemmung nach 20 h. Alle Medikamente wurden bei MHK verwendet.

Negativkontrolle (Nc), Azithromycin (Azi), Clarithromycin (Cla), Solithromycin (Sol); Moxifloxacin (Mox), Flurofamid (Flu), Pantoprazol (Pan)

Bakterienwachstum anhand der Genomäquivalente

Basierend auf der jeweiligen MHK wurden die Genomäquivalente mittels qPCR im Vergleich zu Medikamenten-negativen Kontrollen bestimmt. Flurofamid reduzierte die bakteriellen Genomäquivalente dabei genauso wirksam wie Solithromycin und Clarithromycin (Abb. 27). Pantoprazol und Moxifloxacin waren in geringerer Potenz gleich wirksam. Azithromycin hatte die



Roland Ernst Stiftung für Gesundheitswesen - Abschlussbericht
**Pathomechanismen der Ureaplasmen-vermittelten pulmonalen
 Entzündungsreaktion und chronischen Lungenerkrankung Frühgeborener**

geringste Hemmwirkung. Flurofamid (5–10 μM) hemmte die bakterielle Transkription dabei wirksamer als Azithromycin (**Abb. 28**).

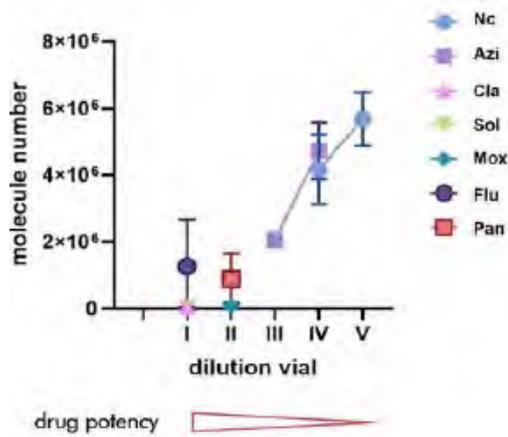


Abb. 27: Anzahl der Bakteriengenome ($n=2$, Mittelwert \pm SD). Die Reaktion in Tube V: keine/schwache Transkriptionshemmung, Reaktion in Tube I: effektive Hemmung nach 20 h. Alle Medikamente wurden bei MHK verwendet.

Negativkontrolle (Nc), Azithromycin (Azi), Clarithromycin (Cla), Solithromycin (Sol); Moxifloxacin (Mox), Flurofamid (Flu), Pantoprazol (Pan)

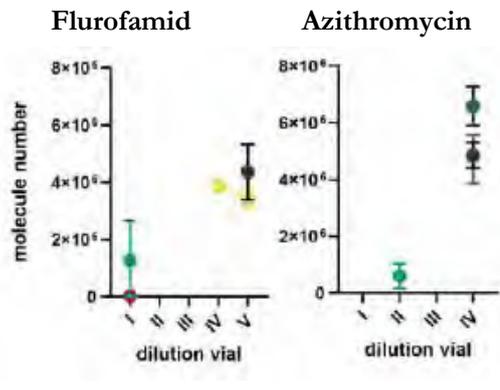


Abb. 28: Anzahl der Bakteriengenome bei unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen ($n=2$, Mittelwert \pm SD) nach 20 h. Flurofamid (5–10 μM) hemmte die bakterielle Transkription dabei wirksamer als Azithromycin (Reaktion in Tube I: effektive Hemmung).

negative control
 0,1 μM
 1 μM
 5 μM
 10 μM

In den Analysen, einschließlich pH-Verschiebung, bakterieller ATP-Produktion und bakterieller Genomäquivalente, zeigte Azithromycin die geringste Hemmwirkung. Andere Antibiotika wie Solithromycin zeigten im Vergleich zu Azithromycin eine überlegene Wirksamkeit. Unterschiede zwischen Makroliden (bakteriostatisch) und Chinolonen (bakterizid) wurden nicht beobachtet. Pantoprazol hemmte ebenfalls das Ureaplasmen-Wachstum, erforderte jedoch zu hohe Konzentrationen, um eine praktikable Alternative im klinischen Kontext darzustellen. Insbesondere Flurofamid, das bisher nicht für die Eradikation von Ureaplasmen bei Frühgeborenen in Betracht gezogen wurde, verhinderte wirksam eine pH-Verschiebung, hemmte die ATP-Freisetzung und reduzierte die bakteriellen Genomäquivalente. Diese Ergebnisse geben Aufschluss über die mögliche Rolle von Urease-hemmenden Arzneimitteln wie Flurofamid als potenzielle Therapiestrategie bei Ureaplasmen-bedingten Infektionen. Flurofamid hemmt das Ureaplasmen-Wachstum genauso wirksam wie herkömmliche Antibiotika und stellt eine vielversprechende Alternative für die Behandlung von Ureaplasmen-Infektionen bei Lungenerkrankungen Frühgeborener dar.



