

Zwischenbericht

Diätetische Beeinflussung des Darm-Mikrobiomes bei der Parkinson Krankheit

Dr. Janis Rebecca Bedarf, Neurologische Klinik, Universitätsklinikum Bonn

1. Hintergrund:

Traditionell wird die Parkinson Erkrankung (PD) als eine Krankheit des Gehirns betrachtet. In den letzten Jahren haben sich allerdings die Anzeichen verdichtet, dass der Verdauungstrakt bereits betroffen sein könnte, noch bevor Störungen in den (dopaminergen) Nervenzellen des Gehirns auftreten. Es besteht eine vielgestaltige und wechselseitige Kommunikation zwischen dem zentralen und dem peripheren/enterischen Nervensystem (sog. Darm-Hirn-Achse), so dass Veränderungen im Mikrobiom des Darmes, also dessen bakterieller Besiedelung, auch Einfluss auf Erkrankungen des zentralen Nervensystems nehmen können (Collins 2012, Grenham 2011, Furness 2012).

Wir konnten in Zusammenarbeit mit Forschern des EMBL in Heidelberg (EMBL) zeigen, dass tatsächlich schon in sehr frühen Phasen der PD die Zusammensetzung des Dickdarm-Mikrobioms verändert ist (Bedarf und Hildebrand 2017, Bedarf 2019). Welche Rolle die Ernährung dabei spielt, ist bislang noch unzureichend untersucht (Cucca 2014, Gao 2007, Chung 2016, Sonnenburg 2016). Es zeichnet sich jedoch ab, dass insbesondere kurzkettige Fettsäuren (SCFAs), zu deren Hauptvertretern im menschlichen Dickdarm Propionat, Butyrat und Acetat gehören, bei der PD eine relevante Rolle spielen könnten: Untersuchungen von Stuhlproben an PD erkrankter Individuen ergaben neben einem verminderten Gehalt an Butyrat-produzierenden Bakterien (Kesharvarzian 2015) auch geringere Mengen an SCFAs (Unger 2016), in deren Folge eine gestörte Darmpermeabilität sowie ein Ungleichgewicht zu Ungunsten anti-entzündlicher Darmbakterien angenommen wird (Soret 2010, Ganapathy 2013, Singh 2014). Da SCFAs Fermentationsprodukte mit der Nahrung aufgenommener Fasern/Ballaststoffe sind, könnte eine diätetische Beeinflussung der mit den SCFAs assoziierten Stoffwechselwege/Regulationssysteme auch symptomatische Wirkung entfalten. Schon kurzfristige Ernährungsumstellungen können sich bereits moderat auf den SCFA Gehalt sowie Immunfunktion des Dickdarmes gesunder Probanden auswirken (Vanegas 2017, David 2014).

Unserer Hypothese nach weisen PD Patienten a priori einen niedrigeren Gehalt an SCFA im Stuhl auf. Der Gehalt an SCFA wird durch Stimulation der entsprechenden Schlüsselspezies durch Diät gesteigert. PD Patienten weisen im Gegensatz zu Gesunden keinen bzw. einen geringeren Anstieg der SCFA durch Diät auf, da entsprechende Schlüsselspezies fehlen.

2. Methodik:

Im Rahmen eines individuellen Heilversuches haben wir 10 Paare, bestehend aus einem an PD erkrankten und einem gesunden/nicht an PD erkrankten Partner einer gemeinsamen, 4 - wöchigen Diät unterzogen: nämlich der regelmäßigen Einnahme von Lactulose (PD: 2x10g/15 ml pro Tag, Nicht-PD: 1x10g/15ml pro Tag; Bourassa 2016) in Kombination mit einer faser- und ballaststoffreichen Nahrung (Fernandez-Navarro, Rahat-Rozenbloom, Robertson). Vor und nach Diät wurden Stuhl- und Urinproben gesammelt. Aus Urin und Stuhl erfolgte die Analyse des Metabolomes (non-targeted, NMR, Kooperation mit dem Helmholtz Zentrum München, Dr. Silke Heinzmann). Mittels metagenomischer Sequenzierung bestimmten wir die Zusammensetzung des Mikrobiomes und dessen Funktionen (Kooperation mit dem Quadram Institute Bioscience, Norwich, UK, Dr. Falk Hildebrand). Darüber hinaus führten wir die direkte Bestimmung von SCFA im Stuhl durch (targeted, Gas-Chromatografie, Labor Ganzimmun, Mainz) durch. Zusätzlich erfolgte eine Kontrolle von Routineparametern im peripheren Blut vor und nach Diät (Zentrallabor Universitätsklinikum Bonn).

3. Ergebnisse:

Kohorte:

	Gesamt	PD	CO
Alter [Jahre]	62,7	65,0	61,2
Geschlecht [w/m]	10/10	3/7	7/3
Nikotin [ja/früher/nie]	0/13/8	0/5/5	0/7/3
Antibiotika [Ja/nein]	1/19	0/10	1/9
Diät [vegan/vegetarisch/omnivor]	0/0/20	0/0/10	0/0/10
Probiotika [ja/nein/manchmal]	2/17/1	0/9/1	2/8/0
Levodopa [ja/nein]	--	6/4	0/0
Dopaminagonist [ja/nein]	--	9/1	0/0

Es wurden 11 Paare in die Studie rekrutiert. 1 Paar verließ die Studie vorzeitig (drop out), wobei der Baseline-Zeitpunkt in die folgenden Analysen mit einbezogen wurde. Ein Patient hatte innerhalb der letzten 3 Monate Antibiotika eingenommen. Vor der Studienteilnahme gaben alle Probanden eine omnivore Diät an. Die reguläre Einnahme von Probiotika wurde von 2 Probanden aus der gesunden Kontrollgruppe bejaht, 1 PD Patient gab an, manchmal Probiotika zu konsumieren. Innerhalb der PD Gruppe waren nahezu alle Patienten mit einem Dopaminagonisten behandelt, wohingegen knapp mehr als die Hälfte zusätzlich Levodopa einnahmen.

