

INSTITUT FÜR KLINISCHE IMMUNOLOGIE, CORE FACILITY FÜR ZELLSORTIERUNG UND ZELLANALYSE

LEITERIN: PROF. DR. RER. NAT. BRIGITTE MÜLLER-HILKE, MME

DER EINFLUSS DREIER *CLOSTRIDIODES DIFFICILE*
STÄMME AUF DIE KOLLAGEN-INDUZIERTERTE
ARTHRITIS BEI DBA/1J × B10.Q F1-MÄUSEN

INAUGURALDISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DOKTOR DER MEDIZIN

VORGELEGT VON

CHRISTIAN JOHANN SCHMIDT | GEB. AM 24.01.1991 IN WEIDEN IN DER OBERPFALZ

EINGEREICHT AM 02.06.2022

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004076

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Schmidt, Christian Johann; Wenndorf, Katharina; Ebbers, Meinolf; Volzke, Johann; Müller, Michael; Strübing, Julia; Kreikemeyer Bernd und Müller-Hilke, Brigitte (2020): Infection With *Clostridioides difficile* Attenuated Collagen-Induced Arthritis in Mice and Involved Mesenteric Treg and Th2 Polarization. In: *Frontiers in immunology* 11, S. 571049. DOI: 10.3389/fimmu.2020.571049.

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Brigitte Müller-Hilke, MME

Einrichtung: AG Klinische Immunologie, Core Facility für Zellsortierung und Zellanalyse, Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Rostock

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Robert Jaster

Einrichtung: Zentrum für Innere Medizin, Abteilung für Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechselkrankheiten, Universitätsmedizin Rostock

Drittgutachter: Prof. Dr. med. Martin Fleck

Einrichtung: Klinik und Poliklinik für Rheumatologie und Klinische Immunologie, Fachkrankenhaus Bad Abbach, Lehrkrankenhaus der Universität Regensburg

Verteidigt am 22.11.2022

*„Wer sich die Kenntnis der Medizin gründlich aneignen will,
der muß folgender Dinge teilhaftig werden:
der natürlichen Anlage, des Unterrichts, und zwar von Jugend auf,
der Lust zur Arbeit, und genügender Zeit.“*

Hippokrates von Kos (460 – etwa 377 v. Chr.)

INHALTSVERZEICHNIS

I.	ZUSAMMENFASSUNG	12
II.	EINLEITUNG	13
2.1	DIE RHEUMATOIDE ARTHRITIS.....	13
2.1.1	<i>Krankheitsmerkmale und Epidemiologie</i>	<i>13</i>
2.1.2	<i>Ätiologie</i>	<i>15</i>
2.1.3	<i>Diagnostik.....</i>	<i>17</i>
2.1.4	<i>Pathophysiologie und T-Lymphozyten.....</i>	<i>19</i>
2.1.5	<i>Therapie.....</i>	<i>21</i>
2.2	CLOSTRIDIODES DIFFICILE-INFEKTION	22
2.2.1	<i>Clostridioides difficile.....</i>	<i>22</i>
2.2.2	<i>Klinisches Erscheinungsbild und Diagnostik</i>	<i>23</i>
2.2.3	<i>Pathophysiologie</i>	<i>24</i>
2.2.4	<i>Therapie und Hygienemaßnahmen</i>	<i>25</i>
2.3	DIE DARM-GELENK-ACHSE.....	26
2.4	ZIELSTELLUNG	28
III.	MATERIAL UND METHODEN	30
3.1	DIE DBA/1J X B10.Q-MAUS.....	30
3.2	CLOSTRIDIODES DIFFICILE-INFEKTION	32
3.2.1	<i>Bakterienstämme</i>	<i>32</i>
3.2.2	<i>Vorbehandlung mit Antibiotika</i>	<i>33</i>
3.2.3	<i>Inokulation</i>	<i>34</i>
3.2.4	<i>Überwachung und medikamentöse Behandlung der C. difficile-Infektion</i>	<i>34</i>
3.2.5	<i>Eradikationstherapie</i>	<i>34</i>
3.3	KOLLAGEN-INDUZIERTER ARTHRITIS	35
3.3.1	<i>Kollagen Typ II und Freund's Adjuvantien</i>	<i>35</i>
3.3.2	<i>Injektion.....</i>	<i>35</i>
3.3.3	<i>Scoringssystem der Arthritis und analgetische Behandlung</i>	<i>36</i>
3.4	HISTOLOGIE.....	37
3.5	IMMUNOHISTOCHEMIE	38
3.6	QUANTITATIVE REAL TIME PCR.....	40
3.7	SOFTWARE	41
3.8	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	41

IV.	ERGEBNISSE	42
4.1	UNTERSCHIEDLICHE KRANKHEITSAUSPRÄGUNGEN DURCH <i>C. DIFFICILE</i> VPI 10463, 2K14 UND 630.....	42
4.2	AUSWIRKUNGEN DER DREI <i>C. DIFFICILE</i> -STÄMME AUF DIE NACHFOLGENDE KOLLAGEN-INDUZIERTER ARTHRITIS	44
4.3	EFFEKTE EINER ERADIKATION VON VPI 10463 AUF EINE NACHFOLGENDE KOLLAGEN-INDUZIERTER ARTHRITIS.....	48
4.4	T-ZELL-SUBPOPULATIONEN IN LYMPHKNOTEN	50
4.5	THERAPEUTISCHES POTENZIAL EINER INFESTION MIT VPI 10463 BEI EINER MANIFESTEN KOLLAGEN-INDUZIERTEN ARTHRITIS	54
4.6	IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON CSPG4	57
V.	DISKUSSION	58
VI.	THESEN	64
VII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	65
VIII.	LEBENS LAUF.....	79
IX.	PUBLIKATIONEN.....	81
X.	DANKSAGUNG	82
XI.	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	83

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Anzahl der Patienten mit RA nach Altersgruppe und Geschlecht im Jahr 2013.....	13
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines gesunden Gelenks und eines Gelenks betroffen von der rheumatoiden Arthritis.....	20
Abbildung 3: Die Arthritis wurde visuell unter Berücksichtigung eines Scores erhoben.	36
Abbildung 4: Experimenteller Aufbau im ersten Teilversuch.	42
Abbildung 5: Mittelwerte (\pm SEM) der prozentualen Gewichtsveränderung der einzelnen Mäusegruppen im ersten Teilversuch.	43
Abbildung 6: Histologische Schnitte (H&E-Färbung, 4 μ m) von Dickdärmen einer gesunden (A und C) und VPI 10463-infizierten Maus (B und D).	44
Abbildung 7: Mäusegruppen und durchgeführte Interventionen sowie repräsentative Fotos der Hinterpfoten am Endpunkt des Experiments.....	46
Abbildung 8: Histologische Schnitte (Hämalaun-Färbung, Dicke 4 μ m) eines gesunden (A) und arthritischen (B) Interphalangealgelenks.	46
Abbildung 9: Inzidenz der Kollagen-induzierten Arthritis je Gruppe im ersten Teilversuch.	47
Abbildung 10: Kumulativer Arthritis-Score pro Gruppe im ersten Teilversuch.	47
Abbildung 11: Experimenteller Aufbau im zweiten Teilversuch.....	48
Abbildung 12: Mittelwerte (\pm SEM) der prozentualen Gewichtsveränderung der einzelnen Mäusegruppen im zweiten Teilversuch.	49
Abbildung 13: Inzidenz der Kollagen-induzierten Arthritis je Gruppe (n = 8) im zweiten Teilversuch.	49
Abbildung 14: Kumulativer Arthritis-Score pro Gruppe (n = 8) im zweiten Teilversuch.	50
Abbildung 15: Q-PCR der T-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren in mesenterialen Lymphknoten.	51
Abbildung 16: Korrelationen der T-Zell spezifischen Transkriptionsfaktoren in mesenterialen Lymphknoten. ..	52
Abbildung 17: Q-PCR der T-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren in inguinale Lymphknoten.	53
Abbildung 18: Korrelationen der T-Zell spezifischen Transkriptionsfaktoren in inguinale Lymphknoten.....	54
Abbildung 19: Experimenteller Aufbau im dritten Teilversuch.	55
Abbildung 20: Boxplot zeigt den Faktor, um wieviel sich der Arthritis-Score durch die jeweilige Intervention (Medium, Infektion mit VPI 10463) erhöht.	55
Abbildung 21: Immunhistochemische Darstellung von CSPG4 anhand Gewebepreparaten von Mausepfoten. .	56

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: ACR/EULAR-Klassifikationskriterien der rheumatoiden Arthritis.....	18
Tabelle 2: Punktesystem zur Einstufung des Belastungsgrades der Mäuse.	31
Tabelle 3: Charakteristika der im Experiment verwendeten <i>Clostridioides difficile</i> -Stämme.	32
Tabelle 4: Verabreichte Antibiotika vor der Infektion mit <i>C. difficile</i>	33
Tabelle 5: Protokoll der Hämalaun-Eosin-Färbung (HE).	37
Tabelle 6: Protokoll der Immunhistochemischen Anfärbung von CSPG4.....	38
Tabelle 7: Verwendete Software.	41
Tabelle 8: Übersicht der Korrelationen der T-Zell spezifischen Transkriptionsfaktoren in mesenteriale Lymphknoten der einzelnen Versuchsgruppen.....	51
Tabelle 9: Übersicht der Korrelationen der T-Zell spezifischen Transkriptionsfaktoren in inguinale Lymphknoten der einzelnen Versuchsgruppen.....	53

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
2K14	<i>Clostridioides difficile</i> -Stamm
630	<i>Clostridioides difficile</i> -Stamm
ACPA	Antikörper gegen zyklisch citrullinierte Peptide/Proteine
ACR	American College of Rheumatology
AK	Antikörper
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlich Medizinischen Fachgesellschaften
BHIS	Brain Heart Infusion Solution
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CCP	Zyklisch citrullinierte Peptide/Proteine
CDAD	<i>Clostridioides difficile</i> -assoziierte Diarrhoe
CDI	<i>Clostridioides difficile</i> -Infektion
CDT	Binäres <i>C. difficile</i> -Toxin
CFA	Complete Freund's Adjuvant
CRP	C-reaktives Protein
CSPG4	Chondroitinsulfat Proteoglykan 4
DAB-Substrat	3,3'-Diaminobenzidin-Substrat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
EULAR	European League Against Rheumatism
FMT	Fecal Microbiota Transfer

g	Gramm
gp96	Glykoprotein 96
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HeLa-Zellen	Zellstamm eines Zervixkarzinoms
HLA	Human Leucocyte Antigen
IFA	Incomplete Freund's Adjuvant
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
kDA	Kilodalton
KG	Körpergewicht
l	Liter
M	Molar
m	Meter
MCP	Metacarpophalangealgelenk
MHC	Major Histocompatibility Complex
min.	Minuten
NaCl	Natriumchlorid
PAD	Peptidylarginindeiminase
PBS	Phosphate Buffered Sialine
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIP	Proximale Interphalangealgelenke
PMC	Pseudomembranöse Colitis

RA	Rheumatoide Arthritis
RANKL	Rezeptor Aktivator des NF- κ B-Ligands
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
s.	siehe
SE	Shared Epitope
sek.	Sekunde
SPF	Specific Pathogen Free
TcdA	Enterotoxin A bzw. <i>C. difficile</i> -Toxin A
TcdB	Zytotoxin B bzw. <i>C. difficile</i> -Toxin B
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
vgl.	vergleiche
VPI10463	<i>Clostridioides difficile</i> -Stamm

I. ZUSAMMENFASSUNG

Die rheumatoide Arthritis ist eine Autoimmunerkrankung mit multifaktorieller Ätiopathogenese, bei der in den letzten Jahren neben den genetischen Ursachen mikrobielle Erreger als auslösende Umweltfaktoren zunehmend an Aufmerksamkeit gewonnen haben. Der Darm stellt in diesem Zusammenhang das größte bakterielle Reservoir im menschlichen Körper dar und nimmt über verschiedene Mechanismen Einfluss auf Gelenkerkrankungen. Die Verbindung dieser zwei Kompartimente wird als Darm-Gelenk-Achse bezeichnet und ist Grundlage der folgenden experimentellen Arbeit, in der der Einfluss einer *Clostridioides-difficile*-Infektion auf eine Arthritis untersucht wurde.

Als experimenteller Organismus diente die DBA/1J × B10.Q F1-Maus, in der die arthritischen Symptome mittels Immunisierung mit Kollagen ausgelöst wurden. Über eine orale Sonde erfolgte die Infektion mit einem von drei verschiedenen *C. difficile*-Stämmen (VPI10463, 2K14, 630), die je nach Pathogenität eine unterschiedliche Krankheitsmanifestation zeigten. Hierbei kam es zur Diarrhoe, Gewichtsverlust und zu morphologischen Veränderungen in der Dickdarmhistologie. Zur Auslösung der Arthritis erfolgten zwei Injektionen von bovinem Kollagen Typ II. Die Bewertung der arthritischen Symptome wurde visuell anhand eines Scores quantifiziert. Aus den Inguinal- und Mesenteriallymphknoten wurde die mRNA von T-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren mittels Q-PCR analysiert und an histologischen Schnitten der Pfoten der TcdB-Rezeptor CSPG4 in den Blutgefäßwänden immunhistochemisch detektiert.

Eine Infektion mit *C. difficile* VPI 10463 führte unter allen Bakterienstämmen zum größten Gewichtsverlust und zu einer schweren Colitis. Eine spontane Ausheilung der VPI 10463-Infektion führte bei den Mäusen zu einer reduzierten Inzidenz der nachfolgenden Kollagen-induzierten Arthritis und führte zu einer mesenterialen Treg- und Th2-Polarisation. Interessanterweise konnten diese positiven Effekte von VPI10463 nach einer Eradikationstherapie nicht mehr verzeichnet werden. Darüber hinaus hat eine VPI 10463-Infektion keinen mildernden Effekt auf eine bereits manifeste Arthritis und somit kein therapeutisches Potenzial.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit *C. difficile* VPI10463 und eine daraus entstehende Colitis bei Mäusen vor einer nachfolgenden Arthritis schützte. Als Bestandteil der Darm-Gelenk-Achse hat die Mobilisierung oder Polarisierung von Immunzellen im Experiment zum Schutz vor der Arthritis beigetragen. Die Aussicht auf einen möglichen therapeutischen Nutzen durch *C. difficile* aber auch die Rolle von CSPG4 erfordert weitere Experimente.

II. EINLEITUNG

In dieser Arbeit werden pathogenetische und immunmodulatorische Aspekte der rheumatoiden Arthritis untersucht, die im Zusammenhang mit einer Infektion durch *Clostridioides difficile* auftreten. Aus diesem Grund sollen zunächst wichtige Informationen zu beiden Krankheitsbildern erläutert werden.

2.1 DIE RHEUMATOIDE ARTHRITIS

2.1.1 KRANKHEITSMERKMALE UND EPIDEMIOLOGIE

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch progrediente Gelenkerkrankung mit autoimmuner Genese und macht sich durch Entzündungen vor allem an Finger- und Zehengelenken, aber auch an größeren Gelenken wie dem Knie-, Ellenbogen- und Schultergelenk bemerkbar. Am häufigsten betroffen sind die proximalen Interphalangealgelenke (PIP) und das Metacarpophalangealgelenk (MCP) an den Händen. Die Entzündungszeichen wie Schwellungen, Rötungen und Schmerzen, treten im schubweisen Krankheitsverlauf symmetrisch auf und führen unbehandelt zu einer irreversiblen Gelenkdestruktion und Funktionseinschränkung.

Bereits um 1800 beschrieb Augustin Jacob Landré-Beauvais Patienten, die an Versteifungen und Deformitäten mehrerer Gelenke litten, ohne zu wissen, welchem Krankheitsbild dies zuzurechnen war. Die Begrifflichkeit „rheumatoide Arthritis“ wurde erstmals 1859 von Sir Alfred Garrod zur Abgrenzung von anderen Gelenkserkrankungen wie der Gicht, verwendet. (D P M Symmons 1995)

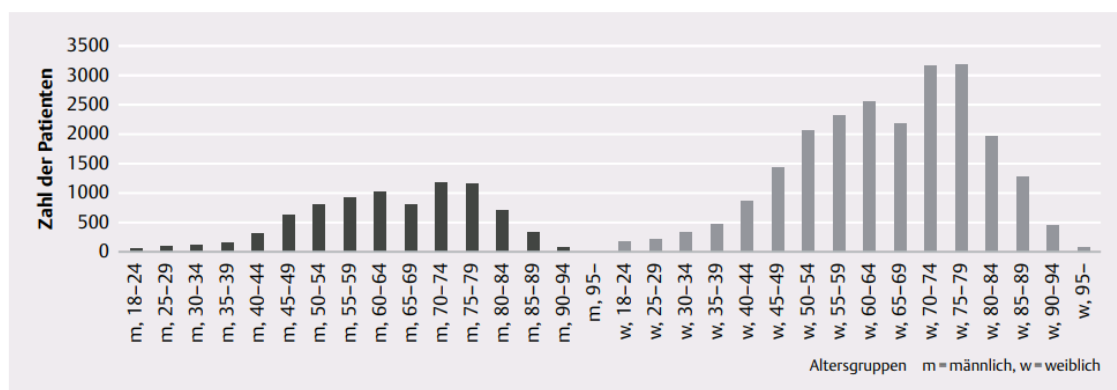


Abbildung 1: Anzahl der Patienten mit RA nach Altersgruppe und Geschlecht im Jahr 2013. (Kienitz et al. 2020)

Heutzutage stellt die RA mit einer Prävalenz von circa 1-2 % eine der häufigsten Autoimmunerkrankungen der Welt dar. Prinzipiell kann die Erkrankung in jedem Alter auftreten, die Inzidenz steigt aber mit zunehmendem Lebensalter. Dabei gibt es einen geschlechterspezifischen Unterschied. Frauen sind nicht nur etwa dreimal häufiger von der Erkrankung betroffen, sondern erkranken im Durchschnitt auch mehrere Lebensjahre früher als Männer (s. Abbildung 1). Eine frühzeitige Diagnose und Therapieeinleitung sind maßgeblich für den prognostischen Verlauf. Dadurch können die Symptome und Funktionseinschränkungen des muskuloskelettalen Systems frühzeitig aufgehalten werden.

Nicht zu vernachlässigen sind die extraartikulären Manifestationen an inneren Organen und den Blutgefäßen, die maßgeblich für eine geringere Lebenserwartung der von der RA betroffenen Menschen verantwortlich sind. (Farragher et al. 2008) Trotz moderner Medikamente versterben Patienten mit RA im Durchschnitt fünf Jahre früher. (Chiu et al. 2021) Die extraartikulären Symptome betreffen etwa 40 % der RA-Patienten, das männliche Geschlecht ist dabei einem höheren Risiko ausgesetzt im Vergleich zum weiblichen Geschlecht. (Cojocaru et al. 2010) So geht die RA mit einem deutlich erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen wie beispielsweise Myokardinfarkte als auch für neurovaskuläre Ereignisse wie Schlaganfälle einher. Die Lunge ist bei jedem dritten RA-Erkrankten involviert. Interstitielle Lungenerkrankungen treten bei nahezu jedem zweiten RA-Patient auf. (Fewins et al. 1991)

Die Parodontitis hat in den letzten Jahren besonderen Stellenwert in Bezug auf die RA-Forschung eingenommen. Einige der Parodontitis-verursachende bakteriellen Erreger besitzen das Enzym Peptidylarginindeiminase (PAD) und können dadurch Einfluss auf die Manifestation der RA nehmen. Andersherum betrachtet, weisen im Vergleich zur Normalbevölkerung RA-Patienten eine höhere Prävalenz von parodontalen Schäden auf. (Choi et al. 2016)

Aus ökonomischer Sicht stellt die RA mit durchschnittlich 4.000 € an jährlichen Kosten pro Patient in Deutschland eine hohe volkswirtschaftliche Belastung dar. (Ruof et al. 2003) Davon abgesehen geraten viele Patienten durch die Bewegungseinschränkung in die Arbeitsunfähigkeit. Anhand einer internationalen Studie konnte gezeigt werden, dass etwa ein Drittel aller Patienten neun Jahre nach ihrer Erstdiagnose ihrer Beschäftigung nicht mehr nachgehen können. (Sokka et al. 2010)

2.1.2 ÄTIOLOGIE

Die genaue Ätiopathogenese der RA ist nicht vollständig geklärt, es spielen jedoch genetische und umweltbezogene Faktoren eine Rolle. (MacGregor et al. 2000; Gibofsky 2014) Eingangs wurde bereits erwähnt, dass das Erkrankungsrisiko vor allem im fortgeschrittenen Alter und beim weiblichen Geschlecht erhöht ist. Vielerlei Gene auf den beiden X-Chromosomen der Frau spielen eine Rolle bei der Regulation des Immunsystems. Normalerweise ist eines der zwei X-Chromosomen inaktiviert, jedoch entgehen dieser Inaktivierung ca. 23 % der darauf befindlichen Gene. (Tukiainen et al. 2017) Als Ursache kommen auch hormonelle Einflüsse in Frage. Während der Schwangerschaft ist das Risiko an RA zu erkranken um 70 % erniedrigt, während in den drei Monaten nach der Geburt das Erkrankungsrisiko mehr als fünffach erhöht ist. (Silman et al. 1992)

Unabhängig vom Geschlecht gibt es bei einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen eine genetische Assoziation auf der Ebene der MHC-Gene, die beim Menschen auch HLA-Gene genannt werden und für HLA-Moleküle codieren. Es gibt HLA-I- und HLA-II-Moleküle die zum einen bei der Bestimmung der Histokompatibilität bei Organtransplantationen und zum anderen bei der Einleitung einer Immunantwort eine wichtige Rolle spielen. An der Zelloberfläche von antigenpräsentierenden Immunzellen beispielsweise befinden sich HLA-II-Moleküle (MHC-II), mit deren Hilfe prozessierte Moleküle von Krankheitserregern für weitere Immunzellen zur Erkennung bereitgestellt werden (Antigenpräsentation). Über diesen Prozess initiieren antigenpräsentierende Zellen, wie dendritische Zellen und Makrophagen, Immunantworten durch Aktivierung von T-Zellen. In den siebziger Jahren stellte man erstmals eine Assoziation von HLA-II-Merkmalen mit der rheumatoiden Arthritis fest, als man bei RA-Patienten vermehrt den Genlocus HLA-DR nachgewiesen hat. (Gibofsky et al. 1978; Stastny 1978) Mit HLA-DRB1*01:01, *01:02, *04:01, *04:04, *04:05, *04:08, *10:01, *14:02 konnten weitere relevante Allele identifiziert werden (Kampstra und Toes 2017), die nicht nur mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko einhergehen, sondern auch zu schwereren systemischen Manifestationen führen. (Turesson et al. 2005) Aus molekularbiologischer Sicht ist diesen HLA-Allelen gemein, dass sie Genabschnitte mit Aminosäuresequenzen QKRAA, QRRAA oder RRRAA, auch genannt als „Shared Epitope“ (SE), aufweisen. (Gregersen et al. 1987) Der zugrundeliegende Mechanismus ist noch unklar. Eine Studie hat jedoch ergeben, dass mit der Anzahl der SE-Kopien das Risiko an RA zu erkranken zunimmt und beschreibt damit einen Mechanismus der Gen-Dosis-Effekt genannt wird. (Huizinga et al.

2005) Bei homozygoten Trägern von SE-Allele besteht zudem eine höhere Wahrscheinlichkeit, dass schwerwiegende extraartikuläre Manifestationen auftreten. (Weyand et al. 1992) HLA-I-Moleküle (MHC-I) spielen bei der rheumatoiden Arthritis eine untergeordnete Rolle und werden an dieser Stelle der Vollständigkeit halber lediglich erwähnt. Alle kernhaltigen Zellen des menschlichen Körpers exprimieren an ihrer Zelloberfläche HLA-I-Moleküle.

Bezüglich des sozioökonomischen Status lassen sich keine eindeutigen Aussagen zum Erkrankungsrisiko treffen, jedoch scheint er ein Marker für die Exposition für umweltbezogene Risikofaktoren zu sein. (Oliver und Silman 2006) In den letzten Jahren konnten anhand epidemiologischer Studien immer mehr umweltbezogene Risikofaktoren mit der RA in Verbindung gesetzt werden. Tabakkonsum ist dabei einer der wichtigsten für die Entwicklung einer rheumatoiden Arthritis. Bestandteile im Tabakrauch zeigen im Tierexperiment eine Exazerbation der arthritischen Symptome. (Takeno et al. 2018) Beim Menschen geht laut einer retrospektiven Studie ein starker Zigarettenkonsum von 41 - 50 pack years mit einem 13-fach erhöhten Risiko an RA zu erkranken einher. (Hutchinson et al. 2001) Vor allem aber die Kombination aus genetischer Disposition auf Ebene der HLA-Gene und der zusätzliche Tabakkonsum scheinen besonders das RA-Erkrankungsrisiko zu erhöhen. (Padyukov et al. 2004)

Heutzutage haben Ernährungsgewohnheiten und Lebensmittel im Hinblick auf die Entstehung von Krankheiten zunehmend an Aufmerksamkeit gewonnen. Was bei der rheumatoiden Arthritis zunächst durch Erfahrungen und Berichte der betroffenen Menschen den Anfang nahm, wurde in den vergangenen Jahren in Studien genauer untersucht. Laut einer prospektiven Studie führt eine mediterrane Kost bei RA-Patienten schon nach wenigen Wochen zu einer signifikant geringeren Krankheitsaktivität und zu einer verbesserten körperlichen Funktionalität. (Sköldstam et al. 2003) Effekte sind vor allem den mehrfach ungesättigten Fettsäuren Docosahexaensäure und Eicosapentaensäure zuzurechnen, die in Fisch und Fischöl vorkommen und zu einer verminderten Produktion von Entzündungsmediatoren und proinflammatorischen Zytokinen sowie zu einer reduzierten Lymphozytenproliferation beitragen. (Calder und Zurier 2001) Dem gegenüber steht ein hoher Konsum von rotem Fleisch, der nicht nur nach empirischen Feststellungen von RA-Patienten einen negativen Einfluss auf die Krankheitsaktivität zu haben scheint. Unabhängig von der gesamten Energieaufnahme geht ein hoher Anteil von rotem Fleisch mit einem mehr als zweifach erhöhtem Risiko an RA zu erkranken einher. (Pattison et al. 2004) Milch- und Weizenprodukte stehen ebenfalls im Verdacht die

Symptome einer RA zur verschlechtern, jedoch sind hier noch weitere Studien notwendig.

