

CORE FACILITY FÜR ZELLSORTIERUNG UND ZELLANALYSE

ARBEITSGRUPPE KLINISCHE IMMUNOLOGIE

LEITUNG: PROF. DR. RER. NAT. B. MÜLLER-HILKE, MME

AUSWIRKUNGEN EINER KOMBINIERTEN *CLOSTRIDIODES*
DIFFICILE-INFEKTION UND KOLLAGEN-INDUZIERTEN
ARTHRITIS AUF DAS GLEICHGEWICHT DER
INNATE LYMPHOID CELLS

INAUGURALDISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DOKTOR DER MEDIZIN

DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

VORGELEGT VON:

LUKAS WENZEL GEB. AM 09.03.1996 IN WÜRZBURG

AUS ROSTOCK

DEZEMBER 2024

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00005546

Gutachter: innen:

Prof. Dr. rer. nat. Brigitte Müller-Hilke, Core Facility für Zellsortierung und Zellanalyse, Universitätsmedizin Rostock

Prof. Dr. med. Robert Jaster, Abteilung für Gastroenterologie, Universitätsmedizin Rostock

Prof. Dr. med. Barbara M. Bröker, Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Greifswald

Jahr der Einreichung: 2024

Jahr der Verteidigung: 2025

HINWEIS

Die Daten dieser Dissertation wurden in Zusammenarbeit mit meiner Kollegin, Frau **Stefanie Brigitte Amann-Stegbauer**, erhoben. Eingereicht wurde ihre Dissertationsschrift unter dem Titel:

Kombinierter Einfluss von subakuter, Antibiotika-assoziiierter *Clostridioides difficile* Infektion und Kollagen-induzierter Arthritis auf die adaptive Immunantwort der Maus

Der Fokus ihrer Arbeit lag dabei auf der Rolle der T-Helfer Zellen bei einer Kollagen-induzierten Arthritis nach vorangegangener *Clostridioides difficile*-Infektion. Aufgrund der gemeinsamen Durchführung der Experimente kann es bei Darstellung und Interpretationen der Daten zu Überschneidungen kommen.

Für mich

I. INHALTSVERZEICHNIS

<u>I.</u>	<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	<u>I</u>
<u>II.</u>	<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>III</u>
<u>III.</u>	<u>TABELLENVERZEICHNIS</u>	<u>IV</u>
<u>IV.</u>	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>V</u>
<u>V.</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>1</u>
<u>VI.</u>	<u>EINLEITUNG</u>	<u>2</u>
6.1	Allgemeines zur Rheumatoiden Arthritis	2
6.1.1	Epidemiologie und sozioökonomische Belastung	2
6.1.2	Pathophysiologie	2
6.1.3	Diagnose und Therapie	3
6.2	Risikofaktoren von Rheumatoider Arthritis und die Rolle des Mikrobioms.....	4
6.2.1	Genetische Prädispositionen.....	4
6.2.2	Umweltfaktoren	5
6.2.2.1	Das Mikrobiom im Allgemeinen	5
6.2.2.2	Das Darmmikrobiom und <i>Clostridioides difficile</i>	5
6.3	Das Gleichgewicht von ILCs bei Veränderungen des Mikrobioms und chronisch-entzündlichen Erkrankungen.....	8
6.4	Zielsetzung der Studie	10
<u>VII.</u>	<u>METHODEN</u>	<u>12</u>
7.1	Versuchstiere und Tierhaltung	12
7.2	<i>Clostridioides difficile</i> Anzucht und Aufbereitung	12
7.3	Antibiose	13
7.4	Infektion im <i>Clostridioides difficile</i>	14
7.5	Monitoring und Behandlung klinischer <i>Clostridioides difficile</i> -Infektionen.....	15
7.6	Induktion der Kollagen-induzierten Arthritis	15
7.7	Monitoring und Behandlung der kollagen-induzierten Arthritis.....	17
7.8	Anästhesie der Tiere	18
7.9	Aufarbeitung und Analyse der entnommenen Organe.....	19
7.10	Durchflusszytometrische Einzelzell-Analyse.....	20
7.11	Histologische Aufarbeitung	21
7.12	Statistische Analyse	22
<u>VIII.</u>	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>23</u>
8.1	Überblick über den Studienaufbau und Einteilung der Versuchsgruppen.....	23
8.2	Die Inokulation mit <i>C. difficile</i> VPI 10463 führte zu einer subakuten Infektion	24

8.3	Eine CDI führte zu einem tendenziell früheren Einsetzen der CIA	27
8.4	Die Kollagen Typ II-Immunisierung ging mit einer erhöhten Zellzahl in den inguinalen Lymphknoten einher.....	30
8.5	Reduktion des prozentualen Anteils CD4+ Zellen in inguinalen Lymphknoten im Zuge der Immunisierung mit bovinem Kollagen Typ II	32
8.6	Die Immunisierung führte in der Infektionsgruppe zur Akkumulation von ILC1 in der Dünndarmmukosa	35
8.7	Die Infektion begünstigte einen schnelleren Anstieg der ILC2 im Darm nach der Immunisierung.....	37
IX.	DISKUSSION	39
9.1	Die Inokulation mit <i>C. difficile</i> VPI10463 zeigte Ausprägungen einer subakuten Infektion ohne signifikantem Gewichtsverlust	40
9.2	Anhaltspunkte für eine frühere Manifestation mit exazerbierter Symptomatik der Kollagen-induzierten Arthritis nach einer subakuten <i>C. difficile</i> - Infektion	42
9.3	Die Kollagen Typ II-Immunisierung induzierte einen Anstieg der absoluten Zellzahl, der jedoch mit einer prozentualen Abnahme der CD4+Zellen einherging.....	43
9.4	Erhöhte ILC-Populationen in Darm und drainierenden Lymphknoten infizierter Tiere nach der Immunisierung mit Kollagen Typ II	44
X.	FAZIT	48
XI.	LITERATURVERZEICHNIS	49
XII.	THESEN	61
XIII.	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	62
XIV.	LEBENS LAUF	63
XV.	DANKSAGUNG	64
XVI.	ANHANG	65
16.1	Deskriptive Statistik.....	65
16.2	Abbildungen	66
16.3	Methoden	67
16.4	Materialien.....	67
16.4.1	Verbrauchsmaterialien	67
16.4.2	Chemikalien.....	68
16.4.3	Versuchstiere	70
16.4.4	Geräte	71
16.4.5	Software	71
16.5	Herstellerverzeichnis.....	71

II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Inokulation der Mäuse.....	14
Abbildung 2: Durchführung der Primär- bzw. Sekundärimmunisierung.	17
Abbildung 3: Scoring-System der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA).	18
Abbildung 4: Zeitlicher Aufbau und Interventionen des Experimentes.....	23
Abbildung 5: Die Inokulation von <i>C. difficile</i> VPI 10463 führte zu einer subakuten Infektion.	25
Abbildung 6: <i>C. difficile</i> führte zu einer entzündlichen Veränderung des Colons.....	26
Abbildung 7: CIA führte zu Rötungen und Schwellungen der betroffenen Gelenke.	27
Abbildung 8: CDI verursachte eine tendenziell früher auftretende und schwerer verlaufende CIA.....	28
Abbildung 9: Die CIA führte in den Pfoten zu entzündlichen Infiltraten und Abrasionen am artikulären Gelenkknorpel.....	29
Abbildung 10: Eine Applikation von Kollagen Typ II führte bei inguinalen Lymphknoten zu einem Anstieg der Zellzahlen.	31
Abbildung 11: Gating-Hierarchie der Lymphknoten.	32
Abbildung 12: Gating-Hierarchie der Dünndarmmukosa.....	33
Abbildung 13: Abfall der inguinalen CD4+Zellen im Zuge der Immunisierung.....	34
Abbildung 14: Anstieg ILC1 im Darm nach der Immunisierung.....	36
Abbildung 15: Infektion begünstigte schnelleren Anstieg der ILC2 nach Sekundärimmunisierung.....	37

III. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Verwendete Antibiotika zur Vorbehandlung	14
Tabelle 2: Score zur Einschätzung der Belastung der Mäuse im Versuch	16
Tabelle 3: Inhaltsstoffe der verschiedenen Lösungen.....	20
Tabelle 4: Antikörper für Durchflusszytometrie	21
Tabelle 5: Übersicht Versuchstiergruppen	24

IV. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
°C	Grad Celsius
ACPA	<i>anti citrullinated peptide antibodies</i>
Aqua dest.	Aqua Destillata
BHIS	<i>Brain Heart Infusion Supplemented</i>
BMI	Body-Mass-Index
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
bzw.	beziehungsweise
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridioides difficile</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDI	<i>Clostridioides difficile</i> -Infektion
CFA	komplette Freund's Adjuvanz
CRP	C-reaktives Protein
d	Tag
EIA	Enzymimmunoassays
<i>F. prausnitzii</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
FCS	fetales Kälberserum
Gruppe A	subakute Infektion (Endpunkt an Tag 9)
Gruppe B	abklingende Infektion (Endpunkt an Tag 16)
Gruppe C	Rekonvaleszenz der Infektion (Endpunkt an Tag 23)
Gruppe D	nach Primärimmunisierung (Endpunkt an Tag 30)
Gruppe E	vor Sekundärimmunisierung (Endpunkt an Tag 48)
Gruppe F	nach Sekundärimmunisierung (Endpunkt an Tag 51)
Gruppe G	CIA-Latenzphase (Endpunkt an Tag 81)
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IFA	inkomplette Freund's Adjuvanz
IFN- γ	Interferon-gamma
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
ILC	<i>Innate lymphoid cell</i>
KBE	Koloniebildende Einheit
MCP	Metacarpophalangealgelenk
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minute
MTP	Metatarsophalangealgelenk
OD	optische Dichte
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>

PAD	Peptidyl-Arginin-Deiminasen
PBS	Phosphate Buffered Sialine
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIP	proximales Interphalangealgelenk
PPI	Protonenpumpeninhibitoren
RA	Rheumatoide Arthritis
RF	Rheumafaktor
SBF	<i>specific pathogen free</i>
SE	<i>shared epitope</i>
Th-Zelle	T-Helfer Zelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
VPI10463	<i>Clostridioides difficile</i> -Stamm

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die rheumatoide Arthritis (RA) gehört mit einer Inzidenz von bis zu 1% weltweit zu den häufigsten Autoimmunerkrankungen. Sie ist gekennzeichnet durch chronisch-entzündliche Prozesse in den Gelenken, welche sich auch systemisch an weiteren Organen manifestieren können. Die genauen Pathomechanismen sind unklar, wobei sowohl Umweltfaktoren als auch genetische Prädispositionen als mögliche Auslöser diskutiert werden. Ein diskutierter Faktor ist die sogenannte Darm-Gelenk-Achse, bei der Veränderung des intestinalen Mikrobioms, beispielsweise durch Infektionen der Schleimhäute, immunologische Veränderungen bewirken, die zu Autoimmunreaktionen führen können. In vorherigen Studien wurde deshalb der Einfluss einer Infektion mit dem Bakterium *Clostridioides difficile* (CDI) auf die Entwicklung einer Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) überprüft. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen deuteten darauf hin, dass eine CDI einen potenziell schützenden Effekt auf die Manifestation einer CIA zeigte, indem sie immunologische Mechanismen modulierte. Das Ziel der vorliegenden Studie war es, diese immunologischen Prozesse, insbesondere Modulationen verschiedener Zellpopulationen im zeitlichen Verlauf detaillierter zu analysieren, um somit ein besseres Verständnis über den Einfluss von aberranten Veränderungen des Darmmikrobioms auf die Ausprägung einer chronisch-entzündlichen Gelenkerkrankung zu gewinnen. Zur Analyse dieser Zielstellung erfolgte die Untersuchung und der Vergleich von *C. difficile*-infizierten mit nicht-infizierten Mäusen und anschließender Immunisierung mit bovinem Kollagen Typ II. Nach Erreichen des jeweiligen Endpunktes wurden den Mäusen inguinale und mesenteriale Lymphknoten, sowie der Dünndarm entnommen. Anschließend wurden die aus dem Gewebe extrahierten Zellen mittels durchflusszytometrischer Einzelzell-Analyse charakterisiert mit dem Fokus auf *innate lymphoid cells* (ILC). Im Gegensatz zur Literatur konnte kein signifikanter Gewichtsverlust infolge der Infektion beschrieben werden, sodass von einer subakuten Infektion ausgegangen wurde. Daran anknüpfend konnte nach subakuter CDI keine Reduktion der CIA-Inzidenz beobachtet werden. In Bezug auf das Immunsystem zeigte sich, dass die Immunisierung zu einer lokalen Ansammlung von Leukozyten in den inguinalen Lymphknoten im Sinne einer Lymphadenopathie führte und gleichzeitig mit einem reduzierten prozentualen Anteil der CD4⁺Zellen einherging. Ebenso ließ sich beobachten, dass die Immunisierung eine Veränderung der Zusammensetzung einzelner ILC-Subpopulationen zur Folge hatte. Dies präsentierte sich in einer ILC1-dominierten Immunantwort mit einer Akkumulation dieser innerhalb der Dünndarmmukosa infizierter Tiere. Ebenfalls zeigte sich, dass Infektionstiere mit einer beschleunigten ILC2-Antwort auf die Sekundärimmunisierung reagierten. Die Ergebnisse dieser Studie verdeutlichen, dass eine subakute CDI keinen Einfluss auf die Manifestation einer Arthritis hatte. Dennoch zeigte die Immunisierung mit Kollagen eine Modifizierung des angeborenen Immunsystems.

VI. EINLEITUNG

6.1 ALLGEMEINES ZUR RHEUMATOIDEN ARTHRITIS

6.1.1 EPIDEMIOLOGIE UND SOZIOÖKONOMISCHE BELASTUNG

Bei der rheumatoiden Arthritis (RA) handelt es sich, mit einer weltweiten Prävalenz von 0,5 bis 1 %, um eine der häufigsten Autoimmunerkrankungen [1,2]. Sie ist primär durch eine chronisch-entzündliche Destruktion der Gelenke charakterisiert, kann jedoch auch extraartikuläre Manifestationen aufweisen, wie beispielsweise an Herz, Lunge, Gastrointestinaltrakt, Nieren, Augen, Blutgefäßen und dem Nervensystem. In 25% der Fälle treten Rheumaknoten auf, die sich als etwa 5 mm große subkutane Knoten darstellen. [3,4]. Die Erkrankung kann zu einer hohen Einschränkung der Betroffenen führen und mit einer reduzierten Lebensqualität einhergehen. Auch die Belastung des Gesundheitssystems mit direkten Kosten von über 4000 € pro Patient im Jahr und noch höheren indirekten Kosten, wie zum Beispiel Produktivitätseinbußen durch Arbeitsausfälle, ist erheblich [5,6]. Zu Beginn berichten betroffene Personen meist von einer Morgensteifigkeit der Gelenke in Begleitung von Abgeschlagenheit, subfebrilen Temperaturen, Gewichtsverlust, sowie Rötungen und Schwellungen in den betroffenen Gelenken. Klinisch manifestieren sich diese bevorzugt symmetrisch an den Metacarpophalangeal (MCP)- bzw. Metatarsophalangeal- (MTP) und den proximalen Interphalangealgelenken (PIP) der Hände und Füße, sowie am Hand-, Ellenbogen- und Schultergelenk der oberen Extremität, und auch an Knöchel, Knie- und Hüftgelenk der unteren Extremität [2,7].

6.1.2 PATHOPHYSIOLOGIE

Die Ätiologie der RA wird als multifaktoriell angesehen und charakterisiert sich durch eine fehlgeleitete Immunreaktion. Eine zentrale Rolle spielt dabei die Entzündung der Synovialmembran, mit einer Hyperplasie von Synovialzellen und im Verlauf einsetzender Infiltration von Immunzellen, wie B- und T-Lymphozyten, mit der Ausbildung von Keimzentren [8]. In der Vergangenheit wurden autoreaktive T-Zellen identifiziert, die mit der Sezernierung von proinflammatorischen Botenstoffen wie Interferon- γ (IFN- γ) oder auch Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) eine lokale Entzündungsreaktion in der Synovia induzieren können [9]. Infolgedessen kommt es zu einer lokalen Fibroblasten-Aktivierung, die mit einer Umstrukturierung der Gewebearchitektur und der Bildung von Pannusgewebe einhergeht [10–12]. Die Synovitis führt im weiteren Krankheitsverlauf zu einer Zerstörung des Knorpels und einer damit verbundenen

Gelenkspaltverengung, welche auf die unkontrollierte Proliferation des Pannus und einer einsetzenden Knochenerosion zurückzuführen ist [13].

6.1.3 DIAGNOSE UND THERAPIE

Die Diagnostik der RA erfolgt aus der Zusammenschau von körperlichen Symptomen und klinischen Untersuchungen. Von zentraler Bedeutung sind hierbei die typischen Prädilektionsstellen der Schwellungen und Rötungen wie oben bereits beschrieben. Darüber hinaus können unspezifische Entzündungszeichen wie die Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) oder auch C-reaktives Protein (CRP) bestimmt werden [14]. Eine besondere Rolle im Diagnostikprozess spielen spezifische Laborparameter wie Rheumafaktoren (RF) oder Antikörper gegen citrullinierte Proteine, ACPAs (*anti citrullinated peptide antibodies*), welche schon mehrere Jahre vor Manifestation der Erkrankung auftreten können [2]. Bei Rheumafaktoren handelt es sich meist um Immunglobuline M (IgM), welche sich gegen das F_C-Fragment von menschlichem Immunglobulin G (IgG) richtet. Sie besitzen eine Sensitivität von 64-86 % und eine Spezifität von 84-90 %, jedoch können diese auch in 10-30 % der Fälle bei gesunden oder anderen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises auftreten [15,16]. Die ACPAs hingegen besitzen mit 62-76 % eine geringere Sensitivität, dafür aber eine höhere Spezifität von über 95 % [16,17]. ACPAs richten sich gegen citrullinierte Proteine, die durch eine posttranslationale Modifikation entstehen. Diese Modifikation kennzeichnet sich durch die Umwandlung der Aminosäure Arginin zu Citrullin an bestimmten Stellen innerhalb des Proteins und wird durch das Enzym Peptidyl-Arginin-Deiminase (PAD) katalysiert. Dabei stehen Veränderungen in der Zusammensetzung des Mikrobioms zunehmend unter Verdacht sich an diesen Prozessen zu beteiligen und somit einen Einfluss auf die Entwicklung einer Arthritis zu nehmen [18]. Mit dem Nachweis von Autoantikörpern bezeichnet man die RA als eine seropositive RA, welche auch mit einem aggressiveren und schwereren Verlauf einhergeht, bzw. bei Fehlen als seronegative RA [2]. Zur Diagnosestellung kann man sich auch an den Klassifikationskriterien des „*American College of Rheumatology*“ (ACR) und der „*European League Against Rheumatism*“ (EULAR) bedienen. Hierbei werden Anzahl der geschwollenen bzw. schmerzhaften Gelenke, der Nachweis von spezifischen Antikörpern, wie RF und ACPAs in der Serologie, unspezifische Entzündungsparameter, beispielsweise CRP und BSG, sowie die Dauer der Symptome mit einem Punktwert versehen. Die Diagnose der RA kann gestellt werden, wenn mindestens ein Punktwert von 6 erreicht wurde, eine bestätigte Synovitis in mindestens einem Gelenk nachgewiesen wurde und keine Differentialdiagnose vorliegt, die die Synovitis anderweitig erklärt [16,19].

Für den Verlauf der Erkrankung ist eine frühe Diagnosestellung unerlässlich. Die Therapie beruht auf dem Konzept „*hit hard and early*“. Grund dafür ist, dass man bei der Behandlung

von RA von einem kurzen therapeutischen Fenster, von etwa 3-6 Monaten nach dem Auftreten der ersten Symptome, spricht [20,21]. Die Akuttherapie dient zur Reduktion von Schmerzen und der Immunreaktion, wofür nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR) und Glucocorticoide zum Einsatz kommen [22]. Ziel der Therapie ist eine möglichst effiziente Reduktion der Entzündungsreaktion, um somit die Progression der Gewebeerstörung zu unterbinden [22,23]. Es sollte zeitnah nach Diagnosestellung mit einer Basistherapie zur Remissionsinduktion begonnen werden. In der Praxis haben sich dafür sogenannte „*disease modifying anti-rheumatic drugs*“ (DMARDs) etabliert. Das bekannteste Präparat ist dabei Methotrexat, welches als Folsäureantagonist die DNA-Synthese stört und somit eine immunsupprimierende Wirkung herbeiführt [24]. Weitere Vertreter der DMARDs sind zum Beispiel Leflunomid und Sulfasalazin [25,26]. Zur Erhöhung der Remissionsrate kann gegebenenfalls die Kombination mit Glucocorticoiden erwägt werden [27]. Eine weitere Therapiemöglichkeit bieten die sogenannten „*Biologics*“, auch bDMARDs genannt, wie zum Beispiel Adalimumab, als TNF- α -Inhibitor oder auch Rituximab, als CD20-Inhibitor [28,29]. Einen neuen Ansatz bilden die Januskinase (JAK)-Inhibitoren, welche durch Unterbindung spezifischer Signalwege die Bildung proinflammatorischer Zytokine reduzieren [30,31]. Als Vertreter sind hier Tofacitinib und Baricitinib beispielhaft zu nennen [32].

6.2 RISIKOFAKTOREN VON RHEUMATOIDER ARTHRITIS UND DIE ROLLE DES MIKROBIOMS

6.2.1 GENETISCHE PRÄDISPOSITIONEN

Für eine adäquate und zielgerichtete Therapie ist die Erforschung der Pathomechanismen von zentraler Bedeutung. Dabei konnten bereits diverse Risikofaktoren detektiert werden, die mit der Entstehung einer RA in Zusammenhang stehen [33]. Die Wahrscheinlichkeit an einer RA zu erkranken, ist bei Frauen im Verhältnis von 3:1 höher als bei Männern. Hierbei manifestiert sich die Erkrankung bei Frauen meist zwischen dem 55. und 64. Lebensjahr, wohingegen Männer erst zwischen dem 65. und 75. Lebensjahr erkranken [2,14]. Zu den bedeutendsten genetischen Markern, die mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für eine RA einhergehen, zählen die HLA-II-Allele (Humane Leukozyten Antigen) [34,35]. Diese Allele, insbesondere der HLA-DRB1-Subtyp, kodieren eine Aminosäuresequenz für das sogenannte „*shared epitope*“ (SE). Dabei haben Studien gezeigt, dass mit steigender Anzahl dieser Allele, sowohl das Risiko für eine RA, als auch für einen schweren Verlauf der Erkrankung zunimmt. Man spricht hier von einem Allel-Dosis-Effekt [35–39].

6.2.2 UMWELTFAKTOREN

Ein Großteil der Risikofaktoren lässt sich jedoch auf beeinflussbare, umweltbedingte Faktoren, wie Lebensstil, Ernährung und Infektionen zurückführen. So verdoppelt Rauchen das Risiko zu erkranken und steht dabei vor allem im Zusammenhang mit einer ACPA-positiven RA [40–43]. Ein erhöhter Body-Mass-Index (BMI) von über 30 kg/m² und ein erhöhter Hüftumfang wurden ebenfalls mit einem gesteigerten Risiko für die Entwicklung einer RA in Verbindung gebracht [44,45]. Bei der Beleuchtung der Risikofaktoren rückt auch das Mikrobiom immer mehr in den Fokus, sich an der Pathogenese zu beteiligen [2].

6.2.2.1 DAS MIKROBIOM IM ALLGEMEINEN

Unter dem Mikrobiom wird die Gemeinschaft unterschiedlicher Mikroorganismen, wie Bakterien, Pilzen, Viren und verschiedensten Mikroben, zusammengefasst, die den menschlichen Körper besiedeln. Diese Mikroorganismen finden sich vor allem auf der Haut und diversen Schleimhäuten und sind an verschiedensten physiologischen Prozessen, einschließlich der Abwehr pathogener Erreger sowie als wichtiger Faktor in der Modulation des Immunsystems, beteiligt [46]. Hierbei wird vermutet, dass Veränderungen in der physiologischen Zusammensetzung des Mikrobioms eine Fehlregulation des Immunsystems begünstigen und einen Verlust der Selbsttoleranz fördern können [46,47]. Ein Beispiel für die Einflussnahme eines veränderten Mikrobioms auf die Manifestation einer RA ist das gehäufte Auftreten von Parodontitis bei Arthritis-Patienten. Durch eine Dysbiose der Mundflora kann es zu einer Infektion mit *Porphyromonas gingivalis* kommen, welcher als ein Erreger der chronisch-entzündlichen Parodontitis betrachtet wird. *P. gingivalis* ist in der Lage mit Hilfe einer PAD eine Citrullinierung zu katalysieren [48]. Durch die Bildung dieser Neoantigene kann es zu Aktivierung von Lymphozyten kommen, welche zur Produktion von ACPAs führen kann, was den Verlust von Toleranzmechanismen im Körper aufzeigt. Dieser Mechanismus wird auch als molekulares Mimikry bezeichnet [11,48–51].

6.2.2.2 DAS DARMMIKROBIOM UND *CLOSTRIDIODES DIFFICILE*

Der Großteil der Mikroorganismen lebt in unserem Darm [52]. Eine Störung der physiologischen Flora, etwa durch den übermäßigen Einsatz von Antibiotika, kann zum Verlust der Schutzfunktion gegenüber opportunistischen Erregern führen und deren Ausbreitung im Darm ermöglichen. Als Beispiel dieser opportunistischen Pathogene ist das obligat anaerobe, gram-positive Bakterium *C. difficile* zu nennen, dem häufigsten Erreger für nosokomiale Diarrhoen

[53–55]. Die Kolonisation des Menschen erfolgt fäkal-oral durch die Aufnahme von Sporen, jedoch muss nicht zwangsläufig eine Infektion auftreten, da in bis zu 3-5 % der gesunden Erwachsenen eine asymptomatische Besiedlung nachgewiesen werden konnte [56–58]. Diese Kolonisation kann im hospitalisierten Umfeld auf bis zu 30% steigen [59]. Wenn es zu einer symptomatischen Manifestation der Besiedlung kommt spricht man von einer CDI. Die Fähigkeit des Sporenbildens ermöglicht dem Bakterium das ubiquitäre Vorkommen, sodass bereits der Nachweis aus dem Gastrointestinaltrakt des Menschen, medizinischen Versorgungseinrichtungen, aber auch in verschiedensten Lebensmitteln erfolgte [57,60]. Die Sporen ermöglichen die Resistenz gegenüber unterschiedlichen Umwelteinflüssen, wie der Überdauerung aerober Bedingungen durch ihre Aerotoleranz oder auch die Unempfindlichkeit gegenüber herkömmlichen Desinfektionsmitteln [61]. Die Klinik einer CDI gestaltet sich vielfältig, von einer leichten bis moderaten Diarrhoe, die sich selbstlimitieren kann, bis hin zu schwersten Verläufen mit Komplikationen. Die Leitsymptome einer Infektion sind Diarrhoen, Fieber, abdominelle Schmerzen, sowie eine Leukozytose ($> 15000/\mu\text{l}$) [62]. Die Definition des Robert-Koch-Instituts spricht von $\geq$ drei wässrigen Stuhlgängen mit charakteristischem fauligen Geruch pro Tag [63]. Im Extremfall kann es zur Ausbildung einer pseudomembranösen Kolitis und toxischem Megakolon kommen, welche bei einem fulminanten Verlauf mit Entwicklung einer Sepsis und/oder Multiorganversagen einhergehen kann [58,62]. Die Mortalität einer Infektion unterliegt starken Schwankungen und hängt vom Risikoprofil des Patienten sowie der Toxizität des *C. difficile*-Stammes ab, kann jedoch bis zu etwa 20 % betragen [55,64–66].

Die Pathogenese der CDI wird durch die zwei Toxine, Enterotoxin A (TcdA) und Zytotoxin B (TcdB) vermittelt. Man vermutet, dass beide Toxine im Synergismus miteinander fungieren. Dabei werden im Darm die Toxine von *C. difficile* freigesetzt und von Darmzellen aufgenommen [67–70]. Im Inneren der Zelle kommt es nun zur Inaktivierung der Rho GTPase, welche für die Stabilität des Aktin-Zytoskeletts und der Regulation des Zellzyklus verantwortlich ist. Aufgrund der Inaktivierung kommt es zu einer Barrierestörung der Epithelzellen, welche mit der Abgabe von Wasser in das Darmlumen einhergeht und somit die Durchfälle bedingt. Es kommt im Zuge der Toxin-Freisetzung auch zu einer Anreicherung von Immunzellen mit Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen, was zusätzlich zum Untergang der Darmzellen beiträgt. Studien konnten belegen, dass TcdB maßgeblich für die Virulenz verantwortlich ist [67,69].