Zusammenfassung und Ausblick

Unsere Daten zeigen eine funktionelle Beeinträchtigung fetaler Alveolarepithelzellen durch Ureaplasmen und NH₃. Die Aufhebung der Ureaplasmen-vermittelten Effekte durch Flurofamid unterstreicht die mögliche Rolle der Urease-vermittelten NH₃-Bildung als Virulenzfaktor. Demgegenüber haben Urease-vermittelte NH₃-Bildung und pH-Shift keinen Einfluss auf die pro-inflammatorische Zytokinantwort neonataler Monozyten. In Ko-Expositionsversuchen mit neonatalen Monozyten konnte eine Verstärkung einer für den Wirt unerwünschten Inflammationsreaktion durch Flurofamid ausgeschlossen werden.

Die vorliegende Studie ist die erste, die die Ureaplasmen-eigene Urease und Hydrolyse von Harnstoff zu NH₃ als Virulenzfaktor im zellspezifischen Kontext beschreibt und eine relevante funktionelle Beeinträchtigung des fetalen Alveolarepithels charakterisiert. Letztere Ergebnisse könnten im klinischen Kontext von großer Relevanz sein, da eine durch Ureaplasmen-vermittelte Hemmung des epithelialen Na⁺-Transports in Ureaplasmen-besiedelten Frühgeborenen perinatal zur Ansammlung von Lungenflüssigkeit in den Alveolen beitragen könnte und so den Übergang zur Luftatmung und die Funktion der noch unreifen Lunge weiter beeinträchtigen würde. Diese Effekte wären umso gravierender, je unreifer das Frühgeborene ist.

Die Arbeiten mit neonatalen Monozyten stellen die erste Studie zur Ureaplasmen-vermittelten Signaltransduktion in humanen Monozyten dar. Die Ergebnisse legen eine zentrale Bedeutung von p38 und Erk1/2, Schlüsselmolekülen z.B. einer TLR-vermittelten Signaltransduktionskaskade, nahe und weisen zugleich auf eine möglicherweise Erreger-spezifische Kinetik mit persistierender Aktivierung hin. Die Möglichkeit einer therapeutischen Intervention muss in Folgestudien untersucht werden.

Abschließend unterstreichen die vorliegenden Daten die Relevanz von Ureaplasmen als echte Krankheitserreger in der Kohorte sehr unreifer Frühgeborener. Unsere Arbeiten in fetalen alveolären Epithelzellen und unsere Analysen der minimalen Hemmkonzentrationen von Makroliden versus Urease-Inhibitoren deuten darauf hin, dass neben Makrolid-Antibiotika der Einsatz von Urease-Inhibitoren wie Flurofamid, z.B. direkt tracheal, eine effektive therapeutische Strategie bei kolonisierten Frühgeborenen im frühen Lebensalter darstellen könnte. Zukünftige Studien sollten die beobachteten Mechanismen *in vivo* bestätigen.

Verwertung der Projektergebnisse

Die bisherigen Ergebnisse wurden und werden auf wissenschaftlichen Konferenzen einem akademischen und industriellen Fachpublikum vorgestellt:

1. „46. Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie“ (GPP 2025). 12. – 15. März 2025, Leipzig, Deutschland.
2. „18th Leipzig Research Festival for Life Sciences“. 30.01.2025, Leipzig, Deutschland.
3. „27. Interdisziplinäres KinderImmunologisches ArbeitsTreffen (KIAT)“. 27.11.2024, Leipzig, Deutschland.
4. “10th Congress of the European Academy of Paediatric Societies”. 17.-20.10.2024, Wien, Deutschland.