Primäre Ziele:

- Messung der SCFA Konzentration im Stuhl vor und nach Diät

Die Ausgangskonzentrationen der SCFA unterschieden sich zwischen PD und Kontrollen nicht signifikant, es ergab sich jedoch ein Trend zu niedrigeren a priori Konzentrationen von Acetat, Propionat und Butyrat in PD Patienten gegenüber den gesunden Kontrollen. Nach der Diät wurde ebenfalls kein Signifikanzniveau erreicht zwischen den Studiengruppen (z.B. für Propionat und Butyrat).

Abb. 1, SCFA

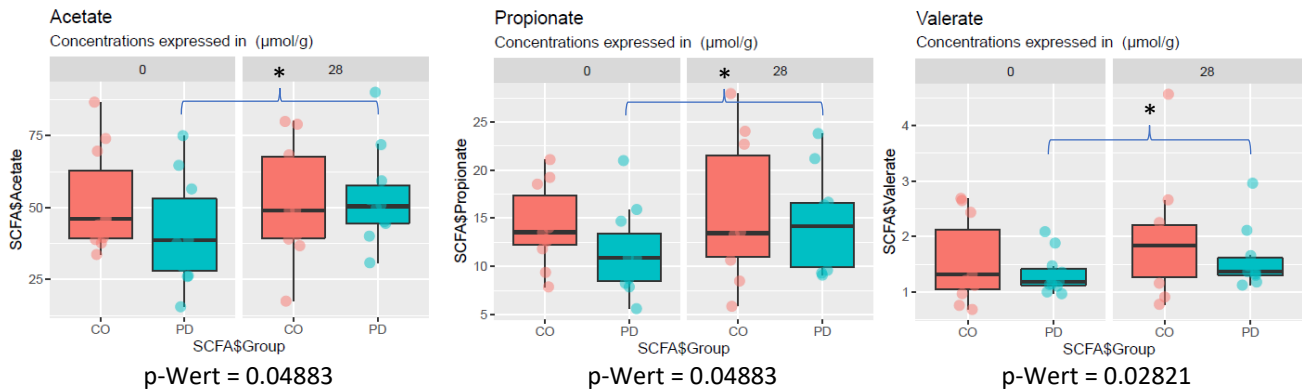
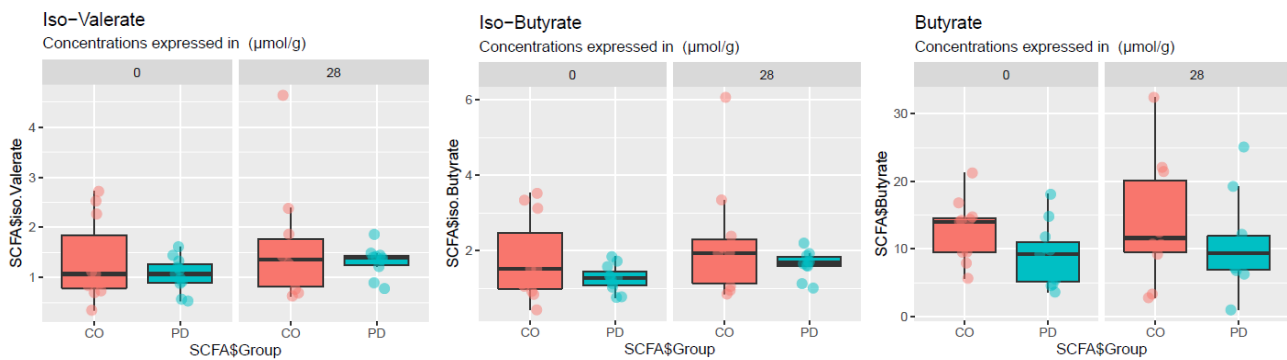


Abb. 1b, SCFA



Konzentrationen der kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) und ihrer Isoformen im Stuhl in µmol/g; CO: gesunde Kontrolle, PD: Parkinson; 0: vor Diät; 28: nach Diät. *: $p < 0.05$