Der bedeutendste Risikofaktor für die Entwicklung einer CDI ist die übermäßige Antibiotikatherapie, wobei etwa 50-70 % der Antibiotika-assoziierten Kolitiden auf eine Infektion mit *C. difficile* zurückzuführen ist [72,73]. Die verschiedenen Antibiotikapräparate unterscheiden sich allerdings in ihrem Risiko eine CDI zu begünstigen, wobei das Risiko bei der Verwendung von

Cephalosporinen (2. Generation oder später), Carbapenemen und Clindamycin am größten ist [74,75]. Weitere Medikamentengruppen, die das Risiko erhöhen sind Protonenpumpeninhibitoren (PPI) und Histamin-2-Rezeptorantagonisten. Durch ihre Hemmung der Magensäureproduktion kommt es zu einem erhöhten pH-Wert im Magen und folglich wird den Sporen die Magenpassage vereinfacht [76,77]. Auch die in der Akuttherapie der RA eingesetzte Gruppe der NSAR steigern die Wahrscheinlichkeit einer CDI durch ihren störenden Einfluss auf die Darmbarrierefunktion und auf die immunologische Abwehrreaktion [22,78]. In vorangegangenen Studien wurde beobachtet, dass eine, durch Methotrexat oder Ciclosporin vermittelte RA-Therapie ausgelöste Immunsuppression, eine Reduktion der Bakterienvielfalt des Mikrobioms mit Verlust der Abwehrmechanismen gegen eine *C. difficile*-Kolonisation zur Folge hatte. Daraus ersichtlich wird die erhöhte Prädisposition dieser Patienten für die Entwicklung einer CDI und Anstieg des Risikos für schwere Verläufe [79,80]. Weitere Risikofaktoren sind das Alter, Aufenthalte in Krankenhäusern oder Pflegeeinrichtungen, schwere Grunderkrankungen oder auch chronisch-entzündliche Darmerkrankungen in der Anamnese. Bezogen auf das Alter, erhöht sich das Risiko an einer Infektion zu erkranken um das 10-fache ab einem Alter >65 Jahre [55,57,62,81].

Aufgrund der vielfältigen klinischen Manifestationen der CDI, ist eine präzise Diagnosesicherung essenziell. Ein Erregernachweis sollte erfolgen, wenn der Verdacht auf ein nosokomiale Durchfallerkrankung mit persistierender Symptomatik besteht. Dies umfasst Patienten, bei denen eine Antibiotikatherapie in den letzten 60 Tagen durchgeführt wurde oder sie sich anamnestisch einer Risikogruppe zuordnen lassen, wie etwa Immunsuppression oder ein erhöhtes Lebensalter [63]. Für den mikrobiologischen Nachweis stehen mehrere Methoden zur Verfügung. Als Goldstandard wird der Zellzytotoxizitätsneutralisationstest oder auch die kulturelle Anzucht aus Stuhlproben aufgeführt. Beide Nachweisverfahren weisen eine hohe Sensitivität und Spezifität auf, sind jedoch mit einem hohen Zeitaufwand verbunden [82]. In der Routinediagnostik haben sich zeitlich weniger aufwändige Testmethoden etabliert, wie Enzymimmunoassays (EIA) zum Nachweis der Glutamat-Dehydrogenase oder auch die DNA-Amplifikation (PCR) zum Nachweis von Toxin-Genen, welche eine hohe Sensitivität aufweisen. Für die Bestätigung nutzt man ein Verfahren mit hoher Spezifität, beispielsweise ein EIA zum Nachweis von Toxin A und B [73].

Die Erstmaßnahmen zur Behandlung einer Infektion beinhalten eine supportive Therapie mit der Substitution von Flüssigkeit und das Absetzen einer laufenden Antibiotikatherapie bei Verdacht auf eine CDI [83]. Laut AWMF- Leitlinie ist die initiale medikamentöse Therapie mit Fidaxomicin per oral oder auch Vancomycin per oral durchzuführen. Bei schweren Komplikationen,

wie toxischem Megakolon oder Darmwandperforationen, ist eine chirurgische Intervention erforderlich [66,84]. Im Falle von multiplen Rezidiven kann eine fäkale Mikrobiota-Transplantation (FMT) durchgeführt werden. Hierbei wird Stuhl eines gesunden Spenders gesammelt und aufgearbeitet und im Anschluss in den Empfänger überführt. Das Ziel ist es mit diesem Mikrobiomtransfer die dysbiotische Darmflora wieder aufzubauen und eine erneute Fehlbesiedlung mit *C. difficile* zu verhindern [68,85].

Bei der Untersuchung des möglichen Einflusses einer CDI auf die Entwicklung einer RA wurden in einer noch nicht publizierten Proteinsequenzanalyse der Universität Rostock Gemeinsamkeiten zwischen *C. difficile* und *P. gingivalis* in ihrem aktiven Zentrum der PAD nachgewiesen. Diese Erkenntnis lässt die Vermutung zu, dass *C. difficile* sich am molekularem Mimikry beteiligen und somit zur Pathogenese der RA beitragen kann. Des Weiteren wird der allgemeinen Integrität und Zusammensetzung des Darmmikrobioms in Hinblick auf die Entstehung der RA eine bedeutende Rolle zugeschrieben [86,87]. Eine Dysbiose des Darms, beispielsweise durch Medikamente, wie Antibiotika, fehlerhafte Ernährung oder auch anderen Umwelteinflüssen, kann die Barrierefunktion einschränken [88]. Somit wird Pathogenen die Translokation in das Darmgewebe und den Blutkreislauf ermöglicht. Dies kann zu einer Dysregulation des Immunsystems aufgrund einer Überaktivierung im Gewebe führen oder auch die Einwanderung von autoreaktiven Zellen in die Gelenke begünstigen [89]. Darüber hinaus ist das Mikrobiom maßgeblich an der Entwicklung und Homöostase des angeborenen und adaptiven Immunsystems im Darm beteiligt. Bei einer Dysbiose kann es daher zu einer vermehrten Bildung von proinflammatorischen T-Zellen wie auch autoreaktiven B-Zellen kommen [87,90,91]. So zeigte sich in Studien, dass ein natürlicher Kommensale der Darmflora, wie *Faecalibacterium prausnitzii* als wesentlicher Faktor des Gleichgewichtes zwischen Th17- und Treg-Zellen identifiziert wurde. RA Patienten präsentieren eine reduzierte Anzahl an *F. prausnitzii*, welche mit einer Imbalance dieses Verhältnisses einherging, charakterisiert durch Zunahme von Th17-Zellen und Abnahme von Treg-Zellen, mit einer gesteigerten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie IL-17 und IL-22, wodurch Immunregulation und Selbsttoleranz verloren gehen können [89,92].

6.3 DAS GLEICHGEWICHT VON ILCs BEI VERÄNDERUNGEN DES MIKROBIOMS UND CHRONISCH-ENTZÜNDLICHEN ERKRANKUNGEN

Bei dem Immunsystem des Menschen handelt es sich um ein hochkomplexes Netzwerk aus verschiedensten Komponenten. Die Aufgabe des Immunsystems besteht darin den Körper vor

Erkrankungen zu schützen, indem es das Eindringen und die Ausbreitung möglicher pathogener Erreger verhindert [93]. Neben dieser Aufgabe unterliegt das Immunsystem einem dynamischen Gleichgewicht. Eine reduzierte Aktivität kann die Entstehung von malignen Erkrankungen, wie etwa Malignomen, begünstigen, während eine Überaktivierung die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise RA, fördern kann. Das Immunsystem wird dabei in zwei Hauptbereiche aufgeteilt: das angeborene und das adaptive (erworbene) Immunsystem. Zusätzlich können jeweils beide Systeme in eine zelluläre und humorale (lösliche) Komponente unterteilt werden. Das angeborene Immunsystem liefert eine schnelle aber eher unspezifische Immunantwort, wohingegen das adaptive System zeitlich verzögert reagiert, aber eine spezifischere Abwehr bietet [94,95]. Das angeborene Immunsystem setzt sich auf zellulärer Ebene aus Makrophagen, dendritische Zellen, neutrophilen Granulozyten, aber auch den *innate lymphoid cells* (ILCs) zusammen. Auf der humoralen Seite stehen Elemente wie das Komplementsystem oder auch das C-reaktive Protein. Das adaptive Immunsystem besteht zum einen aus T- und B-Lymphozyten und zum anderen aus löslichen Immunfaktoren, den Antikörpern [96,97].

Die Aufgaben der ILCs sind die Vermittlung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem, die Gewebemöiostase aufrechtzuerhalten und die Immunität gegenüber Krankheitserregern zu unterstützen. Demzufolge sind sie insbesondere in Geweben mit hoher Exposition gegenüber Umweltfaktoren lokalisiert, wie beispielsweise in der Lunge oder in der Mukosa des Gastrointestinaltrakts [98,99]. ILCs ähneln in ihrer Morphologie den Lymphozyten des adaptiven Immunsystems, jedoch verfügen sie nicht über „*rearranged antigen-specific receptors*“, welche bei B- und T-Zellen für die Heterogenität der Rezeptoren für die spezifische Erkennung von Antigenen verantwortlich ist [96,99]. Dabei können die ILCs nochmals in zwei Gruppen unterteilt werden: die zytotoxischen Natürlichen-Killerzellen und die nicht-zytotoxischen ILC1, ILC2 und ILC3 [100]. Die nicht zytotoxischen ILCs charakterisieren sich durch die Oberflächenexpression von CD127 (auch bekannt als IL-7-Rezeptor- α) [100,101]. ILC1 zeichnen sich durch die Expression des Transkriptionsfaktors T-bet aus und ähneln somit den Th1-Zellen. Sie sezernieren vor allem IFN- γ und unterstützen somit die antimikrobielle Abwehr. ILC2 ähneln den Th2-Zellen und exprimieren den Transkriptionsfaktor GATA3. Sie sind bei der parasitären Abwehr und bei Allergien mittels Freisetzung der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 beteiligt. ILC3 charakterisieren sich über die Expression von ROR γ t, ähnlich zu den Th17-Zellen. Sie besitzen die Fähigkeit IL-17 und IL-22 zu sezernieren und die Möglichkeit, genauso wie ILC2, mittels MHC II Antigene anderen Immunzellen zu präsentieren. Somit beteiligen sie sich an der Abwehr extrazellulärer Erreger [98,100].

In Bezug auf das Mikrobiom besteht die Vermutung, dass die ILCs an der Homöostase der mikrobiellen Besiedlung mitwirken. In vorangegangenen Studien wurde beobachtet, dass

eine Depletion der ILCs mit einer Veränderung der physiologischen Darmflora einherging [102]. Ebenfalls sind sie an der initialen Abwehr von pathogenen Erregern durch die schnelle Freisetzung verschiedener Zytokine und der Regulierung weiterer Immunzellen beteiligt [103]. So zeigte sich bei einer CDI, dass es in der Frühphase der Infektion zu einer Akkumulation von ILC1 und ILC3 in der Mukosa kam, die mit einer Rekrutierung neutrophiler Granulozyten einherging. Anschließend spielten ILC3 eine Rolle bei verschiedenen Reparaturmechanismen der mukosalen Barriere [104].

Auch in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen scheinen sie involviert zu sein. So zeigte sich bei Patienten mit RA ein Anstieg von ILC1 und ILC3 in Lymphknoten. Eine Subpopulation von ILC3 wurde zusätzlich in der Synovia erkrankter Patienten nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass sie mithilfe der Zytokine IL-17 und IL-22 eine ähnliche Funktion in der Entwicklung der RA haben könnten, wie Th17-Zellen. Beim Erreichen einer Remission der RA konnten vermehrt ILC2 im Blut detektiert werden, welche nachweislich mit IL-13 zu einer Hemmung der ILC1-Produktion führte und somit antiinflammatorisch auf die Synovia wirkte [97,105]. Die genauen Mechanismen der ILCs in Bezug auf die Entwicklung von Autoimmunität und wie sie dabei das adaptive Immunsystem beeinflussen, sind noch ungeklärt und derzeit Gegenstand aktueller Forschung.

6.4 ZIELSETZUNG DER STUDIE

Die RA wird durch Veränderungen des Mikrobioms beeinflusst. Forschungen der klinischen Immunologie ergaben, dass eine vorangegangene CDI mit einer Abnahme der CIA-Inzidenz und der Polarisation von T-Zell-Populationen assoziiert war [106]. Diese Erkenntnisse lassen Rückschlüsse darauf zu, dass das intestinale Mikrobiom bei der Modulation des Immunsystems von Bedeutung ist und ein Einfluss auf die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen, wie der RA, denkbar ist. Ebenfalls zeigten andere Studien Veränderungen in der ILC-Zusammensetzung, von denen bekannt ist, dass sie – ähnlich zu den T-Helferzellen – Einfluss auf die Pathomechanismen der RA nehmen können [97].

Ziel dieser Studie war es deshalb ein umfangreiches Verständnis über den Einfluss einer Veränderung der physiologischen Zusammensetzung der Darmflora auf die Entwicklung einer Arthritis zu erlangen. Durch die detaillierte Untersuchung verschiedener Populationen des Immunsystems sollten mögliche Modulationen der ILC-Zusammensetzung detektiert werden. Die Untersuchung dieser Veränderungen kann Einblicke in das Zusammenwirken unterschiedlicher Krankheitsentitäten zulassen und kann gegebenenfalls dazu dienen, verschiedene Subtypen der RA zu identifizieren. So könnten Erkenntnisse aus der Beziehung der Darm-Gelenk-

Achse dieser Arbeit zukünftig, in Kombination mit klinischen Studien an Menschen, bei der Prävention von RA durch Adressierung von neuen Risikofaktoren oder auch bei der Identifizierung von auslösenden Agenzien an der Entwicklung neuer, innovativer Therapiemöglichkeiten beitragen.

VII. METHODEN

7.1 VERSUCHSTIERE UND TIERHALTUNG

Bei denen in dieser Studie verwendeten Mäusen handelt es sich um Nachkommen der ersten Generation (F1) des Mausstamms DBA/1J x B10.Q. Die Züchtung der Tiere erfolgte im Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie unter einer spezifischen Pathogen-freien (SPF) Umgebung. Ab einem Alter von mind. 8 Wochen bis maximal 12 Wochen erfolgte die Einführung in die Versuchsreihe. Einige Tage vor Versuchsbeginn wurden die Tiere in die infektiologische Haltung im Institut für medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene überführt. Dort wurde den Tieren mehrere Tage Zeit gegeben, sich an die Umgebung zu gewöhnen. Die Haltung erfolgte in einzeln belüfteten Käfigen mit maximal 5 Tieren. Die Mäuse erhielten Nestbaumaterialien sowie Rückzugsmöglichkeiten. Die Haltung erfolgte in einer klimatisierten Umgebung mit konstanten Temperaturen zwischen 22-24 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 37 ± 5 % sowie einem künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden. An jedem zweiten Tag wurde das Trinkwasser gewechselt und, je nach Verschmutzungsgrad, mindestens einmal die Woche der Stall gereinigt und mit neuem Streu versorgt. Die Ernährung erfolgte *ad libitum* mittels Leitungswasser und Standardfutter. Einmal am Tag wurde das Gewicht der Tiere ermittelt, sowie ein Scoring auf Arthritis durchgeführt. Alle Tierversuchsvorhaben, auf denen diese Arbeit aufbaut, wurden gemäß §8 Absatz 1 TierSchG vom Tierschutzdienst des Landesamtes für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern geprüft und bewilligt (Aktenzeichen 7221.3-1-016/19).

7.2 CLOSTRIDIODES DIFFICILE ANZUCHT UND AUFBEREITUNG

Für die Studie wurde der *C. difficile* Stamm VPI 10463 verwendet. Die Kultivierung der *C. difficile* erfolgte unter streng anaeroben Bedingungen (80 % N₂, 10 % CO₂ und 10 % H₂). Für die Anzucht wurden 24-30 Stunden vor geplanter Infektion der Tiere, die zuvor bei -80°C gelagerten Glycerol Stammsuspension aufgetaut und in der anaeroben Arbeitsstation auf Brain-Heart-Infusion (BHIS) Agarplatten, welche zusätzlich mit 0,1 % L-Cystein sowie 5 g/L Hefeextrakt angereichert wurde, ausgesät. Nach 24 Stunden wurde eine einzelne Kolonie geerntet und in BHIS-Flüssigmedium, ebenfalls mit 0,1% L-Cystein und 5 g/L Hefeextrakt supplementiert, für weitere 16 Stunden inkubiert. Anschließend wurde am Tag der Infektion aus der Vorkultur eine neue Kultur erstellt und bis zur logarithmischen Wachstumsphase kultiviert, welche in der Regel nach 3 Stunden erreicht war. Folgend wurde die Kultur auf eine optische Dichte

bei 600 nm (OD) von 0,5 eingestellt, was dann einer Bakterienkonzentration von $1,5 \cdot 10^8$ Koloniebildende Einheiten (KBE) pro mL entsprach. Diese wurde mit BHIS-Flüssigmedium verdünnt, bis man die gewünschte $1 \cdot 10^5$ KBE in einem Volumen von 200 µl erhielt. Für die Bestimmung der genauen Bakterienzahl wurde parallel eine Verdünnungsreihe der zuvor eingestellten OD auf den BHIS-Agarplatten angelegt und für weitere 24 Stunden inkubiert. Die Kolonien wurden am nächsten Tag gezählt und so die tatsächliche bakterielle Dosis bestimmt, welche der Maus appliziert wurde. Der Transport und die Applikation erfolgten möglichst zügig, um eine Verminderung der Vitalität der Bakterien durch den Kontakt mit Sauerstoff zu verhindern.

Die Glycerol Stammsuspension wurde in freundlicher Zusammenarbeit mit Frau Dr. Katharina Ekat und Yvonne Humboldt erstellt. Dafür wurde aus der Stammhaltung der Mikrobiologie *C. difficile* aufgetaut und für etwa 24 Stunden kultiviert. Anschließend erfolgte noch die Überführung in eine Flüssigkultur, aus welcher dann die Stammsuspensionen mit einem finalen Anteil von 20 % Glycerol bei -80 °C eingefroren wurden.

7.3 ANTIBIOSE

Da für die Entwicklung einer CDI eine Dysbiose der natürlichen Darmflora erforderlich war, wurde sieben Tage vor der geplanten Infektion eine Antibiotikabehandlung nach dem Protokoll von Chen et al. durchgeführt [107]. Diese Vorbehandlung führte zu einer Zerstörung des physiologischen Mikrobioms und ermöglichte die Fehlbesiedlung durch *C. difficile*. Dafür wurde zu Beginn drei Tage lang ein Antibiotikagemisch über das Trinkwasser verabreicht. Die Konzentrationen der einzelnen Antibiotika und der daraus folgenden Tagesdosis wurde anhand des durchschnittlichen Gewichtes (30 g je Maus) und dem zu erwartenden Tagesbedarf an Trinkwasser (3 mL) berechnet (siehe **Tabelle 1**). Nach der dreitägigen Behandlung wurde den Mäusen zwei Tage lang normales Leitungswasser zur Verfügung gestellt. Am Tag vor der geplanten Infektion mit *C. difficile* wurde den Tieren mittels einer Nadel 0,3 mg in einem Volumen von 100 µL Clindamycin (Dosis/ Maus: 10 mg/kg), intraperitoneal in den rechten unteren Quadranten des Abdomens appliziert.

Tabelle 1: Verwendete Antibiotika zur Vorbehandlung

Antibiotikum	Konzentration im Trinkwasser	Erforderliche Tagesdosis
Colistin	850 U/mL	4,2 mg/kg
Gentamicin	0,035 mg/mL	3,5 mg/kg
Kanamycin	0,4 mg/mL	40 mg/kg
Metronidazol	0,215 mg/mL	21,5 mg/kg
Vancomycin	0,045 mg/mL	4,5 mg/kg

7.4 INFEKTION IM *CLOSTRIDIODES DIFFICILE*

Einen Tag nach der Clindamycin-Applikation erhielten die Mäuse entweder 10^5 KBE des zuvor kultivierten *C. difficile*-Stammes oder nur das zur Verdünnung verwendete BHIS-Flüssigmedium als Kontrolle. Der Stichprobenumfang belief sich in der Infektionstiergruppe auf $n = 7-9$ Tiere und in der Kontrollgruppe auf $n = 3-5$ Tiere. Die Mäuse wurden im Zwangsgriff fixiert



Abbildung 1: Inokulation der Mäuse. Dargestellt wird hier die Prozedur der Inokulation der Mäuse mit *C. difficile* bzw. BHIS-Flüssigmedium. Die Maus befindet sich im Zwangsgriff zur Fixierung und Überstreckung des Kopfes. Unter leichten Drehbewegungen wurde die Schlundsonde über den Ösophagus vorgeschoben. Anschließend erfolgte die Applikation von 200 μ L des Bakterium- bzw. Kontrollmediums.

und die Schlundsonde wurde seitlich an der Zunge vorbei über die Speiseröhre eingeführt und abschließend die Flüssigkeit appliziert (**Abbildung 1**). Während des Vorganges wurde die Maus stetig beobachtet, um die Applikation zum Beispiel bei Anzeichen einer Flüssigkeitsaspiration sofort abbrechen zu können. Im Anschluss an die Prozedur wurden die Arbeitsflächen mit einem sporiziden Desinfektionsmittel wie Dismozon® plus gereinigt, um so auch die Gefahr einer Kontamination der Kontrollgruppen mit den Sporen der Bakterien möglichst gering zu halten.

7.5 MONITORING UND BEHANDLUNG KLINISCHER *CLOSTRIDIODES DIFFICILE*-INFEKTIONEN

Ab dem Tag nach der Infektion wurden die Mäuse mindestens einmal am Tag auf Gewichtsverlust, Durchfall, Allgemeinzustand und Spontanverhalten überprüft. Um den Gewichtsverlust zu bewerten, wurde als Ausgangswert das Gewicht am Tag der Infektion genommen. Ebenfalls wurde das Gewicht als Anhaltspunkt für die Infektion herangezogen, da bei mehreren Tieren in einem Käfig Durchfall nicht zweifelsfrei nur einem Tier zugeordnet werden konnte. Im Vorfeld der Versuche wurden Indikatoren definiert, die das Ausmaß der Belastung der Tiere während der Versuche einschätzen sollten (siehe **Tabelle 2**). Für jedes Bewertungskriterium (I-IV) wurden maximal 25 Punkte vergeben. Der Gesamtbelastungsgrad und die daraus resultierenden Maßnahmen ergaben sich aus der Addition der einzelnen Kriterien. Bei Auftreten von Gewichtsverlust über 5 % und dem Nachweis von Durchfall im Käfig wurde den Tieren 125 mg Metamizol auf 100 ml Trinkwasser *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Das sollte die Schmerzen und mögliche Bauchkrämpfe verringern. Bei einem Belastungsscore von über 25 wurde der Versuch abgebrochen und die Mäuse frühzeitig durch die finale Narkose euthanasiert.

7.6 INDUKTION DER KOLLAGEN-INDUZIERTEN ARTHRITIS

Für die Entwicklung Arthritis-ähnlicher Symptome wurden die F1 Mäuse des DBA/1J x B10.Q-Mausstammes verwendet, da sie den H2q-Haplotyp den *Major Histocompatibility Complex* (MHC) Klasse II tragen. Dies ermöglicht es nach der Immunisierung mit bovinem Kollagen eine Immunreaktion gegen autologes (körpereigenes) Kollagen auszulösen [108,109]. Die Induktion der Arthritis erfolgte durch Immunisierung an Versuchstag 28 und drei Wochen später, an Tag 49, durch wiederholte Immunisierung. Dafür wurde bovines Kollagen Typ II verwendet, welches zuvor in 0,1 M Essigsäure für etwa 12 Stunden unter sanftem Rühren bei etwa 4 °C

Tabelle 2: Score zur Einschätzung der Belastung der Mäuse im Versuch

Beobachtung	Punktwertung
I Körpergewicht bezogen auf Ausgangsgewicht	
- unbeeinflusst oder Anstieg	0
- Gewichtsreduktion > 5 %	5
- Gewichtsreduktion > 10 %	10
- Gewichtsreduktion > 20 %	25
II Allgemeinzustand	
- Fell glatt, glänzend; Körperöffnungen sauber	0
- Fell stumpf, ungeordnet, ungepflegte Körperöffnungen, Augen trüb	5
- verklebte oder feuchte Körperöffnungen, anormale Haltung, Augen trüb; hoher Muskeltonus	10
- Krämpfe, Lähmungen; Tier fühlt sich kalt an, moribund	25
III Spontanverhalten	
- normales Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Anblasen und Berührung, Neugier, Sozialkontakte)	0
- ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik	5
- Selbstisolation, Lethargie; ausgeprägte Hyperkinetik bzw. Verhaltensstereotypen; Koordinationsstörungen	10
- Schmerzlauten beim Ergreifen; Selbstamputation (Autoaggression)	25
IV Versuchsspezifische Kriterien	
- keine Auffälligkeiten	0
- Durchfall mit Gewichtsverlust bis ≤10%	5
- Durchfall mit Gewichtsverlust zwischen 10% und <20%	10
- Durchfall mit Gewichtsverlust >20%	25
- Offene Wunden im Bereich der Gelenke oder Pfoten	25
Bewertung, Maßnahmen	
Belastungsgrad 0 = keine Belastung	0
Belastungsgrad 1 = geringe Belastung; sorgfältig weiter beobachten (Verkürzung der Beobachtungsintervalle)	5
Belastungsgrad 2 = mittelgradige Belastung; sorgfältig weiter beobachten bei verkürzten Beobachtungsintervallen, Versuchsleiter in Kenntnis setzen	10-20
Belastungsgrad 3 = hochgradige Belastung; Versuch abbrechen	25 oder höher

gelöst wurde. Für die Primärimmunisierung wurde eine Emulsion aus Kollagen und komplettem Freund's Adjuvans (CFA) bzw. für den Boost eine Emulsion aus inkompletem Freund's Adjuvans (IFA) und dem Kollagen hergestellt. Für die Mischung der Emulsion wurde Kollagen und die jeweilige Adjuvans im Verhältnis 1:1 in jeweils eine Spritze aufgezogen und über eine

Mischkammer miteinander verbunden. Nachdem die Stabilität der Emulsion überprüft wurde, erfolgte die Fixierung der Tiere für die Injektion in einem sogenannten Restrainter. Ziel war es, durch die Fixierung einen optimalen Zugang zur Schwanzbasis zu erhalten. Appliziert wurde den Tieren 140 μ L der Emulsion subkutan an die Schwanzbasis, welche insgesamt 140 μ g des Kollagens enthielten. Für den Boost erfolgte die Injektion etwa 1cm distaler der ersten Applikationsstelle mit dem gleichen Volumen und somit auch der identischen Menge Kollagen (**Abbildung 2**).

7.7 MONITORING UND BEHANDLUNG DER KOLLAGEN-INDUZIERTEN ARTHRITIS

Nach der Immunisierung wurden die Tiere jeden Tag auf das Auftreten von arthritischen Veränderungen, wie beispielsweise Rötungen und Schwellungen, untersucht. Das Auftreten dieser typischen Beschwerden ist jedoch erst nach dem Boost zu erwarten. Für das Monitoring wurde ein Scoring-System verwendet (**Abbildung 3**), bei diesem Schema wurden alle vier

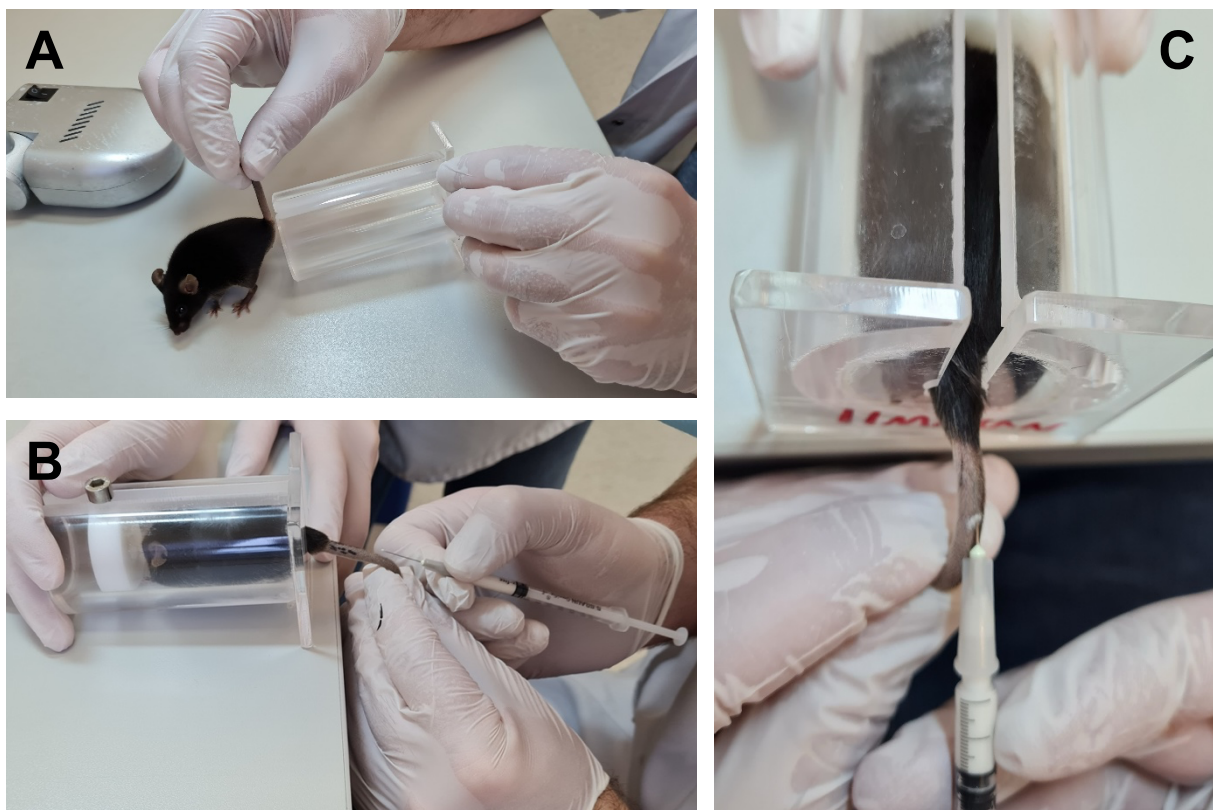


Abbildung 2: Durchführung der Primär- bzw. Sekundärimmunisierung. Zu Beginn wurde die Maus in den Restrainter eingeführt (**A**) und anschließend fixiert (**B**). Über eine Kanüle, welche parallel zur Schwanzvene Richtung Schwanzbasis eingeführt wurde (**C**), applizierten wir 140 μ g bovines Kollagen Typ II, welches entweder mit CFA (Primärimmunisierung) bzw. IFA (Sekundärimmunisierung) versetzt war.

