

Untersuchung aktiver Tryptophanmetaboliten zur Entwicklung mikrobiota-unabhängiger Behandlungsstrategien für Menschen mit Pouchitis und anderen Formen der intestinalen Entzündung

Zusammenfassung

Die hohe Wirksamkeit der Antibiotikabehandlung bei Menschen mit Pouchitis lässt vermuten, dass das Zusammenspiel von Mikrobiom, seinen Metaboliten und dem Immunsystem bei der Behandlung von Entzündungen der Darmschleimhaut ein außergewöhnliches therapeutisches Potenzial hat. Unsere Vorarbeiten zeigen, dass aktive Tryptophanmetabolite der Mikrobiota in Modellen der Pouchitis einen regulatorischen Immunphänotyp induzieren und intestinale Entzündungen reduzieren. Auf dieser Grundlage haben wir eine randomisierte, placebokontrollierte, doppelblinde klinische Studie zur sequenziellen Therapie mit Antibiotika, Probiotika und Tryptophan initiiert. Wir haben das Ziel, die Wirkmechanismen der mikrobiota-vermittelten Immunmodulation bei Pouchitis zu entschlüsseln und diese als mikrobiom-unabhängige Therapie für die Behandlung von Pouchitis und anderen entzündlichen Darmerkrankungen nutzbar zu machen. Dazu sollen Proben aus der Humanstudie longitudinal analysiert und die Wirkung aktiver Tryptophanmetabolite an patientenspezifischen intestinalen Organoiden und intestinalen T-Zellen untersucht werden.

Stand der Forschung

Die chirurgische Anlage eines Ileumpouchs ist ein wichtiger Baustein in der Behandlung von Menschen mit schwerer Colitis ulcerosa (CU) oder Kolonkarzinom. Nach einer Kolektomie bedeutet die Anlage eines Ileumpouchs als Reservoir für Stuhl eine erhebliche Verbesserung der Lebensqualität. Leider entwickeln bis zu 50 % der Betroffenen eine Pouchitis – eine chronische Entzündung der Mukosa des Pouches. Die Ätiopathogenese der Pouchitis ist bislang unklar, doch ähnlich wie bei CU spielt eine unkontrollierte Immunantwort, ausgelöst durch eine Veränderung der intestinalen Mikrobiota, eine zentrale Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion.

Die Behandlung von Menschen mit Pouchitis ist eine große klinische Herausforderung, da eine Linderung der Entzündung oft nur durch die wiederholte Gabe von Antibiotika zu erreichen ist. Trotz dieser Therapien kommt es jedoch häufig zu Rückfällen, und die repetitiven Antibiotikagaben fördern langfristig die Entwicklung antimikrobieller Resistenzen (1). Daher besteht ein dringender Bedarf an neuartigen therapeutischen Ansätzen.

Die intestinale Mikrobiota besteht aus verschiedenen Bakterien, Viren und Pilzen, die Bestandteile der Nahrung des Wirts verstoffwechseln. In den letzten Jahrzehnten wurde zunehmend deutlich, dass die Mikrobiota ein entscheidender Regulator der immunologischen Homöostase ist. So haben Studien gezeigt, dass die Mikrobiota die Entwicklung und Funktion von Immunzellen sowohl direkt als auch indirekt über die Sekretion aktiver Metaboliten beeinflussen kann. Die Zusammensetzung der Mikrobiota ist jedoch hochindividuell, und eine gezielte, langfristige Modulation ist zum aktuellen Zeitpunkt kaum möglich (2-4). Die hohe Wirksamkeit der Antibiotikabehandlung bei Menschen mit Pouchitis lässt jedoch vermuten, dass die Mikrobiom-Metabolit-Immunsystem-Achse bei Entzündungen der Darmschleimhaut ein außergewöhnliches therapeutisches Potenzial bietet.

Wir haben daher das Ziel, die Wirkmechanismen der mikrobiota-vermittelten Immunmodulation bei Pouchitis zu entschlüsseln und sie als mikrobiomunabhängige Therapie zur Behandlung von Pouchitis und anderen entzündlichen Darmerkrankungen nutzbar zu machen..

