

Aus dem Zentrum für Infektiologie der Universität Heidelberg,
Abteilung Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Alexander Dalpke

Das Immunsystem – Regelgröße zur Beeinflussung der Zusammensetzung des Mikrobioms?

Inauguraldissertation
zur Erlangung des
Doctor scientiarum humanarum (Dr. sc. hum.)
an der
Medizinischen Fakultät Heidelberg
der
Ruprecht-Karls-Universität

Vorgelegt von
Maren Bechberger
aus
Heidelberg
2023

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Hans-Georg Kräusslich

Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. Klaus Heeg

Co-Betreuung: Herr Dr. med. Konrad A. Bode

Für Olli, Krümel, Tilli

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abkürzungsverzeichnis.....	X
1. Einleitung.....	1
1.1 Das Immunsystem.....	1
1.1.1 Aufbau des Immunsystems.....	1
1.1.2 Das intestinale Immunsystem.....	2
1.2 Das Mikrobiom.....	4
1.2.1 Das Mikrobiom des Menschen.....	4
1.2.2 Das Mikrobiom des Darms.....	4
1.2.3 Gegenseitige Beeinflussung zwischen Mikrobiom und Immunsystem.....	5
1.2.4 Das Mikrobiom im Zusammenhang mit Erkrankungen.....	6
1.2.5 Bekannte Beeinflussungen zwischen dem Mikrobiom des Darms und medikamentöser Therapie.....	8
1.2.6 Unterschiede im Mikrobiom des Darms zwischen Maus und Mensch.....	8
2. Zielsetzung.....	9
3. Projekt 1: Einfluss von Interleukin-1 β (IL-1 β) auf das Mikrobiom des Darms.....	10
3.1 Einleitung.....	10
3.1.1 Das Mikrobiom des Darms.....	10
3.1.2 Das Immunsystem.....	10
3.1.3 Interleukin-1 β	10
3.2 Zielsetzung.....	14
3.3 Material und Methoden.....	16
3.3.1 Material.....	16
3.3.2 Methoden.....	26
3.4 Ergebnisse.....	37
3.4.1 Next Generation Sequencing von IL-1 β knockout Mäusen und Wildtyp Kontrollen	37
3.4.2 qRT-PCR zur Bestätigung der Ergebnisse aus dem Sequencing.....	43
3.4.3 Bei den Verschiebungen im Colon-Mikrobiom der IL-1 β knockout Mäuse handelt es sich um einen indirekten Effekt von Interleukin-1 β	45

3.4.4	Genexpressionsmuster aus Mukosa-Scrapings zeigt Unterschiede in der Expression antibakterieller Peptide.....	47
3.4.5	Bestätigung der Ergebnisse des Gene-Arrays durch qRT-PCR.....	49
3.4.6	Ermittlung der Expression von Angiogenin 4 auf Protein-Level erweist sich als schwierig	52
3.4.7	Rekombinantes mouse Angiogenin 4 zeigt eine direkte Wirkung auf das Bakterienwachstum von <i>A. muciniphila</i> , jedoch nicht auf das Wachstum von <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> und <i>B. thetaiotaomicron</i>	54
3.4.8	Expression von Mukus-Bestandteilen	55
3.4.9	Eindringen von Bakterien in den Mukus	57
3.4.10	Methoden-Etablierung eines Fluoreszenz in-situ Hybridisierungs (FISH)-Assays mit anschließender Immunfluoreszenz	58
3.4.11	Vergleich der Penetration in den Mukus sowie der Quantität von <i>Akkermansia muciniphila</i> über den FISH-Assay mit anschließender Immunfluoreszenz	74
3.4.12	Untersuchung der IgG-Bindung an Bakterien	78
3.4.13	Übertragbarkeit auf den Menschen	80
3.5	Diskussion.....	82
3.5.1	Das Fehlen von IL-1 β führt zu einer Verschiebung in der Zusammensetzung der Mikrobiota des Darms, besonders im Vorkommen von <i>Akkermansia muciniphila</i>	82
3.5.2	Die verminderte Expression von Angiogenin 4 steht im Zusammenhang mit dem erhöhten Vorkommen von <i>Akkermansia muciniphila</i>	85
3.5.3	Durch die verminderte Expression von Angiogenin 4 scheint eine erhöhte Penetration von <i>Akkermansia muciniphila</i> durch den Mukus an die Mukosaoberfläche ermöglicht zu werden	89
3.5.4	Die Ergebnisse aus den IL-1 β knockout Mäusen scheinen auch auf Menschen unter Therapie mit dem IL-1R Antagonisten Anakinra (Kineret [®]) übertragbar zu sein.....	91
3.5.5	Schlussfolgerung.....	93
3.5.6	Ausblick.....	94
3.6	Zusammenfassung.....	96
4	Projekt 2: Einfluss von Rituximab und Ciclosporin durch Regulierung des adaptiven Immunsystems auf das Mikrobiom des Darms	98
4.1	Einleitung.....	98
4.1.1	Das Mikrobiom	98
4.1.2	Das Immunsystem	98
4.1.3	Rituximab.....	98

4.1.4	Ciclosporin	99
4.2	Zielsetzung.....	101
4.3	Material und Methoden	102
4.3.1	Material	102
4.3.2	Methoden.....	103
4.4	Ergebnisse.....	107
4.4.1	Ergebnisse des Next Generation Sequencings des Tierversuchs mit Rituximab.....	107
4.4.2	Ergebnisse des Next Generation Sequencings von Patienten unter Rituximab Therapie	112
4.4.3	Ergebnisse des Next Generation Sequencings des Tierversuchs mit Ciclosporin	117
4.5	Diskussion.....	124
4.5.1	Eine Therapie mit Rituximab führt zu einer Verschiebung im Mikrobiom.....	124
4.5.2	Unter Therapie mit Ciclosporin zeigt sich eine erhöhte Kolonisation mit dem Bakterium <i>Turicibacter sanguinis</i>	130
4.5.3	Schlussfolgerung.....	132
4.5.4	Ausblick.....	132
4.6	Zusammenfassung.....	134
5	Gesamtdiskussion und Ausblick	136
5.1	Diskussion.....	136
5.2	Ausblick.....	138
6	Zusammenfassung.....	140
7	Literaturverzeichnis.....	142
8	Eigene Veröffentlichungen.....	165
9	Appendix.....	167
9.1	Appendix 1 – Studie Untersuchung des Einflusses von immunsuppressiven Substanzen auf die Bakterienzusammensetzung im Darm – Patienteninformation.....	167
9.2	Appendix 2 – Studie Untersuchung des Einflusses von immunsuppressiven Substanzen auf die Bakterienzusammensetzung im Darm – Patienteninformation Jugendliche.....	169
9.3	Appendix 3 – Studie Untersuchung des Einflusses von immunsuppressiven Substanzen auf die Bakterienzusammensetzung im Darm – Patienteninformation Eltern	171
9.4	Appendix 4 – Studie Untersuchung des Einflusses von immunsuppressiven Substanzen auf die Bakterienzusammensetzung im Darm – Fragebogen für Teilnehmer.....	173
9.5	Appendix 5 – Studie Untersuchung des Einflusses von immunsuppressiven Substanzen auf die Bakterienzusammensetzung im Darm – Einwilligungserklärung für Teilnehmer	174

9.6	Appendix 6 – Studie Untersuchung des Einflusses von immunsuppressiven Substanzen auf die Bakterienzusammensetzung im Darm – Einwilligungserklärung für Jugendliche.....	175
9.7	Appendix 7 – Studie Untersuchung des Einflusses von immunsuppressiven Substanzen auf die Bakterienzusammensetzung im Darm – Einwilligungserklärung für Eltern	177
9.8	Appendix 8 – Next Generation Sequencing IL-1 β knockout Mäuse versus littermate Wildtyp Kontrollen, statistisch signifikante Ergebnisse	179
9.9	Appendix 9 – Genexpressionsanalyse von Mucosascrapings von IL-1 β knockout Mäusen versus littermate Wildtyp Kontrollen, statistisch signifikante Ergebnisse mit fold changes ≥ 2 oder $< 0,5$	180
9.10	Appendix 10 – Next Generation Sequencing Tierversuch Rituximab versus Placebo, statistisch signifikante Ergebnisse.....	183
9.11	Appendix 11 – Next Generation Sequencing Stuhlproben Patienten unter Rituximab Therapie, statistisch signifikante Ergebnisse aller eingeschlossenen Patienten.....	185
9.12	Appendix 12 – Next Generation Sequencing Stuhlproben Patienten unter Rituximab Therapie, statistisch signifikante Ergebnisse der eingeschlossenen Patienten unter Rituximab Monotherapie	186
9.13	Appendix 13 – Next Generation Sequencing Tierversuch Ciclosporin versus Placebo, statistisch signifikante Ergebnisse mit log2 fold changes zwischen -2,5 und 2,5	187
10	Curriculum vitae	189
11	Danksagung	191
12	Eidesstattliche Versicherung	193

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das intestinale Immunsystem.....	3
Abbildung 2: Im Next Generation Sequencing zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Häufigkeit stark vertretener Familien.....	38
Abbildung 3: Für einige seltener vorkommende Familien zeigte sich in der Häufigkeit ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen IL-1 β knockout Mäusen und Wildtyp Kontrollen.	39
Abbildung 4: Für <i>Akkermansia muciniphila</i> zeigte sich ein statistisch hoch signifikanter Unterschied zwischen IL-1 β knockout Mäusen und Wildtyp Kontrollen.....	40
Abbildung 5: Das 2. Sequencing von IL-1 β knockout Tieren verglichen mit littermate Wildtyp Kontrollen zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied in der α -Diversität.....	41
Abbildung 6: Principal Coordinates Analyse (PCoA) zur Darstellung der β -Diversität des 2. Sequencings mit IL-1 β knockout Mäusen und littermate Wildtyp Kontrollen.....	42
Abbildung 7: Für <i>Akkermansia muciniphila</i> zeigte sich auch zwischen IL-1 β knockout Mäusen und littermate Wildtyp Kontrollen eine statistisch hoch signifikant höhere Häufigkeit des Vorkommens.	43
Abbildung 8: Ergebnis der Analyse des Faezes mittels qRT-PCR.....	44
Abbildung 9: <i>A. muciniphila</i> zeigt in IL-1 β knockout Mäusen verglichen mit littermate Wildtyp Kontrollen auch nach eineinhalb Jahren Weiterführen der Mauszucht sowie Wechsel der Zucht-Unit ein erhöhtes Vorkommen.	45
Abbildung 10: In IL-1R knockout Tieren zeigt sich ein erhöhtes Vorkommen von <i>A. muciniphila</i>	46
Abbildung 11: Der Hauptunterschied auf Genexpressionsebene der intestinalen Mukosazellen zwischen IL-1 β knockout und littermate Wildtyp Mäusen zeigt sich in der Expression antimikrobieller Peptide.	47
Abbildung 12: Expression der mRNA für Ang4 ist erniedrigt im Colon von Interleukin-1 β knockout Mäusen.....	49
Abbildung 13: Bildung von Retnlb zeigt in der qRT-PCR der Colon-mRNA keine statistisch signifikanten Unterschiede, jedoch die gleiche Tendenz wie im Gene-Array.	50
Abbildung 14: Expression von Defb2 sowie Reg3 β und Reg3 γ zeigt in der qRT-PCR der Colon-mRNA keine statistisch signifikanten Unterschiede.....	51
Abbildung 15: Expression von IL-17 sowie IL-22 zeigt in der qRT-PCR der Colon-mRNA keine statistisch signifikanten Unterschiede.....	52
Abbildung 16: Analyse der Expression der mRNA der verschiedenen Angiogenine in C57BL/6 Mäusen.	53