Extremitäten berücksichtigt. Für jeden betroffenen Finger bzw. für jede betroffene Zehe wurde ein Punkt vergeben. Dabei ist zu beachten, dass Mäuse an den Vorderläufen nur vier Finger besitzen, an den Hinterläufen jedoch fünf Finger. Für eine betroffene Hand- bzw. Fußwurzel wurden 5 Punkte vergeben, für ein betroffenes Hand- bzw. Sprunggelenk ebenfalls 5 Punkte. Die einzelnen Punkte wurden addiert, sodass ein maximaler Arthritis Score von 58 Punkten erreicht werden konnte. Des Weiteren wurde den Tieren nach der Immunisierung Tramadol mit der Konzentration von 1 mg/mL über das Trinkwasser beigesetzt, da ab diesem Zeitpunkt aufgrund der Arthritis und auch der Applikation von CFA bzw. IFA mit Schmerzen zu rechnen war.

7.8 ANÄSTHESIE DER TIERE

Die Tiere wurden am jeweils für sie vorgesehenen Versuchsende mit 0,75 mg Ketamin mit 0,05 mg Xylazin pro 10 g Körpergewicht narkotisiert. Dafür wurden die Mäuse wieder mit dem

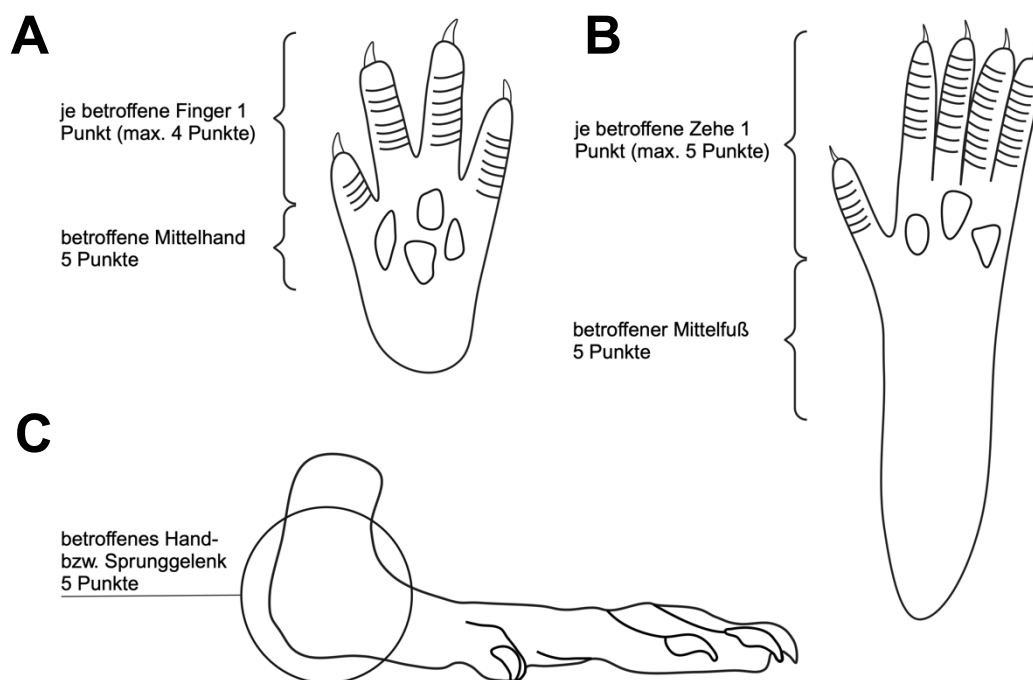


Abbildung 3: Scoring-System der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA). Hier dargestellt sind ein Vorderlauf (**A**), ein Hinterlauf (**B**) und ein Sprung- bzw. Handgelenk (**C**) der Maus. Punkte gab es für das Auftreten von Rötungen und Schwellungen an den eingezeichneten Arealen. Pro betroffene Finger gab es 1 Punkt, pro betroffene Hand- bzw. Fußwurzel gab es 5 Punkte und pro betroffenes Hand- bzw. Sprunggelenk wurden 5 Punkte vergeben, sodass man in Summe aller vier Extremitäten auf einen Maximalscore von 58 Punkten kam.

Zwangsgriff fixiert um das Gemisch intraperitoneal applizieren zu können. Die Narkosetiefe wurde überprüft, indem mit einer Pinzette die Reflexe der Schwanzspitze getestet wurden. Nachdem die Reflexe erloschen waren, wurden die Tiere final mit einer zervikalen Dislokation geopfert. Diese Prozedur wurde auch durchgeführt, wenn ein Tier frühzeitig aus dem Versuch genommen werden mussten, beispielsweise aufgrund von zu hohem Gewichtsverlust oder auch einer zu hohen körperlichen Belastung durch die Immunisierung.

7.9 AUFARBEITUNG UND ANALYSE DER ENTNOMMENEN ORGANE

Nach der zervikalen Dislokation erfolgte die Entnahme der inguinalen und der mesenterialen Lymphknoten. Für die Entnahme der mesenterialen Lymphknoten wurde sich an dem Protokoll von Qiu et al. orientiert [110]. Im Anschluss wurde den Tieren der Dünndarm und bei ausgewählten Tieren für die histologische Aufarbeitung auch der Dickdarm entnommen.

Nach Entnahme der Lymphknoten wurden diese bis zur weiteren Aufarbeitung jeweils in einem Tube mit Running Buffer (RB) auf Eis gelagert. Zur weiteren Untersuchung wurden die Lymphknoten durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 70 µm vereinzelt und anschließend die Zellen bei 400 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen bis zur gemeinsamen Färbung mit den Zellen der Dünndarmmukosa auf Eis gelagert.

Nach der Entnahme des Dünndarms wurde darauf geachtet, diesen konstant mit PBS feucht zu halten. Das restliche anhaftende mesenteriale Fett wurde entfernt und mit einer Pinzette der restliche Stuhl und Mucus vorsichtig aus dem Darm gedrückt. Anschließend wurde er der Länge nach aufgeschnitten, in 2–3 cm große Stücke unterteilt und bis zur endgültigen Aufarbeitung in RPMI-Vollmedium (siehe Anhang) auf Eis gelagert. Die darauffolgenden Schritte orientierten sich an dem Protokoll von Qiu et al. [110]. Zur weiteren Aufreinigung wurden die Därme mit RPMI ohne Zusätze gewaschen. Danach wurden die Därme in mehreren aufeinanderfolgenden Inkubationsstufen bei konstanten 37 °C und unter mechanischer Durchmischung (230 rpm) verdaut. Zu Beginn wurde die DTT-Lösung den Proben beigegeben und für 20 min inkubiert. Der Überstand wurde über einem 70 µm Filter in ein Tube überführt und zentrifugiert. Anschließend wurde der Schritt wiederholt. Im nächsten Schritt wurden die Därme für 30 min mit einer EDTA-Lösung inkubiert und anschließend der Überstand verworfen. Dieser Schritt wurde ebenfalls wiederholt. Im letzten Schritt der Verdauung wurden die Därme mit einer Kollagenase-Lösung für 45 min inkubiert. Danach wurden die Därme mit der Verdau-Lösung über einem 70 µm Sieb vereinzelt und mit den Zellen aus den Überständen der DTT-Lösung zusammengeführt. Die Zellen wurden zentrifugiert und in 44 % Percoll-Lösung resuspendiert und

Tabelle 3: Inhaltsstoffe der verschiedenen Lösungen

DTT-Lösung (50 mL)		EDTA-Lösung (50 mL)		Kollagenase-Lösung (25 mL)	
Reagenz	Menge	Reagenz	Menge	Reagenz	Menge
10x HBSS [-] $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	5 mL	10x HBSS [-] $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	5 mL	Kollagenase IV (100 U/mL)	15 mg
10x HEPES-Bicarbonat-Puffer	5 mL	Na_2EDTA	24 mg	FCS	2,5 mL
FCS	5 mL	Aqua dest.	45 mL	0,5 M MgCl_2	50 μL
Dithiothreitol (DTT)	7-8 mg			0,5 M CaCl_2	50 μL
Aqua dest.	35 mL			RPMI-1640	22,4 mL

im Anschluss mit einer 67 % Percoll-Lösung unterschichtet. Die Gradientensuspension wurde bei Raumtemperatur für 20 min bei 1600 g ungebremst zentrifugiert. Ziel war es, eine Interphase zwischen den Gradienten zu erzeugen, in welcher sich die Leukozyten akkumulierten. Nach dem Zentrifugieren wurden die Zellen vorsichtig aus der Interphase abpipettiert, mit ausreichend RPMI gewaschen und anschließend erneut zentrifugiert. Das entstandene Pelett wurde in RB resuspendiert. Zuletzt wurde in den jeweiligen Proben der Lymphknoten und Dünndarmmukosa mithilfe einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt.

7.10 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE EINZELZELL-ANALYSE

Zur genauen Identifizierung der einzelnen Zellpopulationen wurden die Zellen unter der Verwendung von Antikörpern markiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dafür wurden 500.000 der zuvor gezählten Zellen in 1 mL PBS überführt. Initial wurden die Zellen mit dem Lebend/ Tod Farbstoff ZombieNIR für 15 min auf Eis inkubiert. Da die Qualität der Antikörper bei direkter Einwirkung von Licht abnimmt, wurden alle Inkubationsschritte im Dunkel vorgenommen. Die Zellen wurden nach der Inkubation, zentrifugiert und wieder in Running Buffer resuspendiert. Anschließend wurden eine Fc-Blockierung zur Unterdrückung unspezifischer Antikörper-Bindung mit einem Gemisch aus 1 μL TrueStrain FcX und 5 μL fetales Kälberserum (FCS) vorgenommen. Dafür wurden sie mit dem TrueStrain-FCS-Gemisch für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte die Markierung der Oberflächen-Antigene mit einem Gemisch aus den in **Tabelle 4** beschriebenen Antikörpern für 20 min bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden erneut in Running Buffer aufgenommen und zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit dem True-Nuclear Transcription Factor Buffer Set behandelt. Zuerst wurden sie bei Raumtemperatur für 45 min im Transcription Factor Fix inkubiert, anschließend in Perm Buffer resuspendiert und zentrifugiert. Darauf folgte, wie bereits bei der Markierung der Oberflächenantigene, eine Blockierung der Fc-Rezeptoren für 20 min. Danach wurden die Zellen

Tabelle 4: Antikörper für Durchflusszytometrie

Oberflächen Antikörper			Intrazelluläre Antikörper		
Antikörper	Fluorophor	Menge	Antikörper	Fluorophor	Menge
CD4	PerCP	1 µL	FoxP3	Alexa Fluor 647	1,5 µL
CD45	Brilliant Violet 605	2,5 µL	GATA3	Brilliant Violet 421	2,5 µL
CD127	PE	5 µL	RoRyT	Brilliant Violet 786	0,5 µL
Lin	FITC	10 µL	T-bet	PE/Dazzle 594	3,8 µL
ST2	PE-Cy7	0,6 µL			

für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit den in **Tabelle 4** gelisteten Intrazellulären Antikörpern der Transkriptionsfaktoren inkubiert. Abschließend wurden die Zellen zuerst mit Perm Buffer gewaschen und zentrifugiert, im Anschluss nochmal mit RB gewaschen und zentrifugiert und dann für die durchflusszytometrische Einzelzell-Analyse in 250 µL Running Buffer resuspendiert. Gemessen wurden sie am Cytex Aurora.

7.11 HISTOLOGISCHE AUFARBEITUNG

Histologisch untersucht wurden zum einen die Pfoten der Tiere, zum anderen das Colon. Die Pfoten wurden für maximal zwei Wochen in 4 % Formaldehyd fixiert und anschließend über mehrere Wochen mit UseDecal, einer EDTA-Lösung, entkalkt. Nach vollständiger Entkalkung wurden die Proben für 30 min unter laufendem Leitungswasser gespült und folgend in 70 % Ethanol zur Dehydratation vor der Einbettung in Paraffin inkubiert.

Die Dickdärme wurden nach einem Protokoll von C. Moolenbeek & E. J. Ruitenbergh zu einer sogenannten *Swiss Roll* präpariert [111]. Dafür wurde der Darm der Länge nach aufgeschnitten und restlicher Stuhl entfernt. Anschließend wurde der Darm, mit der Schleimhaut nach außen zeigend, der Länge nach auf ein Holzstäbchen aufgewickelt und danach ebenfalls für maximal zwei Wochen in 4 % Formaldehyd fixiert. Der Vorteil dieser Methode ist, dass man in einem Präparat den Darm über seine vollständige Länge einsehen kann.

Die Lagerung aller Proben in Histokassetten erfolgte in 70 % Ethanol zur Dehydratation vor der Einbettung in Paraffin. Die Einbettung erfolgte mit freundlicher Unterstützung durch Daniel Wolter (Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie).

Im Anschluss wurden serielle Gewebeschnitte der Pfoten in Transversalebene und Darmschnitte mit einer Dicke von etwa 5 µm angefertigt. Zur besseren Darstellung wurde eine Hämatoxylin und Eosin (H&E) Färbung (siehe Anhang) angefertigt. Die Prozedur war bei beiden

Präparaten nahezu identisch. Unterschiede lagen in der Inkubationszeit von Hämalaun und Eosin.

7.12 STATISTISCHE ANALYSE

Die Daten wurden mittels des Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft. Um statistische Unterschiede zwischen zwei Gruppen zu ermitteln, wurde je nach Vorliegen einer Normalverteilung entweder t-Tests oder Mann-Whitney *U* Tests verwendet. Bei Vergleichen zwischen den einzelnen Gruppen wurden entweder einfaktorielle Varianzanalysen (ANOVA) oder Kruskal-Wallis-Tests mit anschließenden post-hoc Tests (*Tukey's multiple comparison* bzw. *Dunn's multiple comparison*) durchgeführt. Die Gewichtsverläufe der Tiere wurden in Bezug auf den Unterschied zwischen Infektion und Kontrolle und über die Zeit mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse untersucht, gefolgt von *Šídák's multiple comparisons* zur *p*-Wert Korrektur. Für die Inzidenz wurde eine umgekehrte Kaplan-Meier-Kurve zu Hilfe genommen und mittels Log-Rank (Mantel-Cox)-Test verglichen. Für die Darstellung der Daten wurde bei parametrischen Daten als Lageparameter der Mittelwert und als Varianzmaß der Standardfehler des Mittelwertes angegeben und bei nichtparametrischen Daten der Median und der Interquartilsabstand. *P*-Werte wurden als signifikant definiert, wenn sie unter 0,05 lagen. Dargestellt wurden die Signifikanzen folgendermaßen:

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

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

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

**** $p < 0,0001$

VIII. ERGEBNISSE

8.1 ÜBERBLICK ÜBER DEN STUDIENAUFBAU UND EINTEILUNG DER VERSUCHSGRUPPEN

Um zu untersuchen, wie sich eine CDI auf das Immunzellgleichgewicht und die Entwicklungsstufen einer CIA auswirkt, wurden Tiere nach Infektion zu unterschiedlichen Zeitpunkten geopfert. Der vollständige Ablauf der Studie ist in **Abbildung 4** dargestellt. Beide Gruppen erhielten zu Beginn eine dreitägige Vorbehandlung mit einem Antibiotikagemisch, eine darauffolgende zweitägige Auswaschphase mit Trinkwasser und einer anschließenden intraperitonealen Applikation von Clindamycin. Darauf folgte die Verabreichung der *C. difficile*-Bakterien bzw. des BHIS-Flüssigmediums. Um die verschiedenen Entwicklungsstadien der CIA zu untersuchen, wurde eine zweimalige Immunisierung mit zeitlichem Abstand durchgeführt. Dieser Versuchsaufbau diente nicht nur dazu etwaige Veränderungen der manifesten Arthritis zu zeigen, sondern auch Hinweise auf die Entstehung präklinischer Autoimmunitäten zu liefern. Als Versuchstag 0 wurde der Beginn der Verabreichung der Antibiotika über das Trinkwasser definiert. Insgesamt gab es sieben Versuchsgruppen mit insgesamt 93 Tieren (siehe **Tabelle 5**). Vier Tiere wurden entweder vorzeitig, aufgrund zu hoher Belastung (siehe **Tabelle 2**), geopfert oder verstarben vor ihren individuellen Endzeitpunkten.

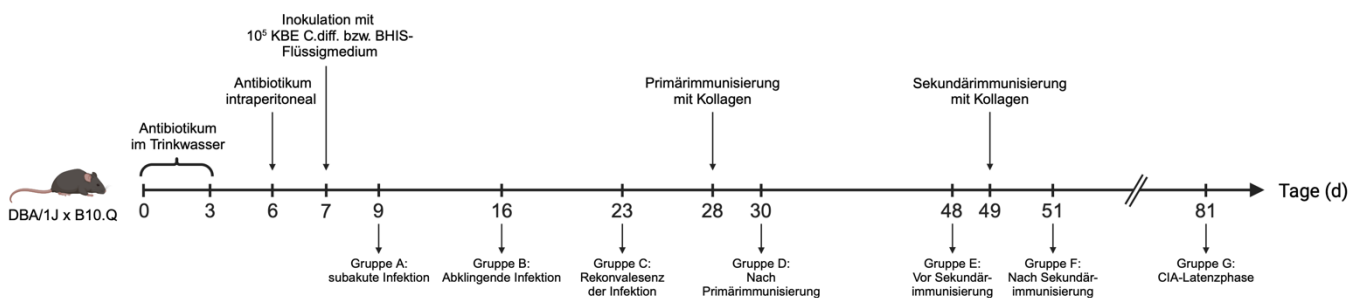


Abbildung 4: Zeitlicher Aufbau und Interventionen des Experimentes. Anhand dieses Zeitstrahls werden hier zum einen die Interventionen, welche an den Tieren durchgeführt wurden (oberhalb des Zeitstrahls) und zum anderen die Endpunkte der einzelnen Versuchsgruppen (unterhalb des Zeitstrahls) dargestellt. Begonnen hat der Versuch mit der dreitägigen Antibiotika-Behandlung über das Trinkwasser mit anschließendem Washout mit normalem Trinkwasser für weitere zwei Tage. An Tag 6 wurde die intraperitoneale Applikation von Clindamycin durchgeführt. An Tag 7 erfolgte dann die Applikation von *C. difficile* bzw. BHIS-Flüssigmedium, wodurch die Tiere in eine Infektions- bzw. Kontrollgruppe unterteilt wurden. Die Primärimmunisierung wurde an Tag 28 mit einer Mischung aus Kollagen und CFA vorgenommen, während an Tag 49 die Sekundärimmunisierung (Boostimmunisierung) mit einer Mischung aus Kollagen und IFA stattfand. Die finalen Endpunkte waren je nach Gruppe an Tag 9, 16, 23, 30, 48, 51 oder 81.

Tabelle 5: Übersicht Versuchstiergruppen

Gruppenbezeichnung	Abkürzung	Anzahl (n)	Endzeitpunkt (Tage)	Anzahl Immu- nisierung (n)
		Infiziert / Kontrolle		
Subakute Infektion	Gruppe A	7 / 4	9	0
Abklingende Infektion	Gruppe B	8 / 4	16	0
Rekonvaleszenz der Infektion	Gruppe C	8 / 4	23	0
Nach Primärimmunisierung	Gruppe D	8 / 4	30	1
Vor Sekundärimmunisierung	Gruppe E	8 / 4	48	1
Nach Sekundärimmunisierung	Gruppe F	8 / 4	51	2
CIA-Latenzphase	Gruppe G	8 / 5	81	2

Gruppe A (subakute Infektion) wurde zwei Tage nach der Inokulation geopfert. An Tag 16, dies entsprach neun Tage nach Infektion, wurde Gruppe B (abklingende Infektion) geopfert. Die Opferung von Gruppe C (Rekonvaleszenz der Infektion) erfolgte an Tag 23, 16 Tage nach Applikation der Bakterien. Die ersten drei Gruppen spiegelten nur den Einfluss der Infektion wider. An Tag 28 erfolgte die erste Immunisierung mit einer Kombination aus bovinem Kollagen Typ II und CFA. Anschließend erreichte Gruppe D (nach Primärimmunisierung) den Endzeitpunkt an Tag 30, zwei Tage nach der Primärimmunisierung. An Tag 48, einen Tag vor der Sekundärimmunisierung wurde Gruppe E (vor Sekundärimmunisierung) geopfert. Diese zwei Gruppen zeigten den Einfluss der Primärimmunisierung auf die ILCs, da sie kurz nach der Primär- und unmittelbar vor der Sekundärimmunisierung ihren Endzeitpunkt erreichten. Die zweite Immunisierung wurde an Tag 49, also drei Wochen nach der Primärimmunisierung vorgenommen. Die Opferung von Gruppe F (nach Sekundärimmunisierung) erfolgte an Tag 51, zwei Tage nach der Sekundärimmunisierung. Zuletzt wurde Gruppe G (CIA-Latenzphase) mit einem Abstand von 32 Tagen zur Sekundärimmunisierung geopfert. Dieser Abstand zur zweiten Immunisierung ermöglichte die Manifestation klinischer CIA-Symptome in den Mäusen. Die letzten beiden Gruppen verdeutlichten somit die Wirkungen einer zweiten Immunisierung bzw. einer manifesten Arthritis auf die ILCs. Nach Erreichen des Endzeitpunktes wurden den Mäusen inguinale und mesenteriale Lymphknoten, sowie der Dünndarm entnommen.

8.2 DIE INOKULATION MIT *C. DIFFICILE* VPI 10463 FÜHRTE ZU EINER SUBAKUTEN INFektion

Um die Infektion quantifizieren zu können, wurde das Gewicht am Tag der Infektion/Applikation als Ausgangswert (100 %) definiert. Erreichte eine Maus einen Gewichtsverlust von 5 % wurde

sie als klinisch krank gewertet, da die Diarrhoe als Merkmal nicht zweifelsfrei einem Tier zugeordnet werden konnte. Der größte Gewichtsverlust beider Gruppen war in den ersten beiden Tagen nach der Inokulation zu beobachten, wobei der Verlust bei den erkrankten Tieren mit 1,6 % ($\pm 0,56$) zu den Kontrolltieren mit 0,72 % ($\pm 0,52$) tendenziell, jedoch nicht signifikant, höher war (**Abbildung 5A**). Die Untersuchung des Gewichtsverlaufes zwischen den beiden Gruppen zu den jeweiligen Versuchstagen ergab keine signifikanten Unterschiede, jedoch deutete sich an Tag 8 eine tendenziell stärkere Abnahme des Gewichtes in der Infektionsgruppe an. Ebenfalls war ein Trend der maximal gemessenen Gewichtsverluste erkennbar. Dafür wurde die Differenz zwischen dem Ausgangswert an Tag sieben und dem höchst gemessenen prozentualen Gewichtsverlust in den ersten zwei Tagen bei Gruppe A beziehungsweise ersten sieben Tagen bei Gruppe B–G gebildet. Dort konnte ein durchschnittlicher maximaler Gewichtsverlust von 4,00 % ($\pm 0,62$) nach der Infektion und bei der Kontrolle 3,20 % ($\pm 0,80$) beobachtet werden. Der dabei höchste gemessene Einzelwert lag bei 19,81 % (CDI) bzw. 13,42 % (Kontrolle) (**Abbildung 5B**). Ebenso erreichte die infizierte Gruppe ihr Ausgangsgewicht im Mittel erst wieder an Versuchstag 11, wohingegen die Kontrollgruppe sich bereits einen Tag früher, erholte.

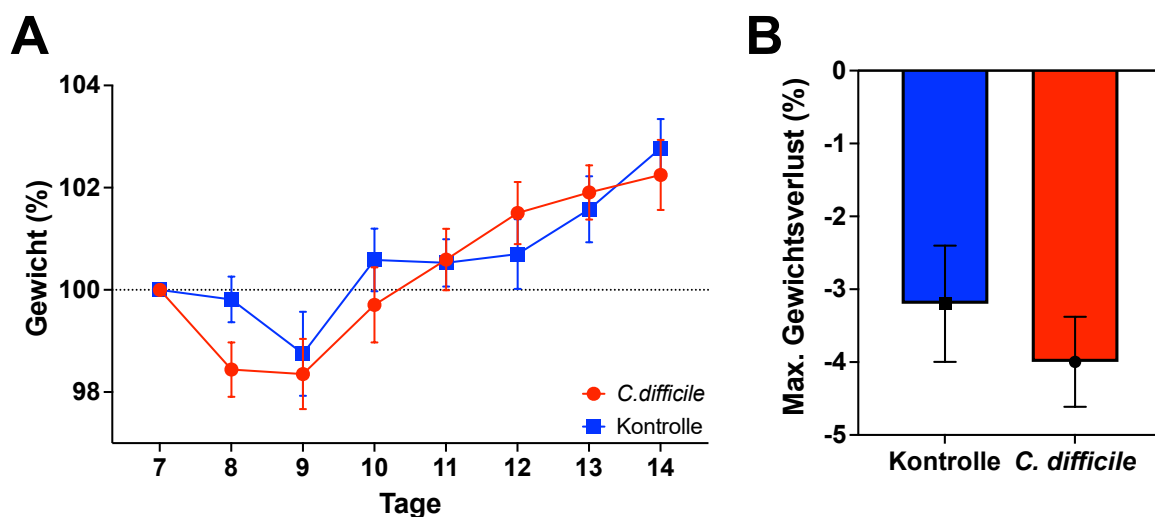


Abbildung 5: Die Inokulation von *C. difficile* VPI 10463 führte zu einer subakuten Infektion. Dargestellt ist der prozentuale Verlauf des Ausgangsgewichtes der Infektions- bzw. Kontrollgruppe in den ersten sieben Tagen nach der Inokulation mit *C. difficile* bzw. BHIS-Flüssigmedium. Hier dargestellt sind nur die Gruppen B–G, da Gruppe A bereits zwei Tage nach Infektion bzw. Applikation seinen Endpunkt erreicht hat. Zweifaktorielle Varianzanalyse (2-Way-ANOVA), $p=0,21$, Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwertes (**A**). Dargestellt wird die Differenz in Prozent zwischen dem Ausgangswert an Tag 7 sowie das geringst gemessene Gewicht in den ersten sieben Tagen bei Gruppe B–G bzw. zwei Tagen bei Gruppe A. t-Test, $p=0,44$, Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwertes (**B**).

Neben der Ermittlung der Gewichte wurde bei einzelnen Tieren das Colon entnommen, um somit die Auswirkungen einer CDI exemplarisch darzustellen. Dafür wurde das Gewebe histopathologisch aufgearbeitet. In den mithilfe einer H&E-Färbung präparierten Dickdärmen konnten vereinzelte Entzündungsinfiltrate nach der Infektion aufgezeigt werden (**Abbildung 6**).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Infektion mit dem Bakterium *C. difficile* in unserem Modell zu keinem signifikanten Gewichtsverlust führte. Da die Aufarbeitung der Dickdärme nur selektiv erfolgte, ließen sich darüber auch keine exakten Rückschlüsse über die Auswirkungen der CDI auf das Colon treffen.

