

AUS DER CORE FACILITY FÜR ZELLSORTIERUNG UND ZELLANALYSE
ARBEITSGRUPPE KLINISCHE IMMUNOLOGIE
LEITUNG: PROF. DR. RER. NAT. B. MÜLLER-HILKE, MME

**KOMBINIERTER EINFLUSS VON SUBAKUTER,
ANTIBIOTIKA-ASSOZIIERTER *CLOSTRIDIODES DIFFICILE*
INFEKTION UND KOLLAGEN-INDUZIERTER ARTHRITIS AUF
DIE ADAPTIVE IMMUNANTWORT DER MAUS**

EINE TIEREXPERIMENTELLE STUDIE

INAUGURALDISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOKTOR DER MEDIZIN
DER
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON:
STEFANIE BRIGITTE AMANN-STEGBAUER
GEB. AM 03.03.1995 IN BURGLENGENFELD

MENGGOFEN, IM NOVEMBER 2024

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00005133



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung - Nicht kommerziell - Keine
Bearbeitungen 4.0 International Lizenz.

GUTACHTENDE:

Prof. Dr. rer. nat. Brigitte Müller-Hilke, MME
AG Klinische Immunologie, Institut für Immunologie
Universitätsmedizin Rostock

Prof. Dr. rer. nat. Bernd Kreikemeyer
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene
Universitätsmedizin Rostock

Prof. Dr. med. Hans Helmut Niller
Institut für Mikrobiologie und Hygiene
Universität Regensburg

Einreichung: November 2024

Verteidigung: Juni 2025

INHALTSVERZEICHNIS

I.	ZUSAMMENFASSUNG	1
II.	EINLEITUNG	2
2.1	RHEUMATOIDE ARTHRITIS	2
2.1.1	EPIDEMIOLOGIE UND SYMPTOMATIK.....	2
2.1.2	ÄTIOLOGIE UND PATHOPHYSIOLOGIE	3
2.1.3	DIAGNOSTIK	4
2.1.4	THERAPIE	6
2.1.5	KOLLAGEN-INDUZIERTE-ARTHRITIS.....	7
2.2	<i>CLOSTRIDIOIDES DIFFICILE</i>	8
2.2.1	<i>C. DIFFICILE</i> UND DER MENSCHLICHE DARM.....	8
2.2.2	PATHOGENESE DER <i>CLOSTRIDIOIDES-DIFFICILE</i> -INFEKTION	8
2.2.3	SYMPTOMATIK.....	9
2.2.4	DIAGNOSTIK	9
2.2.5	THERAPIE	10
2.3	DIE DARM-GELENK-ACHSE	11
2.4	DAS ADAPTIVE IMMUNSYSTEM	12
2.5	ZIEL DER ARBEIT	14
III.	MATERIAL UND METHODEN	15
3.1	VERWENDETE MATERIALIEN	15
3.2	GENUTZTE METHODEN	15
3.2.1	VERSUCHSTIERE	15
3.2.2	<i>CLOSTRIDIOIDES</i> -KULTIVIERUNG	16
3.2.3	ANTIBIOTIKA-APPLIKATION ZUR BEREITUNG DER INFEKTION	17
3.2.4	INITIIERUNG DER INFEKTION MIT <i>C. DIFFICILE</i>	18
3.2.5	INFEKTIONSKONTROLLE	19
3.2.6	INDUKTION DER KOLLAGEN-INDUZIERTEN ARTHRITIS	19
3.2.7	VERLAUFSKONTROLLE DER KOLLAGEN-INDUZIERTEN ARTHRITIS	20

3.2.8	ORGANENTNAHME	21
3.2.9	LYMPHOZYTEN-ISOLATION	22
3.2.10	ANTIKÖRPERFÄRBUNG DER ZELLEN	23
3.2.11	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	24
3.2.12	HISTOLOGIE	25
3.2.13	STATISTIK	26
IV.	ERGEBNISSE	27
4.1	AUFBAU DER TIEREXPERIMENTELLEN STUDIE UND DEREN AUSSCHLUSSKRITERIEN	27
4.2	DIE INFEKTION MIT <i>CLOSTRIDIODES DIFFICILE</i> STAMM VPI 10463 FÜHRTE ZU KEINEM .	29
	GEWICHTSVERLUST	29
4.3	DIE IMMUNISIERUNG MIT KOLLAGEN FÜHRTE BEI ALLEN TIEREN ZU ARTHRITISCHEN	31
	SYMPTOMEN AN DEN PFOTEN	31
4.4	DIE IMMUNISIERUNG MIT KOLLAGEN FÜHRTE ZU EINER ZUNAHME DER ZELLEN IN DEN ..	33
	INGUINALEN LYMPHKNOTEN	33
4.5	UNTERSCHIEDLICHE STRATEGIEN DER EINZELZELLANALYSE VON LEUKOZYTEN AUS	34
	DEN LYMPHKNOTEN UND AUS DEM DARM	34
4.6	DIE CDI FÜHRTE ZU EINER TRANSIENTEN ANREICHERUNG VON CD4+ ZELLEN IM	37
	DARM	37
4.7	EINE CDI FÜHRTE IN DER DARMMUKOSA ZU EINER TRANSIENTEN ANREICHERUNG DER	39
	TH2-ZELLEN, DIE EINER TRANSIENTEN DEPLETION DER TH1- UND TH17-ZELLEN VO-.....	39
	RAUSGING	39
4.8	EINE KOLLAGEN-INDUZIERTER ARTHRITIS FÜHRTE ZU HISTOLOGISCHEN VERÄNDERUN- .	41
	GEN AM BETROFFENEN GELENK	41
V.	DISKUSSION	44
5.1	EINE INFEKTION DER VERSUCHSTIERE MIT <i>C. DIFFICILE</i> KONNTE NICHT BEI ALLEN.....	45
	INOKULIERTEN TIEREN BESTÄTIGT WERDEN	45
5.2	BEI ALLEN VERSUCHSTIEREN KONNTE EINE KOLLAGEN-INDUZIERTER ARTHRITIS AUS.....	46
	GELÖST WERDEN.....	46
5.3	EINE KOLLAGEN-INDUZIERTER ARTHRITIS MODULIERTE DIE IMMUNLANDSCHAFT BEI.....	48

DBAXB10Q MÄUSEN	48
VI. ANHANG	53
6.1 TABELLEN	54
6.2 ABBILDUNGEN	65
VII. LITERATURVERZEICHNIS	66
VIII. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	77
IX. DANKSAGUNG.....	78
X. WISSENSCHAFTLICHER LEBENSLAUF	79
XI. THESEN	80

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: GLOBALE PRÄVALENZ DER RHEUMATOIDEN ARTHRITIS	2
ABBILDUNG 2: INTERVENTIONEN AN DER VERSUCHSMAUS	18
ABBILDUNG 3 DARSTELLUNG DER ARTHRITIS SYMPTOME.....	20
ABBILDUNG 4: ZEITLICHER ABLAUF DER DURCHGEFÜHRTEN EXPERIMENTE	27
ABBILDUNG 5: DIE INFektion MIT <i>C. DIFFICILE</i> STAMM VPI 10463 FÜHRTE ZU KEINEM GEWICHTSVERLUST	30
ABBILDUNG 6: DIE IMMUNISIERUNG MIT KOLLAGEN FÜHRTE BEI ALLEN VERSUCHSTIEREN ZU ARTHROITISCHEN SYMPTOMEN AN DEN PFOTEN	32
ABBILDUNG 7: DIE IMMUNISIERUNG MIT KOLLAGEN FÜHRTE ZU EINER ZUNAHME DER LYMPHOZYTEN IN DEN INGUINALEN LYMPHKNOTEN	33
ABBILDUNG 8 GATINGSTRATEGIE LYMPHKNOTEN	35
ABBILDUNG 9: GATINGSTRATEGIE DARMMUKOSA	36
ABBILDUNG 10: DIE CDI FÜHRTE ZU EINER TRANSIENTEN ANREICHERUNG VON CD4+ ZELLEN IM DARM	37
ABBILDUNG 11: EINE CDI FÜHRTE IN DER DARMMUKOSA ZU EINER TRANSIENTEN ANREICHERUNG DER TH2- ZELLEN, DIE EINER TRANSIENTEN DEPLETION DER TH1- UND TH17-ZELLEN VORAUSGING.....	40
ABBILDUNG 12: EINE KOLLAGEN-INDUZIERTER ARTHRITIS FÜHRTE ZU HISTOLOGISCHEN VERÄNDERUNGEN AM BETROFFENEN GELENK	42
ABBILDUNG 13: EINE <i>C. DIFFICILE</i> INOKULATION KONNTE ZUR EINWANDERUNG VON ENTZÜNDUNGSZELLEN IN DEN DARM FÜHREN	43

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: ACR/EULAR-KLASSIFIKATION VON 2019 ZUR DIAGNOSE EINER RA.....	5
TABELLE 2: PER TRINKWASSER VERABREICHTE ANTIBIOTIKA	17
TABELLE 3: CIA-SCORING-PROTOKOLL.....	21
TABELLE 4: ANTIKÖRPERFÄRBEPROTOKOLL DER OBERFLÄCHENANTIGENE	24
TABELLE 5: ANTIKÖRPERFÄRBEPROTOKOLL DER INTRAZELLULÄREN ANTIGENE	25
TABELLE 6: VERSUCHSGRUPPEN	28

Glossar

AB	Antibiotikum
Abb.	Abbildung/Abbildungen
ACPA	Anti citrullinated peptide antibodies (Antikörper gegen citrullinierte Peptide)
ACR	American College of Rheumatology
A. dest.	Aqua destillata
ANOVA	Analysis of variance (Varianzanalyse)
ASC	Antibody secreting cells (Antikörper-sezernierende Zelle)
AUC	Area under the curve
BHI	Brain-Heart-Infusion
BHIS	Brain-Heart-Infusion-Supplemented
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
Caspase	Cysteine-dependent Aspartate-specific Protease (Cystein-abhängige, aspartatspezifische Protease)
CCP	Cyclic citrullinated peptide (Zyklisch citrulliniertes Peptid)
CDAI-Score	Clinical Disease Activity Score
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridioides difficile</i>
CFA	Complete Freund Adjuvans
CIA	Collagen induced arthritis (Kollagen-induzierte Arthritis)
CRP	C-reaktives Protein
CTL	Zytotoxische T-Zellen
DAS28	Disease Activity Score
DMARD	Disease Modifying Anti-Rheumatic Drug
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ESCMID	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
EULAR	European League Against Rheumatism
F1	Erste Filialgeneration
Fc-Fragment	Carboxyterminaler Teil eines Immungloblins
FCS	Fetal calf serum

FFC-H	forward scatter
FMT	Fetaler Mikrobiomtransfer
HE	Hämatoxilin-Eosin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HBSS	Hank´s balanced salt solution
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IFA	Incomplete Freund Adjuvans
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILC	Innate lymphoid cells (Angeborene lymphatische Zellen)
INF- γ	Interferron gamma
KBE	Koloniebildende Einheiten
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MHC	Major Histocompatibility Complex
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PAD	Peptidylarginindeiminase
RA	Rheumatoide Arthritis
RB	Running Buffer
RF	Rheumafaktoren
RNA	Ribonukleinsäure
sham	eng. „Schein“, Scheinbehandlung ohne untersuchten Wirkstoff
Tab.	Tabelle/Tabellen
TcdA	<i>C.difficile</i> Toxin A
TcdB	<i>C.difficile</i> Toxin B
TGF	Transforming growth factor
Th	T-Helfer
TNF	Tumornekrosefaktor

I. ZUSAMMENFASSUNG

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist als Volkskrankheit eine der relevantesten Pathologien autoimmuner Genese. Auch wenn die RA schon viele Jahrzehnte untersucht wird, sind immer noch nicht alle Einflüsse bekannt, die dieses komplexe Krankheitsbild modulieren. Trotz immer neuer Forschungsergebnisse und Therapieansätze bleibt sie demnach eine noch unzureichend erforschte und unheilbare Erkrankung. Viele Studien wiesen bislang auf ein Zusammenspiel der Erkrankung mit dem intestinalen Mikrobiom hin. Da bereits gezeigt werden konnte, dass eine bakterielle Infektion mit *Clostridioides difficile* eine Abschwächung arthritischer Symptome zur Folge hat, sollte der Fokus der vorliegenden Arbeit auf den immunologischen Veränderungen des adaptiven Immunsystems der Maus liegen, welche sowohl mit einer Kollagen-induzierten Arthritis (CIA), einem viel genutzten Mausmodell für die RA, als auch mit der *Clostridioides difficile* Infektion (CDI), einhergehen. Im Versuchsaufbau wurde ein Teil der Tiere mit *C. difficile* infiziert, ein anderer Teil galt als nicht-infizierte Kontrollgruppe. Anschließend erfolgte die Induktion der CIA bei allen Versuchstieren. Dabei lag der Schwerpunkt der Untersuchung neben den klinischen Arthritis Ausprägungen auf den Veränderungen, welchen die CDI und die CIA auf die Zellpopulationen des adaptiven Immunsystems hatten. Entgegen der Erwartungen zeigte sich, dass alle Tiere, unabhängig ihres Infektionsstatus die Symptome einer Arthritis entwickelten und dabei auch kein spezifischer Unterschied zwischen infizierten und nicht-infizierten Tieren ausgemacht werden konnte. In diesem Zusammenhang zeigte sich jedoch auch, dass eine Inokulation mit *C. difficile* nicht den gewünschten Effekt, eine symptomatische Durchfallerkrankung, auf die Versuchstiere hatte. Dadurch definierten wir die These, dass eine subklinische Infektion mit *C. difficile*, im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Effekten einer klinischen CDI, zu keiner Verringerung der Arthritis-Inzidenz führte. Unter diesen Umständen bewirkte die subklinische CDI nur geringe Veränderung in der Zusammensetzung von Th-Subpopulationen wie beispielsweise eine transiente Anreicherung der Th2-Zellen und Depletion der Th1- und Th17-Zellen nach CDI bei den Lymphozyten der Darmmukosa. Im Hinblick auf die CIA stellte sich im zeitlichen Verlauf des Versuchs mit zunehmender CIA ein mengenmäßiger Abfall der CD4-positiven Zellen in den inguinalen Lymphknoten dar, welcher sich jedoch bei den infizierten und nicht infizierten Tieren zeigte und somit erneut die nur subklinische Ausprägung der CDI unterstrich.

II. EINLEITUNG

2.1 RHEUMATOIDE ARTHRITIS

2.1.1 EPIDEMIOLOGIE UND SYMPTOMATIK

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine systemische, chronisch-entzündliche Gelenkerkrankung. Die Autoimmunerkrankung betrifft in erster Linie die Gelenke, dabei meist mehrere gleichzeitig und wird daher auch als chronische Polyarthritits bezeichnet. Mit einer Prävalenz von 0,4% in Nord- und Westeuropa und 0,2% in Süd- und Osteuropa (2017) stellt sie in Europa eine Volkskrankheit mit hoher sozioökonomischer Relevanz dar, deren Prävalenz und Inzidenz in den Jahren von 1990 bis 2017 angestiegen sind. Es zeigt sich dabei besonders ein vermehrtes Vorkommen in Industrieländern und urbanen Regionen (Abb. 1) (Finckh et al., 2022). Dabei kann, wie bei vielen autoimmunen Erkrankungen, eine erhöhte Prävalenz und ein früheres Auftreten bei Frauen im Vergleich zu Männern festgestellt werden (Crowson et al., 2011; Ngo et al., 2014).

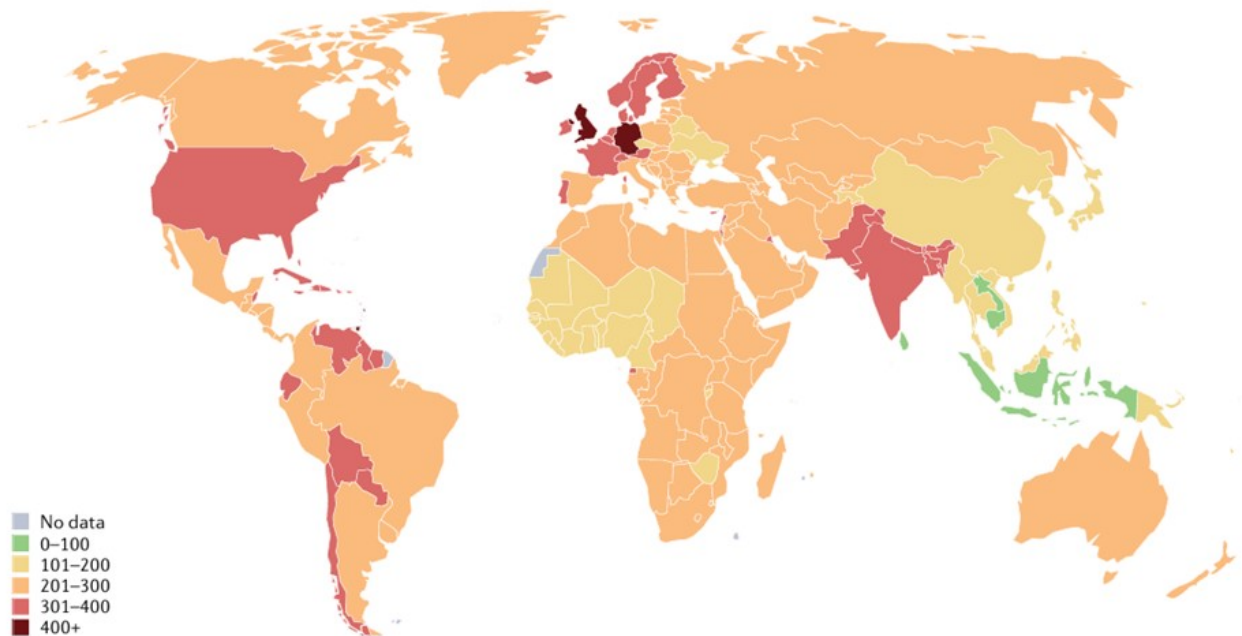


Abbildung 1: Globale Prävalenz der rheumatoiden Arthritis. Dargestellt ist die gemeldete Prävalenz für rheumatoide Arthritis (RA) für jedes Land (pro 100.000 der Bevölkerung). Farbkodierung je nach Höhe der Prävalenz wie links aufgezeigt. Die Daten sind der Global Burden of Disease (GBD) 2017 Studie entnommen. Die ACR-Kriterien von 1987 wurden als Referenz für die Falldefinition festgelegt. Darstellung der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Axel Finckh (Finckh et al., 2022).

Im Volksmund oft nur „Rheuma“ genannt, hat die rheumatoide Arthritis daher einerseits einen starken Einfluss auf die einzelnen betroffenen Patientinnen und Patienten, andererseits aber auch auf das Gesundheitssystem im Ganzen. Initial bemerken betroffene Personen eine Morgensteifigkeit der Gelenke sowie Abgeschlagenheit, subfebrile Temperaturen und eine Schwellung, Rötung und Schmerzhaftigkeit der Gelenke. Betroffen sind dabei besonders die Fingergrundgelenke (Metakarpophalangealgelenke) beziehungsweise Zehengrundgelenke (Metatarsophalangealgelenke), die Fingermittelgelenke beziehungsweise Zehenmittelgelenke (Proximale Interphalangealgelenke) sowie die Handgelenke und Sprunggelenke. Im fortschreitenden Krankheitsverlauf können auch größere Gelenke und Wirbelgelenke betroffen sein (Aletaha et al., 2010). Doch nicht nur die artikulären Beteiligungen führen zu Einschränkungen der Patientinnen und Patienten, sondern auch extraartikuläre Organmanifestationen können die Lebensqualität beeinflussen. Es handelt sich dabei neben kardiovaskulären, pulmonalen, renalen, neurologischen und dermatologischen Krankheitsbildern auch um Malignome. Dabei führen vor allem Beeinträchtigungen des kardiovaskulären Systems zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität (Figus et al., 2021). Durch moderne Behandlungsoptionen sind mittlerweile extreme Krankheitsausprägungen wie Schwanenhalsdeformitäten oder Knopflochdeformitäten aus dem öffentlichen Bild weitestgehend verschwunden. Rheumaknoten, welche oft in Regionen entstehen, die einem hohen Druck ausgesetzt sind und durch eine immunvermittelte Granulationsreaktion entstehen, lassen sich aber dennoch bei bis zu 35% der RA Patientinnen und Patienten finden (Tilstra & Lienesch, 2015).

2.1.2 ÄTIOLOGIE UND PATHOPHYSIOLOGIE

Bis zum heutigen Stand sind die Ätiologie und Pathogenese der rheumatoiden Arthritis noch nicht vollständig verstanden und bedürfen noch vieler weiterer Forschung. Was bekannt ist, sind einige Einflussfaktoren für die Entstehung einer RA. Wie bei vielen systemischen Erkrankungen sind diese teilweise durch persönliches Verhalten modifizierbar, wie die Reduktion des Konsum inhalativem Nikotins oder des Übergewichts (Sparks et al., 2014). Weiterhin bekannt ist, dass genetische Voraussetzungen das Auftreten der RA begünstigen können. So spielen besonders HLA-II-Allele (Humanes Leukozyten Antigen) des Subtyps HLA-DR in der Ätiologie dieser Erkrankung eine Rolle (Silman & Pearson, 2002). Diese kodieren eine spezifische Aminosäuresequenz

für geteilte Epitope (*shared epitope*), die mit einer höheren Seropositivität, also höheren Titern von Rheumafaktoren, einhergehen und oft mit einem schweren Verlauf korrelieren (Gregersen et al., 1987). Dass weiterhin die Integrität der Mukosa und Veränderungen des intestinalen Mikrobioms einen starken Einfluss auf die Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis und Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises im Allgemeinen haben, ist bereits mehrmalig bewiesen worden (Rooney et al., 2020; Zais et al., 2021). Neben Viren wie das Epstein-Barr-Virus oder Parvovirus B19 sind auch Bakterien mit der Ätiologie der rheumatoiden Arthritis mittlerweile fest verbunden (Silman, 1989). So kann beispielsweise *Porphyromonas gingivalis* durch das Enzym Peptidylarginindeiminase (PAD) eine Citrullinierung durchführen, bei der Arginin zu Citrullin umgesetzt wird. (Rosenstein et al., 2004; Wang & Wang, 2013; Wegner et al., 2010). Dadurch werden diese citrullinierten Peptide (CCP) wie Vimentin, Fibrin und Fibrinogen von körpereigenen Zellen als fremd erkannt und im Sinne einer autoimmunen Reaktion angegriffen (Abdullah et al., 2013; Romero-Figueroa et al., 2023). In einer bisher nicht veröffentlichten Rostocker Proteinsequenzanalyse konnte nun eine Übereinstimmung im aktiven Zentrum der PAD von *P. gingivalis* und *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) nachgewiesen werden. Daher beruhen bereits einige Betrachtungen der Arbeitsgruppe Klinische Immunologie in Rostock auf der Untersuchung des Einflusses einer *Clostridioides difficile* Infektion auf die Ausprägungsmerkmale der rheumatoiden Arthritis, um ein tieferes Verständnis der Pathophysiologie dieser Erkrankung zu erlangen.

2.1.3 DIAGNOSTIK

Im Allgemeinen beginnt die Diagnosestellung der RA mit einer weiterführenden Anamnese, wobei eruiert wird, in welcher Hinsicht sich die Symptomatik darstellt und inwieweit Patientinnen und Patienten durch die Symptome Einschränkungen erfahren. Nach der körperlichen Untersuchung, bei der besonderes Augenmerk auf Gelenkmanifestationen, aber auch extraartikuläre Darstellungen der rheumatoiden Arthritis gelegt wird, erfolgt die Blutentnahme. Dabei gibt es Parameter, wie das C-reaktive Protein (CRP) oder die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), welche unspezifisch auf Entzündungen hinweisen. Aber auch weitere serologische Marker, die das Vorhandensein einer RA abbilden können, werden quantifiziert. Ein prominenter Vertreter solcher Marker ist der Rheumafaktor (RF), bei dem es sich um Antikörper handelt, die das Fc-Fragment des

TABELLE 1: ACR/EULAR-KLASSIFIKATION VON 2019 ZUR DIAGNOSE EINER RA

Punkte	Gelenkbeteiligung	Serologie	Entzündungsmarker	Dauer
0	≤ 1 großes Gelenk	RF und CCP negativ	CRP und BSG normal	< 6 Wochen
1	2 - 10 große Gelenke		CRP oder BSG erhöht	≥ 6 Wochen
2	1 - 3 kleine Gelenke	RF oder CCP gering positiv		
3	4 - 10 kleine Gelenke	RF oder CCP stark positiv		
5	> 10 Gelenke (mind. 1 kleines Gelenk)			

körpereigenen IgG binden. Obwohl der Nachweis eines hohen RF-Titers mit einem aggressiveren Krankheitsbild und rascheren Progredienz der Erkrankung assoziiert ist, ist der RF ein relativ unspezifischer Marker für die RA. So weisen circa 5-25% aller gesunden Personen diesen im Serum auf und auch bei anderen Krankheitsbildern kann RF nachgewiesen werden. Dazu zählen andere Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises wie Kollagenosen und weitere Formen der Arthritis, aber auch bakterielle, virale und parasitäre Infektionen, Lebererkrankungen und Malignome (Ingegneroli et al., 2013; Lisse, 1993). Es wird daher additiv der Nachweis von Anti-CCP-Antikörpern (z.B. ACPA), IgG-Antikörper gegen zyklisch zitruillierte Peptide, genutzt, die eine höhere Spezifität aufweisen und auch schon vor dem Ausbruch der Erkrankung nachgewiesen werden können. Die ACPAs gehen ebenso mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für ein erosives Krankheitsbild einher (Schellekens et al., 2000). Auch die Bildgebung liefert wichtige Hinweise für die Diagnose der rheumatoiden Arthritis. Hier finden vor allem die konventionelle Röntgenuntersuchung, die Arthrosonografie, zur Früherkennung die Magnetresonanztomographie und in speziellen Fällen auch die Szintigraphie Anwendung (Llopis et al., 2017; Tan & Conaghan, 2011). Zur einheitlichen Diagnosestellung der rheumatoiden Arthritis wurde 1987 diagnostische Kriterien definiert und von der EULAR (Europäische Rheuma-Liga) und der ACR

(American College of Rheumatology) 2010 als ACR/EULAR-Klassifikation überarbeitet (Kay & Upchurch, 2012). Dabei werden in vier Kategorien Punkte vergeben, wobei bei einem Punktwert von sechs oder mehr Punkten die Diagnose der rheumatoiden Arthritis gestellt werden kann (Tab. 1).

2.1.4 THERAPIE

Da die rheumatoide Arthritis mit einer gravierenden Reduktion der Lebensqualität einhergeht und im Verlauf auch extraartikuläre Manifestationen zur Morbidität beitragen, ist eine frühe und gezielte Therapie umso wichtiger. Aufgrund des noch unvollständigen Verständnisses über die Pathophysiologie stehen jedoch aktuell nur begrenzt Angriffspunkte für eine medikamentöse Therapie der RA zur Verfügung.

Primär steht, wie so oft bei chronischen Erkrankungen, die Modifikation des Lebensstils an erster Stelle. So kann die Kombination aus mediterraner Diät, physischer Aktivität, Psychoedukation und optimierter Schlafhygiene gemeinsam mit einer Einstellung des Tabakkonsums das Fortschreiten der Krankheit reduzieren (Chehade et al., 2019; Siegel et al., 2017). Nichtsdestotrotz gilt in Bezug auf die medikamentöse Therapie das prognosebestimmende Prinzip „Hit hard and early“, um im frühen therapeutischen Fenster bereits eine Remission zu erzielen und damit der Gelenkerosion Einhalt zu gebieten (Boers, 2003; Cush, 2007). Die Initialtherapie besteht aus Glucocorticoiden und Nicht-Steroidalen-Antirheumatika (NSAR), welche symptomlindernd agieren, bis die Wirkung der gleichzeitig angesetzten Basistherapeutika, der konventionellen DMARDs (Disease-Modifying Antirheumatic Drugs), einsetzt. Zu den konventionellen DMARDs zählen neben Methotrexat als Medikament der ersten Wahl auch Leflunomid, Hydrochloroquin und Sulfasalazin. Bei fehlendem Ansprechen ist primär eine Eskalationstherapie durch den Einsatz von NSAR beziehungsweise Glucocorticoiden in Kombination mit konventionellen DMARDs empfohlen (Demoruelle & Deane, 2012; Singh, 2022). Das Anschlagen der Therapie wird über verschiedene Scores wie beispielsweise den DAS28 (Disease Activity Score) oder den CDAI-Score (Clinical Disease Activity Score) (Anderson et al., 2011; Van Riel & Renskers, 2016) evaluiert. Je nachdem, ob die bisherige Therapie bis dahin effektiv war, folgt entweder die Therapie-Deeskalation oder die aggravierende Therapie mit weiteren konventionellen DMARDs,

biologischen DMARDs (Biologika) wie TNF-Inhibitoren, CD20-Inhibitoren, IL6-Inhibitoren, CD80/86-CD28-Interaktions-Inhibitoren oder IL1-Rezeptorantagonisten oder alternativ targeted synthetic DMARDs wie den Januskinase-Inhibitoren (Lin et al., 2020). Aktuell beziehen sich neuere Therapieansätze auf das Potential der mesenchymalen Stammzelltherapie, Gentherapie oder der Applikation von microRNA (Chasov et al., 2024; Zhang et al., 2023). Da der Bedarf an wirksamer und auch personalisierter Therapie groß ist, ist das Spektrum der Therapeutika für die rheumatoide Arthritis noch nicht ausgeschöpft. Deshalb sollte versucht werden, in der vorliegenden Arbeit einen Beitrag zur Grundlagenforschung der Pathogenese dieser Erkrankung zu leisten, um in Zukunft mit neuen Erkenntnissen über die RA den Weg zu neuen therapeutischen Optionen zu ebnet.