Abbildung 17: Rekombinantes murines Angiogenin 4 zeigt einen direkten antibakteriellen Effekt gegen <i>Akkermansia muciniphila</i>	55
Abbildung 18: Muc2 zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Expression zwischen IL-1 β knockout Mäusen und littermate Wildtyp Kontrollen.	57
Abbildung 19: <i>Akkermansia muciniphila</i> zeigt in IL-1 β knockout Mäusen eine erhöhte Penetration in den Mukus.	58
Abbildung 20: Gram-Färbung zur Überprüfung der Anwesenheit von Bakterien.	61
Abbildung 21: Beispiele der Testung neuer Wasch- und Blockmethoden nach Durchführung der Hybridisierung im FISH-Assay.	66
Abbildung 22: Durchführung einer Fluoreszenz in-situ Hybridisierung mit 16S-Cy3 Sonde sowie einer Immunfluoreszenz mit anti-Muc2.	68
Abbildung 23: Vergleich der Fixationszeit für Colon-Gewebe vor einer Fluoreszenz in-situ Hybridisierung mit anschließender Immunfluoreszenz.	69
Abbildung 24: Beispielabbildungen nach Durchführung des endgültigen Protokolls der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung mit anschließender Immunfluoreszenz in Colon-Gewebe.	70
Abbildung 25: Positiv-Kontrolle und Negativ-Kontrolle der FISH-Sonden bei Verwendung von nur einer Sonde.	71
Abbildung 26: Positiv-Kontrolle und Negativ-Kontrolle der FISH-Sonden bei Doppelfärbung unter Verwendung beider Sonden.	72
Abbildung 27: Kontrolle der gleichzeitigen Verwendung der 16S-Cy3 sowie Akk-Cy5 Sonde bei der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung mit anschließender Immunfluoreszenz mit anti-Muc2.	73
Abbildung 28: Durchführung einer Fluoreszenz in-situ Hybridisierung mit der Hybridisierungs-Sonde 16S-Cy3 mit anschließender Immunfluoreszenz mit anti-Villin.	74
Abbildung 29: Die Distanz zwischen Mukosa-Oberfläche und Bakterien im proximalen Colon von IL-1 β knockout Mäusen ist sehr gering, sodass kein innerer Mukus-Layer mehr erkennbar ist.	75
Abbildung 30: Während bei IL-1R Wildtyp Tieren eine Trennung zwischen innerem und äußerem Mukus-Layer erkennbar ist, können bei IL-1R knockout Tieren Bakterien bis zur Mukosa-Oberfläche durchdringen.	76
Abbildung 31: Bakterien können bei IL-1R knockout Tieren bis zur Mukosa-Oberfläche durchdringen.	76
Abbildung 32: Bakterien ist es bei IL-1R knockout Mäusen möglich, durch den Mukus bis zur Mukosa-Oberfläche zu gelangen.	77
Abbildung 33: Die Distanz zwischen auffindbarer <i>Akkermansia muciniphila</i> in Gewebeschnitten des proximalen Colons bei IL-1R knockout Mäusen ist geringer im Vergleich zu ihren littermate Wildtyp Kontrollen.	77

Abbildung 34: Bei IL-1 β knockout Tieren gibt es eine erhöhte Bildung von IgG gegen <i>Akkermansia muciniphila</i>	79
Abbildung 35: Auswertung der Stuhlproben von Patient 3 vor und sechs Wochen nach Beginn einer Therapie mit Anakinra.....	81
Abbildung 36: Vermuteter zugrundeliegender Mechanismus der Erhöhung von <i>Akkermansia muciniphila</i> im Mikrobiom von IL-1 β knockout Mäusen.....	94
Abbildung 37: Vergleich des Shannon-Diversitäts Index zwischen Placebo Tieren und Verum (Rituximab) Tieren.....	107
Abbildung 38: Principal Coordinates Analyse (PCoA) zur Darstellung der β -Diversität des Sequencings von mit Rituximab bzw. Placebo behandelten Mäusen.....	108
Abbildung 39: Heat Map der Änderung in der Häufigkeit des Vorkommens stark vertretener Keime zwischen den Placebo und Verum Mäusen.	109
Abbildung 40: Im Next Generation Sequencing zeigte sich für diese Keime ein statistisch signifikant höheres Vorkommen im Mikrobiom der mit Rituximab behandelten Tiere.	110
Abbildung 41: Im Next Generation Sequencing zeigte sich für diese Keime ein statistisch signifikant niedrigeres Vorkommen im Mikrobiom der mit Rituximab behandelten Tiere.	111
Abbildung 42: Der Shannon-Diversitäts Index für die Patienten unter Therapie mit Rituximab zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied zum Ausgangswert.	113
Abbildung 43: Principal Coordinates Analyse (PCoA) zur Darstellung der β -Diversität des Sequencings von Patienten vor und sechs Wochen nach Beginn einer Therapie mit Rituximab.....	113
Abbildung 44: Heat Map der Änderung in der Häufigkeit des Vorkommens stark vertretener Keime in Patienten vor und nach sechswöchiger Therapie mit Rituximab.....	114
Abbildung 45: Im Next Generation Sequencing zeigte sich für diese Keime ein statistisch signifikanter Unterschied im prozentualen Vorkommen vor und nach sechswöchiger Rituximab Therapie.	115
Abbildung 46: Im Next Generation Sequencing zeigte sich für diese Keime ein statistisch signifikanter Unterschied im prozentualen Vorkommen vor und nach sechswöchiger Rituximab Monotherapie.	116
Abbildung 47: Vergleich des Shannon-Diversitäts Index zwischen Placebo und Verum (Ciclosporin) Tieren.....	117
Abbildung 48: Principal Coordinates Analyse (PCoA) des Sequencings von mit Ciclosporin bzw. Placebo behandelten Mäusen.	118
Abbildung 49: Heat Map der Änderung in der Häufigkeit des Vorkommens stark vertretener Keime zwischen den Placebo und Verum (Ciclosporin) Mäusen.	119
Abbildung 50: Im Next Generation Sequencing zeigte sich für diese Keime ein statistisch signifikant höheres Vorkommen im Mikrobiom der mit Ciclosporin behandelten Tiere.....	120

Abbildung 51: Im Next Generation Sequencing zeigte sich für diese Keime ein statistisch signifikant niedrigeres Vorkommen im Mikrobiom der mit Ciclosporin behandelten Tiere..... 121

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: 16S Primerliste des Next Generation Sequencings (NGS) für die Region V6 für das 1. Sequencing.	23
Tabelle 2: 16S Primerliste des Next Generation Sequencings (NGS) für die Region V4 für das 1. Sequencing.	24
Tabelle 3: Ergebnisse der Expressions-Analyse von Mucinen im GeneArray von IL-1 β knockout Mäusen im Vergleich zu littermate Wildtyp Kontrollen.....	56
Tabelle 4: Entparaffinierungsprotokolle 1, 2 und 3.....	59
Tabelle 5: Gegenüberstellung der Entparaffinierungsprotokolle 3 und 4.	63
Tabelle 6: Gegenüberstellung der zu testenden Variationen des Blockens und Waschens nach Entparaffinierung und vor Durchführung der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung.....	63
Tabelle 7: Gegenüberstellung der zu testenden Variationen der Hybridisierung bei Durchführung der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung.	64
Tabelle 8: Gegenüberstellung der zu testenden Variationen des Waschens sowie des Blockens nach der Hybridisierung bei Durchführung der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung.	65
Tabelle 9: Gegenüberstellung verschiedener Immunfluoreszenzprotokolle.	67
Tabelle 10: Patientencharakteristik der Rituximab-Patienten.	112
Tabelle 11: Ergebnisse des Next Generation Sequencings mit DNA aus Fäzes des Tierversuchs mit Ciclosporin versus Placebo.	122
Tabelle 12: Ergebnisse des Next Generation Sequencings mit DNA aus Fäzes von IL-1 β knockout Tieren und littermate Wildtyp Kontrollen.....	179
Tabelle 13: Ergebnisse der Genexpressionsanalyse mit mRNA aus Mucosascrapings von IL-1 β knockout Tieren und littermate Wildtyp Kontrollen.....	180
Tabelle 14: Ergebnisse des Next Generation Sequencings mit DNA aus Fäzes des Tierversuchs mit Rituximab versus Placebo.....	183
Tabelle 15: Ergebnisse des Next Generation Sequencings mit DNA aus Fäzes von Patienten unter Rituximab Therapie.	185
Tabelle 16: Ergebnisse des Next Generation Sequencings mit DNA aus Fäzes von Patienten unter Rituximab Monotherapie.	186
Tabelle 17: Ergebnisse des Next Generation Sequencings mit DNA aus Fäzes des Tierversuchs mit Ciclosporin versus Placebo.	187

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity
ADP	Antibody-dependent phagocytosis
ANG	Angiogenin
Ang1	Angiogenin 1
Ang2	Angiogenin 2
Ang3	Angiogenin 3
Ang4	Angiogenin 4
ANOVA	Analysis of Variance
Akk	<i>Akkermansia muciniphila</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Bact thet	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>
BD	Becton Dickinson
BMDC	bone marrow derived cells
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
CAR-T-Zell-Therapie	Chimäre Antigen-Rezeptor-T-Zell-Therapie
CD4	Cluster of Differentiation 4
CD20	Cluster of Differentiation 20
cDNA	complementary DNA
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Defb2	β-Defensin 2
CDC	Complement-dependent cytotoxicity
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	desoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Ent co	<i>Enterococcus</i> genus
Eppi	Eppendorf-Gefäß
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCγRIII	Fcγ-Rezeptor IIIa
FCS	Fetal calf serum
FISH	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
FMT	Fäkaler Mikrobiomtransfer
g	Gramm
G	Gauge
GBPI	Gut and Brain Phosphatase Inhibitor
GvHD	Graf-versus-Host-Disease
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
HDAC	Histondeacetylase
Hyb	Hybridisierungssonde
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IF	Immunfluoreszenz

Abkürzungsverzeichnis

IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IL-1	Interleukin-1
IL-1 α	Interleukin-1 α
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
IL-16	Interleukin-16
IL-17	Interleukin-17
IL-17A	Interleukin-17A
IL-18	Interleukin-18
IL-2	Interleukin-2
IL-22	Interleukin-22
IL-1R	Interleukin-1 Rezeptor
IL-1R1	Interleukin-1 Rezeptor Typ 1
IL-1R2	Interleukin-1 Rezeptor Typ 2
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo Dalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KO	Knockout
l	Liter
Lac group	<i>Lactobacillus</i> group
LGM	Lymphocyte Growth Medium
LPS	Lipopolysaccharide
MAC	membrane attack complex
mAng1	murines Angiogenin 1
mAng2	murines Angiogenin 2
mAng3	murines Angiogenin 3
mAng4	murines Angiogenin 4
mbeta-actin	murines β -actin
mcF	mcFarland
mDefb2	murines β -Defensin 2
mg	Milligramm
μ g	Mikrogramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
mIL-1 β	murines Interleukin-1 β
mIL-17	murines Interleukin-17
mIL-22	murines Interleukin-22
min	Minuten
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mM	Millimolar
mMuc2	murines Mucin 2
mReg3 β	murines Regenerating islet-derived protein 3 β
mReg3 γ	murines Regenerating islet-derived protein 3 γ
mRetnlb	murines Resistin-like β
mRNA	messenger Ribonucleic acid
Muc1	Mucin 1
Muc2	Mucin 2
Muc3	Mucin 3

Abkürzungsverzeichnis

Muc4	Mucin 4
Muc5ac	Mucin 5AC
Muc6	Mucin 6
Muc10	Mucin 10
Muc13	Mucin 13
Muc15	Mucin 15
Muc16	Mucin 16
Muc20	Mucin 20
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NFAT	nuclear factor of activated thymocytes
ng	Nanogramm
NGS	Next Generation Sequencing
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
OD 600	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
OTU	Operational Taxonomic Unit
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAS	Periodic acid-Schiff reaction
PBS	phosphatbuffered saline
PCoA	principal coordinate analysis
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PERMANOVA	Permutational multivariate analysis of variance
pg	Picogramm
PolyDIDC	Poly-deoxy-inosinic-deoxy-cytidylic acid
PP1	Protein Phosphatase 1
Ppp1r14d	Protein Phosphatase 1 Regulatory Inhibitor Subunit 14D
qRT-PCR	quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction
rA	relative Abundance
RAG2	Recombination activating gene 2 protein
rE	relative Expression
rE	relative Extinktion
Reg3 β	Regenerating islet-derived protein 3 β
Reg3 γ	Regenerating islet-derived protein 3 γ
Retnlb	Resistin-like β
RNA	Ribonucleic acid
rpm	rounds per minute
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute Medium
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
RSV	Ribosomal Sequence Variance
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	real time – Polymerase Chain Reaction
s	Sekunden
SAHA	Suberoylanilide Hydroxamic Acid
SCFA	Short Chain Fatty Acids
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat = Natriumlaurylsulfat
SSRI	Selektiver Serotonin Reuptake Inhibitor
STAT-1	Signal transducer and activator of transcription 1
T-bet	T-box transcription factor Tbx21
TAE	Tris-Acetat-EDTA

Abkürzungsverzeichnis

TBS	Tris-buffered Saline
TBST	Tris-buffered Saline mit Tween20
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris-HCl	Tris-HCl
Tween	Polysorbat
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
V	Volt
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Der Körper ist ständig äußeren, teils schädlichen Einflüssen ausgesetzt. Um sich vor Pathogenen, Toxinen, anderen körperfremden Stoffen oder vor der Expansion defekter Zellen wie z.B. Tumorzellen zur Wehr zu setzen, stellt das Immunsystem einen lebenswichtigen Schutzschild dar (Chaplin 2010).