Vorarbeiten

Unsere präliminären Daten aus Mausmodellen zeigen, dass – wie auch in der klinischen Praxis – durch eine Behandlung mit Antibiotika eine Remission bei pouchitis-ähnlicher intestinaler Inflammation erreicht werden kann (Abb. 1A–B). Der protektive Effekt der Antibiotikatherapie war mit einer Veränderung der

Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota assoziiert. Dabei zeigten sich vermehrt nützliche Bakterien wie Bifidobacterium- und Lactobacillus-Spezies, während pathogene Spezies wie Helicobacter spp. abnahmen (Abb. 1C).

Interessanterweise veränderte sich auch das metabolische Profil der Darmbakterien – insbesondere Indol-3-propionsäure (indole-3-propionic acid, 3-IPA) war nach der antibiotischen Therapie erhöht (Abb. 1D). 3-IPA ist ein aktiver Tryptophanmetabolit, der von der intestinalen Mikrobiota freigesetzt wird. Sowohl von 3-IPA als auch von anderen Tryptophanderivaten ist bekannt, dass sie immunmodulatorische Effekte haben. Bemerkenswerterweise zeigen Studien, dass Tryptophanmetabolite auch bei Menschen mit aktiver CU erniedrigt sind, was auf ein antiinflammatorisches Potenzial aktiver Tryptophanmetabolite auch bei dieser Erkrankung hindeutet. (5).

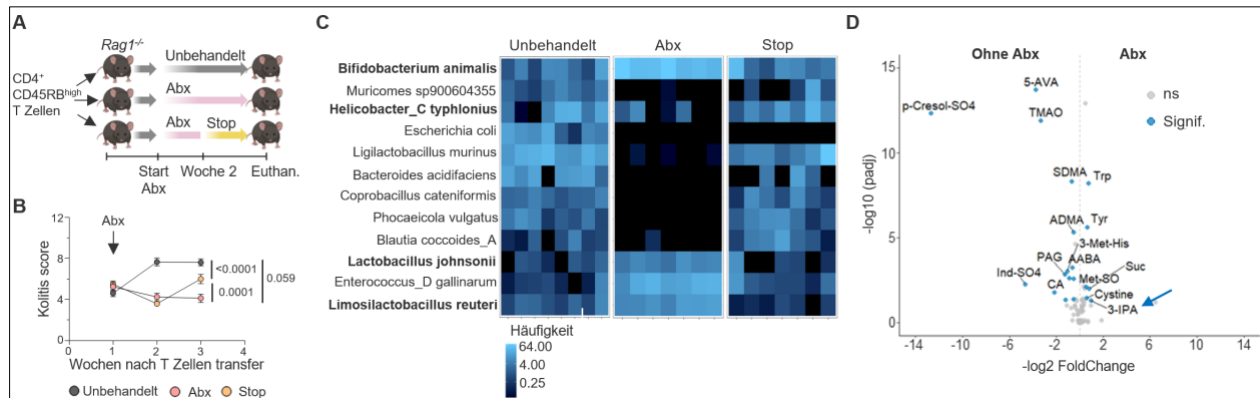


Abbildung 1. A) Versuchsaufbau: Mäuse ohne B und T Zellen erhalten naive („CD45RB^{high}“) CD4⁺ T Zellen, ohne Behandlung entwickeln diese eine spontane Darmentzündung. Es werden entweder im gesamten, oder in Teilen des Zeitverlaufs Antibiotika verabreicht. B) Endoskopischer Kolitis-Score im Verlauf der T Zell Transfer Kolitis, ein höherer Score reflektiert vermehrte intestinale Entzündung. C) Zusammensetzung des Mikrobioms der Gruppen ermittelt über 16s RNA Analysen. D) Vergleich der Menge von Metaboliten im Stuhl von Mäusen mit- und ohne Antibiotikabehandlung während der Kolitis, ermittelt über Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie.

Weiterhin fanden wir heraus, dass die Supplementierung mit 3-IPA zu einer anhaltenden, antibiotikafreien Remission bei Mäusen führte (Abb. 2A–B). Dieser schützende Effekt ging mit einer verringerten Frequenz von Th17-Effektorzellen sowie einer Zunahme regulatorischer Foxp3⁺ T Zellen (Treg-Zellen) im Kolon einher (Abb. 2C). Wir gehen daher davon aus, dass diese sequenzielle Behandlung mit Antibiotika und Probiotika die Etablierung einer intestinalen Mikrobiota ermöglicht, die über die Fähigkeit zum Tryptophanmetabolismus verfügt. Durch die Bereitstellung von Tryptophan kann so die Produktion von Metaboliten gefördert werden, die eine Remission aufrechterhalten (Abb. 3A–B).