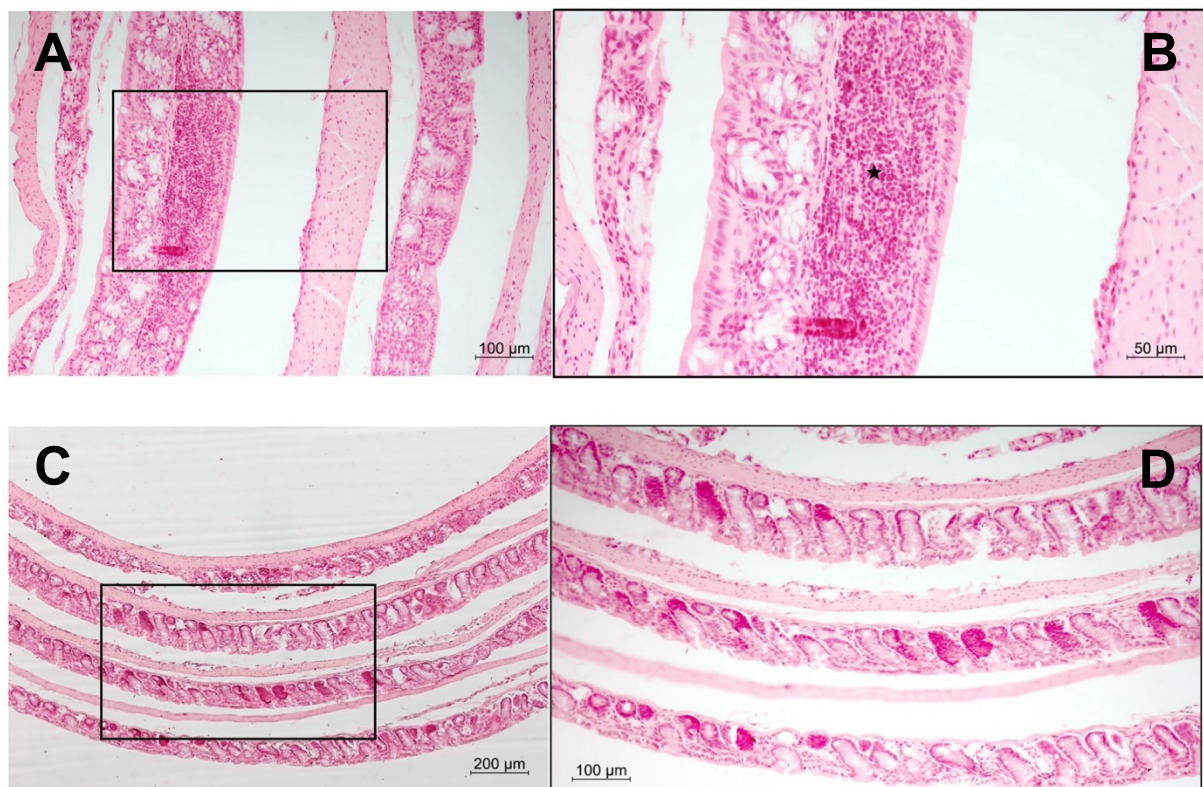


Abbildung 6: *C. difficile* führte zu einer entzündlichen Veränderung des Colons. Mikroskopische Darstellung des Einflusses einer *C. difficile*-Infektion auf das Colon. Colon einer infizierten Maus der Gruppe B (9 Tage nach der Inokulation mit *C. difficile*), dargestellt mithilfe einer Hämatoxylin-Eosin-(H&E)-Färbung. Mit dem Stern markiert sind das Auftreten von Entzündungsinfiltraten, sowie eine Verdickung der Darmschichten. 10-fache Vergrößerung (**A**) und 20-fache Vergrößerung (**B**). Colon einer Maus der Kontrollgruppe A (2 Tage nach der Inokulation mit BHIS-Flüssigmedium). 5-fach Vergrößerung (**C**) und 10-fach Vergrößerung (**D**).

8.3 EINE CDI FÜHRTE ZU EINEM TENDENZIELL FRÜHEREN EINSETZEN DER CIA

Die Tiere wurden nach der ersten Immunisierung täglich gewogen (nicht dargestellt) und inspiziert, um mögliche Belastungen und zu erwartende Symptome der CIA, wie Rötungen und Schwellungen, zu erkennen. Diese sind in **Abbildung 7** exemplarisch zu sehen. Da die Symptome erst mit einer zeitlichen Latenz nach der Sekundärimmunisierung zu erwarten waren, wurde hier nur die Gruppe G in einem Zeitraum von 32 Tagen auf statistische Unterschiede bezüglich des Auftrittszeitpunktes und des Ausprägungsumfanges analysiert. Die Inzidenz wurde anhand einer umgekehrten Kaplan-Meier-Kurve dargestellt und statistisch mittels Log-Rank-Test analysiert. Es konnte kein signifikanter Unterschied im zeitlichen Auftreten der CIA zwischen den beiden Gruppen ermittelt werden. Bei den infizierten Tieren manifestierten sich erste Symptome bereits einige Tage früher (Median = Tag 56) im Vergleich zu den Kontrolltieren (Median = Tag 62) (**Abbildung 8A**). Dabei ist zu erwähnen, dass bereits ein Tier der Infektionsgruppe zum Zeitpunkt der Sekundärimmunisierung erste Symptome einer CIA aufwies. Im Laufe des Versuchszeitraumes wiesen alle Tiere in beiden Gruppen Symptome einer CIA auf. Um die maximale Ausprägung der CIA der beiden Gruppen zu vergleichen, wurden die jeweils höchst gemessenen Scores aller Tiere zusammengetragen und mit Hilfe eines Mann-Whitney *U* Testes auf statistische Signifikanz überprüft. Der Unterschied lag deutlich oberhalb

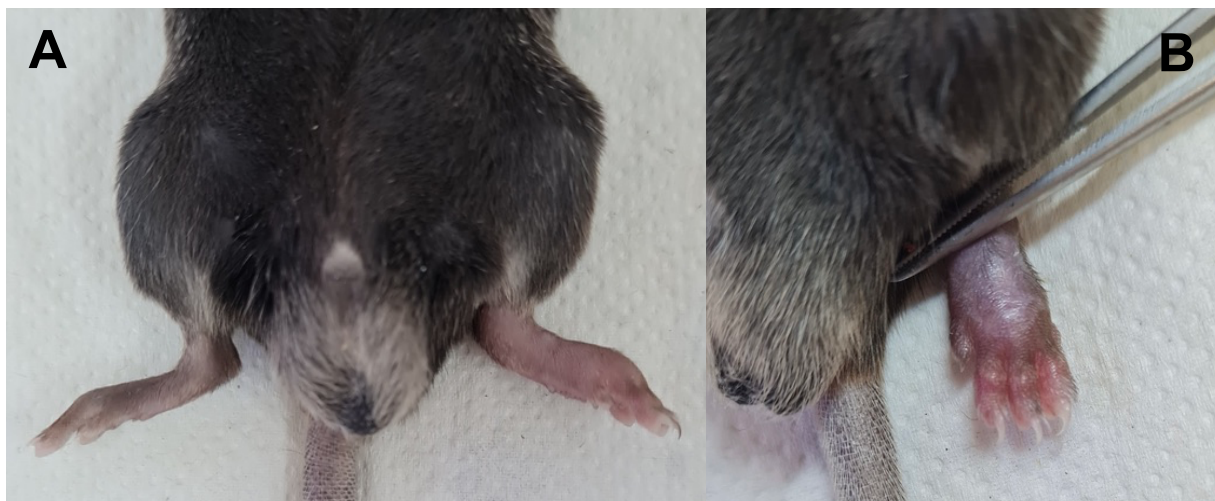


Abbildung 7: CIA führte zu Rötungen und Schwellungen der betroffenen Gelenke. Ansicht einer Maus von ventral und Darstellung der Pfoten von medial. Zu sehen sind die typischen Symptome der Kollagen-induzierten Arthritis, Schwellungen und Rötungen der betroffenen Gelenke. Hier am Beispiel der Hinterläufe zu sehen. Rechter Hinterlauf: ohne Symptomatik, linker Hinterlauf: Zehen, Mittelfuß sowie Sprunggelenk sind deutlich gerötet und geschwollen. Der CIA-Score wäre in diesem Beispiel Hinterlauf links: 15 Punkte (**A**). Darstellung des linken Hinterlaufes von dorsal. Deutliche zu sehen sind Schwellung und Rötungen der Zehen und des Mittelfußes. Das Sprunggelenk ist hier nicht einsehbar (**B**).

des Signifikanzniveaus (**Abbildung 8B**). Bei den Scores, die pro Tag erhoben wurden, zeigte sich in der Darstellung der Mittelwerte ein tendenziell höherer durchschnittlicher Score bei den *C. difficile*-Tieren in den ersten drei Wochen nach der Sekundärimmunisierung im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der letzten Woche vor dem finalen Endpunkt näherten sich die Mittel-

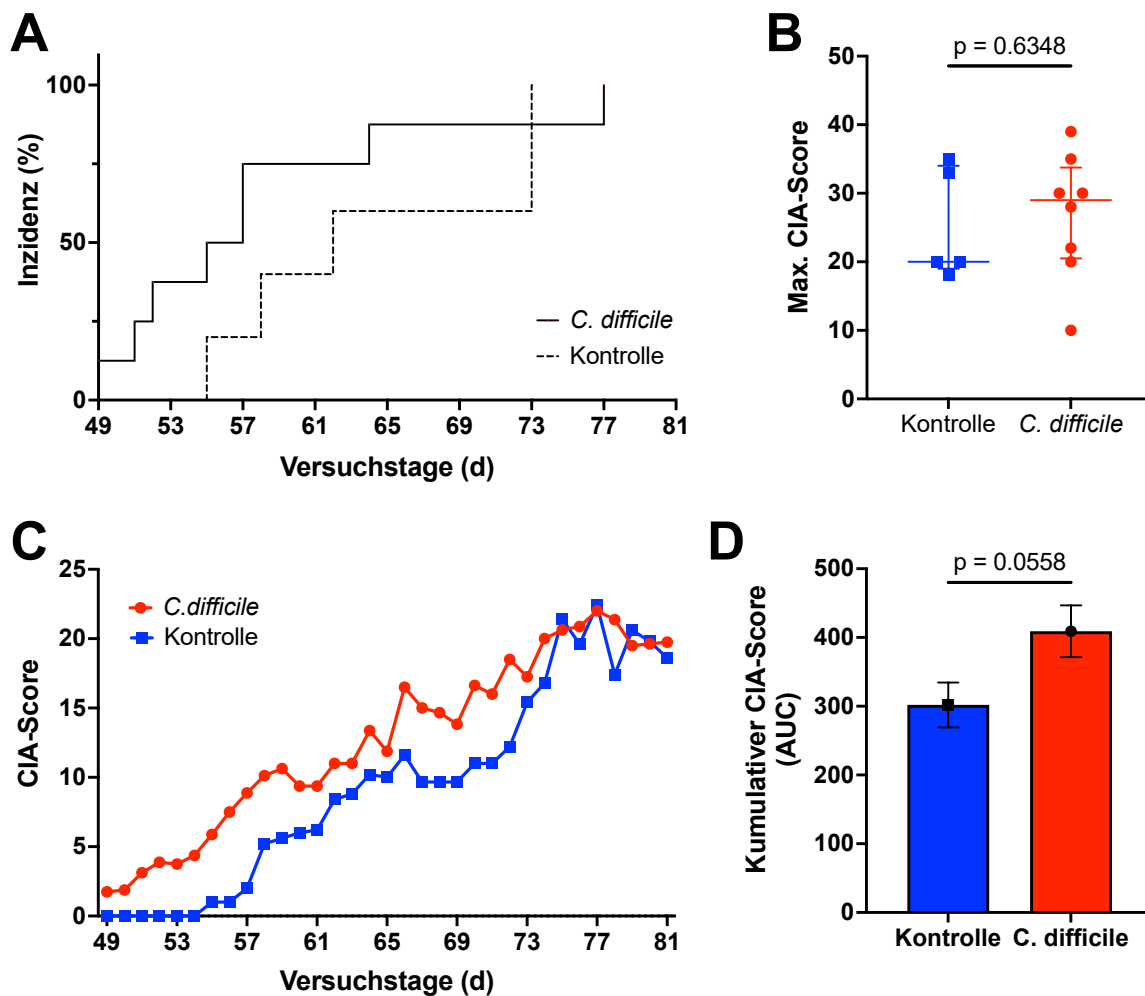


Abbildung 8: CDI verursachte eine tendenziell früher auftretende und schwerer verlaufende CIA. Dargestellt wird die Inzidenz der *C. difficile*- ($n = 8$ Tiere) und der Kontrollgruppe ($n = 5$ Tiere) mit einer umgekehrten Kaplan-Meier-Kurve. Zu beachten ist, dass es bei einem Tier der *C. difficile*-Gruppe zum Auftreten von Arthritis-Symptomen vor dem Tag 49 kam und somit die Kurve mit einem Wert oberhalb von 0 auf der Ordinate beginnt. Log-Rank (Mantel-Cox) -Test, $p = 0,73$, Prozentwerte ohne Standardfehler (**A**). Vergleich des am höchsten gemessenen Scores der Arthritis zwischen der *C. difficile*- bzw. Kontrollgruppe. Mann-Whitney U Test, $p = 0,63$, Median mit dem Interquartilsabstand (**B**). Darstellung des Verlaufes des CIA-Scores der *C. difficile*- bzw. Kontrollgruppe nach der Sekundärimmunisierung an Tag 49. Wie bereits beschrieben ist zu beachten ist, dass es bei einem Tier der *C. difficile*-Gruppe zum Auftreten von Spontanarthritis an Tag 49 kam. Zweifaktorielle Varianzanalyse (2-Way-ANOVA), $p > 0,99$, Mittelwerte ohne Standardfehler des Mittelwertes (**C**). Vergleich der kumulativen CIA-Scores zwischen den beiden Gruppen. Scores wurden mit Hilfe einer Area Under the Curve (AUC) bestimmt. t-Test, $p = 0,056$, Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwertes (**D**).

werte wieder an und auch die zweifaktorielle Varianzanalyse zeigte keine Signifikanz. Betrachtet man den gesamten Zeitraum betrug der im Mittel erhobene Score der CDI-Gruppe 12,68 ($\pm 0,67$) und der der Kontrollgruppe 9,42 ($\pm 0,81$) und zeigte aber im statistischen Vergleich kein signifikantes Niveau, jedoch eine deutliche Tendenz ($p = 0,054$) (**Abbildung 8C**). Die kumulativen CIA-Scores, welche die Ausprägung der Symptomatik über den vollständigen Versuchszeitraum widerspiegeln, wurden mit Hilfe der *Area Under the Curve* (AUC)-Methode ermittelt. Hierbei wurde ersichtlich, dass bei den infizierten Tieren die CIA mit einem kumulativen Score von 409,1 ($\pm 37,66$, SE) tendenziell stärker ausgeprägt war gegenüber der Kontrollgruppe mit einem Score von 301,9 ($\pm 32,55$, SE). Der Vergleich zwischen den beiden Gruppen blieb mit einem $p = 0,056$ jedoch knapp oberhalb des Signifikanzniveaus (**Abbildung 8D**).

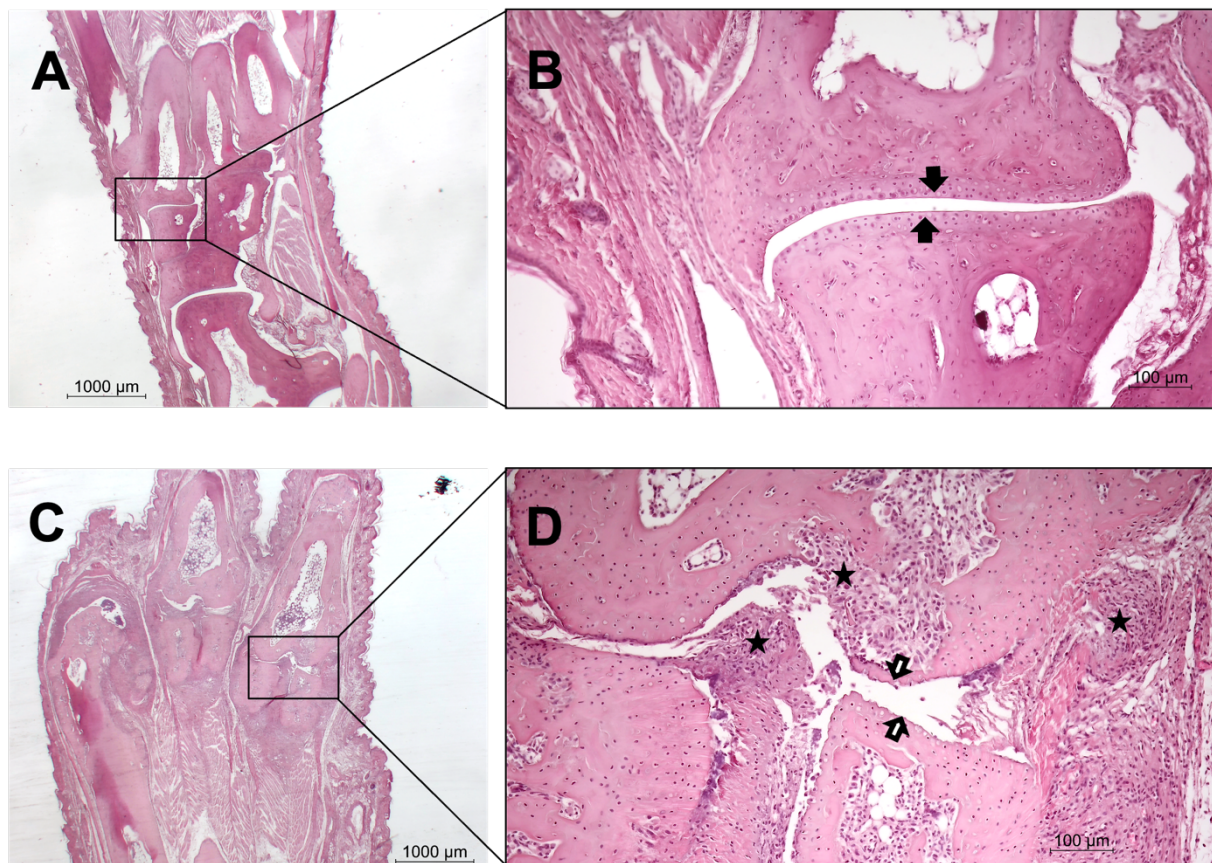


Abbildung 9: Die CIA führte in den Pfoten zu entzündlichen Infiltraten und Abrasionen am artikulären Gelenkknorpel. Mikroskopische Darstellung des Einflusses der CIA auf die Pfote einer Maus mithilfe einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Maus der Kontrollgruppe ohne Arthritis, mit den schwarzen Pfeilen ist die intakte und glatte Gelenkfläche markiert. 1,25-fache Vergrößerung (A) und 10-fache Vergrößerung (B). Pfote einer Maus, welche makroskopisch Symptome der CIA gezeigt hat. Mit den Sternen sind Leukozyten-Infiltrate gekennzeichnet und die weißen Pfeile zeigen auf eine aufgeraute und teilweise degenerativ veränderte Knorpeloberfläche. 1,25-fache Vergrößerung (C) und 10-fache Vergrößerung (D).

Um den Einfluss der CIA auf die Gelenke detaillierter darzustellen, wurde, wie bereits bei den Dickdärmen, vereinzelt eine histologische Untersuchung durchgeführt: Dafür wurde aus der infizierten Gruppe G (CIA-Latenzphase) mit makroskopischen CIA-Symptomen eine Pfote mit einer Pfote eines Tieres ohne CIA-Auffälligkeiten der Gruppe A (Subakute Infektion) verglichen. Die histologischen Schnitte des Kontrolltieres zeigten eine glatte Gelenkoberfläche mit intaktem Gelenkknorpel (**Abbildung 9A & B**), wohingegen bei dem Tier mit der CIA in der Vorgeschichte ein deutlich degenerativ verändertes Gelenk erkennbar war. Dies zeigte sich in einer Destruktion des Gelenkknorpels und einer daraus resultierenden aufgerauten Gelenkoberfläche. Darüber hinaus präsentierte sich eine Einwanderung von Leukozyten und darauffolgenden Knochen- bzw. Knorpelresorption (**Abbildung 9C & D**).

Zusammenfassend wurde beleuchtet, dass eine *C. difficile*-Infektion in Bezug auf die Ausprägung der CIA-Symptomatik keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe aufwies. Es zeigte sich lediglich eine Tendenz mit einem verfrühten Auftreten der Symptomatik bei den infizierten Tieren.

8.4 DIE KOLLAGEN TYP II-IMMUNISIERUNG GING MIT EINER ERHÖHTEN ZELLZAHL IN DEN INGUINALEN LYMPHKNOTEN EINHER

Der zweite Teil dieser Studie beinhaltete die Untersuchung des Immunsystems. Dabei wurde analysiert, ob die CDI eine Veränderung der Zusammensetzung von Leukozyten, mit dem Fokus auf ILCs, in Organen induzierte. Die dabei untersuchten Organe waren inguinale und mesenteriale Lymphknoten, sowie der Dünndarm. Nachdem die Tiere ihren jeweils vorgesehenen Endpunkt, in **Tabelle 5** dargestellt, erreicht hatten, erhielten sie die finale Anästhesie mit anschließender zervikaler Dislokation. Die Organe wurden, wie im Methodenteil erläutert, aufgearbeitet. Da bereits zuvor gezeigt werden konnte, dass sich bezüglich des Infektionsstatus kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen ergab, wurde sich hier für eine gemeinsame Darstellung (**Abbildung 10**) der absoluten Zellzahlen entschieden. Folglich wurden hauptsächlich Veränderungen in Folge der Immunisierungen und CIA, unabhängig von der CDI, illustriert. Bezüglich der Nomenklatur ist noch zu erwähnen, dass es sich bei den Zellen des Dünndarms um eine Kombination aus den intraepithelialen Leukozyten und Leukozyten der Lamina propria handelte, die im Folgenden als Leukozyten der Dünndarmmukosa (DL) zusammengefasst wurden.

Beim Vergleich der Zellzahlen zu den verschiedenen Opferungszeitpunkten waren insbesondere die inguinalen Leukozyten auffällig. So zeigte sich initial nach der Primärimmunisierung

(Gruppe D) ein tendenziell leichter Anstieg der Zellzahl, wobei diese im zeitlichen Verlauf weiter anstiegen. Gruppe E (vor Sekundärimmunisierung), Gruppe F (nach Sekundärimmunisierung) und Gruppe G (CIA-Latenzphase) wiesen beim Vergleich mit den früheren Zeitpunkten ein signifikant und gleichbleibend hohes Plateauniveau der Zellzahlen auf (**Abbildung 10A**). Bei den mesenterialen Leukozyten konnte zu Beginn eine leichte Steigerung der Zellularität beobachtet werden, die dann im Verlauf aber wieder abnahm (**Abbildung 10B**). Bei der Dünndarmmukosa konnten lediglich Anzeichen einer Zellzunahme ab Gruppe C über den Beobachtungszeitraum festgestellt werden (**Abbildung 10C**). Mesenteriale Leukozyten und Leukozyten der Dünndarmmukosa erreichten bei der Verlaufsanalyse nicht das Signifikanzniveau.

In der Zusammenschau dieser Beobachtungen wurde ersichtlich, dass die Immunisierung mit Kollagen Typ II nach einer zeitlichen Verzögerung zur Primärimmunisierung bzw. ab der Sekundärimmunisierung zu einem signifikanten Zellanstieg in inguinalen Lymphknoten führte.

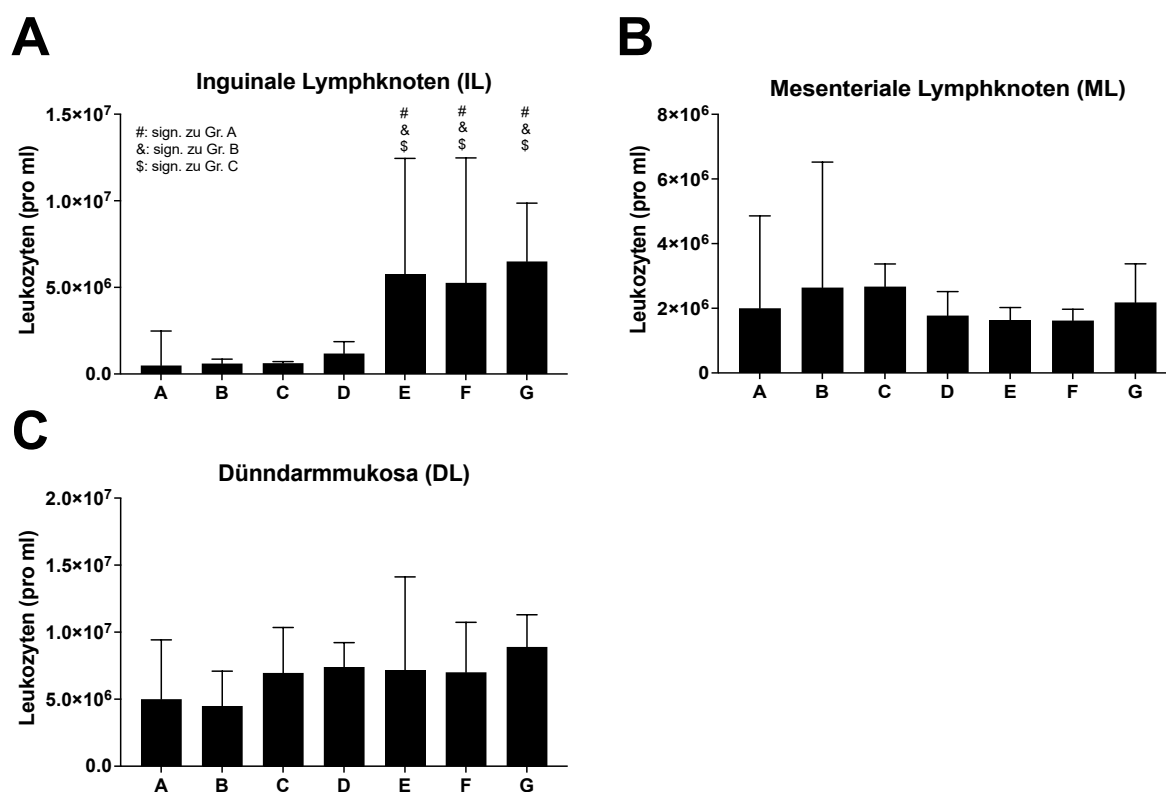


Abbildung 10: Eine Applikation von Kollagen Typ II führte bei inguinalen Lymphknoten zu einem Anstieg der Zellzahlen. Dargestellt sind die absoluten lebenden Leukozyten nach der Aufarbeitung der einzelnen Organe (inguinale Lymphknoten **(A)**, mesenteriale Lymphknoten **(B)** und Dünndarmmukosa **(C)**) bevor die Einzelfärbungen angefertigt wurden. Für eine bessere Übersicht wurden zur Darstellung der Signifikanzen verschiedene Indikatoren verwendet (#, & und \$). Kruskal Wallis Test mit multipler Vergleichsanalyse, Balkendiagramm mit Interquartilsabstand. Versuchsgruppen auf der Abszisse dargestellt: Subakute Infektion (A), Abklingende Infektion (B), Rekonvaleszenz der Infektion (C), Nach Primärimmunisierung (D), Vor Sekundärimmunisierung (E), Nach Sekundärimmunisierung (F), CIA-Latenzphase (G).

8.5 REDUKTION DES PROZENTUALEN ANTEILS CD4+ ZELLEN IN INGUINALEN LYMPHKNOTEN IM ZUGE DER IMMUNISIERUNG MIT BOVINEM KOLLAGEN TYP II

Zur genauen Differenzierung der einzelnen Zelllinien wurden die Organe mithilfe von Durchflusszytometrie analysiert. In **Abbildung 11** ist exemplarisch dargestellt wie die Gating-Hierarchie in den Lymphknoten aufgebaut war. Die Leukozyten wurden anhand ihrer Streueigenschaften als *forward scatter low* (FSClo) und *sideward scatter low* (SSClo) charakterisiert. Die ILCs wurden als Lin- (fehlende Expression der Lineage-Marker CD3ε, GR-1, CD11b, CD45R und Ter-119) und CD127+ definiert. Die T-Helferzellen wurden als

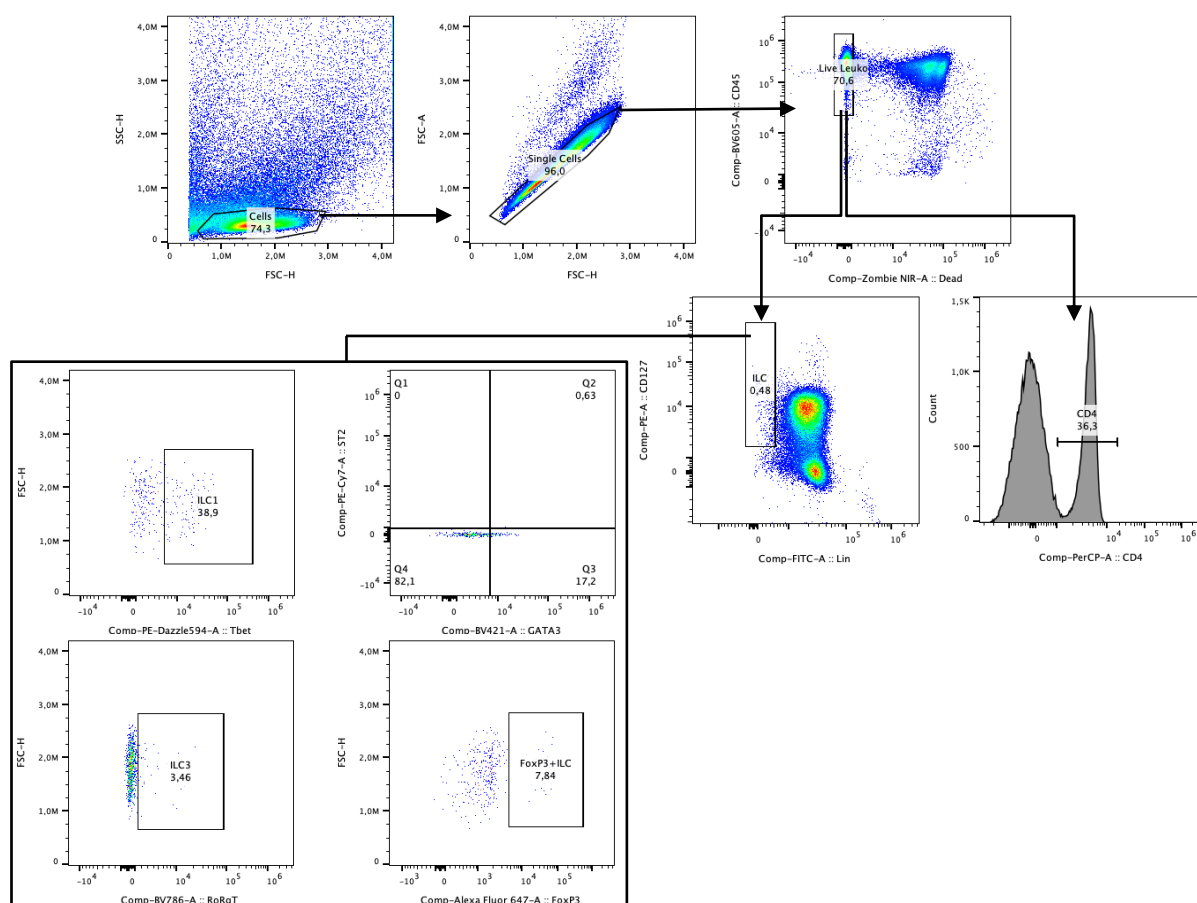


Abbildung 11: Gating-Hierarchie der Lymphknoten. Dargestellt sind hier die einzelnen Schritte für die Identifizierung von Leukozyten aus inguinalen und mesenterialen Lymphknoten. Oben links: über ein Dichtediagramm für *forward scatter* (Zellgröße) und *sideward scatter* (Granularität) der Ausschluss des Debris von den Zellen (Cells). Oben Mitte: Dubletten-Ausschluss (Single-Cells). Oben rechts: Gating der lebenden Leukozyten mittels einer Vitalitätsfärbung. Aus den lebenden Leukozyten heraus wurde dann zum einen unten rechts die CD4+ T-Zellen und zum anderen unten mittig die *Innate lymphoid Cells* (ILC) mittels der Marker lineage- und CD127+ isoliert. Unten links: in der Box sind die Einzelfärbungen der einzelnen Subpopulation der ILCs dargestellt. Oben links: ILC1 nach Markierung von Tbet. Oben rechts: ILC2 über die Markierung von GATA3 und Unterteilung in ST2+ bzw. ST2- Subpopulation. Unten links: ILC3 über die Markierung von RoRyT. Unten rechts: FoxP3+ILC über die Markierung von FoxP3.