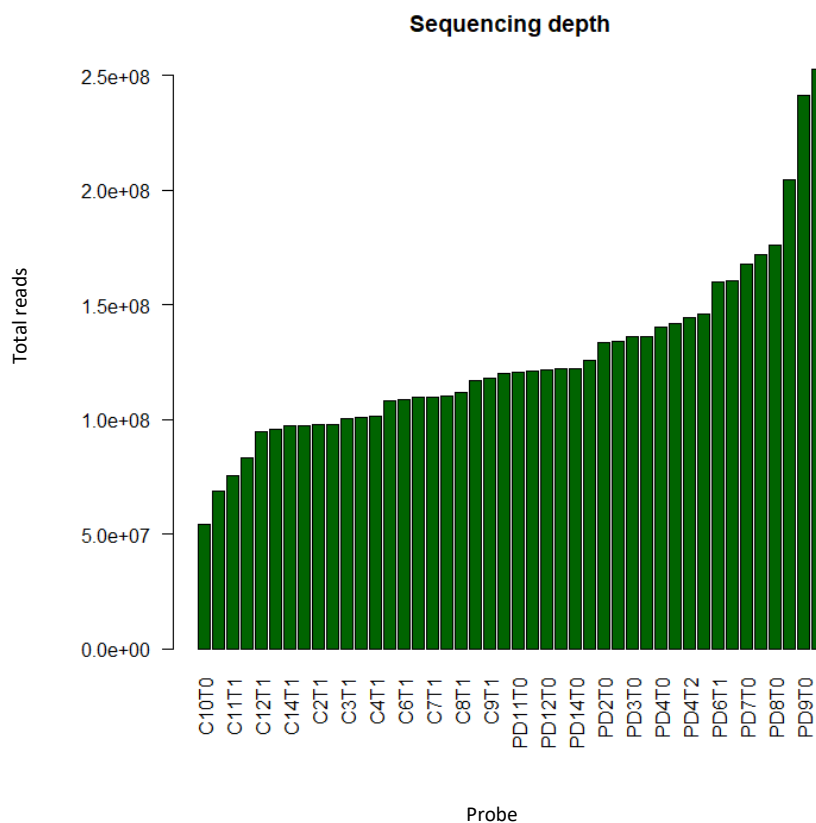
Durch die Diät-Intervention ließen sich entgegen unserer initialen Hypothese die Konzentrationen von Acetat, Propionat und Valerat im Stuhl zumindest im PD Patienten signifikant gegenüber dem Ausgangsniveau zu erhöhen (Abb. 1a). Unverändert blieben in PD Patienten die Konzentrationen von Iso-Valerat und Butyrat, wobei sich ein positiver Trend für Iso-Butyrat ergab ($p = 0.06$).

Für die Kontrollgruppe ließ sich kein signifikanter Effekt der Diät-Intervention auf die SCFA nachweisen, allerdings fand sich für einige SCFA post-interventionell eine größere Ergebnisstreuung nach der Diät, was einen positiven Effekt zumindest in einigen Individuen vermuten lässt.

- Metagenomische Sequenzierung der Stuhlproben/Mikrobiomanalyse vor und nach Diät

Die mittlere Sequenzierungstiefe über alle Proben betrug 126.293.951 reads/Probe. Die durchschnittliche N50 des Assembly beträgt 5580. Aus diesen assemblies konnten wir insgesamt 1354 MAGs (Metagenomisch assemblierte Genome) rekonstruieren, die jeweils ein Spezies Genom darstellen. Diese waren im Durchschnitt 2463703 bp lang, eine erwartete Groesse von bakteriellen Genomen; die Qualität lag bei diesen bei > 80% Vollständigkeit und <5% Kontamination.

Abb. 2, Sequenzierungstiefe



Sequenzierungstiefe in reads pro Probe aller untersuchten Proben; PD: Parkinson; CO: Kontrolle; T0: vor Diät; T1: nach Diät

Probentaxonomie:

Abb. 3, Taxonomische Zusammensetzung

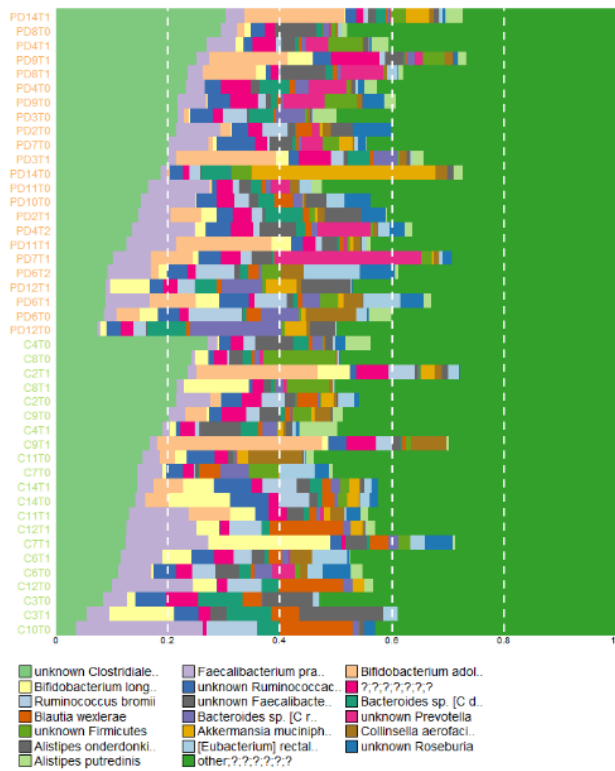


Abb. 3

Taxonomische Zusammensetzung aller Proben auf Spezies Ebene (relative Abundanz); Farben repräsentieren die unterschiedlichen Spezies in unserem Datensatz, in der Legende geordnet von höchster zu niedrigster Abundanz. PD: Parkinson; CO: gesunde Kontrolle; T0: vor Diät; T1: nach Diät; ?: nicht klassifiziert