1.1.1 Aufbau des Immunsystems

Das Immunsystem teilt sich in das angeborene und das erworbene (adaptive) Immunsystem auf. Während das angeborene Immunsystem aufgrund konservierter Strukturen Pathogene erkennen kann und zur initialen Immunantwort nach Identifizierung des Pathogens oder Toxins führt, reagiert das adaptive Immunsystem nach Maturation und Aktivierung der Immunzellen mit einer Antigen-spezifischen Immunantwort auf den Eindringling und ist in der Lage, durch Gedächtniszellen ein Immun-Gedächtnis aufzubauen. Das angeborene und adaptive Immunsystem arbeiten eng zusammen, viele Mechanismen greifen ineinander (Chaplin 2010).

1.1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem beinhaltet neben den zellulären Elementen wie Makrophagen, dendritischen Zellen sowie Granulozyten physikalische Barrieremechanismen wie z.B. Tight Junctions, die den Epithellayer stark verdichten, einen Mukuslayer auf Mukosaoberflächen, lösliche Proteine oder andere bioaktive Moleküle wie antimikrobielle Peptide, das Komplement System, Chemokine, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und vieles mehr. Teile dieses Systems sind konstitutiv aktiv, manche davon werden erst durch Interaktion des Pathogens mit Körperzellen über so genannte Pattern Recognition Rezeptoren (PRR) aktiviert (Chaplin 2010).

Ein Beispiel für die antimikrobiellen Peptide stellen die heterogene Gruppe der Defensine dar, die sowohl auf die Membranen der Mikroben, als auch gegen intrazelluläre Prozesse gerichtet sein können. Die Aufteilung der Defensine erfolgt in α -, β - und θ -Defensine (Stockmann et al. 2011).

Eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunantwort spielen auch Zytokine wie beispielsweise die Interleukine. Sie können proinflammatorische, aber auch antiinflammatorische Eigenschaften besitzen. Interleukin-1 β (IL-1 β) zählt zu den proinflammatorischen Zytokinen, Interleukin-10 (IL-10) hingegen ist ein antiinflammatorisches Zytokin, welches zur Aufrechterhaltung der Homöostase beiträgt (Chen und Schroder 2013; Cheng et al. 2019). Interleukine sind hierbei nicht nur für die Regulierung zellulärer Prozesse, sondern auch für die Differenzierung von Zellen des adaptiven Immunsystems von Bedeutung (Acosta-Rodriguez et al. 2007).

Die Granulozyten werden in basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten eingeteilt. Neutrophile Granulozyten bilden ROS, die zytotoxisch auf bakterielle Pathogene wirken. Durch Freisetzung von Enzymen sind Neutrophile auch an der Geweberegeneration nach Verletzungen beteiligt und können über dies hinaus noch Phagozytose betreiben und zur Freisetzung von Zytokinen führen (Chaplin 2010).

Eosinophile Granulozyten besitzen im Zytoplasma Granula mit toxischen Molekülen und Enzymen, die gegen Parasiten gerichtet sind (Chaplin 2010).

Basophile Granulozyten sowie Mastzellen besitzen Immunglobulin E Rezeptoren und sind dadurch an Hypersensitivitätsprozessen beteiligt, können jedoch auch in der Pathogenabwehr eine Rolle spielen. Durch ihre Möglichkeit, Histamin und andere Mediatoren freizusetzen, werden durch sie eine Ödembildung sowie die Kontraktion der glatten Muskulatur ausgelöst (Chaplin 2010).

Makrophagen phagozytieren Mikroben und andere Partikel, die für die Phagozytose durch andere Immunkomponenten markiert wurden. Sie können zum Zytokin-Release führen und durch Stickstoffmonoxid eine antimikrobielle Wirkung generieren (Chaplin 2010).

1.1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Die Lymphozyten teilen sich auf in T-Lymphozyten, die für die antigen-spezifische, zelluläre Immunantwort verantwortlich sind, und B-Lymphozyten, welche die humorale Immunantwort mit der Produktion von Immunglobulin G (IgG) Antikörpern vermitteln. Des Weiteren zählen zu den Lymphozyten noch die Natürlichen Killer (NK) Zellen, die für die Erkennung von virusinfizierten Zellen und Tumorzellen sowie deren Entfernung zuständig sind, sowie die NK-T-Zellen. T-Zellen unterteilen sich noch nach Maturation in die Subpopulationen Cluster of Differentiation (CD) 4+ T-Helfer-Zellen, die andere Zellen wie z.B. B-Zellen aktivieren können, CD8+ T-Killer-Zellen, welche die zelluläre Immunantwort vermitteln und zum Abtöten der körperfremden Zellen führen, sowie regulatorische T-Zellen (T_{reg}), die sich aus CD4+ T-Zellen entwickeln, um zu einer Regulation der Immunantwort zu führen. Für die T-Helfer (TH)-Zellen ist eine weitere Unterteilung in TH1, TH2 und TH17 bekannt. Damit T-Zellen aktiviert werden, sind Antigenpräsentierende Zellen (APC) notwendig wie beispielsweise Makrophagen und dendritische Zellen. Diese können über ihren Major Histocompatibility Komplex (MHC) Klasse I oder Klasse II Antigene präsentieren, die durch T-Zellen über ihren T-Zell-Rezeptor (TCR) erkannt werden (Chaplin 2010).

1.1.2 Das intestinale Immunsystem

Das intestinale Immunsystem besitzt die Aufgabe, den Körper vor der Invasion von Pathogenen und anderen schädlichen Substanzen zu schützen, während es jedoch die Kolonisation von Kommensalen zulässt sowie die Homöostase im Darm gewährleistet. Die erste Barriere bildet der Mukus, welcher als

schützende Schicht über der Mukosaoberfläche liegt. Der Mukus, dessen Haupt-Strukturbestandteil Mucine darstellen, die in Goblet-Zellen gebildet werden, besteht aus dem inneren und dem äußeren Layer (s. Abbildung 1). Während im äußeren Layer noch Bakterien zu finden sind, ist dies im inneren Layer weniger der Fall. Eine zusätzliche mechanische Barriere stellen die Epithelzellen mit ihren Tight Junctions und anderen Zellverbindungen dar. Die Paneth-Zellen in der Epithelschicht sekretieren antimikrobielle Peptide wie α - und β -Defensine. Außerdem besitzt das intestinale Immunsystem die antimikrobiellen C-Type Lektine wie Regenerating islet-derived protein 3-beta ($\text{Reg3}\beta$) und Regenerating islet-derived protein 3-gamma ($\text{Reg3}\gamma$) sowie Lysozyme. Der Mukus dient auch als eine Art Schwamm, in dem sich diese antimikrobiellen Stoffe ansammeln, stabilisiert werden und eine Invasion von Pathogenen verhindern. Im Fall einer Infektion kann jedoch auch eine zusätzliche Expression ausgelöst werden. Hinter der Epithelschicht liegt die Lamina propria, in der auch die Payer-Plaques lokalisiert sind. Hier befinden sich auch die lymphoiden Zellen des angeborenen Immunsystems (ILC – innate lymphoid cells), die durch Zytokine und Chemokine aus der Epithelschicht angelockt werden können, sowie B- und T-Zellen. B-Zellen produzieren im intestinalen Immunsystem zur Pathogenabwehr Immunglobulin A Antikörper (Jia et al. 2019), die durch Agglutination die Adhärenz von Pathogenen an die Epithelschicht verhindern sowie zu deren Clearance führen. Dendritische Zellen sind im Darm in der Lage die Tight Junctions zu lösen und die Phagozytose von Pathogenen im Lumen durchzuführen. Außerdem können auch durch beispielsweise die Produktion von Zytokinen weitere Immunzellen aus der Peripherie zum Darm gerufen werden, um die Immunantwort zu ergänzen. Um eine Homöostase im Darm zu gewährleisten, ist es auch hier wichtig, ein Zusammenspiel von proinflammatorischen und antiinflammatorischen Mitspielern vorzufinden, damit keine übermäßige Entzündungsreaktion in diesem Organ hervorgerufen wird (Cheng et al. 2019; Gopalakrishnan et al. 2018a; Shi et al. 2017).

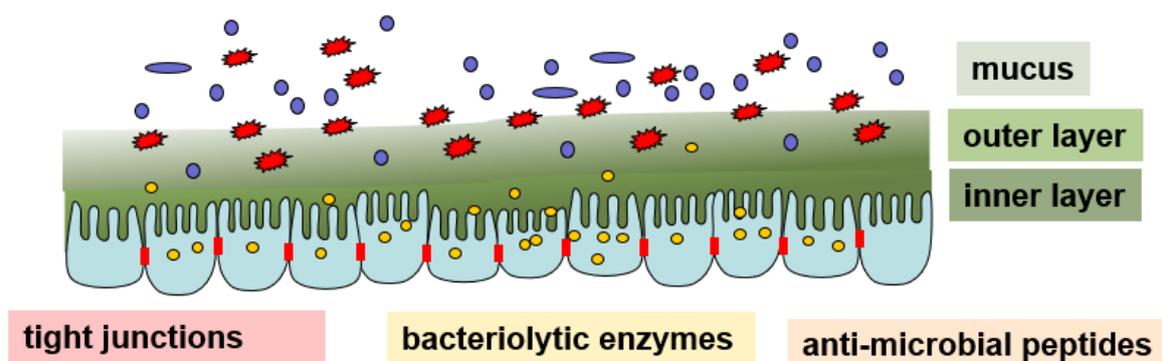


Abbildung 1: Das intestinale Immunsystem. Das intestinale Immunsystem setzt sich zum einen aus den physikalischen Barrieren wie den Tight Junctions der Mukosazellen sowie dem Mukuslayer zusammen. Zum anderen werden bakteriolytische Enzyme und antimikrobielle Peptide in den Mukus freigesetzt. Hinter der Epithelschicht dient die Lamina propria (hier nicht dargestellt) noch als weiterer Bestandteil des intestinalen Immunsystems.

1.2 Das Mikrobiom

Als die Mikrobiota bezeichnet man die gesamte Gemeinschaft aller Mikroben eines Ökosystems, das Mikrobiom bezieht sich auf die kollektiven Genome dieser Einheit. Somit zählen zur Mikrobiota alle Bakterien, Archaeen, Pilze und Viren eines Lebensraums (wie z.B. dem Mensch) oder einem speziellen Bereich wie dem Darm oder der Lunge (Gopalakrishnan et al. 2018a; Peterson et al. 2015).

Das Mikrobiom rückt immer mehr in den Fokus des Interesses, da zunehmend Assoziationen zwischen einer Dysbiose des Mikrobioms und pathophysiologischen Zuständen des Wirts gesehen werden. Erst durch Einführung des Next Generation Sequencing (NGS) wurde es möglich, das Mikrobiom und die erwähnten Zusammenhänge zu erforschen. Besonders die Tatsache, dass eine Vielzahl der Bakterien der Mikrobiota im Darm nicht in Kultur anzüchtbar sind, machte eine Methode notwendig, die auch diese Keime miterfasst. Das Next Generation Sequencing (NGS) brachte hierbei den Durchbruch, da Genome schneller sequenziert werden konnten und auch quantitative Rückschlüsse möglich wurden (Malla et al. 2018; Schippa und Conte 2014).

1.2.1 Das Mikrobiom des Menschen

Alle externen Oberflächen des Menschen wie die Haut, die Lunge, der Gastrointestinaltrakt sowie der Vaginaltrakt sind kolonisiert von Mikroben. Die stärkste Kolonisation ist im Gastrointestinaltrakt vorzufinden. Die Mikroben leben hierbei in friedlicher Koexistenz mit ihrem Wirt. Die Zusammensetzung des Mikrobioms variiert zwischen den einzelnen Bereichen (Schippa und Conte 2014).