Im letzten Jahrzehnt sind Mikroorganismen als Krankheitsauslöser in das Zentrum der Forschung gerückt. Allen voran das gramnegative Bakterium *Porphyromonas gingivalis*, welches Bestandteil der menschlichen Mundflora und ein Verursacher der Parodontitis ist. Mit dem Enzym Peptidylarginin-Deiminase (PAD) ist *P. gingivalis* in der Lage, die Aminosäure Arginin in Citrullin posttranslational umzuwandeln und so zyklisch-citrullinierte Peptide (CCPs) im Körper zu produzieren. Da Antikörper gegen zyklisch-citrullinierte Peptide (ACPAs) sehr spezifisch für die rheumatoide Arthritis sind, stehen CCPs im Verdacht die Autoimmunreaktion zu initiieren und aufrechtzuerhalten. (van Venrooij und Pruijn 2000) Auch der menschliche Organismus exprimiert laut heutigem Erkenntnisstand fünf Isotypen der PAD (Wang und Wang 2013), die einer hormonellen Steuerung unterliegen. (Senshu et al. 1989; Takahara et al. 1992) Bis heute ist noch unklar, ob humane PADs eine Rolle bei der RA spielen.

2.1.3 DIAGNOSTIK

Die Manifestation der RA ist sehr heterogen, weshalb eine Diagnosestellung vor allem im initialen Krankheitsstadium schwierig sein kann. Einen Goldstandard gibt es leider nicht. Aufgrund dieser Problematik wurden 2010 in Kooperation des American College of Rheumatology (ACR) und der European League against Rheumatism (EULAR) Kriterien festgelegt, die die Diagnosestellung erleichtern sollen und anhand dieser die Indikation zur medikamentösen Therapieeinleitung frühzeitig gestellt werden soll. (Aletaha et al. 2010) Tabelle 1 zeigt die ACR/EULAR-Klassifikationskriterien der RA, die die Anzahl der beteiligten Gelenke, Laborparameter und die Symptombdauer berücksichtigen.

Nur mit einer Diagnosestellung und Therapie im Frühstadium der RA lassen sich irreversible Gelenkschäden vorbeugen und erhöhen die Chancen auf ein beschwerdefreies Leben. (Heidari 2011) Anhand der Anamnese und der körperlichen Untersuchung lassen sich Symptome wie beispielsweise schubförmige Entzündungszeichen der Gelenke, Morgensteifigkeit der Finger und allgemeine Abgeschlagenheit erheben. Ein typischer Untersuchungsbefund ist ein auslösbarer Schmerz bei Kompression der Fingergrundgelenke (Gaenslen-Zeichen), zum Beispiel beim Händedruck.

Tabelle 1: ACR/EULAR-Klassifikationskriterien der rheumatoiden Arthritis. Berücksichtigt werden die Anzahl der beteiligten Gelenke, die Symptombdauer sowie Parameter im Blut wie Autoantikörper (RF, ACPA) und Entzündungsmarker (CRP, BSG). Die Diagnose RA kann ab einer Punktzahl von 6 gestellt werden.

Ausmaß der Gelenkbeteiligung (0-5)	
1 großes Gelenk	0
2-10 große Gelenke	1
1-3 kleine Gelenke (große Gelenke nicht gezählt)	2
4-10 kleine Gelenke (große Gelenke nicht gezählt)	3
>10 Gelenke (zumindest ein kleines Gelenk)	5
Serologie (0-3)	
Negativer RF UND negative ACPA	0
Niedrig positiver RF ODER niedrig positive ACPA	2
Hoch positiver RF ODER hoch positive ACPA	3
Symptombdauer (0-1)	
<6 Wochen	0
≥6 Wochen	1
Akutphaseparameter (0-1)	
Normales CRP UND normale BSG	0
Abnormes CRP ODER abnorme BSG	1

Bei den im Blut nachweisbaren Parametern ist neben den Entzündungswerten (C-reaktives Protein, Blutsenkungsgeschwindigkeit) und der Rheumafaktor (RF) sowie der ACPA-Titer ein wichtiger diagnostischer Marker, welcher bereits wenige Jahre vor der Manifestation einer rheumatoiden Arthritis nachweisbar ist. (van de Stadt et al. 2011) ACPAs sind mit 98 % sehr spezifisch für die RA, die Sensitivität liegt bei ca. 80 %. Rheumafaktoren sind Autoantikörper gegen das Fc-Fragment von Immunglobulin G (IgG) und besitzen eine vergleichbare Sensitivität wie ACPAs, jedoch sind sie sehr unspezifisch für die RA, da sie auch bei anderen rheumatischen Erkrankungen vorkommen. In wenigen Fällen kann eine genetische Untersuchung auf das Vorhandensein einer Disposition durch HLA-Risikogenen sinnvoll sein, um schwere Verläufe frühzeitig zu erkennen und erfolgreich behandeln zu können.

Zur Beurteilung der Gelenkbeteiligung und des Krankheitsverlaufs kommen neben der klinisch-körperlichen Untersuchung bildgebende Verfahren wie die Sonographie und Röntgenaufnahmen der beschwerdetragenden Extremitäten in Frage. Um Gelenksveränderungen in ihrer Progredienz zu quantifizieren, wurden radiologische Scoring-Methoden (Larsen-Score, Scoring-System nach Sharp) entwickelt. (Rossi et al. 2006) Bei Verdacht auf möglichen systemischen Manifestationen ist eine weiterführende Diagnostik durchzuführen.

2.1.4 PATHOPHYSIOLOGIE UND T-LYMPHOZYTEN

Der genaue Pathomechanismus und das Zusammenspiel der einzelnen Immunzellen ist in einigen Teilen noch unklar, aber wichtig für das Verständnis der modernen Therapie der RA. Ausgehend von der Gelenkinnenhaut (Synovia) kommt es zur Ausbildung eines sogenannten Pannusgewebes, welches aus unterschiedlichen entzündungswirksamen Zellen besteht. Der Pannus hat die Eigenschaft zu proliferieren und die gelenkbildenden Strukturen, beispielsweise Knochen und Knorpel, zu zerstören. Man geht davon aus, dass synoviale Fibroblasten bei der Proliferation des Pannus eine große Rolle spielen. Der zugrundeliegende Mechanismus ist auf eine Überexpression von antiapoptotischen Molekülen und auf eine Unterexpression von proapoptotischen Molekülen zurückzuführen. (Distler et al. 1999) In den 90er Jahren konnten Produkte von Protoonkogenen wie Ras- und myc-Proteine in der Synovia nachgewiesen werden, welche auch bei der Proliferation von Tumorzellen eine Rolle spielen. (Pap et al. 2004)

Synoviale Fibroblasten führen zusammen mit Makrophagen durch Sekretion von resorbierenden Enzymen, den sogenannten Matrix-Metalloproteasen, zu einer irreversiblen

Zerstörung des Knochens und Knorpels. T-Zellen nehmen hier eine zentrale Rolle bei der Pathophysiologie der RA ein. (Farrugia und Baron 2016) Insbesondere Th1-Zellen aktivieren über IL-2 und IFN γ Makrophagen und regen so die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α - und IL-1 an. Dies führt zu einer weiteren Rekrutierung und Invasion von Immunzellen in die Gelenke, wodurch der Krankheitsprozess über eine überschießende Immunreaktion weiter modifiziert wird. (Distler et al. 1999; Deng und Lenardo 2006)

Über die Produktion von „Receptor Activator of NF- κ B Ligand“ (RANKL) nehmen T-Zellen einen zusätzlichen Einfluss auf die Knochendestruktion. (Deng und Lenardo 2006) RANKL gehört zur gleichen Proteinfamilie wie TNF α und ist für die Differenzierung und Aktivität der knochenabbauenden Osteoklasten zuständig. Zudem führen Th1-Zellen zu einer Bildung von Antikörpern durch B-Zellen, wie den Rheumafaktor und ACPAs.

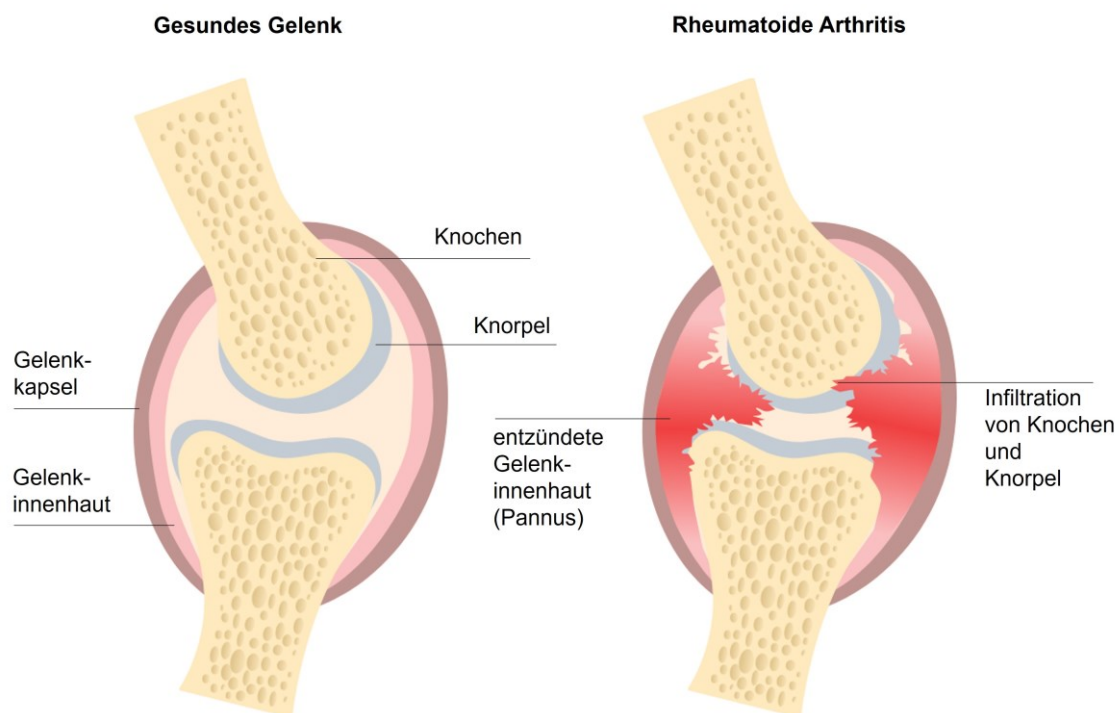


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines gesunden Gelenks und eines Gelenks betroffen von der rheumatoiden Arthritis. Bei einem gesunden Gelenk sind ein intakter Knorpel und Knochen Voraussetzung für eine optimale Funktionalität. Echte Gelenke sind von einer Gelenkkapsel und einer Gelenkinnenhaut (Synovia) umgeben. Bei der rheumatoiden Arthritis kommt es durch Proliferation der entzündeten Gelenkinnenhaut zur Ausbildung eines Pannusgewebes, welches den Knorpel und Knochen zerstört.

Da T-Lymphozyten eine zentrale Rolle bei der rheumatoiden Arthritis einnehmen, konzentrieren sich heutige Forschungsaktivitäten auf die Bedeutung der einzelnen T-Zell-Subtypen. Es gibt Transkriptionsfaktoren, die für die verschiedenen Subpopulationen der T-Zellen spezifisch sind und anhand derer eine Differenzierung möglich ist. Vor allem die bereits erwähnten Th1-Zellen sind bei der proinflammatorischen Entzündungsreaktion in der Synovia beteiligt, indem sie weitere Leukozyten aktivieren. Spezifische Transkriptionsfaktoren für Th1-Zellen sind Tbx21 und STAT4. Eine weitere T-Zell-Unterart sind die IL-17-produzierenden Th17-Zellen, die den Transkriptionsfaktor Ror γ exprimieren und in Verbindung mit vielen Autoimmunerkrankungen gebracht werden. Ror γ wird durch das Gen Rorc kodiert. Man geht davon aus, dass Th17-Zellen neben den Th1-Zellen weitere Hauptakteure der RA sind und zur Chronifizierung des Entzündungsprozesses beitragen. (Benedetti und Miossec 2014; Yasuda et al. 2019)

Regulatorische T-Lymphozyten (Treg-Zellen) sind – wie der Name schon sagt - wichtige Regulatoren der Immunantwort durch Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen. Sie tragen wesentlich zur peripheren Immuntoleranz und Lymphozytenhomöostase bei. Die Transkriptionsfaktoren Foxp3 und STAT5 können zur Identifikation von Treg-Zellen herangezogen werden. Th2-Zellen, die den Transkriptionsfaktor Gata3 exprimieren, sind eine weitere Subpopulation von T-Lymphozyten, die wie die Treg-Zellen eher der antiinflammatorischen Seite zuzurechnen sind.

2.1.5 THERAPIE

Durch intensive Forschungstätigkeit konnte in den vergangenen Jahrzehnten die Behandlung der RA weiterentwickelt werden, jedoch gibt es bis heute keinen kausalen Therapieansatz. Der Krankheitsverlauf ist ohne eine frühzeitige Behandlung progredient, weshalb man im deutschsprachigen Raum die RA auch als chronische Polyarthritits bezeichnet. Hochdosierte Glucocorticoide in Kombination mit nicht-steroidale Antirheumatika stellen die Medikamente der ersten Wahl bei der Behandlung eines akuten Schubs dar und sind mit einem hohen Nebenwirkungspotential verbunden. Dazu zählen mitunter metabolische Entgleisungen, Osteoporose, Magenulcera aber auch Schlafstörungen. Zur Erhaltung der Remission wird Methotrexat verordnet, ein zytostatisches Medikament, das in den Folsäuremetabolismus eingreift und so das Immunsystem supprimiert. Bei der Therapie mittels Biologicals werden die zentralen Akteure der Pathophysiologie der RA adressiert. Infliximab, Etanercept und Adalimumab haben als Zielstruktur TNF α und hemmen dessen proinflammatorische Wirkung. Es gibt weitere Medikamente, die beispielsweise die Wirkung von IL-1, IL-17 und B-Zellen hemmen. (AWMF 2018)

2.2 CLOSTRIDIODES DIFFICILE-INFEKTION

2.2.1 CLOSTRIDIODES DIFFICILE

Clostridioides difficile ist ein grampositives obligat anaerob wachsendes Bakterium und der häufigste Erreger für nosokomiale Diarrhoen. (Roo und Regenbogen 2020) Die Übertragung findet über den fäkal-oralen Weg statt, beispielsweise über direkten Kontakt mit der erkrankten Person oder indirekt über kontaminierte Oberflächen. Im Stuhl kolonisierter Menschen befinden sich neben den Bakterien auch deren resistente Sporen, mit denen das Bakterium in der Lage ist, selbst bei ungünstigen Umweltbedingungen außerhalb des Darmes zu überleben. Die Sporen stellen eine große Problematik bei der Infektionseindämmung dar, da sie sehr hitzestabil und unempfindlich gegenüber den meisten Desinfektionsmitteln sind. (Johnson et al. 1989)

In den vergangenen zwei Jahrzehnten nahm die Inzidenz der *C. difficile*-Infektionen (CDI) und die Erkrankungsschwere durch Ausbreitung hochpathogener Stämme weltweit zu. (Kuijper et al. 2006) (Johnson et al. 1989) Die Besiedlungsrate von Neugeborenen variiert je nach Studie und Testverfahren zwischen 25 % bis 90 %. (Penders et al. 2006; Jangi und Lamont 2010; Rousseau et al. 2011) Die klinische Symptomatik bleibt in der Regel aus, was vermutlich auf einen fehlenden Rezeptor für die Bakterien-spezifischen Toxine zurückzuführen ist. (Borriello und Wilcox 1998) Symptome treten vor allem bei hospitalisierten Erwachsenen auf, die mit einer Prävalenz von 15 % Träger von Toxinproduzierenden *C. difficile*-Stämmen sind. (Alasmari et al. 2014) In Pflegeeinrichtungen lebende und hochbetagte Erwachsene in Deutschland sind fast sechsmal mehr Träger von *C. difficile* im Vergleich zur Normalbevölkerung. (Arvand et al. 2012) Hauptrisikofaktoren einer CDI sind laut AWMF-Leitlinie eine aktuelle oder stattgehabte Antibiotikatherapie innerhalb der letzten drei Monate, ein Lebensalter über 65 Jahren, eine Hospitalisierung innerhalb der letzten drei Monate, zwei oder mehr Vorerkrankungen sowie eine stattgehabte CDI.

2.2.2 KLINISCHES ERSCHEINUNGSBILD UND DIAGNOSTIK

Die CDI manifestiert sich als Entzündung des Dickdarms (Colitis) und führt je nach Schwere der Erkrankung von einer leichten *Clostridioides difficile*-assoziierten Diarrhoe (CDAD) bis zu einer schweren pseudomembranösen Colitis (PMC). Dabei beträgt die Inkubationszeit ein bis drei Tage. Leitsymptom ist die Diarrhoe, die mit kolikartigen abdominalen Schmerzen, Fieber und Leukozytose einhergehen kann. Abhängig von der Kompromittierung des Dickdarms ist die Ausprägung der klinischen Symptome sehr unterschiedlich und zudem unspezifisch, weshalb dabei nur der Verdacht auf eine CDI geäußert werden kann. (Piper 2013; Herold 2017)

Die Diagnose wird im klinischen Alltag mittels laborchemischer oder apparativer Diagnostik bestätigt. Der Nachweis der von *C. difficile* produzierten Toxine A und B in Stuhlproben mittels ELISA hat sich heutzutage etabliert und ist empfohlen. (AWMF 2015) Diese Tests haben mit ca. 95 % eine gute Spezifität. Die Sensitivität variiert je nach Testsystem von 60 % bis 90 % und ist vor allem von präanalytischen Faktoren abhängig. (Ackermann 2004)

Als Goldstandard gilt der Zytotoxizitätstest anhand von Zellkulturen, jedoch findet dieses Testverfahren aufgrund seines Arbeits- und Zeitaufwandes nur selten Anwendung in der Praxis. Ein kultureller Nachweis von *C. difficile* ist insbesondere zur Typisierung des Erregers oder zur Resistenztestung auf Antibiotika sinnvoll. Die alleinige Diagnostik durch Kultur ist nicht weiterführend und ist immer mit dem Toxinnachweis zu ergänzen, da es auch nicht-toxinbildende Spezies gibt und der kulturelle Nachweis selbst bei asymptomatischen Trägern gelingt. (Robert-Koch-Institut 2018)

Die apparative Diagnostik spielt in den meisten Fällen eine nachrangige Rolle. In unklaren Fällen und nach erfolgter Primärdiagnostik sichert der endoskopische Nachweis einer pseudomembranösen Colitis die Infektion. Radiologisch-bildgebende Verfahren, wie beispielsweise die Computertomographie, sind vor allem bei Symptomen eines akuten Abdomens indiziert. Im schlimmsten Fall ist die Funktion des Colons so eingeschränkt, dass sich die Erkrankung als paralytischen Ileus manifestiert. Man spricht auch von einem toxischen Megacolon, bei dem sich dilatierte Darmschlingen abgrenzen lassen, welche perforieren können. (Poutanen und Simor 2004)

2.2.3 PATHOPHYSIOLOGIE

Es gibt zwei denkbare Szenarien, die zu einer symptomatischen *C. difficile* Infektion führen können. Zum einen gelangen die Bakterien und deren Sporen in den menschlichen Verdauungstrakt über den fäkal-oralen Übertragungsweg. Als Erregerreservoir kommen Böden, Gewässer und Nutztiere in Frage.

Der weitaus häufigere Pathomechanismus ist jedoch die (Re-)Aktivierung der Erkrankung bei asymptomatischen Trägern des Keims als Folge einer Dysbiose der Darmflora. Eine antibiotische Therapie beispielsweise mit Clindamycin, Cephalosporinen oder anderen Beta-Lactam-Antibiotika kann dies begünstigen. (AWMF 2015)

Krankheitssymptome werden nur von Toxin-bildenden *C. difficile* Stämmen verursacht. (Samore et al. 1994) Im Dickdarm sezerniert das Bakterium Enterotoxin A (TcdA) und Zytotoxin B (TcdB). Sie sind die größten bekannten bakteriellen Toxine (TcdA 308 bzw. TcdB 270 kDa) und werden durch Internalisierung in die Darmzelle aufgenommen. (Eichel-Streiber et al. 1992; Just et al. 1995) Über die dabei beteiligten Rezeptoren, an denen die Toxine mittels hydrophober Proteinabschnitte binden, ist wenig bekannt. Für TcdA konnten als Rezeptormoleküle Kohlenhydrate und gp96 an Epithelzellen des Dickdarms identifiziert werden. (Greco et al. 2006; Na et al. 2008) Bei *in vitro* Untersuchungen an HeLa-Zellen konnte Chondroitinsulfat-Proteoglykan 4 (CSPG4) als Rezeptor für TcdB identifiziert werden. (Yuan et al. 2015) CSPG4 kommt in zahlreichen Geweben des menschlichen Körpers vor, unter anderem im Magen-Darm-Trakt, der Haut und den Blutgefäßen. (Midwood und Salter 1998; Jones et al. 2002; Legg et al. 2003; Tao et al. 2016) Die Potenz von TcdB ist im Vergleich zu TcdA um ein Vielfaches höher. (Lyras et al. 2009)

Im Inneren der Zelle übernehmen GTP-bindende Proteine eine regulierende Funktion des Aktin-Zytoskeletts, der Zellproliferation und des Zelltods. TcdA und TcdB glykosylieren die GTP-bindenden Proteine und führen zum Untergang der Zelle. Es kommt zu einer Entzündungsreaktion und Darmbarrierestörung, die eine Sekretion von Flüssigkeit in das Darmlumen zur Folge hat. (Aktories et al. 2017)

Es gibt ein weiteres binäres Toxin (CDT), welches nicht von allen *C. difficile* Stämmen produziert wird und dessen Bedeutung noch unklar ist. (Eckert et al. 2015; Androga et al. 2015)

2.2.4 THERAPIE UND HYGIENEMAßNAHMEN

Die Aufrechterhaltung des Wasser- und Elektrolyt-Haushaltes durch Flüssigkeitssubstitution ist bei der symptomatischen Therapie von Durchfallerkrankungen von grundlegender Bedeutung. (AWMF 2015) Zur antibiotischen Therapie sind Metronidazol, Vancomycin und Fidaxomycin über eine Dauer von zehn bis 14 Tagen laut Empfehlungen internationaler Fachgesellschaften und Leitlinien geeignet. Vancomycin ist besonders bei schweren Krankheitsverläufen dem Metronidazol vorzuziehen. (Zar et al. 2007) Unter der Therapie mit dem kostenintensiven Fidaxomycin konnte ein verringertes Risiko von Rezidiven beobachtet werden. (AWMF 2015)

Die eingesetzten Antibiotika stoßen bei Krankheitsrückfällen, die mit einer verminderten Biodiversität der Darmflora einhergehen, an ihre Grenzen. Bei der erweiterten Therapie von rezidivierenden Manifestationen ist deshalb in den letzten Jahren der fäkale Mikrobiomtransfer (FMT) immer mehr ins Licht von Studien gelangt. Dabei wird Stuhl von zuvor getesteten gesunden Spendern entnommen und nach entsprechender Aufarbeitung entweder über eine Sonde im Colon oder als schluckbare Kapsel über den Mund dem Empfänger verabreicht. In Studien konnte dadurch ein Heilungserfolg von bis zu 90 % erzielt werden. (Gough et al. 2011; Brandt et al. 2012; van Nood et al. 2013) Bei fulminanten Krankheitsverläufen kann unter bestimmten Voraussetzungen eine chirurgische Intervention mittels totaler oder subtotaler Kolektomie und Anlage eines temporären Ileostomas die Mortalität senken. (Seltman 2012; Kaiser et al. 2015)

Zur Eindämmung der Ausbreitung von *C. difficile* sind die Einhaltung von Hygiene- und Isolationsmaßnahmen in Krankenhäusern und stationären Pflegeeinrichtungen von essenzieller Bedeutung. Krankenzimmer, in denen infizierte Personen untergebracht sind, weisen eine hohe Kontaminationsrate von bis zu 57 % der umgebenden Oberflächen auf. (Hill et al. 2013) Aus diesem Grund ist eine Einzelzimmerisolation sowie der Einsatz von sporoziden Oberflächendesinfektionsmitteln sinnvoll. Medizinisches Personal ist beim Kontakt mit infizierten Personen angehalten, persönliche Schutzausrüstung, bestehend aus langärmelige Schutzkittel und Einmalhandschuhe, zu tragen.