Abb. 4, Taxonomie auf Klassen-Ebene

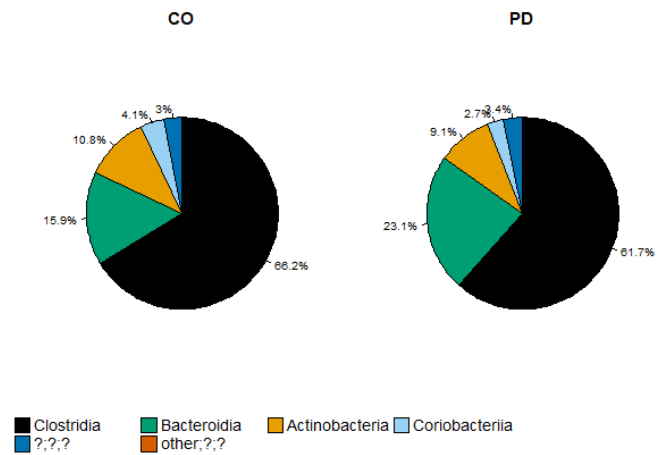
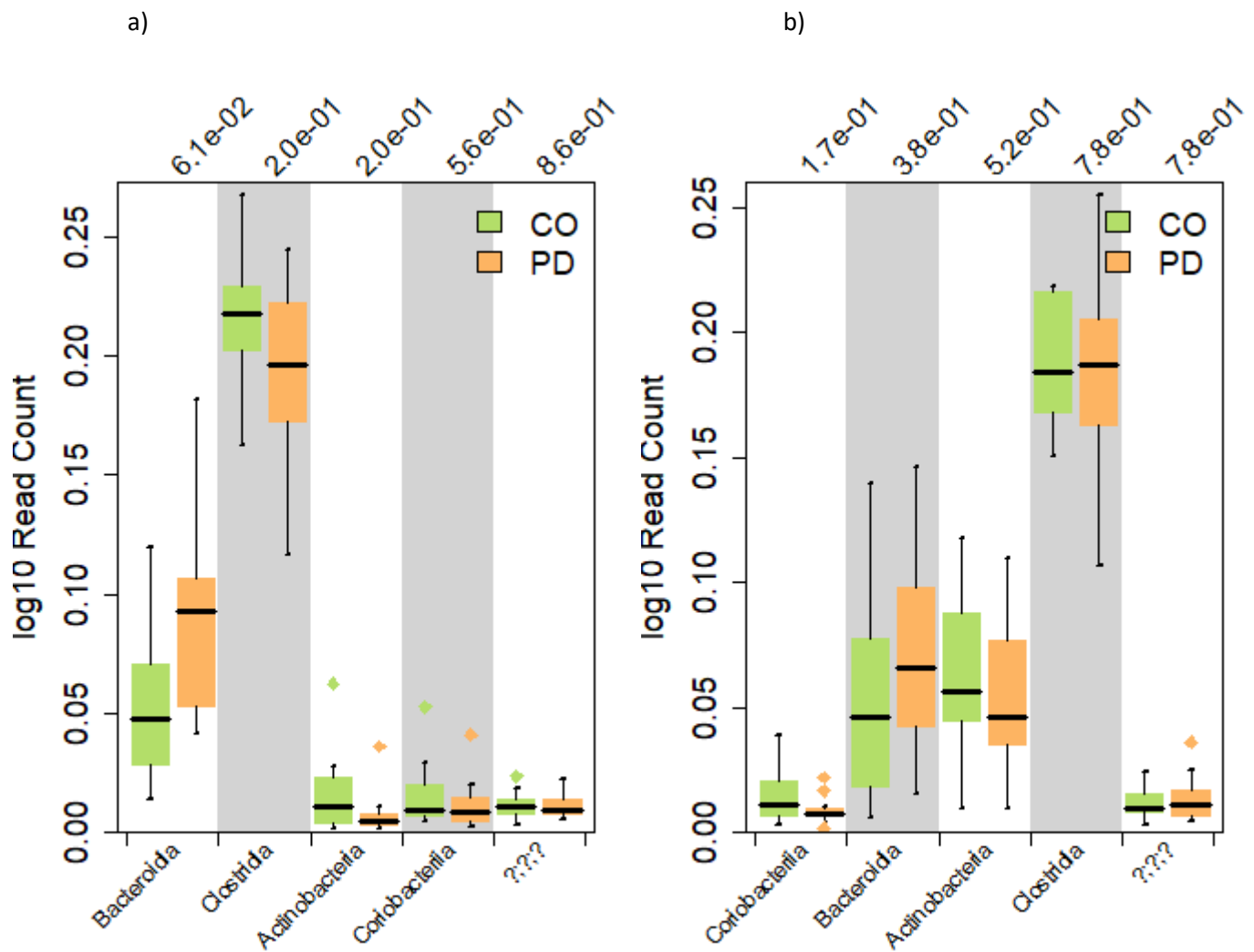


Abb. 4

Zusammensetzung des Darmmikrobioms nach Bakterienklassen; CO: Kontrolle; PD: Parkinson; ?: nicht klassifiziert

Mit Hilfe der metagenomischen Sequenzierungsdaten lässt sich die taxonomische bakterielle Zusammensetzung der einzelnen Proben bestimmen. Auffallend häufig vorhanden waren die zum Phylum Firmicutes gehörigen Spezies, insbesondere Faecalibacterium prausnitzii, Ruminococcus bromii und Blautia wexlerae (Abb. 3). Die am weitesten verbreitete Klasse waren Clostridien (Abb. 4).