CD4+ klassifiziert. Bei der Dünndarmmukosa wurde eine leicht veränderte Gatingstrategie, die in **Abbildung 12** dargestellt ist, verwendet. In den nachfolgenden Abbildungen, die zur statistischen Darstellung der einzelnen Subpopulationen dienen sollen, ist sowohl die zeitliche Entwicklung über den kompletten Beobachtungszeitraum, sowie mögliche Unterschiede zwischen der CDI-Gruppe und der Kontrolle illustriert.

In **Abbildung 13** ist erkennbar, dass der Anteil der CD4+ Zellen ab Gruppe B (Rekonvaleszenz der Infektion) tendenziell und ab Gruppe E (vor Sekundärimmunisierung) bis Gruppe G (CIA-Latenzphase) signifikant abnahm. Interessanterweise war diese Abnahme nur bei infizierten

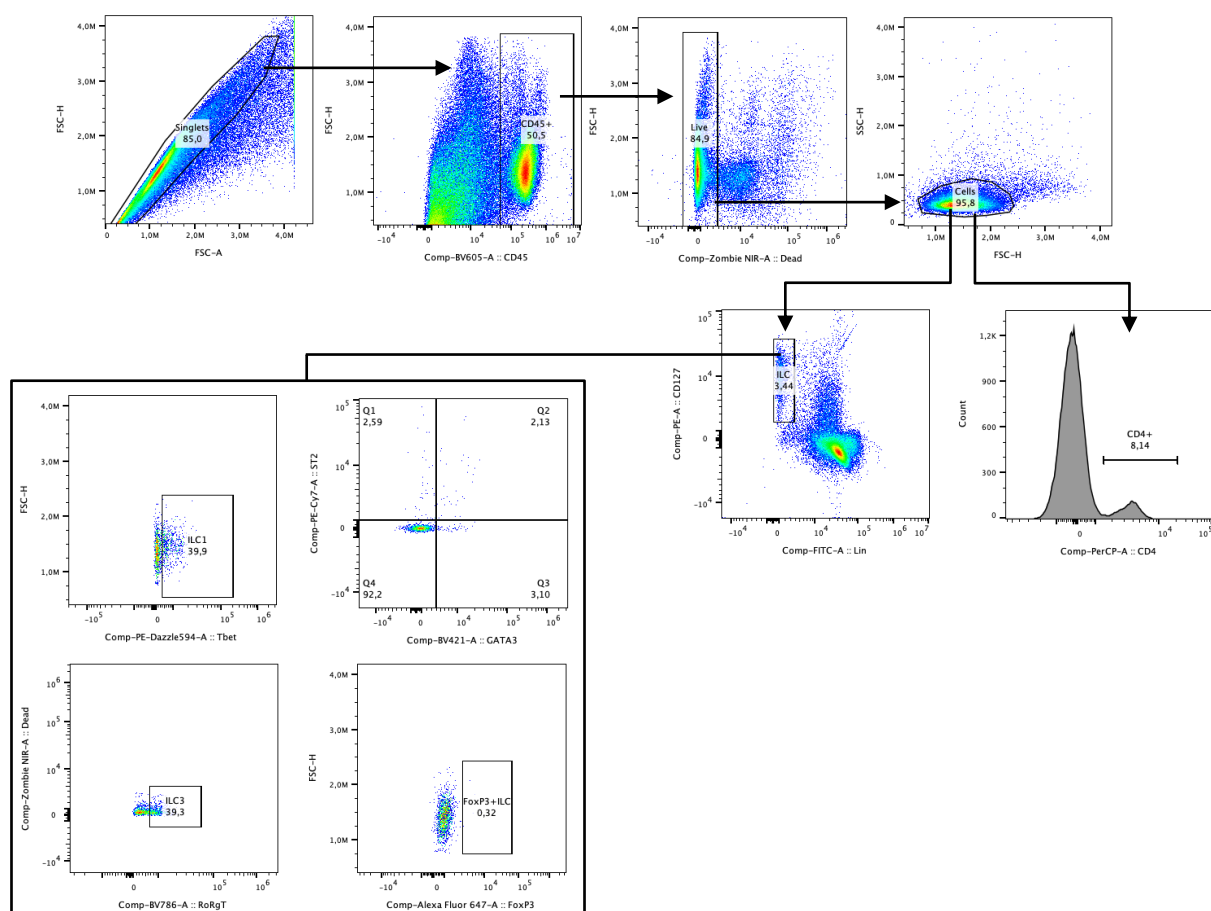


Abbildung 12: Gating-Hierarchie der Dünndarmmukosa. Dargestellt sind hier die einzelnen Schritte für die Identifizierung von Leukozyten aus der Dünndarmmukosa. Oben links: Dubletten Ausschluss (Single Cells). Oben links mittig: Anfärbung der Leukozyten (CD45+) mittels CD45. Oben rechts mittig: Vitalitätsfärbung (Live) zur Lebend/Tod Unterscheidung. Oben rechts: mittels Dichtediagramm für *forward scatter* (Zellgröße) und *sideward scatter* (Granularität) der Ausschluss des Debris. Aus den Cells heraus wurde dann zum einen unten rechts die CD4+T-Zellen und unten mittig die *Innate lymphoid Cells* (ILC) mittels der Marker lineage- und CD127+ isoliert. Unten links: in der Box sind die Einzelfärbungen der einzelnen Subpopulation der ILCs dargestellt. Oben links: ILC1 nach Markierung von T-bet. Oben rechts: ILC2 über die Markierung von GATA3 und Unterteilung in ST2+ bzw. ST2- Subpopulation. Unten links: ILC3 über die Markierung von RoRγT. Unten rechts: FoxP3+ILC über die Markierung von FoxP3.

Tieren signifikant, was suggeriert, dass die Infektion einen Einfluss auf immunisierungsinduzierte Veränderungen der inguinalen Immunlandschaft hatte. Um differenzieren zu können, ob es sich dabei nur um eine relative Reduktion, im Zuge einer Verdünnung durch andere nicht gemessen Leukozyten oder es sich doch um eine absolute Abnahme handelte, wurde die absolute CD4+Zellzahl bestimmt. Dafür wurde der prozentuale Anteil der CD4+Zellen mit der absoluten Zellzahl der inguinalen Lymphknoten verrechnet. Erwartungsgemäß zeigte sich dort, dass die CD4+Zellen mit einer Primärimmunisierung und in Zusammenhang mit der oben festgestellten Lymphadenopathie anstiegen (**Anhang Abbildung 1**). In der Dünndarmmukosa war in den Gruppen B (abklingende Infektion) und Gruppe D (nach Primärimmunisierung) ein höherer Anteil an CD4+Zellen in der CDI-Gruppe gegenüber der Kontrolle erkennbar (**Abbildung 13**).

Im Rahmen der CDI beobachtete man, dass in den inguinalen Lymphknoten in Gruppe C (Rekonvaleszenz der Infektion) weniger Zellen nach der Infektion gegenüber der Kontrolle nachweisbar waren. In Gruppe F (nach Sekundärimmunisierung) waren mehr Zellen in der Infektionsgruppe gegenüber der Kontrolle vorhanden. Dies konnte auch in einem signifikanten Abfall der Zellzahl von Gruppe C zu Gruppe G in der Kontrolle beobachtet werden. In den

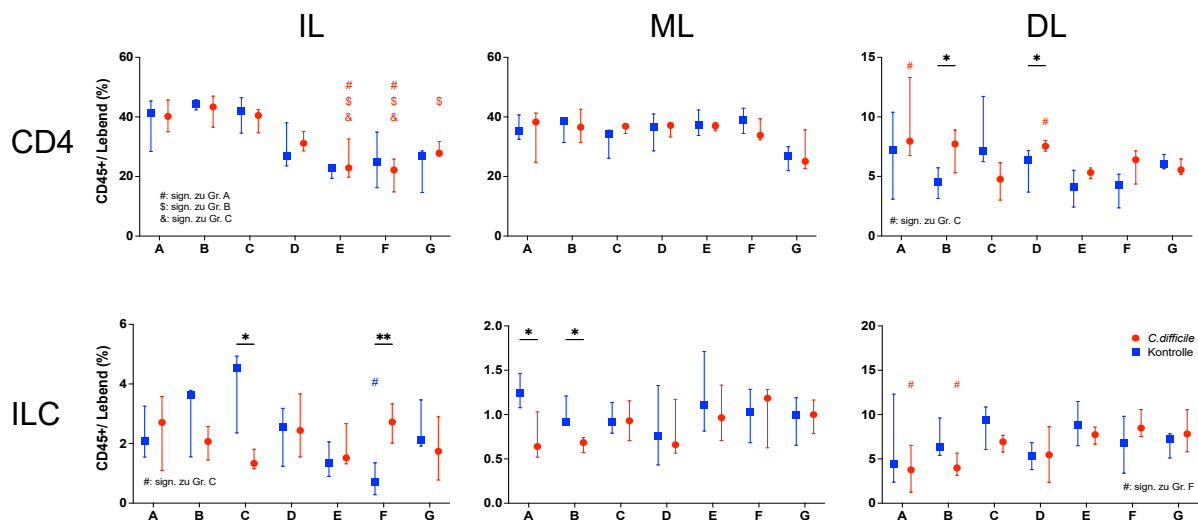


Abbildung 13: Abfall der inguinalen CD4+Zellen im Zuge der Immunisierung. Dargestellt sind in der oberen Reihe die CD4+Zellen und in der Reihe darunter die ILCs. Aufgeteilt in 3 Spalten: inguinale Lymphknoten (IL), mesenteriale Lymphknoten (ML) und Leukozyten der Dünndarmmukosa (DL). Die Zellen sind prozentual im Verhältnis zu den lebenden Leukozyten (CD45+ und ZombieNir-) aufgetragen. Kruskal-Wallis-Test mit Post-Hoc-Test nach Dunn für die zeitliche Verlaufsanalyse. Bei signifikantem Post-Hoc Signifikanzindikatoren &, # und \$ in den Farben der Gruppen. Mann-Whitney U Test für den Vergleich zwischen *C. difficile*-Gruppe zu Kontrollgruppe. Bei signifikantem Vergleich * als Signifikanzindikator. Median mit Interquartilsabstand. Versuchsgruppen auf der Abszisse dargestellt: Subakute Infektion (A), Abklingende Infektion (B), Rekonvaleszenz der Infektion (C), Nach Primärimmunisierung (D), Vor Sekundärimmunisierung (E), Nach Sekundärimmunisierung (F), CIA-Latenzphase (G).

mesenteriale Lymphknoten der Gruppe A (subakute Infektion) und Gruppe B (abklingende Infektion) waren weniger ILCs im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen worden. Der weitere Verlauf zeigte jedoch keine weiteren Auffälligkeiten und verlief annähernd gleich. In der Dünndarmmukosa kam es im Verlauf nach der Sekundärimmunisierung (Gruppe F) zu einem Anstieg des Anteils der ILCs gegenüber den Infektionsgruppen A (subakute Infektion) und B (abklingende Infektion). Erkennbar war auch die bevorzugte Lokalisation von ILCs in Umwelt exponierten Geweben wie der Mukosa, da dort ein größerer Anteil dieser gegenüber den Lymphknoten verzeichnet wurde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es bei den CD4+Zellen in den inguinalen Lymphknoten im Rahmen der Immunisierung lediglich zu einer relativen Reduktion der Zellen kam, wahrscheinlich ausgelöst durch die Einwanderung oder Proliferation anderer Zellen, die hier aber nicht näher untersucht wurden. Im Darm kam es zu einer Akkumulation von ILCs nach der Immunisierung, was einen Hinweis auf den Einfluss einer Darm-Gelenk-Achse bieten könnte.

8.6 DIE IMMUNISIERUNG FÜHRTE IN DER INFEKTIONSGRUPPE ZUR AKKUMULATION VON ILC1 IN DER DÜNNDARMMUKOSA

Um die ILC-Subpopulationen und deren Zusammensetzung in Folge der CDI und CIA zu untersuchen, wurden konjugierte Antikörper gegen intrazelluläre Transkriptionsfaktoren eingesetzt. Da diese Arbeit auf die Darstellung der ILCs beschränkt ist, verweise ich nochmals auf die Arbeit meiner Kollegin **Stefanie Brigitte Amann-Stegbauer**, die sich mit den Veränderungen der T-Helfer-Zellen detaillierter beschäftigte. In **Abbildung 14** wurde die Entwicklung der einzelnen ILC-Subpopulationen über die Zeit, sowie auch signifikante Unterschiede zwischen einer CDI und der Kontrolle abgebildet.

ILC1 wurden als T-bet⁺ definiert. In den inguinalen Lymphknoten wurde ein erhöhter Anteil an ILC1 in der Infektionsgruppe E (vor Sekundärimmunisierung) im Vergleich mit der entsprechenden Kontrolle identifiziert. In den mesenterialen Lymphknoten war ein annähernd gleicher Verlauf dieser Population zu sehen. Simultan zu den inguinalen Lymphknoten war im Dünndarm bei der Kontrollgruppe C (Rekonvaleszenz der Infektion) anteilig mehr ILC1 nachweisbar als in der Gruppe nach Infektion. Auch war nach der Immunisierung ab der Gruppe E (vor Sekundärimmunisierung) bis in Gruppe G (CIA-Latenzphase) eine Anreicherung von ILC1 in der Mukosa der *C. difficile*-infizierten Tiere beobachtet worden.

Bei der ILC3-Subpopulation, welche durch die Expression von ROR γ t definiert wurde, zeigten sich ähnliche Entwicklungen wie bereits bei den ILC1. Ähnlich zu ILC1 zeigte sich auch hier in Gruppe C (Rekonvaleszenz der Infektion) ein vermehrter Nachweis von ILC3 im Dünndarm der Kontrolle gegenüber der CDI-Gruppe. Außerdem konnte beobachtet werden, dass unmittelbar nach der Sekundärimmunisierung (Gruppe F) mehr ILC3 bei infizierten Tieren vorhanden war als in den Kontrollmäusen. In den inguinalen Lymphknoten zeigte sich in der Infektionsgruppe F (nach Sekundärimmunisierung) eine Zunahme des prozentualen Anteils und in Gruppe G (CIA-Latenzphase) wieder eine geringere Zellzahl gegenüber der Kontrolle.

Bei Betrachtung der FoxP3+ILC zeigten sich vereinzelte Signifikanzen zwischen Infektions- und Kontrollgruppe. In den mesenterialen Lymphknoten konnte man im zeitlichen Verlauf einen Anstieg der Population in Folge der Immunisierung in Gruppe G (CIA-Latenzphase) erkennen. In den beiden anderen Organen waren die Zellniveaus über den Beobachtungszeitraum annähernd gleich.

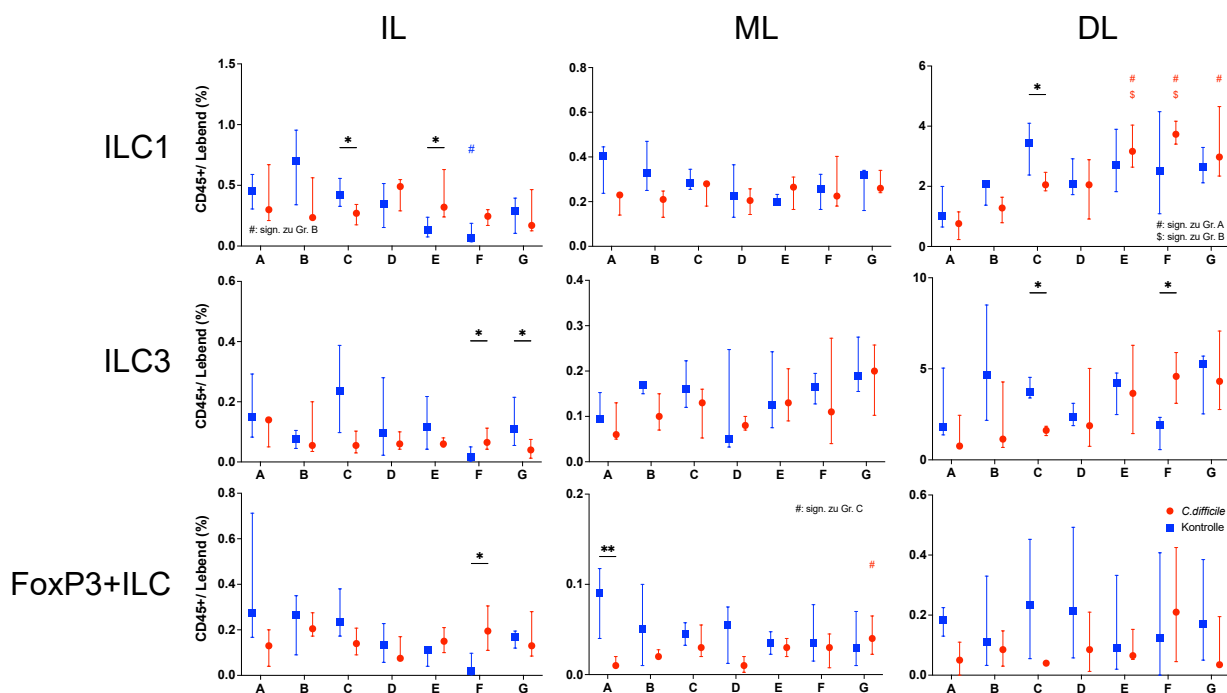


Abbildung 14: Anstieg ILC1 im Darm nach der Immunisierung. Dargestellt sind in der oberen Reihe die ILC1, in der mittleren Reihe die ILC3 und in der unteren Reihe die FoxP3+ILCs. Aufgeteilt in 3 Spalten: inguinale Lymphknoten (IL), mesenteriale Lymphknoten (ML) und Leukozyten der Dünndarmmukosa (DL). Die Zellen sind prozentual im Verhältnis zu den lebenden Leukozyten (CD45+ und ZombieNir-) aufgetragen. Kruskal-Wallis-Test mit Post-Hoc-Test nach Dunn für die zeitliche Verlaufsanalyse. Bei signifikantem Post-Hoc Signifikanzindikatoren # und \$ in den Farben der Gruppen. Mann-Whitney U-Test für den Vergleich zwischen *C. difficile*-Gruppe zu Kontrollgruppe. Bei signifikantem Vergleich * als Signifikanzindikator. Median mit Interquartilsabstand. Versuchsgruppen auf der Abszisse dargestellt: Subakute Infektion (A), Abklingende Infektion (B), Rekonvaleszenz der Infektion (C), Nach Primärimmunisierung (D), Vor Sekundärimmunisierung (E), Nach Sekundärimmunisierung (F), CIA-Latenzphase (G).

Wenn man die Ergebnisse zusammenfasst, lässt sich die Aussage treffen, dass die Immunisierung mit Kollagen zu einer Akkumulation von ILC1 im Darm der Infektionstiere führte.

8.7 DIE INFEKTION BEGÜNSTIGTE EINEN SCHNELLEREN ANSTIEG DER ILC2 IM DARM NACH DER IMMUNISIERUNG

Die ILC2-Population ließ sich über die Expression des Transkriptionsfaktors GATA3 bestimmen. Sie wurde zusätzlich über das Oberflächenantigen ST2 in zwei Subpopulationen unterteilt: ST2+ILC2 und ST2-ILC2 (**Abbildung 15**).

Bei den infizierten Tieren beobachtete man bei den ILC2 und den beiden Subpopulationen im Dünndarm nach der Durchführung der Sekundärimmunisierung eine vermehrte Ansammlung

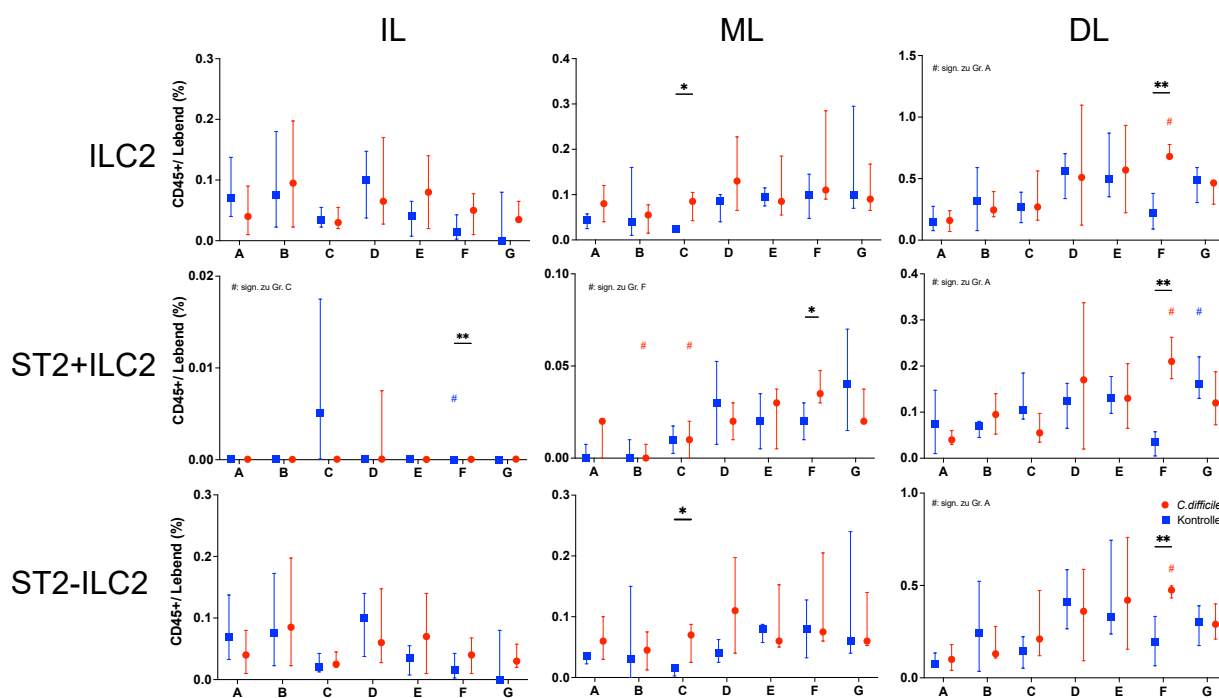


Abbildung 15: Infektion begünstigte schnelleren Anstieg der ILC2 nach Sekundärimmunisierung. Dargestellt sind in der oberen Reihe die ILC2, in der mittleren Reihe die ST2+ILC2-Subpopulation und in der unteren Reihe die ST2-ILC2-Subpopulation. Aufgeteilt in 3 Spalten: inguinale Lymphknoten (IL), mesenteriale Lymphknoten (ML) und Leukozyten der Dünndarmmukosa (DL). Die Zellen sind prozentual im Verhältnis zu den lebenden Leukozyten (CD45+ und ZombieNir-) aufgetragen. Kruskal-Wallis-Test mit Post-Hoc-Test nach Dunn für die zeitliche Verlaufsanalyse. Bei signifikantem Post-Hoc wurde der Signifikanzindikator # in der Farbe der Gruppe verwendet. Mann-Whitney-U-Test für den Vergleich zwischen *C. difficile*-Gruppe zu Kontrollgruppe. Bei signifikantem Vergleich */ ** als Signifikanzindikator. Median mit Interquartilsabstand. Versuchsgruppen auf der Abszisse dargestellt: Subakute Infektion (A), Abklingende Infektion (B), Rekonvaleszenz der Infektion (C), Nach Primärimmunisierung (D), Vor Sekundärimmunisierung (E), Nach Sekundärimmunisierung (F), CIA-Latenzphase (G).

in Gruppe F (nach Sekundärimmunisierung) gegenüber früheren Gruppen, die anschließend wieder einen tendenziellen Abfall in der CIA-Latenzphase (Gruppe G) verzeichneten. Zudem wies die Infektionsgruppe F gegenüber der Kontrollgruppe in allen drei untersuchten Populationen mehr Zellen auf.

Weitere Unterschiede zwischen den Gruppen der CDI und Kontrolle, welche einen Einfluss von *C. difficile* detaillierter darlegten, ließen sich nur begrenzt darstellen. So zeigte sich in den mesenterialen Lymphknoten, dass die ST2+ILC2-Population, ähnlich zur Dünndarmmukosa, sowohl eine Akkumulation in der CDI-Gruppe F (nach Sekundärimmunisierung) gegenüber früheren Gruppen aufwies als auch ein höherer prozentualer Anteil in der Infektionsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe vorhanden war. Bei den ILC2 und ST2-ILC2 waren lediglich signifikant mehr Zellen in der Gruppe C (Rekonvaleszenz der Infektion) nach der Infektion im Vergleich zu Kontrolle zu finden. Auch lässt sich zusammenfassend sagen, dass die ST2-ILC2-Population in den Organen den höchsten Anteil an der Gesamtheit der ILC2 hatte.

In der Gesamtschau konnte beobachtet werden, dass die Infektion mit *C. difficile* einen beschleunigten Anstieg in den ILC2 mit seinen zwei Subpopulationen in der Dünndarmmukosa förderte.

IX. DISKUSSION

Die rheumatoide Arthritis zählt zu den häufigsten Autoimmunerkrankungen weltweit, jedoch sind die genauen Pathomechanismen, die zu einem Ausbruch führen, noch weitestgehend ungeklärt. In den letzten Jahren konnten verschiedene Risikofaktoren identifiziert werden. Dabei rückte auch der Darm immer mehr in den Fokus. So gibt es Hinweise, dass Veränderungen im Mikrobiom einen prädisponierenden Faktor auf die Entwicklung einer Arthritis haben könnten, was man als Darm-Gelenk-Achse zusammenfasst [87].

Die vorliegende Studie befasste sich mit der Untersuchung, wie sich eine Störung der Darmflora durch eine antibiotikaassoziierte Dysbiose und anschließender Fehlbesiedlung mit *C. difficile* auf die Entwicklung einer CIA auswirkte. In vorherigen Studien des Institutes für klinische Immunologie der Universität Rostock ergab sich, dass eine CDI mit dem Stamm VPI 10463 zu einer Abnahme der Inzidenz der CIA und zu einer vermehrten Expression von GATA3 und FoxP3 führte [106]. Diese Ergebnisse basierten jedoch auf bulk-Genexpressionsanalysen von Lymphknoten mittels Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) und demnach wurden keine Einzelzell-Analysen durchgeführt. Schlussfolgernd konnte diese Studie das tatsächliche Ausmaß der Polarisierungseinflüsse durch CDI nur abschätzen. Um diese Ergebnisse zu reproduzieren und detailliertere Einzelzell-Analysen durchführen zu können, wurde auf denselben Bakterien- und Mausstamm zurückgegriffen. Initial wurden klinischen Manifestationen der CDI (Durchfall, Gewichtsverlust) und CIA (Rötungen, Schwellungen der Pfoten) dokumentiert und verglichen. Anschließend wurde zur genauen Differenzierung der immunologischen Veränderungen mittels Durchflusszytometrie ILC1, ILC2, ILC3 und FoxP3+ILC des angeborenen Immunsystems, sowie CD4+Zellen des adaptiven Immunsystems detektiert und analysiert.