Vor und nach dem Patientenkontakt muss die hygienische Händedesinfektion durchgeführt werden um die vegetativen Formen von *C. difficile* zu inaktivieren, die umweltresistenten Sporen jedoch, bleiben durch diese Maßnahme unberührt. Nach dem Patientenkontakt ist neben der Händedesinfektion zusätzlich eine gründliche Reinigung mit Seife notwendig. (Oughton et al. 2009; Jabbar et al. 2010)

2.3 DIE DARM-GELENK-ACHSE

Mit dem Begriff Darm-Gelenk-Achse beschreibt man in der wissenschaftlichen Literatur einen Mechanismus, wie Prozesse im Verdauungstrakt Einfluss auf rheumatische Gelenkerkrankungen und umgekehrt nehmen können. Die Identifizierung und das Verständnis dieser Schnittstellen ist vor allem bei der rheumatoiden Arthritis Gegenstand einer jungen Forschungstätigkeit. Für andere Erkrankungen sind die Mechanismen der Darm-Gelenk-Achse besser bekannt, die in gewissermaßen als Anhaltspunkte für weitere Forschungen dienen können.

Bei der rheumatoiden Arthritis sind IgA ACPAs und IgA RF neben den IgG ACPA schon mehrere Jahre vor Krankheitsausbruch im Serum von Patienten messbar. (Kelmenson et al. 2020) Über die Herkunft dieser IgA-Autoantikörper lässt sich spekulieren. IgA ist ein wesentlicher Bestandteil der humoralen Immunabwehr an Schleimhäuten, weshalb dort auch der Ursprung der IgA-Autoantikörper liegen könnte. Mit dem bereits erläuterten Keim *P. gingivalis* in der Mundschleimhaut ist bekannt, dass Bakterien zu erhöhten ACPA-Titern beitragen können. (Bae und Lee 2018; Sakaguchi et al. 2019) Auch im Darm, der den größten Anteil an allen Oberflächen der Schleimhäute einnimmt, ist die Induktion solcher Autoantikörper denkbar.

Ein weiterer Mechanismus beruht auf der Tatsache, dass Immunzellen in der Lage sind, sich überall im Körper zu bewegen. Die ankylosierende Spondyloarthritis (Morbus Bechterew) ist eine Gelenkerkrankung aus dem rheumatischen Formenkreis, bei der man identische T-Zell-Klone des Darmes auch in den Gelenken nachgewiesen hat. (May et al. 2000) Bei der RA wird dieser Mechanismus ebenfalls vermutet, da eine Subpopulation von T-Zellen der Synovialflüssigkeit von Arthritis-Patienten genauso wie darmassoziierte intraepitheliale T-Zellen das Integrin $\alpha E\beta 7$ exprimieren. (Cepek et al. 1993; Black et al. 2003)

Die reaktive Arthritis ist eine Form der Gelenkentzündung, die mitunter nach gastrointestinalen Infektionen temporär auftreten kann und bei der bakterielle Antigene in der Gelenkflüssigkeit der entzündeten Gelenke nachgewiesen werden können. Das Wissen über diese Form der Arthritis präsentiert Anhaltspunkte für die Forschungstätigkeiten über die Bedeutung des Darmmikrobioms bei der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis. (Toivanen 2001)

Der menschliche Verdauungstrakt bildet mit der Darmflora - bestehend aus Bakterien, Pilzen und Viren - eine funktionelle Einheit. Das Mikrobiom erfüllt zweckdienliche Aufga-

ben für den menschlichen Organismus. Erste Indizien deuten aber auch auf eine Beteiligung der Darmflora bei der Entstehung der rheumatoiden Arthritis hin. So lassen sich signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung des Darmmikrobioms bei Patienten, die an einer RA im Frühstadium leiden, observieren. (Vaahtovuori et al. 2008)

Darüber hinaus hat man in tierexperimentellen Studien Erreger und Mikrobiom-Konstellationen identifizieren können, die über T-Zell vermittelte Immunreaktionen die Entwicklung von arthritischen Symptomen zum einen begünstigen und zum anderen abschwächen können. (Abdollahi-Roodsaz et al. 2008; Maeda et al. 2016; Rogier et al. 2017)

2.4 ZIELSTELLUNG

Um die molekularbiologischen Mechanismen der RA weiter zu erforschen, bedient man sich unter anderem an Tiermodellen. Es gibt verschiedenste Modelle, um die RA in Tieren zu simulieren. Zum einen entwickeln genetisch veränderte Tiere spontan im Laufe der Zeit arthritische Symptome. Eine andere Möglichkeit stellt die Immunisierung von Tieren mittels Antigenen, Antikörpern oder Kollagen dar. Im tierischen Organismus lassen sich Wechselwirkungen zwischen zwei Erkrankungen, wie hier der *Clostridioides difficile*-Infektion und der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) erforschen.

Die Immunisierung mit Kollagen Typ II hat mehrere Vorteile und wird zudem in der Arbeitsgruppe für Klinische Immunologie der Universitätsmedizin Rostock seit einigen Jahren erfolgreich durchgeführt. Die CIA weist sowohl bei der zellulären als auch der antikörpervermittelten Immunreaktion viele Gemeinsamkeiten mit der RA des Menschen auf. Dies spiegelt sich auch in den histomorphologischen Veränderungen der Gelenke wider. (Holmdahl et al. 1989)

Die vorgelegte Arbeit baut auf Erkenntnisse vorangegangener und umfassender Forschungstätigkeiten der AG Klinische Immunologie der Universitätsmedizin Rostock auf. Eine vorherige Infektion mit *Clostridioides difficile* scheint einen positiven Einfluss auf eine nachfolgende Kollagen-induzierten Arthritis bei Mäusen zu haben. Diese Tatsache wirft Fragen auf, die im Folgenden beantwortet werden sollen.

Mit dem Parodontitiserreger *P. gingivalis* rechnet man dem Enzym Peptidylarginindeiminase (PAD) eine große Bedeutung bei der Genese der RA zu. Da es eine große Anzahl an Bakterienstämme von *C. difficile* gibt, die ebenfalls das Enzym PAD mit unterschiedlicher Aktivität exprimieren, sollte herausgefunden werden, ob sich dadurch unterschiedliche Effekte auf eine nachfolgende CIA beobachten lassen. Darüber hinaus war im Vorfeld der Experimente unklar, ob die *C. difficile*-spezifischen Toxine einen Einfluss auf eine nachfolgende Kollagen-induzierte Arthritis haben. Deshalb wurde die Auswahl der in dieser experimentellen Arbeit verwendeten Bakterienstämme zum einen anhand der unterschiedlichen PAD-Aktivität und zum anderen am Ausmaß der Toxinproduktion getroffen. Es gibt *C. difficile*-Stämme, die wie bereits erwähnt, neben den Toxin A und B ein drittes binäres Toxin produzieren. Um die *C. difficile*-Stämme besser miteinander vergleichen zu können, fiel die Auswahl auf Bakterienstämme, die lediglich die Toxine A und B produzieren.

Nach spontaner Ausheilung der CDI, sollte bei den Mäusen die Arthritis durch zwei Injektionen mit bovinen Kollagen Typ II ausgelöst sowie die anschließenden Beschwerden und Symptome überwacht werden.

Wenn die Toxine einen direkten Einfluss auf die nachfolgende CIA bei Mäusen haben sollten, ist das Vorhandensein der vegetativen Form von *C. difficile* eine Voraussetzung dafür. Um dieser Hypothese nachzugehen, sollte eine Mäusegruppe vor Induktion der Arthritis mit *C. difficile* infiziert werden und einen spontanen Heilungsverlauf erfahren. Bei einer weiteren Mäusegruppe soll vor Induktion der Arthritis *C. difficile* mittels Eradikationstherapie und Stuhltransplantation wieder aus dem Darm entfernt werden.

Mit den bisherigen Experimenten konnte ein prophylaktisches Potenzial einer CDI in Hinblick auf eine CIA belegt werden, da die Infektion immer vor Auslösen der Arthritis erfolgte. Unklar war bei der Planung der Experimente, ob eine CDI auch ein therapeutisches Potenzial bei einer bereits manifesten Arthritis aufweist. Um dies zu untersuchen, sollte bei den Mäusen im letzten Teil der Versuche zuerst die Kollagen-induzierte Arthritis ausgelöst werden und nach Entwicklung der arthritischen Beschwerden die *C. difficile*-Infektion erfolgen.

Diese *in vivo*-Studie ist die erste ihrer Art, die sowohl den Einfluss dreier *C. difficile*-Stämme auf die Kollagen-induzierte Arthritis als auch die Auswirkungen einer *C. difficile* Infektion auf eine bereits manifeste Kollagen-induzierte Arthritis untersucht.

III. MATERIAL UND METHODEN

3.1 DIE DBA/1J x B10.Q-MAUS

Als experimenteller Organismus diente die F1-Generation der Kreuzung aus der DBA/1J- und B10.Q-Maus. Die DBA/1J-Maus wurde von Charles River Laboratories in Sulzfeld erworben, die B10.Q-Maus stammt aus dem Jackson Laboratory aus den Vereinigten Staaten. Die Zucht fand unter Specific-Pathogen-Free-Bedingungen in der Zentralen Versuchstierhaltung des Instituts für Experimentelle Chirurgie in Rostock statt.

Mit einem Alter von acht bis zwölf Wochen wurden die zur Identifikation bereits markierten Tiere in den Infektionstierstall des Instituts für medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Universitätsmedizin Rostock überführt und in die Experimente aufgenommen. Die Haltung fand in klimatisierten und belüfteten Käfigen (Raumtemperatur $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, Luftfeuchtigkeit $50\% \pm 8\%$) mit Einstreu, Unterschlupf und Zubehör zur Beschäftigung statt. Je Käfig wurden maximal fünf Tiere untergebracht. Je nach Besatzdichte und Verschmutzungsgrad wurden die Käfige ein bis zweimal pro Woche gereinigt und das Einstreu gewechselt. Die Mäuse waren einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus ausgesetzt und erhielten Futter (ssniff Soest) und Leitungswasser *ad libitum*. Das Körpergewicht wurde jeden zweiten Tag kontrolliert, bei Erfüllen bestimmter Kriterien (im Folgenden näher erläutert) sogar jeden Tag.

Am Endpunkt wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Injektion von 0,75 mg S-Ketamin / 10 g Körpergewicht und 0,05 mg Xylazin / 10 g Körpergewicht (Hellabrunner Mischung) anästhesiert, bevor sie mittels zervikaler Dislokation aus den Experimenten genommen wurden. Während der Experimente wurde systematisch die Belastung der Tiere anhand allgemeiner und versuchsspezifischer Kriterien alle ein bis zwei Tage eingeschätzt (s. Tabelle 2). Die Vornahme wissenschaftlicher Versuche wurde unter dem Aktenzeichen 7221.3-1.1-039/18 vom Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern gemäß § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes genehmigt.

Tabelle 2: Punktesystem zur Einstufung des Belastungsgrades der Mäuse. Die maximale Punktzahl je Beobachungskriterium (I - IV) beträgt 25. Die Punktzahlen der vier Kriterien wurden addiert und die Summe dem entsprechenden Belastungsgrad (0 - 4) zugeordnet, um notwendige Maßnahmen einleiten zu können.

Beobachtung	Punktwertung ¹
I Körpergewicht bezogen auf Ausgangsgewicht	
▪ unbeeinflusst oder Anstieg	0
▪ Gewichtsreduktion > 5 %	5
▪ Gewichtsreduktion > 10 %	10
▪ Gewichtsreduktion > 20 %	25
II Allgemeinzustand	
▪ Fell glatt, glänzend; Körperöffnungen sauber	0
▪ Fell stumpf, ungeordnet, ungepflegte Körperöffnungen, Augen trüb	5
▪ verklebte oder feuchte Körperöffnungen, anormale Haltung, Augen trüb; hoher Muskeltonus	10
▪ Krämpfe, Lähmungen; Tier fühlt sich kalt an, moribund	25
III Spontanverhalten	
▪ normales Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Anblasen und Berührung, Neugier, Sozialkontakte)	0
▪ ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik	5
▪ Selbstisolation, Lethargie; ausgeprägte Hyperkinetik bzw. Verhaltensstereotypen; Koordinationsstörungen	10
▪ Schmerzlaute beim Ergreifen; Autoaggression	25
IV Versuchsspezifische Kriterien	
▪ keine Auffälligkeiten	0
▪ Durchfall mit Gewichtsverlust bis ≤ 10 %	5
▪ Durchfall mit Gewichtsverlust zwischen 10 % und < 20 %	10
▪ Durchfall mit Gewichtsverlust > 20 %	25
▪ Offene Wunden im Bereich der Gelenke oder Pfoten	25
Σ	

Bewertung und Maßnahmen	Punktsumme
▪ <u>Belastungsgrad 0</u> = keine Belastung	0
▪ <u>Belastungsgrad 1</u> = geringe Belastung; sorgfältig weiter beobachten (Verkürzung der Beobachtungsintervalle)	5
▪ <u>Belastungsgrad 2</u> = mittelgradige Belastung; sorgfältig weiter beobachten bei verkürzten Beobachtungsintervallen, Versuchsleiter in Kenntnis setzen; Eradikationstherapie bei Durchfall mit Gewichtsverlust > 15 %	10-20
▪ <u>Belastungsgrad 3</u> = hochgradige Belastung; Versuch abbrechen	25 oder höher

Tabelle 3: Charakteristika der im Experiment verwendeten *Clostridioides difficile*-Stämme. Die drei Bakterienstämme zeichnen sich durch eine unterschiedliche Toxinproduktion (TcdA, TcdB), PAD-Aktivität (Citrullinierung) und klinische Symptomatik aus. (Chen et al. 2008; Tenover et al. 2011; Darkoh et al. 2015; Jafari et al. 2013; Institut für Mikrobiologie, Universität Rostock)

Stamm	Toxinproduktion	Citrullinierung	Gewichtsverlust	Epithelschaden
VPI 10463	hoch	gering	schwer	hoch
2K14	mittel	hoch	gering	sehr gering
630	niedrig	mittel	kaum	kaum

3.2 CLOSTRIDIoidES DIFFICILE-INFEKTION

Bei der Durchführung der Infektion diente zur Orientierung das etablierte Protokoll von Chen et al.

3.2.1 BAKTERIENSTÄMME

Die Stämme 630, 2K14 und VPI 10463 des Bakteriums *Clostridioides difficile* stammen von der Clostridia Research Group (University of Nottingham, Centre for Biomolecular Science, Nottingham, UK). Am Institut für Biowissenschaften der Universität Rostock erfolgte die Kultivierung in Brain Heart Infusion Solution (HiMedia Laboratories GmbH, Einhausen) versetzt mit 5g/l Hefeextrakt (Biolab Zrt. Budapest, Ungarn) unter anaeroben Bedingungen (N_2 mit max. 5% H_2) und 0,1 % L-Cystein (Acros Organics part of Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Die Stämme 630 und VPI 10463 wurden 24 h vor Inokulation bis zu einer optischen Dichte von 1,5 in BHIS kultiviert und in Aliquots à 1 ml aufgeteilt.

Der Stamm 2K14 wurde zum Zeitpunkt der mittleren logarithmischen Phase bei einer Temperatur von - 80°C in BHIS und Glycerin im Verhältnis 10:1 aufbewahrt. Direkt vor dem Zeitpunkt der Inokulation wurden die tiefgefrorenen Aliquots bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend auf geringer Stufe gevortext.

Die verwendeten *C. difficile*-Stämme unterscheiden sich in der PAD-Aktivität, der Pathogenität und der Produktion von TcdA und TcdB (s. Tabelle 3).

Tabelle 4: Verabreichte Antibiotika vor der Infektion mit *C. difficile*. Die Gabe der Antibiotika erfolgte oral über das Trinkwasser über einen Zeitraum von drei Tage. Clindamycin wurde als einmalige intraperitoneale Injektion verabreicht.

Antibiotikum	Firma	Applikation	Dosis
Kanamycin	Carl Roth, Karlsruhe	per oral	0,4 mg / ml
Colistin	InfectoPharm, Heppenheim	per oral	850 IE / ml
Vancomycin	Dr. Eberth, Ursensollen	per oral	0,045 mg / ml
Gentamicin	ratiopharm, Ulm	per oral	0,035 mg / ml
Metronidazol	Braun Melsungen AG, Melsungen	per oral	0,215 mg / ml
Clindamycin	MIP Pharma, Blieskastel-Niederwürzbach, Österreich	intraperitoneal	10 mg / kg KG

3.2.2 VORBEHANDLUNG MIT ANTIBIOTIKA

Die Ausgangssubstanzen der Antibiotika Kanamycin, Colistin und Vancomycin lagen zunächst in einem festen Aggregatzustand vor und wurden aus diesem Grunde in sterilem Wasser gelöst. Die entsprechenden Konzentrationen sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Unter Beachtung der individuellen Haltbarkeitsdauer wurden die Aliquots von Kanamycin bei - 20 °C bzw. die Aliquots von Colistin und Vancomycin bei einer Temperatur von + 4 °C gelagert. Gentamicin, Metronidazol und Clindamycin lagen bereits in gebrauchsfertigen Ampullen vor und wurden lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert.

Die Tiere erhielten an drei aufeinander folgenden Tagen über das Trinkwasser Kanamycin (0,4 mg / ml), Gentamicin (0,035 mg / ml), Colistin (850 IE / ml), Metronidazol (0,215 mg / ml) und Vancomycin (0,045 mg / ml). Diese Mischung wurde täglich neu angesetzt, um Wirkungsverlust zu vermeiden. Am vierten und fünften Tag erhielten die Tiere wieder unbehandeltes Leitungswasser um am darauffolgenden sechsten Tag eine einmalige intraperitoneale Injektion von Clindamycin (10 mg / kg KG) verabreicht zu bekommen. (s. Abbildung 4) Dafür wurde Clindamycin direkt vor der intraperitonealen Injektion auf 3 mg / ml mit steriler NaCl-Lösung verdünnt.

3.2.3 INOKULATION

Einen Tag nach der Gabe von Clindamycin wurde den Mäusen über Einführen einer Schlundsonde 10^5 CFU in einem Volumen von 200 μ l des jeweiligen *C. difficile*-Stammes verabreicht. Die Inokulationen wurden unter einer Abzugshaube und mit persönlicher Schutzausrüstung durchgeführt. Potenziell kontaminierte Oberflächen wurden anschließend mit dem sporoziden Desinfektionsmittel Dismozon® plus (Paul Hartmann AG, Heidenheim) desinfiziert.

3.2.4 ÜBERWACHUNG UND MEDIKAMENTÖSE BEHANDLUNG DER *C. DIFFICILE*-INFEKTION

Ab dem Tag der *C. difficile*-Infektion wurde jedes Tier für zehn Tage mindestens einmal täglich gewogen, um frühzeitig große Gewichtsverluste zu detektieren. Bei ersten Anzeichen der Diarrhoe und ab einem Gewichtsverlust von über 5 % wurde dem Trinkwasser 125 mg / 100 ml Metamizol zugesetzt, um eventuelle Schmerzen und Bauchkrämpfe zu minimieren.

Ein Gewichtsverlust von über 15 % war in den Experimenten ausschlaggebend für einen schweren Verlauf der CDI. Aus diesem Grunde wurde hier die Indikation zur Eradikation gestellt. Bei einem Gewichtsverlust von mehr als 20 % wurden die Mäuse von ihrem Leid erlöst und aus dem Experiment ausgeschlossen.

3.2.5 ERADIKATIONSTHERAPIE

Eine Eradikationstherapie wurde bei allen Mäusen eingeleitet, die aufgrund der CDI mehr als 15 % Gewicht, in Bezug auf das Gewicht gemessen am Tag der Infektion, verloren haben. In einer Versuchsgruppe war die Eradikationstherapie fester Bestandteil des Versuchsaufbaus und somit erhielten diese alle Mäuse drei Tage nach Infektion.

Die Eradikation umfasste insgesamt fünf Tage, an denen die Mäuse 40 mg / kg Körpergewicht Vancomycin oral über das Trinkwasser *ad libitum* erhielten. Zusätzlich wurden den Tieren am fünften Tag Stuhl von gesunden Spendermäusen transplantiert. Hierfür wurden zunächst 6 - 8 Kotpellets von gesunden Spendermäusen mit 1 ml PBS gevortext. Vom Überstand wurde pro Maus ein Volumen von 200 μ l über eine Schlundsonde verabreicht.

3.3 KOLLAGEN-INDUZIERTER ARTHRITIS

Für die Vorgehensweise der Kollagen-induzierten Arthritis dienten als Orientierung die Empfehlungen von Chondrex Inc. Hierfür erfolgte die Injektion zur Immunisierung an Tag 0 und wurde gefolgt von einer Boost-Injektion an Tag 21.

3.3.1 KOLLAGEN TYP II UND FREUNDS ADJUVANTEN

Für die Immunisierung wurde 10 mg lyophilisiertes bovines Kollagen Typ II (Chondrex Inc., WA, USA) in 5 ml 0,05 M Essigsäure mittels Magnetrührer und Rührstab bei einer Temperatur von 4 °C über Nacht gelöst. Am nächsten Morgen erfolgte das Aliquotieren der Lösung in 100 µl bis 500 µl Portionen. Die Aliquots wurden bei - 20 °C für bis zu drei Monate gelagert und bei Gebrauch auf Eis langsam aufgetaut.

Die Herstellung der Emulsion, bestehend aus der Kollagenlösung und kompletter Freund's Adjuvans (CFA) zur Immunisierung (Tag 0) bzw. inkompletter Freund's Adjuvans (IFA) zum Boost (Tag 21) erfolgte im Verhältnis 1:1. Hierfür wurden die zwei Reagenzien in zwei separaten 1 ml-Spritzen aufgezogen, welche über einen Mischadapter verbunden wurden, und unter Kühlung bis zur Erlangung einer homogenen Emulsion für eine Minute gemischt. Zur Überprüfung der Stabilität der Kollagen-CFA-Emulsion, wurde ein Tropfen davon in eine Nierenschale mit raumtemperiertem Wasser gegeben. Bei einer stabilen Emulsion schwimmen die Tropfen solide auf der Wasseroberfläche. War hingegen eine Dissoziation der Emulsion auf der Wasseroberfläche zu beobachten, war dies ein Zeichen für eine instabile Emulsion.

3.3.2 INJEKTION

Sowohl für die Immunisierung als auch für die Boost-Injektion erfolgte eine vorübergehende Fixierung der Maus in einem transparenten Restraint, welcher einen optimalen Zugang zur nicht behaarten Schwanzbasis als Injektionsort ermöglichte. Für die subkutane Applikation wurde über eine 25 G Kanüle ein Volumen von 140 µl der Emulsion verabreicht. Dies entsprach 140 µg bovinem Kollagen Typ II. Für die Boost-Injektion wurde die Einstichstelle ca. 1 cm nach distal verlagert, das applizierte Volumen und die Kollagenmenge blieben gleich.

3.3.3 SCORINGSYSTEM DER ARTHRITIS UND ANALGETISCHE BEHANDLUNG

Ab der ersten Injektion von Kollagen Typ II zur Immunisierung wurden die Tiere jeden zweiten Tag auf arthritische Beschwerden, wie Rötungen und Schwellungen, untersucht. Da mit den ersten Symptomen nach der Boost-Injektion zu rechnen war, erhielten die Mäuse ab diesen Zeitpunkt zur Analgesie Tramadol über das Trinkwasser.

Um die Krankheitsausprägung der Kollagen-induzierten Arthritis zu quantifizieren, wurde ein Score angewendet. Für eine betroffene Phalanx wurde ein Punkt vergeben, für eine betroffene Hand- bzw. Fußwurzel 5 Punkte und für ein betroffenes Hand- bzw. Sprunggelenk ebenfalls 5 Punkte. Da bei den Mäusen die Daumen nicht sehr ausgeprägt sind, war somit ein maximal erzielbarer Arthritis-Score von 58 Punkten pro Tier möglich.