Abb. 5, Taxonomische Unterschiede zwischen den Studiengruppen vor und nach Diät

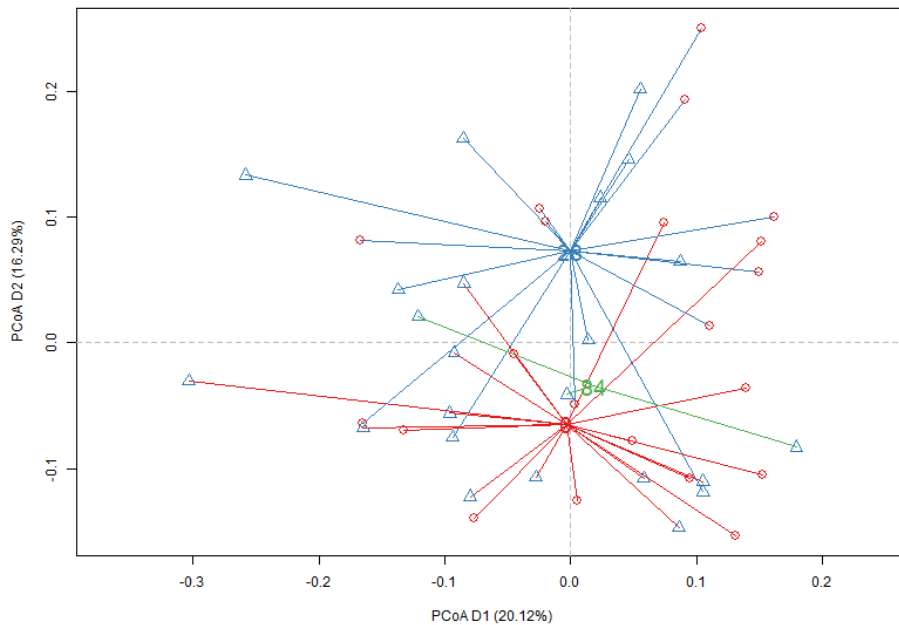


Bakterielle Abundanzen auf Klassenebene in der Parkinson- (PD) und Kontroll-Gruppe (CO) vor und nach Diät-Intervention; ?; ?; ?; unklassifiziert. Logarithmische Skalierung auf der y-Achse.

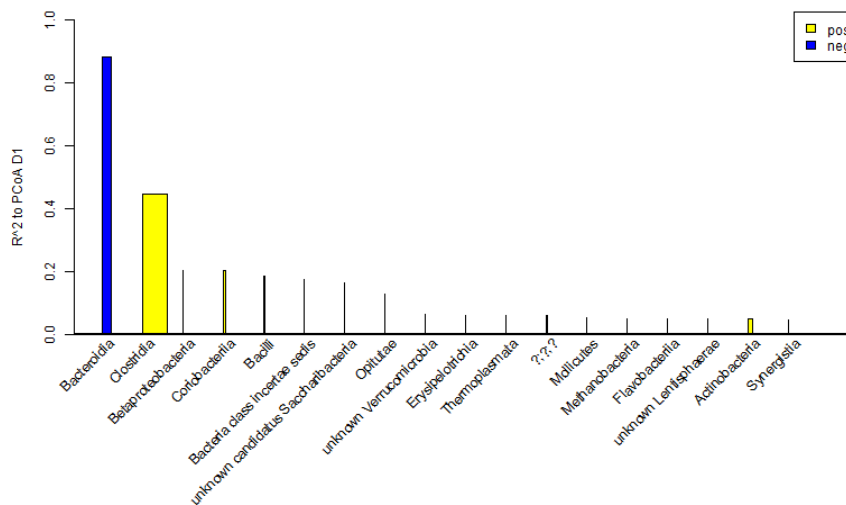
Interessanterweise zeigen sich die vor der Diät-Intervention auffälligen taxonomischen Unterschiede (a) zwischen den PD und Kontroll-Probanden nach der Diät (b) weniger ausgeprägt. In beiden Gruppen kam es zu einer Zunahme von Actinobakterien nach der Diät. Die PD-Patienten zeigten nach der Diät eine geringere Abundanz von Bacteroida bei unveränderten Clostridien, die sich jedoch in der Kontrollgruppe durch die Diät verminderten. Weitere Analysen zur genaueren taxonomischen Auflösung auf z.B. Genus- und Spezies-Ebene stehen noch aus.

Abb. 6, PCoA (principal coordinates analysis) der mikrobiellen Zusammensetzung

a)



b)



PCoA, a) rote Punkte: Kontrolle; blaue Dreiecke: Parkinson; Rote Linien zeigen alle Proben vor Diät, blaue Linien alle Proben nach Diät, grüne Linien entsprechen 2 Parkinson Patienten, die die Intervention bis Tag 84 durchgeführt haben

Das Mikrobiom zeigt sich sowohl in den gesunden Kontrollen als auch in den Parkinson Patienten nach der Diät messbar verändert bzw. in seiner Zusammensetzung beeinflusst (Abb. 6a). D.h. bereits die 4-wöchige Diät ist in der Lage, mikrobielle Änderungen zu induzieren (Analysen des bakteriellen Stoffwechsels und Korrelationen mit den gemessenen Metaboliten im Stuhl und Urin stehen derzeit noch aus).

Die nachweisbaren Veränderungen können durch eine Verringerung in Bacteroida und eine Erhöhung von Clostridien erklärt werden, basierend auf der Analyse der bakteriellen Klassen (Abb. 6b und Abb. 5).