1.2.2 Das Mikrobiom des Darms

Der Darm ist der am stärksten kolonisierte Bereich des Körpers. Finden sich im Magen und Zwölffingerdarm des Menschen noch 10^1 bis 10^3 Bakterien pro Gramm Stuhl, steigt der Gehalt vom Dünndarm mit einer Anzahl von 10^4 bis 10^7 Bakterien pro Gramm Stuhl bis hin zum Dickdarm mit 10^{11} bis 10^{12} Bakterien pro Gramm Stuhl stetig an (Schippa und Conte 2014). Die Firmicutes und Bacteroidetes sind dominierend im Darm-Mikrobiom des Menschen, jedoch findet man vor allem auch noch Proteobacteria, Actinobacteria und andere wie Fusobacteria, Cyanobacteria und Verrucomicrobia (Schippa und Conte 2014; Shi et al. 2017). Beschrieben ist die Einteilung des Darm-Mikrobioms des Menschen in drei Enterotypen, die über die Lebenszeit eines Erwachsenen meist weitgehend stabil bleiben (Ottman et al. 2012). Diese Enterotypen unterscheiden sich in den vorherrschenden Bakterien in den Bacteroidetes-Typ, den *Prevotella*-Typ und den *Ruminococcus*-Typ (Schippa und Conte 2014). Das Darm-Mikrobiom jedes Menschen ist so individuell wie ein Fingerabdruck und wird durch das Alter des Wirts sowie genetische Komponenten, die Diät, den Gesundheitszustand sowie das Lebensumfeld beeinflusst (Ottman et al. 2012; Sánchez-Samper et al. 2017; Schippa und Conte 2014; Shi et al. 2017). Die Besiedlung des Darms beginnt direkt nach der

Geburt. Bereits hier sind Unterschiede in der Darm-Mikrobiota je nach Geburtsweg – vaginal oder durch Sectio caesarea – dokumentiert (Ottman et al. 2012). Das Mikrobiom eines Neugeborenen unterscheidet sich grundlegend von dem eines erwachsenen Menschen, gleicht sich aber schon innerhalb der ersten ein bis zwei Lebensjahre schnell an das eines erwachsenen Menschen an und erreicht beim Erwachsenen die höchste Diversität, die jedoch im Alter wieder abnimmt (Ottman et al. 2012; Peterson et al. 2015). Die Mikrobiota übernimmt in dieser Entwicklungsphase und auch danach wichtige Aufgaben im Körper, die einen Benefit für den Wirt bergen. Zum einen beeinflusst das Darm-Mikrobiom die Entwicklung des Immunsystems und moduliert immunologische Prozesse, zum anderen bietet es auch eine Hilfe in der Aufarbeitung ansonsten unverdaulicher Nahrungsbestandteile. Außerdem schützt die Mikrobiota vor Pathogen-Invasion auch unabhängig von der Modulation des Immunsystems durch den Aufbau einer Kolonisations-Resistenz gegen Pathogene (Cheng et al. 2019; Ottman et al. 2012; Schippa und Conte 2014). Diese vielfältigen Eingriffsmöglichkeiten der Mikrobiota in die Funktionen des Körpers, auch auf immunologische und metabolische Prozesse, stellen eine große Chance, aber auch ein Risiko dar, indem durch eine Dysbiose eventuell Krankheiten begünstigt werden können (Ottman et al. 2012; Peterson et al. 2015). Sowohl aufgrund der positiven als auch aufgrund der negativen Effekte ist deshalb die Erforschung des Darm-Mikrobioms von großem Interesse.

1.2.3 Gegenseitige Beeinflussung zwischen Mikrobiom und Immunsystem

Das Mikrobiom des Darms spielt eine große Rolle in der Entwicklung des Immunsystems. Hierbei wird sowohl das angeborene, als auch das adaptive Immunsystem beeinflusst (Malla et al. 2018; Ottman et al. 2012; Peterson et al. 2015; Schippa und Conte 2014; Shi et al. 2017). Des Weiteren kann das Mikrobiom auch eine Rolle in der Immunregulation des Darms spielen. Das Immunsystem kann über sogenannte Pattern Recognition Receptors (PRR) wie z.B. Toll-like Rezeptoren (TLR) bakterielle Antigene erkennen und nachgeschaltet eine Signalkaskade auslösen, die beispielweise zur Hochregulation von Zytokinen führen kann (Peterson et al. 2015). So kann über die Bindung an Toll-like Rezeptoren (TLRs) die Expression von C-Type Lektinen wie Reg3 β und Reg3 γ gesteuert werden. Auch durch die Produktion von Metaboliten kann eine Hochregulation von Interleukinen wie z.B. IL-22 zur Erhaltung der Homöostase im Darm erfolgen (Shi et al. 2017). Des Weiteren können Paneth-Zellen direkt oder über Metabolite der Mikrobiota im Darm zur Produktion von Defensinen angeregt werden (Cheng et al. 2019; Peterson et al. 2015; Schippa und Conte 2014). Außerdem gibt es Daten, dass einige der Bakterien im Darm die Expression von Mukusbestandteilen und somit eine Vergrößerung des Mukus bewirken können, sodass die Penetration von Pathogenen aus dem Darmlumen zur Epithelschicht behindert wird (Schippa und Conte 2014).

Jedoch kann nicht nur das Mikrobiom das Immunsystem des Wirts sowie dessen Gesundheitsstatus beeinflussen, sondern auch der Wirt mit seinem genetischen Hintergrund sowie inflammatorische Prozesse in dessen Körper können eine Veränderung der Mikrobiota herbeiführen (Schipa und Conte 2014; Shi et al. 2017).

Um die Homöostase im Darm aufrecht zu erhalten und eine Invasion von Bakterien – ungeachtet von ihrem Status als Kommensalen oder Pathogenen – in den Körper zu verhindern, muss sich der Wirt auch schützen. Dies geschieht unter anderem durch die Ausbildung eines Mukuslayers über der Epithelschicht, der mit Immunglobulin A (Jia et al. 2019), Defensinen und anderen antimikrobiell wirksamen Substanzen versehen ist (Peterson et al. 2015). Außerdem kann als Pathogen-Abwehr zusätzlich die Sekretion antimikrobieller Peptide, die Aktivierung des Inflammasoms sowie die Aktivierung des adaptiven Immunsystems angeworfen werden (Peterson et al. 2015). Um jedoch eine überschießende Immunantwort, besonders gegen Kommensalen, zu vermeiden, muss eine Toleranz gegenüber diesen Bakterien erreicht werden, die teilweise einen Benefit in der Fitness des Wirts schaffen. Dies geschieht durch die Runterregulierung der Immunantwort (Peterson et al. 2015).

Ein Beispiel für die Einflussnahme des Immunsystems auf die Zusammensetzung des Mikrobioms ist die Beobachtung, dass bei T-bet $-/-$ x RAG2 $-/-$ Tieren (T-bet = T-box transcription factor Tbx21, RAG2 = Recombination activating gene 2 protein) spontan eine phänotypische Colitis ulcerosa entsteht. Überträgt man durch gemeinsame Haltung von Wildtyp Tieren mit diesen knockout Mäusen die Mikrobiota auf T-bet suffiziente Tiere, so entwickeln diese auch eine Colitis. Somit zeigt sich auch die Möglichkeit, durch eine alterierte Mikrobiota eine Beeinflussung des Immunsystems hin zu einer Inflammation zu verändern (Garrett et al. 2007).

Eine weitere Möglichkeit der Regulation des Immunsystems durch die Mikrobiota des Darms ist die Bildung von Short Chain Fatty Acids (SCFA, kurzkettige Fettsäuren) durch Bakterien. Hierzu gehören beispielsweise Butyrat, Propionat und Acetat. Sie können sowohl induzierende, als auch inhibitorische Effekte auf Prozesse des Immunsystems bewirken (Corrêa-Oliveira et al. 2016; Sanna et al. 2019; Stammler et al. 2015).

1.2.4 Das Mikrobiom im Zusammenhang mit Erkrankungen

Viele Daten weisen inzwischen darauf hin, dass die Mikrobiota des Darms einen erheblichen Einfluss auf die Gesundheit des Wirtes ausübt. So zeigte sich, dass eine Dysbiose des Darm-Mikrobioms nicht nur mit Erkrankungen des Darms selbst wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa sowie Darm-Krebs, sondern auch mit der Entstehung anderer inflammatorischer Erkrankungen, Autoimmun-Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, aber auch mit neurologischen Erkrankungen und Bluthochdruck in Verbindung gebracht werden kann (Belizário et al. 2018; Li et al. 2017b; Malla et al.

2018; Ottman et al. 2012; Peterson et al. 2015; Schippa und Conte 2014; Shi et al. 2017; Wang et al. 2020; Wu et al. 2016). Auch die Assoziation zwischen einer veränderten Zusammensetzung des Mikrobioms und Adipositas, dem metabolischen Syndrom sowie Diabetes mellitus Typ 1 und Diabetes mellitus Typ 2 wurde beschrieben (Belizário et al. 2018; Chassaing und Gewirtz 2014; Dao et al. 2016; Malla et al. 2018; Ottman et al. 2012; Peterson et al. 2015; Plovier et al. 2017; Schippa und Conte 2014).

Oft wird hier entweder eine veränderte Zusammensetzung in der Mikrobiota mit erhöhter Dominanz einer einzelnen Gruppe oder verminderter Diversität beobachtet (Li et al. 2017b; Ottman et al. 2012). Diese Diversität wird häufig anhand der α -Diversität beschrieben. Die α -Diversität lässt sich in verschiedene Aspekte aufteilen. Zum einen kann die α -Diversität durch den Shannon Diversitätsindex ausgedrückt werden und beschreibt hierbei die Anzahl an Spezies und die unterschiedliche quantitative Verteilung der Spezies in einem Ökosystem. Die Richness beschreibt die Anzahl der verschiedenen Spezies in einem mikrobiellen Lebensraum. Die Evenness beschäftigt sich mit der Gleichmäßigkeit der quantitativen Verteilung der Spezies und die Dominanz mit dem relativen Vorkommen der dominanten Spezies (Malla et al. 2018; Wolff et al. 2019). Während die α -Diversität einen Lebensraum beschreibt, vergleicht die β -Diversität den Unterschied in der Artenvielfalt verschiedener Lebensräume miteinander (Walters und Martiny 2020).

Die Erklärungen für die Änderungen des Gesundheitszustands durch Verschiebungen im Mikrobiom werden auf vielerlei Faktoren zurückgeführt. Zum einen kann eine erhöhte intestinale Permeabilität und ein daraus folgender erhöhter Lipopolysaccharid (LPS) - Spiegel im Blut einen negativen Einfluss auf die Krankheitsentstehung besitzen. Zum anderen kann eine chronische Inflammation, hervorgerufen z.B. durch eine veränderte Genexpression durch die Aktivierung von PRRs und nachfolgender alterierter Expression von proinflammatorischen Zytokinen oder anderen Mediatoren, zu einer Änderung des Gesundheitsstatus führen (Chassaing und Gewirtz 2014; Schippa und Conte 2014).

Lifestyle-Faktoren wie die Ernährung können hierbei einen Einfluss auf die Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms besitzen. Andere therapeutische Möglichkeiten stellen die Gabe von Pro- oder Präbiotika, sowie die Fäkale Mikrobiota Transplantation (FMT), auch Stuhltransplantation genannt, dar (Gopalakrishnan et al. 2018a; Li et al. 2017b; Ottman et al. 2012; Peterson et al. 2015; Schippa und Conte 2014; Shi et al. 2017). Die FMT wird therapeutisch meist bei der Behandlung von rekurrierenden *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) Infektionen eingesetzt und zeigt dort gute Erfolge. Jedoch ist diese Methode auch bei anderen Erkrankungen in Erforschung und zeigt dort sowohl im Tierversuch als auch am Menschen vielversprechende Ergebnisse (Gopalakrishnan et al. 2018c; Li et al. 2017b; Ottman et al. 2012; Peterson et al. 2015; Shi et al. 2017). Wichtig hierbei ist jedoch die gewissenhafte Auswahl

eines geeigneten Spenders, da eine FMT auch immer das Risiko der Übertragung von Krankheiten birgt (Cammarota et al. 2017; Fuhri Snethlage et al. 2021; Marrs und Walter 2021).

1.2.5 Bekannte Beeinflussungen zwischen dem Mikrobiom des Darms und medikamentöser Therapie

In den letzten Jahren rückte die Rolle des Mikrobioms in der Beeinflussung der medikamentösen Therapie immer mehr in den Fokus. Sowohl die Therapie mit Medikamenten kann einen Einfluss auf die Mikrobiota ausüben als auch die Mikrobiota auf Wirksamkeit oder Toxizität von medikamentösen Interventionen (Chaput et al. 2017; Gopalakrishnan et al. 2018a; Lee et al. 2018; Matson et al. 2018; Vich Vila et al. 2020).

Neben der nachzuvollziehenden Beeinflussung des Darm-Mikrobioms durch die Einnahme von Antibiotika (Hansen et al. 2012), lässt sich z.B. auch eine Änderung der Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms durch Protonenpumpeninhibitoren feststellen (Vich Vila et al. 2020).

Metformin zeigt eine Beeinflussung des metabolischen Potentials des Darm-Mikrobioms durch Hochregulation metabolischer Prozesse durch die Mikroben und sorgt hierbei für eine Steigerung seiner Wirksamkeit (Vich Vila et al. 2020).

Ein weiteres Beispiel sind die Immun-Checkpoint-Inhibitoren wie Nivolumab, Ipilimumab oder Pembrolizumab. Bei diesen besitzt das Mikrobiom einen Einfluss auf die Response. Responder zeigten hierbei eine erhöhte Diversität im Darm-Mikrobiom. Außerdem werden Indikatorkeime vermutet, die besonders bei Respondern oder bei Patienten mit erhöhter Toxizität vorzufinden sind (Chaput et al. 2017; Gopalakrishnan et al. 2018a; Gopalakrishnan et al. 2018c; Matson et al. 2018).