Die Ergebnisse zeigten im Gegensatz zu vorherigen Studien, dass der Bakterienstamm nicht in der Lage war eine klinische Infektion auszulösen, sondern lediglich eine subakute Infektion nachgewiesen werden konnte. Diese subakute Infektion führte zu einer tendenziell ausgeprägteren Manifestation der CIA. Im angeborenen Immunsystem kam es nur zu vereinzelten Unterschieden zwischen den beiden Gruppen, jedoch zeigte sich, dass es im Rahmen der Immunisierung zu einer Akkumulation von ILCs und verschiedenen Subpopulationen im Dünndarm kam.

9.1 DIE INOKULATION MIT *C. DIFFICILE* VPI10463 ZEIGTE AUSPRÄGUNGEN EINER SUBAKUTEN INFEKTION OHNE SIGNIFIKANTEM GEWICHTSVERLUST

Zu Beginn der Studie wurde die Hypothese überprüft, ob eine Infektion mit *C. difficile* VPI 10463 induziert werden konnte und es zur klinischen Manifestation einer Colitis kam. Um die Infektion zu verifizieren, wurde als Maß der Gewichtsverlust gewählt, da eine zweifelsfreie Zuordnung der Symptome, wie Durchfall, zu einzelnen Individuen in Folge der gemeinschaftlichen Käfighaltung nicht möglich war.

In beiden Gruppen, unabhängig vom Infektionsstatus, kam es zur tendenziellen Reduktion des Gewichtes. Dabei zeigten die infizierten Tiere eine Neigung zu schnelleren und ausgeprägteren Verlusten gegenüber den Kontrollen, die aber oberhalb des Signifikanzniveaus blieben. Ebenfalls war der maximal gemessene Gewichtsverlust bei den Infektionstieren tendenziell höher gegenüber den Kontrolltieren. Der durchschnittliche Gewichtsverlust lag unterhalb von 5 %, weshalb man hier von keiner klinischen, sondern einer subakuten Infektion ausging.

Unsere Ergebnisse bezüglich der schwankenden Gewichtsverluste bzw. des subakuten Infektionsstatus werden durch die Untersuchungen von Reeves et al. unterstützt [112]. Aus diesen Daten ging hervor, dass bei Verwendung der gleichen Antibiotikatherapie es in einigen Tieren ebenfalls zu keiner klinischen Ausprägung der CDI kam. Jedoch konnte bei Tieren nach Inokulation, ohne klinische Manifestation einer Infektion, dennoch vermehrte Infiltrate gegenüber der Kontrolle im Darm histologisch nachgewiesen werden. Sie stellten dabei die Hypothese auf, dass der Ausbruch einer Infektion von einem Gleichgewicht abhängig war: Dieses Gleichgewicht beruht auf der einen Seite auf der Möglichkeit von *C. difficile* zu kolonisieren, Toxine zu produzieren und somit die Tiere erkranken zu lassen. Auf der anderen Seite das Bestreben des Mikrobioms nach einer Antibiotikatherapie zu seiner ursprünglichen Zusammensetzung zurückzukehren. Dabei wirkt sich eine schnellere Rückbildung der physiologischen Flora protektiv auf die Entstehung einer CDI aus. Interessanterweise ist dabei nicht die Gesamtmasse des Mikrobioms für den Schutz verantwortlich, sondern die strukturelle Zusammensetzung der nach Antibiotikatherapie noch vorhandenen Mikroorganismen des Darms. Sie zeigten zusätzlich, dass die Resistenz gegenüber einer Kolonisation bei der Gabe von Cefoperazone nicht vorhanden war [112]. Auch wenn in vorherigen Studien bereits bewiesen wurde, dass eine Dysbiose durch die verwendete Antibiotikatherapie induziert werden konnte, so wurde ebenfalls beschrieben, dass die Zusammensetzung des Antibiotikagemisches im Trinkwasser das Trinkverhalten der Tiere verändert hat. So zeigte die Untersuchung von Goulding et al., dass die Kombination von Ampicillin, Neomycin, Metronidazol und Vancomycin im Vergleich zu der alleinigen Kombination von Enrofloxacin und Ampicillin zu einer signifikant geringeren Aufnahme

von Trinkwasser führte und auch die Depletion des Mikrobioms einen längeren Zeitraum erforderte [113]. Metronidazol und Vancomycin wurden auch in unserer Studie verwendet und könnten somit ein auslösender Faktor für eine inadäquate Aufnahme des Trinkwasser-Antibiotika-Gemisches gewesen sein. Diese genannten Faktoren könnten ursächlich gewesen sein, dass die Dysbiose des Darms nicht ausreichend war, um eine klinische CDI hervorzurufen. Dennoch beobachteten wir in der Infektionsgruppe Tendenzen zu höheren Gewichtsverlusten, was auf das Vorliegen einer subakuten Infektion hindeutete.

Zu diskutieren wäre, ob man in Zukunft auf die ebenfalls etablierte Monotherapie mit Cefoperazone umsteigt, die sich zuverlässig in der Steigerung der Empfänglichkeit des Mikrobioms für eine CDI zeigte [114]. Da für die histologische Darstellung nur vereinzelt Dickdärme aufgearbeitet wurden, ließen diese auch keine quantitative Analyse zu.

Kritisch zu betrachten sind im folgenden weitere Aspekte, die Einfluss auf die Ergebnisse genommen haben könnten. In den Kontrolltieren zeigten sich ebenfalls Tendenzen eines Gewichtsverlustes nach Medium-Applikation. Ursächlich dafür könnte die Kombination aus antibiotikaassoziierter Dysbiose und mit L-Cystein versetztem BHIS-Medium gewesen sein. Letzteres diente zuvor als Nährmedium für die Bakterien und könnte jetzt in der Darmflora mithilfe seiner wachstumsfördernden Eigenschaften die Fehlbesiedlung durch verschiedene Bakterien begünstigt haben, die mit einem Gewichtsverlust einhergegangen sein könnten. Schmidt et al. beobachtete bei der Untersuchung von Veränderungen in der Zusammensetzung des Mikrobioms, dass es auch nach der Antibiotikatherapie und der alleinigen Applikation von Medium zu einem Anstieg des prozentualen Anteils von *Clostridiaceae* kam [106]. Die Anzucht der Bakterien erfolgte erst unmittelbar vor der Inokulation. Dafür wurden diese in die logarithmische Wachstumsphase gebracht und anschließend eine KBE von 10^5 in die Tiere überführt. Die Zeit bis zur Applikation und der Transport der Bakterien bis zu den Tieren, könnten die Vitalität der obligat anaeroben Organismen negativ beeinflusst haben, da sich eine vollständige Isolation von der Umgebungsluft bis zur Inokulation nicht vermieden ließ. Um die erforderliche KBE zu überprüfen, wurde von jeder Probe vor Applikation eine Verdünnungsreihe auf BHIS-Agar angelegt und erst 24 h nach Inokulation kontrolliert. Dabei entsprachen die Auszählungen der Kolonien immer der erforderlichen KBE von 10^5 .

Abschließend lässt sich somit die erste Hypothese verwerfen, denn eine Inokulation mit *C. difficile* VPI 10463 in den DBA/1J x B10.Q. Mäusen nicht zu einer klinisch manifesten Colitis mit signifikantem Gewichtsverlust führte.

9.2 ANHALTSPUNKTE FÜR EINE FRÜHERE MANIFESTATION MIT EXAZERBIERTER SYMPTOMATIK DER KOLLAGEN-INDUZIERTEN ARTHRITIS NACH EINER SUBAKUTEN *C. DIFFICILE*-INFEKTION

Um die arthritischen Symptomatiken bei den Tieren zu induzieren, erhielten sie drei Wochen nach der Infektion bzw. Medium-Applikation zwei Immunsierungen. Dafür wurde ihnen im Abstand von drei Wochen 140 µg bovines Kollagen Typ II subkutan an die Schwanzbasis verabreicht. Versuche, die im Vorfeld durch die Arbeitsgruppe vorgenommen wurden, zeigten dabei, dass es nach Infektion mit *C. difficile* zu einer Abnahme der CIA-Inzidenz, sowie einer Reduktion der kumulativen Arthritis-Scores kam [106].

In unseren Versuchen konnte man jedoch nur Tendenzen erkennen, die auf eine gegenteilige Annahme hindeuteten. So zeigte sich, dass die Beschwerden in der *C. difficile*-Gruppe einige Tage früher auftraten, und der durchschnittlich erhobene Score pro Tag im Mittel höher gegenüber der Kontrolle war. Daraus ergab sich ebenso eine deutliche Tendenz ($p = 0,056$) in einem erhöhten kumulativen Score der Infektionsgruppe. In beiden Gruppen, unabhängig von ihrem Infektionsstatus, traten im Laufe des Beobachtungszeitraums Symptome einer CIA auf, somit lag die Inzidenz bei 100 %. Die Manifestation der CIA nach der Immunisierung zeigte sich nicht nur makroskopisch in Form von klinischen Merkmalen an den Pfoten, sondern konnte auch durch den histopathologische Nachweis von Abrasionen der Gelenkknorpel, Destruktion des Knochens, sowie lymphozytären Infiltraten nachgewiesen werden.

Unsere Daten legen dar, dass der protektive Effekt einer klinischen CDI bei einer lediglich subakuten Infektion nicht hervorgerufen werden kann. Im Gegenteil zeigten sich Hinweise, dass durch die subakute Infektion ein verfrühtes Auftreten der CIA mit einer exazerbierten Symptomatik einhergehen könnte. Dies wirft die Spekulation darüber auf, ob die Infektionsintensität und die Krankheitsmanifestation eine negative Korrelation aufweisen und somit die mildere subakute Infektion die Pathogenese der CIA fördert, wohingegen eine klinische Infektion mit signifikantem Gewichtsverlust einen schützenden Faktor hat.

Als mögliche Fehlerquellen sind hier zu nennen, dass es zum Auftreten von spontanen Arthritis-Zeichen vor der Sekundärimmunisierung bei 4 von 49 insgesamt immunisierten Tieren kam. Dies entspricht einer Rate von knapp 8 %. Im Normalfall ist mit dem Manifestieren der Symptome erst drei Wochen nach der ersten Immunisierung zu rechnen [108]. Ursächlich dafür könnte das Alter der Mäuse gewesen sein, da mit steigendem Alter auch die Inzidenzrate für die Arthritis zunimmt [115,116]. Darüber hinaus ist die Tatsache nicht zu vernachlässigen, dass wie bereits erwähnt, die Versuche in Zusammenarbeit mit Frau Amann-Stegbauer durchgeführt wurden, weshalb es bei der Bewertung zu interpersonellen Abweichungen kommen

konnte, da die Einschätzung von Rötungen und Schwellungen eine subjektive Entscheidung war.

Schlussfolgernd muss auch die zweite Hypothese, dass eine subakute Infektion ebenfalls einen protektiven Effekt auf die Entwicklung einer CIA hat, abgelehnt werden, da eine subakute CDI zu einer verfrühten Inzidenz und höheren kumulativen Arthritis-Scores neigte. Die dritte Hypothese, dass die CIA sich auch in histologischen Veränderungen manifestiert, konnte bestätigt werden.

9.3 DIE KOLLAGEN TYP II-IMMUNISIERUNG INDUZIERTEN EINEN ANSTIEG DER ABSOLUTEN ZELLZAHL, DER JEDOCH MIT EINER PROZENTUALEN ABNAHME DER CD4+ZELLEN EINHERGING

Um ein besseres Verständnis für die zeitlichen Zusammenhänge der immunologischen Vorgänge bei einer vorangegangenen CDI und folgender CIA zu bekommen, wurden die Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten geopfert und ihnen inguinale und mesenteriale Lymphknoten, sowie der Dünndarm entnommen. Durch die Aufarbeitung der Organe wurden die absoluten Zellzahlen bestimmt und durch Einzelzell-Analyse verschiedene immunologische Subpopulationen charakterisiert.

Bei der absoluten Leukozytenzahl präsentierte sich in den inguinalen Lymphknoten mit einer Latenz von 20 Tagen zu der Primärimmunisierung ein signifikanter Anstieg im Sinne einer Lymphadenopathie. Die inguinalen Lymphknoten stellen vor allem das lymphatische Drainagegebiet der Hinterläufe dar [117]. In einer Untersuchung von Dahdah et al. konnte im Zusammenhang mit der Immunisierung mittels Kollagen immunhistochemisch die Bildung von Keimzentren in inguinalen Lymphknoten nachgewiesen werden [118]. Keimzentren dienen der Proliferation von B-Zellen und der Bildung von hochaffinen Antikörpern durch somatische Hypermutation. Dabei ist auch die Bildung autoreaktiver B-Zellen möglich, welche einen Einfluss auf die Entwicklung von Autoimmunitäten haben können [119].

Des Weiteren zeigte sich eine Abnahme des prozentualen Anteils CD4+ Zellen an den lebenden Leukozyten im Rahmen der Immunisierung in der Infektionsgruppe. CD4+ Zellen können in weitere Subpopulationen wie Th1- oder Th2-Zellen unterschieden werden. Ihre Aufgabe ist es mithilfe von Zytokinen immunologische Prozesse in Gang zu setzen, um beispielsweise Makrophagen anzulocken oder auch B-Zellen bei der Differenzierung zu unterstützen [120]. Bei der Untersuchung der absoluten CD4+Zellen zeigte sich jedoch, dass diese in den inguinalen Lymphknoten anstiegen und man bei der beobachteten Abnahme lediglich von einer Verdünnung sprechen kann, die durch die Zunahme anderer Zellreihen, welche nicht näher

identifiziert wurden, zustande kam. In Studien wurde postuliert, dass es nach einer Immunisierung mit Kollagen Typ II auch zu einem deutlichen Anstieg von B-Zellen und CD8+Zellen in inguinalen Lymphknoten kam [118]. B-Zellen sind in der Lage, sich sowohl an der Bildung und Sezernierung von pathologischen Antikörpern zu beteiligen als auch T-Zellen mittels Antigenpräsentation über MHC II zu aktivieren [121]. Die Depletion von B-Zellen in Studien führte zu einer verzögerten Manifestation der CIA und unterstreicht somit ihr Rolle in der Pathogenese der Erkrankung [122]. CD8+Zellen, auch zytotoxische T-Zellen genannt, sind in der Lage über die Freisetzung von Zytokinen die Apoptose einzuleiten. In Bezug auf die RA, zeigte sich ein Nachweis der CD8+Zellen auch im Bereich der Synovia mit Freisetzung proinflammatorischer Zytokine [123,124].

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Studie ein lymphoproliferatives Verhalten infolge der Immunisierung mit bovinem Kollagen in den inguinalen Lymphknoten dargestellt werden, womit die Hypothese 4 bestätigt werden konnte. Dabei kam es zu einer signifikanten Zunahme der absoluten CD4+Zellzahl in den inguinalen Lymphknoten. Hypothese 5 wird somit als belegt angesehen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Immunisierung die fokale Akkumulation und Aktivierung verschiedener Immunzellpopulation in lymphatischen Organen begünstigt.

9.4 ERHÖLTE ILC-POPULATIONEN IN DARM UND DRAINIERENDEN LYMPHKNOTEN INFIZierter TIERE NACH DER IMMUNISIERUNG MIT KOLLAGEN TYP II

In der vorherigen Studie von Schmidt et al. wurde unter Verwendung einer PCR die Genexpressionsniveaus spezifischer Transkriptionsfaktoren in inguinalen und mesenterialen Lymphknoten untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass es im Zuge der klinischen CDI zu einer Hochregulation der Expression von Transkriptionsfaktoren GATA3 und FoxP3 in mesenterialen Lymphknoten gegenüber der Kontrolle kam [106]. In der von uns durchgeführten Einzelzell-Analyse wurden zunächst punktuelle Signifikanzen ausfindig gemacht, welche Hinweise auf Veränderungen der ILCs im Rahmen der Infektion lieferten. Die Immunisierung führte darüber hinaus noch zu Signifikanzen im zeitlichen Verlauf, welche sich in einer Zunahme diverser ILC-Populationen im Dünndarm der Infektionsgruppe manifestierte.

Die ILCs sind vor allem in Geweben mit hoher Exposition gegenüber Umweltfaktoren lokalisiert, wie beispielsweise der Mukosa des Darms. Sie spielen eine tragende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion und der Immunabwehr gegenüber pathogenen Erregern [98,99]. Eine Studie von Abt et al. beschrieb, dass ILC1 und ILC3 für die initiale Immunreaktion

gegen *C. difficile* verantwortlich waren. Eine wesentliche Rolle spielte dabei die ILC1-vermittelte IFN- γ -Freisetzung [125]. Dieses Phänomen konnte in unseren Untersuchungen nicht beobachtet werden, vielmehr stellte sich im Zuge der Rekonvaleszenz der Infektion weniger ILC1 und ILC3 im Vergleich zur Kontrolle in der Dünndarmmukosa dar. Auch bei ILC2 konnte in der initialen Phase unmittelbar nach der Infektion kein Anstieg des prozentualen Anteils detektiert werden. Die Aktivierung von ILC1 und ILC3 erfolgt durch die Freisetzung verschiedener Zytokine wie IL-12 oder IL-1 β [125]. ILC2 hingegen kann über IL-33 induziert werden, welches bei Gewebeschädigungen freigesetzt werden kann [126]. Dabei zeigte sich bereits in vorherigen Studien, dass eine mildere Form der CDI mit abgeschwächter klinischer Ausprägung zu geringeren Gewebeschädigungen führte [112]. Der Vergleich von Zytokin-Spiegeln in Seren von CDI-Patienten, wies niedrigere Werte bei einer milden Infektion gegenüber einer moderaten auf [127]. Die subakute Infektion könnte aufgrund ihrer geringeren Aggressivität auf den Darm für die fehlende initiale Aktivierung unmittelbar nach der Inokulation der ILCs gegenüber der Kontrolle verantwortlich gewesen sein. Da es sich bei den Untersuchungen um Seren von Menschen handelte ist eine exakte Übertragung auf die Maus nicht möglich, jedoch könnte in Zusammenschau mit den Ergebnissen dieser vorliegenden Arbeit ein Hinweis auf mögliche Parallelen vorliegen. Zur genauen Verifizierung dieser Vermutung bedarf es noch weitere Untersuchungen bezüglich der Zytokin-Spiegel bei einer CDI in der Maus.

In der abklingenden Infektion konnte bei ST2+ILC2 des Dünndarms beobachtet werden, dass in der Infektionsgruppe der prozentuale Anteil tendenziell höher ausfiel als in der Kontrollgruppe. Da der höchste Gewichtsverlust bei Tieren erst an Tag 9, also 2 Tage nach der Infektion auftrat, könnte dies eine Erklärung für den späteren Anstieg von ST2+ILC2 bedeuten. Frisbee et al. beschrieb, dass ILC2 ebenfalls eine essenzielle Rolle bei der Abwehr von *C. difficile* spielte. Die Induktion der ILC2 erfolgt dabei über das bereits beschriebene IL-33, welches an den ST-Rezeptor der ILC2 binden kann. Gleichzeitig erläuterte diese Studie auch, dass die Behandlung von Mäusen mit IL-33 zu einer Reduktion von ILC1 und ILC3 führte. Dieser Zusammenhang könnte als Erklärung für den zeitlich verzögerten Abfall von ILC1 und ILC3 in der Rekonvaleszenz der Infektion gegenüber der Kontrolle dienen, aufgrund der ILC2 ausgelösten Immunantwort bei infizierten Mäusen [128]. Zusätzlich wurden in den mesenterialen Lymphknoten, welche das Drainagegebiet des Darmes bilden, ein Anstieg von ILC2 in der Infektionsgruppe nach Rekonvaleszenz gegenüber der Kontrolle beobachtet [129]. Die vorliegenden Ergebnisse stehen im Einklang mit denen von Schmidt et al. postulierten Erkenntnissen. Diese beschrieben ebenfalls, dass nach spontaner Ausheilung einer CDI eine transient gesteigerte Expression von GATA3 in mesenterialen Lymphknoten zu finden war und stellten die Theorie auf, dass die Infektion zu einer Th2-dominierten Reaktion führte. In Verbindung mit unseren Beobachtungen könnte es auch auf eine ILC2-dominierte Immunantwort hinweisen.

Besonders auffällig war jedoch, dass es durch die Immunisierung zu veränderter ILC-Zusammensetzung, insbesondere in der Dünndarmmukosa, kam. Hierbei zeigten vor allem die ILC1 der Infektionsgruppe eine Akkumulation im Darm. Diese war gekennzeichnet durch den signifikanten Anstieg, der mit einer zeitlichen Latenz zur Primärimmunisierung auftrat und eine anhaltend hohe Zellzahl im Vergleich zu früheren Gruppen aufwies. Vorherige Studien beobachteten, dass ILC1 mit der Freisetzung von IFN- γ verbunden war und dies bei RA-Patienten vermehrt in der Synovia nachgewiesen werden konnte [105]. Bei ILC3 zeigte sich ein signifikant erhöhter Anteil nach der Sekundärimmunisierung bei *C. difficile*-infizierten Tiere gegenüber der Kontrolle. Takaki-Kuwahara et al. postulierten in ihren Untersuchungen, dass es im Rahmen der CIA zu einer Anreicherung von ILC3 in inflammatorischen Gelenken der Mäuse kam und diese mit erhöhten Zytokin-Spiegeln von IL-17A und IL-22 einhergingen [130]. Das ILC3-Gegenstück des adaptiven Immunsystems, Th17, zeigte ebenso in Studien seinen fördernden Einfluss auf die Pathogenese der RA durch Freisetzung von proinflammatorischen IL-17. Dabei korrelierte die Höhe des Serumspiegels mit der Krankheitsaktivität [131]. ILCs könnten möglicherweise aus dem Darm in die Gelenke über das Blutgefäßsystem migrieren, Hinweis dafür ist die Zirkulation von ILC3 in Spondyloarthritis (SpA)-Patienten [132]. Zusätzlich zeigte sich zum gleichen Zeitpunkt, also unmittelbar nach der Sekundärimmunisierung, ein höherer Anteil von ILC3 in der Infektionsgruppe gegenüber der Kontrolle in inguinalen Lymphknoten. Ähnliche Tendenzen waren bei ILC1 ebenfalls in inguinalen Lymphknoten detektiert worden. Rodríguez-Carrio et al. gelang der erfolgreiche Nachweis von ILC1 und ILC3 in Lymphknoten bei RA-Patienten. Sie stellten die Theorie auf, dass die Arthritis eine Veränderung in der ILC-Zusammensetzung hin zu einem proinflammatorischen Profil bewirkte [133]. Die von den ILC sezernierten Zytokine können im weiteren Verlauf zur Aktivierung der entsprechenden Gegenstücke der Th-Populationen beitragen [132].

Bei den ILC2 und seinen Subpopulationen lässt sich ein leicht verzögerter Anstieg in der Infektionsgruppe nach Sekundärimmunisierung beobachten, der anschließend wieder tendenziell abnimmt. Zusätzlich konnte ein deutlich signifikant höherer Anteil in den Infektionstieren gegenüber der Kontrolle unmittelbar nach der Boostimmunisierung detektiert werden. Omata et al. beschrieb, dass eine reduzierte ILC2-Population in Mäusen mit einer Exazerbation der CIA-Symptomatik einherging [134]. Diese Erkenntnisse, sowie der zusätzliche Nachweis von erhöhten ILC2 im Blut von RA-Patienten in Remission, charakterisierten ILC2 als die Gegenspieler zu ILC1 in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der chronisch-entzündlichen Prozesse in Gelenken von RA-Patienten. Ihnen wurde über die Freisetzung von IL-4 und IL-13 und die daraus resultierende hemmende Wirkung auf die TNF- α -Produktion, ein protektiver Faktor zugeschrieben [105,134]. Omata et al. postulierte ebenfalls, dass ILC2 nach der Applikation von Kollagen Typ II im zeitlichen Verlauf anstieg [134]. In Bezug auf unsere Ergebnisse

zeigt sich ähnliches, wobei sich durch den signifikanten Unterschied zwischen der Infektionsgruppe und Kontrolle unmittelbar nach Sekundärimmunisierung der Eindruck ergibt, dass *C. difficile* eine beschleunigte Immunantwort auf die Immunisierung lieferte. Ein interessanter Ansatz für weitere Untersuchungen wäre daher, ob bei Verlängerung des Beobachtungszeitraumes die infizierten Tiere im Vergleich zu nicht-infizierten Mäusen früher die Remission der CIA erreichen würden. Der beobachtete tendenzielle Abfall in der Infektionsgruppe zwischen den beiden letzten Gruppen (Gruppe F und G) könnte ein Hinweis auf die Fähigkeit der Plastizität der ILCs zurückzuführen sein [135]. ILC2 kann sich unter dem Einfluss von IL-1 β in IFN- γ produzierende ILC1 umwandeln [136]. Eine vermehrte Ausschüttung von IL-1 β konnte bereits bei Seren von RA-Patienten gezeigt werden [137].

Zuletzt bleibt die Frage offen, warum die beschriebenen Veränderungen der ILC-Zusammensetzung überwiegend in der Infektionsgruppe auftrat. So wäre es möglich, dass die subakute CDI einen immunmodulatorischen Effekt auf die Dünndarmmukosa hatte, der die Ausbildung von Autoimmunität durch den Verlust von Toleranz beschleunigen könnte. Dies könnte auch eine Erklärung für das beobachtete tendenziell frühere und schwerere Auftreten der CIA in unseren Versuchen bieten.

Zu den hier untersuchten FoxP3+ILC lässt sich bisher keine genaue Aussage in Bezug auf ihre potentielle Funktion beschreiben, da sie in der Literatur noch nicht detaillierter beschrieben wurden. Während FoxP3 bei den T-Zellen für regulatorische T-Zellen (Treg) charakteristisch ist, fehlt diese Expression bei dem Gegenspieler ILCreg. Diese weisen stattdessen eine hohe Expression von ID3+ und Sox4+ auf [138].

Bei ganzheitlicher Betrachtung der Ergebnisse, kann die sechste Hypothese, welche besagt, dass es im Rahmen einer subakuten CDI zu einer ILC2-dominierte Antwort kam, nur bedingt bestätigt werden, da es sich lediglich um Tendenzen handelte. Die siebte Hypothese, dass die Immunisierung zu einer ILC1 Akkumulation in den Dünndärmen der infizierten Tiere führte, kann ebenfalls als belegt angesehen werden. Abschließend wurde beobachtet, dass eine CDI einen schnelleren Anstieg der ILC2 im Darm begünstige und somit konnte die achte Hypothese ebenfalls bestätigt werden.

X. FAZIT

Resümierend lässt sich sagen, dass sich eine Infektion mit *C. difficile* nicht klinisch manifestierte, jedoch beobachteten wir bei der immunologischen Untersuchung Tendenzen einer ILC2 verantwortlichen Immunantwort in den Dünndärmen. Hierbei fiel auf, dass bei einer subklinischen CDI eine tendenziell frühere und schwerere Manifestation einer CIA bei infizierten Tieren auftrat. Diese kennzeichnete sich durch eine ILC1-dominierende Immunantwort im Dünndarm bei der Infektionsgruppe nach stattgehabter Immunisierung. Zusätzlich zeigte sich nach erfolgter CDI ein beschleunigter Anstieg der ILC2 im Darm gegenüber nicht infizierten Tieren. Schlussfolgernd sind Zusammenhänge mit Verschiebungen der ILC-Zusammensetzung möglich, jedoch erfordern diese Hintergründe weiterführende detailliertere Untersuchungen. Ein Ansatz dafür könnte die zukünftige Analyse von Zytokin-Spiegeln sein, um somit modulatorische Einflüsse dieser auf die ILCs oder von den ILCs selbst ausgehend, adressieren zu können. Eine Verlängerung des Beobachtungszeitraumes könnte ebenfalls Erkenntnisse darüber liefern, ob der CDI-induzierte Anstieg der ILC2 zu einer vorgezogenen Remission führen kann. Auch könnte der Nachweis von *C. difficile*-spezifischen Toxinen im Stuhl erfolgen, um die Infektion besser quantifizieren zu können. Es wurden verschiedene Limitationen aufgezeigt, die Einfluss auf die Ergebnisse genommen haben könnten.

Mithilfe unserer Untersuchungen machten wir auf verschiedene Modulationen in immunologischen Prozessen bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen aufmerksam, dabei insbesondere im Darm. Auslösender Faktor könnte hierbei die veränderte Zusammensetzung des Mikrobioms gewesen sein. Es bedarf jedoch weiterer Forschungen, um unsere Ergebnisse weiter zu stützen.