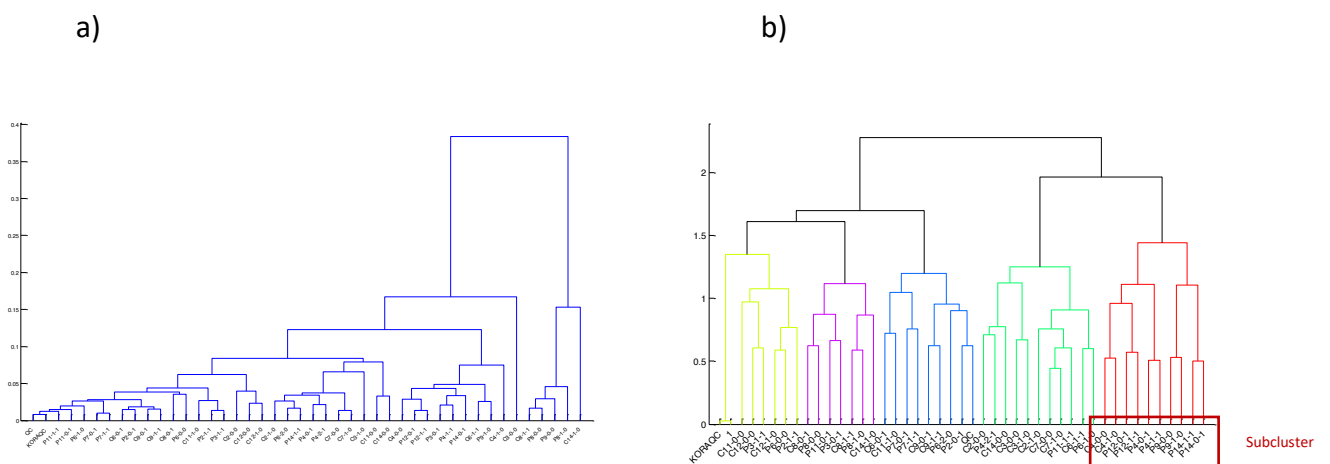
- Analyse des Stuhl- und Urinmetabolomes vor und nach Diät

Es wurden insgesamt 847 Metabolite im Urin gemessen, von denen 441 annotiert werden konnten (überwiegend durch mehrere NMR Shifts repräsentiert). In einer ersten groben statistischen Testung ergaben sich a priori keine Unterschiede zwischen PD und den gesunden Kontrollen, ebenfalls nicht innerhalb der Gruppen zu den verschiedenen Zeitpunkten.

Im Stuhl konnten 43 Metabolite annotiert werden, wohingegen 44 nicht annotiert wurden und 43 unbekannt blieben.

Weitere Analysen, insbesondere Korrelationen mit den metagenomischen Daten stehen noch aus.

Abb 7, Hierarchische Cluster-Analyse (HCA) im Urin

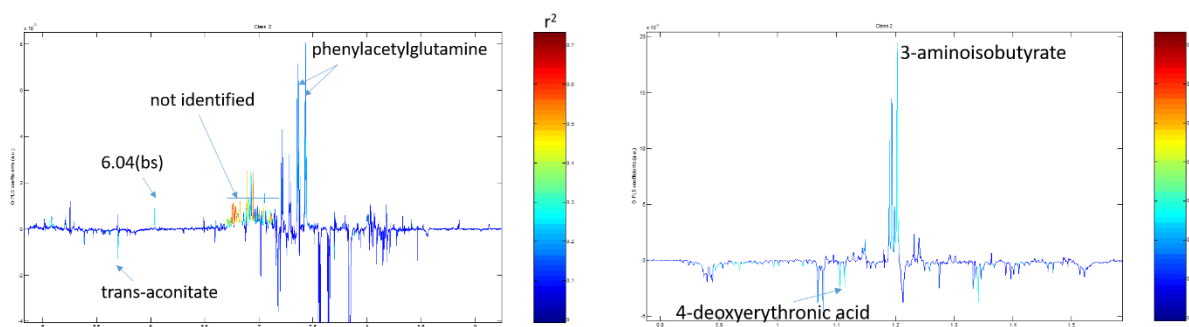


Hierarchische Cluster Analyse (HCA) des Urin-Metabolomes. CO: Kontrolle; PD: Parkinson; 0: vor Diät; 1: nach Diät.

In der HCA aller Samples zeigt sich zunächst kein Clustering innerhalb der PD oder Kontroll-Proben (Abb. 7a). In einem reduzierten und transformierten Datensatz findet sich jedoch ein interessanter Sub-Cluster (10 Proben), bestehend aus 4 PD Patienten und einer Kontrolle,

bei der eine entzündliche Darmerkrankung in der Vergangenheit diagnostiziert wurde (Abb. 7b). Die Subgruppierung dieser Proben hat sich von den anderen Proben unterschieden durch die folgenden Metabolite (Abb. 8): 4-deoxyerythronic acid, 3-aminoisobutyrate, p-cresol-sulphate und phenylacetylglutamine, und vor allem durch eine Erhöhung eines bisher unbekanntes Metabolites, der bisher noch nicht identifiziert werden konnte. Hierbei könnte es sich z.B. um ein gemeinsames Medikament handeln.