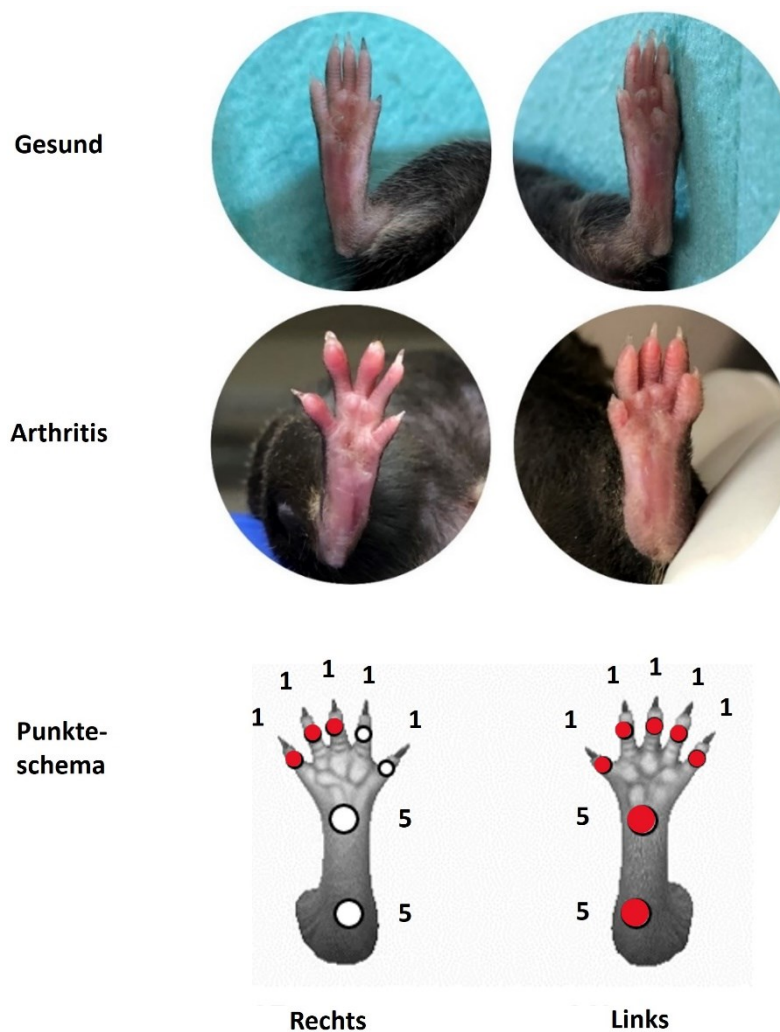


Abbildung 3: Die Arthritis wurde visuell unter Berücksichtigung eines Scores erhoben. Eine betroffene Phalanx ging mit einer Punktwertung von 1 ein, ein betroffenes Hand- beziehungsweise Fußwurzelgelenk sowie Hand- bzw. Sprunggelenk ging mit einer Punktwertung von jeweils 5 ein.

3.4 HISTOLOGIE

In Histokassetten überführt wurden die Pfoten für 14 Tage beziehungsweise der Dickdarm für zwei Tage zur Asservierung zunächst in Formaldehyd 4 % eingelegt. Bei der Präparation der Dickdärme fand die Swiss-Roll-Technik Anwendung. (Bialkowska et al. 2016) Zur weiteren Aufbewahrung wurden die Präparate für 30 min. mit Leitungswasser gespült und in Ethanol 70 % gelagert. Bei den Pfoten war vor diesem Schritt eine Knochenentkalkung mit UseDecalc® über eine Dauer von zwei Wochen notwendig. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden die Präparate in Paraffin eingebettet. Mit einem Mikrotom wurden 4 µm dicke Schnitte geschnitten, die auf Objektträgern fixiert wurden. Im weiteren Schnitt erfolgte die HE-Färbung (s. Tabelle 5).

Tabelle 5: Protokoll der Hämalaun-Eosin-Färbung (HE).

Arbeitsschritt	Reagenz	Zeit
1	Roti-Histol	10 min.
2	Roti-Histol	10 min.
3	Propanol	5 min.
4	Propanol	5 min.
5	Ethanol 96 %	5 min.
6	Ethanol 80 %	5 min.
7	Ethanol 70 %	5 min.
8	Aqua destillata	5 min.
9	Aqua destillata	5 min.
10	Hämalaun	25 sek.
11	Spülung mit Leitungswasser	30 min.
12	Aqua destillata	5 min.
13	Eosin	2 min.
14	Aqua destillata	3x eintauchen
15	Ethanol 70 % + 1 Tropfen NH ₃	3x eintauchen
16	Ethanol 80 %	5 min.

17	Ethanol 96 %	5 min.
18	Propanol	5 min.
19	Propanol	5 min.
20	Roti-Histol	5 min.
21	Roti-Histol	über Nacht
22	Eindecken mit Kandabalsam verdünnt mit Xylol	über Nacht

3.5 IMMUNHISTOCHEMIE

Tabelle 6: Protokoll der Immunhistochemischen Anfärbung von CSPG4

Arbeitsschritt	Reagenz	Zeit
1	Roti-Histol	10 min.
2	Roti-Histol	10 min.
3	Propanol	5 min.
4	Propanol	5 min.
5	96% EtOH	5 min.
6	80% EtOH	5 min.
7	70% EtOH	5 min.
8	Aqua destillata	5 min.
9	Aqua destillata	5 min.
10	Trocken wischen in der Peripherie	
11	Liquid-Blocker-Stift	
12	Waschen in Puffer A	2x 5 min., Orbitalschüttler
13	Antigenretrieval mit Trypsin-EDTA (0,05 %)	10 min. bei 37 °C im Brutschrank
14	Waschen in Puffer A	2x 5 min., Orbitalschüttler

16	Antigenblockung mit Goat Serum : Puffer B (1 : 10)	2 h in Feuchtkammer bei Raumtemperatur
17	Waschen in Puffer A	2x 5 min., Orbitalschüttler
18	Primär-AK im Kühlschrank bei 4°C	Über Nacht, 5.0 µg/ml
19	Spülen mit Puffer A	Jedes Präparat einzeln mit Pipette!
20	Waschen in Puffer A	2x 5 min., Orbitalschüttler
21	Peroxid	Jeweils 1 Tropfen pro Präparat, 15 min.
22	Waschen mit Leitungswasser	15x eintauchen
23	Waschen in Puffer A	2x 5 min., Orbitalschüttler
24	Sekundär-AK	1 h bei Raumtemperatur, 5.0 µg/ml
25	Waschen mit Puffer A	2x 5 min., Orbitalschüttler
26	DAB-Substrat	10 min. bei Raumtemperatur
27	Waschen mit Leitungswasser	15x eintauchen
28	Hämalaun	Umrühren, 50 sek. einwirken
29	Fließendes Leitungswasser	25 min.
30	Aqua dest	5 min.
31	70% EtOH	5 min.
32	80% EtOH	5 min.
33	96% EtOH	5 min.
34	Propanol	5 min.
35	Propanol	5 min.
36	Roti-Histol	5 min.
37	Roti-Histol	2 h
38	Eindecken mit Kanadabalsam	1-2 Tropfen

3.6 QUANTITATIVE REAL TIME PCR

Am Endpunkt der Experimente wurde von den Tieren sowohl inguinale als auch mesenteriale Lymphknoten entnommen und zunächst in 200 µl RNAlater (ThermoFisher) für 24 h bei einer Temperatur von 4 °C gelagert, um sie anschließend bei - 80 °C bis zur Weiterverarbeitung aufzubewahren. Für die PCR wurden die Vials mit Lymphknoten zunächst auf Eis aufgetaut und in ein Vial mit FastPrep Lysing Matrix A und 600 µl RLT-Puffer (Qiagen, Hilden, Germany) gegeben (MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege, Germany). Mittels eines Homogenisators wurde das Präparat bei 6 m / s für 45 Sekunden homogenisiert und bei 16.000 x g für 1 Minute mittels einer Microfuge 16 – Zentrifuge (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) zentrifugiert. Die Proteinextraktion erfolgte durch Hinzugeben von 600 µl Acid-Phenol : Chloroform pH 4,5 und manuellem Schütteln. Im nächsten Schritt wurde das Gemisch bei 16.000 x g für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und die RNA von der wässrigen Phase mit Hilfe von RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden, Germany) extrahiert. Der RNA-Gehalt wurde am NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gemessen. Anschließend wurde die RT-PCR mit Mastercycler gradient (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) und unter Anwendung des HighCapacity cDNA Reverse Transcription Kit Users Guide (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Die Q-PCR wurde mit ABI 7900 HT Fast Real Time PCR (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) mit Hilfe des Benutzerhandbuchs von TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Dafür wurden folgende TaqMan Gene Expression Assays benutzt: Gapdh (Mm99999915_g1), Tbx21 (Mm00450960_m1), Gata3 (Mm00484683_m1), Foxp3 (Mm00475162_m1) und Rorc (Mm01261022_m1).

3.7 SOFTWARE

Tabelle 7: Verwendete Software.

Software	Verwendungszweck
SigmaPlot	Abbildungen und Statistische Berechnungen
Microsoft Word	Anfertigung der Dissertation
Vision (Mikroskop)	Histologische Aufnahmen
NanoDrop, Thermofisher	Quantifizierung des RNA-Gehalts
Microsoft Excel	Datenarchivierung
Microsoft Powerpoint	Bearbeitung der Abbildungen
Citavi	Zitierprogramm

3.8 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die Datensätze wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Um statistische Unterschiede zwischen zwei Gruppen zu berechnen, wurden t-Tests beziehungsweise Mann-Whitney U-tests angewendet. Zum Vergleich der Gewichtsverläufe von mehr als zwei Gruppen erfolgte die Auswertung mittels One-Way ANOVA mit Post-Hoc-Tests (Tukey-Test). Mittels umgekehrter Kaplan-Meier-Kurven erfolgte die Darstellung der Inzidenz der Arthritis. Hier erfolgte der Vergleich der Versuchsgruppen untereinander mittels log-rank-Test (Mantel-Cox). Korrelationen zwischen den T-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren wurden mit dem Spearman-Test (nichtparametrisches Maß) oder Pearson-Test (parametrisches Maß) berechnet.

P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant definiert. Die dazugehörige Darstellung geschah folgendermaßen:

* $p = 0,01 - 0,05$

** $p = 0,001 - 0,01$

*** $p = 0,0001 - 0,001$

IV. ERGEBNISSE

4.1 UNTERSCHIEDLICHE KRANKHEITSAUSPRÄGUNGEN DURCH *C. DIFFICILE* VPI 10463, 2K14 UND 630

Die Suszeptibilität des DBA/1J x B10.Q-Mausstamms für die *C. difficile*-Infektion (CDI) wurde bereits durch Vorexperimente im Institut untersucht. Wie bereits in 3.2.2 erläutert wurde, erhielten die Tiere vor der Gabe der Bakterien eine Antibiotikamixtur über das Trinkwasser bzw. als intraperitoneale Injektion. Für die verschiedenen *C. difficile*-Stämme sind sowohl unterschiedliche Aktivitäten der Toxinproduktion als auch PAD-Aktivitäten bekannt (s. Tabelle 3). Im Allgemeinen ist die Toxinproduktion für die krankheitsspezifischen Symptome einer CDI verantwortlich. (Samore et al. 1994)

In den Experimenten konnten die größten Gewichtsverluste nach ca. zwei Tagen bei den Tieren verzeichnet werden, die den Bakterienstamm VPI 10463 erhielten. Im Vergleich zur Medium-Gruppe führte die VPI 10463-Infektion zu einem signifikanten Gewichtsverlust an Tag 9 ($p = 0,04$). (s. Abbildung 5) Im Durchschnitt kam es bei diesen Mäusen zu einer Gewichtsreduktion von 5 % ($SD = 4,8$). Der größte gemessene Gewichtsverlust lag in dieser Gruppe bei 13,4 %. Der Gewichtsverlust der 630-infizierten Mäusegruppe war zwar nicht signifikant, lag jedoch mit 4,0% ($SD = 2,3$) annähernd in der Größenordnung von VPI 10463.

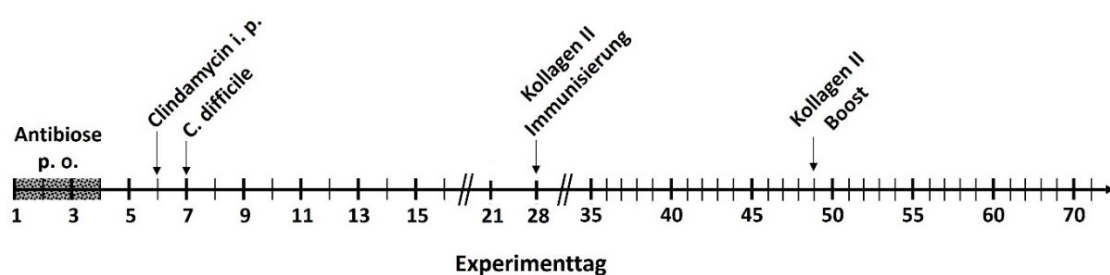


Abbildung 4: Experimenteller Aufbau im ersten Teilversuch. An den ersten drei Tagen erhielten die Mäuse eine Antibiotikamixtur über das Trinkwasser und an Experimenttag sechs eine einmalige intraperitoneale Injektion von Clindamycin (vgl. Tabelle 4). Die Infektion mit 10^5 CFU des jeweiligen *C. difficile*-Stamms (2K14, 630, VPI 10463) erfolgte an Tag sieben. Anschließend wurde durch zwei subkutane Kollagen-Typ-II-Injektionen (Experimenttag 28 bzw. 49) im Bereich der Schwanzbasis die Kollagen-induzierten Arthritis ausgelöst.

Durch die Inokulation mit dem Stamm 2K14 wurde das Gewicht mit durchschnittlich 0,3 % ($SD = 4,0$) durch die Infektion am wenigsten beeinflusst. Die Gewichtsverlaufskurve der 2K14-infizierten Mäuse unterscheidet sich dadurch nicht wesentlich von der der Medium-Gruppe. Unabhängig vom Bakterienstamm und von der Ausprägung der Gewichtsreduktion war bei allen infizierten Mäusen eine Diarrhoe als weiteres klinisches Symptom erkennbar.

Neben der klinischen Symptomatik lassen sich zwei Tage nach der Infektion mit dem Stamm VPI 10463 histopathologische Zeichen einer *C. difficile*-assoziierten Colitis anhand von H&E-Färbungen von Dickdarmpräparaten der Mäuse nachweisen (s. Abbildung 6). Im Vergleich zu gesunden Mäusen sind eine verdickte Submukosa mit Entzündungsinfiltraten und vermehrter Kapillarisation Zeichen einer Entzündungsreaktion. In der Epithelschicht weisen die zum Darmlumen gerichteten Schleimhautabschnitte Erosionen - sogenannte „summit lesions“ - auf. Ferner weisen die muzinproduzierenden Becherzellen bildmorphologisch eine reduzierte Zahl an Vesikeln auf, was für eine eingeschränkte Funktionalität der Zellen spricht.

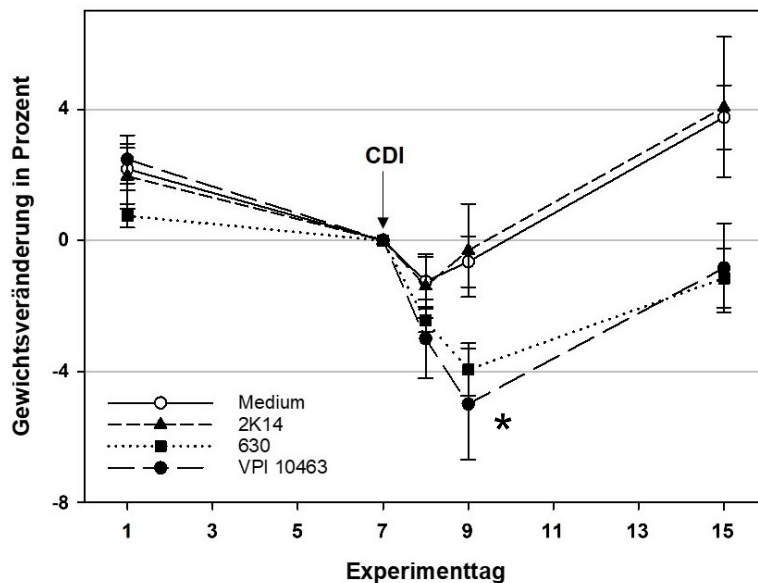


Abbildung 5: Mittelwerte (\pm SEM) der prozentualen Gewichtsveränderung der einzelnen Mäusegruppen im ersten Teilversuch. Nach vorheriger Antibiotikatherapie erhielten die Mäuse am siebten Experimenttag 10^5 CFU des jeweiligen *C. difficile*-Stamms (2K14: $n = 8$, 630: $n = 8$, VPI 10463: $n = 8$) bzw. Bakterienmedium (Medium: $n = 8$) über eine Schlundsonde. Die drei *C. difficile*-Stämme führten zu unterschiedlichen Gewichtsverlusten ein bis zwei Tage nach Infektion (CDI). Bei den VPI 10463-infizierten Mäusen war die Gewichtsveränderung signifikant im Vergleich zu den Mäusen (Medium), die nur das Bakterienmedium erhielten (* $p = 0,04$).

4.2 AUSWIRKUNGEN DER DREI *C. DIFFICILE*-STÄMME AUF DIE NACHFOLGENDE KOLLAGEN-INDUZIERT ARTHRITIS

Zum Auslösen der artifiziellen Arthritis sind zwei Kollagen Typ II-Injektionen nötig. Die Primärimmunisierung fand an Tag 28 - drei Wochen nach CDI - statt. Die zweite Injektion drei Wochen nach der Primärimmunisierung an Versuchstag 49 (s. Abbildung 4).

Bei einer Gruppengröße von acht Tieren pro Gruppe erhielten alle Tiere die Kollagen-Injektionen. Drei Mäusegruppen erhielten vor Immunisierung einen jeweiligen Clostridienstamm (s. 4.1). Zum Vergleich wurde eine Kontrollgruppe mitgeführt, in der lediglich die Arthritis ausgelöst wurde. Eine weitere Gruppe erhielt vor Induktion der Arthritis die Antibiotika, jedoch keine Clostridien, sondern lediglich 200 µl des BHIS-Nährmediums.

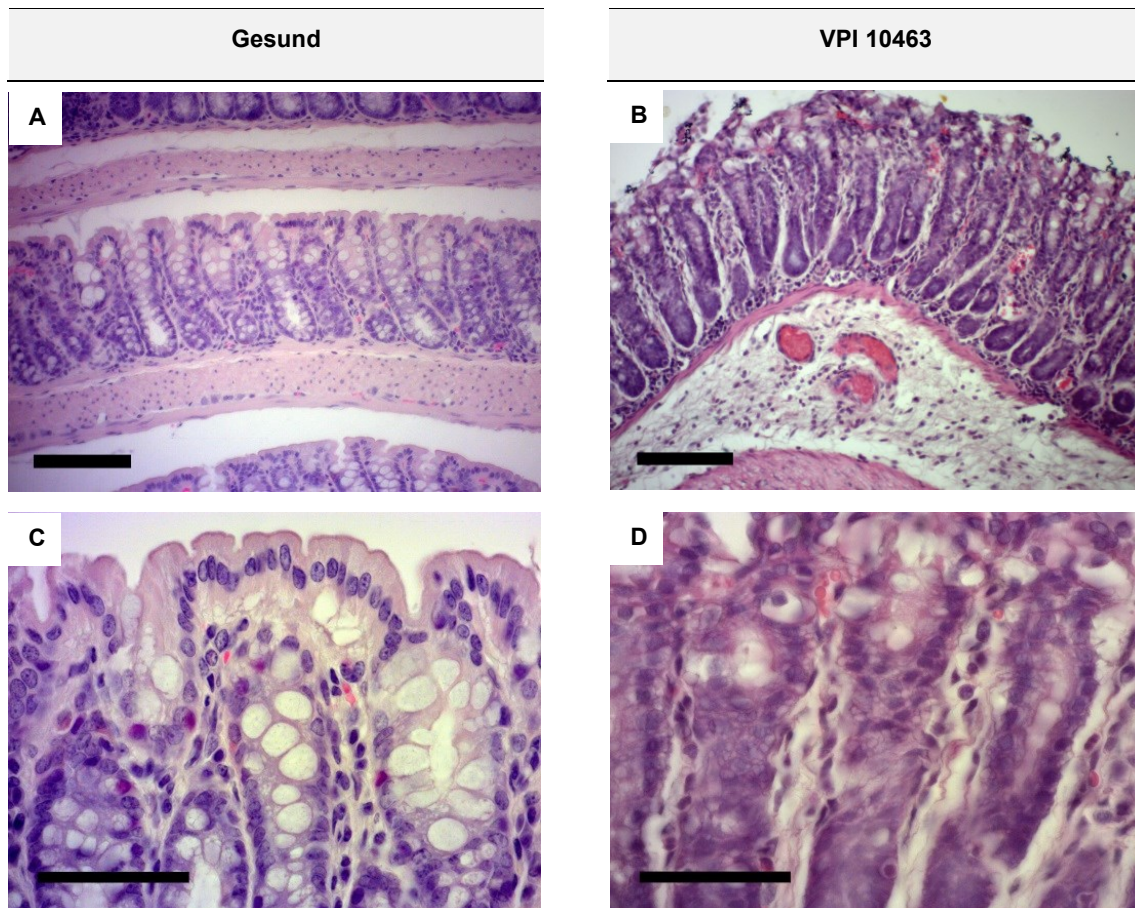


Abbildung 6: Histologische Schnitte (H&E-Färbung, 4 µm) von Dickdärmen einer gesunden (A und C) und VPI 10463-infizierten Maus (B und D). Die Infektion mit *C. difficile* VPI 10463 führt zu Erosionen des Darmepithels und Entzündungsinfiltraten im Bereich der Submukosa, die ödematös verdickt ist und dilatierte Kapillare enthält. Im Dickdarm von gesunden Mäusen lassen sich die Vesikel der Becherzellen deutlich erkennen. Die Maßstableiste entspricht in A und B 100 µm und in C und D 50 µm.

Im Experiment machte sich die CIA anschließend durch Schwellungen, Rötung und Deformitäten der betroffenen Gelenke bemerkbar (s. Abbildung 7).

Jeden zweiten Tag ab Immunisierung wurden die Tiere auf arthritische Symptome untersucht und mit Hilfe des Arthritis-Scores quantifiziert (vgl. Abbildung 3). In der Kontroll- und Medium-Gruppe manifestierte sich die Kollagen-induzierte Arthritis nach durchschnittlich 9,5 Tagen ab dem Boost. In der Kontrollgruppe erkrankten 7 von 8 und in der Medium-Gruppe 8 von 8 Mäusen an der Arthritis.

Die Mäuse, die vorher mit dem Clostridienstamm VPI 10463 infiziert wurden, erzielten einen signifikant niedrigen kumulativen Arthritis-Score im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Bezogen auf einen Beobachtungszeitraum von drei Wochen nach Boost-Injektion entwickelten sieben von acht Mäusen in der VPI10463-Gruppe keine Arthritis. Bei einer Maus in dieser Gruppe zeigten sich erste arthritische Symptome am 54. Experimenttag und entwickelte im weiteren Verlauf eine schwere CIA mit einem Arthritis-Score von 39 am Endpunkt (s. Abbildung 9 und 10).

Bei den 2K14 und 630 infizierten Mäusen erkrankten pro Gruppe jeweils 7 von 8 Tieren im Laufe des Experiments an der Kollagen-induzierten Arthritis. Der Arthritis-Score wurde in beiden Mäusegruppen nicht signifikant beeinflusst durch die Vorinfektion mit dem jeweiligen *C. difficile*-Stamm, jedoch manifestierte sich auch hier die Arthritis später. Im Mittel entwickelten sich arthritische Beschwerden nach 12,7 Tagen bei den 2K14-infizierten Mäusen bzw. nach 15,3 Tagen bei den 630-infizierten Mäusen.

Am Ende des Experiments wurden die Pfoten der Mäuse asserviert und histologische Schnittbilder angefertigt. Bei den gesunden Tieren, die als Spender für die Stuhltransplantation dienten und bei denen keine arthritischen Symptome ausgelöst wurden, zeigt sich ein intaktes Knochen- und Knorpelgewebe, das von einer erkennbaren Gelenkkapsel umgeben ist. Der Gelenkspalt stellt sich aufgrund von Präparationsartefakten verbreitert dar. (s. Abbildung 8A)

Die von der Kollagen-induzierten Arthritis betroffenen Gelenkabschnitte zeigen eine Gelenkspaltverschmälerung, Lymphozyteninfiltrate sowie Resorptionszonen, die zu einer Destruktion des Knochens und Knorpels führten. Die einzelnen gelenkbildenden Einheiten wie die Gelenkkapsel und die Synovia lassen sich bei den arthritischen Gelenken schwer abgrenzen. (s. Abbildung 8B)

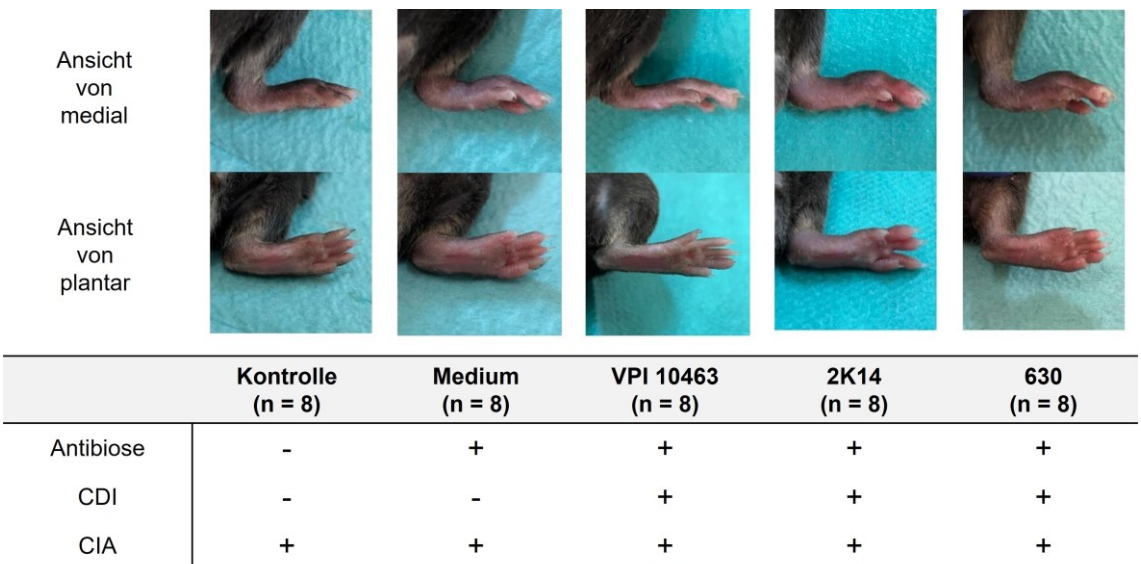


Abbildung 7: Mäusegruppen und durchgeführte Interventionen sowie repräsentative Fotos der Hinterpfoten am Endpunkt des Experiments.