Roland Ernst Stiftung für Gesundheitswesen - Abschlussbericht
**Pathomechanismen der Ureaplasmen-vermittelten pulmonalen
Entzündungsreaktion und chronischen Lungenerkrankung Frühgeborener**

5. „European Respiratory Society (ERS) Congress 2024“, 07.-11.09.2024, Wien, Deutschland.
6. “50. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin”. 17.-19.04.2024, München, Deutschland.
7. „17th Leipzig Research Festival for Life Sciences“. 18.01.2024, Leipzig, Germany.
8. 5th Congress of joint European Neonatal Societies (jENS) 2023, 19.-23.09.2023, Rom, Italien.
9. 49. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin e. V. und 35. Jahrestagung des wissenschaftlichen Arbeitskreises (WAKKA), 15.–17.06.2023, Hamburg, Deutschland.

Die Ergebnisse wurden des Weiteren zur Veröffentlichung bei der renommierten und peer-reviewed Zeitschrift *Cellular & Molecular Biology Letters* (impact factor 2023: 9,2) eingereicht und befindet sich nach ersten Gutachten in Revision.

Glaser K, Rieger C-B, Paluszkiwicz E, Thome UH, Laube M. *Ureaplasma*-driven inhibition of the epithelial Na⁺ transport in fetal alveolar cells: a novel mechanism of Ureaplasma-mediated preterm lung disease. CMBL (under revision).

Des Weiteren wurden die Ergebnisse bereits auf dem Preprint-Server von *bioRxiv* veröffentlicht.

Glaser K, Rieger C-B, Paluszkiwicz E, Thome UH, Laube M. Inhibition of epithelial Na⁺ transport: novel mechanism of *Ureaplasma*-driven lung disease. *bioRxiv* 2024; doi: 10.1101/2024.02.14.580256.

Eine weitere Publikation zu den Ergebnissen des Vergleichs von Flurofamid mit den gängigen Antibiotika befindet in Vorbereitung.

Literaturverzeichnis

- 1 Althaus M, Clauss WG, Fronius M. Amiloride-Sensitive Sodium Channels and Pulmonary Edema. *Pulm Med* 2011;2011:830320.
- 2 Barker PM, Gowen CW, Lawson EE, et al. Decreased sodium ion absorption across nasal epithelium of very premature infants with respiratory distress syndrome. *J Pediatr* 1997;130(3):373–77.
- 3 Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000;342(18):1334–49.
- 4 Helve O, Pitkänen O, Janér C, et al. Pulmonary Fluid Balance in the Human Newborn Infant. *Neonatology* 2009;95(4):347–52.
- 5 Grenache DG, Gronowski AM. Fetal lung maturity. *Clin Biochem* 2006;39(1):1–10.
- 6 Glaser K, Speer CP. Toll-like receptor signaling in neonatal sepsis and inflammation: a matter of orchestration and conditioning. *Expert Rev Clin Immunol* 2013;9(12):1239–52.
- 7 Tatad AMF, Nesin M, Peoples J, et al. Cytokine expression in response to bacterial antigens in preterm and term infant cord blood monocytes. *Neonatology* 2008;94(1):8–15.
- 8 O'Brodovich HM. Immature epithelial Na⁺ channel expression is one of the pathogenetic mechanisms leading to human neonatal respiratory distress syndrome. *Proc Assoc Am Physicians* 1996;108(5):345–55.
- 9 Jesse NM, McCartney J, Feng X, et al. Expression of ENaC subunits, chloride channels, and aquaporins in ovine fetal lung: ontogeny of expression and effects of altered fetal cortisol concentrations. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;297(2):R453–61.
- 10 Thome U, Chen L, Factor P, et al. Na,K-ATPase gene transfer mitigates an oxidant-induced decrease of active sodium transport in rat fetal AIII cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24(3):245–52.



Roland Ernst Stiftung für Gesundheitswesen - Abschlussbericht
**Pathomechanismen der Ureaplasmen-vermittelten pulmonalen
Entzündungsreaktion und chronischen Lungenerkrankung Frühgeborener**