2.1.5 KOLLAGEN-INDUZIERTE-ARTHRITIS

Zur Untersuchung von Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis wird in wissenschaftlichen Studien oft auf Nagetiere wie Mäuse oder Ratten zurückgegriffen. Dabei ist das Modell der Kollagen-Induzierten Arthritis (Collagen-Induced-Arthritis, CIA) eines der bestuntersuchteten (Brand et al., 2003; Schurgers et al., 2011). Es wurde 1977 von der Arbeitsgruppe um Trentham erstmalig für Mäuse beschrieben. Die Ähnlichkeit zwischen der RA und der CIA beruht neben den pathologischen Ausprägungen unter anderem auf dem MHC-II-Molekül (Major Histocompatibility Complex). So sind nur Mäuse mit den Haplotypen H2-Aq und H2-Ar suszeptibel für die CIA (Holmdahl et al., 1989; J. S. Courtenay, 1980; Wooley et al., 1981, 1983). Das ist bei den in dieser Studie verwendeten DBAxB10Q Mäusen gegeben und so kann die CIA durch Injektion von autologem oder heterologem Kollagen Typ II ausgelöst werden. Dies führt dann in Kombination mit Freund's Adjuvans zu einer Polyarthritits, welche nach drei bis vier Wochen klinisch in Erscheinung tritt (Holmdahl et al., 1985). Betroffene Tiere entwickeln eine erosive Arthritis mit Schwellung, Synovialproliferation, Infiltration mononukleärer Zellen sowie Knorpel- und Knochenerosion homolog zu den Symptomen der rheumatoiden Arthritis (Trentham et al., 1978). Damit eignet sich dieses Modell hervorragend, um der Fragestellung dieser Arbeit, welchen Einfluss eine CDI in Kombination mit der CIA auf das murine Immunsystem hat, nachzugehen. Es soll dazu führen, in der Zukunft genauere Pathomechanismen der rheumatoiden Arthritis weiter untersuchen zu können.

2.2 CLOSTRIDIOIDES DIFFICILE

2.2.1 C. DIFFICILE UND DER MENSCHLICHE DARM

Der in dieser Studie verwendete Mikroorganismus *Clostridioides difficile*, bis 2016 als *Clostridium difficile* bezeichnet, ist ein anaerobes, gram-positives und sporenbildendes Bakterium, der häufigste Erreger bei nosokomialen Diarrhoen (Hung et al., 2021). Er wurde erstmals 1935 in der Darmflora von gesunden Neugeborenen beschrieben (Hall & O'Toole, 1935). Grundsätzlich führt eine Besiedelung des Darmes mit *C. difficile* nicht zwangsmäßig zu einer Infektion. Sie kann im Rahmen der physiologischen Darmflora als Kommensale vorkommen (Eckburg et al., 2005).

Als *Clostridioides difficile* Infektion (CDI) hingegen bezeichnet man die symptomatische Ausprägung der Besiedelung. Das Krankheitsbild kann sich dabei von Diarrhö und Emesis bis zur pseudomembranösen Kolitis und toxischem Megakolon in vielen Ausprägungen zeigen (George et al., 1978). Es gibt viele Faktoren, die zum Auftreten einer *C. difficile* Infektion führen können. Dazu gehören ein erhöhtes Lebensalter, die Einnahme von Protonenpumpeninhibitoren, Komorbiditäten und Hospitalisierungen im Allgemeinen. Den stärksten Einfluss hat jedoch eine antibiotische Therapie und deren Dauer durch die Veränderung des natürlichen Mikrobioms des Darms (Bauer et al., 2011; Howell et al., 2010). Die Antibiotika, welche häufig mit einer CDI assoziiert sind, werden je nach Quelle als Clarithromycin, Amoxicillin, Amoxicillin/Clavulansäure (Chalmers et al., 2016), Ciprofloxacin (Issa et al., 2007), Clindamycin (Mounsey et al., 2020), Kanamycin, Metronidazol, Vancomycin und Cefoperazon (Theriot et al., 2014) deklariert.

2.2.2 PATHOGENESE DER CLOSTRIDIOIDES-DIFFICILE-INFektion

Die Virulenz von *C. difficile* beruht unter anderem auf der Produktion der Exotoxine Enterotoxin A (TcdA) und Zytotoxin B (TcdB) (von Eichel-Streiber, 1993), wobei das Vorhandensein beider Toxine für die Ausbildung einer klinischen Symptomatik relevant erscheint, eine Infektion aber auch durch nur ein vorhandenes Toxin zustande kommen kann (Kuehne et al., 2010). Pathophysiologisch handelt es sich bei den Toxinen A und B um Glykosyltransferasen, welche einerseits durch die Inaktivierung der Rho-GTPase im Sinne einer „loss-of-function“-Reaktion zur Dysorganisation des Zell-Zytoskeletts und anschließend zum programmierten Zelltod führen (Just & Gerhard, 2004).

Des Weiteren kommt es andererseits durch eine „gain-of-function“-Reaktion zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine durch TcdA und TcdB. Das geschieht in mehreren Schritten über eine Rho-gekoppelte Aktivierung der Caspase-1, einem zentralen Regulator der angeborenen Immunantwort. Es werden dadurch IL-1 β und IL-18 aktiviert, wobei diese wiederum zur Ausschüttung von IL-8 und INF- γ führen. Diese Faktoren können zum Zelltod der Kolonozyten führen, was wiederum durch die Permeabilitätssteigerung der Zellmembran mit Verlust der Zell-Zell-Kontakte zu einer Retention von Flüssigkeit im Kolonlumen führt, wodurch der für die CDI so typische Durchfallzustand kommt (Di Bella et al., 2016).

2.2.3 SYMPTOMATIK

Der kennzeichnende Durchfall ist somit ein Teil der klassischen Symptomkonstellation, mit der eine Infektion mit *Clostridioides difficile* beim Menschen einhergeht. Dieser kann oft akut einsetzen und meist wässrig, gelegentlich auch blutig ausfallen. Zusätzlich entwickeln Patientinnen und Patienten oft subfebrile Temperaturen und meist auch abdominale Schmerzen mit einer Verschlechterung des Allgemeinzustands. Ein schwerer Verlauf der *C. difficile* Infektion zeigt sich dabei durch eine Leukozytose, Fieber, Kreatininanstieg und eine in der bildgebenden Diagnostik darstellbare Kolonwandverdickung (van Prehn et al., 2021). Im Extremfall kann eine CDI bis zum Tod führen. Dabei liegt die Letalität für die herkömmlichen Bakterienstämme bei 1%, bei hypervirulenten Stämmen aber auch darüber (Pépin et al., 2005). Darum ist natürlich eine frühe Diagnostik und eine zielführende Therapie besonders relevant für das Outcome der Patientinnen und Patienten.

2.2.4 DIAGNOSTIK

Nach der European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) gilt dabei die Diagnose einer CDI als gesichert, wenn entweder die klinische Symptomatik in Kombination mit einem *C. difficile* Nachweis durch ein mikrobiologisches Nachweisverfahren vorliegt oder in der Endoskopie (alternativ am Kolektomiepräparat oder in der Autopsie) der Nachweis einer pseudomembranösen Kolitis in Kombination mit dem Nachweis toxinbildender *C. difficile* erbracht wird (van Prehn et al., 2021). Neben Standarduntersuchungen wie Blutuntersuchung, Kontrolle der Vitalparameter

und gegebenenfalls der Koloskopie oder einer Bildgebung sind spezifischere Untersuchungen das Mittel der Wahl für die Diagnostik der CDI bei symptomatischen Patientinnen und Patienten. Initial wird dabei auf die Antigenuntersuchung mittels Enzymimmunoassays zurückgegriffen, die den Nachweis der von *C. difficile* exprimierten Glutamat-Dehydrogenase erbringen. Da dieser Test zwar eine hohe Sensitivität, jedoch eine geringe Spezifität aufweist, kommen in zweiter Reihe Methoden zum Nachweis der Toxine A und B zur Anwendung. Diese werden über ELISA oder auch als Goldstandard mit Zytotoxizitätstests nachgewiesen. Es handelt sich dabei um Nachweismethoden, die zwar eine geringere Sensitivität für den Nachweis von *Clostridioides difficile* hat, das Vorliegen der Toxine jedoch sicher nachweisen können. Dementsprechend empfiehlt die ESCMID auch eine mehrstufige Vorgehensweise bei der Diagnostik der *Clostridioides difficile* Infektion (Gateau et al., 2018). Ihrem Namen Ehre machend, ist die Anzucht von *C. difficile* Bakterien aus einer Stuhlkultur sehr diffizil und langwierig und daher wird diese Nachweismethode eher im Sinne einer Resistenanalyse und nicht für die Akutdiagnostik genutzt (Lübbert et al., 2014).

Im tierexperimentellen Design wird zur Diagnostik der CDI auf die Faktoren der Diarrhoe und des schlechten Allgemeinzustandes zurückgegriffen, welcher sich durch Gewichtsverlust, Apathie und verminderter Körperhygiene der Versuchstiere darstellt.

2.2.5 THERAPIE

Sollte sich bei einer Patientin oder einem Patienten eine symptomatische CDI diagnostizieren lassen, ist der erste Schritt, der einer suffizienten Therapie vorausgeht, das Absetzen der auslösenden Antibiotika (Ofosu, 2016). Es schließen sich eine supportive Therapie des Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt an sowie die Absetzung von Protonenpumpeninhibitoren, Nicht-Steroidalen-Antirheumatika (NSAR) und Medikamenten zur Verlangsamung der Darmmotilität. Während bei einem milden Krankheitsverlauf weiterhin Metronidazol als Antibiotikum für die Therapie der anaeroben *C. difficile* eingesetzt wird, hat bei schweren Verläufen nach internationalen Leitlinien mittlerweile Fidaxomycin Vancomycin als Antibiotikum der First-Line-Therapie abgelöst. Sollten ökonomische Gründe gegen den Einsatz des kostspieligeren Fixadomycins sprechen, ist die Therapie mit Vancomycin jedoch mikrobiologisch akzeptierbar. Im Falle eines CDI-Rezidives sollte aber trotzdem auf Fidaxomycin zurückgegriffen werden (Johnson et al., 2021). Bei therapierefraktärer *C. difficile* Infektion kann auch eine

Therapie mit Fäkalem Mikrobiomtransfer (FMT) erfolgen, bei der aufgereinigter Stuhl nach Spenderscreening via Koloskopie oder mittels einer nasojejunalen Sonde verabreicht wird (Rupawala et al., 2021). Weiterhin wird als Behandlungsoption der monoklonale Antikörper Bezlotoxumab eingesetzt, ein Neutralisator des *C. difficile* Toxins B, der in Kombination mit einer antibiotischen Therapie das Risiko einer Rekurrenz der Infektion senken kann (Wilcox et al., 2017). Neue Therapieansätze bilden zum einen auch Bakteriocine. Es handelt sich dabei um von Bakterien abgesonderte proteino-gene Toxine, die das Wachstum von Bakterienstämmen hemmen und damit zur CDI-Therapie eingesetzt werden können (Walsh et al., 2024). Zum anderen ergibt sich in der Bakteriophagen-Therapie, die auch allgemein in der Bekämpfung multiresistenter Bakterien diskutiert wird, eine Option zur Therapie der *C. difficile* Infektion. (Fujimoto & Uematsu, 2022). Die operative Therapie spielt in der Behandlung der *Clostridioides difficile* Infektion eher eine untergeordnete Rolle und beschränkt sich hauptsächlich auf die Behandlung und Vermeidung von Komplikationen (Lübbert et al., 2014). Im Sinne der Infektions- und Ausbreitungsprophylaxe ist eine Infektion mit *C. difficile* nach dem deutschen Infektionsschutzgesetz meldepflichtig.

2.3 DIE DARM-GELENK-ACHSE

Ein Aspekt, der für das Verständnis der vorliegenden Arbeit relevant ist, ist die Verbindung zwischen rheumatoider Arthritis und *C. difficile* Infektion. Dabei ist die Darm-Gelenk-Achse ein bekanntes Modell, mit dem der Einfluss des intestinalen Mikrobioms auf die Pathophysiologie verschiedener Gelenkerkrankungen beschrieben wird (Zaiss et al., 2021). Es kommt dabei durch Störung des natürlichen Mikrobioms des Darms mittels verschiedenster Erreger zu bisher noch unvollständig verstandenen pathologischen Prozessen, welche wiederum zu einer Modulation des Immunsystems führen, wodurch artikuläre Krankheitsbilder gefördert werden können. Dies können vorübergehende Pathologien wie eine reaktive Arthritis nach einer bakteriellen Darmerkrankung sein (Jubber & Moorthy, 2021), aber auch manifeste Krankheitsbilder wie die rheumatoide Arthritis, die Osteoarthritis oder die Spondyloarthritis (Gracey et al., 2020; Jeyaraman et al., 2023; Zaiss et al., 2021). Infolgedessen steigt die Rolle des externen Einflusses auf den Darm im Hinblick auf therapeutische Optionen sowohl bei Gelenkerkrankungen als auch bei Autoimmunerkrankungen. Dies beinhaltet Behandlungen

mit Probiotika, gesunde Ernährung oder Anregung der Darmperistaltik durch körperliche Aktivität (de Sire et al., 2020).

2.4 DAS ADAPTIVE IMMUNSYSTEM

Das menschliche Immunsystem ist ein mehrdimensionaler Abwehrmechanismus, dessen Bestimmung es ist, durch Kontakt mit der Umwelt entstehende Einflüsse und Erkrankungen abzuhalten, abzuwehren und zu eliminieren. Aufgrund seiner Komplexität ist es noch immer in vielen Teilen unverstanden und es besteht damit weiterhin die Notwendigkeit, durch experimentelle Studien die Grundlagenforschung weiter voranzutreiben.

Das Immunsystem wird als Träger der Immunantwort in ein angeborenes und ein erworbenes (adaptives) Immunsystem aufgeteilt. Diese stehen in engem Austausch zueinander und haben die Aufgabe, den Organismus von Pathologien zu schützen. Dabei ist jedem Part eine zelluläre und eine humorale (lösliche) Immunantwort eigen, welche jeweils eigene Aufgaben in diesem vielschichtigen System übernehmen. Neben dem Schutz vor externen Pathogenen wirkt das intakte Immunsystem auch körpereigenen Pathologien wie Autoimmunerkrankungen und Malignomen entgegen (Neumann, 2008).

Während das angeborene Immunsystem vor allem schnelle Reaktionen auf Angriffe von Pathogenen bietet, reagiert das adaptive Immunsystem langsamer, dafür jedoch spezifischer auf Antigenkontakt. Das bietet evolutionäre Vorteile, indem es dem Organismus erlaubt, sich an neue Infektionen anzupassen und sich besser gegen wiederholte Exposition zu verteidigen (Cooper & Alder, 2006). Die Hauptakteure des adaptiven Immunsystems sind neben den B-Lymphozyten, welche für die Antikörperbildung und das immunologische Gedächtnis zuständig sind, die T-Lymphozyten, welche aus dem Thymus (T) stammen. Dort werden sie entweder als CD4-positiv selektiert und differenzieren sich zu T-Helfer-Zellen (Th) oder als CD8-positiv selektiert und differenzieren sich zu zytotoxischen T-Zellen (CTL) (Bonilla & Oettgen, 2010). Damit sowohl die CTLs als auch die Th-Zellen optimal aktiviert werden können, ist neben der Bindung an den T-Zell-Rezeptor auch das Erkennen eines MHC-Rezeptors (Major Histocompatibility Complex) notwendig. Dabei erkennen die CD8-positiven Zellen den

MHC-I-Rezeptor, die CD4-positiven Zellen den MHC-II-Rezeptor bei der Antigenpräsentation (Holling et al., 2004). Während die Hauptaufgabe der CTLs die Abtötung körpereigener, von Virus befallener oder entarteter Zellen durch Apoptose ist (Shresta et al., 1998), differenzieren sich die Th-Zellen in der T-Zell-Polarisierung mittels Zytokineinfluss zu weiteren T-Zell-Subpopulationen. Es handelt sich dabei unter anderem um Th1-Zellen, Th2-Zellen, Th17-Zellen und regulatorische T-Zellen (Treg) (Luckheeram et al., 2012).

In diesem komplexen System übernehmen die Th1-Zellen die Bekämpfung intrazellulärer Pathogene sowie Bakterien wie *C. difficile*. Sie interagieren mit antigenpräsentierenden Makrophagen und exprimieren die Zytokine IL-2 und INF- γ (Morinobu & Kumagai, 1998). Die extrazellulären Parasiten hingegen werden durch die Th2-Zellen bekämpft. Diese exprimieren die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 und wirken unter anderem über die Stimulation der B-Zellen, welche einen Klassenwechsel der Antikörper hin zu den antiparasitären IgE Antikörper veranlassen. Weiterhin spielen sie eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Allergien (Goetzl, 2024).

Im angeborenen Immunsystem sind die angeborenen lymphatischen Zellen (innate lymphoid cells, ILC) das Pendant der T-Zellen. Sie sezernieren ähnliche Zytokinmuster wie die T-Zellen und werden in drei Gruppen, ILC1, ILC2 und ILC3 unterteilt. Dabei fördern die ILC1 Zellen die Th1 Antwort, die ILC2-Zellen spiegeln durch ihre Rolle bei allergischen und parasitären Reaktionen die Th2-Zellen und die ILC3-Zellen spiegeln die Th17-Zellen durch Ausschüttung von IL-17 und Abwehr extrazellulärer Bakterien und Pilze (Hazenberg & Spits, 2014).

Die Balance zwischen Th1 und Th2 ist ein Kernpunkt allgemeiner immunologischer Pathologien. So können Th1-Zellen die Hemmung von Th2-Zellen herbeiführen und umgekehrt. Man sprach dabei ursprünglich vom Th1-Th2-Paradigma (Mills et al., 2000). Ein Übergewicht von Th1-Zellen kann dementsprechend autoimmune Erkrankungen wie die rheumatoide Arthritis fördern, ein Übergewicht von Th2-Zellen hingegen Allergien. Allerdings gibt es mittlerweile auch Stimmen, welche diese strikte Einteilung hinterfragen, weil die Plastizität und Flexibilität dieser Zellen damit nicht ausreichend abgebildet ist (Raouia et al., 2024; Rogozynski & Dixon, 2024).

Die Aufgabe der Th17-Zellen dagegen ist die Elimination extrazellulärer Bakterien und Pilze vor allem an der Schleimhautoberfläche, wie auch beispielsweise die Abwehr einer CDI bereits in der Darmmukosa. Sie sezernieren IL-17 und spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung neutrophiler Granulozyten, eine Überaktivität jedoch führt zu

Entzündungsreaktionen, auch gegen körpereigenes Gewebe wie bei der rheumatoiden Arthritis (Yasuda et al., 2019).

Als Sicherheitsmechanismus dieses ausbalancierten Systems fungieren die Treg-Zellen. Sie produzieren IL-10 und TGF- β , regulieren im Sinne einer negativen Rückkopplung die CD4-positiven Zellen und verhindern dadurch überschießende Immunreaktionen (Jiang et al., 2021).

Die Flexibilität des gesamten Immunsystems außerhalb starrer Einteilungsgrenzen wird, wie bei der Überarbeitung des Th1-Th2-Paradigmas, immer wieder neu diskutiert. So konnte beispielsweise Komatsu 2014 darstellen, dass bei einigen autoimmunen Erkrankungen, wozu auch die RA gehört, eine pathologische Umprogrammierung von Treg-Zellen zu beobachten ist, bei der diese ihre immunsuppressive Eigenschaft verlieren und zu proinflammatorischen Th17-Zellen umgewandelt werden.

Diese Erkenntnisgewinne in Relation zueinander zu setzen und daraus allgemein gültige Thesen abzuleiten, bleibt eine wichtige Aufgabe aktueller Forschung.

2.5 ZIEL DER ARBEIT

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, den immunologischen Einfluss einer Infektion mit *Clostridioides difficile* auf die Kollagen-induzierte Arthritis sowie den eigenen Einfluss der CIA auf die adaptive Immunantwort zu untersuchen. Dieses Werk schließt an vorherige Experimente der Arbeitsgruppe Klinische Immunologie der Universität Rostock an, welche zeigen konnten, dass eine symptomatische Infektion mit *C. difficile* die Symptome einer Kollagen-induzierten Arthritis lindern konnte (Schmidt et al., 2020). Daher wollten wir hiermit dieses Studienergebnisses in Hinsicht auf das adaptive Immunsystem näher beleuchten. Dabei wurden der *Clostridioides difficile* Stamm VPI 10463 und der Mausstamm DBAxB10Q genutzt.

Es sei darauf hingewiesen, dass die Experimente, Auswertungen und Interpretationen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, in Zusammenarbeit mit Lukas Wenzel durchgeführt wurden. Eine von ihm publizierte Veröffentlichung wird dementsprechend ähnliche Inhalte aufweisen, wobei sich Herr Wenzel dabei vermehrt auf die Auswirkungen von *C. difficile* Infektion und Kollagen-induzierter Infektion auf das angeborene Immunsystem fokussieren wird.

III. MATERIAL UND METHODEN

3.1 VERWENDETE MATERIALIEN

Die Auflistung des Materials, welches im Laufe des Experiments verwendet wurde, erfolgt über die Tabellen im Anhang. Dabei handelt es sich um Verbrauchsmaterialien (Anhang Tabelle 1), genutzte Chemikalien und Reagenzien (Anhang Tabelle 2), Lösungen und Medien (Anhang Tabelle 3), sowie benötigte Geräte (Anhang Tabelle 4) und genutzte Softwareprogramme (Anhang Tabelle 5). Die Auflistung beinhaltet dabei nur versuchsspezifische Materialien. Allgemeine Bedarfsmaterialien wie Pipettenspitzen oder Reaktionsgefäße wurden dem Laborbestand entnommen.

3.2 GENUTZTE METHODEN

3.2.1 VERSUCHSTIERE

Beim Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei des Landes Mecklenburg-Vorpommern wurde unter dem Aktenzeichen 7221.3-1.1-016/19 ein Antrag auf Genehmigung dieses Tierversuchsvorhabens gestellt, welchen die Behörde bewilligte. Die Versuchsdurchführung erfolgte unter steter Einhaltung der aus dem Antrag hervorgehenden Auflagen. Im Versuch wurden männliche Mäuse der F1 Generation aus der Verpaarung von weiblichen DBA/1 Mäusen und männlichen B10.Q Mäusen verwendet. Die Zucht der Tiere erfolgte in der zentralen Versuchstierhaltung am Rudolf-Zenker-Institut für experimentelle Chirurgie (IEC) der Universitätsmedizin in Rostock. Die Zuchttiere stammten ursprünglich von The Jackson Laboratory (Bar Harbour, Maine, USA). Tiere in einem Alter von 8 bis 12 Wochen wurden in den Versuch aufgenommen. Die Haltung der Tiere erfolgte zu höchstens vier Tieren in einem einzelbelüfteten Käfig unter Pathogen-freien Bedingungen sowie unter permanenter Kontrolle der Raumtemperatur bei 22-24°C und einer Luftfeuchtigkeit von $37 \pm 5\%$ sowie unter Erschaffung eines artifiziiellen 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus. Die Mäuse erhielten Futter (ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland) und Trinkwasser (Leitungswasser) ad libitum sowie nach Beginn des invasiven Verfahrens der CIA regelhaft Analgetika über das Trinkwasser. Es erfolgte eine tägliche visuelle Kontrolle der Ver-

suchstiere auf Auffälligkeiten und Pathologien sowie eine Bestimmung des Körpergewichtes zur Überwachung des allgemeinen Gesundheitszustandes. Weiterhin wurde ein Wechsel des Trinkwassers im Zweitagesrhythmus vollzogen, sowie eine Reinigung und Neubefüllung der Haltungskäfige mit Streu und Nestbaumaterialien im Wochenrhythmus.

3.2.2 CLOSTRIDIODES-KULTIVIERUNG

Für die Infektion der Versuchstiere mit *C. difficile* wurde eine Suspension erstellt, die via Schlundsonde appliziert wurde. Die Bakterienurkultur des Stammes VPI 10463 wurde freundlicherweise vom Institut für Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Universität Rostock zur Verfügung gestellt. Durch Ausplattieren wurde die *C. difficile* Stammkultur auf einem Brain-Heart-Infusion-Agar-Medium (BHI-Agar) rekultiviert, indem die Platten für 24-30 h bei 37°C in anaerober Atmosphäre (10% CO₂, 10% H₂, 80% N₂) inkubiert wurden. Gewachsene Kolonien wurden anschließend vereinzelt und in ein Röhrchen mit 7 ml flüssigem Brain-Heart-Infusion-Supplemented-Medium (BHIS-Medium) zur Herstellung einer Vorkultur überführt. Nach 16 h Inkubation bei 37°C anaeroben Wachstum wurde 1 ml dieser Vorkultur in weitere 9 ml BHIS-Medium überführt und erneut für 3 h bei 37°C anaerob inkubiert. Die mittlere exponentielle Wachstumsdichte wurde durch die photometrische Messung der optischen Dichte bei 600nm (OD₆₀₀) von etwa 0,5 bis 1,2 bestätigt. Die Bakterienflüssigkultur wurde dann durch Verdünnung mit weiterem BHIS-Flüssigmedium auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt. Dadurch entstand eine Bakteriensuspension, welche $1,5 \cdot 10^8$ Koloniebildende Einheiten (KBE) enthielt. Diese Konzentration war in Vorexperimenten durch Wachstumskurven bestätigt worden. Um die für die orale Applikation notwendige Suspension mit einer Bakterienmenge von 10^5 KBE herzustellen, wurde eine Verdünnungsreihe mit BHIS-Flüssigmedium genutzt, wobei die auf 10^5 KBE konzentrierte Bakteriensuspension schlussendlich in einem Volumen von 600 µl vorlag. Für die Applikation des Mediums bei den Tieren der Kontrollgruppe wurde ein BHIS-Medium ohne *C. difficile* vorbereitet. Zur Bestätigung der Vitalität und des Wachstums der *C. difficile* Applikationskultur wurde diese mit PBS (Phosphate-buffered-saline) verdünnt, auf BHIS-Agarplatten aufgetragen, über Nacht bei 37°C anaerob inkubiert und das Wachstum am folgenden Tag durch makroskopische Überprüfung auf Koloniewachstum kontrolliert.

TABELLE 2: PER TRINKWASSER VERABREICHTE ANTIBIOTIKA

Antibiotikum	Konzentration	Hersteller
Kanamycinsulfat	0,4mg/ml	Carl Roth, Karlsruhe
Gentamycin	0,035mg/ml	Ratiopharm, Ulm
Colistin	850U/ml	InfectoPharm, Heppenheim
Metronidazol	0,215mg/ml	Braun, Melsungen
Vancomycin	0,045mg/ml	MiP Pharma, Blieskastel

3.2.3 ANTIBIOTIKA-APPLIKATION ZUR BEREITUNG DER INFektion

Es erfolgte die Störung des Darmmikrobioms mittels Antibiotika, um die Versuchstiere anfällig für eine CDI zu machen. Dafür wurden den Versuchsmäusen sowohl über das Trinkwasser als auch direkt mittels intraperitonealer Injektion Antibiotika verabreicht. Nach Akklimation der Versuchstiere in den Versuchskäfigen wurde am ersten Tag des Experiments mit der Verabreichung von antibiotikahaltigem Trinkwasser begonnen. Dieses erhielten die Versuchstiere in ihren Käfigen von Tag eins bis Tag drei ad libitum. Ab Tag vier wurde den Tieren wieder normales Trinkwasser angeboten. Die intraperitoneale Injektion von Clindamycin erfolgte an Tag sechs, bevor an Tag sieben die Applikation der *C. difficile* Suspension stattfand. Bei der oralen Antibiotika-Applikation handelte es sich um steriles Trinkwasser, welches mit definierten Mengen verschiedener Antibiotika versetzt war (Tab. 2). Dabei wurde von der Annahme ausgegangen, dass eine Versuchsmaus circa 30 g wiege und pro Tag circa 3 ml Trinkwasser benötige. Die antibiotische Trinkwasserbeimengung erfolgte sowohl bei den Tieren der Interventionsgruppe als auch bei den Tieren der Kontrollgruppe. Die an Versuchstag sechs durchgeführte Injektion von 0,3 mg Clindamycin in 0,2 ml Volumen pro Versuchstier erfolgte ebenfalls in bei allen Tieren der Versuchsgruppe und denen der Kontrollgruppe. Dafür wurden die Mäuse im Zwangsgriff gehalten und mit Hilfe einer Kanüle das Antibiotikum ventral in der Inguinalregion links oder bei schlechter Zugänglichkeit auch rechts intraperitoneal appliziert (Abb. 2B).