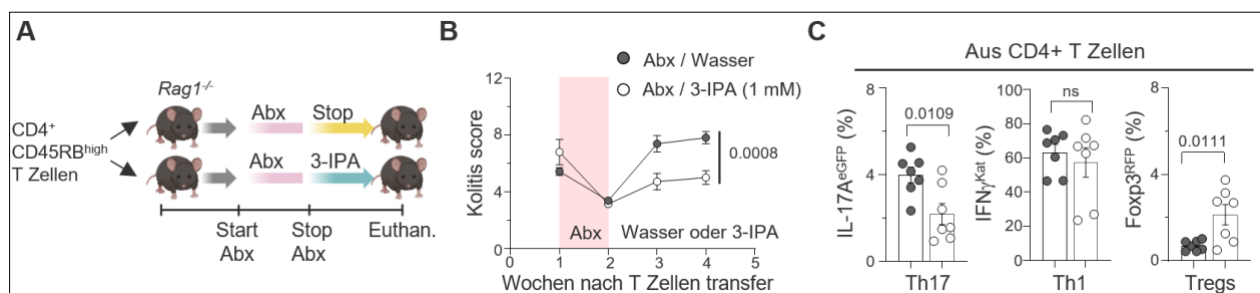


Abbildung 2 A) Versuchsaufbau: Mäuse ohne B und T Zellen erhalten naive („CD45RB^{high}“) CD4⁺ T Zellen, ohne Behandlung entwickeln diese eine spontane Darmentzündung. Es wird über einen Teil der Zeit Antibiotika verabreicht, im Anschluss erfolgt in einer Gruppe die Gabe von 3-IPA. Endoskopischer Kolitis-Score im Verlauf der T Zell Transfer Kolitis, ein höherer Score reflektiert vermehrte intestinale Entzündung. C) Anteil verschiedener CD4⁺ T Zell Populationen im Kolon der Mäuse am Ende des Experiments. Es wird die Frequenz proinflammatorische Th17 und Th1, sowie regulatorische Treg Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

Basierend auf diesen Daten entwickelten wir eine placebokontrollierte, doppelblinde, randomisierte Studie mit dem Titel “TryProPouch” (NCT06861140). Hierbei handelt es sich um die erste klinische Studie, die eine sequenzielle therapeutische Strategie mit **1)** kurzzeitiger Antibiotikabehandlung zur Depletion von pro-inflammatorischen Bakterien **2)** einem Mikrobiom-Cocktail zur Repopulation des Magen-Darm-Traktes mit nützlichen Bakterienspezies und **3)** Supplementierung von tryptophanhaltigen Kapseln bei Menschen mit aktiver Pouchitis evaluiert (Abb. 3A).