- 11 O'Brodovich H, Staub O, Rossier BC, et al. Ontogeny of alpha 1- and beta 1-isoforms of Na(+)-K(+)-ATPase in fetal distal rat lung epithelium. *Am J Physiol* 1993;264(5 Pt 1):C1137-43.
- 12 Guagliardo R, Pérez-Gil J, Smedt S de, et al. Pulmonary surfactant and drug delivery: Focusing on the role of surfactant proteins. *J Control Release* 2018;291:116–26.
- 13 Glass JI, Lefkowitz EJ, Glass JS, et al. The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. *Nature* 2000;407(6805):757–62.
- 14 Blazer-Yost BL, Cox M, Furlanetto R. Insulin and IGF I receptor-mediated Na⁺ transport in toad urinary bladders. *Am J Physiol* 1989;257(4 Pt 1):C612-20.
- 15 Lee I-H, Dinudom A, Sanchez-Perez A, et al. Akt mediates the effect of insulin on epithelial sodium channels by inhibiting Nedd4-2. *J Biol Chem* 2007;282(41):29866–73.
- 16 Diakov A, Nesterov V, Mokrushina M, et al. Protein kinase B alpha (PKBalpha) stimulates the epithelial sodium channel (ENaC) heterologously expressed in *Xenopus laevis* oocytes by two distinct mechanisms. *Cell Physiol Biochem* 2010;26(6):913–24.
- 17 Shen J-P, Cotton CU. Epidermal growth factor inhibits amiloride-sensitive sodium absorption in renal collecting duct cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;284(1):F57-F64.
- 18 Booth RE, Stockand JD. Targeted degradation of ENaC in response to PKC activation of the ERK1/2 cascade. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;284(5):F938-47.
- 19 Shi H, Asher C, Chigaev A, et al. Interactions of beta and gamma ENaC with Nedd4 can be facilitated by an ERK-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 2002;277(16):13539–47.
- 20 Sweeney EL, Dando SJ, Kallapur SG, et al. The Human *Ureaplasma* Species as Causative Agents of Chorioamnionitis. *Clin Microbiol Rev* 2017;30(1):349–79.
- 21 Silwedel C, Speer CP, Glaser K. *Ureaplasma*-associated prenatal, perinatal, and neonatal morbidities. *Expert Rev Clin Immunol* 2017;13(11):1073–87.
- 22 Harder LM, Bunkenborg J, Andersen JS. Inducing autophagy: a comparative phosphoproteomic study of the cellular response to ammonia and rapamycin. *Autophagy* 2014;10(2):339–55.
- 23 Merhi A, Delrée P, Marini AM. The metabolic waste ammonium regulates mTORC2 and mTORC1 signaling. *Sci Rep* 2017;7:44602.
- 24 Glaser K, Silwedel C, Fehrholz M, et al. *Ureaplasma* Species Differentially Modulate Pro- and Anti-Inflammatory Cytokine Responses in Newborn and Adult Human Monocytes Pushing the State Toward Pro-Inflammation. *Front Cell Infect Microbiol* 2017;7:484.
- 25 Glaser K, Silwedel C, Fehrholz M, et al. *Ureaplasma* isolates stimulate pro-inflammatory CC chemokines and matrix metalloproteinase-9 in neonatal and adult monocytes. *PLoS ONE* 2018;13(3):e0194514.
- 26 Glaser K, Silwedel C, Waaga-Gasser AM, et al. *Ureaplasma* isolates differentially modulate growth factors and cell adhesion molecules in human neonatal and adult monocytes. *Cytokine* 2018;105:45–48.
- 27 Silwedel C, Laube M, Speer CP, et al. The Role of *Ureaplasma* Species in Prenatal and Postnatal Morbidity of Preterm Infants: Current Concepts. *Neonatology* 2024;1–9.
- 28 Shimizu T, Kida Y, Kuwano K. *Ureaplasma parvum* lipoproteins, including MB antigen, activate NF- κ B through TLR1, TLR2 and TLR6. *Microbiology* 2008;154(Pt 5):1318–25.
- 29 Triantafilou M, Glanville B de, Aboklaish AF, et al. Synergic activation of toll-like receptor (TLR) 2/6 and 9 in response to *Ureaplasma parvum* & *urealyticum* in human amniotic epithelial cells. *PLoS ONE* 2013;8(4):e61199.
- 30 Noh EJ, Kim DJ, Lee JY, et al. *Ureaplasma Urealyticum* Infection Contributes to the Development of Pelvic Endometriosis Through Toll-Like Receptor 2. *Front Immunol* 2019;10:2373.
- 31 Glaser K, Kern D, Speer CP, et al. Imbalanced Inflammatory Responses in Preterm and Term Cord Blood Monocytes and Expansion of the CD14+CD16+ Subset upon Toll-like Receptor Stimulation. *Int J Mol Sci* 2023;24(5).
- 32 Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol* 2014;5:461.
- 33 Jong PR de, Schadenberg AWL, van den Broek T, et al. STAT3 regulates monocyte TNF-alpha production in systemic inflammation caused by cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *PLoS ONE* 2012;7(4):e35070.