XI. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Minichiello E, Semerano L, Boissier M-C. Time trends in the incidence, prevalence, and severity of rheumatoid arthritis: A systematic literature review. *Joint Bone Spine* 2016;83:625–30. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2016.07.007>.
 - [2] Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, et al. Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primers* 2018;4:18001. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.1>.
 - [3] Cojocaru M, Cojocaru IM, Silosi I, Vrabie CD, Tanasescu R, Maiorescu T. Extra-articular Manifestations in Rheumatoid Arthritis n.d.
 - [4] Conforti A, Di Cola I, Pavlych V, Ruscitti P, Berardicurti O, Ursini F, et al. Beyond the joints, the extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Reviews* 2021;20:102735. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102735>.
 - [5] Boonen A, Severens JL. The burden of illness of rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2011;30:3–8. <https://doi.org/10.1007/s10067-010-1634-9>.
 - [6] Finckh A, Gilbert B, Hodgkinson B, Bae S-C, Thomas R, Deane KD, et al. Global epidemiology of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2022. <https://doi.org/10.1038/s41584-022-00827-y>.
 - [7] Wasserman AM. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis. *Rheumatoid Arthritis* 2011;84.
 - [8] Glocker MO, Guthke R, Kekow J, Thiesen H-J. Rheumatoid arthritis, a complex multifactorial disease: On the way toward individualized medicine. *Medicinal Research Reviews* 2006;26:63–87. <https://doi.org/10.1002/med.20045>.
 - [9] Sakuragi T, Yamada H, Haraguchi A, Kai K, Fukushi J, Ikemura S, et al. Autoreactivity of Peripheral Helper T Cells in the Joints of Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Immunology* 2021;206:2045–51. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000783>.
 - [10] Bromley M, Woolley DE. Histopathology of the rheumatoid lesion. *Arthritis & Rheumatism* 1984;27:857–63. <https://doi.org/10.1002/art.1780270804>.
 - [11] McInnes IB. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *The New England Journal of Medicine* 2011.
 - [12] Chen L, Lu Y, Chu Y, Xie J, Ding W, Wang F. Tissue factor expression in rheumatoid synovium: a potential role in pannus invasion of rheumatoid arthritis. *Acta Histochemica* 2013;115:692–7. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2013.02.005>.
 - [13] Ostrowska M, Maśliński W, Prochorec-Sobieszek M, Nieciecki M, Sudoł-Szopińska I. Cartilage and bone damage in rheumatoid arthritis n.d.
-

-
- [14] Schneider M, Baseler G, Funken O, Heberger S, Kiltz U, Klose P, et al. Management der frühen rheumatoiden Arthritis: Interdisziplinäre Leitlinie. *Z Rheumatol* 2020;79:1–38. <https://doi.org/10.1007/s00393-020-00775-6>.
- [15] Zendman AJW, Vossenaar ER, Van Venrooij WJ. Autoantibodies to Citrullinated (Poly)Peptides: A Key Diagnostic and Prognostic Marker for Rheumatoid Arthritis. *Autoimmunity* 2004;37:295–9. <https://doi.org/10.1080/08916930410001708733>.
- [16] Interdisziplinäre Leitlinie Management der frühen rheumatoiden Arthritis. Darmstadt: Steinkopff; 2007. <https://doi.org/10.1007/978-3-7985-1711-0>.
- [17] Lee YH, Bae S-C, Song GG. Diagnostic accuracy of anti-MCV and anti-CCP antibodies in rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Z Rheumatol* 2015;74:911–8. <https://doi.org/10.1007/s00393-015-1598-x>.
- [18] Kuhn KA. Microbial pathways contributing to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 2024;152587. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2024.152587>.
- [19] Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis & Rheumatism* 2010;62:2569–81. <https://doi.org/10.1002/art.27584>.
- [20] Detert J, Bastian H, Listing J, Weiß A, Wassenberg S, Liebhaber A, et al. Induction therapy with adalimumab plus methotrexate for 24 weeks followed by methotrexate monotherapy up to week 48 versus methotrexate therapy alone for DMARD-naïve patients with early rheumatoid arthritis: HIT HARD, an investigator-initiated study. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2013;72:844–50. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-201612>.
- [21] Burmester GR, Pope JE. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis. *The Lancet* 2017;389:2338–48. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31491-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31491-5).
- [22] Bullock J, Rizvi SAA, Saleh AM, Ahmed SS, Do DP, Ansari RA, et al. Rheumatoid Arthritis: A Brief Overview of the Treatment. *Medical Principles and Practice* 2018;27:501–7. <https://doi.org/10.1159/000493390>.
- [23] Cush JJ. Rheumatoid Arthritis: Early Diagnosis and Treatment. *Medical Clinics of North America* 2021;105:355–65. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2020.10.006>.
- [24] Friedman B, Cronstein B. Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2019;86:301–7. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2018.07.004>.
- [25] Plosker GL, Croom KF. Sulfasalazine. *Drugs* 2005;65:1825–49. <https://doi.org/10.2165/00003495-200565130-00008>.
-

- [26] Alfaro-Lara R, Espinosa-Ortega HF, Arce-Salinas CA. Systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of leflunomide and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. *Reumatología Clínica* 2019;15:133–9. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2017.07.020>.
- [27] Verschueren P, De Cock D, Corluy L, Joos R, Langenaken C, Taelman V, et al. Effectiveness of methotrexate with step-down glucocorticoid remission induction (COBRA Slim) versus other intensive treatment strategies for early rheumatoid arthritis in a treat-to-target approach: 1-year results of CareRA, a randomised pragmatic open-label superiority trial. *Ann Rheum Dis* 2017;76:511–20. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-209212>.
- [28] Patel JP, Konanur Srinivasa NK, Gande A, Anusha M, Dar H, Baji DB. The Role of Biologics in Rheumatoid Arthritis: A Narrative Review. *Cureus* 2023. <https://doi.org/10.7759/cureus.33293>.
- [29] Scott DL. Biologics-Based Therapy for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2012;91:30–43. <https://doi.org/10.1038/clpt.2011.278>.
- [30] Schwartz DM, Kanno Y, Villarino A, Ward M, Gadina M, O'Shea JJ. JAK inhibition as a therapeutic strategy for immune and inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2017;16:843–62. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.201>.
- [31] Tanaka Y, Luo Y, O'Shea JJ, Nakayamada S. Janus kinase-targeting therapies in rheumatology: a mechanisms-based approach. *Nat Rev Rheumatol* 2022;18:133–45. <https://doi.org/10.1038/s41584-021-00726-8>.
- [32] Yamaoka K. Janus kinase inhibitors for rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Chemical Biology* 2016;32:29–33. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.03.006>.
- [33] Radu A-F, Bungau SG. Management of Rheumatoid Arthritis: An Overview. *Cells* 2021;10:2857. <https://doi.org/10.3390/cells10112857>.
- [34] Padyukov L. Genetics of rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol* 2022;44:47–62. <https://doi.org/10.1007/s00281-022-00912-0>.
- [35] Balsa A, Cabezón A, Orozco G, Cobo T, Miranda-Carus E, López-Nevot MA, et al. Influence of HLA DRB1 alleles in the susceptibility of rheumatoid arthritis and the regulation of antibodies against citrullinated proteins and rheumatoid factor. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R62. <https://doi.org/10.1186/ar2975>.
- [36] Berglin E, Padyukov L, Sundin U, Hallmans G, Stenlund H, Venrooij WJ van, et al. A combination of autoantibodies to cyclic citrullinated peptide (CCP) and HLA-DRB1 locus antigens is strongly associated with future onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2004;6:R303. <https://doi.org/10.1186/ar1187>.

-
- [37] Almeida DE de, Ling S, Holoshitz J. New Insights into the Functional Role of the Rheumatoid Arthritis Shared Epitope. *FEBS Letters* 2011;585:3619. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.03.035>.
- [38] Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987;30:1205–13. <https://doi.org/10.1002/art.1780301102>.
- [39] Hla class II association with rheumatoid arthritis: Facts and interpretations. *Human Immunology* 2000;61:1254–61. [https://doi.org/10.1016/S0198-8859\(00\)00185-3](https://doi.org/10.1016/S0198-8859(00)00185-3).
- [40] Malmström V, Catrina AI, Klareskog L. The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting. *Nat Rev Immunol* 2017;17:60–75. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.124>.
- [41] Alivernini S, Firestein GS, McInnes IB. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunity* 2022;55:2255–70. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.11.009>.
- [42] Gravalles EM, Firestein GS. Rheumatoid Arthritis — Common Origins, Divergent Mechanisms. *N Engl J Med* 2023;388:529–42. <https://doi.org/10.1056/NEJMra2103726>.
- [43] Pradeepkiran JA. Insights of rheumatoid arthritis risk factors and associations. *Journal of Translational Autoimmunity* 2019;2:100012. <https://doi.org/10.1016/j.jtauto.2019.100012>.
- [44] Qin B, Yang M, Fu H, Ma N, Wei T, Tang Q, et al. Body mass index and the risk of rheumatoid arthritis: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Arthritis Res Ther* 2015;17:86. <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0601-x>.
- [45] Linauskas A, Overvad K, Symmons D, Johansen MB, Stengaard-Pedersen K, De Thurah A. Body Fat Percentage, Waist Circumference, and Obesity As Risk Factors for Rheumatoid Arthritis: A Danish Cohort Study. *Arthritis Care & Research* 2019;71:777–86. <https://doi.org/10.1002/acr.23694>.
- [46] Frost F. Einführung in das Mikrobiom. *Innere Medizin* 2022;63:1015–21. <https://doi.org/10.1007/s00108-022-01395-9>.
- [47] De Luca F, Shoenfeld Y. The microbiome in autoimmune diseases. *Clinical and Experimental Immunology* 2018;195:74–85. <https://doi.org/10.1111/cei.13158>.
- [48] Li Y, Guo R, Oduro PK, Sun T, Chen H, Yi Y, et al. The Relationship Between Porphyromonas Gingivalis and Rheumatoid Arthritis: A Meta-Analysis. *Front Cell Infect Microbiol* 2022;12:956417. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.956417>.
- [49] Sakkas LI, Daoussis D, Liossis S-N, Bogdanos DP. The Infectious Basis of ACPA-Positive Rheumatoid Arthritis. *Front Microbiol* 2017;8:1853. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01853>.
-

- [50] Alshamrani S, Mashraqi MM, Alzamami A, Alturki NA, Almasoudi HH, Alshahrani MA, et al. Mining Autoimmune-Disorder-Linked Molecular-Mimicry Candidates in *Clostridioides difficile* and Prospects of Mimic-Based Vaccine Design: An In Silico Approach. *Microorganisms* 2023;11:2300. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092300>.
- [51] English J, Patrick S, Stewart LD. The potential role of molecular mimicry by the anaerobic microbiota in the aetiology of autoimmune disease. *Anaerobe* 2023;80:102721. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2023.102721>.
- [52] Amon P, Sanderson I. What is the microbiome? *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 2017;102:257–60. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2016-311643>.
- [53] Karaoui WR, Rustam LBO, Bou Daher H, Rimmani HH, Rasheed SS, Matar GM, et al. Incidence, outcome, and risk factors for recurrence of nosocomial *Clostridioides difficile* infection in adults: A prospective cohort study. *Journal of Infection and Public Health* 2020;13:485–90. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.11.005>.
- [54] Johanesen P, Mackin K, Hutton M, Awad M, Larcombe S, Amy J, et al. Disruption of the Gut Microbiome: *Clostridium difficile* Infection and the Threat of Antibiotic Resistance. *Genes* 2015;6:1347–60. <https://doi.org/10.3390/genes6041347>.
- [55] Leffler DA, Lamont JT. *Clostridium difficile* Infection. *N Engl J Med* 2015;372:1539–48. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1403772>.
- [56] Bouza E, Muñoz P, Alonso R. Clinical manifestations, treatment and control of infections caused by *Clostridium difficile*. *Clinical Microbiology and Infection* 2005;11:57–64. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01165.x>.
- [57] Schäffler H, Breitrück A. *Clostridium difficile* – From Colonization to Infection. *Front Microbiol* 2018;9:646. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00646>.
- [58] Smits WK, Lyras D, Lacy DB, Wilcox MH, Kuijper EJ. *Clostridium difficile* infection. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2:16020. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.20>.
- [59] Bartlett JG. Antibiotic-Associated Diarrhea. *The New England Journal of Medicine* 2002.
- [60] Weese JS. *Clostridium difficile* in food—innocent bystander or serious threat? *Clinical Microbiology and Infection* 2010;16:3–10. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03108.x>.
- [61] Paredes-Sabja D, Shen A, Sorg JA. *Clostridium difficile* spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends in Microbiology* 2014;22:406–16. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.003>.

- [62] Herold G. Innere Medizin: eine vorlesungsorientierte Darstellung: 2024: unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung: mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Dr. med. Gerd Herold, Arzt für Innere Medizin/Arbeitsmedizin; 2024.
- [63] RKI - RKI-Ratgeber - Clostridioides (früher Clostridium) difficile n.d. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Clostridium.html#doc2393684bodyText1 (accessed November 2, 2024).
- [64] Pepin J. Mortality attributable to nosocomial Clostridium difficile-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. Canadian Medical Association Journal 2005;173:1037–42. <https://doi.org/10.1503/cmaj.050978>.
- [65] Wiegand PN, Nathwani D, Wilcox MH, Stephens J, Shelbaya A, Haider S. Clinical and economic burden of Clostridium difficile infection in Europe: a systematic review of healthcare-facility-acquired infection. Journal of Hospital Infection 2012;81:1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2012.02.004>.
- [66] Manthey CF, Epple H-J, Keller K-M, Lübbert C, Posovszky C, Ramharter M, et al. S2k-Leitlinie Gastrointestinale Infektionen der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS): Version 2.0 – November 2023 – AWMF-Registernummer: 021–024. Z Gastroenterol 2024;62:1090–149. <https://doi.org/10.1055/a-2240-1428>.
- [67] Kordus SL, Thomas AK, Lacy DB. Clostridioides difficile toxins: mechanisms of action and antitoxin therapeutics. Nat Rev Microbiol 2022;20:285–98. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00660-2>.
- [68] Abt MC, McKenney PT, Pamer EG. Clostridium difficile colitis: pathogenesis and host defence. Nat Rev Microbiol 2016;14:609–20. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.108>.
- [69] Chandrasekaran R, Lacy DB. The role of toxins in Clostridium difficile infection. FEMS Microbiology Reviews 2017;41:723–50. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux048>.
- [70] Hof H. Clostridioides difficile. In: Hof H, Schlüter D, editors. Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie. 8., unveränderte Auflage, Georg Thieme Verlag KG; 2022. <https://doi.org/10.1055/b0000000575>.
- [71] Lyras D, O'Connor JR, Howarth PM, Sambol SP, Carter GP, Phumoonna T, et al. Toxin B is essential for virulence of Clostridium difficile. Nature 2009;458:1176–9. <https://doi.org/10.1038/nature07822>.
- [72] Murphy K, Weaver C. Das mukosale Immunsystem. Janeway Immunologie, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018, p. 641–91. https://doi.org/10.1007/978-3-662-56004-4_12.
-

-
- [73] Del Vecchio LE, Fiorani M, Tohumcu E, Bibbò S, Porcari S, Mele MC, et al. Risk Factors, Diagnosis, and Management of *Clostridioides difficile* Infection in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Microorganisms* 2022;10:1315. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071315>.
- [74] Slimings C, Riley TV. Antibiotics and healthcare facility-associated *Clostridioides difficile* infection: systematic review and meta-analysis 2020 update. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2021;76:1676–88. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab091>.
- [75] Webb BJ, Subramanian A, Lopansri B, Goodman B, Jones PB, Ferraro J, et al. Antibiotic Exposure and Risk for Hospital-Associated *Clostridioides difficile* Infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2020;64:e02169-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.02169-19>.
- [76] Mehta P, Nahass RG, Brunetti L. Acid Suppression Medications During Hospitalization as a Risk Factor for Recurrence of *Clostridioides difficile* Infection: Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases* 2021;73:e62–8. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa545>.
- [77] D'Silva KM, Mehta R, Mitchell M, Lee TC, Singhal V, Wilson MG, et al. Proton pump inhibitor use and risk for recurrent *Clostridioides difficile* infection: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection* 2021;27:697–703. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.01.008>.
- [78] Soto Ocaña J, Bayard NU, Zackular JP. Pain killers: the interplay between nonsteroidal anti-inflammatory drugs and *Clostridioides difficile* infection. *Current Opinion in Microbiology* 2022;65:167–74. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.11.011>.
- [79] Schaier M, Wendt C, Zeier M, Ritz E. *Clostridium difficile* diarrhoea in the immunosuppressed patient--update on prevention and management. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2004;19:2432–6. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfh428>.
- [80] Varma S, Greendyke WG, Li J, Freedberg DE. Class-Specific Relationship Between Use of Immunosuppressants and Risk for Community-Acquired *Clostridioides difficile* Infection. *Clinical Infectious Diseases* 2022;74:793–801. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab567>.
- [81] Boeriu A, Roman A, Fofiu C, Dobru D. The Current Knowledge on *Clostridioides difficile* Infection in Patients with Inflammatory Bowel Diseases. *Pathogens* 2022;11:819. <https://doi.org/10.3390/pathogens11070819>.
- [82] Markantonis JE, Fallon JT, Madan R, Alam MZ. *Clostridioides difficile* Infection: Diagnosis and Treatment Challenges. *Pathogens* 2024;13:118. <https://doi.org/10.3390/pathogens13020118>.
- [83] Cho JM, Pardi DS, Khanna S. Update on Treatment of *Clostridioides difficile* Infection. *Mayo Clinic Proceedings* 2020;95:758–69. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.08.006>.
-

-
- [84] Sinnathamby ES, Mason JW, Flanagan CJ, Pearl NZ, Burroughs CR, Witt AJD, et al. Clostridioides difficile Infection: A Clinical Review of Pathogenesis, Clinical Considerations, and Treatment Strategies. *Cureus* 2023;15:e51167. <https://doi.org/10.7759/cureus.51167>.
- [85] Wortelboer K, Nieuwdorp M, Herrema H. Fecal microbiota transplantation beyond Clostridioides difficile infections. *eBioMedicine* 2019;44:716–29. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.05.066>.
- [86] Zaiss MM, Joyce Wu H-J, Mauro D, Schett G, Ciccia F. The gut–joint axis in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2021;17:224–37. <https://doi.org/10.1038/s41584-021-00585-3>.
- [87] Romero-Figueroa MDS, Ramírez-Durán N, Montiel-Jarquín AJ, Horta-Baas G. Gut–joint axis: Gut dysbiosis can contribute to the onset of rheumatoid arthritis via multiple pathways. *Front Cell Infect Microbiol* 2023;13:1092118. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1092118>.
- [88] Hrnčir T. Gut Microbiota Dysbiosis: Triggers, Consequences, Diagnostic and Therapeutic Options. *Microorganisms* 2022;10:578. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030578>.
- [89] Zhao T, Wei Y, Zhu Y, Xie Z, Hai Q, Li Z, et al. Gut microbiota and rheumatoid arthritis: From pathogenesis to novel therapeutic opportunities. *Front Immunol* 2022;13:1007165. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1007165>.
- [90] Lin L, Zhang J. Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. *BMC Immunol* 2017;18:2. <https://doi.org/10.1186/s12865-016-0187-3>.
- [91] Garabatos N, Santamaria P. Gut Microbial Antigenic Mimicry in Autoimmunity. *Front Immunol* 2022;13:873607. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.873607>.
- [92] Zhou L, Zhang M, Wang Y, Dorfman RG, Liu H, Yu T, et al. Faecalibacterium prausnitzii Produces Butyrate to Maintain Th17/Treg Balance and to Ameliorate Colorectal Colitis by Inhibiting Histone Deacetylase 1. *Inflammatory Bowel Diseases* 2018;24:1926–40. <https://doi.org/10.1093/ibd/izy182>.
- [93] Delves PJ, Roitt IM. The Immune System. *N Engl J Med* 2000;343:37–49. <https://doi.org/10.1056/NEJM200007063430107>.
- [94] Nicholson LB. The immune system. *Essays in Biochemistry* 2016;60:275–301. <https://doi.org/10.1042/EBC20160017>.
- [95] Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *The Lancet* 2001;357:1777–89. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7).
-

-
- [96] Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010;125:S24–32. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.016>.
- [97] Edilova MI, Akram A, Abdul-Sater AA. Innate immunity drives pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Biomedical Journal* 2021;44:172–82. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.06.010>.
- [98] Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* 2013;13:145–9. <https://doi.org/10.1038/nri3365>.
- [99] Geremia A, Arancibia-Cárcamo CV. Innate Lymphoid Cells in Intestinal Inflammation. *Front Immunol* 2017;8:1296. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01296>.
- [100] Artis D, Spits H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature* 2015;517:293–301. <https://doi.org/10.1038/nature14189>.
- [101] Lim AI, Li Y, Lopez-Lastra S, Stadhouders R, Paul F, Casrouge A, et al. Systemic Human ILC Precursors Provide a Substrate for Tissue ILC Differentiation. *Cell* 2017;168:1086–1100.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.021>.
- [102] Levy M, Kolodziejczyk AA, Thaïs CA, Elinav E. Dysbiosis and the immune system. *Nat Rev Immunol* 2017;17:219–32. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.7>.
- [103] Beck K, Ohno H, Satoh-Takayama N. Innate Lymphoid Cells: Important Regulators of Host–Bacteria Interaction for Border Defense. *Microorganisms* 2020;8:1342. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091342>.
- [104] Fachi JL, Oliveira SD, Gilfillan S, Antonova AU, Hou J, Vinolo MAR, et al. NKp46⁺ ILC3s promote early neutrophil defense against *Clostridioides difficile* infection through GM-CSF secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2024;121:e2416182121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2416182121>.
- [105] Clottu AS, Humbel M, Fluder N, Karampetsou MP, Comte D. Innate Lymphoid Cells in Autoimmune Diseases. *Front Immunol* 2022;12:789788. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.789788>.
- [106] Schmidt CJ, Wenndorf K, Ebbers M, Volzke J, Strübing J, Kriebel K, et al. Infection With *Clostridioides difficile* Attenuated Collagen-Induced Arthritis in Mice and Involved Mesenteric Treg and Th2 Polarization. *Front Immunol* 2020;11:571049. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.571049>.
- [107] Chen X, Katchar K, Goldsmith JD, Nanthakumar N, Cheknis A, Gerding DN, et al. A Mouse Model of *Clostridium difficile*–Associated Disease. *Gastroenterology* 2008;135:1984–92. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.09.002>.
- [108] Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nat Protoc* 2007;2:1269–75. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.173>.
-

-
- [109] Campbell IK, Hamilton JA, Wicks IP. Collagen-induced arthritis in C57BL/6 (H-2b) mice: new insights into an important disease model of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 2000;30:1568–75. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200006\)30:6<1568::AID-IMMU1568>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200006)30:6<1568::AID-IMMU1568>3.0.CO;2-R).
- [110] Qiu Z, Sheridan BS. Isolating Lymphocytes from the Mouse Small Intestinal Immune System. *J Vis Exp* 2018. <https://doi.org/10.3791/57281>.
- [111] Moolenbeek C, Ruitenberg EJ. The ‘Swiss roll’: a simple technique for histological studies of the rodent intestine. *Lab Anim* 1981;15:57–60. <https://doi.org/10.1258/002367781780958577>.
- [112] Reeves AE, Theriot CM, Bergin IL, Huffnagle GB, Schloss PD, Young VB. The interplay between microbiome dynamics and pathogen dynamics in a murine model of *Clostridium difficile* Infection. *Gut Microbes* 2011;2:145–58. <https://doi.org/10.4161/gmic.2.3.16333>.
- [113] Goulding DR, Myers PH, Dickerson AB, Comins MM, Wiltshire RA, Blankenship-Paris TL. Comparative Efficacy of Two Types of Antibiotic Mixtures in Gut Flora Depletion in Female C57BL/6 Mice. *Comp Med* 2021;71:203–9. <https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-21-000023>.
- [114] Theriot CM, Koenigsnecht MJ, Carlson PE, Hatton GE, Nelson AM, Li B, et al. Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to *Clostridium difficile* infection. *Nat Commun* 2014;5:3114. <https://doi.org/10.1038/ncomms4114>.
- [115] Nordling C, Karlsson-Parra A, Jansson L, Holmdahl R, Klareskog L. Characterization of a spontaneously occurring arthritis in male DBA/1 mice. *Arthritis & Rheumatism* 1992;35:717–22. <https://doi.org/10.1002/art.1780350619>.
- [116] Braem K, Carter S, Lories RJ. Spontaneous arthritis and ankylosis in male DBA/1 mice: further evidence for a role of behavioral factors in “stress-induced arthritis.” *Biol Proced Online* 2012;14:10. <https://doi.org/10.1186/1480-9222-14-10>.
- [117] Harrell MI, Iritani BM, Ruddell A. Lymph node mapping in the mouse. *Journal of Immunological Methods* 2008;332:170–4. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2007.11.012>.
- [118] Dahdah A, Habir K, Nandakumar KS, Saxena A, Xu B, Holmdahl R, et al. Germinal Center B Cells Are Essential for Collagen-Induced Arthritis. *Arthritis & Rheumatology* 2018;70:193–203. <https://doi.org/10.1002/art.40354>.
- [119] Vinuesa CG, Sanz I, Cook MC. Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 2009;9:845–57. <https://doi.org/10.1038/nri2637>.
- [120] Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* 2015;74:5–17. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.09.011>.
-

- [121] Scherer HU, Huizinga TWJ, Krönke G, Schett G, Toes REM. The B cell response to citrullinated antigens in the development of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2018;14:157–69. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2018.10>.
- [122] Yanaba K, Hamaguchi Y, Venturi GM, Steeber DA, St. Clair EW, Tedder TF. B Cell Depletion Delays Collagen-Induced Arthritis in Mice: Arthritis Induction Requires Synergy between Humoral and Cell-Mediated Immunity¹. *The Journal of Immunology* 2007;179:1369–80. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.2.1369>.
- [123] Mellado M. T cell migration in rheumatoid arthritis. *Front Immunol* 2015;6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00384>.
- [124] Petrelli A, Van Wijk F. CD8⁺ T cells in human autoimmune arthritis: the unusual suspects. *Nat Rev Rheumatol* 2016;12:421–8. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.74>.
- [125] Abt MC, Lewis BB, Caballero S, Xiong H, Carter RA, Sušac B, et al. Innate Immune Defenses Mediated by Two ILC Subsets Are Critical for Protection against Acute *Clostridium difficile* Infection. *Cell Host & Microbe* 2015;18:27–37. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.06.011>.
- [126] Wallrapp A, Riesenfeld SJ, Burkett PR, Kuchroo VK. Type 2 innate lymphoid cells in the induction and resolution of tissue inflammation. *Immunological Reviews* 2018;286:53–73. <https://doi.org/10.1111/imr.12702>.
- [127] Hamo Z, Azrad M, Nitzan O, Peretz A. Characterization of the Immune Response during Infection Caused by *Clostridioides difficile*. *Microorganisms* 2019;7:435. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100435>.
- [128] Frisbee AL, Saleh MM, Young MK, Leslie JL, Simpson ME, Abhyankar MM, et al. IL-33 drives group 2 innate lymphoid cell-mediated protection during *Clostridium difficile* infection. *Nat Commun* 2019;10:2712. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10733-9>.
- [129] Houston SA, Cerovic V, Thomson C, Brewer J, Mowat AM, Milling S. The lymph nodes draining the small intestine and colon are anatomically separate and immunologically distinct. *Mucosal Immunology* 2016;9:468–78. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.77>.
- [130] Takaki-Kuwahara A, Arinobu Y, Miyawaki K, Yamada H, Tsuzuki H, Irino K, et al. CCR6⁺ group 3 innate lymphoid cells accumulate in inflamed joints in rheumatoid arthritis and produce Th17 cytokines. *Arthritis Res Ther* 2019;21:198. <https://doi.org/10.1186/s13075-019-1984-x>.
- [131] Al-Saadany HM, Hussein MS, Gaber RA, Zaytoun HA. Th-17 cells and serum IL-17 in rheumatoid arthritis patients: Correlation with disease activity and severity. *The Egyptian Rheumatologist* 2016;38:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejr.2015.01.001>.
- [132] Fang W, Zhang Y, Chen Z. Innate lymphoid cells in inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther* 2020;22:25. <https://doi.org/10.1186/s13075-020-2115-4>.

- [133] Rodríguez-Carrio J, Hähnlein JS, Ramwadhoebe TH, Semmelink JF, Choi IY, Van Lienden KP, et al. Brief Report: Altered Innate Lymphoid Cell Subsets in Human Lymph Node Biopsy Specimens Obtained During the At-Risk and Earliest Phases of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatology* 2017;69:70–6. <https://doi.org/10.1002/art.39811>.
- [134] Omata Y, Frech M, Primbs T, Lucas S, Andreev D, Scholtysek C, et al. Group 2 Innate Lymphoid Cells Attenuate Inflammatory Arthritis and Protect from Bone Destruction in Mice. *Cell Reports* 2018;24:169–80. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.005>.
- [135] Ohne Y, Silver JS, Thompson-Snipes L, Collet MA, Blanck JP, Cantarel BL, et al. IL-1 is a critical regulator of group 2 innate lymphoid cell function and plasticity. *Nat Immunol* 2016;17:646–55. <https://doi.org/10.1038/ni.3447>.
- [136] Kumar V. Innate Lymphoid Cells and Adaptive Immune Cells Cross-Talk: A Secret Talk Revealed in Immune Homeostasis and Different Inflammatory Conditions. *International Reviews of Immunology* 2021;40:217–51. <https://doi.org/10.1080/08830185.2021.1895145>.
- [137] Burska A, Boissinot M, Ponchel F. Cytokines as Biomarkers in Rheumatoid Arthritis. *Mediators of Inflammation* 2014;2014:1–24. <https://doi.org/10.1155/2014/545493>.
- [138] Zeng B, Shi S, Ashworth G, Dong C, Liu J, Xing F. ILC3 function as a double-edged sword in inflammatory bowel diseases. *Cell Death Dis* 2019;10:315. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1540-2>.