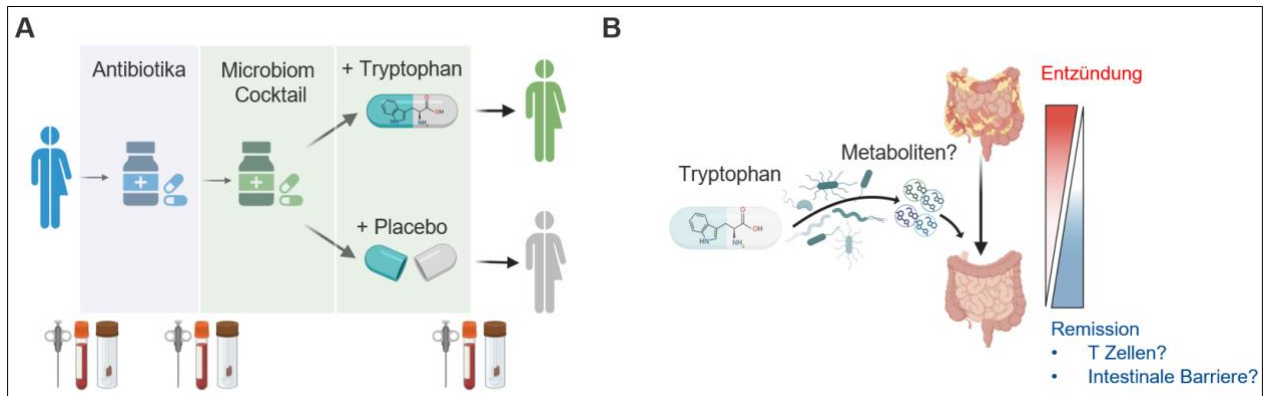


Abbildung. 3. A) Studiendesign der randomisierten kontrollierten, doppelblinden Studie TryProPouch, Menschen mit Pouchitis erhalten eine sequenzielle Therapie mit Antibiotika und Probiotika, es wird Tryptophan oder Placebo supplementiert (NCT06861140). Endoskopische Biopsien, Blut- und Stuhlproben werden entnommen. B) Graphischer Abstract: Wir vermuten, dass die Metabolisierung von Tryptophan durch die intestinale Mikrobiota zu therapeutisch wirksamen, aktiven Tryptophanmetaboliten führt.

Da die intestinale Mikrobiota eine Vielzahl von Metaboliten aus der Aminosäure Tryptophan erzeugen kann, sind die spezifischen immunmodulierenden Effekte von 3-Indolpropionsäure (3-IPA) und anderen tryptophanbasierten Verbindungen bislang nicht vollständig verstanden. Weiterhin ist die untersuchte Behandlungsstrategie dadurch limitiert, dass weiterhin Antibiotika verabreicht werden müssen, deren Effekte auf die Mikrobiota interindividuell stark schwanken. Wir möchten deshalb die beschriebene Behandlungsstrategie weiterentwickeln, um langfristig eine Mikrobiom-unabhängige Behandlungsstrategie etablieren zu können.

Ziel unserer Untersuchungen ist es daher, Blut- und Stuhlproben aus der TryProPouch-Studie zu analysieren, um therapeutisch wirksame Tryptophanmetabolite zu identifizieren – darunter auch 3-IPA. Das placebokontrollierte Studiendesign ermöglicht es, interventionsspezifische Veränderungen in der Zusammensetzung und Funktion der Mikrobiota zu erkennen. Diese Arbeit soll somit die Grundlage für zukünftige klinische Interventionsstudien schaffen, bei denen gezielt mikrobielle Metaboliten anstelle von Tryptophan eingesetzt werden, um Remissionen bei Menschen mit Pouchitis und möglicherweise auch CU aufrechtzuerhalten (Abb. 3B).

Projektziele und Forschungshypothesen

Wir stellen die Hypothese auf, dass die therapeutische Anwendung eines oder mehrerer aktiver Tryptophanmetabolite ausreicht, um nach dem Absetzen von Antibiotika eine Remission bei Pouchitis aufrechtzuerhalten. Um dies zu untersuchen, haben wir folgende Ziele definiert:

- 1) Longitudinale Analyse von Proben aus der TryProPouch-Studie zur Identifikation potenziell therapeutisch wirksamer **Tryptophanmetabolite** der Mikrobiota
- 2) Untersuchung der Wirkung der identifizierten Metabolite auf **intestinale Organoide** generiert aus endoskopischen Biopsien von Patient*innen mit Pouchitis oder Colitis ulcerosa, sowie auf das Immunprofil **intestinaler T Zellen**.

Unser langfristiges Ziel ist es, eine Metabolit-basierte, mikrobiota-unabhängige Therapie zu entwickeln, die eine Krankheitsremission bei Patienten mit intestinaler Entzündung aufrechterhalten kann.

Arbeitsprogramm mit Meilensteinen

Studien zeigen, dass Metabolite der Mikrobiota sowohl auf das intestinale Epithel als auch auf das T Zell-Kompartiment wirken können. Außerdem zeigte sich, dass es verschiedene aktive Tryptophanmetabolite gibt. Aus den humanen Daten der TryProPouch-Studie wollen wir potenziell therapeutisch wirksame, aktive Tryptophanmetaboliten identifizieren und deren mechanistische Relevanz an patientenspezifischen intestinalen Organoiden und T Zellen *in vitro* untersuchen.

Arbeitspaket 1: Identifikation von aktiven Tryptophanmetaboliten.

Zur Identifikation von potenziell therapeutisch wirksamer aktiver Tryptophanmetaboliten wird das Metabolitenprofil der Mikrobiota der TryProPouch-Teilnehmenden mit Hilfe von Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie charakterisiert. Diese Art der Metabolomic Analyse ist bereits etabliert (6). Wir werden relevante Metabolite sowohl unsupervidiert als auch supervidiert auswählen. Bei den supervidierten Analysen sollen insbesondere die gut beschriebenen Substrate des Tryptophan-Stoffwechsels untersucht werden (7). Die Kandidaten aktiver Tryptophanmetabolite werden auf Grundlage ihrer Korrelation mit der klinischen Verbesserung und der Dauer der Reission für weitere Analysen priorisiert.