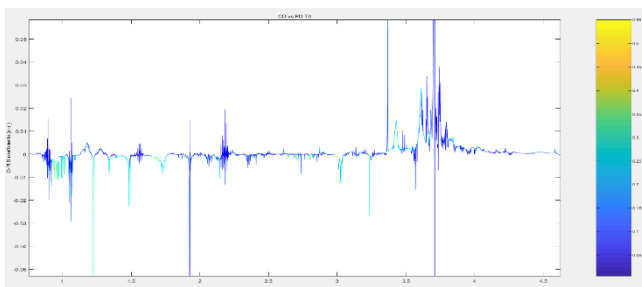
Abb. 8, OPLS-DA Analyse des Sub-Clusters im Urin



OPLS-DA: orthogonal partial least squares data analysis (Regressionsmodell) des Sub-Clusters.

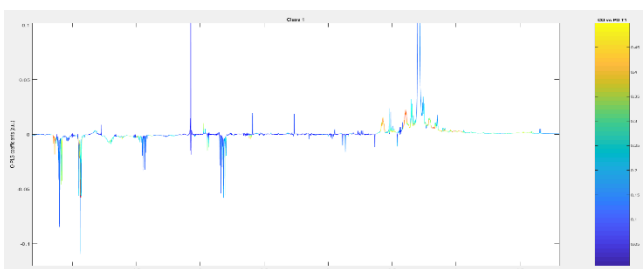
Abb. 9, OPLS-DA Analyse im Stuhl

a) vor Diät



Annotated	CO	PD
Valine	higher	
Leucine	higher	
Isoleucine	higher	
Threonine	higher	
Alanine	higher	
Methionine	higher	
Aspartate	higher	
Tyrosine	higher	
Phenylalanine	higher	
Formate	higher	

b) nach Diät



Annotated	CO	PD
Methylbutyrate	higher	
Isovalerate	higher	
Isobutyrate	higher	
Propionate	higher	

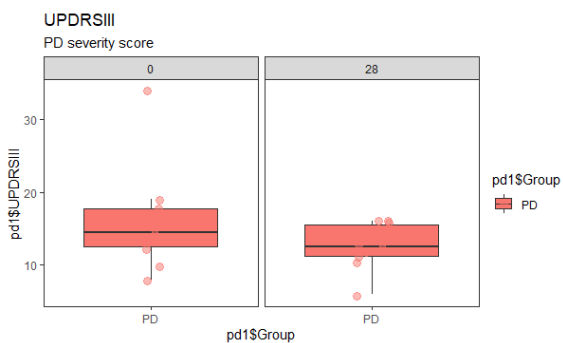
In der non-targeted NMR Bestimmung der SCFA im Stuhl erreichten die Analysen entsprechend unserer initialen Hypothese ein Signifikanzniveau mit Nachweis eines sign. stärkeren Anstieges einiger SCFA (9b) in den gesunden Kontrollen verglichen mit den PD durch die Diät. Die Unterschiede zu den targeted SCFA Bestimmungen mittels Gas-Chromatografie (s.o.) erklären sich u.U. durch die methodischen Unterschiede und werden derzeit nochmal überprüft.

Sekundäre Ziele:

- Nachweis einer Veränderung der klinischen Symptome

Es wurden verschiedene klinische Bewertungsskalen erhoben, von denen exemplarisch der UPDRS_{III} zur Abschätzung der motorischen Krankheitsschwere abgebildet ist. Weitere Skalen werden derzeit ausgewertet.

Abb. 10, UPDRS_{III}

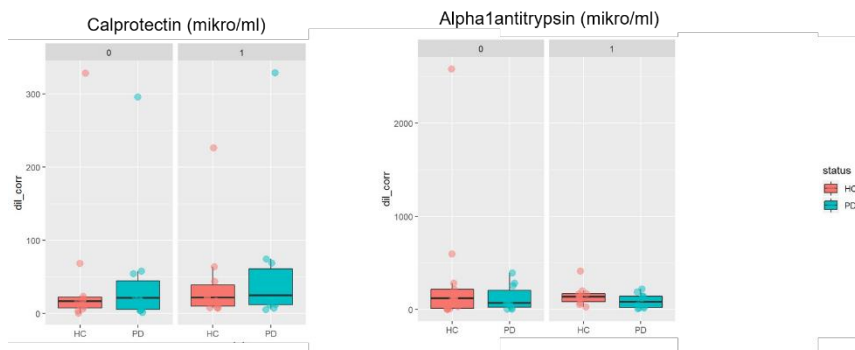


UPDRS_{III}: Unified Parkinson's Disease Rating Scale; PD: Parkinson; 0: vor Diät; 28: nach Diät.

Die Krankheitsschwere, gemessen am UPDRS_{III} Score (motorischer Teil) ergab keine signifikanten Änderungen nach der 4-wöchigen Diät-Intervention. Unklar bleibt, ob eine ggf. längerfristige Diät die motorischen Funktionen positiv modulieren könnte.