3.2.4 INITIIERUNG DER INFEKTION MIT *C. DIFFICILE*

An Tag sieben der Versuchsreihe wurden die CDI initiiert. Dies erfolgte über die orale Applikation der vorbereiteten Bakteriensuspension über eine metallene Schlundsonde.

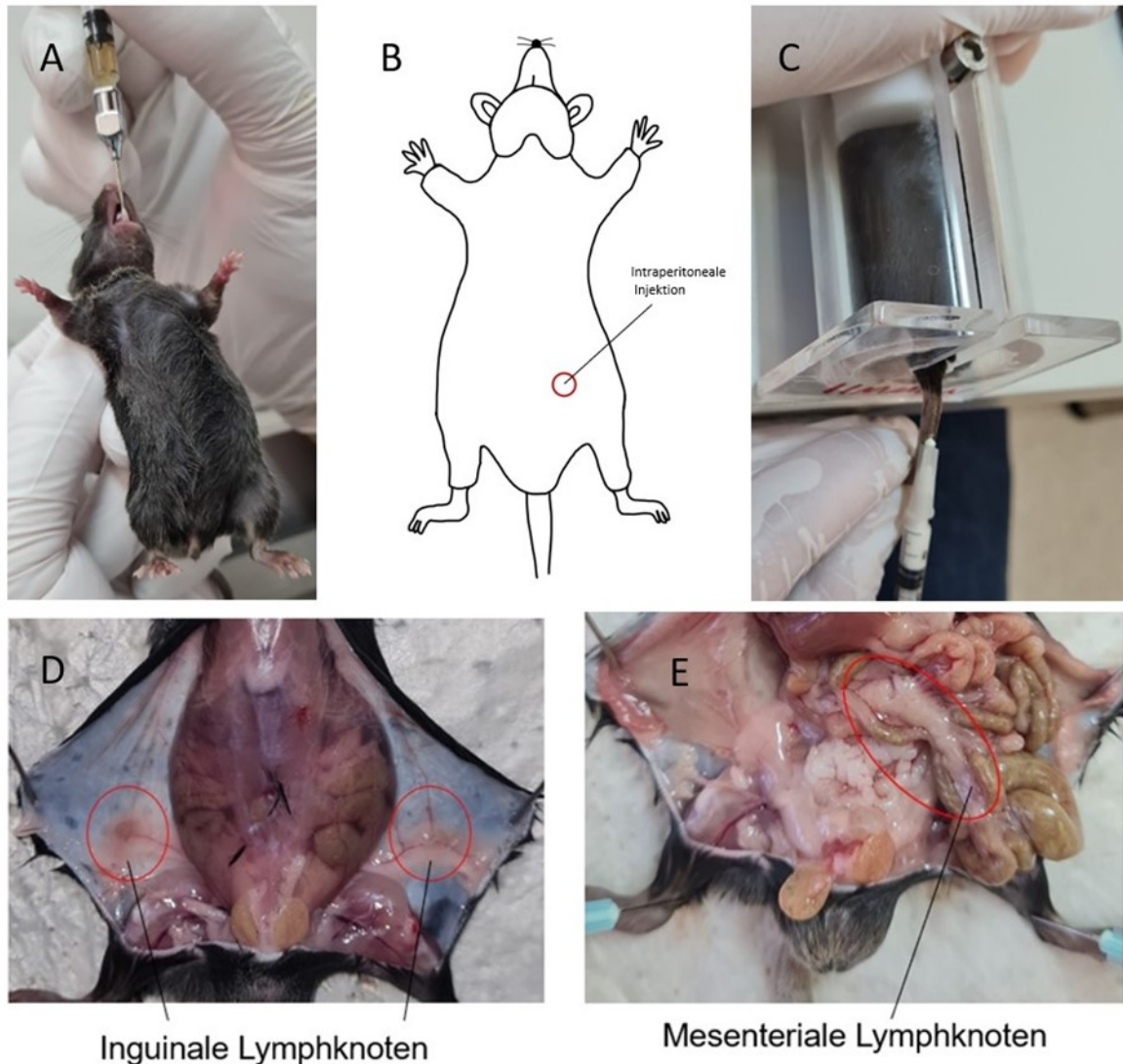


Abbildung 2: Interventionen an der Versuchsmaus. (A) Inokulation der Maus mit Versuchsmedium. Es handelte sich dabei je nach Versuchsgruppe um 10^5 KBE *C. difficile* oder Shammedium, jeweils in einem Volumen von 200 μ l. Dabei wurde die Maus kurzzeitig im Zwangsgriff festgehalten, wobei der Kopf überstreckt wurde. Anschließend erfolgte die Einführung der Schlundsonde, das vorsichtige Applizieren des Versuchsmediums und schließlich die Entfernung der Schlundsonde. (B) Schematische Darstellung einer Versuchsmaus von ventral. Der rote Kreis zeigt die Stelle an, an der die intraperitoneale Injektion des Clindamycin erfolgte. (C) Immunisierung der Versuchsmaus mit Kollagen zur Induktion der Kollagen-induzierten-Arthritis. Die Maus wurde durch Halten am Schwanz rückwärts in den Restraainer eingeführt. Nach Fixierung erfolgte die Markierung der Applikationsstelle an der Schwanzwurzel. Anschließend erfolgte die Injektion des vorbereiteten Kollagens subkutan an der Schwanzwurzel. Dabei wurden jeweils 70 μ l Kollagen links und rechts der den Schwanz versorgenden Gefäße zu einem Gesamtvolumen von 140 μ l injiziert. Anschließend wurde die Maus aus dem Restraainer entlassen. (D) Darstellung der muralen inguinalen Lymphknoten. Nach Eröffnung der behaarten Haut und seitlichem Aufklappen ließen sich die Lymphknoten bilateral im inguinalen Fettgewebe darstellen (rote Kreise). Sie stellten sich dunkler als das umgebende Fettgewebe dar und konnten daher für die Organentnahme gut identifiziert werden. (E) Darstellung der muralen mesenterialen Lymphknoten. Nach der Eröffnung des Peritoneums wurde das Caecum nach unten platziert. Der Dünndarm wurde dann zur Seite gelegt. Nun konnte man die Kette der mesenterialen Lymphknoten eingebettet im mesenterialen Fettgewebe darstellen. (roter Kreis). Die Lymphknotenkette wurde samt dem Fettgewebe entnommen und anschließend vom mesenterialen Fettgewebe befreit.

Dafür wurden die Versuchsmäuse im Zwangsgriff fixiert, was mit der Extension des Kopfes einherging. Dadurch konnte die Schlundsonde zwischen Zunge und Inflexum pellitum (nach innen gewölbte, behaarte Lippenhaut der Maus) in den Ösophagus der Mäuse eingeführt werden (Abb. 2A). Nach korrekter Platzierung der Sonde wurde die Bakteriensuspension langsam appliziert. Nach dem vorsichtigen Entfernen der Schlundsonde aus dem Pharynx wurden die Mäuse wieder in den Käfig zurückgesetzt und noch einige Zeit zur Kontrolle ihres Wohlbefindens beobachtet. Das gleiche Prozedere wurde auch bei den Tieren der Kontrollgruppe angewandt mit dem Unterschied, dass es sich bei der applizierten Substanz um reines BHIS-Flüssigmedium handelte.

3.2.5 INFEKTIONSKONTROLLE

Um den Gewichtsverlauf der Mäuse im Verlauf des Versuchs zu kontrollieren, wurden diese ab dem ersten Versuchstag täglich unter Zuhilfenahme einer Digitalwaage gewogen. Es wurde davon ausgegangen, dass sich eine bestehende CDI durch Gewichtsabnahme zeige. Bei einem Gewichtsverlust von mehr als zehn Prozent des Ausgangsgewichts von Tag sieben (Tag der Infektion *mit C. difficile*) wurden die Tiere aus dem Versuch genommen. Weiterhin wurden die Käfige der infizierten Mäuse täglich auf Diarrhö inspiziert, was ebenfalls als Zeichen einer CDI gewertet wurde.

3.2.6 INDUKTION DER KOLLAGEN-INDUZIERTEN ARTHRITIS

Für die Induktion der Kollagen-induzierten Arthritis erfolgte zuerst an Tag 28 die Primärimmunisierung und an Tag 49, drei Wochen später, die Sekundärimmunisierung. Dafür wurde für die Primärimmunisierung das komplette Freund's Adjuvans (CFA) mit inaktiviertem *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) eingesetzt. Dieses wurde unmittelbar vor der Verabreichung mit in 0,1 M Essigsäure gelöstem bovinen Kollagen Typ II in einer Mischkammer emulgiert. Um die Applikation der Kollagen-CFA-Emulsion durchführen zu können, wurden die Versuchstiere in einer Haltekammer fixiert, in der ein freier Zugang zur Schwanzbasis gewährleistet und gleichzeitig die Maus an Bewegungen gehindert wurde. Dadurch konnte damit einhergehende potentielle Eigen- und Fremdgefährdung der Maus unterbunden werden. Nach Darstellung sowohl der Schwanzarterie als auch der Dorsalvene der Maus wurden 140 µl der Emulsion an

der dorsalen Schwanzbasis der Versuchsmaus subkutan mit Hilfe einer 27 G Kanüle appliziert. Damit wurden insgesamt 280 μg *M. tuberculosis* und 140 μg Kollagen eingebracht (Abb. 2C). Die Sekundärimmunisierung an Tag 49 gestaltete sich im Ablauf gleich. Mit dem Unterschied, dass statt des CFA nun inaktiviertes Freund's Adjuvans (IFA) ohne *M. tuberculosis* mit Kollagen emulgiert verabreicht wurde. Sowohl die Primärimmunisierung als auch die Sekundärimmunisierung wurden gleichwohl bei den Tieren der Infektionsgruppe als auch bei den Tieren der Kontrollgruppe durchgeführt. Jeweils nach der subkutanen Applikation des Kollagen-Gemisches an der Schwanzbasis wurden die Versuchstiere aus der Haltekammer befreit, vorsichtig in den Käfig zurückgesetzt und circa zehn Minuten lang auf ihr Wohlbefinden und ihr weiteres Verhalten hin kontrolliert. Um bei den Versuchsmäusen potentielle Schmerzen durch die Immunisierung und die damit einhergehenden arthritischen Veränderungen der Gelenke zu unterbinden oder zu lindern, wurde dem Trinkwasser ab dem Tag der Primärimmunisierung Tramadol in einer Konzentration von 1 mg/ml beigelegt.

3.2.7 VERLAUFSKONTROLLE DER KOLLAGEN-INDUZIERTEN ARTHRITIS

Für die Beurteilung der CIA wurde einem etablierten Scoring-Protokoll gefolgt. Es wurden dabei Punkte für Schwellung und Rötung von Gelenken der Phalangen, des Metatarsal- bzw. Metacarpalgelenks und des Tarsal- bzw. Carpalgelenks vergeben.

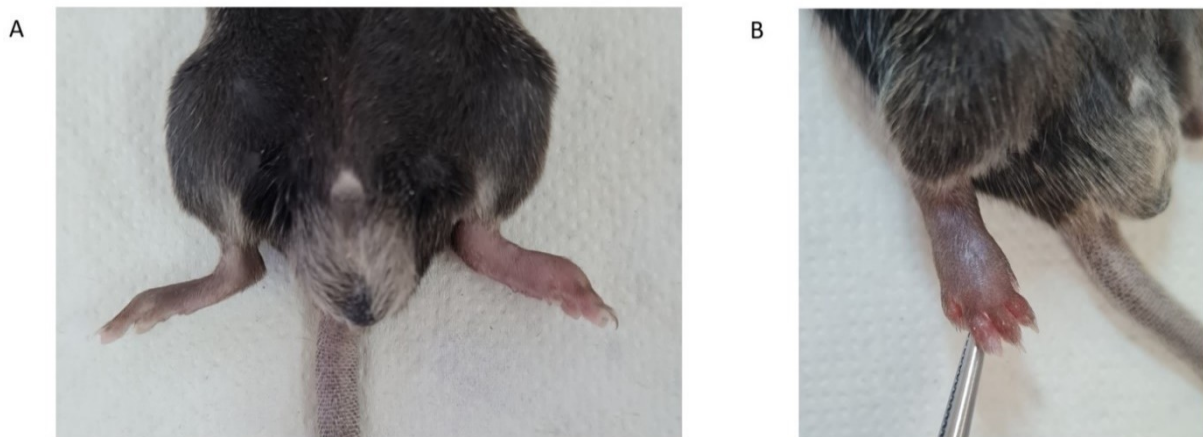


Abbildung 3 Darstellung der Arthritis Symptome. (A) Darstellung einer Versuchsmaus von ventral. Es sind die Hinterläufe beidseits von medial gezeigt. Vergleich einer nur gering symptomatischen rechten (im Bild links) Pfote mit einer stark symptomatischen linken (im Bild rechts) Pfote. CIA-Score rechte Hinterpfote: 1 (betroffener Phalanx auf dem Foto nicht erkennbar), CIA-Score linke Hinterpfote: 15. **(B)** Nahaufnahme der rechten Hinterpfote einer Versuchsmaus von dorsal. Es zeigt sich das Maximalbild einer Arthritis. Der CIA-Score beträgt 15. Betroffen sind alle 5 Phalangen, das Tarsalgelenk und das Metatarsalgelenk.

TABELLE 3: CIA-SCORING-PROTOKOLL

Rötung/Schwellung im Gelenk	Punktevergabe	Anzahl Gelenke	Maximalscore
Phalanx	1 pro Phalanx	18	18
Metatarsalgelenk/Metacarpalgelenk	5 pro Gelenk	4	20
Tarsalgelenk/Carpalgelenk	5 pro Gelenk	4	20
Höchster erreichbarer Arthritis Score:			58

Dabei hat die Maus vier Phalangen an der Vorderpfote und fünf Phalangen an der Hinterpfote (Tab. 3). Es wurde bereits das Betreffen eines einzigen Gelenkes ohne Notwendigkeit des Vollbildes als Arthritis gewertet. Aus früheren Experimenten mit CIA konnte bereits gezeigt werden, dass die arthritischen Symptome klassischerweise zwei bis vier Wochen nach der sekundären Immunisierung auftraten (Brand et al., 2007). Um die Symptomatik und ihren Verlauf besser vergleichen zu können, wurden jedoch alle Versuchstiere bereits ab Tag 28 (Tag der Primärimmunisierung) täglich mithilfe des bestehenden Schemas untersucht. In Abbildung 3 wird anhand der Hinterläufe exemplarisch die Symptomatik der Arthritis abgebildet, die mit einer Punktevergabe einherging. Es ist dabei in Abbildung 3A der Vergleich einer (fast) asymptomatischen rechten Hinterpfote mit einer arthritischen linken Hinterpfote gezeigt. In Abbildung 3B wird das Maximalbild der Arthritis an einer Hinterpfote dargestellt.

3.2.8 ORGANENTNAHME

Nach Abschluss des Versuchsprotokolls erfolgte die Tötung der Versuchsmäuse durch thorako-zervikale Dislokation in terminaler Anästhesie mit einer Mischung aus Ketamin in einer Konzentration von 75 mg/kg und Xylacin in einer Konzentration von 5 mg/kg bezogen auf das Körpergewicht der Tiere. Dies geschah abhängig von der Versuchsgruppe jeweils an Tag 9, 16, 23, 30, 48, 51 und 81 des Experiments. Anschließend folgte die Entnahme der Organe zur weiteren Aufarbeitung. Es wurde zuerst die Prä-

paration der inguinalen Lymphknoten durchgeführt. Dazu wurden nach dem Hautschnitt die Lymphknoten links und rechts inguinal aus dem subkutanen Fettgewebe herauspräpariert (Abb. 2D). Im nächsten Schritt wurde zur Entnahme der mesenterialen Lymphknoten das Peritoneum eröffnet. Anschließend konnte, dem Protokoll von Qiu & Sheridan (2018) folgend, das Caecum (Blinddarm) nach unten verlagert und das Intestinum tenuae (Dünndarm) nach rechts platziert werden. Daraufhin erfolgte die Präparation der dem Colon (Dickdarm) anliegenden mesenterialen Lymphknoten (Abb. 2E). Alle entnommenen Lymphknoten lagerten bis zur weiteren Verarbeitung in gekühltem Running-Buffer (RB). Für die Entnahme des Darmes wurde das Intestinum tenuae distal des Pylorus des Magens und proximal des Caecums abgetrennt. Nach Entfernung des anhaftenden mesenterialen Fettgewebes erfolgte die Reinigung vom Stuhl und Mucus durch Ausstreichen. Zur histologischen Untersuchung wurde weiterhin das Colon durch Abtrennung distal des Caecum und proximal des Rectum (Enddarm) herauspräpariert. Die Darmabschnitte wurden in gekühltem RPMI-Medium gelagert.

3.2.9 LYMPHOZYTEN-ISOLATION

Die Extraktion der Lymphozyten erfolgte nach einem etablierten laborinternen Protokoll aus den gewonnenen Organen. Dabei wurden die Zellen aus den mesenterialen und inguinalen Lymphknoten jeweils durch einen 70 µm Filter (MACS SmartStrainer) vereinzelt und bis zur Weiterverarbeitung in RB gelagert. Zu Gewinnung der Lymphozyten aus der Tunica mucosa mit Lamina Propria vor allem des Ileums (Krummdarm) wurde der gewonnene Darm zuerst in circa 2 cm lange Stücke geschnitten und der Länge nach aufgeschnitten. Nach dreimaligem Waschen der Darmstücke in kaltem RPMI-Medium wurden diese mit Dithiothreitol-Lösung (DTT) versetzt und bei 37°C und 220 rpm für 20 min bei 220 rpm rührend inkubiert. Dann wurde das Gemisch stark gevortext und anschließend wurden die Darmstücke von der Lösung getrennt. Der Überstand wurde bei 400 g und 4°C für 5 min zentrifugiert und das entstandene Pellet in RPMI-Medium resuspendiert. Die DTT-Behandlung wurde mit den Darmstücken ein zweites Mal durchgeführt, die beiden in RPMI-Medium gelagerten Zellfraktionen vereinigt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Darmstücke in warme EDTA-Lösung aufgenommen und bei 37°C bei 220 rpm für 20

min rührend inkubiert. Nach Verwerfen der ersten gebrauchten EDTA-Lösung und Behalten der Darmstücke wurde dieser Schritt wiederholt und die zweite EDTA-Lösung ebenfalls verworfen. Im nächsten Schritt wurde den Darmstücken 20 ml warme Verdau-Lösung zugesetzt und das Gemisch dann erneut bei 37°C für 45 min bei 220 rpm rührend inkubiert. Anschließend wurden die verdauten Darmstücke durch ein 70 µm Sieb gegeben, wobei die Reste der Darmstücke zum Vereinzeln restlicher Zellen durch das Sieb gedrückt und mit dem Überstand vereinigt wurden. Nach einer Waschung des Überstandes mit RPMI-Medium, Zentrifugation (400 g, 4°C, 5 min) und Resuspendierung des Pellets wurden die gewonnenen Zellen aus dem Verdau-Schritt mit den zuvor aus den DTT-Schritten gewonnenen Zellen vereinigt. Die Gesamtheit der Darmzellen wurde nun in 44% Percoll-Lösung in einem Gesamtvolumen von 8 ml aufgenommen und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach dem Unterschichten dieser Lösung mit 5 ml 67% Percoll wurde das Reaktionsgefäß 20 min ohne Bremse bei 1600 g zentrifugiert. Anschließend wurde aus dem Zentrifugat vorsichtig die aufliegende Fettphase entfernt und die lymphozytenhaltige Interphase gewonnen. Die Interphase wurde dann mit RPMI-Medium gewaschen, zentrifugiert (400 g, 4°C, 5 min), der Überstand verworfen und das Pellet in autoMACS Running Buffer resuspendiert.

3.2.10 ANTIKÖRPERFÄRBUNG DER ZELLEN

Im Anschluss an die Isolation der Lymphozyten aus Dünndarm, mesenterialen und inguinalen Lymphknoten wurden diese für die Messung im Durchflusszytometer angefärbt. Dafür wurde mittels Trypanblaufärbung, Neubauerzählkammer und Lichtmikroskop zuerst von allen Zellfraktionen (mesenteriale Lymphozyten, inguinale Lymphozyten und Darmlymphozyten) eine Menge von $5 \cdot 10^5$ Zellen definiert und diese durch Zugabe von 1 ml PBS gewaschen. Für die Lebend-Tot-Färbung wurden die Zellen zuerst jeweils mit 50 µl 1:1000 verdünntem ZombieNIR Farbstoff versetzt und 15 min im Dunklen auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Waschung mit Running Buffer, eine Zentrifugation (400 g, 4°C, 5 min) und eine Resuspendierung des Pellets in 25 µl RB. Zur Unterbindung unspezifischer Antikörperbindung am Fc-Rezeptor wurde eine Fc-Blockierung durch Zugabe von 5 µl fetalem Kälberserum (FCS) und 1 µl TruStainFcX und eine Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur im Dunklen durchgeführt. Es wurden die vorgefärbten Zellfraktionen jeweils mit verschiedenen Antikörpern versetzt, die in Tabelle 4 aufgeführt sind.

TABELLE 4: ANTIKÖRPERFÄRBEPROTOKOLL DER OBERFLÄCHENANTIGENE

Antikörper	Clone	Volumen pro Zellfraktion
CD45: BV605	30-F11	2,5µl
lin:FITC	145-2C11; RB6-8C5; RA3-6B2; Ter-119; M1/70	10µl
ST2: PE/Cy7	DIH4	0,6µl
CD127: PE	A7R34	5µl
CD4: PerCP	RM4-5	1µl

Die Inkubation erfolgte 20 min bei Raumtemperatur im Dunklen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von Transcription Factor Fix für 45 min bei Raumtemperatur im Dunklen fixiert. Die Zugabe von Perm Buffer schloss die Permeabilisierung ab und die Zellen wurden nach Zentrifugation (400 g, 4°C, 5 min) zur weiteren Antikörperfärbung in Perm Buffer resuspendiert. Nach Inkubation mit Blockpuffer (siehe oben) erfolgte die intrazelluläre Markierung mit den in Tabelle 5 gelisteten Antikörpern für 30 min bei Raumtemperatur im Dunklen. Im Anschluss an die Antikörperfärbung wurde die Reaktion mit Perm Buffer abgestoppt, anschließend die Zellen mit RB gewaschen und für die durchflusszytometrische Analyse in ein Volumen von 250 µl RB aufgenommen.

3.2.11 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die Durchflusszytometrie diente zur Beurteilung und Auftrennung der verschieden gefärbten Zellen unter Zuhilfenahme der fluoreszenzmarkierten Antikörper. Es wurde dafür das Cytek™ Aurora, ein spektrales Durchflusszytometer genutzt. Zur Analyse wurde die Software SpectroFlow™ Version 2.2.0.3 (07142020) genutzt. Die Datenauswertung wurde mit der FlowJo Software Version 10.7.1 durchgeführt. Um eine

TABELLE 5: ANTIKÖRPERFÄRBEPROTOKOLL DER INTRAZELLULÄREN ANTIGENE

Antikörper	Clone	Volumen pro Zellfraktion
Tbet:PE/Dazzle594	4B10	3,8µl
GATA3:BV421	16E10A23	2,5µl
FoxP3:AF647	MF-14	1,5µl
RoRyT:BV786	Q31-378	0,5µl

aussagekräftige Beurteilung der gefärbten Zellen erreichen zu können, wurde vor der Auswertung der in diesem Experiment gewonnenen Zellen das grundsätzliche Färbeverhalten der Antikörper durch Anfärbung naiver Lymphozyten oder Kompensationsbeads als Referenzwert bestimmt. Mit dieser Grundeinstellung wurde dann die Gatingstrategie für die durchflusszytometrischen Daten festgelegt.

3.2.12 HISTOLOGIE

Um die Ausmaße der lymphozytären Infiltration in das Gewebe von Darm und Gelenken darstellen zu können, wurden von den Geweben histologische Präparate angelegt und gefärbt. Dafür wurde zur Präparation des Darmes das zuvor entnommene Colon nach dem Protokoll von Moolenbeek und Ruitenbergh (1981) der Länge nach eröffnet, durch Ausstreichen von Stuhl und Mucus befreit und mit der Tunica mucosa (Schleimhaut) nach außen auf einen Holzstab aufgewickelt. Diese Rolle wurde dann für die histologische Aufarbeitung in Einbettkassetten gelegt und für eine Woche in 4% Formalinlösung fixiert. Nach der Fixierung wurden die Gewebepreparate unter fließendem Wasser gespült und bis zur Sektionierung und Färbung in 70% Ethanol gelagert.

Zur Präparation der Pfoten wurden die Hinterläufe der Versuchstiere entnommen und durch Inkubation in EDTA-Lösung über mehrere Wochen entkalkt. Dann wurden sowohl die Hinterpfoten als auch die aufgerollten Därme in Paraffin eingebettet und mittels Rotationsmikrotom erfolgte anschließend die Erstellung von dünnen Gewebeschnitten. Für die eigentliche Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung wurde einem etablierten Protokoll gefolgt (Anhang Tabelle 6). Sowohl die Därme als auch die Pfoten wurden nach dem gleichen Schema gefärbt. Ein Unterschied lag dabei einerseits in der

Länge der Färbezeit mit Hämalaun für die Kernfärbung (Schritt 10). Darin wurden die Därme für 70 Sekunden inkubiert, die Pfoten für 30 Sekunden. Andererseits auch in der Zeit für die Plasmafärbung (Schritt 13) mit Eosin. Hier wurden die Därme 80 Sekunden gefärbt, die Därme 40 Sekunden. Anschließend erfolgte die histologische Untersuchung.

3.2.13 STATISTIK

Die statistische Auswertung und Visualisierung gewonnener Daten erfolgte mit Hilfe der Programme SPSS in der Version 29.0.2.0 und GraphPad Prism in der Version 8.0.2 (263). Es erfolgte die statistische Berechnung des Körpergewichtes der Tiere, des Arthritis-Scores, der absoluten lymphozytären Zellzahlen und der Vergleich zwischen Auswertungsergebnissen von Tieren, welche mit *C. difficile* infiziert wurden im Vergleich zu jenen, die nicht infiziert wurden. Die Normalverteilung wurde nach Shapiro-Wilk getestet. Bei Annahme einer Nicht-Normalverteilung der Daten wurde zum Einzelgruppenvergleich ein Man-Whitney-U-Test genutzt und bei multiplen Stichproben der Kruskal-Wallis-Test. Wurde eine normalverteilte Stichprobe vorausgesetzt, wurde der T-Test zum Einzelgruppenvergleich und für die Varianzanalyse die einseitige oder zweiseitige ANOVA angewandt. Post-Hoc-Tests wurden nach einem Kruskal-Wallis-Test mit dem Dunn-Test durchgeführt, nach der ANOVA mit der Bonferroni-Korrektur. Daten wurden als signifikant (*) deklariert, wenn der p-Wert unter 0,05 lag.

IV. ERGEBNISSE

4.1 AUFBAU DER TIEREXPERIMENTELLEN STUDIE UND DEREN AUSSCHLUSSKRITERIEN

In dieser Arbeit sollte am Mausmodell untersucht werden, welchen Einfluss eine antibiotika-assoziierte *Clostridioides difficile* Infektion (CDI) einerseits auf die Symptome der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) und andererseits auf die Zusammensetzung unterschiedlicher T-Zell-Populationen bei der CIA hat. Zur Durchführung des Versuchs wurden die Tiere nach Akklimatisierung an die Haltungsbedingungen entsprechend dem Studienaufbau gehalten und behandelt (Abb. 4). Dafür bekamen die Versuchsmäuse an Tag eins bis drei ein antibiotikaversetztes Trinkwasser verabreicht. Ab Tag vier wurde den Mäusen wieder unbehandeltes Trinkwasser angeboten. An Tag sechs des Versuchs erfolgte die intraperitoneale Gabe von Clindamycin. Der versuchsgruppenunterscheidende Schritt erfolgte an Tag sieben, als den Mäusen der Interventionsgruppe eine definierte Menge von 10^5 KBE *C. difficile* oral verabreicht wurde. Die Mäuse der Kontrollgruppe wurden nach dem gleichen Behandlungsschema mit BHIS-Medium sham-inokuliert.

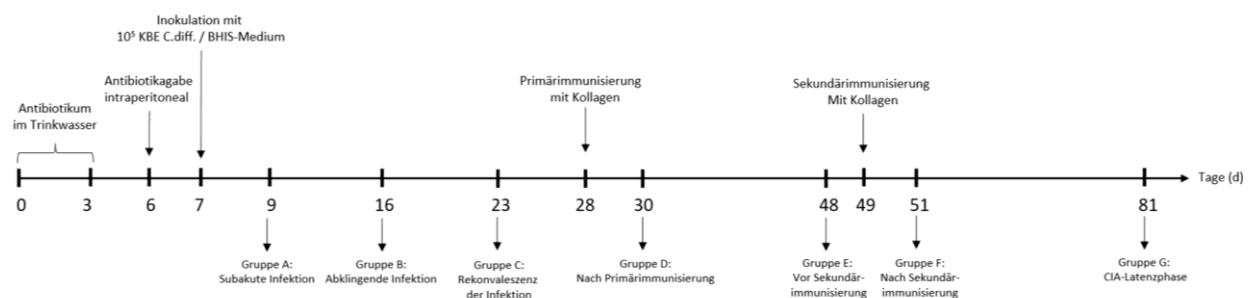


Abbildung 4: Zeitlicher Ablauf der durchgeführten Experimente. Die durchgeführten Maßnahmen sind in der oberen Hälfte der Abbildung, nach unten auf den Zeitstrahl verweisend, dargestellt; die Endpunkte des Experiments werden unterhalb des Zeitstrahls dargestellt. In den ersten drei Tagen erfolgte die Antibiotika-Gabe über das Trinkwasser. Es schloss sich eine zweitägige Wash-Out-Phase an, in der die Tiere reine Trinkwasser verabreicht bekamen. Nachfolgend erfolgte an Tag 6 des Experiments die intraperitoneale Injektion von Clindamycin. An Tag 7 schloss sich der gruppenunterscheidende Schritt, die Inokulation der Versuchstiere mit *C. difficile* oder BHIS-Medium (sham) an. Die primäre Immunisierung mit Kollagen fand an Tag 28 statt, die sekundäre Immunisierung erfolgte an Tag 49. Die Euthanasie der Tiere erfolgte zu sieben verschiedenen Zeitpunkten (Tag 9, 16, 23, 30, 48, 51 und 81 nach Versuchsbeginn). Daran anschließend erfolgte die Organentnahme und die Aufarbeitung der gewonnenen Proben.