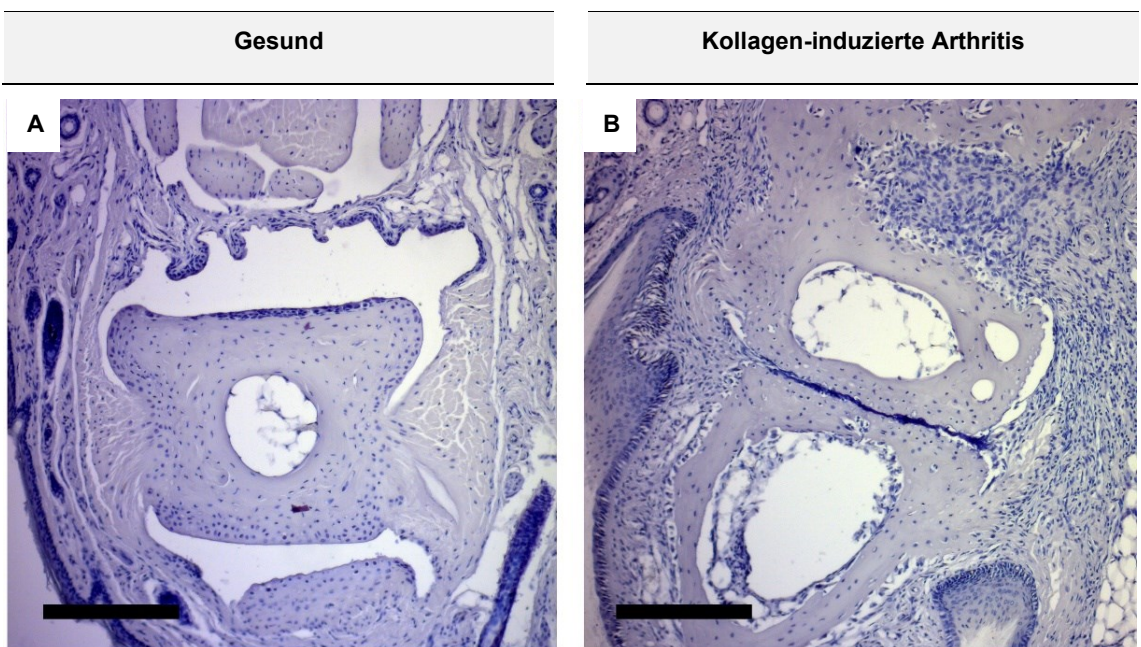


Abbildung 8: Histologische Schnitte (Hämalaun-Färbung, Dicke 4 µm) eines gesunden (A) und arthritischen (B) Interphalangealgelenks. Im gesunden Zustand zeigt sich eine glatte Knorpel- und Knochenoberfläche umgeben von einer intakten Gelenkkapsel mit regelrechter Synovia. Bei der CIA sind Entzündungsinfiltrate, Knochen- und Knorpelresorptionen sowie ein vermindelter Gelenkspalt histomorphologische Zeichen einer Entzündungsreaktion. Maßstabsleiste entspricht 200 µm.

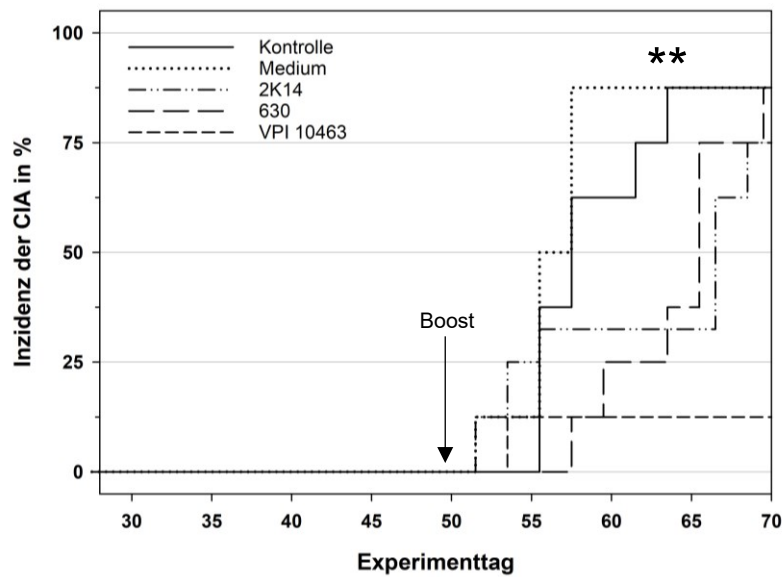


Abbildung 9: Inzidenz der Kollagen-induzierten Arthritis je Gruppe im ersten Teilversuch. An Tag 49 erhielten die Tiere die Boost-Injektion mit Kollagen Typ II. Anschließend manifestierte sich die CIA. Bei den Mäusen in den infizierten Gruppen (2K14: n = 8, VPI 10463: n = 8, 630: n = 8) zeigten sich die Symptome einige Tage später als in den nicht infizierten Gruppen (Kontrolle: n = 8, Medium: n = 8). Der *C. difficile*-Stamm VPI 10463 führte sogar zu einer erniedrigten Inzidenz der CIA. Nach Berechnung des log-rank-Test (Mantel-Cox-Test) weisen die Versuchsgruppen untereinander signifikante Unterschiede auf (** $p = 0,006$).

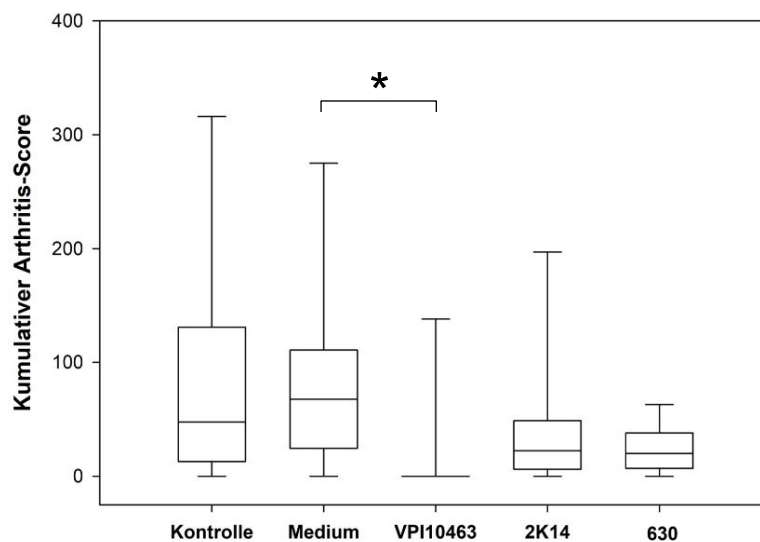


Abbildung 10: Kumulativer Arthritis-Score pro Gruppe im ersten Teilversuch. Die mit *C. difficile* infizierten Mäuse (2K14: n = 8, 630: n = 8 und VPI 10463: n = 8) haben im Vergleich zu den nicht infizierten Gruppen (Kontrolle: n = 8, Medium: n = 8) einen niedrigeren kumulativen Arthritis-Score. Nach Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Medium- und VPI 10463-Gruppe (* $p = 0,024$).

4.3 EFFEKTE EINER ERADIKATION VON VPI 10463 AUF EINE NACHFOLGENDE KOLLAGEN-INDUZIERTE ARTHRITIS

Aufgrund der signifikant positiven Effekte auf die Kollagen-induzierte Arthritis, wurden die folgenden Experimente nur mit dem *C. difficile*-Stamm VPI 10463 durchgeführt. Um herauszufinden, ob eine Eradikationstherapie nach Infektion mit dem Bakterienstamm VPI 10463 die folgende CIA beeinflusst, erhielten Mäuse in dieser Versuchsgruppe (n = 8) drei Tage nach der *C. difficile*-Infektion über einen Zeitraum von fünf Tagen eine medikamentöse Therapie mit Vancomycin oral im Trinkwasser. Am fünften Therapietag erfolgte zusätzlich eine Stuhltransplantation. Die genaue Vorgehensweise ist unter 3.2.5 beschrieben.

Nach einer Remissionszeit von 5 Tagen nach Infektion erreichten die Mäuse mit Eradikation wieder ihr Ausgangsgewicht. In der Vergleichsgruppe gelangten hingegen die Tiere nach ca. 9 Tagen in Spontanremission und glichen sich am 17. Experimenttag dem Gewichtsniveau der Eradikationsgruppe an. (s. Abbildung 12)

Am Experimenttag 28 erfolgte die Primärimmunisierung und am Tag 49 die Boost-Injektion, um die Kollagen-induzierte Arthritis auszulösen. Zu diesen Zeitpunkten waren weder bei den eradizierten noch bei den nicht eradizierten Mäusen klinische Symptome einer *C. difficile*-Infektion zu sehen. Sieben der acht Mäuse, die die Eradikation erhielten, erkrankten an der Arthritis. (s. Abbildung 13) Dabei manifestierten sich die arthritischen Symptome im Durchschnitt früher als in der Gruppe ohne Eradikation, nämlich 6,1 Tage nach der Boost-Injektion von Kollagen Typ II. In Hinblick auf den kumulativen Arthritis-Score war bei den Mäusen mit Eradikation eine signifikant höhere Punktzahl und somit ein höherer Schweregrad der Arthritis zu verzeichnen. (s. Abbildung 14)

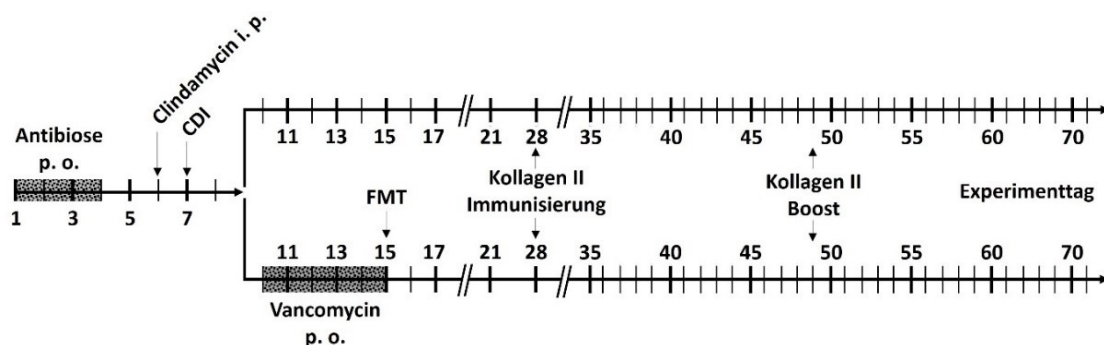


Abbildung 11: Experimenteller Aufbau im zweiten Teilversuch. Der obere Arm entspricht dem Versuchsaufbau des ersten Teilversuchs. Um nun die Auswirkungen einer Eradikationstherapie auf die CIA zu untersuchen, erhielt eine Mäusegruppe (n = 8) ab dem zehnten Experimenttag Vancomycin über das Trinkwasser sowie am 15. Tag eine Stuhltransplantation (FMT) von gesunden Spendermäusen. Anschließend wurde durch zwei subkutane Kollagen-Typ-II-Injektionen (Experimenttag 28 bzw. 49) die Arthritis ausgelöst.

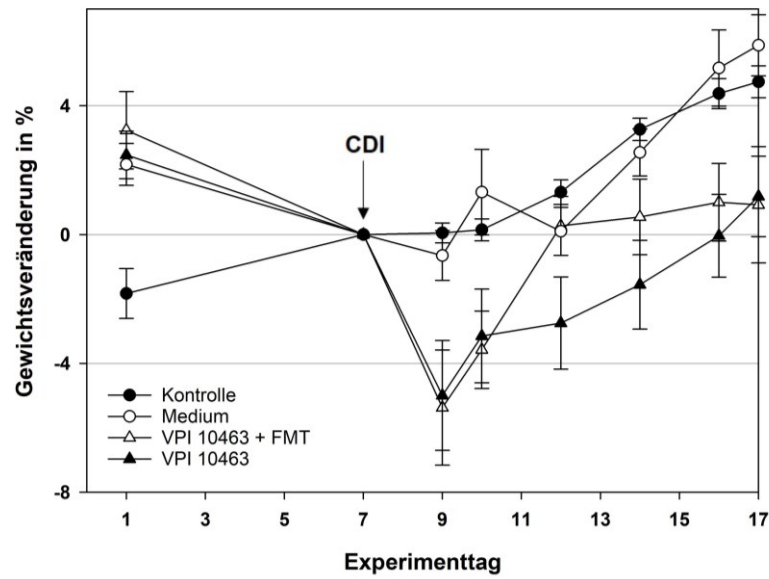


Abbildung 12: Mittelwerte (\pm SEM) der prozentualen Gewichtsveränderung der einzelnen Mäusegruppen ($n = 8$) im zweiten Teilversuch. Durch die Eradikationstherapie erlangten die Mäuse schneller ihr Ausgangsgewicht.

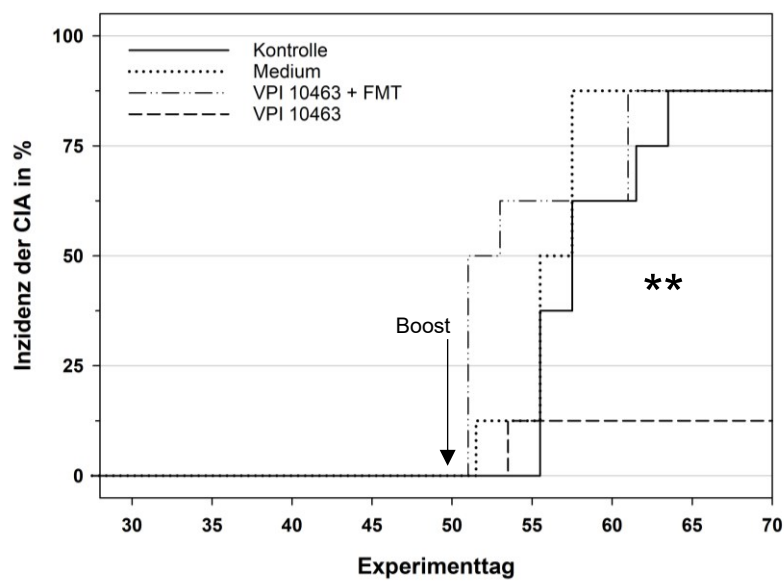


Abbildung 13: Inzidenz der Kollagen-induzierten Arthritis je Gruppe ($n = 8$) im zweiten Teilversuch. Ein Eradikation von VPI 10463 hebt dessen positiven Effekt auf die Inzidenz der CIA auf. Nach Berechnung des log-rank-Test (Mantel-Cox-Test) weisen die Versuchsgruppen untereinander signifikante Unterschiede auf (** $p = 0,008$).

4.4 T-ZELL-SUBPOPULATIONEN IN LYMPHKNOTEN

Aus den bisherigen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass eine spontane Abheilung einer Infektion mit VPI 10463 eine darauffolgende CIA abschwächt bzw. den Krankheitsausbruch verhindert. Erfolgt jedoch eine Eradikationstherapie, bestehend aus Vancomycin und einer Stuhltransplantation, zeigt sich dieser Effekt interessanterweise nicht mehr. Es muss also einen Unterschied in der Immunreaktion geben. Zur Differenzierung der unterschiedlichen T-Helferzellen (Th-Zellen) wurden die Expression der populationspezifischen Transkriptionsfaktoren in den mesenterialen und inguinalen Lymphknoten mittels PCR analysiert.

In den mesenterialen Lymphknoten von VPI 10463-infizierten Mäusen mit und ohne Eradikation lässt sich eine Überexpression von Gata3 und Foxp3 detektieren. (s. Abbildung 15) Die signifikant erhöhte Gata3-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe lässt auf eine Th2-gewichtete Immunantwort schließen. Da zwischen der individuellen Foxp3- und Gata3-Expression der VPI 10463-infizierten Tiere ohne Eradikationstherapie eine signifikant hohe Korrelation besteht, ist hier die Immunreaktion in den mesenterialen Lymphknoten von einem anti-inflammatorischen Treg-Th2-Milieu gesteuert. (s. Abbildung 16) Bei den VPI 10463-infizierten Mäusen, die anschließend die Eradikationstherapie erhielten, korrelierte die Expression von Foxp3 nicht mit der von Gata3, dafür jedoch mit der Tbx21- und Rorc-Expression. (s. Abbildung 16)

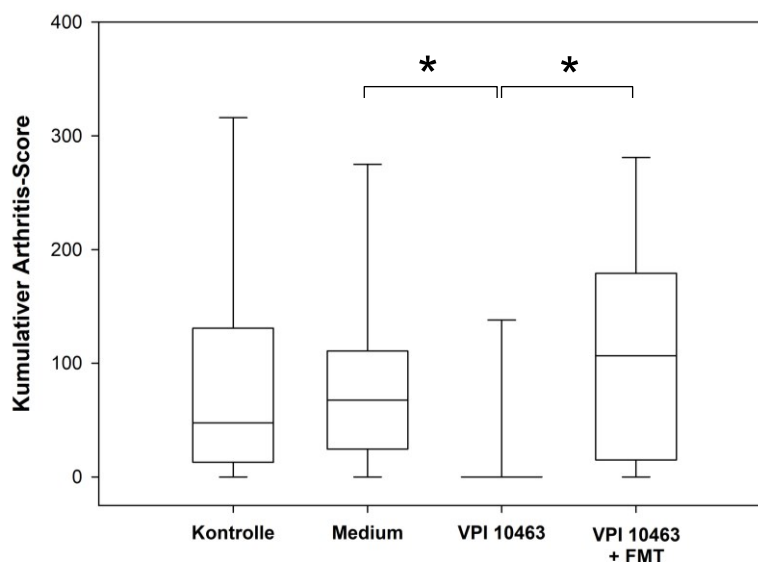


Abbildung 14: Kumulativer Arthritis-Score pro Gruppe (n = 8) im zweiten Teilversuch. Die Eradikation von VPI 10463 führt im Vergleich zur spontanen Ausheilung zu einem höheren kumulativen Arthritis-Score (n jeweils 8). Nach Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der VPI 10463- und VPI 10463 + FMT-Gruppe (* $p = 0,03$) sowie zwischen der VPI 10463- und Medium-Gruppe (* $p = 0,024$).

Tabelle 8: Übersicht der Korrelationen der T-Zell spezifischen Transkriptionsfaktoren in mesenteriale Lymphknoten der einzelnen Versuchsgruppen. Signifikante Korrelationen sind fett markiert.

	Gata3 [Δ ct]	Tbx21 [Δ ct]	Rorc [Δ ct]	Foxp3 [Δ ct]	CIA [score]
<u>Kontrolle</u>					
Gata3 [Δ ct]	1				
Tbx21 [Δ ct]	0.357/0.385	1			
Rorc [Δ ct]	0.405/0.320	0.976/0.00033	1		
Foxp3 [Δ ct]	0.786/0.021	0.571/0.139	0.619/0.102	1	
CIA [score]	0.476/0.233	-0.024/0.955	0.024/0.955	0.238/0.570	1
<u>VPI 10463 + FMT</u>					
Gata3 [Δ ct]	1				
Tbx21 [Δ ct]	6.43/0.119	1			
Rorc [Δ ct]	0.464/0.294	0.821/0.023	1		
Foxp3 [Δ ct]	0.464/0.294	0.929/0.003	0.893/0.007	1	
CIA [score]	0.286/0.535	0.286/0.535	-0.179/0.702	0.000/1.000	1
<u>VPI10463</u>					
Gata3 [Δ ct]	1				
Tbx21 [Δ ct]	0.381/0.352	1			
Rorc [Δ ct]	0.810/0.015	0.357/0.385	1		
Foxp3 [Δ ct]	0.976/0.000033	0.357/0.385	0.762/0.028	1	
CIA [score]	-0.558/0.151	-0.140/0.742	-0.482/0.226	-0.647/0.083	1

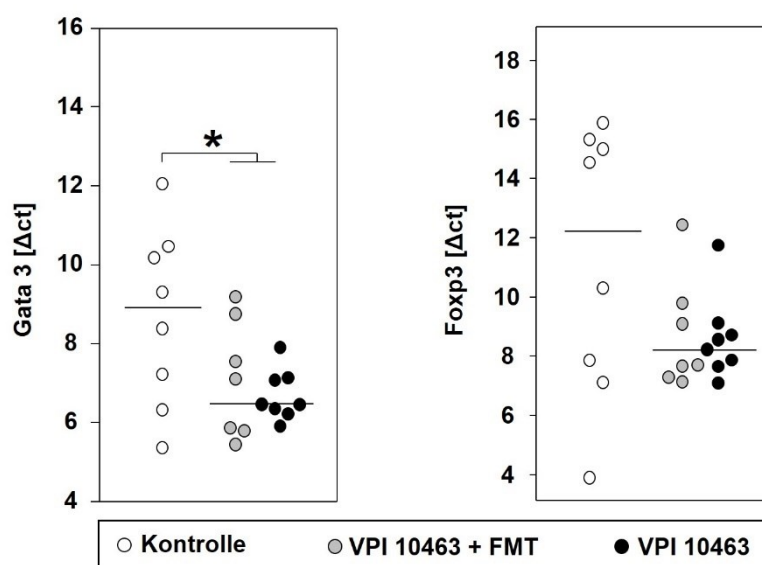


Abbildung 15: Q-PCR der T-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren in mesenterialen Lymphknoten. Jeder Punkt entspricht einer Maus. Nach Anwendung des t-Tests ergibt sich ein signifikanter Unterschied in der Gata3-Expression (* $p=0,018$)

Dies spricht für eine Th1- und Th17-Polarisation in den Mesenteriallymphknoten der Mäuse, die mit VPI 10463 infiziert wurden und anschließend die Eradikationstherapie erhalten haben. In der Mäusegruppe, bei der die Kollagen-induzierte Arthritis ohne eine vorherige CDI ausgelöst wurde, zeigte Foxp3 weder eine Korrelation mit Gata3, Tbx21 oder Rorc. Stattdessen gab es eine signifikante Korrelation der Tbx21- mit der Rorc-Expression. (s. Abbildung 16)

Die inguinalen Lymphknoten sind die drainierenden Lymphknoten der hinteren Extremität und zeigten ein signifikant erhöhtes Expressionslevel von Rorc, bei den VPI 10463-infizierten Mäusen, die frei von arthritischen Symptomen waren. (s. Abbildung 17) Bei diesen Mäusen zeigte sich auch eine erhöhte Expression von Foxp3, die nicht mit der Rorc-Expression korrelierte (s. Tabelle 9) und somit eine Polarisation der Treg-Zellen in Richtung Th17-Zellen ausschließt. Im Gegensatz dazu zeigt sich in den Mäusegruppen, die arthritische Symptome entwickelten (Kontrolle, VPI 10463 + FMT), eine Korrelation der Foxp3-Expression mit der von Tbx21 in den Inguinallymphknoten als Zeichen einer Treg-Polarisation in Richtung Th1-Zellen. (s. Abbildung 18) Zusammenfassend lassen sich die Befunde in den mesenterialen und inguinalen Lymphknoten auf eine unterschiedliche T-Zell-Polarisation zurückführen. Eine spontane Abheilung einer Infektion mit VPI 10463 führt zu einer Th2-Polarisation in den mesenterialen Lymphknoten, die Kollagen-induzierte Arthritis hingegen geht mit einer Polarisation der inguinalen Treg-Zellen in Richtung Th1-Zellen einher.