Meilenstein 1: Bewertung der Wirkung und des therapeutischen Effekts der sequenziellen Therapie mit Antibiotika und Probiotika mit/ohne Supplementation von Tryptophan bei Menschen mit Pouchitis.

Meilenstein 2: Untersuchung der Unterschiede in der Zusammensetzung der Mikrobiota und des Metabolitenprofils von mit Placebo und Tryptophan behandelten Patient*innen

Meilenstein 3: Abschluss der Auswahl potenzieller Metaboliten durch Korrelation der Metabolit-Kandidaten mit dem klinischen Ansprechen.

Arbeitspaket 2: Präklinische Untersuchung der Wirkung identifizierter Metabolite auf intestinale Organoide und T Zellen, die aus endoskopisch entnommenen Biopsien von Patient*innen mit Pouchitis oder Colitis ulcerosa generiert wurden.

Die Wirkung der aktiven Tryptophanmetabolite auf das intestinale Epithel wird unter Verwendung von patientenabgeleiteten intestinalen Organoiden von Personen mit Pouchitis und Colitis ulcerosa untersucht. Patientenspezifische intestinale Organoide werden generiert und in Anwesenheit/Abwesenheit der aktiven Tryptophanmetabolite stimuliert. Die Proliferation wird durch Immunfluoreszenzmikroskopie erfasst und ein FITC-Dextran-Assay wird zur Beschreibung der Barrierefunktion des intestinalen Epithels der patientenspezifischen Organoide eingesetzt.

Zur Bewertung der Wirkung der Metaboliten auf T Zellen isolieren wir intestinale mononukleäre Zellen von Patient*innen mit Pouchitis und Colitis ulcerosa und führen Differenzierungsassays in Anwesenheit/Abwesenheit der potenziell aktiven Metabolite durch. Im Anschluss wird die Expression verschiedener Zytokine mittels Durchflusszytometrie analysiert. Zusätzlich werden wir die T Zellen unter verschiedenen pro- und antiinflammatorischen Bedingungen entweder alleine oder in Kombination mit den patientenspezifischen Organoiden co-kultivieren, um die Interaktionen zwischen Epithel und T Zellen *in vitro* zu untersuchen.

Meilenstein 4: Beschreibung der Wirkung einzelner und/oder kombinierter aktiver Tryptophanmetaboliten auf patientenspezifische intestinale Organoide und intestinale T Zellen.

Meilenstein 5: Abschluss der Identifikation aktiver Tryptophanmetaboliten mit therapeutischem Potenzial zur weiteren Evaluation in zukünftigen klinischen Studien.

Voraussichtliche Dauer

Das hier vorgestellte Arbeitsprogramm soll nach 18 Monaten abgeschlossen sein.

Literatur

1. Shen B, Kochhar GS, Rubin DT, et al.: Treatment of pouchitis, Crohn's disease, cuffitis, and other inflammatory disorders of the pouch: consensus guidelines from the International Ileal Pouch Consortium. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2022; 7: 69-95.
2. Atarashi K, Tanoue T, Shima T, et al.: Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* 2011; 331: 337-41.
3. Siracusa F, Schaltenberg N, Kumar Y, et al.: Short-term dietary changes can result in mucosal and systemic immune depression. *Nat Immunol* 2023; 24: 1473-86.
4. Singh R, Chandrashekharappa S, Bodduluri SR, et al.: Enhancement of the gut barrier integrity by a microbial metabolite through the Nrf2 pathway. *Nature Communications* 2019; 10: 89.
5. Sathyaikumar KV, Blanco-Ayala T, Zheng Y, et al.: The Tryptophan Metabolite Indole-3-Propionic Acid Raises Kynurenic Acid Levels in the Rat Brain In Vivo. *Int J Tryptophan Res* 2024; 17: 11786469241262876.
6. Tintelnot J, Xu Y, Lesker TR, et al.: Microbiota-derived 3-IAA influences chemotherapy efficacy in pancreatic cancer. *Nature* 2023; 615: 168-74.
7. Agus A, Planchais J, Sokol H: Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. *Cell Host Microbe* 2018; 23: 716-24.