1.2.6 Unterschiede im Mikrobiom des Darms zwischen Maus und Mensch

Zwar sind die meisten Genera sowohl im humanen als auch im murinen Mikrobiom enthalten, jedoch zeigen sich Abweichungen in der Häufigkeit der einzelnen Spezies. In Anbetracht der Tatsache, dass bereits die Nahrung als auch die Umgebung einen Einfluss auf die Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms haben, begründet der Unterschied zwischen Herbivoren wie Mäusen und einem Karnivoren-Herbivoren-Mix bei den Menschen die Verschiedenheit in der Mikrobiota. Weitere Faktoren stellen der unterschiedliche Magen-pH, der bei Mäusen weitaus höher bei einem pH von 3-4 liegt, sowie die Koprophagie dar, die Mäuse praktizieren (Hugenholtz und de Vos 2018).

Um eine Reproduzierbarkeit in der Erforschung des Mikrobioms des Darms im Mausmodell zu erhalten, ist es deshalb wichtig, die Tiere bei exakt denselben Bedingungen wie Lebensraum oder Nahrung zu halten, um äußere Einflüsse als Confounder auszuschließen. Um eine Übertragbarkeit auf den Menschen zu erforschen, ist es ratsam, die Veränderung zu einem Ursprungs-Mikrobiom wie das von Wildtyp Tieren zu analysieren.

2. Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen die Einflüsse verschiedener Komponenten des Immunsystems auf die Zusammensetzung des Mikrobioms des Darms sowohl im Mausmodell als auch beim Menschen untersucht werden.

Diese Arbeit teilt sich in zwei Projekte auf:

Projekt 1 soll den Einfluss des wichtigen Zytokins Interleukin-1 β bzw. dessen Abwesenheit auf die Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms näher beleuchten.

Projekt 2 beschäftigt sich zum einen mit der Beeinflussung des humoralen Immunsystems durch die Anwendung des therapeutisch eingesetzten monoklonalen Antikörpers Rituximab und einer daraus resultierenden B-Zell-Depletion. Hierbei soll der Unterschied im murinen System zwischen mit Rituximab therapierten Mäusen und mit Placebo behandelten Kontroll-Mäusen evaluiert werden. Des Weiteren soll in diesem Projekt die Veränderung des Darm-Mikrobioms bei Patienten vor und nach Beginn einer Therapie mit Rituximab untersucht werden. Gibt es hier Unterschiede und lassen diese sich mit den Ergebnissen des Tierversuchs vergleichen?

Zum anderen soll Projekt 2 Aufschluss über die Auswirkung eines Eingriffs auf Ebene der T-Lymphozyten durch Ciclosporin im Mausmodell liefern. Gibt es hierbei Unterschiede in der Zusammensetzung des Mikrobioms des Darms zwischen mit Ciclosporin therapierten Tieren und den Kontrolltieren, die ein Placebo erhalten haben?

3. Projekt 1: Einfluss von Interleukin-1 β (IL-1 β) auf das Mikrobiom des Darms

Teile dieses Projekts wurden publiziert unter: Bechberger, M., Eigenbrod, T., Boutin, S., Heeg, K. und Bode, K. A. (2023). **IL-1 β knockout increases the intestinal abundance of *Akkermansia muciniphila***. *Beneficial Microbes*, 1-10, doi: <https://doi.org/10.1163/18762891-20220042>.

3.1 Einleitung

3.1.1 Das Mikrobiom des Darms

Dieser Teil der Einleitung wird im Abschnitt 1.2 näher ausgeführt.

3.1.2 Das Immunsystem

Dieser Teil der Einleitung wird im Abschnitt 1.1 näher ausgeführt.

3.1.3 Interleukin-1 β

Interleukin-1 (IL-1) teilt sich auf in die Interleukine Interleukin-1 α (IL-1 α) und Interleukin-1 β (IL-1 β). Diese Zytokine besitzen zwar ähnliche physiologische Funktionen, jedoch trotz ihrer Wirkung über denselben Rezeptor, den Interleukin-1-Rezeptor 1 (IL-1R1), nicht die absolut identische Funktion. Während IL-1 α auch konstitutiv exprimiert ist, bereits als pro-IL-1 α eine leichte Aktivität besitzt und auch in Zellen wie mesenchymalen Zellen, Epithelzellen o.ä. gebildet werden kann, wird IL-1 β ausschließlich in Immunzellen gebildet (Chan und Schroder 2020; Mantovani et al. 2019). Pro-IL-1 β ist nicht konstitutiv exprimiert und benötigt eine Aktivierung, um in die wirksame Form IL-1 β umgewandelt zu werden (Mantovani et al. 2019).

Die Expression von pro-IL-1 β findet während Infektionen, inflammatorischen Prozessen bzw. Erkrankungen oder bei Gewebeverletzungen statt. Nach Aktivierung von Pattern Recognition Rezeptoren (PRR) wie beispielsweise Toll-like Rezeptoren (TLR) und Synthese des Precursors pro-IL-1 β findet eine Aktivierung des proinflammatorischen Zytokins bevorzugt Inflammasom-assoziiert statt. Das Inflammasom ist ein Multi-Protein-Komplex, der sich als Antwort auf eine Infektion, einen Gewebeschaden oder zellulären Stress zusammenschließt. Das Inflammasom kann über den kanonischen Weg durch die Caspase-1 pro-IL-1 β schneiden und in die aktive Form IL-1 β überführen (Chan und Schroder 2020; Gallenga et al. 2019; Mantovani et al. 2019; Peterson et al. 2015). Alternativ kann die Maturation auch durch die Caspase-8 oder möglicherweise Elastasen und Serinproteasen ausgelöst werden (Chan und Schroder 2020; Dinarello 1988). Nur die aktive Form IL-1 β kann aus der Zelle freigesetzt werden (Chan und Schroder 2020).

IL-1 β kommuniziert über den Interleukin-1-Rezeptor 1 (IL-1R1). Als proinflammatorisches Zytokin werden hierdurch lokale inflammatorische, aber auch systemische Prozesse ausgelöst. Der Interleukin-1-Rezeptor 2 (IL-1R2) dient zur negativen Regulation des IL-1 β Signals (Chan und Schroder 2020; Mantovani et al. 2019). IL-1 β hat einen Einfluss auf die Entwicklung und Aktivierung einer Vielzahl von Immunzellen, sowohl des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems, es kann die Entstehung von Fieber triggern, spielt in der Akuten Phase Antwort eine Rolle und hat die Möglichkeit, eine Notfall-Hämatopoese einzuleiten und die Produktion von Wachstumsfaktoren anzukurbeln (Chan und Schroder 2020; Dinarello 1988; Garlanda et al. 2013; Kahlenberg und Kang 2020; Mantovani et al. 2019; Mendiola und Cardona 2018; Shin et al. 2019; Weber et al. 2010). Auch in der Pathogen-Abwehr an der Mukosa-Oberfläche des Darms spielt IL-1 β eine Rolle (Mantovani et al. 2019).

Durch seine proinflammatorischen Eigenschaften besitzt das Zytokin IL-1 β während einer Infektion oder Inflammation bzw. Gewebsverletzung eine protektive Rolle für den Organismus. Findet man jedoch eine übermäßige Produktion von IL-1 β vor, so ist dies meist mit pathologischen Zuständen des Körpers verbunden. So findet man beispielweise bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2, Patienten mit Adipositas oder bei Patienten mit einem Cryopyrin-assoziierten periodischen Syndrom einen erhöhten IL-1 β Spiegel im Serum (Chan und Schroder 2020; Osborn et al. 2008).

3.1.3.1 Anakinra

3.1.3.1.1 Wirkmechanismus von Anakinra

Anakinra (Kineret®) ist ein Interleukin-1-Rezeptor (IL-1R) – Antagonist, der für die Indikationen rheumatoide Arthritis, periodische Fiebersyndrome, Cryopyrin-assoziierte periodische Syndrome (CAPS), das Familiäre Mittelmeerfieber sowie das Still-Syndrom zugelassen ist. Bei diesen Erkrankungen findet man einen erhöhten Interleukin-1 (IL-1) Spiegel. Anakinra führt hierbei zu einer Hemmung der inflammatorischen Wirkung von IL-1 durch kompetitive Hemmung des IL-1R1 (Mertens und Singh 2009).

3.1.3.1.2 Einfluss von Anakinra auf das Mikrobiom

Needell et al. beschrieben in ihrer Arbeit durch eine fünftägige Gabe von Anakinra in LEW1.WR1 Ratten, die nach einer Infektion mit dem Parvovirus Kilham Rat Virus einen Diabetes Typ 1 entwickeln, eine Veränderung der Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT-1) und Interleukin-12/Interleukin-23 Genexpression sowie einen Anstieg des Bakteriums *Akkermansia* und einem Bakterium der Familie der Prevotellaceae sowie einem Bakterium der Familie der Ruminococcaceae (Needell et al. 2017). Erniedrigt waren in dieser Arbeit jedoch nach fünftägiger Anakinra Gabe *Bifidobacterium* sowie *Clostridium* (Needell et al. 2017).

Rogier et al. beschrieben bei einem Verlust des Interleukin-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1Ra) einen Rückgang der Richness sowie Diversität. In der Lamina propria wurde eine vermehrte Interleukin-17 (IL-17) Konzentration vorgefunden sowie eine vermehrte Expansion von T-Helfer-17 Zellen (TH17 Zellen). Die Veränderung des Mikrobioms zeigte ein übermäßiges Vorkommen von *Helicobacter*. *Prevotella* und *Ruminococcus* waren vermindert vorzufinden (Rogier et al. 2017).

3.1.3.2 Canakinumab

3.1.3.2.1 Wirkmechanismus von Canakinumab

Canakinumab (Ilaris®) ist ein humaner monoklonaler anti-IL-1 β -Antikörper und führt über die Neutralisierung des IL-1 β Signalings zu einer Unterbindung der Entzündungsreaktionen bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen. Canakinumab besitzt eine Zulassung bei Erkrankungen mit übermäßiger IL-1 β Exprimierung wie dem Familiären Mittelmeerfieber, bei periodischen Fiebersyndromen, dem Still-Syndrom oder den Cryopyrin-assoziierten periodischen Syndromen (Dhimolea 2010; Lachmann et al. 2009).

3.1.3.2.2 Einfluss von Canakinumab auf das Mikrobiom

Zum Einfluss von Canakinumab auf das Mikrobiom bzw. spezieller das Mikrobiom des Darms sind noch keine Daten bekannt.

3.1.3.3 Einfluss von Interleukin-1 β auf das Mikrobiom

IL-1 β ist maßgeblich an der intestinalen Homöostase beteiligt. Eine Überproduktion von IL-1 β ist in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu finden, wo es eine mukosale Inflammation triggert. Jedoch kann IL-1 β auch eine protektive Wirkung ausüben, in dem es bei einer mukosalen Verletzung, Stress, Infektion oder mukosaler Inflammation eine Immunantwort hervorruft. Diese Kaskade kann auch durch die Kommensalen oder Pathogene ausgelöst werden, die hierbei die Produktion bzw. Aktivierung von IL-1 β fördern (Kitamoto et al. 2020; Mortha et al. 2014; Seo et al. 2015; Zhen und Zhang 2019).

Diverse Arbeiten zeigten eine alterierte Darm-Mikrobiota bei gleichzeitigem Auftreten von erhöhten IL-1 β Spiegel (Ding et al. 2019; Suriano et al. 2017). Ding et al. beschrieben beispielsweise bei Typ 1 Diabetes mellitus neben einem erhöhten IL-1 β Spiegel eine erniedrigte Diversität der Darm-Mikrobiota, ein vermehrtes Vorkommen von *Ruminococcus* und *Bacteroides*, sowie ein verringertes Auftreten von *Bifidobacterium* und *Faecalibacterium* (Ding et al. 2019). Suriano et al. zeigten bei Adipositas einen erhöhten IL-1 β Spiegel und ein reduziertes Vorkommen von *Akkermansia*, das durch eine Weizenkleie-reiche Diät zu einer Reduktion des erhöhten IL-1 β Spiegel und einer Steigerung im Vorkommen von *Akkermansia* verschoben werden kann (Suriano et al. 2017). Auch bei Gabe von Metformin oder Probiotika wie *Lactobacillus* G15 and Q14 in Zusammenhang mit Erkrankungen wie

Projekt 1: Einfluss von Interleukin-1 β (IL-1 β) auf das Mikrobiom des Darms

Einleitung

Adipositas oder Diabetes mellitus wurde eine alterierte Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms neben einer Reduktion von Interleukin-1 β beobachtet (Lee et al. 2018; Tian et al. 2016).