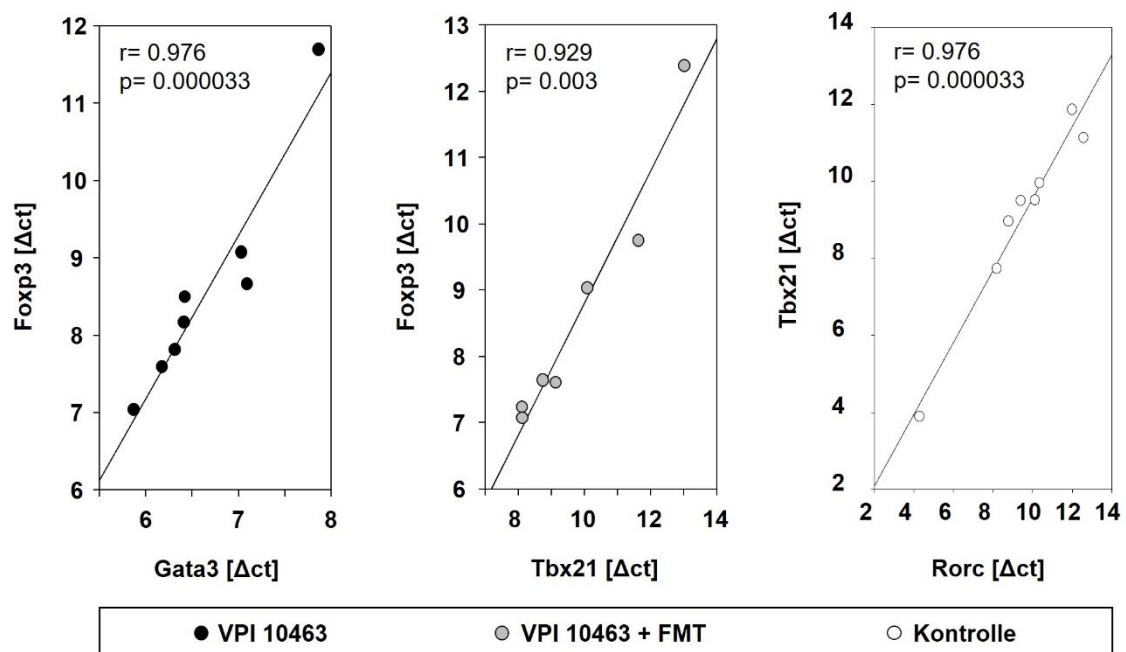


Abbildung 16: Korrelationen der T-Zell spezifischen Transkriptionsfaktoren in mesenterialen Lymphknoten. Jeder Punkt entspricht einer Maus.

Tabelle 9: Übersicht der Korrelationen der T-Zell spezifischen Transkriptionsfaktoren in inguinale Lymphknoten der einzelnen Versuchsgruppen. Signifikante Korrelationen sind fett markiert.

	Gata3 [Δ ct]	Tbx21 [Δ ct]	Rorc [Δ ct]	Foxp3 [Δ ct]	CIA [score]
<u>Kontrolle</u>					
Gata3 [Δ ct]	1				
Tbx21 [Δ ct]	0.595/0.120	1			
Rorc [Δ ct]	0.571/0.139	0.833/0.010	1		
Foxp3 [Δ ct]	0.810/0.015	0.905/0.002	0.690/0.058	1	
CIA [score]	0.762/0.028	0.643/0.086	0.429/0.289	0.738/0.037	1
<u>VPI 10463 + FMT</u>					
Gata3 [Δ ct]	1				
Tbx21 [Δ ct]	0.524/0.183	1			
Rorc [Δ ct]	0.429/0.289	0.857/0.007	1		
Foxp3 [Δ ct]	0.643/0.086	0.929/0.001	0.881/0.004	1	
CIA [score]	0.667/0.071	0.214/0.610	0.381/0.352	0.524/0.183	1
<u>VPI10463</u>					
Gata3 [Δ ct]	1				
Tbx21 [Δ ct]	0.143/0.760	1			
Rorc [Δ ct]	0.000/1.000	0.857/0.014	1		
Foxp3 [Δ ct]	0.607/0.148	0.286/0.535	0.464/0.294	1	
CIA [score]	-0.519/0.233	-0.445/0.317	-0.556/0.195	-0.334/0.465	1

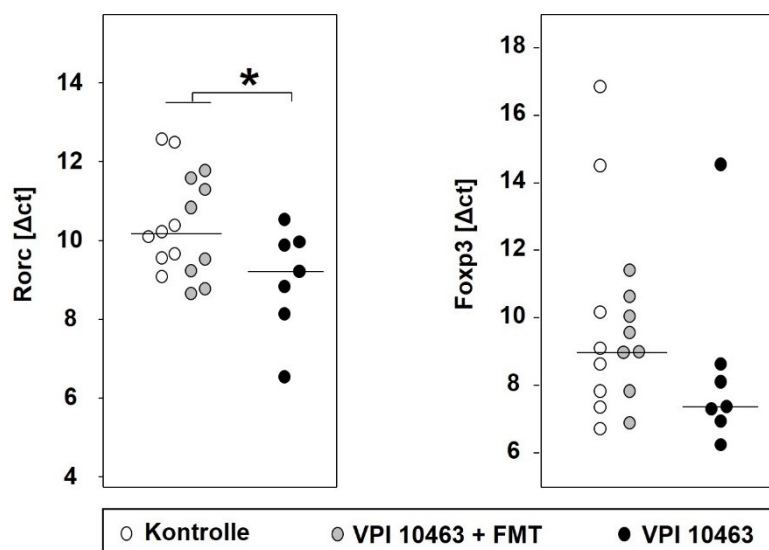


Abbildung 17: Q-PCR der T-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren in inguinale Lymphknoten. Jeder Punkt entspricht einer Maus. Nach Anwendung des t-Tests ergibt sich ein signifikanter Unterschied in der Rorc-Expression (* $p=0,0325$)

4.5 THERAPEUTISCHES POTENZIAL EINER INFektion MIT VPI 10463 BEI EINER MANIFESTEN KOLLAGEN-INDUZIERTEN ARTHRITIS

In den vorherigen Experimenten ergab sich ein positiver Einfluss auf die CIA, wenn eine Vorinfektion mit dem *C. difficile*-Stamm VPI10463 stattfand und spontan abheilte. Im nächsten Schritt sollte herausgefunden werden, ob Mäuse, die bereits an einer manifesten CIA leiden, ebenfalls von einer Infektion mit dem VPI 10463 profitieren. Es wurde in diesem Versuchsabschnitt wieder mit einer Gruppengröße von acht Mäusen pro Gruppe gearbeitet. Alle Mäuse erhielten die Kollagen-Typ II-Injektionen an Tag 1 und 22. In den darauffolgenden Wochen manifestierten sich bei 23 der 24 Mäuse die arthritischen Beschwerden durchschnittlich nach 9 Tagen, gemessen ab der Boost-Injektion.

An Tag 49, also ca. 4 Wochen nach der Boost-Injektion mit Kollagen Typ II, erhielt ein Teil der Tiere 10^5 CFU des *C. difficile*-Stamms VPI 10463 über die Schlundsonde. Die antibiotische Therapie vor Infektion bestand wie in den vorherigen Telexperimenten aus den in Tabelle 4 genannten Antibiotika für drei Tage über das Trinkwasser und einer intraperitonealen Injektion von Clindamycin an Tag 48. (s. Abbildung 19)

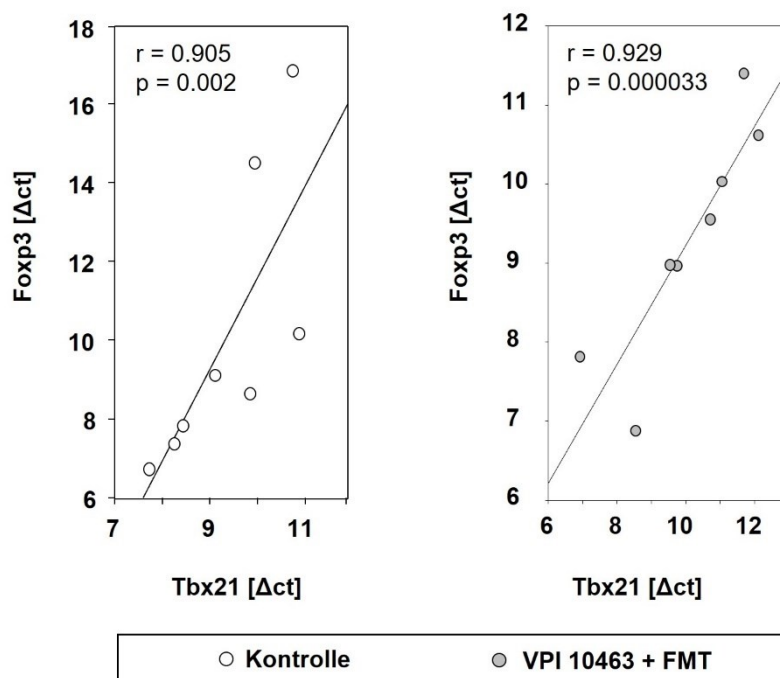


Abbildung 18: Korrelationen der T-Zell spezifischen Transkriptionsfaktoren in inguinale Lymphknoten. Jeder Punkt entspricht einer Maus.

Die Medium-Gruppe in diesem Versuchsaufbau erhielt nach der Antibiotikaperiode an Tag 49 lediglich das BHIS-Nährmedium. In der Kontrollgruppe wurde nur die Arthritis induziert, ohne einer darauffolgenden Intervention.

Abbildung 20 zeigt den Quotienten aus der AUC des Arthritis-Scores von Tag 50 - 77 und der AUC des Arthritis-Scores von Tag 22-49 der jeweiligen Versuchsgruppe. Die Infektion mit dem *C. difficile*-Stamm VPI 10463 führte bei den Mäusen zu einer Exazerbation der Arthritis um den Faktor sechs. Im Vergleich dazu wiesen die Tiere, die lediglich die Antibiose und das Bakterienmedium erhielten, eine Verdoppelung des Arthritis-Scores auf. In der Kontrollgruppe, die keine Intervention erfuhr, veränderte sich die AUC des Arthritis-Scores um durchschnittlich 1,35.

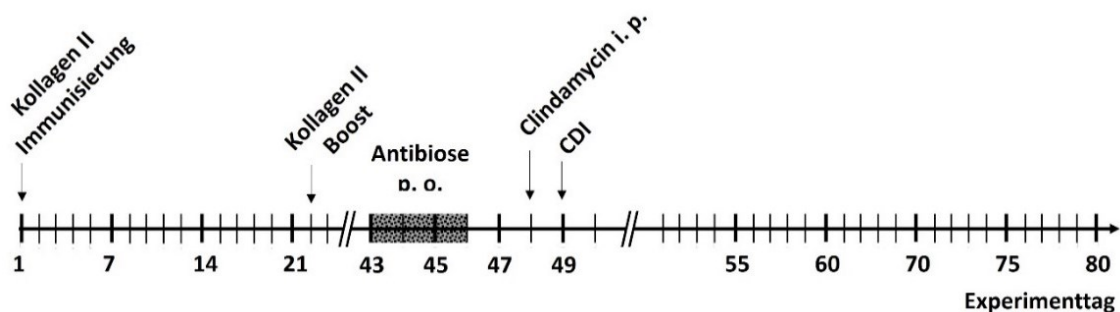


Abbildung 19: Experimenteller Aufbau im dritten Teilversuch. Bei einer manifesten Arthritis erhielten die Mäuse der VPI 10463-Gruppe (n=8) die antibiotische Mixtur über das Trinkwasser und an Tag 49 die Clostridien. Die Medium-Gruppe (n=8) erhielt die Antibiose und das BHIS-Nährmedium ohne Clostridien. Bei der Kontroll-Gruppe (n=7) wurde lediglich die Kollagen-induzierte Arthritis ausgelöst ohne weitere Intervention.

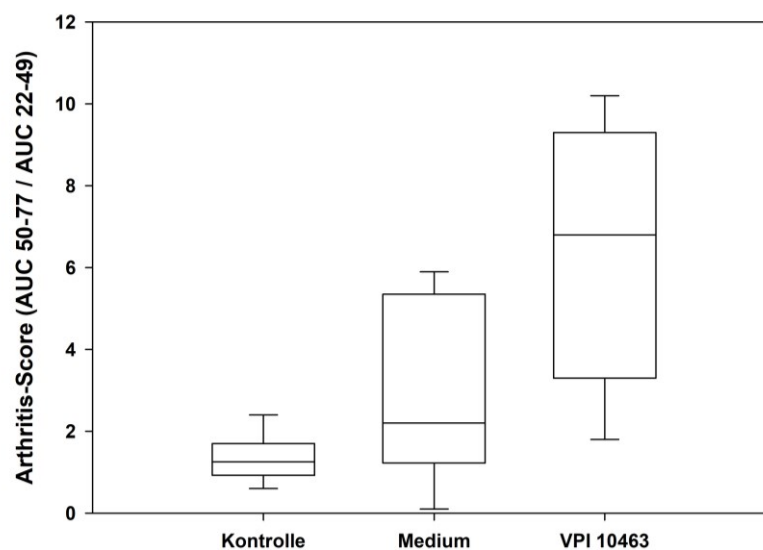


Abbildung 20: Boxplot zeigt den Faktor, um wieviel sich der Arthritis-Score durch die jeweilige Intervention (Medium, Infektion mit VPI 10463) erhöht. (Kontrolle n = 7, Medium: n = 8 und VPI 10463: n = 8)

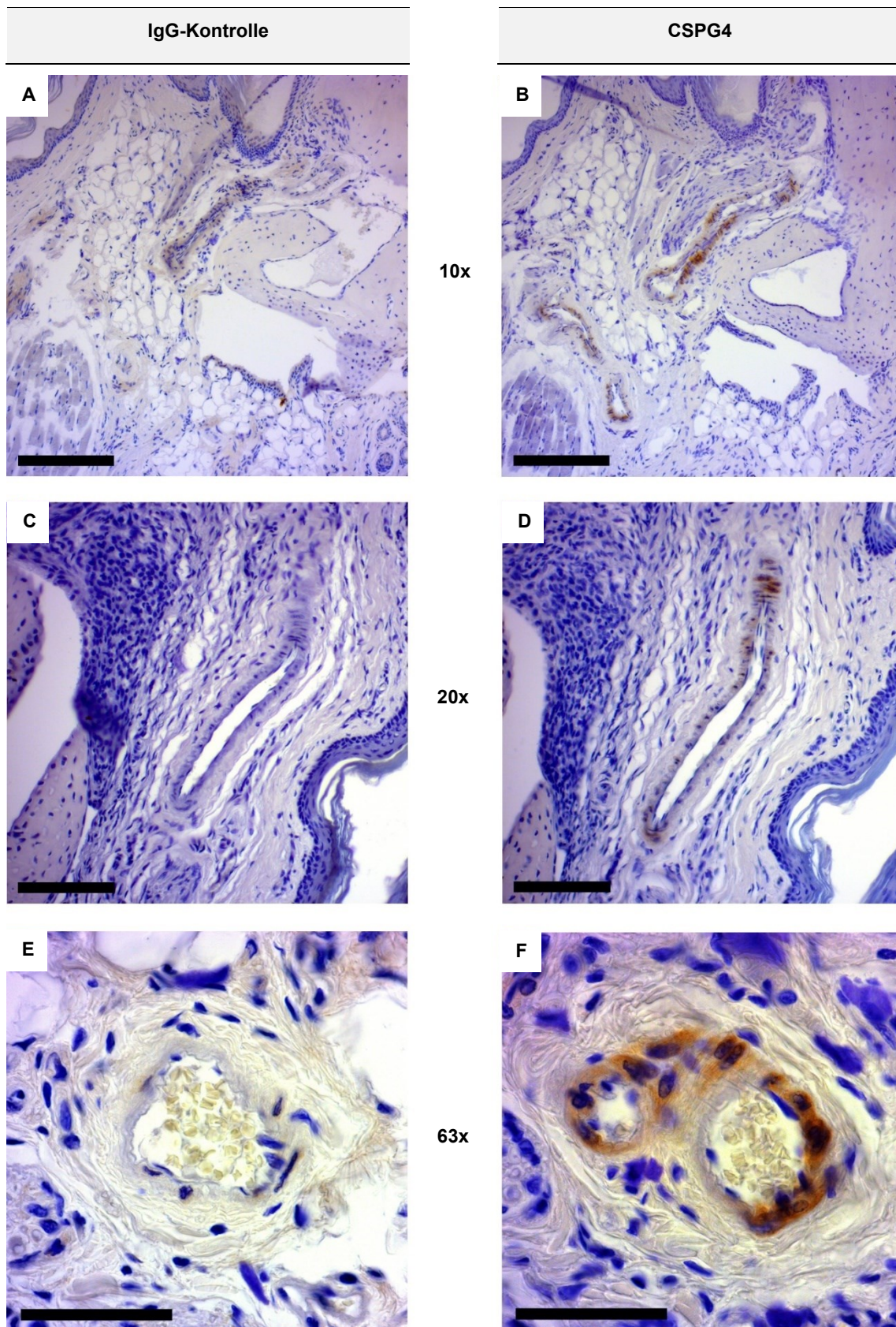


Abbildung 21: Immunhistochemische Darstellung von CSPG4 anhand Gewebepräparaten von Mäusepfoten. Vergrößerung in A und B 10-fach, in C und D 20-fach sowie in E und F 63-fach. Der Maßstabballen beträgt in A und B 200 µm, in C und D 100 µm sowie in E und F 50 µm.

4.6 IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON CSPG4

Von formalinfixierten Vorder- und Hinterpfoten wurden zum Nachweis von Chondroitinsulfate-Proteoglykan 4 (CSPG4) immunhistochemische Präparate angefertigt. Dafür wurden aus der jeweiligen Mäusegruppe vier Tiere ausgewählt, die am stärksten von der Arthritis betroffen waren. Die Arbeitsschritte sind dem Protokoll unter 3.5 zu entnehmen. Bei mikroskopischer Betrachtung konnte in allen Tieren das Antigen CSPG4 in den Wänden von Blutgefäßen detektiert werden. Bei den Gefäßen handelt es sich um sowohl arterielle als auch venöse Gefäße, die den typischen dreischichtigen Wandaufbau zeigen. Die CSPG4-positiven Zellen liegen der Intima bestehend aus Endothelzellen auf und sind ungleichmäßig in den Gefäßwänden verteilt. (s. Abbildung 21)

Zudem ist erkennbar, dass die Blutgefäße in der näheren Umgebung der Gelenke lokalisiert sind. Abbildung 21B zeigt exemplarisch den Nachweis von CSPG4 in direkter Lokalisation eines arthritischen Gelenks. Im Knochen- oder Knorpelgewebe konnte CSPG4 bei den Mäusen immunhistochemisch nicht nachgewiesen werden.

V. DISKUSSION

Die unklare Genese der rheumatoiden Arthritis (RA) ist Grundlage vieler Forschungstätigkeiten. Das intestinale Mikrobiom erlangt dabei immer mehr Aufmerksamkeit, da es über zum Teil unbekannte Mechanismen der Darm-Gelenk-Achse Einfluss auf Gelenkerkrankungen nehmen kann (vgl. 2.3). Veränderungen des komplexen Mikrobioms des Darms werden beim Menschen aber auch in tierexperimentellen Studien nach heutigem Kenntnisstand mit der RA bzw. CIA in Verbindung gesetzt. (Vaahtovuori et al. 2008; Wu et al. 2010; Rooney et al. 2020)

Um spezifische Aussagen über die Auswirkung auf Gelenkerkrankungen ziehen zu können, ist der Fokus auf einzelne Bestandteile und Mikroben der Darmflora notwendig.

In dieser experimentellen Arbeit wurde erstmals der Einfluss dreier Stämme des Darmbakteriums *C. difficile* auf die Kollagen-induzierte Arthritis im Mausmodell untersucht. Unterteilt in drei Einzelexperimente, sollten die Auswirkungen einer Infektion vor und nach Auslösen der arthritischen Symptome sowie die Einflüsse einer Eradikationstherapie auf die Arthritis beleuchtet werden.

Die *C. difficile*-Infektion als Ursache einer Colitis und Darmbarrierestörung

Im ersten Teil der Versuche wurden jeweils acht DBA/1 x B10.Q F1-Mäuse nach vorheriger antibiotischer Therapie mit 10^5 CFU des jeweiligen *C. difficile*-Stamms 2K14, 630 und VPI 10463 infiziert, die zu einer unterschiedlichen Ausprägung der klinischen Symptomatik und des Gewichtsverlustes bei den Tieren führten. Die verwendeten *C. difficile*-Stämme weisen unterschiedliche Charakteristika bezüglich der Citrullinierung und der Virulenzfaktoren auf (vgl. Tabelle 3). (Chen et al. 2008; Tenover et al. 2011; Darkoh et al. 2015; Jafari et al. 2013)

Bei dem Stamm VPI 10463 waren dabei die größten Gewichtsverluste zu verzeichnen, gefolgt vom *C. difficile* Stamm 630. VPI 10463, der durchaus eine hohe Toxinproduktion besitzt, zeigte bei den mit diesem Stamm infizierten Mäusen auch die höchsten Gewichtsverluste. Der Stamm 630 produziert die geringste Toxinmenge im Experiment, führte jedoch bei den Tieren ebenfalls zu einer nennenswerten Gewichtsreduktion. Der Stamm 2K14 hingegen zeigte nur eine geringe Krankheitslast bei den damit infizierten Mäusen, trotz einer berichteten mittelgradigen Toxinproduktion. Ein Zusammenhang mit der quantitativen Toxinproduktion und der Ausprägung des Gewichtsverlustes in den Versuchen lässt sich nicht eindeutig herstellen. Die Pathogenität und die Virulenz eines

C. difficile-Stamms korreliert bekanntermaßen nicht ausschließlich mit der Toxinproduktion und ist von weiteren Faktoren, wie der Geschwindigkeit der Sporenbildung und deren Auskeimung, abhängig. (Borriello et al. 1987; Hammond und Johnson 1995; Braun et al. 1996; Merrigan et al. 2010; Carlson et al. 2015) Zudem wurde 2K14 im Gegensatz zu VPI 10463 und 630 tiefgekühlt bei - 80 °C in Vials gelagert und direkt vor Inokulation bei Zimmertemperatur aufgetaut. Fehlerquellen sind hier nicht auszuschließen, auch wenn vorherige Untersuchungen Instituts für Mikrobiologie der Universität Rostock keinen Einfluss durch die tiefgefrorene Lagerung auf die Stabilität der Sporen gezeigt haben.

Neben den klinischen Symptomen zeigen sich durch eine VPI 10463-Infektion typische histopathologische Veränderungen einer Colitis mit Erosionen der Schleimhaut, Schwellung der Submukosa und Entzündungsinfiltraten (s. Abbildung 6). Der Nachweis mittels ELISA der *C. difficile* Toxine aus dem Kot der Mäuse, war in unseren Experimenten leider nicht weiterführend und ist aus diesem Grund hier nicht weiter erläutert. Dennoch sind die morphologischen Veränderungen der Dickdarm-Histologie Zeichen einer erfolgreichen *C. difficile*-Infektion. (Steele et al. 2010; Carter et al. 2015)

Der Wirkungsbereich von *C. difficile* VPI 10463

Um anschließend arthritische Beschwerden, ähnlich einer rheumatoiden Arthritis, bei den Mäusen zu simulieren, erfolgten drei Wochen nach Gabe der Bakterien zwei subkutane Injektionen von bovinen Kollagen Typ II. Die Mäuse zeigten nach einer spontanen Abheilung der CDI insbesondere bei dem *C. difficile*-Stamm VPI 10463 keine bzw. abgeschwächte arthritische Symptome im Vergleich zu den Kontrollgruppen. In den Experimenten äußerte sich dies durch eine signifikant erniedrigte Inzidenz und einer geringeren Punktzahl des Arthritis-Scores. Dieses Ergebnis stellt den aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnisstand in Frage, der eine Verschlechterung der arthritischen Symptome durch PAD-exprimierende Mikroben postuliert. (Maresz et al. 2013)

In einer anderen Publikation hingegen konnte mittels einer Dextransulfat-Natrium-induzierte Colitis ebenfalls eine Abschwächung der arthritischen Symptome bei Mäusen beobachtet werden. (Hablott et al. 2017) Auch wenn bei Hablott et al. keine spezifischen Erreger involviert waren, lässt dies Raum für Spekulationen zu, in dem eine Darmbarrierestörung – wie sie auch durch die Infektion mit *C. difficile* in unserem Experiment auftrat – die Gelenke vor einer Arthritis schützt.

In vorherigen Versuchen der Arbeitsgruppe Klinische Immunologie Rostock führt *C. difficile* zu einer schnelleren Wiederherstellung der ursprünglichen Zusammensetzung der Darmflora. Die Ergebnisse dieser Mikrobiomanalysen wurden in einer gemeinsamen Publikation veröffentlicht und sind aufgrund der identischen Vorgehensweise der *C. difficile*-Infektion auf die vorliegende experimentelle Arbeit übertragbar. (Schmidt et al. 2020)

Auch wenn *C. difficile* VPI 10463 sich aufgrund der pathologischen Eigenschaften schlecht den Probiotika zurechnen lässt, schützt es wie das gram-positive Bakterium *Lactobacillus casei* durch eine Wiederherstellung einer gestörten Darmflora vor einer Arthritis im Tierexperiment. (Pan et al. 2019)

Modulation der CIA durch T-Zellen und CSPG4 als Bestandteile der Darm-Gelenk-Achse

Einen ersten Anhaltspunkt auf immunologischer Ebene liefern die Expressionslevel der T-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren in den mesenterialen Lymphknoten der VPI 10463-infizierten Mäuse, die eine erhöhte Anzahl von Foxp3- und Gata3-positiven Zellen aufweisen. Foxp3-exprimierende Treg-Zellen spielen eine besondere Rolle bei der Progression von Autoimmunerkrankungen wie der RA. (Attias et al. 2019; Qiu et al. 2020) Durch die spontane Abheilung der CDI scheint dort ein anti-inflammatorisches Milieu bestehend aus Treg- und Th2-Zellen zu herrschen. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem von Atarashi et al., wo gezeigt werden konnte, dass bei Mäusen mittels der oralen Gabe einer festgelegten Mischung von *C. difficile*-Stämmen die Anreicherung von Treg-Zellen und TGF β im Dickdarm induziert werden konnte. (Atarashi et al. 2011)

Zur Treg-Differenzierung im Colon trägt auch die von Mikroben der kommensalen Darmflora gebildete kurzkettige Fettsäure Butyrat bei. (Furusawa et al. 2014) Auch wenn *Clostridien ssp.* zur Produktion von Butyrat in der Lage sind (Vital et al. 2017), ist für die *C. difficile*-Stämme VPI 10463, 2K14 und 630 unklar, ob über diesen Mechanismus der Anstieg der Foxp3-positiven Treg-Zellen und Gata3 in den mesenterialen Lymphknoten zu erklären ist. Denkbar wäre zudem eine indirekte Stimulation der Treg-Differenzierung durch Beeinflussung der Expression von TcdA und TcdB. (Smits et al. 2016) Laut unseren Untersuchungen ist dabei eine hohe Toxinproduktion notwendig, da nur der VPI 10463 zu einem signifikant geringeren Arthritis-Score bei den Mäusen führte.