TABELLE 6: VERSUCHSGRUPPEN

Gruppe	Gruppenbezeichnung	Endzeitpunkt (Versuchstag)	Tiere in der Inter- ventionsgruppe	Tiere in der Kontrollgruppe
A	Subakute Infektion	9	7	4
B	Abklingende Infektion	16	8	4
C	Rekonvaleszenz der Infek- tion	23	8	4
D	Nach Primärimmunisie- rung	30	8	4
E	Vor Sekundärimmunisie- rung	48	8	4
F	Nach Sekundärimmunisie- rung	51	8	4
G	CIA-Latenzphase	81	8	5

Der Endpunkt des Experiments definierte sich, je nachdem in welche zeitliche Gruppe die Tiere eingeordnet waren (Tab. 6). Die Euthanasie der Versuchstiere erfolgte zu sieben verschiedenen Zeitpunkten. Dabei war der erste Opferungspunkt Tag neun, zwei Tage nach der Bakterieninokulation (Gruppe A, Subakute Infektion). Der zweite Opferungstag war an Tag 16 des Experiments (Gruppe B, Abklingende Infektion). An Tag 23 wurden die Tiere der dritten Versuchsgruppe geopfert (Gruppe C, Rekonvaleszent der Infektion) und an Tag 30 die der vierten Versuchsgruppe, zwei Tage nach der primären Immunisierung mit Kollagen (Gruppe D, Nach Primärimmunisierung). Die Tiere der fünften und sechsten Versuchsgruppe wurden ein Tag vor der sekundären Immunisierung, an Tag 48 (Gruppe E, Vor Sekundärimmunisierung) beziehungsweise zwei Tage nach der sekundären Immunisierung, an Tag 51 (Gruppe F, Nach Sekundärimmunisierung) getötet. Die Tiere der letzten Versuchsgruppe, in der die Langzeiteffekte der Kollagen-induzierten Arthritis dargestellt werden sollten, wurden an Tag 81 geopfert (Gruppe G, CIA-Latenzphase). In der Versuchsgruppe waren mindestens sieben Tiere eingeteilt, in der Kontrollgruppe mindestens vier Tiere. Insgesamt wurden 89 Tiere in den Tierversuch aufgenommen. Fünf Tiere schieden durch unerwartetes

Versterben vorzeitig aus dem Versuch aus. Davon war eine Maus unter unbekanntem Umständen verstorben und tot im Käfig aufgefunden worden, ohne dass es Anhalt auf Verletzungen, übermäßigen Gewichtsverlust oder Krankheitszeichen gegeben hatte. Eine weitere Maus hatte einen Gewichtsverlust von mehr als 20% in Kombination mit einem schlechten Erscheinungsbild, wozu unter anderem stumpfes Fell, Lethargie und eine Trübung der Augen zählen und was einen zu großen Stress des Tieres anzeigte, als dass es ethisch vertretbar gewesen wäre und musste daher vorzeitig geopfert werden. Drei andere Mäuse waren am Tag der Sekundärimmunisierung unmittelbar nach der zweiten Kollagenabgabe verstorben. In die endgültige Auswertung wurden somit 84 Mäuse aufgenommen, die den Versuchsablauf nach Plan durchlaufen haben und zum eingeteilten Zeitpunkt geopfert wurden.

4.2 DIE INFEKTION MIT *CLOSTRIDIoidES DIFFICILE* STAMM VPI 10463 FÜHRTE ZU KEINEM GEWICHTSVERLUST

Zur Untersuchung, wie gut die Inokulation mit *C. difficile* eine symptomatische CDI auslösen konnte, wurde das Körpergewicht der Versuchstiere als Indikator genutzt. In Abbildung 5 ist die Gewichtsentwicklung der Versuchstiere dargestellt. Dabei ist in Abbildung 5A der maximale Gewichtsverlust aller Versuchstiere dargestellt. Es wurde das Ausgangsgewicht von Versuchstag sieben mit dem größten Gewichtsverlust an den Folgetagen verglichen. Da, wie in Tabelle 6 dargestellt ist, Gruppe A (Subakute Infektion) nur bis zum Tag neun im Versuch verblieb, wurde für die Berechnung das geringste Gewicht der Tage sieben bis neun, bei allen anderen Gruppen das geringste Gewicht der Tage sieben bis vierzehn eingeschlossen. Es konnte dabei in der *C. difficile* Gruppe ein Mittelwert des maximalen Gewichtsverlustes von 0,039%, in der Kontrollgruppe ein Mittelwert von 0,032% aufgezeigt werden. Die Werte unterschieden sich nicht signifikant. In Abbildung 5B ist der Gewichtsverlauf der Versuchstiere der Gruppen B (Abklingende Infektion) bis G (CIA-Latenzphase) nach der Bakterieninokulation bzw. der sham-Inokulation dargestellt. Es wurden dabei die Mittelwerte der summierten Körpergewichte innerhalb des Versuchstags sieben (direkt vor der Infektion) mit denen der folgenden Tage bis Versuchstag vierzehn verglichen. Die Körpergewichte bewegten sich dabei in beiden Gruppen im Bereich von 27-33g mit einem minimal geringeren durchschnittlichen Körpergewicht der Kontrolltiere (Mittelwert 29,68

g) im Vergleich zu den infizierten Tieren (Mittelwert 30,26 g). Es zeigte sich dementsprechend, dass es zwar einen insignifikanten Gewichtsunterschied zwischen der *Clostridioides*-Gruppe und der Kontrollgruppe gab, jedoch der erwartete Gewichtsabfall nach der Infektion mit *C. difficile* in der Versuchsgruppe ausblieb. Dafür wurde in der zweifaktoriellen Varianzanalyse ein p-Wert von 0,173 für den Interaktionseffekt berechnet.

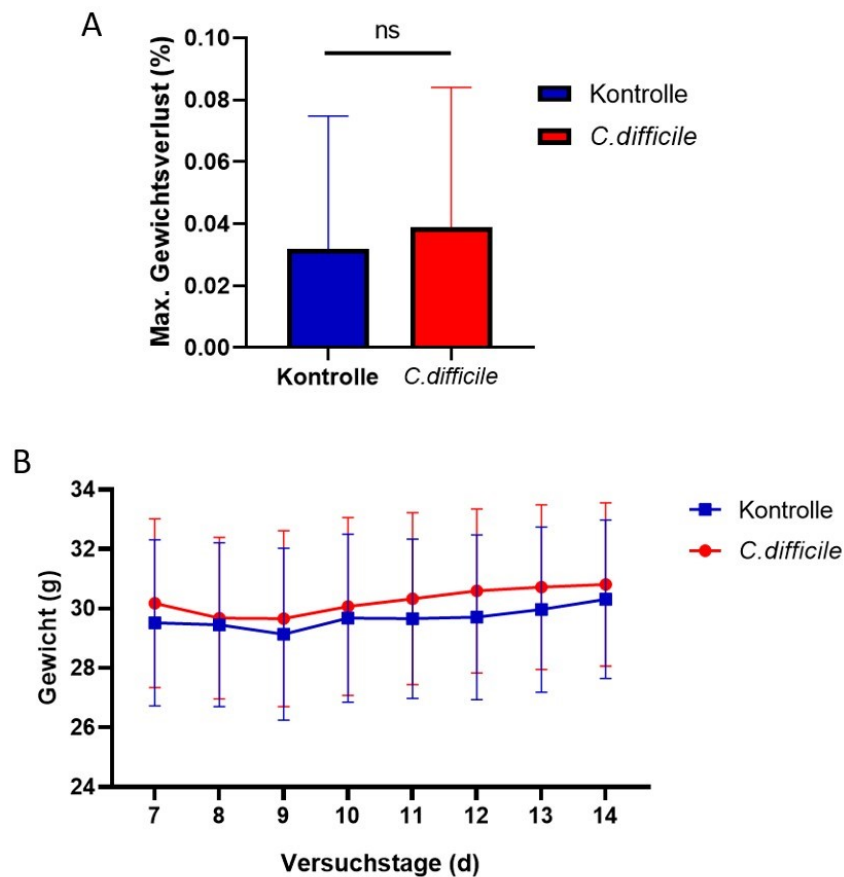


Abbildung 5: Die Infektion mit *C. difficile* Stamm VPI 10463 führte zu keinem Gewichtsverlust. (A) Maximaler, prozentualer Gewichtsverlust nach Infektion mit *C. difficile* (n=55) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=29) unterschied sich nicht, Einschluss der Gruppen A-G, Balkendiagramm der Mittelwerte mit Standardabweichung, T-Test, p=0,487 **(B)** Gewichtsverlauf in den sieben Tagen nach Bakterieninokulation (n=48) oder sham-Inokulation (n=25) unterschied sich nicht, Angabe des absoluten Mausgewichtes, Einschluss der Gruppen B-G, gruppiertes Verlaufsdigramm der mit Mittelwerte mit Standardabweichung, zweiseitige Anova, p=0,173

4.3 DIE IMMUNISIERUNG MIT KOLLAGEN FÜHRTE BEI ALLEN TIEREN ZU ARTHRITISCHEN SYMPTOMEN AN DEN PFOTEN

Weiterhin wollten wir untersuchen, ob eine CDI einen Einfluss auf die Symptom-schwere der CIA hat. Dazu wurde an Tag 28 des Experiments zur Auslösung der Kollagen-induzierte Arthritis eine Primärimmunisierung durchgeführt (siehe Methodenteil). Die Sekundärimmunisierung zum Auslösen der arthritischen Symptome erfolgte an Tag 49. Zur Auswertung der CIA-Symptomatik wurde die Versuchsgruppe G (CIA-Latenzphase) untersucht. Die Tiere dieser gesamten Gruppe wurden an Tag 81 des Experiments geopfert. Eine Maus aus der Interventionsgruppe zeigte dabei bereits am Tag der Sekundärimmunisierung arthritische Symptome am rechten Hinterlauf. Die Symptome der CIA wurden nach dem im Methodenteil beschriebenen Scoring-Schema quantifiziert. Es wurde gezeigt, dass bei allen Tieren der Versuchsgruppe G (CIA-Latenzphase), unabhängig von einer durchgeführten Inokulation mit *C. difficile*, nach der Sekundärimmunisierung eine Ausbildung arthritischer Symptome auftrat (Abb. 6A). Im Laufe der Versuchstage verschlimmerte sich dabei die Gelenksymptomatik initial langsam, besserten sich jedoch gegen Ende des Experiments durch Rückläufigkeit der Schwellung teilweise. Dieser Trend wurde sowohl bei den Tieren der Interventionsgruppe als auch bei den Tieren der Kontrollgruppe festgestellt. In der Infektionsgruppe wurde, ausgenommen des Tieres, welches bereits am Tag der Sekundärimmunisierung eine Arthritis entwickelt hatte, die CIA-Symptomatik initial an Tag 51 des Versuches festgestellt. In der Kontrollgruppe begannen die ersten Symptome an Tag 55 (Abb. 6B). Für das frühere Einsetzen der Symptomatik wurde jedoch keine Signifikanz ermittelt.

Eine weitere Betrachtungsweise ist die Beurteilung des maximal aufgetretenen Wertes des CIA-Scores (Abb. 6C). Eine Versuchsmaus konnte bei Addition der Werte für ihre vier Pfoten einen Höchstscore von 58 erreichen. In diesem Experiment wurde in der Infektionsgruppe ein maximaler CIA-Wert von 39, in der Kontrollgruppe ein maximaler Wert von 35 eruiert. Auch diese Werte unterschieden sich unter Berücksichtigung der aufgetretenen Varianz nicht signifikant. Insgesamt wurde bei vier der 49 Mäuse, welche eine primäre, jedoch keine sekundäre Immunisierung durchlebten, eine spontane Arthritisentwicklung aufgezeigt. Während die AUC des CIA-Scores der *C. difficile* Tiere bei 409,1 lag, zeigte der CIA-Score der sham-infizierten Tiere einen AUC-Wert von 301,9.

Dies ist in Abbildung 6D dargestellt, wo sich vermuten lässt, dass der kumulative Arthritisscore der mit *C. difficile* infizierten Versuchstiere, der die gesamte Krankheitslast über den Versuchszeitraum darstellt, tendenziell höher war, als der der nicht-infizierten Tiere, doch auch hier ließ sich dieser Trend nicht mit statistischer Signifikanz untermauern.

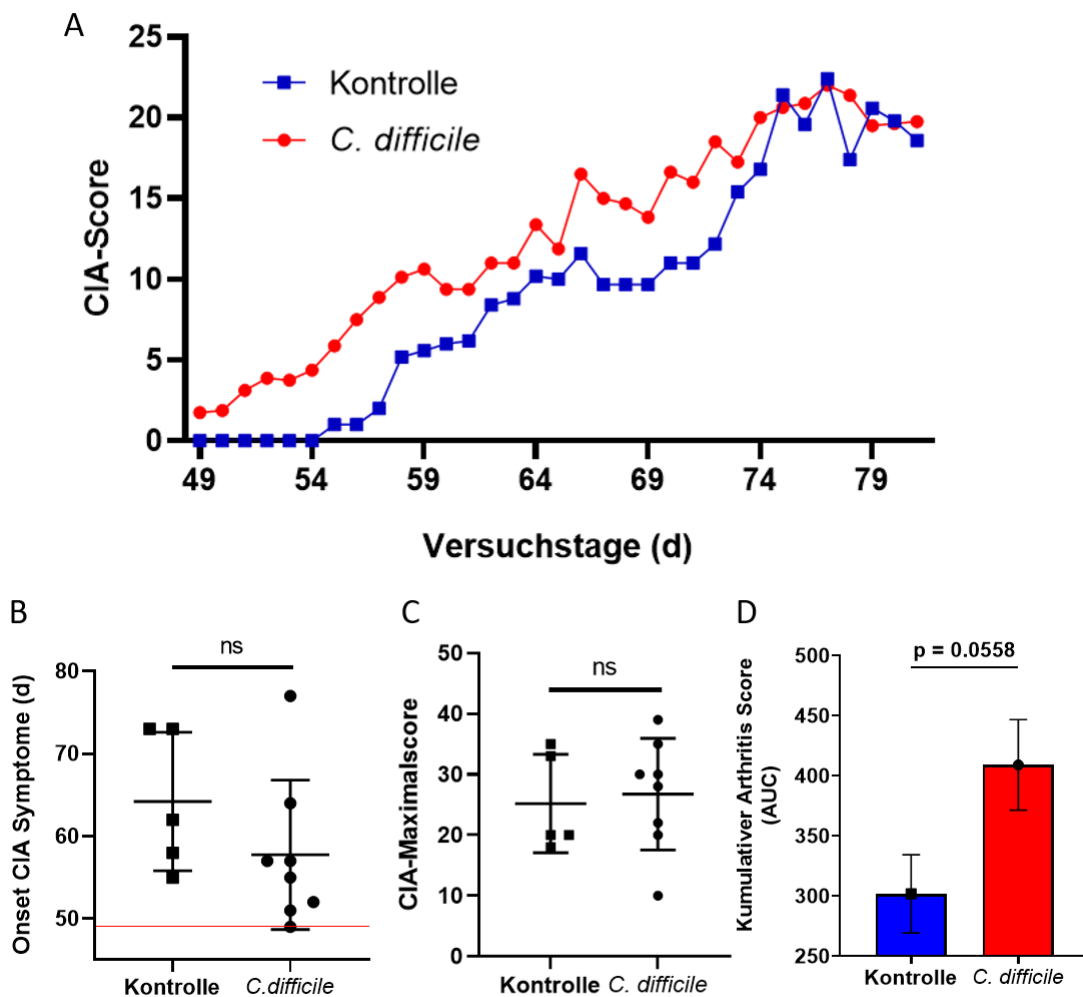


Abbildung 6: Die Immunisierung mit Kollagen führte bei allen Versuchstieren zu arthritischen Symptomen an den Pfoten. (A) Der CIA-Score, beginnend am Tag der Sekundärimmunisierung (Tag 49) bis zum Tag der Operation (81) der Gruppe G (CIA-Latenzphase), stieg sowohl in der Infektionsgruppe (n=8) als auch in der Kontrollgruppe (n=5) an, Verlaufendiagramm der Mittelwerte mit $p > 0,99$ in der zweiseitige Anova **(B)** Der Onset der Arthritis Symptome unterschied sich nicht voneinander, Darstellung der Gruppe G (CIA-Latenzphase), Vergleich der Infektionsgruppe (n=8) mit der Kontrollgruppe (n=5). Die rote Linie stellt den Tag der Sekundärimmunisierung (Tag 49) dar, Punktdiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung, Man-Whitney-U-Test, $p = 0,163$ **(C)** Darstellung der maximalen Arthritis-Scores der Gruppe G (CIA-Latenzphase), Vergleich der Infektionsgruppe (n=8) mit der Kontrollgruppe (n=5), Punktdiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung, Man-Whitney-U-Test, $p = 0,605$ **(D)** Es zeigte sich ein Unterschied zwischen dem kumulativem Arthritisscore der mit *C. difficile* infizierten Tiere (n=8) im Vergleich zu den nicht-infizierten Tieren (n=5), der jedoch keine statistische Signifikanz erreichte, Balkendiagramm der Mittelwerte mit Standardabweichung zum T-Test-Vergleich der jeweiligen AUC.

4.4 DIE IMMUNISIERUNG MIT KOLLAGEN FÜHRTE ZU EINER ZUNAHME DER ZELLEN IN DEN INGUINALEN LYMPHKNOTEN

Die eminenteste Fragestellung war, darzustellen, welchen Einfluss einerseits die Immunisierung mit Kollagen, andererseits aber auch die Inokulation mit *C. difficile* auf die extrahierten Gewebe in Bezug auf die T-Zellen und ihre Aufteilung in Subpopulationen hatte.

Dafür wurden von den Versuchsmäusen post mortem für die Zellaufarbeitung die inguinalen und mesenterialen Lymphknoten ebenso wie der Dünndarm entnommen. Nach der Isolation der Zellen aus den verschiedenen Geweben erfolgte deren Aufreinigung. In Abbildung 7 sind die Mengen der extrahierten Zellen illustriert. Da kein klinischer Unterschied zwischen CDI- und Kontrollmäusen festgestellt wurde, erfolgte der

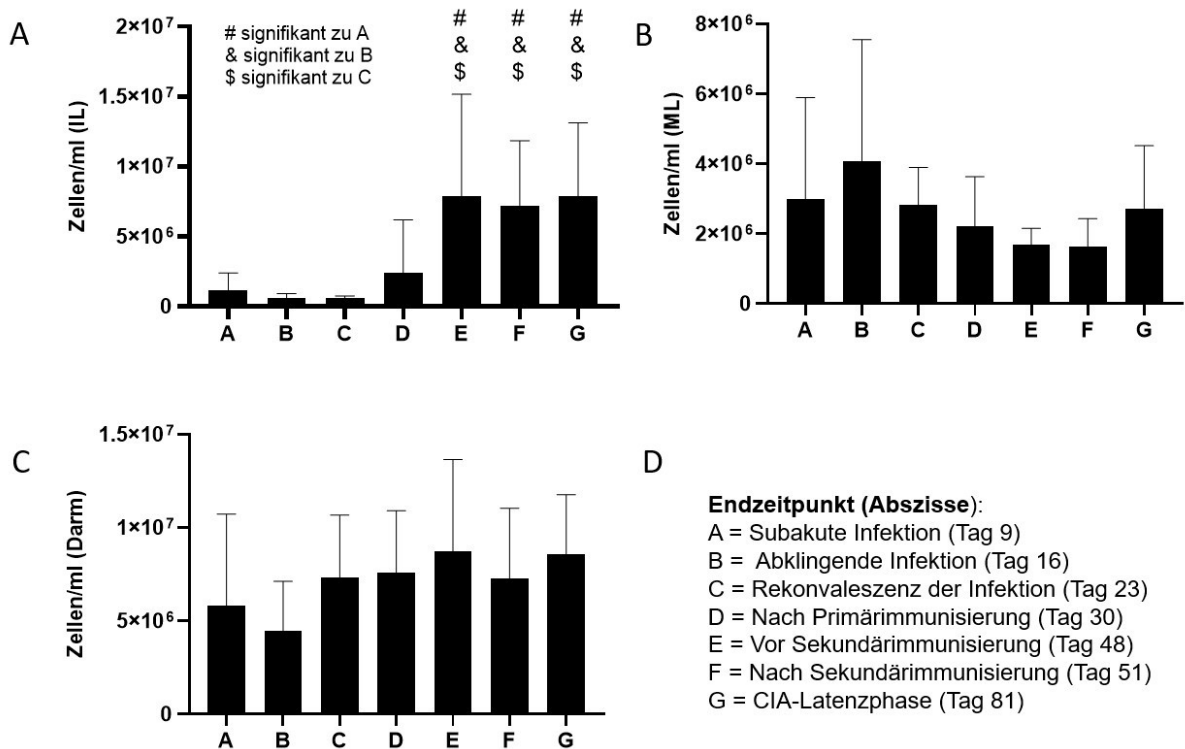


Abbildung 7: Die Immunisierung mit Kollagen führte zu einer Zunahme der Lymphozyten in den inguinalen Lymphknoten. In A-C ist die Anzahl der aus den Lymphknoten gewonnenen Zellen pro ml in den Versuchsgruppen A (n=11), B (n=12), C (n=12), D (n=12), E (n=12), F (n=12) und G (n=13) dargestellt, Balkendiagramm der Mittelwerte mit Standardabweichung, Kruskal-Wallis-Test, aufgezeigte Signifikanzen definieren sich mit einem p-Wert zwischen p=0,01 und p=0,05. **(A)** Die Zellen aus den inguinalen Lymphknoten (IL) vermehrten sich im zeitlichen Verlauf, **(B)** die Zellen der mesenterialen Lymphknoten (ML) waren in den späteren Versuchsgruppen weniger, jedoch ohne Signifikanz. **(C)** Die Zellen der Darmmukosa hatten nur einen unwesentlichen, insignifikanten Mengenzuwachs. **(D)** Legende zu den in A-C gezeigten Graphen bezüglich der Gruppennamen.

Vergleich der Zellzahlen nur in zeitlicher Abhängigkeit und nicht abhängig vom *C. difficile* Inokulationsstatus. Es zeigte sich, dass die Menge an Zellen in den inguinalen Lymphknoten ab Opferungstag D (Nach Primärimmunisierung) erst langsam anstieg und dann ab Gruppe E (Vor Sekundärimmunisierung) auf ähnlich hohem Niveau bis zur zuletzt geopferten Versuchsgruppe konstant blieb. Mittels Varianzanalyse konnten dabei vorhandene Signifikanzen zwischen den ersten drei Versuchsgruppen, welche vor der ersten Immunisierung geopfert wurden und den letzten drei Versuchsgruppen, bei denen die Versuchstiere eine oder zwei Immunisierungen durchlaufen hatten, berechnet werden. Gegensätzliches zeigte sich in der Zellzahlmenge der mesenterialen Lymphknoten. Hier konnte eine leichte Abnahme der Lymphozytenzahl nach Gruppe B (Abklingende Infektion) bis eingeschlossen Gruppe F (Nach Sekundärimmunisierung) dargestellt werden, welche jedoch nicht signifikant war.

Beim Vergleich zwischen infizierten und nicht-infizierten Tieren wurde in den Gruppen A und B eine *C. difficile*-induzierte Zunahme der mesenterialen Lymphozyten festgestellt, die nicht die statistische Signifikanz erreichte (Anhang Abbildung 1). Bei den aus der Darmmukosa extrahierten Lymphozyten konnte keine Zellzahlveränderung dargestellt werden.

Zusammenfassend führte die Immunisierung mit Kollagen und Adjuvans zu einer inguinal-nodalen Leukozytose, was sich mesenterial-nodal und intestinal-mukosal nicht zeigte.

4.5 UNTERSCHIEDLICHE STRATEGIEN DER EINZELZELLANALYSE VON LEUKOZYTEN AUS DEN LYMPHKNOTEN UND AUS DEM DARM

Um etwaige Veränderungen der Zusammensetzung der Lymphozyten in Lymphknoten und Darm zu untersuchen, wurden durchflusszytometrische Analysen mit Hilfe von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern durchgeführt, welche über genauere Selektierung der farbstoffmarkierten Zellen eine explizitere Darstellung lieferte, wie sich die Lymphozytensubpopulationen durch CDI und CIA veränderten. Nach der Aufreinigung und Anfärbung der extrahierten Zellen wurden für die durchflusszytometrische Messung aus jeder Probe insgesamt $1 \cdot 10^5$ Events aufgenommen. In Abbildung 8 ist exemplarisch das Gating Schema für die Zellen der inguinalen und mesenterialen Lymphknoten dargestellt. Als erstes erfolgte die Abtrennung der eigentlichen Zellen vom Debris in der Größenauftragung von FSC-H (*forward scatter* - Zellgröße) gegen

SSC-H (*side-scatter* - Zellgranularität) sowie die Abtrennung von Dubletten. Die lebenden Leukozyten wurden als CD45+ und ZombieNIR- definiert. Aus diesen wurden dann die CD127 positiven und Lineage negativen ILC durch Auftrennung gegen CD127 und Lineage dargestellt. Für die weitere Aufarbeitung der ILC sei an dieser Stelle auf die Arbeit von Herrn Lukas Wenzel verwiesen.

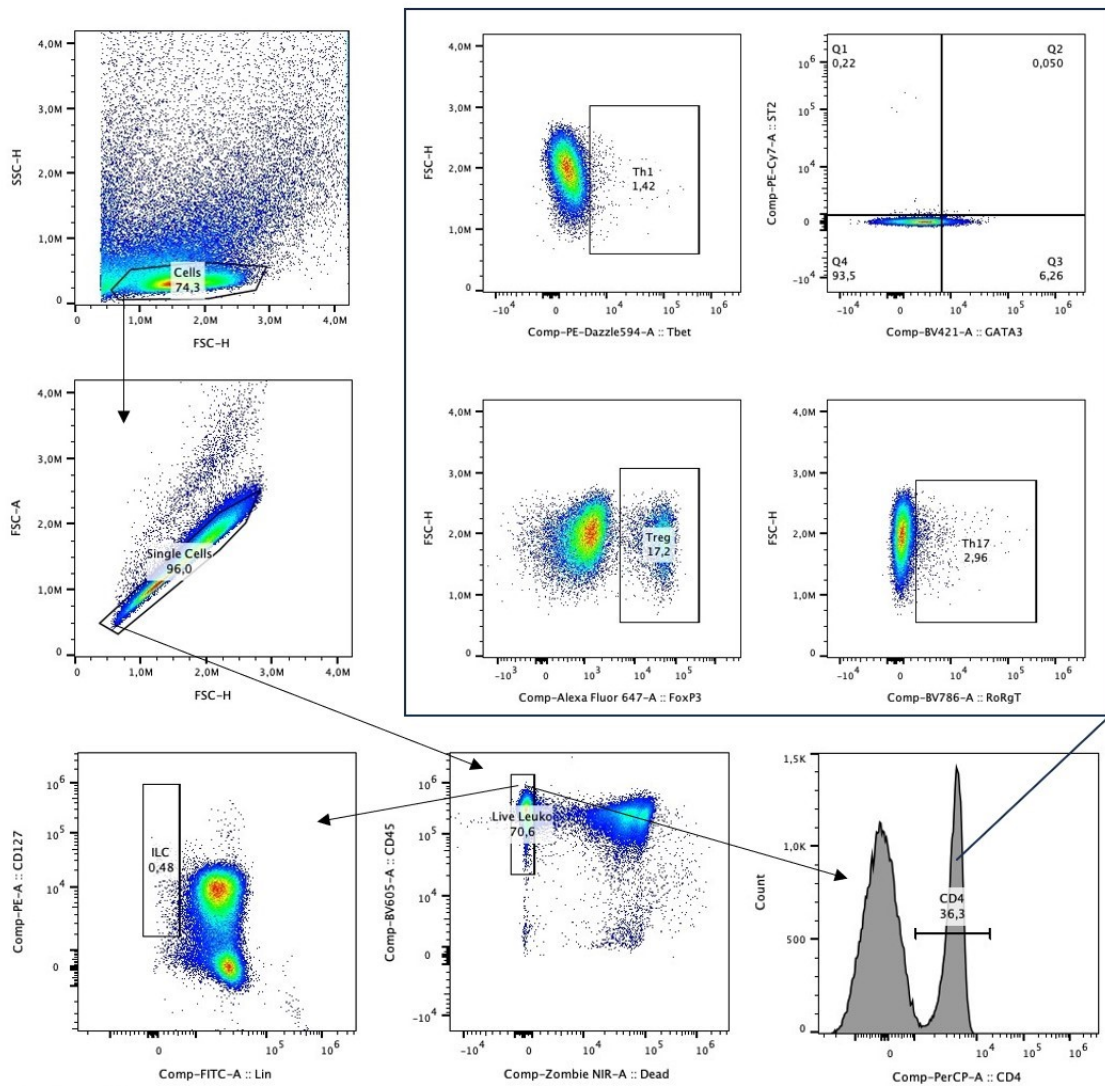


Abbildung 8 Gatingstrategie Lymphknoten. Es ist an einer Versuchsprobe exemplarisch die Strategie für das hierarchische Gating der Lymphozyten aus inguinalen und mesenterialen Lymphknoten am Durchflusszytometer dargestellt. Links oben: Größenauftragung zur Unterscheidung der Zellen (Cells) vom Debris. Darunter: Darstellung der Gesamtzellen zum Dubletten Ausschluss (Single Cells). Unten Mitte: Darstellung der Einzelzellen in der Vitalitätsfärbung zur Vereinzelung lebender Zellen (LiveLeuko). Aus den Lebendzellen heraus werden rechts unten die CD4 positiven Zellen dargestellt, unten links die ILC durch Auftragung von CD127 gegen Lineage. Aus den CD4 positiven Zellen (unten rechts) werden im Kasten oben rechts die T-Zell-Populationen definiert. Im Kasten links oben: Th1-Zellen nach Tbet-Anfärbung, oben rechts: Th2-Tellen nach Auftragung von ST2 gegen GATA3, unten links: Treg-Zellen nach FoxP3-Anfärbung, unten rechts: Th17-Zellen nach RoRyT-Anfärbung.