Diese Daten weisen auf einen eventuellen Zusammenhang zwischen dem Interleukin-1 β Spiegel und der Zusammensetzung der Darm-Mikrobiota hin, der in dieser Arbeit näher untersucht werden soll.

3.2 Zielsetzung

In diesem Teilprojekt soll der Einfluss von Interleukin-1 β auf das Darmmikrobiom durch folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Gibt es einen Unterschied im Mausmodell zwischen IL-1 β -knockout Tieren und Wildtyp Tieren?
2. Unterscheiden sich IL-1 β knockout Tiere und Wildtyp Kontrollen in der α - oder β -Diversität?
3. Wenn es Unterschiede zwischen den Versuchstieren gibt: Lassen diese sich reproduzieren?
4. Lassen sich diese Unterschiede auf eine direkte Wirkung von IL-1 β auf die Bakterien im Darm zurückführen oder handelt es sich hierbei um eine indirekte Wirkung?
5. Gibt es Unterschiede im Expressionsmuster zwischen IL-1 β knockout Tieren und Wildtyp Mäusen?
6. Stehen diese Veränderungen im Zusammenhang mit den Veränderungen im Mikrobiom der Versuchstiere?
7. Lassen sich die Unterschiede auf mRNA-Level auch auf Protein-Level beobachten?
8. Ist eine direkte Wirkung des vermutlich für den Unterschied zwischen IL-1 β knockout Tieren und Wildtyp Kontrollen verantwortlichen Proteins auf bestimmte Bakteriengruppen feststellbar?
9. Gibt es eine erhöhte Penetrationsfähigkeit von Bakterien in IL-1 β knockout Tieren im Vergleich zu Wildtyp Kontrollen?
10. Wenn ja: Lässt sich diese erhöhte Penetrationsfähigkeit auf eine geringere Expression von Mucinen zurückführen?
11. Wenn Punkt 9 mit ja beantwortet werden kann: Lässt sich diese erhöhte Penetrationsfähigkeit auch mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit gekoppelter Immunfluoreszenz nachweisen?
12. Wenn Punkt 9 mit ja beantwortet werden kann: Entsteht durch die erhöhte Penetrationsfähigkeit bestimmter Bakterien in IL-1 β knockout Tieren im Vergleich zu Wildtyp Kontrollen eine erhöhte Exposition des systemischen Immunsystems mit diesen Bakterien? Unterscheiden sich die Immunglobulin G (IgG) Level gegen diese Bakterien zwischen IL-1 β knockout Tieren und Wildtyp Kontrollen?
13. Lassen sich die im Mausmodell erlangten Erkenntnisse auch auf das Humansystem übertragen?
14. Wie unterscheidet sich das Mikrobiom des Darms von Patienten vor und nach sechswöchiger Therapie mit einem Medikament, das die Wirkung von IL-1 β hemmt? Findet man hier dieselben Unterschiede wie im Mausmodell?

Projekt 1: Einfluss von Interleukin-1 β (IL-1 β) auf das Mikrobiom des Darms
Zielsetzung

Die Ergebnisse dieses Projekts sollen somit einen Einblick in den Einfluss des wichtigen Zytokins Interleukin-1 β auf die Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms und der damit verbundenen Faktoren geben.

3.3 Material und Methoden

3.3.1 Material

3.3.1.1 Geräte

Anaerobier-Kammer	Oxoid
Elektrophorese-Gerät	Consort Electrophoresis Power Supply; Sigma-Aldrich
FACSCanto	BD Biosciences
Heizer	Eppendorf Thermomixer® Comfort; Eppendorf
Hybridisierungs-Kammer (Heizofen)	Hybridizer 600; Stratagene
Illumina Sequencer	Illumina MiSeq System; Illumina
Inkubator	Brutschrank / Wärmeschrank BBD-6220; Heraeus
Konfokales Mikroskop	Leica Microsystems GmbH
Licht-Mikroskop	Leica Microsystems GmbH
McFarland Messgerät	DensiCheck plus; bioMérieux
Nano Drop	ND-1000 Spektrophotometer; peQLAB Biotechnologie
Schüttler Bakterien	Heidolph Unixam 1010 und Inkubator 1000; Heidolph
Schüttler DNA-Isolation	IKA VIBRAX VXR; IKA Werke
TaqMan Real-Time PCR	ABI Prism® 7700; Applied Biosystems
Tecan	Tecan Sunrise Spektral-Photometer; Tecan
ThermoCycler	peQLAB Biotechnologie GmbH
UV-Kamera	Quantum ST4 System; peQLAB Biotechnologie GmbH
Vortexer	Schüttelgerät MS-1 Minishaker; IKA Werke
Westernblot Detektion	Chemi Start 5000; peQLAB Biotechnologie GmbH
Zentrifuge groß	Megafuge 1.0R; Heraeus
Zentrifuge klein	Biofuge pico; Heraeus

3.3.1.2 Verbrauchsmaterialien

1,5 ml Eppendorf-Gefäß (Eppi)	Eppendorf Tubes; Eppendorf
2,0 ml Safe Seal Eppi	Eppendorf Safe Lock Tubes; Eppendorf
24 G x 1 Kanüle	BD Microlance™ 3; Becton Dickinson GmbH
27 G x ¾ Kanüle	BD Microlance™ 3; Becton Dickinson GmbH
BD GasPak™ EZ	Anaerobe Container System with Indicator; Becton Dickinson and Company
Blotting-Membran 0,2 μ m	Nitrocellulose; Sigma Aldrich
Blotting-Papier	Schleicher & Schuell GB003; Whatman GmbH
Deckgläser	Deckgläser 24x60mm No1; Marienfeld Superior
ELISA-Platten	Microplatte, 96 Well, PS, F-Boden, transparent, Microlon®, High-Binding; Greiner Bio-one
FACS-Tubes	Probenröhre 75 x 12 mm; Sarstedt AG & Co.
Kühlakkus	Carl Roth GmbH + Co. KG
Objektträger	Objektträger 76x26x1mm; Marienfeld Superior
Parafilm	Parafilm M; PM-996, Peching Plastick Packaging
PCR-Tubes	Eppendorf PCR Tubes; Eppendorf
qRT-PCR Folien	prima Seal qPCR; Steinbrenner Laborsystem GmbH
qRT-PCR Platten	prima PLATE qPCR; Steinbrenner Laborsystem GmbH
Spritzen	BD Plastipak™ Spritzen; 2 ml und 5 ml; Becton Dickinson GmbH
Stuhluntersuchungsröhrchen	Sarstedt AG & Co.
U-Bottom-Plate	Microplatte, 96 Well, PS, U-Boden, transparent; Greiner Bio-one
Versandboxen	Sarstedt AG & Co.

Projekt 1: Einfluss von Interleukin-1 β (IL-1 β) auf das Mikrobiom des Darms
Material und Methoden

Zellkulturflaschen	verschiedene Größen; Greiner bio-one
Zellkulturschalen	verschiedene Größen; Greiner bio-one
Zellschaber	Corning Incorporated

3.3.1.3 Gebrauchsfertige Kits

cDNA-Synthese	„High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“; Applied Biosystem S
DNA-Aufreinigung aus PCR-Mix	QIAquick® PCR Purification Kit; QIAGEN
DNA-Isolation aus Fäzes	QIAmp® DNA Stool Kit; QIAGEN
DNA-Isolation aus Mukosa	„High Pure RNA Isolation Kit“; Roche
ELISA	„Mouse IL1 β ELISA Set“; BD optEIA
Pierce BCA Protein Assay	Thermo Scientific
RNA-Isolation	„High Pure RNA Isolation Kit“; Roche
TMB Substrate Reagent Set	Becton Dickinson GmbH

3.3.1.4 Chemikalien/Reagenzien

10x Pfu PCR buffer with MgSO ₄	Thermo Scientific
10x Taq Buffer with KCl	Thermo Scientific
Agarose	Bio&Sell
APS	PlusOne Ammonium Persulphate; Life Science products Cytiva
Bisbenzimid	Hoechst 33258; Sigma-Aldrich
Blutagar-Platten	Becton Dickinson GmbH
BSA	Bovine Serum Albumin Solution; AppliChem
Chloroform	AppliChem
Deoxycholat	Sigma Aldrich
DirectPCR® Lysis Reagent Ear	Viagen Biotech, Inc.
DirectPCR® Lysis Reagent Tail	peQLAB Biotechnologie GmbH
DMEM	Life Technologies
DMEM „no glucose“	Life Technologies
DNA-Dye Non Tox	AppliChem
dNTP Mix, 10 mM each	Thermo Scientific
EDTA	Ethylendiamintetraacetat; AppliChem
Eisessig	Merck KGaA
Entfärber Gramfärbung	BBL Gram Decolonizer; Becton Dickinson GmbH
Ethanol	Sigma Aldrich
FACS clean	Becton Dickinson GmbH
FACS flow	Becton Dickinson GmbH
FCS	Fetal Calf Serum; Gibco
Galactose	Sigma Aldrich
Gene Ruler™ 100bp Ladder	Fermentas
Glasbeads	Carl Roth GmbH + Co. KG
Glycin	AppliChem
HCl	Salzsäure; Carl Roth GmbH + Co. KG
Human Transferrin	apo-Transferrin human; Sigma Aldrich Chemie GmbH
Inhibitoren-Mix	Aprotonin, Leupeptin, Pepstatin (je 1 mg/ml); cOMplete Tablets, Mini EASYpack; Roche
Kristallviolett	BBL Gram Crystal Violet; Becton Dickinson GmbH
L-Glutamin	Sigma Aldrich
Leber/Thio-Medium	SIFIN
LGM	Lymphocyte Growth Medium; AppliChem
Lugolsche Lösung	BBL Gram Iodine; Becton Dickinson GmbH

Projekt 1: Einfluss von Interleukin-1 β (IL-1 β) auf das Mikrobiom des Darms
Material und Methoden

Lysozym	Sigma Aldrich
Methanol	vwr chemicals
MgCl ₂ 25 mM	Magnesiumchlorid; Thermo Scientific
Mounting Medium	Dako Fluorescence Mounting Medium; Dako GmbH
Natrium Fluorid	Sigma Aldrich
Natrium-Carbonat	Grüssing
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma Aldrich
PBS (w/o Ca & Mg)	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w/o Calcium w/o Magnesium; anprotec
Penicillin/Streptomycin	Pen/Strep (10x); anprotec
Pfu DNA Polymerase 2,5 u/ μ l	Thermo Scientific
PolyDIDC	Poly-deoxy-inosinic-deoxy-cytidylic acid; Sigma Aldrich
Power SYBR [®] Green PCR Master Mix	applied biosystems
Protein Ladder	Fermentas
Proteinase K	Roche
RNAse-freies H ₂ O	Aqua ad injectabilia Braun 10 ml; B.Braun
Roticlear	Carl Roth GmbH + Co. KG
RPMI 1640	anprotec
Safranin	BBL Gram Safranin; Becton Dickinson GmbH
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	AppliChem
Taq DNA Polymerase 5 u/ μ l	Thermo Scientific
TEMED	Tetramethylethylenediamine; Carl Roth GmbH + Co. KG
Tris-base	Tris for molecular biology; PanReac AppliChem
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Triton X100	Merck KGaA
Trypsin/EDTA (10x)	anprotec
Tween-20	AppliChem
Xylol	Sigma Aldrich
β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG

3.3.1.5 Mäuse

IL-1 β -KO Mäuse und littermate Kontrollen	aus laufender Zucht, Basis: C57BL/6, Zucht-Unit: zu Beginn 4, im Verlauf 6 (Shornick et al. 1996)
IL-1R-KO Mäuse und littermate Kontrollen	aus laufender Zucht, Basis: C57BL/6 Zucht-Unit: 6 (Girtsman et al. 2014)
C57BL/6	Charles River Zucht-Unit: zu Beginn 4, im Verlauf 6

3.3.1.6 Puffer

DNase-Lösung (pro Probe, angesetzt als n+1)

- DNase Incubation Buffer (Kit: „High Pure RNA Isolation Kit“, Roche)	90 μ l
- DNase (Kit: „High Pure RNA Isolation Kit“, Roche)	10 μ l

Lysepuffer (pro Probe, angesetzt als n+1)

- Lysepuffer (Kit: „High Pure RNA Isolation Kit“, Roche)	400 μ l
- β -Mercaptoethanol	0,4 μ l
- PBS	200 μ l

Stuhl-Lysepuffer

- 2 ml 1M Tris-HCl pH 8,0
- 400 μ l EDTA 0,5 M
- 1,2 ml Triton X100
- ad 100 ml Aqua destillata

Stuhl-Lysepuffer mit Lysozym (pro Probe, angesetzt als n+1)