Darüber hinaus entfalten TcdA und TcdB auf direkten Weg durch rezeptorabhängige Endozytose ihre Wirkung und können im Rahmen einer CDI über die Blutbahn systemische Manifestationen verursachen. (Steele et al. 2012) Dass sich über diesen Mechanismus neben der Treg-Polarisation die Ausprägung der CIA durch die von *C. difficile* produzierten Toxine beeinflussen lässt, kann in unserer experimentellen Arbeit nur vermutet werden. Nichtsdestotrotz ist das Rezeptormolekül CSPG4, über welches das *C. difficile* Toxin B in die Zelle aufgenommen wird (Yuan et al. 2015), bei unseren Mäusen immunhistochemisch in wandbildende Zellen der Blutgefäße nachweisbar. Bei diesen Zellen ist aufgrund der Lokalisation und der Beziehung zu den Endothelzellen von Perizyten auszugehen, für die CSPG4 zusammen mit PDGFR β ein spezifischer Marker ist. (Attwell et al. 2016) Zugleich wird CSPG4 physiologisch von Zellen unterschiedlicher Organsysteme, wie dem zentralen Nervensystem, der Haut, dem Gastrointestinaltrakt, in Gelenken sowie von Makrophagen exprimiert. (Midwood und Salter 1998; Jones et al. 2002; Legg et al. 2003; Tao et al. 2016) Bei Mäusen hingegen lässt sich CSPG4 in Knorpel- und Knochenzellen ausschließlich im präpubertären Alter finden und scheint Aufgaben bei der primären Ossifikation zu haben. (Fukushi et al. 2003) Dies erklärt zudem, warum CSPG4 nicht im Knorpel- und Knochengewebe der im Experiment verwendeten Mäuse detektiert wurde, da es sich um adulte Tiere handelte.

Weitaus wichtiger zur Einordnung unserer Ergebnisse ist, dass Perizyten unter anderem bei der Transmigration von Leukozyten aus dem intravasalen Raum in entzündetes Gewebe beteiligt sind, mit T-Zellen interagieren und deren Verhalten bezüglich inflammatorischer Reaktionen verändern. (Proebstl et al. 2012; Pober und Tellides 2012) Inwiefern TcdB über CSPG4 zu einer Hemmung der Transmigration von Leukozyten beitragen oder T-Zellen in eine Anergie bringen kann ist unklar. Die transvasale Rekrutierung von Immunzellen ist für lokale Entzündungsprozesse im peripheren Gewebe jedoch von großer Bedeutung. (Pober und Tellides 2012) Tatsächlich sind Perizyten nicht nur in der Lage durch Interaktionen mit Immunzellen Entzündungsprozesse zu regulieren, sie stellen bei der rheumatoiden Arthritis auch ein therapeutisches Ziel dar. (Ross et al. 2019)

Therapeutisches Potenzial von *C. difficile* in Bezug auf eine manifeste CIA

Im dritten Teil der Experimente konnte die Hypothese, dass eine Infektion mit *C. difficile* ein therapeutisches Potenzial in Bezug auf eine bereits manifeste Arthritis habe, zunächst nicht bestätigt werden. Die Ursache dafür könnte in einer zweiphasig ablaufenden Immunreaktion begründet sein, bei der die initiale proinflammatorische Reaktion

durch immunogene Proteine an der Zelloberfläche von *C. difficile* (Awad et al. 2014) den positiven Effekt auf die CIA gewisser Maßen kaschierte. Im Gegensatz zu den Mäusen, bei denen die Infektion vor Auslösen der Arthritis spontan abheilen konnte, hat sich nach einem längeren Zeitraum ein antiinflammatorisches Milieu, dominiert von Treg-Zellen, gebildet.

Diese Theorie wird gestützt durch die Resultate im zweiten Teil dieser experimentellen Arbeit, in der gezeigt werden konnte, dass das Vorhandensein der vegetativen Form von *C. difficile* über einen längeren Zeitraum im Organismus ausschlaggebend ist. Nach einer Eradikation mittels Vancomycin und Stuhltransplantation drei Tage nach Infektion der Mäuse mit *C. difficile* VPI 10463 kam es interessanterweise nicht mehr zu einer Abschwächung der nachfolgenden arthritischen Symptome, gemessen am klinischen Arthritis-Score, und zu einer vergleichbaren Inzidenz wie bei den Kontrollgruppen. Auch das inflammatorische Milieu in den mesenterialen Lymphknoten scheint sich dadurch in eine Polarisation der Treg-Zellen in Richtung einer Th1-Antwort entwickelt zu haben.

Ausblick

Zusammenfassend kommt in unseren Experimenten die Treg-Polarisation in den mesenterialen Lymphknoten sowie die immunmodulatorischen Eigenschaften von CSPG4-positiven Perizyten als Faktoren in Frage, die zur Abschwächung der arthritischen Symptome bei den *C. difficile* VPI 10463-infizierten Mäusen beigetragen haben könnten. Zugegebenermaßen bleibt bei dieser Studie unklar, ob es durch eine Translokation von mesenterialen Treg-Zellen oder durch Einfluss von TcdB an CSPG4-tragende Perizyten zu dem beobachteten Effekt kam. Die in unseren Versuchen durch *C. difficile* ausgelöste Darmbarrierestörung kommt allerdings hierfür als Voraussetzung in Betracht. (Deng et al. 2018; Ghosh et al. 2020) Der Nachweis der *C. difficile*-Toxine im Blut der Tiere könnte an dieser Stelle für Klarheit sorgen. Wenn TcdB über diesen Mechanismus ins Blutsystem gelangte und zu einer Abschwächung der CIA bei den Mäusen führte, müsste eine intravenöse Injektion des Toxins zu einer ähnlichen Wirkung führen. In diesen Zusammenhang stellt CSPG4 auf molekularer Ebene ein potenzielles Verbindungsstück zwischen dem Bakterium *C. difficile* und der Pathogenese der Arthritis dar. Um dem Proteoglykan eine direkte Beteiligung zuzuschreiben, sind allerdings weitere Studien notwendig. Dieser Unklarheit könnte nachgegangen werden, indem man den ersten Teilversuch dieser Arbeit mit Tieren durchführt, die den Rezeptor für TcdB nicht exprimieren.

Mit Hilfe weiterer Experimente kann zudem der Frage nachgegangen werden, ob andere Erreger einer gastrointestinalen Infektion zu einer ähnlichen Abschwächung der arthritischen Symptome führen. Abgesehen von *C. difficile* gibt es in der aktuellen wissenschaftlichen Literatur lediglich Versuche, bei denen eine Entzündung des Gastrointestinaltrakts ohne mikrobielle Erreger hervorgerufen wurde. Eine Treg-Polarisation konnte dabei trotzdem beobachtet werden. Diesbezüglich erfordert das Verständnis der Wechselwirkungen zwischen der *C. difficile*-assoziierten Colitis und der Kollagen-induzierten Arthritis sowie der zugrundeliegenden immunologischen Prozesse weitere Untersuchungen.

VI. THESEN

- Die Infektion mit *C. difficile* führt bei Mäusen zu einer Durchfallerkrankung, die mit einem Gewichtsverlust einhergeht
- Die drei verwendeten *C. difficile*-Stämme VPI 10463, 630 und 2K14 führen zu einer unterschiedlichen Ausprägung der Symptome.
- Eine Infektion mit dem *C. difficile*-Stamm VPI 10463 führt zu einer signifikant niedrigeren Inzidenz und Ausprägung der nachfolgenden Kollagen-induzierten Arthritis.
- Ein Zusammenhang zwischen Toxinproduktion und der Krankheitsausprägung der Kollagen-induzierten Arthritis lässt sich nicht eindeutig ableiten.
- Eine Eradikation von *C. difficile* VPI 10463 – bestehend aus Vancomycin und einer Stuhltransplantation – hebt die positiven Effekte auf die Kollagen-induzierte Arthritis auf.
- Eine Infektion mit VPI 10463 hat kein therapeutisches Potenzial in Bezug auf eine manifeste Kollagen-induzierte Arthritis.
- Eine Infektion mit VPI 10463 führt zu einer Treg-Polarisation in Richtung Th2-Antwort in den mesenterialen Lymphknoten.
- Das Leiden an der Kollagen-induzierte Arthritis führt zu einer Treg-Polarisation in Richtung Th1-Zellen in den inguinalen Lymphknoten.
- Der TcdB-Rezeptor CSPG4 lässt sich bei DBA/1 x B10.Q F1-Mäusen immunhistochemisch in den Wänden von Blutgefäßen detektieren.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Abdollahi-Roodsaz, Shahla; Joosten, Leo A. B.; Koenders, Marije I.; Devesa, Isabel; Roelofs, Mieke F.; Radstake, Timothy R. D. J. et al. (2008): Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. In: *The Journal of clinical investigation* 118 (1), S. 205–216. DOI: 10.1172/JCI32639.

Ackermann, Grit (2004): Clostridium difficile - Aktueller Stand. Teil I: Epidemiologie, Pathogenese, Diagnostik, Therapie, Immunologie und Prophylaxe. In: *Der Mikrobiologe* 14, S. 125–129.

Aktories, Klaus; Schwan, Carsten; Jank, Thomas (2017): Clostridium difficile Toxin Biology. In: *Annual review of microbiology* 71, S. 281–307. DOI: 10.1146/annurev-micro-090816-093458.

Alasmari, Faisal; Seiler, Sondra M.; Hink, Tiffany; Burnham, Carey-Ann D.; Dubberke, Erik R. (2014): Prevalence and risk factors for asymptomatic Clostridium difficile carriage. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 59 (2), S. 216–222. DOI: 10.1093/cid/ciu258.

Aletaha, Daniel; Neogi, Tuhina; Silman, Alan J.; Funovits, Julia; Felson, David T.; Bingham, Clifton O. et al. (2010): 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. In: *Arthritis and rheumatism* 62 (9), S. 2569–2581. DOI: 10.1002/art.27584.

Androga, Grace O.; Hart, Julie; Foster, Niki F.; Charles, Adrian; Forbes, David; Riley, Thomas V. (2015): Infection with Toxin A-Negative, Toxin B-Negative, Binary Toxin-Positive Clostridium difficile in a Young Patient with Ulcerative Colitis. In: *Journal of clinical microbiology* 53 (11), S. 3702–3704. DOI: 10.1128/JCM.01810-15.

Arvand, Mardjan; Moser, Vera; Schwehn, Christine; Bettge-Weller, Gudrun; Hensgens, Marjolein P.; Kuijper, Ed J. (2012): High prevalence of Clostridium difficile colonization among nursing home residents in Hesse, Germany. In: *PloS one* 7 (1), e30183. DOI: 10.1371/journal.pone.0030183.

Atarashi, Koji; Tanoue, Takeshi; Shima, Tatsuichiro; Imaoka, Akemi; Kuwahara, Tomomi; Momose, Yoshika et al. (2011): Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. In: *Science (New York, N.Y.)* 331 (6015), S. 337–341. DOI: 10.1126/science.1198469.

Attias, M.; Al-Aubodah, T.; Piccirillo, C. A. (2019): Mechanisms of human FoxP3+ Treg cell development and function in health and disease. In: *Clinical and experimental immunology* 197 (1), S. 36–51. DOI: 10.1111/cei.13290.

Attwell, David; Mishra, Anusha; Hall, Catherine N.; O'Farrell, Fergus M.; Dalkara, Turgay (2016): What is a pericyte? In: *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 36 (2), S. 451–455. DOI: 10.1177/0271678X15610340.

Awad, Milena M.; Johanesen, Priscilla A.; Carter, Glen P.; Rose, Edward; Lyras, Dena (2014): Clostridium difficile virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. In: *Gut microbes* 5 (5), S. 579–593. DOI: 10.4161/19490976.2014.969632.

AWMF (2015): S2k-Leitlinie Gastrointestinale Infektionen und Morbus Whipple. Online verfügbar unter https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/021-024I_S2k_Infektiose_Gastritis_2015-02-abgelaufen.pdf, zuletzt geprüft am 15.02.2022.

AWMF (2018): S2e-Leitlinie: Therapie der rheumatoiden Arthritis mit krankheitsmodifizierenden Medikamenten. Online verfügbar unter https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/060-004I_S2e_Therapie_rheumatoide_Arthritis_krankheitsmod_Med_2018-10_01.pdf, zuletzt geprüft am 20.05.2022.

Bae, S-C; Lee, Y. H. (2018): Zusammenhang zwischen Anti-Porphyromonas-gingivalis-Antikörpern, Anti-citrulliniertes-Protein-Antikörpern und rheumatoider Arthritis : Eine Metaanalyse. In: *Zeitschrift für Rheumatologie* 77 (6), S. 522–532. DOI: 10.1007/s00393-017-0328-y.

Benedetti, Giulia; Miossec, Pierre (2014): Interleukin 17 contributes to the chronicity of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis. In: *European journal of immunology* 44 (2), S. 339–347. DOI: 10.1002/eji.201344184.

Bialkowska, Agnieszka B.; Ghaleb, Amr M.; Nandan, Mandayam O.; Yang, Vincent W. (2016): Improved Swiss-rolling Technique for Intestinal Tissue Preparation for Immunohistochemical and Immunofluorescent Analyses. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (113). DOI: 10.3791/54161.

Black, Antony P. B.; Bhayani, Hansha; Ryder, Clive A. J.; Pugh, Mark T.; Gardner-Medwin, Janet M. M.; Southwood, Taunton R. (2003): An association between the acute phase response and patterns of antigen induced T cell proliferation in juvenile idiopathic arthritis. In: *Arthritis research & therapy* 5 (5), R277-84. DOI: 10.1186/ar791.

- Borriello, S. P.; Ketley, J. M.; Mitchell, T. J.; Barclay, F. E.; Welch, A. R.; Price, A. B.; Stephen, J. (1987): Clostridium difficile--a spectrum of virulence and analysis of putative virulence determinants in the hamster model of antibiotic-associated colitis. In: *Journal of medical microbiology* 24 (1), S. 53–64. DOI: 10.1099/00222615-24-1-53.
- Borriello, S. P.; Wilcox, M. H. (1998): Clostridium difficile infections of the gut: the unanswered questions. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 41 Suppl C, S. 67–69. DOI: 10.1093/jac/41.suppl_3.67.
- Brandt, Lawrence J.; Aroniadis, Olga C.; Mellow, Mark; Kanatzar, Amy; Kelly, Colleen; Park, Tina et al. (2012): Long-term follow-up of colonoscopic fecal microbiota transplant for recurrent Clostridium difficile infection. In: *The American journal of gastroenterology* 107 (7), S. 1079–1087. DOI: 10.1038/ajg.2012.60.
- Braun, Veit; Hundsberger, Thomas; Leukel, Petra; Sauerborn, Markus; Eichel-Streiber, Christoph von (1996): Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in Clostridium difficile. In: *Gene* 181 (1-2), S. 29–38. DOI: 10.1016/s0378-1119(96)00398-8.
- Calder, P. C.; Zurier, R. B. (2001): Polyunsaturated fatty acids and rheumatoid arthritis. In: *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 4 (2), S. 115–121. DOI: 10.1097/00075197-200103000-00006.
- Carlson, Paul E.; Kaiser, Alyssa M.; McColm, Sarah A.; Bauer, Jessica M.; Young, Vincent B.; Aronoff, David M.; Hanna, Philip C. (2015): Variation in germination of Clostridium difficile clinical isolates correlates to disease severity. In: *Anaerobe* 33, S. 64–70. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2015.02.003.
- Carter, Glen P.; Chakravorty, Anjana; Pham Nguyen, Tu Anh; Mileto, Steven; Schreiber, Fernanda; Li, Lucy et al. (2015): Defining the Roles of TcdA and TcdB in Localized Gastrointestinal Disease, Systemic Organ Damage, and the Host Response during Clostridium difficile Infections. In: *mBio* 6 (3), e00551. DOI: 10.1128/mBio.00551-15.
- Cepek, K. L.; Parker, C. M.; Madara, J. L.; Brenner, M. B. (1993): Integrin alpha E beta 7 mediates adhesion of T lymphocytes to epithelial cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 150 (8 Pt 1), S. 3459–3470.
- Chen, Xinhua; Katchar, Kianoosh; Goldsmith, Jeffrey D.; Nanthakumar, Nanda; Chenkis, Adam; Gerding, Dale N.; Kelly, Ciarán P. (2008): A mouse model of Clostridium difficile-associated disease. In: *Gastroenterology* 135 (6), S. 1984–1992. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.09.002.

Chiu, Ying-Ming; Lu, Yi-Peng; Lan, Joung-Liang; Chen, Der-Yuan; Wang, Jung-Der (2021): Lifetime Risks, Life Expectancy, and Health Care Expenditures for Rheumatoid Arthritis: A Nationwide Cohort Followed Up From 2003 to 2016. In: *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 73 (5), S. 750–758. DOI: 10.1002/art.41597.

Choi, In Ah; Kim, Jin-Hee; Kim, Yong Mi; Lee, Joo Youn; Kim, Kyung Hwa; Lee, Eun Young et al. (2016): Periodontitis is associated with rheumatoid arthritis: a study with longstanding rheumatoid arthritis patients in Korea. In: *The Korean journal of internal medicine* 31 (5), S. 977–986. DOI: 10.3904/kjim.2015.202.

Cojocaru, Manole; Cojocaru, Inimioara Mihaela; Silosi, Isabela; Vrabie, Camelia Doina; Tanasescu, R. (2010): Extra-articular Manifestations in Rheumatoid Arthritis. In: *Mae-dica* 5 (4), S. 286–291.

D P M Symmons (1995): what is rheumatoid arthritis? In: *British Medical Bulletin* (51), S. 243–248.

Darkoh, Charles; DuPont, Herbert L.; Norris, Steven J.; Kaplan, Heidi B. (2015): Toxin synthesis by *Clostridium difficile* is regulated through quorum signaling. In: *mBio* 6 (2), e02569. DOI: 10.1128/mBio.02569-14.

Deng, Guo-Min; Lenardo, Michael (2006): The role of immune cells and cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 3 (2), S. 163–168. DOI: 10.1016/j.ddmec.2006.06.009.

Deng, Huimin; Yang, Siqi; Zhang, Yucheng; Qian, Kai; Zhang, Zhaohui; Liu, Yangyang et al. (2018): *Bacteroides fragilis* Prevents *Clostridium difficile* Infection in a Mouse Model by Restoring Gut Barrier and Microbiome Regulation. In: *Frontiers in microbiology* 9, S. 2976. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02976.

Distler, O.; Müller-Ladner, U.; Schölmerich, J.; Gay, R. E.; Gay, S. (1999): Rheumatoide Arthritis: Neue molekulare und zelluläre Aspekte. In: *Medizinische Klinik (Munich, Germany : 1983)* 94 (12), S. 673–680. DOI: 10.1007/BF03044757.

Eckert, C.; Emirian, A.; Le Monnier, A.; Cathala, L.; Montclos, H. de; Goret, J. et al. (2015): Prevalence and pathogenicity of binary toxin-positive *Clostridium difficile* strains that do not produce toxins A and B. In: *New microbes and new infections* 3, S. 12–17. DOI: 10.1016/j.nmni.2014.10.003.

Eichel-Streiber, C. von; Laufenberg-Feldmann, R.; Saringen, S.; Schulze, J.; Sauerborn, M. (1992): Comparative sequence analysis of the *Clostridium difficile* toxins A and B. In: *Molecular & general genetics : MGG* 233 (1-2), S. 260–268. DOI: 10.1007/BF00587587.

Farragher, Tracey M.; Goodson, Nicola J.; Naseem, Haris; Silman, Alan J.; Thomson, Wendy; Symmons, Deborah; Barton, Anne (2008): Association of the HLA-DRB1 gene with premature death, particularly from cardiovascular disease, in patients with rheumatoid arthritis and inflammatory polyarthritis. In: *Arthritis & Rheumatism* 58 (2), S. 359–369. DOI: 10.1002/art.23149.

Farrugia, Mark; Baron, Byron (2016): The role of TNF- α in rheumatoid arthritis: a focus on regulatory T cells. In: *Journal of Clinical and Translational Research* 2 (3), S. 84–90.

Fewins, H. E.; McGowan, I.; Whitehouse, G. H.; Williams, J.; Mallya, R. (1991): High definition computed tomography in rheumatoid arthritis associated pulmonary disease. In: *British journal of rheumatology* 30 (3), S. 214–216. DOI: 10.1093/rheumatology/30.3.214.

Fukushi, Jun-ichi; Inatani, Masaru; Yamaguchi, Yu; Stallcup, William B. (2003): Expression of NG2 proteoglycan during endochondral and intramembranous ossification. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 228 (1), S. 143–148. DOI: 10.1002/dvdy.10359.

Furusawa, Yukihiro; Obata, Yuuki; Fukuda, Shinji; Endo, Takaho A.; Nakato, Gaku; Takahashi, Daisuke et al. (2014): Erratum: Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. In: *Nature* 506 (7487), S. 254. DOI: 10.1038/nature13041.

Ghosh, Siddhartha S.; Wang, Jing; Yannie, Paul J.; Ghosh, Shobha (2020): Intestinal Barrier Dysfunction, LPS Translocation, and Disease Development. In: *Journal of the Endocrine Society* 4 (2), bvz039. DOI: 10.1210/jendso/bvz039.

Gibofsky, A.; Winchester, R.; Hansen, J.; Patarroyo, M.; Dupont, B.; Paget, S. et al. (1978): Contrasting patterns of newer histocompatibility determinants in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. In: *Arthritis and rheumatism* 21 (5 Suppl), S134-8. DOI: 10.1002/art.1780210920.

Gibofsky, Allan (2014): Epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis: A Synopsis. In: *The American journal of managed care* 20 (7 Suppl), S128-35.

Gough, Ethan; Shaikh, Henna; Manges, Amee R. (2011): Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent *Clostridium difficile* infection. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 53 (10), S. 994–1002. DOI: 10.1093/cid/cir632.

- Greco, Antonio; Ho, Jason G. S.; Lin, Shuang-Jun; Palcic, Monica M.; Rupnik, Maja; Ng, Kenneth K-S (2006): Carbohydrate recognition by *Clostridium difficile* toxin A. In: *Nature structural & molecular biology* 13 (5), S. 460–461. DOI: 10.1038/nsmb1084.
- Gregersen, P. K.; Silver, J.; Winchester, R. J. (1987): The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. In: *Arthritis and rheumatism* 30 (11), S. 1205–1213. DOI: 10.1002/art.1780301102.
- Hablot, Julie; Peyrin-Biroulet, Laurent; Kokten, Tunay; El Omar, Reine; Netter, Patrick; Bastien, Claire et al. (2017): Experimental colitis delays and reduces the severity of collagen-induced arthritis in mice. In: *PloS one* 12 (9), e0184624. DOI: 10.1371/journal.pone.0184624.
- Hammond, Georgia Ann; Johnson, John L. (1995): The toxigenic element of *Clostridium difficile* strain VPI 10463. In: *Microbial Pathogenesis* 19 (4), S. 203–213. DOI: 10.1016/s0882-4010(95)90263-5.
- Heidari, Behzad (2011): Rheumatoid Arthritis: Early diagnosis and treatment outcomes. In: *Caspian journal of internal medicine* 2 (1), S. 161–170.
- Herold, Gerd (Hg.) (2017): Innere Medizin 2017. Eine vorlesungsorientierte Darstellung : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Dr. Gerd Herold. Köln: Gerd Herold.
- Hill, K. A.; Collins, J.; Wilson, L.; Perry, J. D.; Gould, F. K. (2013): Comparison of two selective media for the recovery of *Clostridium difficile* from environmental surfaces. In: *The Journal of hospital infection* 83 (2), S. 164–166. DOI: 10.1016/j.jhin.2012.10.006.
- Holmdahl, R.; Andersson, M. E.; Goldschmidt, T. J.; Jansson, L.; Karlsson, M.; Malmström, V.; Mo, J. (1989): Collagen induced arthritis as an experimental model for rheumatoid arthritis. Immunogenetics, pathogenesis and autoimmunity. In: *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 97 (7), S. 575–584. DOI: 10.1111/j.1699-0463.1989.tb00446.x.
- Huizinga, Tom W. J.; Amos, Christopher I.; van der Helm-van Mil, Annette H. M.; Chen, Wei; van Gaalen, Floris A.; Jawaheer, Damini et al. (2005): Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. In: *Arthritis & Rheumatism* 52 (11), S. 3433–3438. DOI: 10.1002/art.21385.
-

Hutchinson, D.; Shepstone, L.; Moots, R.; Lear, J. T.; Lynch, M. P. (2001): Heavy cigarette smoking is strongly associated with rheumatoid arthritis (RA), particularly in patients without a family history of RA. In: *Annals of the rheumatic diseases* 60 (3), S. 223–227. DOI: 10.1136/ard.60.3.223.