- Untersuchung von Markern für intestinale Inflammation und Permeabilität

Abb. 11, intestinale Marker

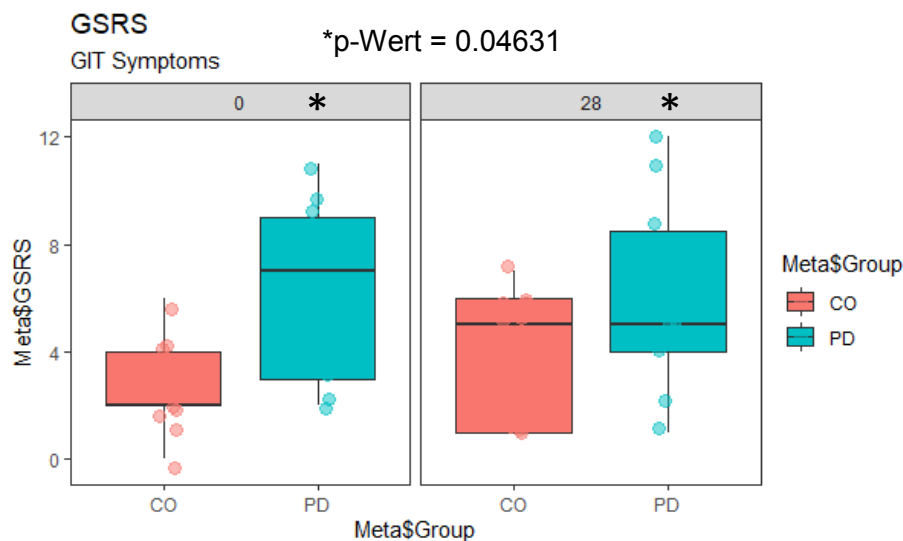


Dil_corr: Dilutionsfaktor; PD: Parkinson; HC: gesunde Kontrolle; 0: vor Diät; 1: nach Diät.

Entgegen der hierzu verfügbaren Literatur ergaben sich anhand der von uns im Stuhl bestimmten Inflammations- (Calprotectin) und Permeabilitätsmarker (Alpha1 Antitrypsin) keine a priori Unterschiede zwischen PD und gesunden Kontrollen. Auch schien der diätetische Einfluss hierauf keinen Effekt zu haben.

- Nachweis einer Veränderung in gastrointestinalen Bewertungsskalen

Abb. 12, Gastro-intestinale Symptome



PD: Parkinson; HC: gesunde Kontrolle; 0: vor Diät; 28: nach Diät

Der modifizierte GSRS (Gastro-intestinal Symptom Rating Scale) bildet 9 items der Originalskala ab (Darmgeräusche, abdomielle Distension, abgehende Winde, gesteigerte/verminderte Stuhlpassage, harte/weiche Stühle, Stuhldrang und inkomplette Entleerung). Interessanterweise zeigen sich zwischen den Studiengruppen divergente Ergebnisse; während die PD Patienten durch die Diät-Intervention (hier a. e. die Einnahme von Lactulose) eine signifikante Reduktion ($p= 0.04631$) des gastro-intestinalen Symptome aufweisen, zeigen sich für die gesunden Kontrollen in der Tendenz eher vermehrte Symptome (nicht sign.), wobei auch hier eine vermehrte Streuung auffällt.

Derzeit befinden sich tiefgreifende Analysen in der Auswertung und werden zukünftig Teil der geplanten Publikation sein. Auch testen wir derzeit verschiedene taxonomische Annotations-Systeme auf dem Datensatz. Insbesondere auf Grund der Komplexität der Integration der erhobenen Daten sind diese Analysen zeitaufwändig.

APPENDIX

Diät:

- **Anwendung von Lactulose-Sirup:**

PD: 2x10g/15 ml pro Tag, Nicht-PD: 1x10g/15ml pro Tag

Lactulose wird als Arzneimittel u.a. bei Verstopfung, die durch ballaststoffreiche Kost und andere allgemeine Maßnahmen nicht ausreichend beeinflusst werden kann, sowie bei Erkrankungen, die einen erleichterten Stuhlgang erfordern, angewandt. Beide Indikationen treffen auf die Parkinsonkrankheit zu. Darüber hinaus stellt Lactulose ein Präbiotikum dar, das vom menschlichen Organismus nicht verdaut wird, sondern von den ortsansässigen Darmbakterien abgebaut wird und zusätzlich zur Anreicherung spezifischer Darmbakterien führt.

- **Faser- und ballaststoffreiche Nahrung: mind. 5 Portionen der im Folgenden aufgeführten Nahrungsmittel/Woche sowie 2 Äpfel pro Tag oder 10 getrocknete Apfelringe/Tag**

Liste der Nahrungsmittel:

Linsen, Kartoffeln, grüne Bohnen, Haferkleie, Zwiebeln, Salat, Olivenöl, Äpfel, Bananen, Erdbeeren.

Es kamen vorwiegend Nahrungsmittel zur Anwendung, die laut aktueller Literatur die Konzentration an kurzkettigen Fettsäuren im Dickdarm erhöhen und sich somit potentiell gesundheitsfördernd und ggf. krankheitsverzögernd auswirken können. Insbesondere Nahrungsmittel, die viel Pektine, resistente Stärke, eine hohe Faserlast (v. a. Lignin), gemeinhin „Ballaststoffe“ oder auch Anthocyane enthalten, bewirken eine Erhöhung einzelner/mehrerer kurzkettiger Fettsäuren im Stuhl/Dickdarm. Bei den am häufigsten vorkommenden SCFAs (Propionat, Acetat und Butyrat) ist die Wirkung von Butyrat bisher am besten untersucht, weswegen die gewählte Diät vorwiegend eine Erhöhung des Butyrats zum Ziel hat.

Erhoffte Wirkungsweise:

Die Kombination aus Lactulose und faser- sowie ballaststoffreicher Ernährung soll zu einer Mehrproduktion an kurzkettigen Fettsäuren durch die ortsständigen Dickdarmbakterien führen bzw. das Überwiegen potentiell gesundheitsfördernder Bakterien induzieren, was nicht nur eine verbesserte Verdauungsfunktion, sondern auch einen günstigen Einfluss auf den Krankheitsverlauf zur Folge haben soll.