- 200 μ l Stuhl-Lysepuffer
- 4 mg Lysozym

50x TAE-Puffer

- 242 g Tris-base
- 57 ml Eisessig
- 0,5 M EDTA
- ad 1000 ml Aqua destillata

ELISA-Coating-Puffer

- 0,1 M Natrium-Carbonat, pH 9,5

ELISA-Block-Puffer

- 10 % FCS
- in PBS

ELISA-Wasch-Puffer

- 0,05 % Tween-20
- in PBS

ELISA-Substratlösung

- Tetramethylbenzidin (BD optEIA)
- Wasserstoffperoxid (BD optEIA)

ELISA-Enzym

- Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (s. TMB Substrate Reagent Set; Becton Dickinson GmbH)

ELISA-Stopplösung

- 0,1 M Schwefelsäure

FISH-Hybridisierungspuffer

- 20 mM Tris-HCl (pH 7,4)
- 0,9 M NaCl
- 0,1 % SDS

FISH-Waschpuffer

- 20 mM Tris-HCl (pH 7,4)
- 0,9 M NaCl

FISH-Blockpuffer

- 5 % FCS
- In PBS

RIPA-Puffer

- 150 mM NaCl
- 1 mM EDTA
- 1 % Triton X100
- 1 % Deoxycholat
- 1 mM Natrium Fluorid
- 25 mM Tris-base

10 x TBS (Tris-gepufferte Salzlösung)

- 80 g NaCl
- 30 g Tris-base
- Ad 1000 ml Aqua destillata
- mit HCl 37 % auf einen pH von 7,4 eingestellt

Wet-Blot-Puffer

- 25 mM Tris-base
- 192 mM Glycin
- 10 % Methanol
- ad 1000 ml Aqua destillata

Semi-Dry-Puffer

- 2,93 g Glycin (39 mM)
- 5,81 g Tris-base (48 mM)
- 0,37 g SDS (0,037 %)
- 200 ml Methanol (20 %)
- ad 1000 ml Aqua destillata

TBST

- 0,05 % Tween-20
- in 1x TBS

Acrylamid-Trenngel 12 % (pro Gel)

- 1,6 ml Aqua destillata
- 2,4 ml Acrylamid (30 %)
- 2 ml Trenngelpuffer
- 5 μ l TEMED
- 20 μ l 10 % APS

Acrylamid-Sammelgel (pro Gel)

- 720 μ l Aqua destillata
- 270 μ l Acrylamid (30%)
- 1 ml Sammelgelpuffer
- 2 μ l TEMED
- 10 μ l 10 % APS

Trenngelpuffer

- 136 g Tris-base
- 3 g SDS
- Mit HCl auf pH 8,8 einstellen
- ad 1000 ml Aqua destillata

Sammelgelpuffer

- 30 g Tris-base
- 2 g SDS
- Mit HCl auf pH 6,8 einstellen
- ad 1000 ml Aqua destillata

Western-Blot Block Puffer

- 3 % BSA
- in TBST

Kulturmedium zur bone marrow derived cells (BDMC)-Anzucht aus Knochenmarkszellen

- 10 % FCS
- 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S)
- 0,5 % β -Mercaptoethanol
- in RPMI

Kulturmedium HT29/18-N2-Zellen

- Medium DMEM „no glucose“
- 50 U/ml Penicillin
- 50 μ g/ml Streptomycin
- 10 % FCS
- 1 ml 5 mg/ml Human Transferrin
- 5 mM Galactose

Kulturmedium CMT93 Zellen

- Medium DMEM
- 10 % FCS

Kulturmedium Colon-26 Zellen

- RPMI 1640
- 2 mM L-Glutamine
- 10 % FCS

Methanol-Carnoy`s fixative

- Methanol 6 ml
- Chloroform 3 ml
- Eisessig 1 ml

3.3.1.7 Zelllinien

CMT93	ATCC CCL-223, American Type Culture Collection, Colon und Rektum Epithel, murin
Colon-26	CLS Cell Lines Service GmbH, Colon Epithel, murin
HT29/18-N2-Zellen	Arbeitsgruppe von Marshall H. Montrose, University of Cincinnati, Colon mit Überexpression an Goblet-Zellen, human

3.3.1.8 Primer

Alle Primer wurden über die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) bezogen. Der Buchstabe „m“ vor den Primern steht für Primer, die spezifisch auf das murine Modell sind.

mIL-1 β -WT

Forward: 5' - AACCTTTGACCTGGGCTGT - 3'

Reverse: 5' - TGAAGGAAAAGAAGGTGCTCA - 3'

mIL-1R-Typisierung

Forward: 5' - CCGAAGAAAGCTCACGTTGTCAAG - 3'

Reverse Wildtyp: 5' - GAGTTACCCGAGGTCCAGTGG - 3'

Reverse Knockout: 5' - GAATGGGCTGACCGCTTCCTCG - 3'

16S eubakterielle Primer

Forward: 5' - CCATGAAGTCGGAATCGCTAG - 3'

Reverse: 5' - ACTCCCATCGTGTGACGG - 3'

Akkermansia muciniphila

Forward: 5' - CAGCACGTGAAGGTGGGGAC - 3'

Reverse: 5' - CCTGCGGTTGGCTTCAGAT - 3'

Enterococcus genus

Forward: 5' - CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT - 3'

Reverse: 5' - ACTCGTTGTACTTCCCATTGT - 3'

Lactobacillus group

Forward: 5' - AGCAGTAGGGAATCTTCCA - 3'

Reverse: 5' - CACCGCTACACATGGAG - 3'

Bacteroides thetaiotaomicron

Forward: 5' - CACAAGAGCCATAGCGTTCCA - 3'

Reverse: 5' - ATCGCAAAAATAAGATGGGCAA - 3'

mbeta-actin

Forward: 5' - CCCTGTGCTGCTCACCGA - 3'

Reverse: 5' - ACAGTGTGGGTGACCCCGTC - 3'

mAng4

Forward: 5' - GGTTGTGATTCCTCCAACCTCTG - 3'

Reverse: 5' - CTGAAGTTTTCTCCATAAGGGCT - 3'

mAng1

Forward: 5' - CCAGGCCCGTTGTTCTTGAT - 3'

Reverse: 5' - GGAAGGGAGACTTGCTCATTC - 3'

mAng2

Forward: 5' - CAGGACGCCCTCTGATGTG - 3'

Reverse: 5' - CCCTGAGATTCTGTTTTCGCTTA - 3'

mAng3

Forward: 5' - TGAGTCTGGATGTGATCCCTC - 3'

Reverse: 5' - GACCTGGAATCGAGAATTGCTT - 3'

mRetnlb

Forward: 5' - AAGCCTACACTGTGTTTCCTTTT - 3'

Reverse: 5' - GCTTCCTTGATCCTTTGATCCAC - 3'

mReg3 β

Forward: 5' - ACTCCCTGAAGAATATACCCTCC - 3'

Reverse: 5' - CGCTATTGAGCACAGATACGAG - 3'

mReg3 γ

Forward: 5' - ATGCTTCCCCGTATAACCATCA - 3'

Reverse: 5' - GGCCATATCTGCATCATACCAG - 3'

mDefb2

Forward: 5' - GCCATGAGGACTCTCTGCTC - 3'
 Reverse: 5' - AGGAGGACAAATGGCTCTGA - 3'

mIL-17

Forward: 5' - TCCAGAAGGCCCTCAGACTA - 3'
 Reverse: 5' - TGAGCTTCCCAGATCACAGA - 3'

mIL-22

Forward: 5' - AATGTCAGAAGGCTGAAGGAGACAGTG - 3'
 Reverse: 5' - TTCTCAGAGACATAAACAGCAGGTCCA - 3'

ANG

Forward: 5' - CTGGGCGTTTTGTTGTTGGTC - 3'
 Reverse: 5' - CCAGCACTATGATGCCAAACC - 3'

mMuc2

Forward: 5' - ATGCCACCTCCTCAAAGAC - 3'
 Reverse: 5' - GTAGTTTCCGTTGGAACAGTGAA - 3'

IL-1R1

Forward: 5' - GGCTGAAAAGCATAGAGGGAAC - 3'
 Reverse: 5' - CTGGGCTCACAATCACAGG - 3'

IL-1R2

Forward: 5' - ATGTTGCGCTTGTACGTGTTG - 3'
 Reverse: 5' - CCCGCTTGTAATGCCTCCC - 3'

Humanes β -actin

Forward: 5' - AGAGCTACGAGCTGCCTGAC - 3'
 Reverse: 5' - AGCACTGTGTTGGCGTACAG - 3'

Tabelle 1: 16S Primerliste des Next Generation Sequencings (NGS) für die Region V6 für das 1. Sequencing.
 Primer sind angegeben mit Namen und Sequenz. Der kleingeschriebene Anteil der Sequenzen dient zur Zuordnung in der Auswertung des Sequencings.

Oligoname	Sequenz
16SV6L1	catgcg CAACGCGARGAACCTTACC
16SV6L2	gcagt CAACGCGARGAACCTTACC
16SV6L3	tagct CAACGCGARGAACCTTACC
16SV6L4	gactgt CAACGCGARGAACCTTACC
16SV6L5	cgtcga CAACGCGARGAACCTTACC
16SV6L6	gtcgc CAACGCGARGAACCTTACC
16SV6L7	acgta CAACGCGARGAACCTTACC
16SV6L8	cactac CAACGCGARGAACCTTACC
16SV6L9	tgac CAACGCGARGAACCTTACC
16SV6L10	agta CAACGCGARGAACCTTACC
16SV6L11	atga CAACGCGARGAACCTTACC
16SV6L12	tgca CAACGCGARGAACCTTACC
16SV6L13	act CAACGCGARGAACCTTACC
16SV6R1	cgcatg ACAACACGAGCTGACGAC
16SV6R2	actgc ACAACACGAGCTGACGAC
16SV6R3	agcta ACAACACGAGCTGACGAC
16SV6R4	acagtc ACAACACGAGCTGACGAC
16SV6R5	tcgacg ACAACACGAGCTGACGAC

Projekt 1: Einfluss von Interleukin-1 β (IL-1 β) auf das Mikrobiom des Darms
Material und Methoden

16SV6R6	gcgac ACAACACGAGCTGACGAC
16SV6R7	tacgt ACAACACGAGCTGACGAC
16SV6R8	gtagtg ACAACACGAGCTGACGAC
16SV6R9	gtca ACAACACGAGCTGACGAC
16SV6R10	tact ACAACACGAGCTGACGAC
16SV6R11	tcat ACAACACGAGCTGACGAC
16SV6R12	tgca ACAACACGAGCTGACGAC
16SV6R13	agt ACAACACGAGCTGACGAC

Tabelle 2: 16S Primerliste des Next Generation Sequencings (NGS) für die Region V4 für das 1. Sequencing.
Primer sind angegeben mit Namen und Sequenz. Der kleingeschriebene Anteil der Sequenzen dient zur Zuordnung in der Auswertung des Sequencings.

Oligoname	Sequenz
16SV4L1	catgcg GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
16SV4L2	gcagt GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
16SV4L3	tagct GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
16SV4L4	gactgt GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
16SV4L5	cgtcga GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
16SV4L6	gtcgc GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
16SV4L7	acgta GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
16SV4L8	cactac GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
16SV4L9	tgac GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
16SV4L10	agta GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
16SV4L11	atga GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
16SV4L12	tgca GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
16SV4L13	act GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
16SV4R1	cgcatg GGACTACHVGGGTWTCTAAT
16SV4R2	actgc GGACTACHVGGGTWTCTAAT
16SV4R3	agcta GGACTACHVGGGTWTCTAAT
16SV4R4	acagtc GGACTACHVGGGTWTCTAAT
16SV4R5	tcgacg GGACTACHVGGGTWTCTAAT
16SV4R6	gcgac GGACTACHVGGGTWTCTAAT
16SV4R7	tacgt GGACTACHVGGGTWTCTAAT
16SV4R8	gtagtg GGACTACHVGGGTWTCTAAT
16SV4R9	gtca GGACTACHVGGGTWTCTAAT
16SV4R10	tact GGACTACHVGGGTWTCTAAT
16SV4R11	tcat GGACTACHVGGGTWTCTAAT
16SV4R12	tgca GGACTACHVGGGTWTCTAAT
16SV4R13	agt GGACTACHVGGGTWTCTAAT

Primer 2. Next Generation Sequencing

341F_MiSeq: 5' - TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG - 3'

805R_MiSeq: 5' - GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC - 3'

3.3.1.9 Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH)-Sonden

Alle FISH-Sonden wurden über die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) bezogen.