Weiterhin wurden aus den lebenden Leukozyten die CD4-positiven T-Helfer-Zellen dargestellt. Diese wurden dann in weiteren Vereinzelungsschritten in Th1-Zellen (Tbet+), Th2-Zellen (GATA3+/ST2±), Treg-Zellen (FoxP3+) und Th17-Zellen (RoRyT+) aufgetrennt.

In Vergleich dazu kann man in Abbildung 9 sehen, dass das Gating-Schema der Darmmukosazellen in anderer Reihenfolge erfolgte. Dabei wurde zuerst zum Ausschluss von Dubletten nach der Zellgröße sortiert, daran schloss sich die Abtrennung der CD45 positiven Zellen zur Leukozytenvereinzelung an sowie das Gating der lebenden

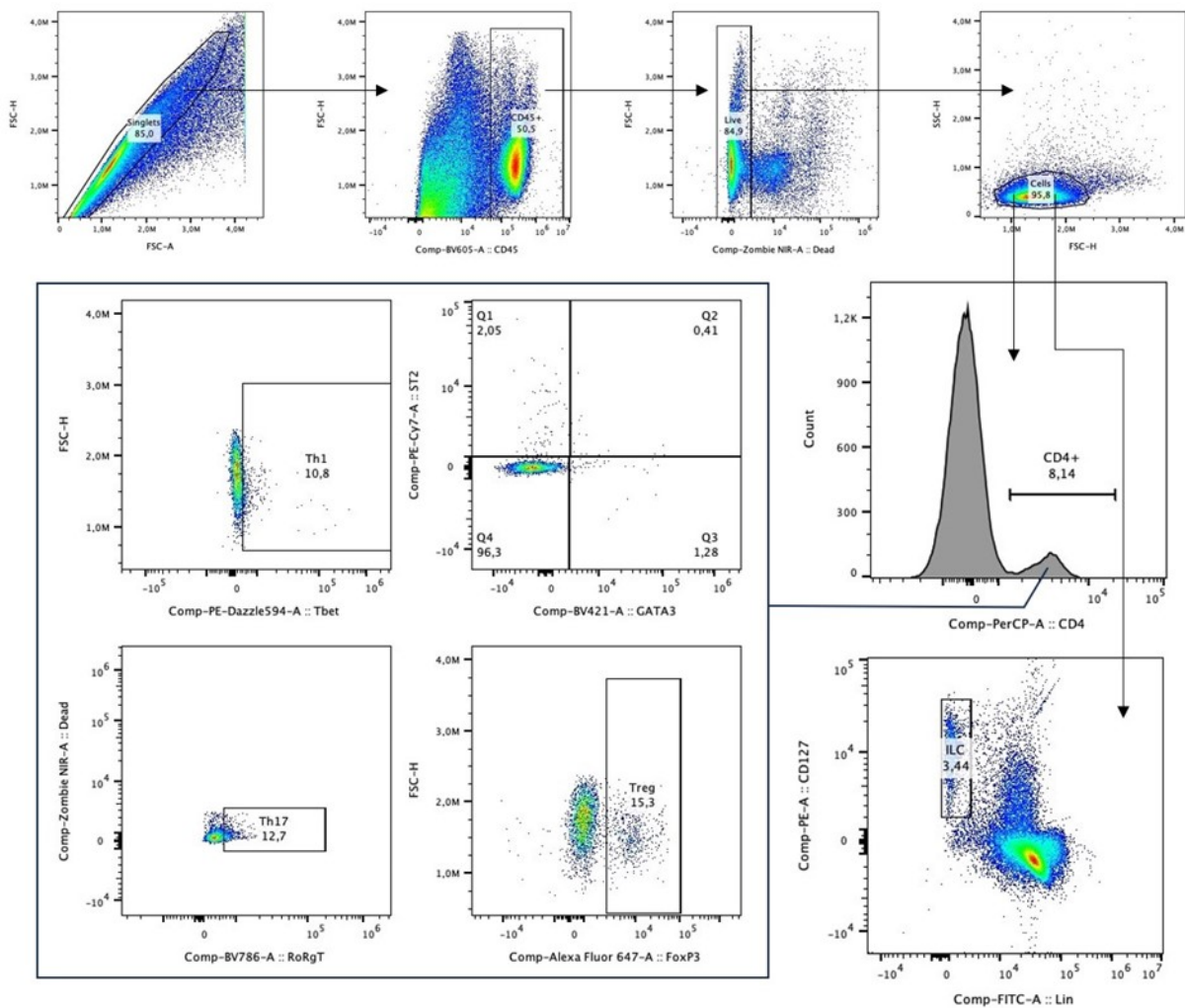


Abbildung 9: Gatingstrategie Darmmukosa. Es ist an einer Versuchsprobe exemplarisch die Strategie für das hierarchische Gating der Lymphozyten aus der Darmmukosa am Durchflusszytometer dargestellt. Links oben: Größenauftragung zum Dublettenausschluss (Singlets), rechts daneben: Vereinzelung der Leukozyten durch Auftragung gegen CD45 (CD45+), rechts daneben: Vitalitätsfärbung zur Darstellung lebender Zellen (LiveLeuko), rechts daneben: Abscheidung der restlichen Zellen vom Debris (Cells). Aus der reinen Zellpopulation (Cells) erfolgt rechts mittig die Abtrennung der CD4 positiven Zellen und rechts unten die ILC durch Auftragung von CD127 gegen Lineage. Aus den CD4 positiven Zellen werden im Kasten links die T-Zell-Populationen aufgetrennt. Im Kasten links oben: Th1-Zellen nach Tbet-Anfärbung, oben rechts: Th2-Zellen nach Auftragung von ST2 gegen GATA3, unten links: Th17-Zellen nach RoRyT-Anfärbung, unten rechts: Treg-Zellen nach FoxP3-Anfärbung.

Leukozyten, welche sich ZombieNIR positiv darstellten. Erst danach erfolgte die Abscheidung vom Debris zur Zelldarstellung. Im Anschluss wurde, ebenso wie bei den Lymphknoten, einerseits die Fraktion der ILC (CD127+/Lin-) als auch die Fraktion der CD4-postiven Zellen einzeln aufgetrennt. Auch hier wurden die CD4-positiven T-Helferzellen anschließend noch nach Th1 (Tbet+), Th2 (GATA3+/ST2±), Th17 (RoRγT+) und Treg (FoxP3+) aufgetrennt.

4.6 DIE CDI FÜHRTE ZU EINER TRANSIENTEN ANREICHERUNG VON CD4+ ZELLEN IM DARM

Die graphische Darstellung der aus der Durchflusszytometrie gewonnenen Daten hinsichtlich der CD4-positiven Zellen und der ILCs erfolgte in Abbildung 10. Dabei wurde jeweils aufgezeigt, wie sich die Zellzahl der definierten Zellpopulationen im zeitlichen Verlauf darstellte. Wobei der zeitliche Verlauf mit dem stärker werdenden Einfluss der

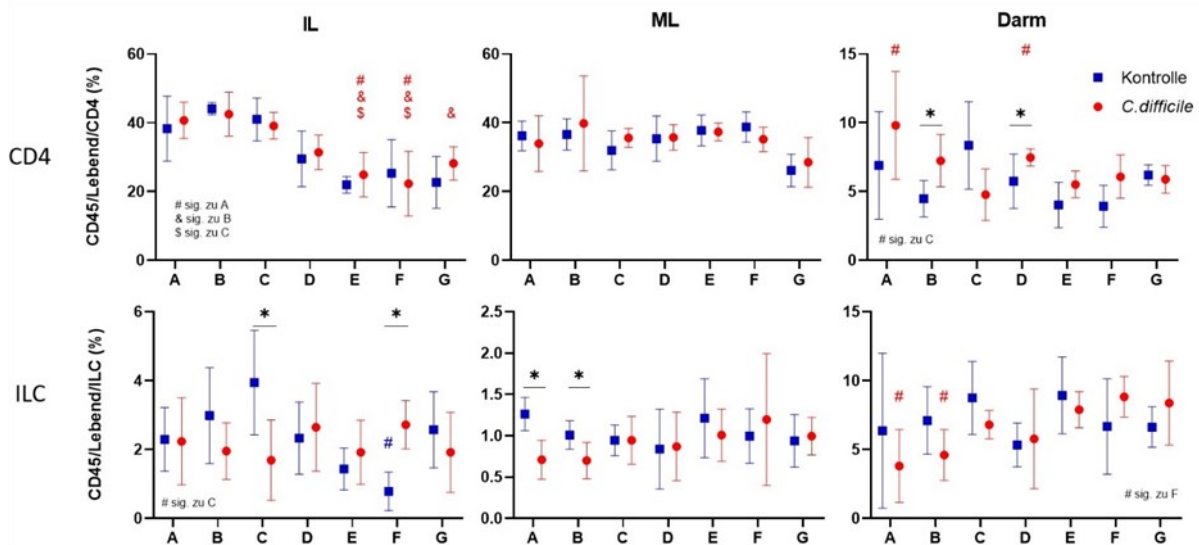


Abbildung 10: Die CDI führte zu einer transienten Anreicherung von CD4+ Zellen im Darm. Es sind in der oberen Reihe die CD4-positiven Zellen und in der unteren Reihe die ILC dargestellt. In der linken Spalte jeweils Zellen der inguinalen Lymphknoten (IL), in der mittleren Spalte Zellen der mesenterialen Lymphknoten (ML), in der rechten Spalte Zellen der Darmmukosa. Angabe in Prozent jeweils anteilig an CD45+ und lebenden Zellen. Kein Unterschied zwischen den Zellzahlen der CD4-positiven Zellen der inguinalen und mesenterialen Lymphknoten, in der Darmmukosa nur vereinzelt. Bei der Menge der ILCs zeigte sich in den inguinalen Lymphknoten eher ein insignifikant gegenläufiger Verlauf, sowie ein ähnlicher Verlauf bei den Zellen der mesenterialen Lymphknoten und der Darmmukosa. Mittelwertdiagramm mit Standardabweichungen, Kruskal-Wallis-Test zum Longitudinalvergleich mit Post-Hoc-Test nach Dunn, dafür Signifikanzindikator (#,&,\$) in der Farbe, in der im Post-Hoc-Test eine Signifikanz aufgetreten ist. Man-Whitney-U-Test zum Vergleich Infektionsgruppe (n=7-8) gegen Kontrollgruppe (n=3-4), schwarzer Signifikanzindikator (*) bei $p \leq 0,05$. Auf Abszisse Auftragung der Versuchsgruppen: Subakute Infektion (A), Abklingende Infektion (B), Rekonvaleszenz der Infektion (C), Nach Primärimmunisierung (D), Vor Sekundärimmunisierung (E), Nach Sekundärimmunisierung (F), CIA-Latenzphase (G).

CIA assoziiert ist und das Vorhandensein der CDI durch den farblichen Gruppenvergleich dargestellt ist. Die den jeweiligen Abbildungen zugrundeliegenden Werte sind in den Tabellen 7,8 und 9 des Anhangs abgebildet. Es ist dabei sowohl für Abbildung 10 als auch für die im nächsten Abschnitt diskutierte Abbildung 11 zu beachten, dass bei den inguinalen Lymphknoten ein Tier aus der Infektionsgruppe der Gruppe E (Vor Sekundärimmunisierung) und bei den mesenterialen Lymphknoten ein Tier aus der Kontrollgruppe der Gruppe B (Abklingende Infektion) aus der Berechnung ausgeschlossen wurde, da sich bei der Auswertung dieser Werte ein Fehler in der Datenaufarbeitung zeigte. Zuerst ist in Abbildung 10 der Verlauf der T-Helferzellen sowie der ILCs dargestellt. Es erfolgte die gewebespezifische Auftragung der inguinalen und mesenterialen Lymphknoten sowie der Darmmukosa. Bei den CD4-positiven Zellen zeigte sich größtenteils ein ähnlicher Verlauf von Zellen, welche eine Infektion mit *C. difficile* erfuhren, wie jene, welche nicht infiziert waren. Nur bei den Zellen der Darmmukosa differierten diese Werte.

Es ließ sich darstellen, dass die CD4-positiven Zellen der inguinalen Lymphknoten, im Gegensatz zu denen der mesenterialen Lymphknoten und der Darmmukosa, sowohl in der Interventionsgruppe als auch in der Kontrollgruppe einen sinuskurvenförmigen Verlauf mit initial hoher und zum Ende des Experiments niedriger T-Lymphozytenzahl hatte, welcher interessanterweise nur in der Infektionsgruppe statistische Signifikanz erreichte. Bei den Zellen der Darmmukosa zeigten sich in zwei Gruppen (Gruppe B, Abklingende Infektion und Gruppe D, Vor Sekundärimmunisierung) signifikant mehr CD4+ Zellen bei den Tieren mit CDI im Vergleich zu den Tieren ohne CDI. Auch ließ sich weiterhin zeigen, dass, unabhängig von einer CDI, sowohl aus den inguinalen als auch aus den mesenterialen Lymphknoten mehr CD4-positive Zellen extrahiert werden konnten als aus der Darmmukosa.

Obwohl sich auch bei den ILCs nur punktuelle Signifikanzen zwischen den Zellen, welche mit *C. difficile* infiziert waren und jenen, welche nicht infiziert waren, berechnet ließen, glich der Verlauf der beiden Versuchsgruppen sich hier nicht so sehr wie bei den CD4-positiven Zellen. Bei den Zellen der inguinalen Lymphknoten stellte sich initial ein eher gegenläufiger Verlauf der ILCs zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen dar, mit mehr ILCs bei den Kontrolltieren. In den mesenterialen Lymphknoten hatten die Tiere mit CDI in den Gruppen A (Subakute Infektion) und Gruppe B (Abklingende Infektion) weniger ILCs als die Tiere ohne CDI. Bei den Zellen der Darmmukosa zeigte

sich der Unterschied eher als zeitlicher Versatz, bei dem die ILCs der infizierten Tiere initial langsamer anstiegen als die der nicht infizierten Tiere.

Zusätzlich ließ sich darstellen, dass, unabhängig von einer Infektion mit *C. difficile*, aus der Darmmukosa mehr ILCs extrahiert werden konnten als aus den Lymphknoten.

Daraus lässt sich zusammenfassen, dass es sowohl bei den Lymphknoten der CD4-positiven Zellen als auch bei den ILCs keine kontinuierlich signifikanten Unterschiede zwischen den Zellen der mit *C. difficile* infizierten und nicht infizierten Tiere gab. Es zeigte sich jedoch, dass die CDI in den Zellen der Darmmukosa initial zu einem transienten Anstieg der CD4+ Zellen führte. Weiterhin stellte sich einerseits dar, dass die Anzahl CD4-positiver Zellen in den inguinalen Lymphknoten mit zunehmender CIA abnahm. Und andererseits stellten sich in der Darmmukosa weniger CD4-positive Zellen und mehr ILCs als in den Lymphknoten dar.

4.7 EINE CDI FÜHRTE IN DER DARMMUKOSA ZU EINER TRANSIENTEN ANREICHERUNG DER TH2-ZELLEN, DIE EINER TRANSIENTEN DEPLETION DER TH1- UND TH17-ZELLEN VORAUSGANG

Mit der durchflusszytometrischen Differenzierung wurden nach der Darstellung der CD4-positiven Zellen diese in die T-Zell-Subpopulationen eingeteilt. Abbildung 11 stellt die aus den T-Helferzellen aufgetrennten Gruppen einzeln und nach Gewebe unterteilt dar. Dabei ist, wie in Abbildung 10, der zeitliche Verlauf mit dem stärker werdenden Einfluss der CIA assoziiert und das Vorhandensein der CDI durch den farblichen Gruppenvergleich dargestellt. Auch hier war ein Unterschied zwischen den Zellen der mit *C. difficile* infizierten Tiere und der nicht infizierten Tiere nur punktuell darstellbar. So zeigte sich bei den inguinalen Lymphknoten ein signifikanter, versuchsgruppenspezifischer Unterschied nur bei den Th1-Zellen in Gruppe A (Subakute Infektion) und Gruppe C (Rekonvaleszenz der Infektion).

Bei den mesenterialen Lymphknoten zeigte sich nur ein signifikanter, versuchsgruppenspezifischer Unterschied in Gruppe C (Rekonvaleszenz der Infektion) der Th2-Zellen, der sich in den ST2-negativen Th2-Zellen widerspiegelte.

Bei den Zellen der Darmmukosa hingegen stellten sich signifikante Unterschiede in der Gruppe C (Rekonvaleszenz der Infektion) der Th1- und Th17-Zellen dar, bei denen eine geringere Th1- und Th17-Menge bei den Tieren mit CDI im Vergleich zu den Tieren ohne CDI auffiel.

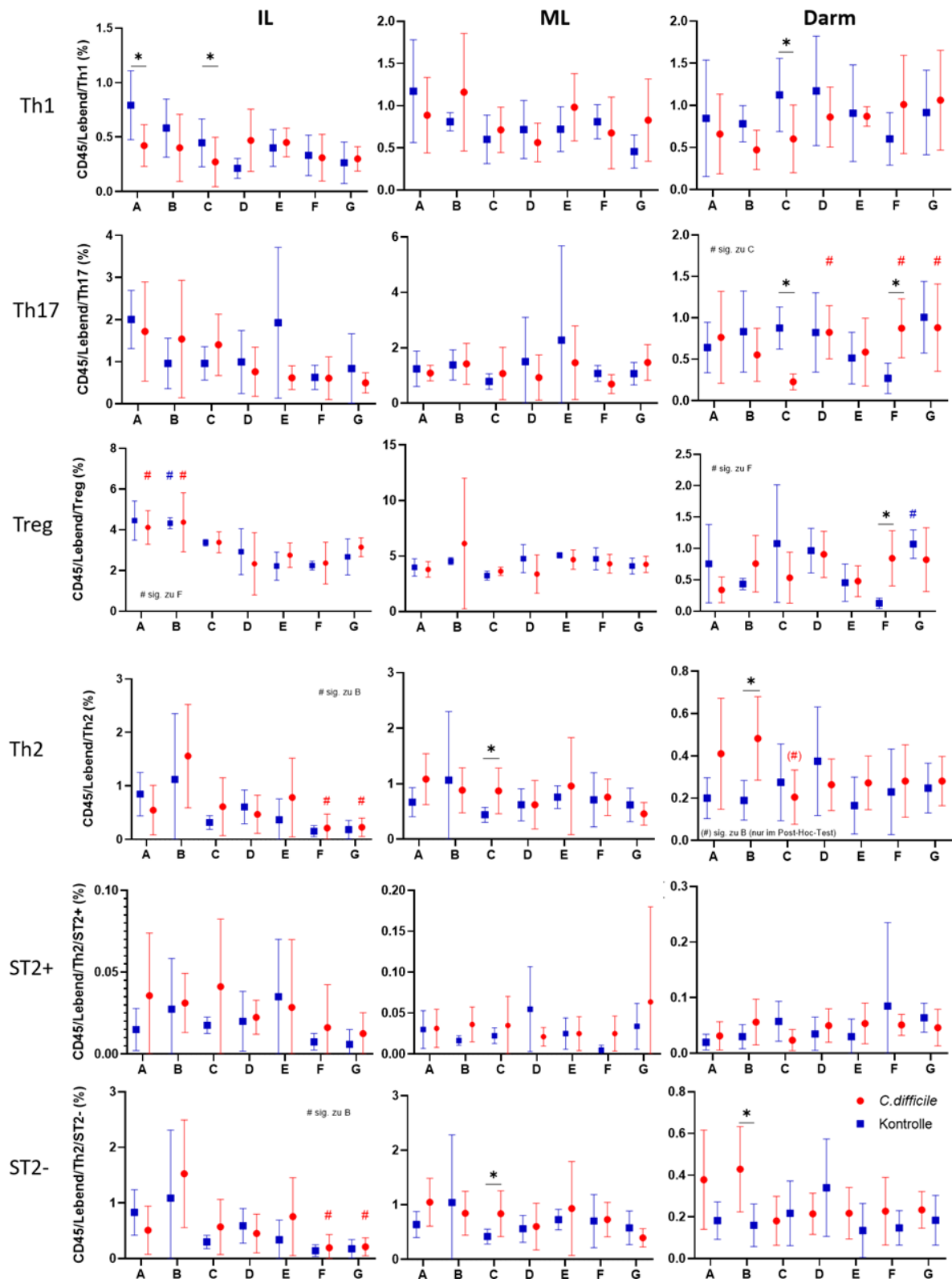


Abbildung 11: Eine CDI führte in der Darmmukosa zu einer transienten Anreicherung der Th2-Zellen, die einer transienten Depletion der Th1- und Th17-Zellen vorausging.: Legende auf der nächsten Seite.

Weiterhin stellten sich in der Gruppe F (Nach Sekundärimmunisierung) mehr Th17- und Treg-Zellen bei den infizierten Tieren dar im Gegensatz zu den uninfizierten Tieren. Außerdem zeigten sich in den frühen Versuchsgruppen A und B mehr Th2- und ST2-negativen Th2-Zellen bei den Tieren mit CDI im Vergleich zu den Tieren ohne CDI.

Darüber hinaus stellte sich dar, dass in allen T-Zell-Subpopulationen der inguinalen Lymphknoten die prozentualen Zellzahlen im zeitlichen Verlauf abnahmen, ohne dass dies die statistische Signifikanz erreichte, während die Zellzahlen der mesenterialen Lymphknoten meist auf ähnlichem Niveau stagnierten und bei der Darmmukosa tendenzlose Schwankungen im zeitlichen Verlauf erkennbar war. Zusätzlich zeigte es sich, dass die ST2-negativen Zellen in allen Geweben, dadurch dass sie den größten Teil der als GATA3-positiv getageten Zellen ausmachten, meistens synchron mit den Th2-Zellen verliefen, unabhängig davon, ob es sich um die Infektionsgruppe oder um die Kontrollgruppe handelte.

Zusammenfassend stellte sich dar, dass eine Infektion mit *C. difficile* nur im Einzelnen signifikante Unterschiede in den Subpopulationen der CD4-Zellen verursachte. Diese waren vor allem in den aus der Darmmukosa extrahierten Zellen darzustellen, in der nach CDI initial die Th2-Zellen transient anstiegen gefolgt von einem transienten Abfall der Th1- und Th17-Zellen.

4.8 EINE KOLLAGEN-INDUZIERTE ARTHRITIS FÜHRTE ZU HISTOLOGISCHEN VERÄNDERUNGEN AM BETROFFENEN GELENK

Zur Untersuchung, welche histologischen Veränderungen eine Kollagen-induzierte Arthritis verursachen konnte, wurden arthritische Hinterpfoten von Mäusen aus verschiedenen Versuchsgruppen einer histologischen Beurteilung unterzogen. Dabei erfolgte nach der Opfierung der Mäuse zum jeweiligen Versuchszeitpunkt die Entnahme

Legende zu Abbildung 11: Darstellung der Th1-, Th17-, Treg- und Th2-Zellen sowie der aus den Th2-Zellen getageten ST2-positiven und ST2-negativen Zellen. In der linken Spalte jeweils Zellen der inguinalen Lymphknoten (IL), in der mittleren Spalte Zellen der mesenterialen Lymphknoten (ML), in der rechten Spalte Zellen der Darmmukosa. Angabe in Prozent jeweils anteilig an CD45+ und lebenden Zellen. Es zeigten sich nur vereinzelt Signifikanzen, die keinem klaren Trend folgen, Mittelwertdiagramm mit Standardabweichung, Kruskal-Wallis-Test zum Längsvergleich mit Post-Hoc-Test nach Dunn, dafür Signifikanzindikator (#,&,\$) in der Farbe, in der im Post-Hoc-Test eine Signifikanz aufgetreten ist. Man-Whitney-U-Test zum Vergleich Infektionsgruppe (n=7-8) gegen Kontrollgruppe (n=3-4), schwarzer Signifikanzindikator (*) bei $p \leq 0,05$. Auf Abszisse Auftragung der Versuchsgruppen: Subakute Infektion (A), Abklingende Infektion (B), Rekonvaleszenz der Infektion (C), Nach Primärimmunisierung (D), Vor Sekundärimmunisierung (E), Nach Sekundärimmunisierung (F), CIA-Latenzphase (G).

der Pfote, welche anschließend entkalkt und für die histologische Untersuchung mit Hämatoxilin-Eosin gefärbt wurde. Es wurden dabei nicht die Pfoten aller Versuchstiere entnommen, daher war eine Quantifizierung der erosiven Prozesse nicht möglich. In Abbildung 12 ist exemplarisch das histologische Bild einer arthritischen Pfote im Vergleich zu einer asymptotischen Pfote dargestellt. Erkennbar sind vermehrte Entzündungsinfiltrate und eine Kontinuitätsunterbrechung der Knochenoberfläche im Gelenkspalt, die sich an der asymptotischen Pfote nicht darstellen lässt.

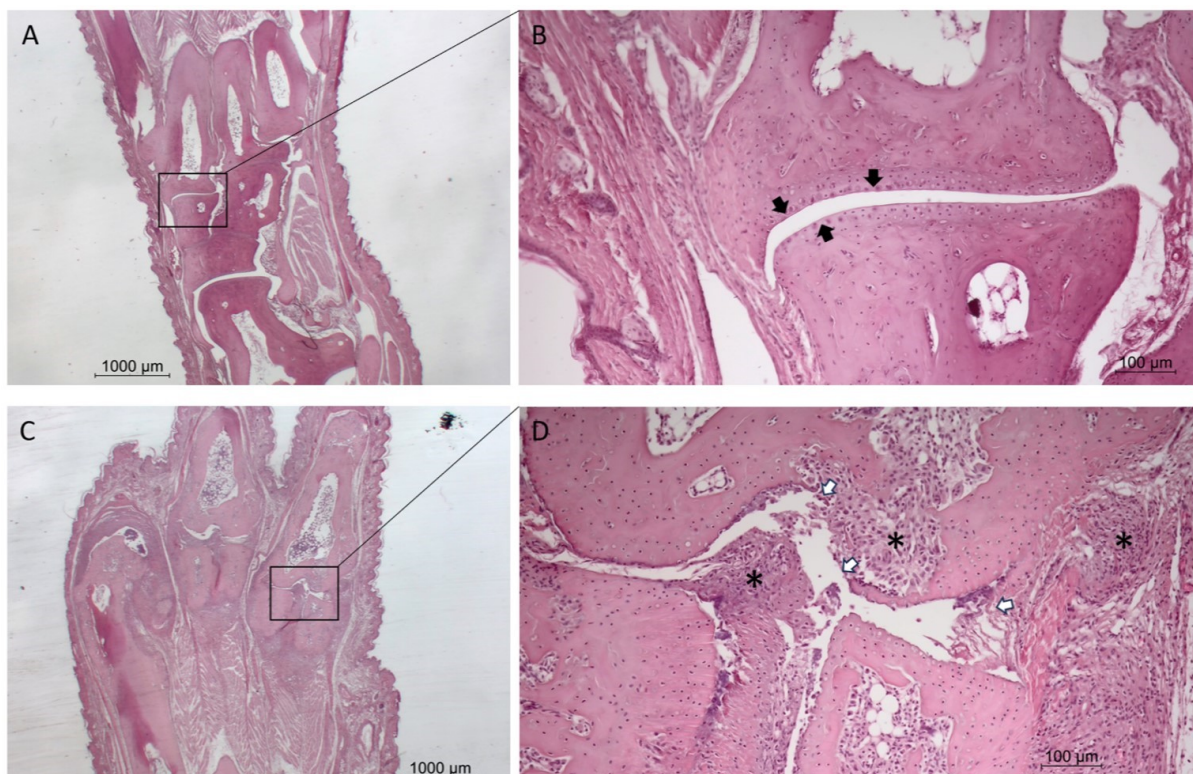


Abbildung 12: Eine Kollagen-induzierte Arthritis führte zu histologischen Veränderungen am betroffenen Gelenk. (A) Exemplarische Darstellung der histologischen Aufarbeitung der Hinterläufe in der Hämatoxilin-Eosin-Färbung. Hinterlauf ohne Arthritis, Knochen glatt, ohne Erosion (schwarze Pfeile), Hinterlauf einer Kontrollmaus der Gruppe A (Subakute Infektion) in 1,25-facher Vergrößerung **(B)** und 10-facher Vergrößerung. **(C)** Hinterlauf mit Arthritis, Knochenoberfläche aufgeraut mit Erosionen (weiße Pfeile), Entzündungsinfiltrate (*), Hinterlauf einer mit *C. difficile* infizierten Maus der Gruppe G (CIA-Latenzphase) mit arthritischen Symptomen in 1,25-facher Vergrößerung **(D)** und 10-facher Vergrößerung.