Jabbar, Umair; Leischner, Julie; Kasper, Douglas; Gerber, Robert; Sambol, Susan P.; Parada, Jorge P. et al. (2010): Effectiveness of alcohol-based hand rubs for removal of *Clostridium difficile* spores from hands. In: *Infection control and hospital epidemiology* 31 (6), S. 565–570. DOI: 10.1086/652772.

Jafari, Nazila V.; Kuehne, Sarah A.; Bryant, Clare E.; Elawad, Mamoun; Wren, Brendan W.; Minton, Nigel P. et al. (2013): *Clostridium difficile* modulates host innate immunity via toxin-independent and dependent mechanism(s). In: *PloS one* 8 (7), e69846. DOI: 10.1371/journal.pone.0069846.

Jangi, Sushrut; Lamont, J. Thomas (2010): Asymptomatic colonization by *Clostridium difficile* in infants: implications for disease in later life. In: *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 51 (1), S. 2–7. DOI: 10.1097/MPG.0b013e3181d29767.

Johnson, S.; Adelman, A.; Clabots, C. R.; Peterson, L. R.; Gerding, D. N. (1989): Recurrences of *Clostridium difficile* diarrhea not caused by the original infecting organism. In: *The Journal of infectious diseases* 159 (2), S. 340–343. DOI: 10.1093/infdis/159.2.340.

Jones, Leonard L.; Yamaguchi, Yu; Stallcup, William B.; Tuszynski, Mark H. (2002): NG2 Is a Major Chondroitin Sulfate Proteoglycan Produced after Spinal Cord Injury and Is Expressed by Macrophages and Oligodendrocyte Progenitors. In: *J. Neurosci.* 22 (7), S. 2792–2803. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-07-02792.2002.

Just, I.; Selzer, J.; Wilm, M.; Eichel-Streiber, C. von; Mann, M.; Aktories, K. (1995): Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. In: *Nature* 375 (6531), S. 500–503. DOI: 10.1038/375500a0.

Kaiser, Andreas M.; Hogen, Rachel; Bordeianou, Liliana; Alavi, Karim; Wise, Paul E.; Sudan, Ranjan (2015): *Clostridium Difficile* Infection from a Surgical Perspective. In: *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* 19 (7), S. 1363–1377. DOI: 10.1007/s11605-015-2785-4.

Kampstra, Arieke S. B.; Toes, René E. M. (2017): HLA class II and rheumatoid arthritis: the bumpy road of revelation. In: *Immunogenetics* 69 (8-9), S. 597–603. DOI: 10.1007/s00251-017-0987-5.

Kelmenson, Lindsay B.; Wagner, Brandie D.; McNair, Bryan K.; Frazer-Abel, Ashley; Demoruelle, M. Kristen; Bergstedt, Dylan T. et al. (2020): Timing of Elevations of Auto-antibody Isotypes Prior to Diagnosis of Rheumatoid Arthritis. In: *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 72 (2), S. 251–261. DOI: 10.1002/art.41091.

Kienitz, Carsten; Grellmann, Claudia; Hapfelmeier, Jana (2020): Prävalenz der Rheumatoiden Arthritis in Deutschland: Analyse von Längsschnittdaten der Gesetzlichen Krankenversicherung. In: *Gesundheitswesen (Bundesverband der Ärzte des Öffentlichen Gesundheitsdienstes (Germany))*. DOI: 10.1055/a-1192-4628.

Kuijper, E. J.; Coignard, B.; Tüll, P. (2006): Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. In: *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 12 Suppl 6, S. 2–18. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2006.01580.x.

Legg, James; Jensen, Uffe B.; Broad, Simon; Leigh, Irene; Watt, Fiona M. (2003): Role of melanoma chondroitin sulphate proteoglycan in patterning stem cells in human inter-follicular epidermis. In: *Development (Cambridge, England)* 130 (24), S. 6049–6063. DOI: 10.1242/dev.00837.

Lyras, Dena; O'Connor, Jennifer R.; Howarth, Pauline M.; Sambol, Susan P.; Carter, Glen P.; Phumoonna, Tongted et al. (2009): Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. In: *Nature* 458 (7242), S. 1176–1179. DOI: 10.1038/nature07822.

MacGregor, Alexander J.; Snieder, Harold; Rigby, Alan S.; Koskenvuo, Markku; Kaprio, Jaakko; Aho, Kimmo; Silman, Alan J. (2000): Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. In: *Arthritis & Rheumatism* 43 (1), S. 30–37. DOI: 10.1002/1529-0131(200001)43:1<30::AID-ANR5>3.0.CO;2-B.

Maeda, Yuichi; Kurakawa, Takashi; Umemoto, Eiji; Motooka, Daisuke; Ito, Yoshinaga; Gotoh, Kazuyoshi et al. (2016): Dysbiosis Contributes to Arthritis Development via Activation of Autoreactive T Cells in the Intestine. In: *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 68 (11), S. 2646–2661. DOI: 10.1002/art.39783.

Maresz, Katarzyna J.; Hellvard, Annelie; Sroka, Aneta; Adamowicz, Karina; Bielecka, Ewa; Koziel, Joanna et al. (2013): *Porphyromonas gingivalis* facilitates the development and progression of destructive arthritis through its unique bacterial peptidylarginine deiminase (PAD). In: *PLoS pathogens* 9 (9), e1003627. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003627.

May, E.; Märker-Hermann, E.; Wittig, B. M.; Zeitz, M.; zum Meyer Büschenfelde, K. H.; Duchmann, R. (2000): Identical T-cell expansions in the colon mucosa and the synovium of a patient with enterogenic spondyloarthritis. In: *Gastroenterology* 119 (6), S. 1745–1755. DOI: 10.1053/gast.2000.20173.

Merrigan, Michelle; Venugopal, Anilrudh; Mallozzi, Michael; Roxas, Bryan; Viswanathan, V. K.; Johnson, Stuart et al. (2010): Human hypervirulent *Clostridium difficile* strains exhibit increased sporulation as well as robust toxin production. In: *Journal of bacteriology* 192 (19), S. 4904–4911. DOI: 10.1128/JB.00445-10.

Midwood, K. S.; Salter, D. M. (1998): Expression of NG2/human melanoma proteoglycan in human adult articular chondrocytes. In: *Osteoarthritis and cartilage* 6 (5), S. 297–305. DOI: 10.1053/joca.1998.0128.

Na, Xi; Kim, Ho; Moyer, Mary P.; Pothoulakis, Charalabos; Lamont, J. Thomas (2008): gp96 is a human colonocyte plasma membrane binding protein for *Clostridium difficile* toxin A. In: *Infection and immunity* 76 (7), S. 2862–2871. DOI: 10.1128/IAI.00326-08.

Oliver, J. E.; Silman, A. J. (2006): Risk factors for the development of rheumatoid arthritis. In: *Scandinavian journal of rheumatology* 35 (3), S. 169–174. DOI: 10.1080/03009740600718080.

Oughton, Matthew T.; Loo, Vivian G.; Dendukuri, Nandini; Fenn, Susan; Libman, Michael D. (2009): Hand hygiene with soap and water is superior to alcohol rub and antiseptic wipes for removal of *Clostridium difficile*. In: *Infection control and hospital epidemiology* 30 (10), S. 939–944. DOI: 10.1086/605322.

Padyukov, Leonid; Silva, Camilla; Stolt, Patrik; Alfredsson, Lars; Klareskog, Lars (2004): A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. In: *Arthritis & Rheumatism* 50 (10), S. 3085–3092. DOI: 10.1002/art.20553.

Pan, Hudan; Guo, Ruijin; Ju, Yanmei; Wang, Qi; Zhu, Jie; Xie, Ying et al. (2019): A single bacterium restores the microbiome dysbiosis to protect bones from destruction in a rat model of rheumatoid arthritis. In: *Microbiome* 7 (1), S. 107. DOI: 10.1186/s40168-019-0719-1.

Pap, Thomas; Nawrath, Michael; Heinrich, Jochen; Bosse, Magnus; Baier, Anja; Hummel, Klaus M. et al. (2004): Cooperation of Ras- and c-Myc-dependent pathways in regulating the growth and invasiveness of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. In: *Arthritis & Rheumatism* 50 (9), S. 2794–2802. DOI: 10.1002/art.20461.

- Pattison, Dorothy J.; Symmons, Deborah P. M.; Lunt, Mark; Welch, Ailsa; Luben, Robert; Bingham, Sheila A. et al. (2004): Dietary risk factors for the development of inflammatory polyarthritis: evidence for a role of high level of red meat consumption. In: *Arthritis & Rheumatism* 50 (12), S. 3804–3812. DOI: 10.1002/art.20731.
- Penders, John; Thijs, Carel; Vink, Cornelis; Stelma, Foekje F.; Snijders, Bianca; Kummeling, Ischa et al. (2006): Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. In: *Pediatrics* 118 (2), S. 511–521. DOI: 10.1542/peds.2005-2824.
- Piper, Wolfgang (2013): Innere Medizin. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Pober, Jordan S.; Tellides, George (2012): Participation of blood vessel cells in human adaptive immune responses. In: *Trends in immunology* 33 (1), S. 49–57. DOI: 10.1016/j.it.2011.09.006.
- Poutanen, Susan M.; Simor, Andrew E. (2004): Clostridium difficile-associated diarrhea in adults. In: *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 171 (1), S. 51–58. DOI: 10.1503/cmaj.1031189.
- Proebstl, Doris; Voisin, Mathieu-Benoît; Woodfin, Abigail; Whiteford, James; D'Acquisto, Fulvio; Jones, Gareth E. et al. (2012): Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo. In: *The Journal of experimental medicine* 209 (6), S. 1219–1234. DOI: 10.1084/jem.20111622.
- Qiu, Runze; Zhou, Liyu; Ma, Yuanjing; Zhou, Lingling; Liang, Tao; Le Shi et al. (2020): Regulatory T Cell Plasticity and Stability and Autoimmune Diseases. In: *Clinical reviews in allergy & immunology* 58 (1), S. 52–70. DOI: 10.1007/s12016-018-8721-0.
- Robert-Koch-Institut (2018): Clostridioides (früher Clostridium) difficile. RKI-Ratgeber. Online verfügbar unter https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Clostridium.html?jsessionid=F0D3C77C9BD6808F63547F6264EBDDE8.internet102, zuletzt aktualisiert am 02.02.2018.
- Rogier, Rebecca; Evans-Marin, Heather; Manasson, Julia; van der Kraan, Peter M.; Walgreen, Birgitte; Helsen, Monique M. et al. (2017): Alteration of the intestinal microbiome characterizes preclinical inflammatory arthritis in mice and its modulation attenuates established arthritis. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 15613. DOI: 10.1038/s41598-017-15802-x.
- Roo, Ana C. de; Regenbogen, Scott E. (2020): Clostridium difficile Infection: An Epidemiology Update. In: *Clinics in colon and rectal surgery* 33 (2), S. 49–57. DOI: 10.1055/s-0040-1701229.

Rooney, Cristopher M.; Mankia, Kulveer; Emery, Paul (2020): The Role of the Microbiome in Driving RA-Related Autoimmunity. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 8, S. 538130. DOI: 10.3389/fcell.2020.538130.

Ross, Christina L.; Ang, Dennis C.; Almeida-Porada, Graça (2019): Targeting Mesenchymal Stromal Cells/Pericytes (MSCs) With Pulsed Electromagnetic Field (PEMF) Has the Potential to Treat Rheumatoid Arthritis. In: *Frontiers in immunology* 10, S. 266. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00266.

Rossi, Federica; Di Dia, Fiorella; Galipò, Olivia; Pistorio, Angela; Valle, Maura; Magni-Manzoni, Silvia et al. (2006): Use of the Sharp and Larsen scoring methods in the assessment of radiographic progression in juvenile idiopathic arthritis. In: *Arthritis & Rheumatism* 55 (5), S. 717–723. DOI: 10.1002/art.22246.

Rousseau, Clotilde; Levenez, Florence; Fouqueray, Charlène; Doré, Joël; Collignon, Anne; Lepage, Patricia (2011): Clostridium difficile colonization in early infancy is accompanied by changes in intestinal microbiota composition. In: *Journal of clinical microbiology* 49 (3), S. 858–865. DOI: 10.1128/JCM.01507-10.

Ruof, J.; Hülsemann, J. L.; Mittendorf, T.; Handelsmann, S.; Schulenburg, J. M. von der; Zeidler, H.; Merkesdal, S. (2003): Costs of rheumatoid arthritis in Germany: a micro-costing approach based on healthcare payer's data sources. In: *Annals of the rheumatic diseases* 62 (6), S. 544–549. DOI: 10.1136/ard.62.6.544.

Sakaguchi, Wakako; To, Masahiro; Yamamoto, Yuko; Inaba, Keitaro; Yakeishi, Mayumi; Saruta, Juri et al. (2019): Detection of anti-citrullinated protein antibody (ACPA) in saliva for rheumatoid arthritis using DBA mice infected with Porphyromonas gingivalis. In: *Archives of oral biology* 108, S. 104510. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2019.104510.

Samore, M. H.; Bettin, K. M.; DeGirolami, P. C.; Clabots, C. R.; Gerding, D. N.; Karchmer, A. W. (1994): Wide diversity of Clostridium difficile types at a tertiary referral hospital. In: *The Journal of infectious diseases* 170 (3), S. 615–621. DOI: 10.1093/infdis/170.3.615.

Schmidt, Christian Johann; Wenndorf, Katharina; Ebbers, Meinolf; Volzke, Johann; Müller, Michael; Strübing, Julia et al. (2020): Infection With Clostridioides difficile Attenuated Collagen-Induced Arthritis in Mice and Involved Mesenteric Treg and Th2 Polarization. In: *Frontiers in immunology* 11, S. 571049. DOI: 10.3389/fimmu.2020.571049.

Seltman, Ann K. (2012): Surgical Management of *Clostridium difficile* Colitis. In: *Clinics in colon and rectal surgery* 25 (4), S. 204–209. DOI: 10.1055/s-0032-1329390.

Senshu, T.; Akiyama, K.; Nagata, S.; Watanabe, K.; Hikichi, K. (1989): Peptidylarginine deiminase in rat pituitary: sex difference, estrous cycle-related changes, and estrogen dependence. In: *Endocrinology* 124 (6), S. 2666–2670. DOI: 10.1210/endo-124-6-2666.

Silman, A.; Kay, A.; Brennan, P. (1992): Timing of pregnancy in relation to the onset of rheumatoid arthritis. In: *Arthritis & Rheumatism* 35 (2), S. 152–155. DOI: 10.1002/art.1780350205.

Sköldstam, L.; Hagfors, L.; Johansson, G. (2003): An experimental study of a Mediterranean diet intervention for patients with rheumatoid arthritis. In: *Annals of the rheumatic diseases* 62 (3), S. 208–214. DOI: 10.1136/ard.62.3.208.

Smits, Wiep Klaas; Lyras, Dena; Lacy, D. Borden; Wilcox, Mark H.; Kuijper, Ed J. (2016): *Clostridium difficile* infection. In: *Nature reviews. Disease primers* 2, S. 16020. DOI: 10.1038/nrdp.2016.20.

Sokka, Tuulikki; Kautiainen, Hannu; Pincus, Theodore; Verstappen, Suzanne M. M.; Aggarwal, Amita; Alten, Rieke et al. (2010): Work disability remains a major problem in rheumatoid arthritis in the 2000s: data from 32 countries in the QUEST-RA study. In: *Arthritis research & therapy* 12 (2), R42. DOI: 10.1186/ar2951.

Stastny, P. (1978): Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. In: *The New England journal of medicine* 298 (16), S. 869–871. DOI: 10.1056/NEJM197804202981602.

Steele, Jennifer; Chen, Kevin; Sun, Xingmin; Zhang, Yongrong; Wang, Haiying; Tzipori, Saul; Feng, Hanping (2012): Systemic dissemination of *Clostridium difficile* toxins A and B is associated with severe, fatal disease in animal models. In: *The Journal of infectious diseases* 205 (3), S. 384–391. DOI: 10.1093/infdis/jir748.

Steele, Jennifer; Feng, Hanping; Parry, Nicola; Tzipori, Saul (2010): Piglet models of acute or chronic *Clostridium difficile* illness. In: *The Journal of infectious diseases* 201 (3), S. 428–434. DOI: 10.1086/649799.

Takahara, H.; Kusubata, M.; Tsuchida, M.; Kohsaka, T.; Tagami, S.; Sugawara, K. (1992): Expression of peptidylarginine deiminase in the uterine epithelial cells of mouse is dependent on estrogen. In: *The Journal of biological chemistry* 267 (1), S. 520–525.

- Takeno, Masafumi; Kitagawa, Shinya; Yamanaka, Junpei; Teramoto, Mayumi; Tomita, Haruka; Shirai, Naohiro et al. (2018): 5-Hydroxy-2-methylpyridine Isolated from Cigarette Smoke Condensate Aggravates Collagen-Induced Arthritis in Mice. In: *Biological & pharmaceutical bulletin* 41 (6), S. 877–884. DOI: 10.1248/bpb.b17-00982.
- Tao, Liang; Zhang, Jie; Meraner, Paul; Tovaglieri, Alessio; Wu, Xiaoqian; Gerhard, Ralf et al. (2016): Frizzled proteins are colonic epithelial receptors for *C. difficile* toxin B. In: *Nature* 538 (7625), S. 350–355. DOI: 10.1038/nature19799.
- Tenover, Fred C.; Baron, Ellen Jo; Peterson, Lance R.; Persing, David H. (2011): Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection can molecular amplification methods move us out of uncertainty? In: *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 13 (6), S. 573–582. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2011.06.001.
- Toivanen, P. (2001): From reactive arthritis to rheumatoid arthritis. In: *Journal of autoimmunity* 16 (3), S. 369–371. DOI: 10.1006/jaut.2000.0496.
- Tukiainen, Taru; Villani, Alexandra-Chloé; Yen, Angela; Rivas, Manuel A.; Marshall, Jamie L.; Satija, Rahul et al. (2017): Landscape of X chromosome inactivation across human tissues. In: *Nature* 550 (7675), S. 244–248. DOI: 10.1038/nature24265.
- Turesson, Carl; Schaid, Daniel J.; Weyand, Cornelia M.; Jacobsson, Lennart T. H.; Goronzy, Jörg J.; Petersson, Ingemar F. et al. (2005): The impact of HLA-DRB1 genes on extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis. In: *Arthritis research & therapy* 7 (6), R1386-93. DOI: 10.1186/ar1837.
- Vaahtovuori, Jussi; Munukka, Eveliina; Korkeamäki, Mika; Luukkainen, Reijo; Toivanen, Paavo (2008): Fecal microbiota in early rheumatoid arthritis. In: *The Journal of rheumatology* 35 (8), S. 1500–1505.
- van de Stadt, Lotte A.; Koning, Margret H. M. T. de; van de Stadt, Rob J.; Wolbink, Gertjan; Dijkmans, Ben A. C.; Hamann, Dörte; van Schaardenburg, Dirkjan (2011): Development of the anti-citrullinated protein antibody repertoire prior to the onset of rheumatoid arthritis. In: *Arthritis and rheumatism* 63 (11), S. 3226–3233. DOI: 10.1002/art.30537.
- van Nood, Els; Vrieze, Anne; Nieuwdorp, Max; Fuentes, Susana; Zoetendal, Erwin G.; Vos, Willem M. de et al. (2013): Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. In: *The New England journal of medicine* 368 (5), S. 407–415. DOI: 10.1056/NEJMoa1205037.

van Venrooij, W. J.; Pruijn, G. J. (2000): Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. In: *Arthritis research* 2 (4), S. 249–251. DOI: 10.1186/ar95.

Vital, Marius; Karch, André; Pieper, Dietmar H. (2017): Colonic Butyrate-Producing Communities in Humans: an Overview Using Omics Data. In: *mSystems* 2 (6). DOI: 10.1128/mSystems.00130-17.

Wang, Shu; Wang, Yanming (2013): Peptidylarginine deiminases in citrullination, gene regulation, health and pathogenesis. In: *Biochimica et biophysica acta* 1829 (10), S. 1126–1135. DOI: 10.1016/j.bbagr.2013.07.003.

Weyand, C. M.; Xie, C.; Goronzy, J. J. (1992): Homozygosity for the HLA-DRB1 allele selects for extraarticular manifestations in rheumatoid arthritis. In: *The Journal of clinical investigation* 89 (6), S. 2033–2039. DOI: 10.1172/JCI115814.

Wu, Hsin-Jung; Ivanov, Ivaylo I.; Darce, Jaime; Hattori, Kimie; Shima, Tatsuichiro; Umesaki, Yoshinori et al. (2010): Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. In: *Immunity* 32 (6), S. 815–827. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.06.001.

Yasuda, Keiko; Takeuchi, Yusuke; Hirota, Keiji (2019): The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases. In: *Seminars in immunopathology* 41 (3), S. 283–297. DOI: 10.1007/s00281-019-00733-8.

Yuan, Pengfei; Zhang, Hongmin; Cai, Changzu; Zhu, Shiyu; Zhou, Yuexin; Yang, Xiaozhou et al. (2015): Chondroitin sulfate proteoglycan 4 functions as the cellular receptor for *Clostridium difficile* toxin B. In: *Cell research* 25 (2), S. 157–168. DOI: 10.1038/cr.2014.169.

Zar, Fred A.; Bakkanagari, Srinivasa R.; Moorthi, K. M. L. S. T.; Davis, Melinda B. (2007): A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea, stratified by disease severity. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 45 (3), S. 302–307. DOI: 10.1086/519265.

VIII. LEBENS LAUF

Angaben zur Person

Name	Schmidt
Vornamen	Christian Johann
Geburtsdatum	24.01.1991
Geburtsort	Weiden i. d. OPf., Bayern
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulabschluss

2007 - 2011	Gustav-von-Schlör-Fachoberschule in Weiden
12.07.2011	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung

2011 – 2014	Ausbildung zum Rettungsassistenten beim Malteser in Regensburg und BRK in Weiden i. d. OPf. sowie anschließende Berufstätigkeit
-------------	---

Akademische Ausbildung

2014 – 2020	Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität in Marburg sowie an der Universität Rostock
Seit 2021	Studium der Zahnmedizin an der Universität Rostock

Berufliche Tätigkeit

2016 – 2018	Studentische Pflegekraft auf Intensivstationen und in der Notaufnahme der Universitätsmedizin Rostock
-------------	---

2019 – 2020 Praktisches Jahr Universitätsmedizin Rostock (Anästhesiologie), Klinikum Weiden (Innere Medizin) und BG Unfallklinik Murnau (Chirurgie)

Seit 2021 Arzt in Weiterbildung in der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universitätsmedizin Rostock

Weiterbildung

2021 Prüfarzt nach GCP für klinische Prüfungen

Ehrenamtliches Engagement

Seit 2014 Bayerisches Rotes Kreuz Kreisverband Weiden i. d. OPf./Neustadt a. d. WN

Rostock, den 02.06.2022

IX. PUBLIKATIONEN

Schmidt, Christian Johann; Wenndorf, Katharina; Ebbers, Meinolf; Volzke, Johann; Müller, Michael; Strübing, Julia; Kreikemeyer Bernd und Müller-Hilke, Brigitte (2020): Infection With Clostridioides difficile Attenuated Collagen-Induced Arthritis in Mice and Involved Mesenteric Treg and Th2 Polarization. In: *Frontiers in immunology* 11, S. 571049. DOI: 10.3389/fimmu.2020.571049.

Müller, Michael; Volzke, Johann; Subin, Behnam; **Schmidt, Christian Johann**; Geerdes-Fenge, Hilte; Reisinger, Emil Christian; Müller-Hilke, Brigitte (2022): Distinguishing Incubation and Acute Disease Stages of Mild-to-Moderate Covid-19. In: *Viruses*, 14, 203. <https://doi.org/10.3390/v14020203>

x. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich bei allen beteiligten Personen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. rer. nat. Brigitte Müller-Hilke, MME. Während der Durchführung dieser Arbeit hat sie mich vielfältig unterstützt und mir durch ihre Kompetenz und ihr Wissen sehr viel gelehrt.

Mein Dank gilt der Arbeitsgruppe für ihre Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Weiterhin gilt mein ausdrücklicher Dank Dr. med. Meinolf Ebbers für die Unterstützung und Durchführung der PCR.

Darüber hinaus danke ich meinen Eltern, Geschwistern und allen Verwandten für die aufgebrachte Geduld und permanente emotionale sowie finanzielle Unterstützung während des Studiums.

Zu guter Letzt danke ich meinen Freunden und Kommilitonen für die Ermutigung und Zusprüche während der Ausfertigung meiner Dissertation.

xI. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)