XII. THESEN

1. Eine Inokulation mit *C. difficile* VPI 10463 führt in den DBA/1J x B10.Q. Mäusen zur klinischen Manifestation einer Colitis mit einem signifikanten Gewichtsverlust.
2. Eine subakute *C. difficile* Infektion zeigt einen protektiven Effekt auf den Krankheitsverlauf einer Kollagen-induzierten Arthritis.
3. Die klinische Manifestation zeigt auch histologische Veränderungen in den Pfoten der Tiere.
4. Eine Immunisierung mit Kollagen Typ II induziert eine lymphoproliferative Reaktion in inguinalen Lymphknoten.
5. Die Immunisierung führt zu einer Zunahme der absoluten CD4+Zellen in den inguinalen Lymphknoten.
6. Die subakute Infektion zeigt Tendenzen einer ILC2-dominierten Immunantwort.
7. Im Zuge der Immunisierung zeigt sich eine Zunahme von ILC1 in der Dünndarmmukosa von zuvor infizierten Mäusen.
8. *C. difficile* begünstigt einen schnelleren ILC2-Anstieg nach der Sekundärimmunisierung.

XIII. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

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

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

Rostock, den

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)

XVI. ANHANG

16.1 DESKRIPTIVE STATISTIK

Anhang Tabelle 1: Deskriptive Statistik der inguinale Lymphknoten

IL Anteil (%) CD45+ Live		Gruppe A: Subklinische Infektion		Gruppe B: Abklingende Infektion		Gruppe C: Chronische Infektion		Gruppe D: Nach Primärimmunisierung		Gruppe E: Vor Sekundärimmunisierung		Gruppe F: Nach Sekundärimmunisierung		Gruppe G: CIA-Latenzphase		Interaktion	Einzelsignifikanz
		Median (IQR)	p	Median (IQR)	p	Median (IQR)	p	Median (IQR)	p	Median (IQR)	p	Median (IQR)	p	Median (IQR)	p		
CD4	C difficile	40,20 (35,00-45,70)	1,00	43,35 (36,58-47,00)	0,77	40,50 (34,65-42,45)	0,65	31,15 (28,63-35,18)	0,57	22,90 (19,80-32,60)	0,79	22,20 (14,83-25,85)	0,68	27,85 (26,90-31,73)	0,28	<0,0001	A&E: p=0,02
	Kontrolle	41,20 (28,43-45,35)		44,25 (42,38-45,75)		41,95 (34,58-46,48)		26,90 (23,58-38,03)		22,75 (19,43-23,83)		24,80 (16,25-34,93)		27,00 (14,65-28,60)			A&F: p=0,004
ILC	C difficile	2,71 (1,10-3,58)	0,97	2,01 (1,45-2,57)	0,15	1,34 (1,16-1,81)	0,03	2,44 (1,55-3,67)	0,71	1,52 (1,32-2,87)	0,53	2,73 (2,02-3,33)	0,004	1,74 (0,78-2,90)	0,31	0,03	B&E: p=0,004
	Kontrolle	2,10 (1,56-3,26)		3,62 (1,56-3,79)		4,55 (2,36-4,94)		2,57 (1,24-3,16)		1,36 (0,90-2,06)		0,73 (0,29-1,35)		2,11 (1,92-3,47)			B&G: p=0,03
ILC1	C difficile	0,30 (0,21-0,67)	0,79	0,24 (0,21-0,56)	0,07	0,27 (0,18-0,34)	0,04	0,49 (0,29-0,55)	0,30	0,32 (0,24-0,63)	0,04	0,25 (0,17-0,30)	0,07	0,17 (0,13-0,47)	1,00	0,01	C&E: p=0,04
	Kontrolle	0,46 (0,31-0,59)		0,70 (0,34-0,96)		0,42 (0,33-0,56)		0,35 (0,15-0,52)		0,13 (0,08-0,24)		0,07 (0,04-0,19)		0,29 (0,11-0,40)			C&F: p=0,01
ILC3	C difficile	0,14 (0,05-0,15)	0,28	0,06 (0,04-0,20)	0,91	0,06 (0,03-0,10)	0,12	0,06 (0,04-0,10)	0,78	0,06 (0,05-0,08)	0,66	0,07 (0,04-0,11)	0,03	0,04 (0,01-0,08)	0,05	0,09	B&F: p= 0,04
	Kontrolle	0,15 (0,08-0,29)		0,08 (0,05-0,11)		0,24 (0,10-0,39)		0,10 (0,02-0,28)		0,12 (0,04-0,22)		0,02 (0,00-0,05)		0,11 (0,04-0,22)			
FoxP3+ILC	C difficile	0,13 (0,04-0,20)	0,07	0,21 (0,17-0,28)	0,60	0,14 (0,09-0,21)	0,12	0,08 (0,07-0,17)	0,68	0,15 (0,1-0,21)	0,13	0,20 (0,11-0,31)	0,02	0,13 (0,09-0,28)	0,70	0,32	
	Kontrolle	0,28 (0,17-0,71)		0,27 (0,09-0,35)		0,24 (0,17-0,38)		0,14 (0,06-0,23)		0,11 (0,04-0,12)		0,02 (0,00-0,10)		0,17 (0,12-0,20)			0,02
ILC2	C difficile	0,04 (0,01-0,09)	0,39	0,10 (0,02-0,20)	0,97	0,03 (0,02-0,06)	0,81	0,07 (0,03-0,17)	0,60	0,02 (0,03-0,14)	0,25	0,05 (0,01-0,08)	0,24	0,04 (0,03-0,07)	0,18	0,20	
	Kontrolle	0,07 (0,04-0,14)		0,08 (0,02-0,18)		0,04 (0,02-0,06)		0,10 (0,04-0,15)		0,04 (0,01-0,07)		0,02 (0,00-0,04)		0,00 (0,00-0,08)			0,68
ST2+ILC2	C difficile	0,00 (0,00-0,00)	0,56	0,00 (0,00-0,00)	0,93	0,00 (0,00-0,00)	0,07	0,00 (0,00-0,01)	0,68	0,00 (0,00-0,00)	0,78	0,00 (0,00-0,00)	0,004	0,00 (0,00-0,00)	0,17	0,02	C&F: p= 0,01
	Kontrolle	0,00 (0,00-0,00)		0,00 (0,00-0,00)		0,01 (0,00-0,02)		0,00 (0,00-0,00)		0,00 (0,00-0,00)		0,00 (0,00-0,00)		0,00 (0,00-0,00)			
ST2-ILC2	C difficile	0,04 (0,01-0,08)	0,39	0,09 (0,02-0,20)	0,84	0,03 (0,02-0,05)	0,54	0,06 (0,03-0,15)	0,60	0,07 (0,01-0,14)	0,21	0,04 (0,01-0,06)	0,35	0,00 (0,02-0,06)	0,28	0,18	
	Kontrolle	0,07 (0,03-0,14)		0,08 (0,02-0,17)		0,02 (0,01-0,04)		0,10 (0,04-0,14)		0,04 (0,01-0,06)		0,02 (0,00-0,04)		0,00 (0,00-0,08)			

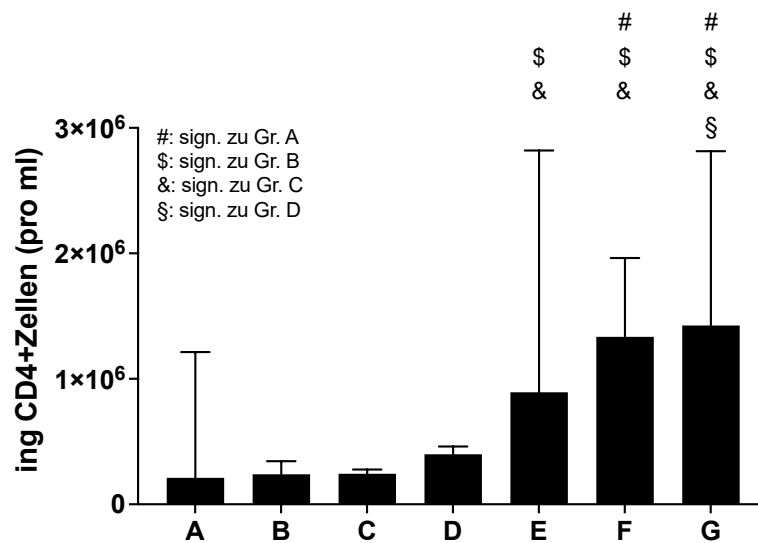
Anhang Tabelle 2: Deskriptive Statistik der mesenteriale Lymphknoten

ML Anteil (%) CD45+ Live		Gruppe A: Subklinische Infektion		Gruppe B: Abklingende Infektion		Gruppe C: Chronische Infektion		Gruppe D: Nach Primärimmunisierung		Gruppe E: Vor Sekundärimmunisierung		Gruppe F: Nach Sekundärimmunisierung		Gruppe G: CIA-Latenzphase		Interaktion	Einzelsignifikanz
		Median (IQR)	p	Median (IQR)	p	Median (IQR)	p	Median (IQR)	p	Median (IQR)	p	Median (IQR)	p	Median (IQR)	p		
CD4	C difficile	38,30 (24,80-41,30)	0,93	36,55 (31,45-42,60)	1,00	36,90 (34,43-37,30)	0,07	37,15 (33,28-38,05)	0,78	37,00 (35,35-38,10)	0,91	33,85 (32,33-39,38)	0,15	25,10 (22,73-35,65)	0,81	0,25	
	Kontrolle	35,40 (32,53-40,68)		38,60 (31,40-39,80)		34,25 (26,13-35,55)		36,60 (28,60-41,00)		37,25 (33,75-42,33)		39,00 (34,48-42,93)		26,90 (21,95-30,00)			0,09
ILC	C difficile	0,64 (0,52-1,03)	0,01	0,69 (0,57-0,74)	0,04	0,93 (0,71-1,16)	0,81	0,66 (0,57-1,17)	1,00	0,97 (0,71-1,33)	0,68	1,19 (0,63-1,28)	0,97	1,00 (0,79-1,17)	0,94	0,10	
	Kontrolle	1,25 (1,08-1,47)		0,92 (0,90-1,21)		0,92 (0,79-1,14)		0,76 (0,43-1,33)		1,11 (0,82-1,71)		1,03 (0,68-1,29)		1,00 (0,66-1,19)			0,48
ILC1	C difficile	0,23 (0,14-0,24)	0,07	0,21 (0,13-0,25)	0,06	0,28 (0,18-0,29)	0,36	0,21 (0,14-0,28)	0,81	0,27 (0,17-0,30)	0,30	0,23 (0,18-0,40)	1,00	0,26 (0,24-0,34)	1,00	0,23	
	Kontrolle	0,41 (0,24-0,45)		0,33 (0,25-0,47)		0,29 (0,26-0,35)		0,23 (0,13-0,37)		0,20 (0,19-0,23)		0,26 (0,17-0,32)		0,32 (0,16-0,34)			0,25
ILC3	C difficile	0,06 (0,05-0,13)	0,33	0,10 (0,07-0,15)	0,12	0,13 (0,05-0,16)	0,22	0,08 (0,07-0,10)	0,40	0,13 (0,09-0,21)	0,98	0,11 (0,04-0,27)	0,43	0,20 (0,10-0,26)	0,65	0,26	
	Kontrolle	0,10 (0,09-0,15)		0,17 (0,15-0,17)		0,16 (0,12-0,22)		0,05 (0,03-0,25)		0,13 (0,08-0,24)		0,17 (0,13-0,20)		0,19 (0,16-0,28)			0,25
FoxP3+ILC	C difficile	0,01 (0,01-0,02)	0,009	0,02 (0,02-0,03)	0,63	0,03 (0,02-0,06)	0,36	0,01 (0,00-0,02)	0,21	0,03 (0,02-0,05)	0,66	0,03 (0,01-0,05)	0,67	0,04 (0,02-0,07)	0,55	0,02	D&G: p=0,04
	Kontrolle	0,09 (0,04-0,12)		0,05 (0,01-0,10)		0,05 (0,03-0,06)		0,06 (0,01-0,08)		0,04 (0,02-0,05)		0,04 (0,02-0,08)		0,03 (0,01-0,07)			0,58
ILC2	C difficile	0,08 (0,04-0,12)	0,31	0,06 (0,02-0,08)	0,96	0,09 (0,04-0,11)	0,03	0,13 (0,07-0,23)	0,27	0,09 (0,06-0,19)	0,90	0,11 (0,09-0,29)	0,55	0,09 (0,07-0,17)	0,50	0,04	
	Kontrolle	0,05 (0,03-0,06)		0,04 (0,01-0,16)		0,03 (0,02-0,03)		0,09 (0,04-0,10)		0,10 (0,08-0,12)		0,10 (0,05-0,15)		0,10 (0,07-0,30)			0,10
ST2+ILC2	C difficile	0,02 (0,00-0,02)	0,41	0,00 (0,00-0,01)	0,66	0,01 (0,00-0,02)	0,85	0,02 (0,01-0,03)	0,52	0,03 (0,01-0,04)	0,58	0,04 (0,03-0,05)	0,03	0,02 (0,02-0,04)	0,38	0,06	B&F: p=0,002
	Kontrolle	0,00 (0,00-0,01)		0,00 (0,00-0,01)		0,01 (0,00-0,02)		0,03 (0,01-0,05)		0,02 (0,01-0,04)		0,02 (0,01-0,03)		0,04 (0,02-0,07)			C&F: p=0,04
ST2-ILC2	C difficile	0,06 (0,03-0,11)	0,25	0,05 (0,01-0,08)	1,00	0,07 (0,03-0,09)	0,02	0,11 (0,04-0,20)	0,16	0,06 (0,05-0,15)	0,84	0,08 (0,06-0,21)	0,85	0,06 (0,05-0,14)	0,85	0,37	
	Kontrolle	0,04 (0,02-0,04)		0,03 (0,00-0,15)		0,02 (0,00-0,02)		0,04 (0,03-0,06)		0,08 (0,06-0,09)		0,08 (0,03-0,13)		0,06 (0,04-0,24)			0,04

Anhang Tabelle 3: Deskriptive Statistik der Dünndarmmukosa

DL Anteil (%) CD45+ Live		Gruppe A: Subklinische Infektion		Gruppe B: Abklingende Infektion		Gruppe C: Chronische Infektion		Gruppe D: Nach Primärimmunisierung		Gruppe E: Vor Sekundärimmunisierung		Gruppe F: Nach Sekundärimmunisierung		Gruppe G: CIA-Latenzphase		Interaktion	Einzelsignifikanz
		Median (IQR)	p	Median (IQR)	p	Median (IQR)	p	Median (IQR)	p	Median (IQR)	p	Median (IQR)	p	Median (IQR)	p		
CD4	C.difficile	7,96 (6,75-13,30)	0,32	7,73 (5,30-8,91)	0,05	4,77 (3,02-6,16)	0,07	7,54 (7,13-8,03)	0,03	5,33 (4,82-5,71)	0,15	6,41 (4,37-7,15)	0,11	5,56 (5,18-6,47)	0,52	0,003	A&C: p= 0,02
	Kontrolle	7,25(3,09-10,39)		4,57 (3,16-5,73)		7,13 (6,24-11,72)		6,42 (5,69-7,17)		4,15 (2,43-5,52)		4,27 (2,36-5,19)		6,04 (5,64-6,86)		0,05	C&D: p=0,05
ILC	C.difficile	3,77 (1,26-6,53)	0,53	4,00 (3,15-5,65)	0,07	6,93 (5,78-7,67)	0,21	5,45 (2,38-8,63)	1,00	7,75 (6,67-8,59)	0,68	8,49 (7,52-10,56)	0,43	7,83 (5,81-10,55)	0,35	0,44	A&F: p=0,03
	Kontrolle	4,42 (2,39-12,32)		6,31 (5,40-9,62)		9,34 (6,06-10,86)		5,36 (3,79-6,85)		8,85 (6,49-11,48)		6,82 (3,40-9,82)		7,27 (5,11-7,85)		0,002	B&F: p=0,002
ILC1	C.difficile	0,76 (0,23-1,15)	0,32	1,28 (0,79-1,64)	0,21	2,05 (1,85-2,47)	0,03	2,05 (0,91-2,89)	0,68	3,17 (2,64-4,04)	0,57	3,73 (3,40-4,17)	0,68	2,98 (2,34-4,65)	0,44	<0,0001	A&F: p=0,0002
	Kontrolle	1,02 (0,65-2,00)		2,10 (1,38-2,13)		3,45 (2,38-4,10)		2,09 (1,72-2,92)		2,70 (1,82-3,90)		2,52 (1,09-4,48)		2,63 (2,12-3,30)		0,15	A&G: p=0,004
ILC3	C.difficile	0,76 (0,57-2,45)	0,23	1,14 (0,69-2,48)	0,11	1,62 (1,33-1,85)	0,03	1,88 (0,75-5,02)	0,68	3,66 (1,44-6,29)	0,93	4,59 (3,11-5,90)	0,02	4,32 (2,76-7,08)	0,72	0,07	B&E: p=0,05
	Kontrolle	1,82 (1,37-5,04)		4,64 (2,17-8,51)		3,75 (3,40-4,54)		2,34 (1,88-3,11)		4,24 (2,49-4,77)		1,94 (0,56-2,34)		5,29 (2,53-5,70)		0,01	B&F: p=0,01
FoxP3+ILC	C.difficile	0,05 (0,00-0,11)	0,07	0,09 (0,03-0,15)	0,68	0,04 (0,03-0,05)	0,06	0,09 (0,01-0,21)	0,31	0,07 (0,05-0,15)	0,84	0,21 (0,05-0,43)	0,46	0,04 (0,03-0,20)	0,40	0,49	
	Kontrolle	0,19 (0,13-0,23)		0,11 (0,03-0,33)		0,24 (0,06-0,45)		0,22 (0,06-0,49)		0,09 (0,02-0,33)		0,13 (0,00-0,41)		0,17 (0,05-0,39)	0,40	0,95	
ILC2	C.difficile	0,16 (0,07-0,24)	0,97	0,25 (0,19-0,40)	0,78	0,27 (0,16-0,56)	0,81	0,51 (0,12-1,10)	1,00	0,57 (0,22-0,93)	0,96	0,68 (0,65-0,78)	0,004	0,47 (0,29-0,48)	0,60	0,06	
	Kontrolle	0,15 (0,08-0,28)		0,32 (0,08-0,59)		0,27 (0,14-0,39)		0,57 (0,34-0,70)		0,50 (0,35-0,87)		0,22 (0,09-0,38)		0,49 (0,31-0,59)		0,02	
ST2+ILC2	C.difficile	0,04 (0,03-0,06)	0,61	0,10 (0,05-0,14)	0,30	0,06 (0,04-0,10)	0,08	0,17 (0,02-0,34)	0,94	0,13 (0,07-0,21)	0,97	0,21 (0,17-0,26)	0,004	0,12 (0,07-0,19)	0,30	0,005	A&F: p=0,01
	Kontrolle	0,08 (0,01-0,15)		0,07 (0,05-0,08)	0,30	0,11 (0,09-0,19)	0,08	0,13 (0,07-0,16)		0,13 (0,10-0,18)		0,04 (0,01-0,06)	0,004	0,16 (0,13-0,22)	0,30	0,02	A&F: p=0,003
ST2-ILC2	C.difficile	0,1 (0,04-0,18)	0,75	0,13 (0,11-0,28)	0,78	0,21 (0,12-0,47)	0,30	0,36 (0,09-0,59)	0,64	0,42 (0,16-0,76)	0,97	0,48 (0,43-0,56)	0,006	0,29 (0,21-0,40)	0,97	0,10	F&G: p= 0,02
	Kontrolle	0,08 (0,06-0,14)		0,25 (0,04-0,52)	0,21	0,15 (0,05-0,22)	0,30	0,41 (0,27-0,59)		0,33 (0,24-0,75)		0,20 (0,07-0,33)		0,30 (0,16-0,39)	0,10		

16.2 ABBILDUNGEN



Anhang Abbildung 1: Eine Immunisierung mit Kollagen Typ II führte bei inguinalen Lymphknoten zu einem Anstieg der absoluten CD4+Zellzahl. Dargestellt sind die absoluten CD4+Lymphozyten nach der Aufarbeitung in den inguinalen Lymphknoten. Dafür wurde der prozentuale Anteil der CD4+Population aus der Durchflusszytometrie mit der absoluten Zellzahl verrechnet. Für eine bessere Übersicht wurden zur Darstellung der Signifikanzen verschiedene Indikatoren verwendet (#, &, \$ und §). Kruskal-Wallis Test mit multipler Vergleichsanalyse, Balkendiagramm mit Interquartilsabstand. Versuchsgruppen auf der Abszisse dargestellt: Subakute Infektion (A), Abklingende Infektion (B), Rekonvaleszenz der Infektion (C), Nach Primärimmunisierung (D), Vor Sekundärimmunisierung (E), Nach Sekundärimmunisierung (F), CIA-Latenzphase (G).

16.3 METHODEN

Anhang Tabelle 4: RPMI-Vollmedium

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

Anhang Tabelle 5: Protokoll H&E Färbung

Schritt	Reagenz	Zeit
1.	Roti-Histol	10 min
2.	Roti-Histol	10 min
3.	Propanol	5 min
4.	Propanol	5 min
5.	96 % Ethanol	5 min
6.	80 % Ethanol	5 min
7.	70 % Ethanol	5 min
8.	Aquadest	5 min
9.	Aquadest	5 min
10.	Hämalaun	70 s (Darm) / 30 s (Pfote)
11.	Spülen unter fließendem Leitungswasser	30 min
12.	Aquadest	5 min
13.	Eosin	80 s (Darm) / 40 s (Pfote)
14.	Aquadest	3x eintauchen
15.	70 % Ethanol + 1 Tropfen NH	5 min
16.	80 % Ethanol	5 min
17.	96 % Ethanol	5 min
18.	Propanol	5 min
19.	Propanol	5 min
20.	Roti-Histol	5 min
21.	Roti-Histol	Über Nacht
22.	Eindecken mit Kanadabalsam verdünnt mit Xylol	Über Nacht

16.4 MATERIALIEN

16.4.1 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
Feeding Needle 20G	Fine Science Tools	18060-20
Zellkultur Multiwellplatte, 6 well	Greiner	657160
Einbettkassette Standard	Kabe Labortechnik GmbH	REF 053749
MACS SmartStrainers 70µm	Miltenyi Biotec	130-110-916
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld	640010
FACS-Reaktionsgefäß, 5 ml	Sarstedt AG & Co. KG	REF 55.1579
Sterilisationsfilter, 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
Reaktionsgefäßen mit verschiedenen Volumina	Laborbestand	

16.4.2 CHEMIKALIEN

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

M. tuberculosis des. H37 Ra 100mg	Becton, Dickinson and Company	231141
Alexa Fluor® 647 anti-mouse FOXP3 Antibody (MF-14)	BioLegend	126407
Alexa Fluor® 647 anti-mouse IL-4 Antibody	BioLegend	504112
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 Isotype 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
Recombinant Human TGF-β1	BioLegend	781802
Recombinant Mouse IL-12 (p70)	BioLegend	577002
True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set	BioLegend	424401
TruStain FcX™ (anti-mouse CD16/32) Antibody (93)	BioLegend	101319
Ultra-LEAF™ Purified anti-mouse CD28 Antibody	BioLegend	102116
Ultra-LEAF™ Purified anti-mouse CD3ε Antibody	BioLegend	100340
Ultra-LEAF™ Purified anti-mouse IFN-γ Antibody	BioLegend	505834
Zombie NIR™ Fixable Viability Kit	BioLegend	423105
1-Propanolol >99,5%	Carl Roth	9169.1
Eosin G-Lösung 0,5 %	Carl Roth	X883.2
Kanadabalsam	Carl Roth	8016.2
Kanamycinsulfat	Carl Roth	T832.1
ROTI Histol (96 - 98 % Limonen)	Carl Roth	6640.1
Bovines Typ 2 Kollagen	Chondrex	CHX-20021
Percoll density gradient media	GE Healthcare	17089101
L-Glutamin 200 mM	Gibco™	25030081
Trypanblau	Gibco™	15250-061
Formafix 4%	Grimm med. Logistics	F10010G
Colistiflex 1 mio. I.E	InfectoPharm	PZN 11511790
Ultracomp eBeads™ Kompensations-Beads	Invitrogen™	01-2222-41

		Lot 2462645
Ketamin Graeub 100 mg/ml	Livisto	400042.00.00
UseDecal, EDTA-Lösung	Medite	403310-00
Glycerol 85%	Merck	1.04094.1000
Mayers Häkalaunlösung	Merck	1.09249.0500
CD4 (L3T4) MicroBeads	Miltenyi Biotec	130-117-043
Mouse IL-2 IS	Miltenyi Biotec	130-120-662
Mouse IL-23	Miltenyi Biotec	130-096-676
Mouse IL-4	Miltenyi Biotec	130-094-061
Mouse IL-6	Miltenyi Biotec	130-094-065
autoMACS Running Buffer	Miltenyi Biotec	130-091-221
Clinda-saar 600 mg	MIP Pharma GmbH	PZN-03796519
Vanco-saar 500 mg	MIP Pharma GmbH	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
Collagenase Type IV 100U/ml	StemCell Technologies	100-0680
Phosphate Buffered Saline Packs	Thermo SCIENTIFIC	REF 28374
Ethanol 96 % (v/v), mit Methylethylketon vergällt	UMR Zentralapotheke	

16.4.3 VERSUCHSTIERE

Mausstamm	Geschlecht	Alter zu Beginn	Anzahl (n)
F1 (DBA/1J x B10.Q)	Männlich	8-12 Wochen	93

16.4.4 GERÄTE

Produktbezeichnung	Hersteller	Verwendungszweck
Axiocam 208c color	Carl Zeiss AG	Mikro-Fotoapparat
Axioskop 40	Carl Zeiss AG	Mikroskop
Hyrax M55 Mikrotom	Carl Zeiss AG	Rotationsmikrotom
Cytec Aurora	Cytec® Biosciences	Durchflusszytometer
DS-C Spectrophotometer	DeNovix	OD-Messung
miniMACS Anaerobic Workstation	don whitley scientific	Anaerobier Box
Vent II THF3365	Ehret	Belüftungsanlage Kleintierkäfig
autoMACS® Pro	Miltenyi Biotec	Zellsortierung
Class II Biosafety Cabinets	Nuaire	Sterilbank
IVC-Käfig 2L	Zoonlab	Kleinnager-Käfig

16.4.5 SOFTWARE

Produktbezeichnung	Hersteller	Verwendungszweck
ZEN Version 3.8	Carl Zeiss AG	Anfertigung histologischer Bilder
Zotero	Corporation for Digital Scholarship	Zitierprogramm
FlowJo Version 10.10	FlowJo, LLC	Auswertung Durchflusszytometrischer Daten
GraphPad Prism 10	GraphPad Software, Inc	Abbildungen und Statistik
Microsoft Excel Version 2021	Microsoft Corporation	Datenarchivierung
Microsoft Power Point Version 2021	Microsoft Corporation	Abbildungen
Microsoft Word Version 2021	Microsoft Corporation	Dissertationsschrift

16.5 HERSTELLERVERZEICHNIS

Firmenname	Hauptsitz
Acros Organics	Geel, Belgien
B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Bayer AG	Leverkusen, Deutschland
BD Biosciences	Franklin Lakes, New Jersey, USA
Becton Dickinson and Company	Franklin Lakes, New Jersey, USA
BioLegend	San Diego, Kalifornien, USA
Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Chondrex	Woodinville, Washington, USA
Cytek® Biosciences	Fremont, Kalifornien, USA
DeNovix	Wilmington, Delaware, USA
don whitley scientific	Bingley, Vereinigtes Königreich
Ehret	Freiburg, Deutschland
Fine Science Tools	Heidelberg, Deutschland (EU-Büro)
GE Healthcare	Chicago, Illinois, USA
Gibco™	Waltham, Massachusetts, USA
Greiner	Kremsmünster, Österreich
Grimm med. Logistics	Torgelow, Deutschland
InfectoPharm	Heppenheim, Deutschland
Invitrogen™	Waltham, Massachusetts, USA
Kabe Labortechnik GmbH	Nümbrecht, Deutschland
Livisto	Senden-Bösensell, Deutschland
Medite	Burgdorf, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
MIP Pharma GmbH	Blieskastel, Deutschland
Nuaire	Plymouth, Minnesota, USA
Oxoid	Basingstoke, Vereinigtes Königreich
PAN Biotech	Aidenbach, Deutschland
Paul Marienfeld	Lauda-Königshofen, Deutschland
Ratiopharm	Ulm, Deutschland
Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri, USA

StemCell Technologies

Vancouver, Kanada

Thermo SCIENTIFIC

Waltham, Massachusetts, USA