Eine weitere histologische Untersuchung wurde zur Beurteilung des Einflusses einer *Clostridioides difficile* Infektion durchgeführt. Dabei wurden die Kolons präpariert und ebenfalls mit Hämatoxilin-Eosin gefärbt. Auch hier ist eine Quantifizierung des Entzündungsprozesses nicht möglich, da nicht von allen Tieren das Kolon entnommen wurde. In Abbildung 13 ist exemplarisch das Kolon einer mit *C. difficile* infizierten Maus gegen das einer sham-infizierten Maus dargestellt. In nur wenigen Präparaten konnte die hier beschriebene Leukozyteninfiltration aufgezeigt werden.

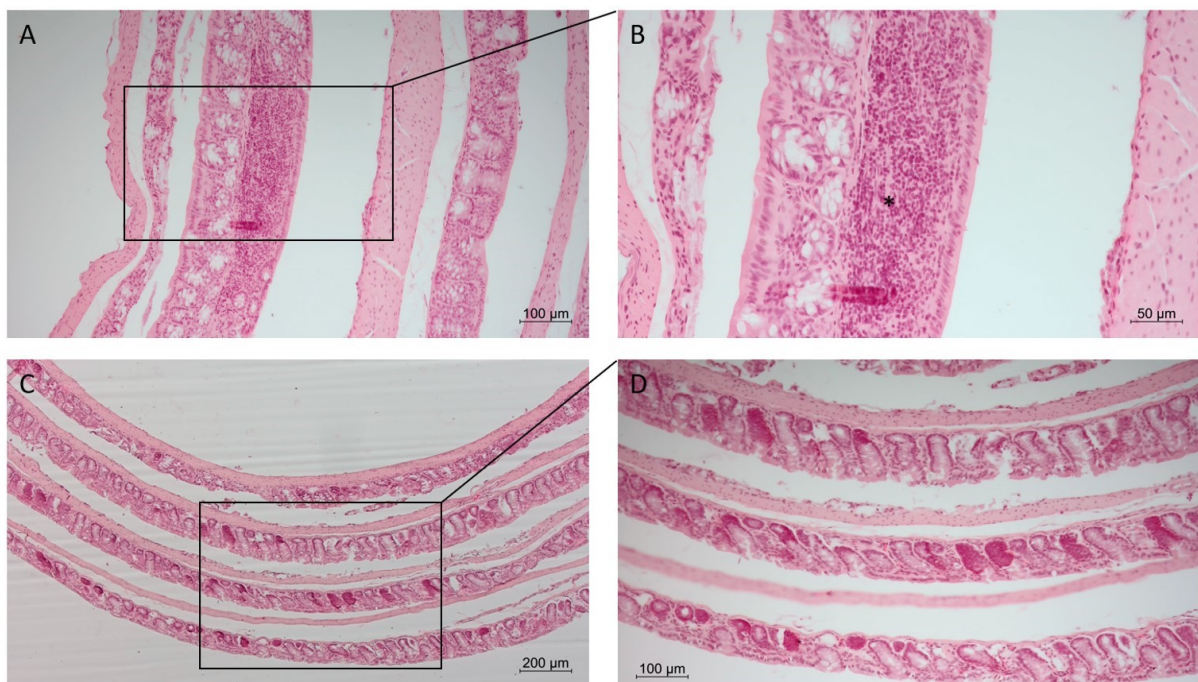


Abbildung 13: Eine *C. difficile* Inokulation konnte zur Einwanderung von Entzündungszellen in den Darm führen. (A) Exemplarische Darstellung der histologischen Aufarbeitung des Kolons in der Hämatoxilin-Eosin-Färbung. Kolon einer mit *C. difficile* infizierten Maus der Gruppe B (abklingende Infektion) 9 Tage nach Infektion. 10-fach Vergrößerung **(B)** und 20-fach Vergrößerung. Mit Verdickung des Darmes und Auftreten von Entzündungsinfiltraten (*). **(C)** Kolon einer Kontrollmaus der Gruppe A (Subakute Infektion) 2 Tage nach sham-Infektion. 5-fach Vergrößerung **(D)** und 10-fach Vergrößerung.

v. DISKUSSION

Die rheumatoide Arthritis ist eine Volkskrankheit immunologischer Genese, deren Pathophysiologie bis heute nicht vollständig geklärt ist. Die Mukosa-Gelenk-Achse ist dabei in den letzten Jahren vermehrt in den Fokus der Forschung gerückt. Dabei beziehen sich viele Studien explizit auf die Relevanz der Darm-Gelenk-Achse.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zum Verständnis der Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis zu leisten. Dazu wurde für die durchgeführte Studie das Modell der Kollagen-induzierten Arthritis gewählt. Es ist das am häufigsten genutzte Modell für die rheumatoide Arthritis, mit dem in vivo die Auswirkungen der Arthritis am Organismus dargestellt werden können und aus dessen Pathophysiologie Parallelen zur rheumatoiden Arthritis gezogen werden können (Brand et al., 2007). Zur Durchführung der Experimente wurden männliche DBAxB10Q Mäuse der F1-Generation genutzt, für welche beschrieben ist, dass diese eine Kollagen-induzierte-Arthritis entwickeln können (Lübcke et al., 2019). Explizit wurde zur Untersuchung der Darm-Gelenk-Achse der Einfluss einer *Clostridioides difficile* Infektion in Kombination mit einer Kollagen-induzierten Arthritis auf das Immunsystem der Maus untersucht. Dabei stand besonders das adaptive Immunsystem mit den unterschiedlichen T-Zell-Populationen im Fokus der Betrachtung. Da in einer Veröffentlichung der Arbeitsgruppe Klinische Immunologie bereits nachgewiesen werden konnte, dass eine CDI die Symptome einer CIA linderte (Schmidt et al., 2020), wurde das gleiche Erregermodell mit dem *C. difficile* Stamm VPI 10463 auch in der vorliegenden Arbeit genutzt um die dort dargestellten Ergebnisse hier zu reproduzieren und weiterführend zu untersuchen.

Es stellte sich in dieser Arbeit jedoch überraschenderweise heraus, dass die subklinische CDI nur punktuell Einfluss auf die T-Zell-Subpopulationen der Maus hatte. Dies zeigte sich auch unabhängig von einer sich anschließenden CIA. Zur Investigation, welche Ursache diesem unterschiedlichen Ergebnis zugrunde liegt, müssen mehrere Faktoren diskutiert werden.

5.1 EINE INFektion DER VERSUCHSTIERE MIT *C. DIFFICILE* KONNTE NICHT BEI ALLEN INOKULIERTEN TIEREN BESTÄTIGT WERDEN

Die Kontrolle einer erfolgreichen Infektion mit *Clostridioides difficile* lässt sich im klinischen Gebrauch über die Faktoren der Abnahme des Körpergewichtes und des Auftretens von Diarrhöen, welche miteinander korrelieren können, bestätigen. Da jedoch im Laufe der Tierhaltung jeweils mehrere Tiere in einem Käfig untergebracht waren, konnte den Tiere zur Infektionskontrolle somit nur spezifisch der potentielle Gewichtsverlust, nicht jedoch Diarrhoen als Zeichen der CDI zugeordnet werden. Da die Gewichtsabnahme der Infektionsgruppe jedoch nicht signifikant größer war als die der Kontrollgruppe, musste davon ausgegangen werden, dass nicht jedes mit *C. difficile* inokulierte Tier letztendlich infiziert war. Dem können unterschiedliche Auslöser zugrunde gelegen haben.

Obwohl neuere Daten zeigen, dass *C. difficile* unter Umständen besser mit Sauerstoffexposition umgehen kann, als es von einem obligaten Anaerobier erwartet ist (Morvan et al., 2021), ist zu erwähnen, dass, obwohl schnell und präzise gearbeitet wurde, eine gewisse Zeit zwischen der Entnahme der *C. difficile* aus der Anaerobenkammer und der oralen Inokulation verstrich, wodurch die Bakterien für undefinierte Zeit sauerstoffhaltiger Luft ausgesetzt waren, was die Vitalität beeinflussen konnte.

Weiterhin wurden für die Infektion der Tiere eigens *C. difficile* kultiviert, deren Vitalität anschließend gegengeprüft wurde. Bei den in die Versuchstiere eingebrachten Bakterien handelte es sich um vegetative Zellen. In natürlicher Umgebung geschieht eine Infektion mit *C. difficile* jedoch über die Aufnahme der Sporen, die erst im Darm wieder auskeimen (Howerton et al., 2011; Koenigsknecht et al., 2015). Und obwohl die Infektion von Versuchsmäusen mit vegetativen Formen von *C. difficile* schon mehrmals erfolgreich durchgeführt wurde, konnte auch dieser Umstand eine Limitation des Versuchs zu Folge haben (Reeves et al., 2011).

Außerdem zeigte die Arbeitsgruppe um Castro-Córdova (2020), dass der *C. difficile* Stamm VPI 10463 nach einer Behandlung mit einem Antibiotika-Cocktail gefolgt von einer Clindamycin-Injektion eine schlechtere Suszeptibilität zeigt als nach einer zehntägigen Cefoperazon-Therapie. Obwohl das hier angewandte antibiotische Regime zur Erhöhung der Empfänglichkeit des Organismus mit *C. difficile* bereits in vorausgehenden Studien erfolgreich war, kann diskutiert werden, ob eine Erweiterung des antibiotischen Wash-Out-Protokolls zur Suszeptibilitätserhöhung sinnvoll wäre.

Ein alternativer Ansatz, eine CDI zu initiieren, stellt die Infektion mit *Helicobacter hepaticus* dar. Dieser ahmt das Konzept einer entzündlichen Darmerkrankung im Sinne der Erschaffung eines inflammatorischen Milieus nach und kreierte damit eine antibiotika-unabhängige Methode, einen murinen Organismus anfällig für *C. difficile* zu machen (Barron et al., 2022). Auch damit kann sich zur experimentellen Induktion der CDI auseinandergesetzt werden.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Gewebeeinfiltration von Neutrophilen in den Darm von Mäusen, welche mit *C. difficile* Sporen inokuliert wurden, innerhalb von 24-48 Stunden nach dem Infektionsereignis nachweisbar war (Jarchum et al., 2012). Bei der anschließenden histologischen Aufarbeitung der Kolons konnte in der vorliegenden Arbeit nur in Einzelfällen ein histopathologisches Korrelat im Sinne einer Leukozyteninfiltration in den betroffenen Geweben dargestellt werden. Dies kann einerseits die klinische Hypothese, dass die Inokulation mit *C. difficile* bei vielen Interventionstieren nicht zu einer CDI geführt habe, stützen. Andererseits kann es auch darauf hindeuten, dass die Entzündungsreaktion bereits wieder rekonvaleszent war und damit histopathologische Merkmale noch teilweise vorhanden, aber bereits am Abklingen waren. Die Aussage aus der Anzahl der Zellen, welchen aus den mesenterialen Lymphknoten gewonnen wurden, konnten diese These jedoch auch nur unmaßgeblich bestätigen. Denn obwohl die Zahl der mit *C. difficile* infizierten Zellen aus den mesenterialen Lymphknoten gering höher als die der nicht infizierten Tiere war, erreichte dieser Aspekt keine statistische Signifikanz. Es ist daher zu überlegen, ob in anschließenden Experimenten die Infektionskontrolle auf eine vorhandene CDI schon während des Versuchs über einen Toxinnachweis aus dem Stuhl einzeln gehaltener Mäuse oder über neuere alternative Möglichkeiten, wie beispielsweise eine Serumkontrolle von Antikörper-sezernierender Zellen (ASC), durchgeführt werden kann (Haddad et al., 2021).

5.2 BEI ALLEN VERSUCHSTIEREN KONNTE EINE KOLLAGEN-INDUZIERTER ARTHRITIS AUS GELÖST WERDEN

Zu Beginn der Experimente sollte die These verfolgt werden, nach der eine klinische CDI die Schwere der arthritischen Symptome linderte. Da jedoch in der vorliegenden Arbeit der Status einer klinisch symptomatischen CDI nicht erreicht wurde, können die Ergebnisse dieser Studie nicht direkt mit denen von Schmidt (2020) korreliert werden.

Es wurden daher mittels zytometrischer Daten versucht, das von Schmidt untersuchte Phänomen zu erklären. Dies geschah, indem analysiert wurde, welchen Einfluss eine subklinische CDI auf Symptomschwere der CIA hatte. Das Auftreten einer Kollagen-induzierten Arthritis wurde über den CIA-Score gemessen. In dieser Messung konnte für alle Tiere der mit *C. difficile* inokulierten Gruppe ebenso wie für alle Tiere der Kontrollgruppe das Vorhandensein der Arthritis definiert werden. Es ergab sich damit eine Inzidenz von 100% für beide Gruppen und somit kein versuchsgruppenspezifischer Unterschied. Zur genaueren Analyse dieses Faktus wurde anschließend der maximal aufgetretene Arthritiscore zur Beurteilung der Schwere der Symptome sowie der erste Tag, an dem Symptome der Arthritis diagnostiziert werden konnten, und der kumulative Arthritiscore miteinander verglichen. Aber auch hier mussten wir feststellen, dass die Inokulation mit *C. difficile* weder einen signifikant protektiven noch aggravierenden Effekt auf die klinische Symptomatik der CIA hatte.

Es ist dabei jedoch zu erwähnen, dass bei den genutzten DBAxB10Q Mäusen bei einigen Tieren im Versuchsablauf auch ohne sekundäre Immunisierung mit Kollagen, eine spontane Arthritis nach alleiniger Primärimmunisierung aufgetreten ist. Es handelte sich dabei um insgesamt vier der 49 Mäuse, die die primäre Immunisierung durchlaufen haben, aber noch vor der sekundären Immunisierung standen. Damit ergibt sich eine Rate von 12,25% der Tiere, bei denen bei der CIA eine verfrühte Arthritis auftrat. Obwohl das spontane Auftreten arthritischer Symptome ohne das Verfahren der Kollageninduktion bereits mehrmalig und bei verschiedenen Mausstämmen nachgewiesen werden konnte (Hang et al., 1982; Holmdahl et al., 1992; Sakaguchi et al., 2003), lässt sich in der Literatur zu einem verfrühten Ausbruch arthritischer Symptome nach Primärimmunisierung, jedoch vor Sekundärimmunisierung keine aussagekräftige Studie finden. Es konnte jedoch für DBAxB10Q Tiere bei früheren Experimenten der Arbeitsgruppe klinische Immunologie bei einzelnen Mäusen bereits ein solch verfrühtes Einsetzen beobachtet werden. Daher muss überlegt werden, ob die in allen Versuchstieren ausgelöste Arthritis wirklich auf die Immunisierung mit Kollagen Typ II zurückzuführen ist oder ob der verwendete Mausstamm DBAxB10Q die Eigenheit innehat, spontane Arthritiden auch ohne Interventionen oder verfrühte arthritische Symptome ohne sekundäre Immunisierung auslösen zu können und inwiefern dieser Stamm damit für ein Vergleichsmodell geeignet ist.

Den Anstieg der Zellzahlen aus den inguinalen Lymphknoten werteten wir als lokale Lymphadenopathie, für die bewiesen ist, dass sie mit einer arthritischen Symptomatik

der Gelenken einhergeht (Rodríguez-Palmero et al., 1999; Wooley & Whalen, 1991). Dies ist mit den klinischen Entzündungszeichen, die an den Gelenken der Versuchstiere darstellbar waren, vereinbar.

Die histologischen Präparate, welche von den Hinterläufen der arthritischen Mäuse in diesem Versuch angefertigt wurden, unterstreichen die Ursache dieser Lymphadenopathie der Pfoten-drainierenden Lymphknoten. Sie weisen ähnliche Entzündungspathologien auf wie die bereits 1986 von Holmdahl beschriebenen Symptomen der Kollagen-induzierten Arthritis; eine lokale Entzündungsform mit Einwanderung mononuklearer Zellen in das artikuläre Gewebe, synoviale Hyperplasie sowie Lyse von Knorpel und Knochen.

Als Limitation im Scoring der Arthritis Symptomatik muss an dieser Stelle jedoch weiterhin eine potentielle Fehlerquelle dieser Arbeit angesprochen werden. Wie eingangs bereits erwähnt, wurden die Experimente zu dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit Lukas Wenzel durchgeführt. Dadurch drängt es sich naturgegeben auf, dass es sowohl in der Aufarbeitung der Proben, welche anschließend diskutiert werden, als auch in der subjektiven Bewertung der arthritischen Symptome eine interpersonelle Varianz vorhanden war, die mathematisch nicht eliminiert werden konnte.

5.3 EINE KOLLAGEN-INDUZIERTER ARTHRITIS MODULIERTE DIE IMMUNLANDSCHAFT BEI DBAXB10Q MÄUSEN

Neben den klinischen Veränderungen, die eine CDI auf die Symptomatik der CIA hatte, interessierten wir uns auch für die immunologischen Aspekte, welche durch den Eingriff in das Mikrobiom der Versuchstiere moduliert wurden. Daher schloss sich nach der Opferung der Versuchstiere die Entnahme der inguinalen und mesenterialen Lymphknoten ebenso wie des Dünndarms der Tiere an. Damit erfolgte die Untersuchung, inwiefern die subakute CDI und die CIA die T-Zell-Populationen innerhalb des murinen Immunsystems beeinflussten.

Als allumfassender Aspekt ließ sich auch bei der Auswertung der einzelnen Lymphozytenpopulationen darstellen, dass bei den ILCs und den CD4-positiven Zellen und deren Unterpopulationen Th1, Th17, Treg und Th2 (ST2±) nur punktuell Unterschiede zwischen den Zellen der Tiere, die mit *C. difficile* infiziert waren und denen, die es nicht waren, darstellbar waren. Dies korreliert mit der zuvor postulierten Behauptung, die

Inokulation mit *C. difficile* sei ineffektiv gewesen und es zeige sich kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen bei den arthritischen Symptomen. Stattdessen zeigte sich eher ein Effekt, den die zunehmende CIA mit zeitlichem Verlauf auf die unterschiedlichen Zellpopulationen hatte.

Als Vertreter der adaptiven Immunantwort reagieren die T-Helferzellen, die CD4-positiven Zellen, als spezifisches Abwehrsystem. Spannenderweise konnte bei diesen in den inguinalen Lymphknoten ein Abfall der Zellzahlen über den zeitlichen Verlauf des Experimentes dargestellt werden. Dies würde verwundern, da doch gezeigt werden konnte, dass CD4-positiven T-Zellen bei CIA-Mäusen in der Milz und den Lymphknoten akkumulieren (Vita et al., 2021). Betrachtet man parallel dazu jedoch die Gesamtzellzahlen der aus den inguinalen Lymphknoten gewonnenen Zellen, die einen Anstieg im zeitlichen Verlauf zeigen, lässt sich überlegen, ob die relative Abnahme der CD4-positiven T-Zellen der inguinalen Lymphknoten eher auf den absoluten Zellzuwachs zurückzuführen war und man hier von einem Verdünnungseffekt durch die gleichzeitige die Zunahme anderer Zellen, welche eine Immunantwort bieten, sprechen konnte. Bei den Zellen der Darmmukosa stellte sich eine transiente Anreicherung der CD4+-Zellen nach CDI dar. Dies war nicht verwunderlich, da auch eine subklinische CDI entzündlich auf den Darm wirkt und somit eine T-lymphozytäre Antwort mit sich zieht (Vargas et al., 2017).

Als Konterpart der adaptiven Immunantwort wurden neben den CD4-positiven T-Zellen auch die angeborenen lymphatischen Zellen (ILC) als Vertreter der angeborenen Immunantwort dargestellt. Die Rolle derer ist noch Gegenstand aktueller Forschung. Im Jahr 2013 definierten Spits et al. die Klassifikation der ILC. Die Arbeitsgruppe um Ryu zeigte 2023, dass die angeborenen lymphatischen Zellen die Funktionen der Th1, Th2 und Th17 Zellen der erworbenen Immunabwehr in der angeborenen Immunabwehr spiegeln und als gewebeständige Zellen vor allem in mukosalem Gewebe ihrer Aufgabe, der frühen Immunantwort, nachkommen. Dies unterstreicht den in dieser Arbeit dargestellten Gradienten, nach dem die prozentual meisten ILC in der Darmmukosa auftraten, gefolgt von den mesenterialen Lymphknoten wobei die inguinalen Lymphknoten dahinter mengenmäßig zurückblieben.

In der weiterführenden Auftrennung der T-Zell-Populationen stellte sich der zeitliche Verlauf der einzelnen Populationen größtenteils synchron zu dem der CD4-Zellen dar.

Entsprechend des Th1-Th2-Paradigmas, das besagt, dass Th1-Zellen und Th2-Zellen eine gegensätzliche Regulierungsfunktion haben, war erwartet, dass die Menge an Th2-Zellen in einer autoimmunen Entzündungsreaktion rückläufig wäre, wenn eine inflammatorische Reaktion aufträte, dies konnte auch für die rheumatoide Arthritis bereits gezeigt werden (Pandey et al., 2016). Dementsprechend konnte bereits früher dargestellt werden, dass ein Anstieg der proinflammatorischen Th1-Zellen und Th17-Zellen zur Pathogenese der rheumatoiden Arthritis am Modell der Kollagen-induzierten Arthritis beitragen kann (Bedoya et al., 2013; Tang et al., 2021).

Auch wenn nicht explizit dargestellt werden konnte, dass die Immunisierung mit Kollagen einen Einfluss auf die Zellen der adaptiven Immunantwort hatte, bei dem sich die Zellen der infizierten Tiere von denen der nicht-infizierten Tiere unterschied, wurden dennoch andere Effekte aufgezeigt, die einen Unterschied zwischen Tieren mit CDI und ohne CDI ausmachten.

So wurde in der hier vorliegenden Arbeit als hervortretender Effekt in der Darmmukosa eine an die Inokulation mit *C. difficile* anschließende transiente Depletion von Th1- und Th17 Zellen dargestellt, welche sich an eine transiente Anreicherung von Th2 Zellen anschloss. Dies spricht für eine Th2-dominierte Antwort auf die subklinische CDI. Da Th2-Zellen mit einer antientzündlichen Immunantwort einhergehen, könnte dies eine Erklärung der Ergebnisse liefern, die die Arbeitsgruppe um Schmidt (2020) darstellte. Es bliebe dahingehend zu untersuchen, ob eine intestinale Th2-Polarisierung bei unterschiedlich starken Ausprägungen der CDI ebenso unterschiedlich stark aufträte.

Da der Anstieg der Th2-Zellen in der Darmmukosa der mit *C. difficile* infizierten Tiere nur transient war und von einem ebenso transienten Abfall der proinflammatorischen Th1- und Th17-Zellen gefolgt wurde, ist zu überlegen, ob dieser Verlauf mit dem Th1-Th2-Paradigma in Einklang steht, da der Anstieg der Th1- und Th2-Zellen nicht zum gleichen Zeitpunkt geschah und damit die gegensätzliche Polarisierung dieser Zellpopulationen bekräftigt (Mills et al., 2000). Alternativ lässt sich jedoch auch spekulieren, ob die nur milde Ausprägung der Verläufe von Th1-, Th2- und Th17-Zellen eher der nur subklinischen CDI folgt oder hingegen der von Rogozynski und Dixon (2024) postulierte Behauptung, dass das Th1-Th2-Paradigma zu starr gedacht sei und die Komplexität und Fluidität des Th1-Th2-Systems nicht miteinberechne.

Weiterhin erfolgte die Darstellung der Treg-Zellen. Diese agieren als Entzündungsinhibitor und regulieren die Immuntoleranz indem sie überschießende Reaktionen, wie

die Aktivierung der proinflammatorischen Th1- und Th17-Zellen, verhindern (Fletcher et al., 2009; Koch et al., 2012). In der hier vorliegenden Arbeit wurde in den inguinalen Lymphknoten ein prozentualer Abfall der Treg-Population im zeitlichen Verlauf dargestellt. Dabei fand man diesen sowohl bei der Infektionsgruppe als auch bei der Kontrollgruppe. Dieser abfallende Verlauf steht mit den Arbeiten von Kawashiri et al. (2011) und Samson et al. (2012) in Einklang. Es muss jedoch erwähnt werden, dass die Literatur sich hierbei uneins ist. So sprechen beispielsweise van Amelsfort et al. (2004) und Han et al. (2008) von einem Anstieg der Treg Zellen bei Mäusen mit rheumatoider Arthritis im Vergleich zu Kontrolltieren. Liu et al. (2005) wiederum stellten dar, dass sich die Anzahl der Treg-Zellen bei rheumatoider Arthritis nicht verändere. Es ist daher schwierig, den hier dargestellten Trend in der aktuellen wissenschaftlichen Diskussion zu verordnen.

In der weiteren Betrachtung der Th2-Population fällt auf, dass der Verlauf der einzelnen Th2-Zellen dem der ST2-negativen Th2-Zellen ähnelt. ST2, der IL-33-Rezeptor, ist bei Tumorerkrankungen und nicht-allergischen Entzündungen relevant, wird aber vor allem bei allergischen Reaktionen ausgebildet. So wäre es nicht verwunderlich, dass die Anzahl an ST2-positiven Th2-Zellen bei der Aufarbeitung der Lymphknoten und Darmmukosa arthritischer Mäuse nur eine untergeordnete Rolle spielt (Calise et al., 2021; Cayrol & Girard, 2022). Auch die Tatsache, dass kein Unterschied zwischen den ST2-positiven Zellen der mit *C. difficile* infizierten und den nicht infizierten Mäusen darstellbar war, würde dieser These folgen. Man könnte jedoch auch gegensätzlich argumentieren, dass IL-33 als Alarmzytokin erst bei Gewebeverletzung und Entzündung freigesetzt wird, welches als Rückkopplungsmechanismus die Immunzellen dazu veranlasste, den Rezeptor ST2 auszubilden (Cayrol & Girard, 2018). In dem Fall wäre es interessant, den Verlauf der ST2-positiven Th2-Zellen nach der Ausbildung arthritischer Symptome zu verfolgen.

In Conclusio lässt sich darlegen, dass in der vorliegenden Arbeit weder symptomatisch noch nodal-immunologisch ein Unterschied zwischen einer durchgemachten Infektion mit *Clostridioides difficile* und einer sham-Infektion aufgezeigt werden konnten, wenn es sich bei der *C. difficile* Infektion um eine subklinische Ausprägungsform handelte. Nur in der Darmmukosa zeigte sich eine milde Th2-dominierte Reaktion auf die Infektion mit *C. difficile*, die von einer transienten Th1/Th17-Antwort abgelöst wurde.

Für den Grund der insuffizienten CDI wurden unter anderem Fehler bei der Bakterieninokulation als auch Ursachen diskutiert, die der CDI oder den Versuchstieren eigen sind. Die isolierte lymphozytäre Antwort der Darmmukosa auf die CDI wurde im Kontext des Th1-Th2-Paradigmas betrachtet. Auch Limitationen wurden besprochen, welche das statistische Outcome des Experimentes unterminierten. Dazu zählte, neben den bereits diskutierten, auch eine eventuell zu geringe Stichprobenanzahl, wobei hier im Falle weiterer Untersuchungen aus ethischen Gesichtspunkten zuerst andere Limitationsfaktoren ausgeschlossen werden sollten wie beispielsweise eine Prüfung der Infektiosität von *C. difficile* in verschiedenen Wachstums- und Überdauerungsformen. Ein weiterer Punkt, der erneuter Reevaluation bedarf, sind Faktoren, die beiden Versuchsgruppen gemein ist, wie beispielsweise die orale und intraperitoneale Behandlung mit Antibiotika oder die Induktion der Kollagen-induzierten-Arthritis mittels Freund's Adjuvans und Kollagen Typ II.

VI. ANHANG

Anhang Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

Anhang Tabelle 2: Chemikalien und Reagenzien

Anhang Tabelle 3: Lösungen und Medien

Anhang Tabelle 4: Genutzte Geräte

Anhang Tabelle 5: Softwareprogramme

Anhang Tabelle 6: Färbeprotokoll für die HE-Färbung

Anhang Tabelle 7: Statistische Auswertung der Zellen der inguinalen Lymphknoten

Anhang Tabelle 8: Statistische Auswertung der Zellen der mesenterialen Lymphknoten

Anhang Tabelle 9: Statistische Auswertung der Zellen der Darmmukosa

Anhang Abbildung 1: Nicht-infizierte Tiere wiesen insignifikant weniger Zellen in den mesenterialen Lymphknoten in den Gruppen A und B auf

6.1 TABELLEN

ANHANG TABELLE 1: VERBRAUCHSMATERIALIEN

Produktbezeichnung	Hersteller	Produktnummer
Injekt solo Einmalspritzen, 5 ml	B. Braun Melsungen AG	REF 4606051V
Omnifix-F Spritze 1 ml	B. Braun Melsungen AG	REF 9161406V
Microlance 3 25G 1"	Becton, Dickinson and Company	REF 300400
Microlance 3 27G 1/2"	Becton, Dickinson and Company	REF 300635
Deckgläser 24 x 50 mm	Carl Roth	1871.2
Objektträger	Carl Roth	PC68.1
Einbettkassette Standard	Kabe Labortechnik GmbH	REF 053749
MACS SmartStrainers 70µm	Miltenyi Biotec	130-110-916
FACS-Reaktionsgefäß, 5 ml	Sarstedt AG & Co. KG	REF 55.1579
Sterilisatonsfilter, Filtrapur S 0,2 µm	Sarstedt AG & Co. KG	83.1826.001
Greiner Falcon Tube 16 C 15 ml	Sigma Aldrich	T1943 SIGMA
Greiner Falcon Tube 16 C 50 ml	Sigma-Aldrich	T2318 SIGMA

ANHANG TABELLE 2: CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN

Produktbezeichnung	Hersteller	Produktnummer
L-Cystein-Hydrochlorid, 98 %, wasserfrei	Acros Organics	434851000
Metronidazol	B. Braun Melsungen AG	PZN 05543515
Rompun 2 % (Xylacin)	Bayer AG	82826107
BV786 Mouse Anti-Mouse RORyt (Q31-378)	BD Biosciences	564723
PerCP Rat Anti-Mouse CD4 (RM4-5)	BD Biosciences	561090
Adjuvant Incomplete Freund	Becton, Dickinson and Company	233910
<i>M. tuberculosis</i> des. H37 Ra 100mg	Becton, Dickinson and Company	231141
Alexa Fluor® 647 anti-mouse FOXP3 Antibody (MF-14)	BioLegend	126407
Brilliant Violet 421™ anti-GATA3 Antibody (16E10A23)	BioLegend	653813
Brilliant Violet 605™ anti-mouse CD45 Antibody (30-F11)	BioLegend	103139
FITC anti-mouse Lineage Cocktail with Iso-type Ctrl	BioLegend	133301
PE anti-mouse CD127 (IL-7Rα) Antibody (A7R34)	BioLegend	135009
PE/Cyanine7 anti-mouse IL-33Rα (ST2) Antibody (DIH4)	BioLegend	146609
PE/Dazzle™ 594 anti-T-bet Antibody (4B10)	BioLegend	644827
True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set	BioLegend	424401

TruStain FcX™ (anti-mouse CD16/32) Antibody (93)	BioLegend	101319
Zombie NIRT™ Fixable Viability Kit	BioLegend	423105
Eosin G-Lösung 0,5 %	Carl Roth	X883.2
Kanadabalsam	Carl Roth	8016.2
Kanamycinsulfat	Carl Roth	T832.1
Natriumchlorid	Carl Roth	3957.1
ROTI Histol (96 - 98 % Limonen)	Carl Roth	6640.1
1-Propranolol >99,5%	Carl Roth	9169.1
Bovines Typ 2 Kollagen	Chondrex	CHX-20021
Percoll density gradient media	GE Healthcare	17089101
L-Glutamin 200 mM	Gibco™	25030081
Trypanblau	Gibco™	15250-061
Colistiflex 1 mio. I.E	InfectoPharm	PZN 11511790
Ultracomp eBeads™ Kompensations-Beads	Invitrogen™	01-2222-41 Lot 2462645
Ketamin Graeub 100 mg/ml	Livisto	Zulassungs Nr.: 400042.00.00
UseDecal, EDTA-Lösung	Medite	403310-00
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck	106586
Glycerol 85%	Merck	1.04094.1000
HEPES, Free Acid, Molecular Biology Grade	Merck	391340-25GM
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	104873
Mayers Hämalaunlösung	Merck	1.09249.0500
Natriumhydrogencarbonat	Merck	106329

autoMACS Running Buffer	Miltenyi Biotec	130-091-221
Clinda-saar 600 mg	MiP	PZN-03796519
Vanco-saar 500 mg	MiP	PZN-03796531
Agar Technical	Oxoid	LP0012
Brain Heart Infusion	Oxoid	CM1135
Yeast Extract	Oxoid	LP0021
FBS Good	PAN Biotech	P40-37500
HEPES Buffer 1M	PAN Biotech	P05-01100
Penicillin-Streptomycin, 10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin	PAN Biotech	P06-07100
RPMI 1640	PAN Biotech	P04-18525
Sodium pyruvate 100 mM	PAN Biotech	P04-43100
Gentamicin 40 mg/ml	Ratiopharm	PZN 03928174
Tramadol 100 mg/ml Tropfen	Ratiopharm	31467.00.00
EDTA-Dinatrium	Serva	11280
Collagenase Type IV 100U/ml	StemCell Technologies	100-0680
Phosphate Buffered Saline (PBS) Packs	Thermo SCIENTIFIC	REF 28374
Ethanol 96 % (v/v), mit Methylethylketon vergällt	UMR Zentralapotheke	
Formafix 4%	Grimm med. Logistics	F10010G

ANHANG TABELLE 3: LÖSUNGEN UND MEDIEN

Name	Menge	Bestandteil
BHIS-Medium	37 g/l	BHI (Brain-Heart-Infusion Broth)
	5 g/l	Hefeextrakt
	15g /l	Agar (nur für Festmedien)

Auf 1 l mit *A. dest* auffüllen und bei 121°C für 20 min autoklavieren. Das (Fest-)Medium auf etwa 60°C abkühlen lassen und 0.1 % L-Cystein-HCl hinzugeben (10%)

L-Cystein-HCl	L-Cystein-HCl	5 g
	<i>A. dest</i>	<i>ad</i> 50 ml

Steril filtrieren und bei 4 °C lagern

10xPBS	NaCl	80g
	KCl	0.2g
	Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O	17.7 g
	KH ₂ PO ₄	2.4 g
	<i>A. dest</i>	<i>ad</i> 1000 ml

RPMI-Vollmedium	FCS inaktiv	10% 50ml
	Penicillin-Streptomycin	1% 5ml
	Glutamin	2mM
	HEPES	10mM
	Pyruvat	1mM
	RPMI	500 ml

HEPES-Bicarbonat-Puffer	HEPES	1,19g
	NaHCO ₃	1,05g
	HCl	Nach Bedarf

In *A.dest* lösen, mit HCl auf pH 7,2 einstellen, auf 50ml mit *A.dest* auffüllen, steril filtrieren

10x HBSS [-] Ca²⁺/Mg²⁺	NaCl	8,00g
	KCl	0,40g
	D-Glucose	1,00g
	NaHCO ₃	0,35g
	Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O	0,06g
	KH ₂ PO ₄	0,06g
In 100ml <i>A.dest</i> auflösen		

DTT-Lösung	10x HBSS [-] Ca ²⁺ /Mg ²⁺	5ml
	10x HEPES-Bicarbonat-Puffer	5ml
	FCS	5ml
	Dithiothreitol	1mM 7-8mg
Mit <i>A.dest</i> auf 50ml auffüllen		

EDTA-Lösung	10x HBSS [-] Ca ²⁺ /Mg ²⁺	5ml
	Na ₂ EDTA	1,3mM 24mg
Mit <i>A.dest</i> auf 50ml auffüllen		

Verdau-Lösung	Kollagenase IV	100 U/ml 31mg
	FCS	5ml
	MgCl ₂	0,5M 100µl
	CaCl ₂	0,5M 100µl

Mit RPMI-Nicht-Vollmedium auf 50ml auffüllen

1x Percoll-Lösung	Percoll	9 Teile
	10x PBS	1 Teil

Daraus erfolgt die Herstellung von 44% und 67% Percoll durch Verdünnung mit RPMI-Medium

ANHANG TABELLE 4: GENUTZTE GERÄTE

Produktbezeichnung	Hersteller	Verwendungszweck
Feeding Needle 20G	Fine Science Tools	Schlündelung
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld	Zellzählung
Axiocam 208c color	Carl Zeiss AG	Mikro-Fotoapparat
Axioskop 40	Carl Zeiss AG	Mikroskop
Hyrax M55 Mikrotom	Carl Zeiss AG	Rotationsmikrotom
Cytec Aurora	Cytek® Biosciences	Durchflusszytometer
DS-C Spectrophotometer	DeNovix	OD-Messung
miniMACS Anaerobic Workstation	don whitley scientific	Anaerobier Box
<i>autoMACS® Pro</i>	<i>Miltenyi Biotec</i>	<i>Zellsortierung</i>
Class II Biosafety Cabinets	Nuaire	Sterilbank
IVC-Käfig 2L	Zoonlab	Kleinnager-Käfig
Vent II THF3365	Ehret	Belüftungsanlage Kleintier-käfig

ANHANG TABELLE 5: SOFTWAREPROGRAMME

Produktbezeichnung	Hersteller	Verwendungszweck
FlowJo Version 10.10	FlowJo LLC	Auswertung Durchflusszyto- metrischer Daten
ZEN Version 3.8	Carl Zeiss AG	Anfertigung histologischer Bilder
Mendeley, Version 2.99.0 (2023)	Mendeley Ltd.	Zitierprogramm
GraphPad Prism, Version 8.0.2 (263)	GraphPad Software, Inc	Abbildungen und Statistik
SPSS, Version 29.0.2.0	IBM	Statistik
Microsoft Excel Version 2016	Microsoft Corporation	Datenarchivierung
Microsoft Power Point Version 2016	Microsoft Corporation	Abbildungen
Microsoft Word Version 2016	Microsoft Corporation	Dissertationsschrift

ANHANG TABELLE 6: FÄRBEPROTOKOLL FÜR DIE HE-FÄRBUNG¹

Reaktionsschritt	Reagenz	Inkubationszeit
1. Entparaffinieren	Roti-Histol	10 min
2. Entparaffinieren	Roti-Histol	10min
3. Wässern	Propanolol	5 min
4. Wässern	Propanolol	5 min
5. Wässern	96% EtOH	5 min
6. Wässern	80% EtOH	5 min
7. Wässern	70% EtOH	5 min
8. Wässern	Aquadest	5 min
9. Wässern	Aquadest	5 min
10. Kernfärbung	Hämalaun	70 s (D) / 25 s (P)
11. Bläuen	Fließendes Leitungswasser	25 min
12. Wässern	Aquadest	5 min
13. Plasmafärbung	Eosin	80 s (D) / 60 s (P)
14. Plasmafärbung	Aquadest	3 x Eintauchen
15. Entwässern	70% EtOH + NH ₃	3 x Eintauchen
16. Entwässern	80% EtOH	5 min
17. Entwässern	956% EtOH	5 min
18. Entwässern	Propanolol	5 min
19. Entwässern	Propanolol	5 min
20. Entwässern	Roti-Histol	5 min
21. Entwässern	Roti-Histol	Über Nacht
22. Eindecken	Kanadabalsam	Über Nacht

¹ D = Därme, P = Pfoten

ANHANG TABELLE 7: STATISTISCHE AUSWERTUNG DER ZELLEN DER INGUINALEN LYMPH-KNOTEN²

IL	Gruppe	A	B	C	D	E	F	G	Interaktion	Post-Hoc		
Anteil (%)	Name	Subakute Infektion	Abklingende Infektion	Rekonvaleszenz der Infektion	Nach Primär-immunisierung	Vor Sekundär-immunisierung	Nach Sekundär-immunisierung	CIA-Latenzphase				Einzel-signifikanz
CD45+ / Live	Test	Man-Whitney-U	Man-Whitney-U	Man-Whitney-U	Man-Whitney-U	Man-Whitney-U	Man-Whitney-U	Man-Whitney-U	Kruskal-Wallis	Dunn		
	CD4	p-Wert	1,00	0,73	0,61	0,50	0,71	0,61	0,24	p(CDI)=<0,001	sig.	A&E: p=0,016 A&F: p=0,004
		p-Wert								p(Ktr)=0,007	nicht sig.	B&E: p=0,004
	Th1	p-Wert	0,029	0,40	0,042	0,09	0,57	0,67	0,66	p(CDI)=0,34	nicht sig.	B&F: p=0,001
		p-Wert								p(Ktr)=0,042	nicht sig.	B&G: p=0,031
	Th17	p-Wert	0,45	0,67	0,73	0,73	0,71	0,61	0,61	p(CDI)=0,006	nicht sig.	C&E: p=0,036
		p-Wert								p(Ktr)=0,44	nicht sig.	C&F: p=0,010
	Treg	p-Wert	0,71	0,61	0,80	0,50	0,26	0,73	0,38	p(CDI)=0,005	sig.	A&F: p=0,035
		p-Wert								p(Ktr)=0,005	sig.	B&F: p=0,035
	Th2	p-Wert	0,35	0,40	0,87	0,50	0,26	1,00	0,56	p(CDI)=0,004	sig.	B&F: p=0,039
		p-Wert								p(Ktr)=0,09	nicht sig.	B&F: p=0,002
	Th2 ST2+	p-Wert	0,85	0,61	0,50	1,00	0,85	0,80	0,31	p(CDI)=0,040	nicht sig.	B&G: p=0,010
		p-Wert								p(Ktr)=0,46	nicht sig.	
	Th2 ST2-	p-Wert	0,26	0,40	0,87	0,39	0,19	0,87	0,56	p(CDI)=0,003	sig.	B&F: p=0,002
		p-Wert								p(Ktr)=0,09	nicht sig.	B&G: p=0,009
	ILC	p-Wert	0,93	0,13	0,027	0,67	0,45	0,007	0,24	p(CDI)=0,31	nicht sig.	
	p-Wert								p(Ktr)=0,030	sig.	C&F: p=0,027	

ANHANG TABELLE 8: STATISTISCHE AUSWERTUNG DER ZELLEN DER MESENTERIALEN LYMPHKNOTEN²

ML	Gruppe	A	B	C	D	E	F	G	Interaktion	Post-Hoc	
Anteil (%)	Name	Subakute Infektion	Abklingende Infektion	Rekonvaleszenz der Infektion	Nach Primär-immunisierung	Vor Sekundär-immunisierung	Nach Sekundär-immunisierung	CIA-Latenzphase			
CD45+ / Live	Test	Man-Whitney-U	Man-Whitney-U	Man-Whitney-U	Man-Whitney-U	Man-Whitney-U	Man-Whitney-U	Man-Whitney-U	Kruskal-Wallis	Dunn	
	CD4	p-Wert	0,85	1	0,06	0,73	0,87	0,13	0,77	p(CDI)=0,25	nicht sig.
		p-Wert								p(Ktr)=0,09	nicht sig.
	Th1	p-Wert	0,45	0,54	0,87	0,50	0,40	0,13	0,14	p(CDI)=0,27	nicht sig.
		p-Wert								p(Ktr)=0,14	nicht sig.
	Th17	p-Wert	0,71	0,68	0,73	1,00	0,40	0,06	0,31	p(CDI)=0,09	nicht sig.
		p-Wert								p(Ktr)=0,81	nicht sig.
	Treg	p-Wert	0,78	1,00	0,13	0,17	0,50	0,40	0,46	p(CDI)=0,20	nicht sig.
		p-Wert								p(Ktr)=0,052	nicht sig.
	Th2	p-Wert	0,26	0,54	0,017	0,87	1,00	0,67	0,34	p(CDI)=0,15	nicht sig.
		p-Wert								p(Ktr)=0,86	nicht sig.
	Th2 ST2+	p-Wert	1,00	0,22	1,00	0,40	0,73	0,06	0,77	p(CDI)=0,78	nicht sig.
		p-Wert								p(Ktr)=0,19	nicht sig.
	Th2 ST2-	p-Wert	0,26	0,68	0,017	1,00	0,93	0,73	0,19	p(CDI)=0,10	nicht sig.
		p-Wert								p(Ktr)=0,81	nicht sig.
	ILC	p-Wert	0,014	0,04	0,73	1,00	0,61	0,93	0,88	p(CDI)=0,10	nicht sig.
	p-Wert								p(Ktr)=0,48	nicht sig.	

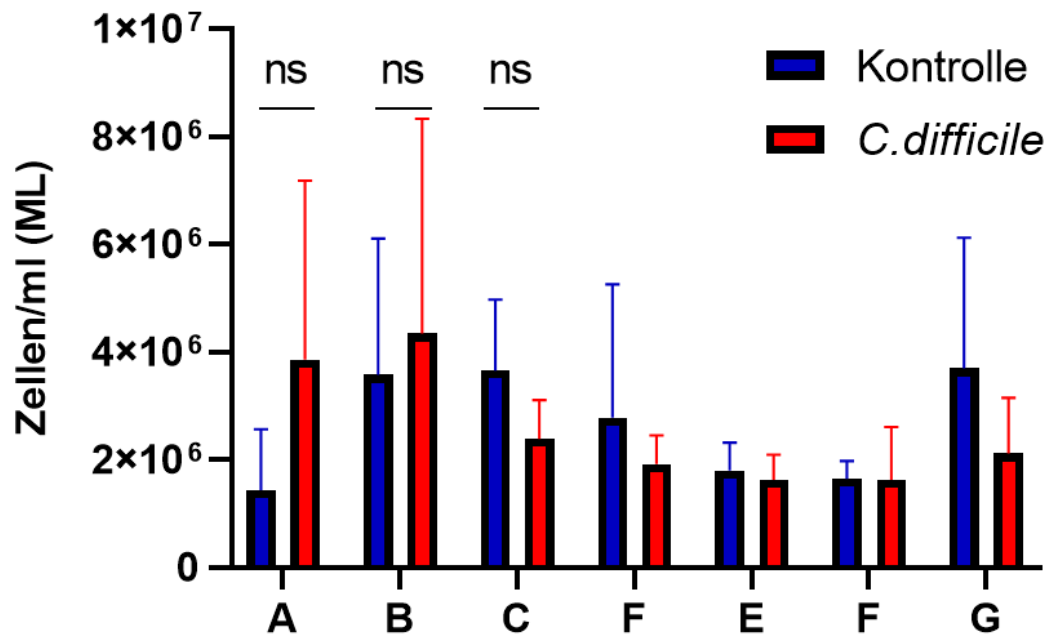
ANHANG TABELLE 9: STATISTISCHE AUSWERTUNG DER ZELLEN DER DARMMUKOSA^{2,3}

Darm	Gruppe	A	B	C	D	E	F	G	Interaktion	Post-Hoc		
Anteil (%)	Name	Subakute Infektion	Abklingende Infektion	Rekonvaleszenz der Infektion	Nach Primär-immunisierung	Vor Sekundär-immunisierung	Nach Sekundär-immunisierung	CIA-Latenzphase				
CD45+ / Live	Test	Man-Whitney-U	Man-Whitney-U	Man-Whitney-U	Man-Whitney-U	Man-Whitney-U	Man-Whitney-U	Man-Whitney-U	Kruskal-Wallis	Dunn		
	CD4	p-Wert	0,257	0,042	0,062	0,027	0,126	0,089	0,464	p(CDI)=0,003	sig.	A&C: p=0,016 C&D: p=0,048
		p-Wert								p(Ktr)=0,048	nicht sig.	
	Th1	p-Wert	0,776	0,074	0,027	0,396	0,396	0,349	0,661	p(CDI)=0,048	nicht sig.	
		p-Wert								p(Ktr)=0,61	nicht sig.	C&D: p=0,024
	Th17	p-Wert	0,705	0,349	0,007	0,734	0,671	0,027	0,608	p(CDI)=0,010	sig.	C&F: p=0,015 C&G: p=0,025
		p-Wert								p(Ktr)=0,13	nicht sig.	
	Treg	p-Wert	0,218	0,308	0,269	0,734	0,865	0,007	0,38	p(CDI)=0,06	nicht sig.	
		p-Wert								p(Ktr)=0,020	sig.	F&G: p=0,018
	Th2	p-Wert	0,155	0,017	0,396	0,495	0,106	0,495	0,509	p(CDI)=0,06	sig.	B&C: p=0,037
		p-Wert								p(Ktr)=0,89	nicht sig.	
	Th2 ST2+	p-Wert	0,448	0,234	0,062	0,671	0,396	0,174	0,241	p(CDI)=0,16	nicht sig.	
		p-Wert								p(Ktr)=0,30	nicht sig.	
	Th2 ST2-	p-Wert	0,155	0,017	0,396	0,444	0,308	0,55	0,304	p(CDI)=0,051	nicht sig.	
		p-Wert								p(Ktr)=0,66	nicht sig.	A&F: p=0,012
	ILC	p-Wert	0,45	0,062	0,174	1	0,61	0,395	0,306	p(CDI)=0,002	sig.	B&F: p=0,025
	p-Wert								p(Ktr)=0,44	nicht sig.		

² In Spalte A-G ist der Vergleich C. difficile – Kontrollgruppe (p-Wert) dargestellt

³ Bei Th2 in der C. difficile Gruppe zeigte der Post-Hoc-Test nach Dunn eine Signifikanz auf, obwohl im Kruskal-Wallis-Test p>0,05 war

6.2 ABBILDUNGEN



Anhang Abbildung 1: Nicht-infizierte Tiere wiesen insignifikant weniger Zellen in den mesenterialen Lymphknoten in den Gruppen A und B auf. Es ist die Anzahl der aus den mesenterialen Lymphknoten gewonnenen Zellen pro ml im Unterschied zwischen den Tieren der *C. difficile* Gruppe und der Kontrollgruppe dargestellt. In Gruppe A und B wiesen die Lymphknoten der infizierten Tiere ($n_A=7$, $n_B=8$) insignifikant mehr Zellen als die Lymphknoten der sham-infizierten Tiere ($n=4$) auf, $p_A=0,257$, $p_B=0,865$, $p_C=0,089$, gruppiertes Balkendiagramm mit Standardabweichungen, Man-Whitney-U-Test. Auf Abszisse Auftragung der Versuchsgruppen: Subakute Infektion (A), Abklingende Infektion (B), Rekonvaleszenz der Infektion (C), Nach Primärimmunisierung (D), Vor Sekundärimmunisierung (E), Nach Sekundärimmunisierung (F), CIA-Latenzphase (G).

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Abdullah, S.-N., Farmer, E.-A., Spargo, L., Logan, R., & Gully, N. (2013). Porphyromonas gingivalis peptidylarginine deiminase substrate specificity. *Anaerobe*, 23, 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.07.001>
- Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A. J., Funovits, J., Felson, D. T., Bingham, C. O., Birnbaum, N. S., Burmester, G. R., Bykerk, V. P., Cohen, M. D., Combe, B., Costenbader, K. H., Dougados, M., Emery, P., Ferraccioli, G., Hazes, J. M. W., Hobbs, K., Huizinga, T. W. J., Kavanaugh, A., ... Hawker, G. (2010). 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. In *Arthritis and Rheumatism* (Vol. 62, Issue 9). <https://doi.org/10.1002/art.27584>
- Anderson, J. K., Zimmerman, L., Caplan, L., & Michaud, K. (2011). Measures of Rheumatoid Arthritis Disease Activity. *Arthritis Care & Research*, 63(S11). <https://doi.org/10.1002/acr.20621>
- Barron, M. R., Sovacool, K. L., Abernathy-Close, L., Vendrov, K. C., Standke, A. K., Bergin, I. L., Schloss, P. D., & Young, V. B. (2022). Intestinal Inflammation Reversibly Alters the Microbiota to Drive Susceptibility to Clostridioides difficile Colonization in a Mouse Model of Colitis. *MBio*, 13(4). <https://doi.org/10.1128/mbio.01904-22>
- Bauer, M. P., Notermans, D. W., Van Benthem, B. H., Brazier, J. S., Wilcox, M. H., Rupnik, M., Monnet, D. L., Van Dissel, J. T., & Kuijper, E. J. (2011). Clostridium difficile infection in Europe: A hospital-based survey. *The Lancet*, 377(9759). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61266-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61266-4)
- Bedoya, S. K., Lam, B., Lau, K., & Larkin, J. (2013). Th17 Cells in Immunity and Autoimmunity. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2013/986789>
- Boers, M. (2003). Understanding the window of opportunity concept in early rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 48(7), 1771–1774. <https://doi.org/10.1002/art.11156>
- Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S33–S40. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>
- Brand, D. D., Kang, A. H., & Rosloniec, E. F. (2003). Immunopathogenesis of Collagen Arthritis. *Springer Seminars in Immunopathology*, 25(1), 3–18. <https://doi.org/10.1007/s00281-003-0127-1>
- Brand, D. D., Latham, K. A., & Rosloniec, E. F. (2007). Collagen-induced arthritis. *Nature Protocols*, 2(5), 1269–1275. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.173>
- Calise, J., Garabatos, N., Bajzik, V., Farrington, M., Robinson, D., Jeong, D., Londei, M., & Wambre, E. (2021). Optimal human pathogenic TH2 cell effector function requires local
-

- epithelial cytokine signaling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 148(3), 867-875.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.02.019>
- Castro-Córdova, P., Díaz-Yáñez, F., Muñoz-Mirallas, J., Gil, F., & Paredes-Sabja, D. (2020). Effect of antibiotic to induce *Clostridioides difficile*-susceptibility and infectious strain in a mouse model of *Clostridioides difficile* infection and recurrence. *Anaerobe*, 62, 102149. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102149>
- Cayrol, C., & Girard, J. P. (2018). Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. In *Immunological Reviews* (Vol. 281, Issue 1, pp. 154–168). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/imr.12619>
- Cayrol, C., & Girard, J. P. (2022). Interleukin-33 (IL-33): A critical review of its biology and the mechanisms involved in its release as a potent extracellular cytokine. *Cytokine*, 156. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2022.155891>
- Chalmers, J. D., Akram, A. R., Singanayagam, A., Wilcox, M. H., & Hill, A. T. (2016). Risk factors for *Clostridium difficile* infection in hospitalized patients with community-acquired pneumonia. *Journal of Infection*, 73(1). <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2016.04.008>
- Chasov, V., Ganeeva, I., Zmievskaia, E., Davletshin, D., Gilyazova, E., Valiullina, A., & Bulatov, E. (2024). Cell-Based Therapy and Genome Editing as Emerging Therapeutic Approaches to Treat Rheumatoid Arthritis. In *Cells* (Vol. 13, Issue 15). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cells13151282>
- Chegade, L., Jaafar, Z. A., El Masri, D., Zmerly, H., Kreidieh, D., Tannir, H., Itani, L., & El Ghoch, M. (2019). Lifestyle Modification in Rheumatoid Arthritis: Dietary and Physical Activity Recommendations Based on Evidence. *Current Rheumatology Reviews*, 15(3), 209–214. <https://doi.org/10.2174/1573397115666190121135940>
- Cooper, M. D., & Alder, M. N. (2006). The Evolution of Adaptive Immune Systems. *Cell*, 124(4), 815–822. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.001>
- Crowson, C. S., Matteson, E. L., Myasoedova, E., Michet, C. J., Ernste, F. C., Warrington, K. J., Davis, J. M., Hunder, G. G., Therneau, T. M., & Gabriel, S. E. (2011). The lifetime risk of adult-onset rheumatoid arthritis and other inflammatory autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis and Rheumatism*, 63(3), 633–639. <https://doi.org/10.1002/art.30155>
- Cush, J. J. (2007). *Early Rheumatoid Arthritis-Is There a Window of Opportunity?*
- de Sire, A., de Sire, R., Petito, V., Masi, L., Cisari, C., Gasbarrini, A., Scaldaferrri, F., & Invernizzi, M. (2020). Gut–Joint Axis: The Role of Physical Exercise on Gut Microbiota Modulation in Older People with Osteoarthritis. *Nutrients*, 12(2), 574. <https://doi.org/10.3390/nu12020574>
- Demoruelle, M. K., & Deane, K. D. (2012). Treatment strategies in early rheumatoid arthritis and prevention of rheumatoid arthritis. *Current Rheumatology Reports*, 14(5), 472–480. <https://doi.org/10.1007/s11926-012-0275-1>
-

- Di Bella, S., Ascenzi, P., Siarakas, S., Petrosillo, N., & di Masi, A. (2016). Clostridium difficile toxins A and B: Insights into pathogenic properties and extraintestinal effects. In *Toxins* (Vol. 8, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/toxins8050134>
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., & Relman, D. A. (2005). Microbiology: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, *308*(5728). <https://doi.org/10.1126/science.11110591>
- Figus, F. A., Piga, M., Azzolin, I., McConnell, R., & Iagnocco, A. (2021). Rheumatoid arthritis: Extra-articular manifestations and comorbidities. In *Autoimmunity Reviews* (Vol. 20, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2021.102776>
- Finckh, A., Gilbert, B., Hodkinson, B., Bae, S. C., Thomas, R., Deane, K. D., Alpizar-Rodriguez, D., & Lauper, K. (2022). Global epidemiology of rheumatoid arthritis. In *Nature Reviews Rheumatology* (Vol. 18, Issue 10). <https://doi.org/10.1038/s41584-022-00827-y>
- Fletcher, J. M., Lonergan, R., Costelloe, L., Kinsella, K., Moran, B., O'Farrelly, C., Tubridy, N., & Mills, K. H. G. (2009). CD39+Foxp3+ Regulatory T Cells Suppress Pathogenic Th17 Cells and Are Impaired in Multiple Sclerosis. *The Journal of Immunology*, *183*(11), 7602–7610. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901881>
- Fujimoto, K., & Uematsu, S. (2022). Phage therapy for Clostridioides difficile infection. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1057892>
- Gateau, C., Couturier, J., Coia, J., & Barbut, F. (2018). How to: diagnose infection caused by Clostridium difficile. In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 24, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.12.005>
- George, R. H., Symonds, J. M., Dimock, F., Brown, J. D., Arabi, Y., Shinagawa, N., Keighley, M. R., Alexander-Williams, J., & Burdon, D. W. (1978). Identification of Clostridium difficile as a cause of pseudomembranous colitis. *British Medical Journal*, *1*(6114).
- Goetzl, E. J. (2024). Th2 cells in rapid immune responses and protective avoidance reactions. *The FASEB Journal*, *38*(4). <https://doi.org/10.1096/fj.202302584RR>
- Gracey, E., Vereecke, L., McGovern, D., Fröhling, M., Schett, G., Danese, S., De Vos, M., Van den Bosch, F., & Elewaut, D. (2020). Revisiting the gut–joint axis: links between gut inflammation and spondyloarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, *16*(8), 415–433. <https://doi.org/10.1038/s41584-020-0454-9>
- 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. *Arthritis & Rheumatism*, *30*(11), 1205–1213. <https://doi.org/10.1002/art.1780301102>
- Haddad, N. S., Nozick, S., Kim, G., Ohanian, S., Kraft, C., Rebolledo, P. A., Wang, Y., Wu, H., Bressler, A., Le, S. N. T., Kuruvilla, M., Cannon, L. E., Lee, F. E.-H., & Daiss, J. L. (2021).
-

- Novel immunoassay for diagnosis of ongoing *Clostridioides difficile* infections using serum and medium enriched for newly synthesized antibodies (MENSA). *Journal of Immunological Methods*, 492, 112932. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2020.112932>
- HALL, I. C., & O'TOOLE, E. (1935). INTESTINAL FLORA IN NEW-BORN INFANTS WITH A DESCRIPTION OF A NEW PATHOGENIC ANAEROBE, BACILLUS DIFFICILIS. *Medicine, Biology*.
- Han, G. M., O'Neil-Andersen, N. J., Zurier, R. B., & Lawrence, D. A. (2008). CD4+CD25high T cell numbers are enriched in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Cellular Immunology*, 253(1–2), 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2008.05.007>
- Hang, L., Theofilopoulos, A. N., & Dixon, F. J. (1982). A spontaneous rheumatoid arthritis-like disease in MRL/l mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 155(6), 1690–1701. <https://doi.org/10.1084/jem.155.6.1690>
- Hazenberg, M. D., & Spits, H. (2014). Human innate lymphoid cells. In *Blood* (Vol. 124, Issue 5, pp. 700–709). American Society of Hematology. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-11-427781>
- Holling, T. M., Schooten, E., & van Den Elsen, P. J. (2004). Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: of mice and men. *Human Immunology*, 65(4), 282–290. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2004.01.005>
- HOLMDAHL, R., ANDERSSON, M. E., GOLDSCHMIDT, T. J., JANSSON, L., KARLSSON, M., MALMSTROM, V., & MO, J. (1989). Collagen induced arthritis as an experimental model for rheumatoid arthritis. *APMIS*, 97(7–12), 575–584. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1989.tb00446.x>
- Holmdahl, R., Jansson, L., Andersson, M., & Jonsson, R. (1992). Genetic, hormonal and behavioural influence on spontaneously developing arthritis in normal mice. In *Clin. exp. Immunol* (Vol. 88).
- Holmdahl, R., Jansson, L., Gullberg, D., & Rubin, K. (1985). Incidence of arthritis and auto-reactivity of anti-collagen antibodies after immunization of DBA/1 mice with heterologous and autologous collagen II. In *Clin. exp. Immunol* (Vol. 62).
- Holmdahl, R., Jansson, L., Larsson, E., Rubin, K., & Klareskog, L. (1986). Homologous type II collagen induces chronic and progressive arthritis in mice. *Arthritis & Rheumatism*, 29(1), 106–113. <https://doi.org/10.1002/art.1780290114>
- Howell, M. D., Novack, V., Grgurich, P., Soulliard, D., Novack, L., Pencina, M., & Talmor, D. (2010). Iatrogenic gastric acid suppression and the risk of nosocomial *Clostridium difficile* infection. *Archives of Internal Medicine*, 170(9). <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2010.89>
-

- Howerton, A., Ramirez, N., & Abel-Santos, E. (2011). Mapping interactions between germinants and *Clostridium difficile* spores. *Journal of Bacteriology*, 193(1). <https://doi.org/10.1128/JB.00980-10>
- Hung, Y. P., Lee, J. C., Tsai, B. Y., Wu, J. L., Liu, H. C., Liu, H. C., Lin, H. J., Tsai, P. J., & Ko, W. C. (2021). Risk factors of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in hospitalized adults: Vary by hospitalized duration. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 54(2), 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2019.07.004>
- Ingegnoli, F., Castelli, R., & Gualtierotti, R. (2013). Rheumatoid factors: Clinical applications. In *Disease Markers* (Vol. 35, Issue 6, pp. 727–734). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2013/726598>
- Issa, M., Vijayapal, A., Graham, M. B., Beaulieu, D. B., Otterson, M. F., Lundeen, S., Skaros, S., Weber, L. R., Komorowski, R. A., Knox, J. F., Emmons, J., Bajaj, J. S., & Binion, D. G. (2007). Impact of *Clostridium difficile* on Inflammatory Bowel Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 5(3). <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2006.12.028>
- J. S. Courtenay, M. J. D. A. D. D. A. M. & B. M. (1980). *Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice*.
- Jarchum, I., Liu, M., Shi, C., Equinda, M., & Pamer, E. G. (2012). Critical role for myd88-Mediated Neutrophil recruitment during *Clostridium difficile* colitis. *Infection and Immunity*, 80(9), 2989–2996. <https://doi.org/10.1128/IAI.00448-12>
- Jeyaraman, M., Ram, P. R., Jeyaraman, N., & Yadav, S. (2023). The Gut-Joint Axis in Osteoarthritis. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.48951>
- Jiang, Q., Yang, G., Liu, Q., Wang, S., & Cui, D. (2021). Function and Role of Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.626193>
- Johnson, S., Lavergne, V., Skinner, A. M., Gonzales-Luna, A. J., Garey, K. W., Kelly, C. P., & Wilcox, M. H. (2021). Clinical Practice Guideline by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA): 2021 Focused Update Guidelines on Management of *Clostridioides difficile* Infection in Adults. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 73(5). <https://doi.org/10.1093/cid/ciab549>
- Jubber, A., & Moorthy, A. (2021). Reactive Arthritis: A Clinical Review. *Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*, 51(3), 288–297. <https://doi.org/10.4997/jrcpe.2021.319>
- Just, I., & Gerhard, R. (2004). Large clostridial cytotoxins. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 152. <https://doi.org/10.1007/s10254-004-0033-5>
- KAWASHIRI, S.-Y., KAWAKAMI, A., OKADA, A., KOGA, T., TAMAI, M., YAMASAKI, S., NAKAMURA, H., ORIGUCHI, T., IDA, H., & EGUCHI, K. (2011). CD4+CD25^{high} CD127
-

- ^{low/} Treg Cell Frequency from Peripheral Blood Correlates with Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Rheumatology*, 38(12), 2517–2521. <https://doi.org/10.3899/jrheum.110283>
- Kay, J., & Upchurch, K. S. (2012). ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis classification criteria. *Rheumatology*, 51(suppl 6), vi5–vi9. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kes279>
- Koch, M. A., Thomas, K. R., Perdue, N. R., Smigiel, K. S., Srivastava, S., & Campbell, D. J. (2012). T-bet+ Treg Cells Undergo Abortive Th1 Cell Differentiation due to Impaired Expression of IL-12 Receptor β 2. *Immunity*, 37(3), 501–510. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.05.031>
- Koenigsnecht, M. J., Theriot, C. M., Bergin, I. L., Schumacher, C. A., Schloss, P. D., & Young, V. B. (2015). Dynamics and establishment of *Clostridium difficile* infection in the murine gastrointestinal tract. *Infection and Immunity*, 83(3). <https://doi.org/10.1128/IAI.02768-14>
- Komatsu, N., Okamoto, K., Sawa, S., Nakashima, T., Oh-hora, M., Kodama, T., Tanaka, S., Bluestone, J. A., & Takayanagi, H. (2014). Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. *Nature Medicine*, 20(1), 62–68. <https://doi.org/10.1038/nm.3432>
- Kuehne, S. A., Cartman, S. T., Heap, J. T., Kelly, M. L., Cockayne, A., & Minton, N. P. (2010). The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. *Nature*, 467(7316). <https://doi.org/10.1038/nature09397>
- Lin, Y. J., Anzaghe, M., & Schülke, S. (2020). Update on the Pathomechanism, Diagnosis, and Treatment Options for Rheumatoid Arthritis. In *Cells* (Vol. 9, Issue 4). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9040880>
- Lisse, J. R. (1993). Does rheumatoid factor always mean arthritis? *Postgraduate Medicine*, 94(6), 133–139. <https://doi.org/10.1080/00325481.1993.11945749>
- Liu, M. -F., Wang, C. -R., Fung, L. -L., Lin, L. -H., & Tsai, C. -N. (2005). The Presence of Cytokine-Suppressive CD4 + CD25 + T Cells in the Peripheral Blood and Synovial Fluid of Patients with Rheumatoid Arthritis. *Scandinavian Journal of Immunology*, 62(3), 312–317. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2005.01656.x>
- Llopis, E., Kroon, H. M., Acosta, J., & Bloem, J. L. (2017). Conventional Radiology in Rheumatoid Arthritis. *Radiologic Clinics of North America*, 55(5), 917–941. <https://doi.org/10.1016/j.rcl.2017.04.002>
- Lübbert, C., John, E., & von Müller, L. (2014). *Clostridium difficile* infection: guideline-based diagnosis and treatment. In *Deutsches Ärzteblatt international* (Vol. 111, Issue 43). <https://doi.org/10.3238/arztebl.2014.0723>
- Lübcke, P. M., Ebbers, M. N. B., Volzke, J., Bull, J., Kneitz, S., Engelmann, R., Lang, H., Kreikemeyer, B., & Müller-Hilke, B. (2019). Periodontal treatment prevents arthritis in mice
-

- and methotrexate ameliorates periodontal bone loss. *Scientific Reports*, 9(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-44512-9>
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). CD4⁺ T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 1–12.
<https://doi.org/10.1155/2012/925135>
- Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *The Journal of Immunology*, 164(12), 6166–6173.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>
- Moolenbeek, C., & Ruitenbergh, E. J. (1981). The “Swiss roll”: A simple technique for histological studies of the rodent intestine. *Laboratory Animals*, 15(1).
<https://doi.org/10.1258/002367781780958577>
- Morinobu, A., & Kumagai, S. (1998). Cytokine measurement at a single-cell level to analyze human Th1 and Th2 cells. *Rinsho Byori*.
- Morvan, C., Folgosa, F., Kint, N., Teixeira, M., & Martin-Verstraete, I. (2021). Responses of Clostridia to oxygen: from detoxification to adaptive strategies. *Environmental Microbiology*, 23(8), 4112–4125. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15665>
- Mounsey, A., Smith, K. L., Reddy, V. C., & Nickolich, S. (2020). Clostridioides difficile Infection: Update on Management. *Am Fam Physician*.
- Neumann, J. (2008). *Immunbiologie: Eine Einführung*. Springer-Verlag Heidelberg.
- Ngo, S. T., Steyn, F. J., & McCombe, P. A. (2014). Gender differences in autoimmune disease. In *Frontiers in Neuroendocrinology* (Vol. 35, Issue 3, pp. 347–369). Academic Press Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.04.004>
- Ofosu, A. (2016). Clostridium difficile infection: A review of current and emerging therapies. In *Annals of Gastroenterology* (Vol. 29, Issue 2). <https://doi.org/10.20524/aog.2016.0006>
- Pandey, A., Rizvi, M., Shah, B. A., & Bani, S. (2016). Anti-arthritis effect of Saponin-1 by alteration of Th1/Th2 cytokine paradigm in arthritic mice. *Cytokine*, 79, 103–113.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.01.004>
- Pépin, J., Valiquette, L., & Cossette, B. (2005). Mortality attributable to nosocomial Clostridium difficile-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. *CMAJ. Canadian Medical Association Journal*, 173(9).
<https://doi.org/10.1503/cmaj.050978>
- Qiu, Z., & Sheridan, B. S. (2018). Isolating Lymphocytes from the Mouse Small Intestinal Immune System. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(132).
<https://doi.org/10.3791/57281>
- Raouia, F., Mariem, B. J., Nesrine, E., Meriam, M., Mohany, M., Emna, B., Sellami, K., Sawsan, F., Milošević, M., Hamida, T., Hatem, M., & Olfa, A. (2024). CD4⁺ T-cell Subsets and Cytokine Signature in Pemphigus Foliaceus Clinical Stratification beyond the th1/Th2
-

- Paradigm. *Current Molecular Medicine*, 24.
<https://doi.org/10.2174/0115665240305096240611064617>
- Reeves, A. E., Theriot, C. M., Bergin, I. L., Huffnagle, G. B., Schloss, P. D., & Young, V. B. (2011). The interplay between microbiome dynamics and pathogen dynamics in a murine model of *Clostridium difficile* infection. *Gut Microbes*, 2(3), 145–158. <https://doi.org/10.4161/gmic.2.3.16333>
- Rodríguez-Palmero, M., Pelegrí, C., Ferri, M. J., Castell, M., Franch, À., & Castellote, C. (1999). Alterations of lymphocyte populations in lymph nodes but not in spleen during the latency period of adjuvant arthritis. *Inflammation*, 23(2), 153–165. <https://doi.org/10.1023/A:1020293012793>
- Rogozynski, N. P., & Dixon, B. (2024). The Th1/Th2 paradigm: A misrepresentation of helper T cell plasticity. In *Immunology Letters* (Vol. 268). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2024.106870>
- Romero-Figueroa, M. del S., Ramírez-Durán, N., Montiel-Jarquín, A. J., & Horta-Baas, G. (2023). Gut-joint axis: Gut dysbiosis can contribute to the onset of rheumatoid arthritis via multiple pathways. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1092118>
- Rooney, C. M., Mankia, K., & Emery, P. (2020). The Role of the Microbiome in Driving RA-Related Autoimmunity. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.538130>
- Rosenstein, E. D., Greenwald, R. A., Kushner, L. J., & Weissmann, G. (2004). Hypothesis: The Humoral Immune Response to Oral Bacteria Provides a Stimulus for the Development of Rheumatoid Arthritis. *Inflammation*, 28(6), 311–318. <https://doi.org/10.1007/s10753-004-6641-z>
- Rupawala, A. H., Gachette, D., Bakhit, M., Jimoh, L., & Kelly, C. R. (2021). Management of Severe and Severe/Complicated *Clostridoides difficile* Infection Using Sequential Fecal Microbiota Transplant by Retention Enema. *Clinical Infectious Diseases*, 73(4). <https://doi.org/10.1093/cid/ciab041>
- Ryu, S., Lim, M. Y., Kim, J., & Kim, H. Y. (2023). Versatile roles of innate lymphoid cells at the mucosal barrier: from homeostasis to pathological inflammation. In *Experimental and Molecular Medicine* (Vol. 55, Issue 9, pp. 1845–1857). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01022-z>
- Sakaguchi, N., Takahashi, T., Hata, H., Nomura, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Sakihama, T., Matsutani, T., Negishi, I., Nakatsuru, S., & Sakaguchi, S. (2003). Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature*, 426(6965), 454–460. <https://doi.org/10.1038/nature02119>
-

- Samson, M., Audia, S., Janikashvili, N., Ciudad, M., Trad, M., Fraszczak, J., Ornetti, P., Maillefert, J., Miossec, P., & Bonnotte, B. (2012). Brief Report: Inhibition of interleukin-6 function corrects Th17/Treg cell imbalance in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, *64*(8), 2499–2503. <https://doi.org/10.1002/art.34477>
- Schellekens, G. A., Visser, H., De Jong, B. A. W., Van Den Hoogen, F. H. J., Hazes, J. M. W., Breedveld, F. C., & Van Venrooij, W. J. (2000). The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis & Rheumatism*, *43*(1), 155–163. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200001\)43:1<155::AID-ANR20>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200001)43:1<155::AID-ANR20>3.0.CO;2-3)
- Schmidt, C. J., Wenndorf, K., Ebbers, M., Volzke, J., Müller, M., Strübing, J., Kriebel, K., Kneitz, S., Kreikemeyer, B., & Müller-Hilke, B. (2020). Infection With *Clostridioides difficile* Attenuated Collagen-Induced Arthritis in Mice and Involved Mesenteric Treg and Th2 Polarization. *Frontiers in Immunology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.571049>
- Schurgers, E., Billiau, A., & Matthys, P. (2011). Collagen-Induced Arthritis as an Animal Model for Rheumatoid Arthritis: Focus on Interferon- γ . *Journal of Interferon & Cytokine Research*, *31*(12), 917–926. <https://doi.org/10.1089/jir.2011.0056>
- Shresta, S., Pham, C. T., Thomas, D. A., Graubert, T. A., & Ley, T. J. (1998). How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Current Opinion in Immunology*, *10*(5), 581–587. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(98\)80227-6](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(98)80227-6)
- Siegel, P., Tencza, M., Apodaca, B., & Poole, J. L. (2017). Effectiveness of Occupational Therapy Interventions for Adults With Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review. *The American Journal of Occupational Therapy*, *71*(1), 7101180050p1-7101180050p11. <https://doi.org/10.5014/ajot.2017.023176>
- Silman. (1989). *Rheumatoid arthritis and infection: a population approach*.
- Silman, A. J., & Pearson, J. E. (2002). Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research*, *4*(Suppl 3), S265. <https://doi.org/10.1186/ar578>
- Singh, J. A. (2022). Treatment Guidelines in Rheumatoid Arthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, *48*(3), 679–689. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2022.03.005>
- Sparks, J. A., Chen, C. Y., Hiraki, L. T., Malspeis, S., Costenbader, K. H., & Karlson, E. W. (2014). Contributions of familial rheumatoid arthritis or lupus and environmental factors to risk of rheumatoid arthritis in women: A prospective cohort study. *Arthritis Care and Research*, *66*(10). <https://doi.org/10.1002/acr.22366>
- Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J. P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R. M., McKenzie, A. N. J., Mebius, R. E., Powrie, F., & Vivier, E. (2013). Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nature Reviews Immunology*, *13*(2), 145–149. <https://doi.org/10.1038/nri3365>
-

- Tan, Y. K., & Conaghan, P. G. (2011). Imaging in rheumatoid arthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 25(4), 569–584. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2011.10.002>
- Tang, K. T., Lin, C. C., Lin, S. C., Wang, J. H., & Tsai, S. W. (2021). Kurarinone attenuates collagen-induced arthritis in mice by inhibiting th1/th17 cell responses and oxidative stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8). <https://doi.org/10.3390/ijms22084002>
- Theriot, C. M., Koenigsnecht, M. J., Carlson, P. E., Hatton, G. E., Nelson, A. M., Li, B., Huffnagle, G. B., Li, J. Z., & Young, V. B. (2014). Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to *Clostridium difficile* infection. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms4114>
- Tilstra, J. S., & Lienesch, D. W. (2015). Rheumatoid Nodules. In *Dermatologic Clinics* (Vol. 33, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.det.2015.03.004>
- Trentham, D. E., Townes, A. S., & Kang, A. H. (1978a). AUTOIMMUNITY TO TYPE II COLLAGEN: AN EXPERIMENTAL MODEL OF ARTHRITIS*. In *THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE* • (Vol. 146).
- Trentham, D. E., Townes, A. S., & Kang, A. H. (1978b). AUTOIMMUNITY TO TYPE II COLLAGEN: AN EXPERIMENTAL MODEL OF ARTHRITIS*. In *THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE* • (Vol. 146).
- van Amelsfort, J. M. R., Jacobs, K. M. G., Bijlsma, J. W. J., Lafeber, F. P. J. G., & Taams, L. S. (2004). CD4+CD25+ regulatory T cells in rheumatoid arthritis: Differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis & Rheumatism*, 50(9), 2775–2785. <https://doi.org/10.1002/art.20499>
- van Prehn, J., Reigadas, E., Vogelzang, E. H., Bouza, E., Hristea, A., Guery, B., Krutova, M., Norén, T., Allerberger, F., Coia, J. E., Goorhuis, A., van Rossen, T. M., Ooijevaar, R. E., Burns, K., Scharvik Olesen, B. R., Tschudin-Sutter, S., Wilcox, M. H., Vehreschild, M. J. G. T., Fitzpatrick, F., & Kuijper, E. J. (2021). European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: 2021 update on the treatment guidance document for *Clostridioides difficile* infection in adults. In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 27). <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.09.038>
- Van Riel, P. L. C. M., & Renskers, L. (2016). The Disease Activity Score (DAS) and the Disease Activity Score using 28 joint counts (DAS28) in the management of rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*.
- Vita, A. A., Aljobaily, H., Lyons, D. O., & Pullen, N. A. (2021). Berberine delays onset of collagen-induced arthritis through T cell suppression. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7). <https://doi.org/10.3390/ijms22073522>
- von Eichel-Streiber, C. (1993). *Molecular Biology of the Clostridium difficile Toxins*. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-7087-5_19
-

- Walsh, L., Lavelle, A., O'Connor, P. M., Hill, C., & Ross, R. P. (2024). Comparison of fidaxomicin, thuricin CD, vancomycin and nisin highlights the narrow spectrum nature of thuricin CD. *Gut Microbes*, 16(1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2342583>
- Wang, S., & Wang, Y. (2013). Peptidylarginine deiminases in citrullination, gene regulation, health and pathogenesis. In *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* (Vol. 1829, Issue 10). <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.07.003>
- Wegner, N., Wait, R., Sroka, A., Eick, S., Nguyen, K. A., Lundberg, K., Kinloch, A., Culshaw, S., Potempa, J., & Venables, P. J. (2010). Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and α -enolase: Implications for autoimmunity in rheumatoid Arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 62(9), 2662–2672. <https://doi.org/10.1002/art.27552>
- Wilcox, M. H., Gerding, D. N., Poxton, I. R., Kelly, C., Nathan, R., Birch, T., Cornely, O. A., Rahav, G., Bouza, E., Lee, C., Jenkin, G., Jensen, W., Kim, Y.-S., Yoshida, J., Gabryelski, L., Pedley, A., Eves, K., Tipping, R., Guris, D., ... Dorr, M.-B. (2017). Bezlotoxumab for Prevention of Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *N Engl J Med*.
- Wooley, P. H., Dillon, A. M., & Luthra, H. S. (1983). *Genetic control of type II collagen induced arthritis in mice. Factors influencing disease susceptibility and evidence for multiple MHC-associated gene control.*
- Wooley, P. H., Luthra, H. S., Stuart, J. M., & David, C. S. (1981). *TYPE II COLLAGEN-INDUCED ARTHRITIS IN MICE I. Major Histocompatibility Complex (I Region) Linkage and Antibody Correlates**.
- Wooley, P. H., & Whalen, J. D. (1991). Pristane-induced arthritis in mice. III. Lymphocyte phenotypic and functional abnormalities precede the development of pristane-induced arthritis. *Cellular Immunology*, 138(1), 251–259. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(91\)90150-A](https://doi.org/10.1016/0008-8749(91)90150-A)
- Yasuda, K., Takeuchi, Y., & Hirota, K. (2019). The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases. *Seminars in Immunopathology*, 41(3), 283–297. <https://doi.org/10.1007/s00281-019-00733-8>
- Zaiss, M. M., Joyce Wu, H.-J., Mauro, D., Schett, G., & Ciccia, F. (2021). The gut–joint axis in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 17(4), 224–237. <https://doi.org/10.1038/s41584-021-00585-3>
- Zhang, Y., Yang, M., Xie, H., Hong, F., & Yang, S. (2023). Role of miRNAs in Rheumatoid Arthritis Therapy. In *Cells* (Vol. 12, Issue 13). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cells12131749>
-

VIII. EIDESSTÄTTLICHE 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.

Mengkofen,

November 2024

Stefanie Amann-Stegbauer

IX. DANKSAGUNG

Ich möchte mich zuerst bedanken bei Frau Prof. Müller-Hilke. Für die Themenvergabe der Arbeit und die Möglichkeit, Teil dieser Arbeitsgruppe sein zu dürfen, für Ihre fantastische Betreuung, konstruktive Kritik und Ihre im wahrsten Sinne des Wortes immer offene Tür. Es ist mir eine Ehre, Sie als Doktormutter bezeichnen zu dürfen.

Besonderer Dank geht an Dr. Johann Aleith für seine beispiellose Unterstützung, seine kreativen Einfälle und sein immer optimistisches Wesen, wenn Ergebnisse nicht so ausgefallen sind, wie ich sie mir gewünscht hätte. Ohne Dich hätte es nur halb so viel Spaß gemacht.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei Lukas Wenzel bedanken, in dessen Zusammenarbeit die Experimente zu dieser Arbeit entstanden. Danke für die interessanten und konstruktiven Gespräche, mit denen auch die längsten Labortage nicht langweilig wurden.

Ein großer Dank geht auch an alle, mit denen ich im Verlauf der letzten Jahre kooperieren durfte. Ich bin dankbar für dieses fantastische Team, mit dem man so gut zusammenarbeiten kann. Besonders möchte ich dabei Wendy Bergmann-Ewert und Dr. Marcel Kordt für den guten Input und die viele Unterstützung danken.

Vielen Dank auch an Prof. Kreikemeyer und die Mitarbeitenden des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Universitätsmedizin Rostock, die Labore und Fachwissen für diese Arbeit bereitstellten.

Außerdem bedanke ich mich auch bei Karin Gerber und Mareike Degner von der Core Facility Zentrale Tierversuchshaltung für die Unterstützung bei der Tierhaltung und Tierbereitstellung, ebenso wie beim Team des Rudolf-Zenker-Instituts für Experimentelle Chirurgie.

Mein größter Dank geht an meine Familie. An meine Mutter, die mir das Studieren und alles, was damit zusammenhing, ermöglicht und immer an mich geglaubt hat, an meinen Mann, der trotz vieler mäusewiegender Tage und Fernbeziehung immer an meiner Seite stand und mir den Rücken freigehalten hat. Und an alle, die mich darin unterstützt haben, diese Doktorarbeit fertigzustellen.

x. WISSENSCHAFTLICHER LEBENS LAUF

Bildungsweg

- 09/2005 – 07/2013 Johannes-Nepomuk-Gymnasium in Rohr i. NB
- Abitur
- 10/2013 – 07/2016 Universität Regensburg
- Studium B.Sc. Biologie
- 10/2017 – 09/2019 Universität Göttingen
- Studium Humanmedizin, vorklinischer Abschnitt
- 10/2019 – 11/2023 Universität Rostock
- Studium Humanmedizin, klinischer Abschnitt
- Approbation als Ärztin
- Seit 03/2021 Arbeitsgruppe Klinische Immunologie, Universität Rostock
- Promotion

Beruflicher Werdegang

- 09/2016 – 08/2017 Bundesfreiwilligendienst BRK Kelheim mit Berufsausbildung zur Rettungssanitäterin
- 11/2022 – 10/2023 Praktisches Jahr des Medizinstudiums
- Gynäkologie und Geburtshilfe, Krankenhaus Landshut Achdorf
- Innere Medizin, Spital Wil, Schweiz
- Chirurgie, Krankenhaus St. Elisabeth, Straubing
- 04/2024 bis aktuell Ärztin in Weiterbildung in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe LAKUMED Kliniken

XI. THESEN

1. Die Infektion von DBAxB10Q Mäusen mit 10^5 KBE des *Clostridioides difficile* Stamm VPI 10463 führte zu keinem Gewichtsverlust.
2. Die Immunisierung mit Kollagen und inaktiviertem Freund Adjuvans nach Applikation von Kollagen aktiviertem Freund Adjuvans führte bei allen DBAxB10Q Mäusen zu arthritischen Symptomen an den Pfoten.
3. Eine vorausgehende subakute Infektion mit *C. difficile* Stamm VPI 10563 führte zu keiner Veränderung der Inzidenz und Symptomschwere der Arthritis.
4. Eine klinische Arthritis führte zu histologischen Veränderungen am betroffenen Gelenk.
5. Bereits die Primärimmunisierung mit Kollagen und aktiviertem Freund Adjuvans führt bei DBAxB10Q Mäusen zu einer Hyperplasie der inguinalen Lymphknoten.
6. Es lassen sich mehr ILCs aus der Darmmukosa als aus den inguinalen oder mesenterialen Lymphknoten extrahieren.
7. Die *Clostridioides difficile* Infektion führte zu einer transienten Anreicherung von CD4+ Zellen in der Darmmukosa.
8. Eine *Clostridioides difficile* Infektion führte zu einer transienten Anreicherung der Th2-Zellen, die einer transienten Depletion der Th1- und Th17-Zellen in der Darmmukosa vorausging.