Hyb 16S-Cy3

5' - GCTGCCTCCCGTAGGAGT - 3'

Hyb Akk-Cy5

5' - CCTTGC GGTTGGCTTCAGAT - 3'

3.3.1.10 Antikörper

anti-Muc2	abcam
anti-Villin	abcam
anti-Mouse IgG Alexa Fluor® 488	abcam
anti-mouse IgG PE	Santa Cruz Biotechnology
anti-ANG	Santa Cruz Biotechnology
anti-mouse beta actin	abcam
anti-goat IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology
anti-mouse IgG HRP-linked	Cell Signaling

3.3.1.11 Stimulantien

LPS	eingesetzte Konz.: 100 ng/ml	Invivogen
IL-1 β (human)	eingesetzte Konz.: 100 ng/ μ l	PeptoTech
SAHA	eingesetzte Konz.: 4 μ M	Cayman Chemical
IL-1 β (murin)	eingesetzt Konz.: 50 ng/ μ l	PeptoTech

3.3.1.12 Rekombinante Proteine

Rekombinantes mouse Ang 4	CSB-EP661010MO; Cusabio
---------------------------	-------------------------

3.3.1.13 Bakterien

<i>Akkermansia muciniphila</i>	DSM 22959; DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH
<i>Enterococcus faecium</i>	Patientenisolat
<i>Enterococcus faecalis</i>	Patientenisolat
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Patientenisolat
<i>Lactobacillus species</i>	Patientenisolat
<i>Staphylococcus aureus</i>	Patientenisolat

3.3.1.14 Prüfsubstanzen

Anakinra	Kineret®, Swedish Orphan Biovitrum
Canakinumab	Ilaris®, Novartis

3.3.1.15 Datenbanken und Software zur Auswertung

Chipster Analysis Software	Auswertung des Gene-Arrays (Auswertung durch DKFZ)
CLC Biomedical Workbench	Auswertung von Sequencings, Version 4.0
Greengenes	Datenbank zur Auswertung von Sequencings, Version 13.0
Prism – GraphPad	Erstellung der Abbildungen sowie Durchführung Statistik, Version 5.00
Silva Database	Datenbank zur Auswertung von Sequencings, Version 132
Software R	Auswertung von Sequencings, Version 3.6.3

3.3.2 Methoden

3.3.2.1 Tierversuchsnummer Tötung

Die Tötung der Versuchstiere wurde unter der Tötungsmeldung TV-62/14 durchgeführt.

3.3.2.2 Typisierung der Mäuse über Polymerase Chain Reaction (PCR)

Zur Isolierung der DNA aus Schwanzspitzen wurden die Schwanzspitzen der zu typisierenden Mäuse in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß (Eppi) mit 200 μ l DirectPCR[®] Lysis Reagent Tail (peQLAB Biotechnologie) sowie 2 μ l Proteinase K (Roche) versetzt und 3-16 Stunden bei 55 °C auf dem Schüttler inkubiert. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurden die Proben danach 45 Minuten bei 85 °C ohne Schütteln auf einem Heizblock erwärmt.

Zur Isolierung der DNA aus Ohrstanzen wurden die Ohrstanzen der zu typisierenden Mäuse in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß mit 200 μ l DirectPCR[®] Lysis Reagent Ear (Viagen Biotech, Inc.) sowie 2 μ l Proteinase K (Roche) versetzt und 3-16 Stunden bei 55 °C auf dem Schüttler inkubiert. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurden die Proben danach 45 Minuten bei 85 °C ohne Schütteln auf einem Heizblock erwärmt.

Für die Typisierung der IL-1 β -KO-Mäuse und Wildtyp Kontrollen wurde ein Master-Mix aus 36,6 μ l H₂O (B.Braun), 5 μ l 10x Taq Buffer with KCl (Kaliumchlorid) (Thermo Scientific), 5 μ l Magnesiumchlorid (MgCl₂) 25 mM (Thermo Scientific), 1 μ l dNTP Mix 10 mM each (Thermo Scientific), 0,5 μ l Taq DNA Polymerase 5 u/ μ l (Thermo Scientific), 0,5 μ l Primer forward IL-1 β WT (5'-AAACCTTTGACCTGGGCTGT-3') und 0,5 μ l Primer reverse IL-1 β WT (5'-TGAAGGAAAAGAAGGTGCTCA -3'), multipliziert mit der Anzahl der zu typisierenden Mäuse plus 1 (n+1), hergestellt. Es wurde jeweils 1 μ l der aus der Isolation erhaltenen gelösten DNA plus 49 μ l des Master-Mix in einem PCR-Tube im ThermoCycler mit folgendem Programm amplifiziert:

1. 95 °C 10 min
2. 37 Zyklen:
 - a. Denaturierung: 95 °C 30 s
 - b. Annealing: 60 °C 60 s
 - c. Elongation: 72 °C 90 s
3. 72 °C 5 min

Nach Abschluss der PCR wurden die PCR-Produkte auf ein Agarose-Gel 2 %, bestehend aus 2 g Agarose (Bio&Sell) in 100 ml 1x TAE-Puffer (verdünnt aus 50x TAE Puffer: 242 g Tris-base, 57 ml Eisessig, 0,5 M EDTA, ad 1000 ml Aqua destillata), aufgetragen und anschließend eine Gelelektrophorese für ca. 1 Stunde bei 100-130 V gefahren. Die Detektion erfolgte durch Mischung von 5 μ l der PCR-Produkte mit 1 μ l DNA-Dye Non Tox (AppliChem) unter der UV-Kamera (peQLAB Biotechnologie GmbH). Als Standard wurde der Gene Ruler[™]100 bp Ladder (Fermentas) mitlaufen gelassen. Bei Wildtyp Tieren sowie heterozygoten IL-1 β +/- Tieren erschien eine Bande bei einer Basenlänge von 190 bp.

Für die Typisierung der IL-1R-KO-Mäuse und Wildtyp Kontrollen wurde ein Master-Mix aus 36,6 μ l H₂O (B.Braun), 5 μ l 10x Taq Buffer with KCl (Thermo Scientific), 5 μ l Magnesiumchlorid (MgCl₂) 25 mM (Thermo Scientific), 1 μ l dNTP Mix, 10 mM each (Thermo Scientific), 0,5 μ l Taq DNA Polymerase 5 u/ μ l (Thermo Scientific), 0,5 μ l Primer forward (5'-CCGAAGAAAGCTCACGTTGTCAAG-3') und 0,5 μ l von einem der Primer reverse (Reverse Wildtyp: 5'-GAGTTACCCGAGGTCCAGTGG-3'; Reverse Knockout: 5'-GAATGGGCTGACCGCTTCCTCG-3'), multipliziert mit der Anzahl der zu typisierenden Mäuse plus 1 (n+1), hergestellt. Es wurde jeweils 1 μ l der aus der Isolation erhaltenen gelösten DNA plus 49 μ l des Master-Mix in einem PCR-Tube im ThermoCycler mit folgendem Programm amplifiziert:

1. 95 °C 10 min
2. 38 Zyklen:

- a. Denaturierung: 95 °C 30 s
 - b. Annealing: 63 °C 60 s
 - c. Elongation: 72 °C 90 s
3. 72 °C 7 min

Nach Abschluss der PCR wurden die PCR-Produkte auf ein Agarose-Gel 2 %, bestehend aus 2 g Agarose (Bio&Sell) in 100 ml 1x TAE-Puffer (verdünnt aus 50x TAE Puffer: 242 g Tris-base, 57 ml Eisessig, 0,5 M EDTA, ad 1000 ml Aqua destillata), aufgetragen und anschließend eine Gelelektrophorese für ca. 1 Stunde bei 100-130 V gefahren. Die Detektion erfolgte durch Mischung von 5 μ l der PCR-Produkte mit 1 μ l DNA-Dye Non Tox (AppliChem) unter der UV-Kamera (peQLAB Biotechnologie GmbH). Als Standard wurde der Gene Ruler™100 bp Ladder (Fermentas) mitlaufen gelassen. Die Bande des Wildtyp-Allels zeigte sich bei 860 bp, die des knockout-Allels bei 1150 bp.

3.3.2.3 Probennahme Mäuse

Die Mäuse wurden durch eine CO₂-Narkose und anschließender zervikaler Dislokation getötet. Es wurden Blut, ein Stück des proximalen Colons, Fäzes von Colon, Caecum und Dünndarm sowie Scrapings der Darm-Mukosa durch Abschaben mit einem kleinen Löffel in den Abschnitten Colon, Caecum und Dünndarm entnommen.

Das Blut wurde bei 13.000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, das Serum in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die Proben bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Das entnommene Darmstück wurde in Methanol-Carnoy's fixative (Methanol : Chloroform : Eisessig 6:3:1) bei 2-8 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Der Fäzes wurde bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Die Mukosa-Scrapings wurden bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

3.3.2.4 Typisierung der Mäuse über Knochenmarkszellen

Knochenmarkszellen von IL-1 β -KO-Mäusen sowie littermate Wildtyp Kontrollen wurden aus dem Oberschenkelknochen gespült und in Zellkulturschalen in einem Medium, bestehend aus 10 % FCS (Gibco), 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) (anprotec) und 0,5 % β -Mercaptoethanol (Carl-Roth) in RPMI 1640 (anprotec) mit einem Zusatz von 1 ml Lymphozyte Growth Medium (LGM)(anprotec), zum Wachstum von BMDCs (Bone marrow derived cells) kultiviert. An Tag +1 wurden die Zellen geerntet und jeweils 10⁷ Zellen in 20 ml des oben genannten Mediums zusammen mit 1 ml LGM (anprotec) ausgebracht. An Tag +4 wurde das Medium gewechselt und 1 ml LGM (anprotec) hinzugegeben. An Tag +8 wurden die Zellen geerntet und in einer Konzentration von 10⁶ Zellen/ml auf Zellkulturplatten ausgebracht, sodass 0,2 x 10⁶ Zellen/well vorhanden waren. Die Zellen wurden mit Lipopolysaccharid (LPS) (Invivogen) in einer Verdünnung von 100 ng/ml und 4 μ M SAHA (Suberoylanilide Hydroxamic Acid)(Cayman Chemical) für 6 h stimuliert und der Überstand danach bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

Zur Durchführung eines mL-1 β ELISA wurde das „Mouse IL1 β ELISA Set“ (BD optEIA) verwendet. Es wurden Microplate Half-Area 96 Well Platten über Nacht mit 25 μ l/Well des Mix aus 11 μ l Capture-Antikörper + 2,75 ml ELISA Coating Puffer (0,1 M Natrium-Carbonat, pH 9,5) bei 4 °C gecoatet. Anschließend wurde dreimal mit ELISA Wasch Puffer (0,05 % Tween-20 in PBS) gewaschen und 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 100 μ l ELISA Block Puffer (10 % FCS in PBS) pro Well geblockt. Nach Entfernen des Puffers wurden die Proben 1:4 in ELISA Block Puffer verdünnt und auf die Wells ausgebracht. Nach 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten mit ELISA Wasch Puffer gewaschen und 25 μ l des Mix aus 2,75 μ l Detection-Antikörper und 2,75 ml ELISA Block Puffer pro Well für eine Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen mit ELISA Wasch Puffer wurde 25 μ l/well

des Mix aus 11 μ l Enzym plus 2,75 ml ELISA Block Puffer für eine halbe Stunde aufgebracht. Danach wurde mit ELISA Wasch Puffer gewaschen und 50 μ l des Substrats (A:B 1:1) pro Well ausgebracht. Nach 15 Minuten wurde pro Well 25 μ l ELISA Stopp Puffer (0,1 M Schwefelsäure) zur Beendigung der Reaktion ausgebracht. Die Messung erfolgte am ELISA Reader (Tecan). Zur Errechnung der IL-1 β Konzentration wurde eine Standardverdünnungsreihe herangezogen, die im Versuch mitgeführt wurde. Bei Produktion von IL-1 β handelt es sich um Wildtyp (+/+) Tiere oder heterozygote (+/-) Tiere. Bei Tieren ohne Produktion von IL-1 β handelt es sich um die knockout (-/-) Tiere.

3.3.2.5 DNA-Aufarbeitung aus Fäzes

Aus Fäzes der Mäuse oder Stuhl der Patienten wurde mithilfe des „QIAmp DNA Stool Kit“ von QIAGEN DNA isoliert. Dieses Kit enthält: ASL Puffer, Inhibit Ex Tabletten, Proteinase K, AL-Puffer, Silicasäulen, collection tubes, AW1 Puffer, AW2 Puffer, AE Puffer. Hierfür wurden die Proben auf Eis aufgetaut. Der Fäzes wurde in einem 2 ml SafeSeal Eppendorf-Gefäß mit 700 μ l ASL-Puffer und Glasbeads (Carl Roth GmbH + Co. KG) versetzt. Diese wurden auf dem Schüttler (IKA VIBRAX VXR; IKA Werke) 5 Minuten geschüttelt, danach 5 Minuten auf dem Heizer (Eppendorf) bei 95 °C gekocht, eine Minute abkühlen gelassen, nochmals 3 Minuten geschüttelt und anschließend 1 Minute bei 13.000 rounds per minute (rpm) zentrifugiert. Die Überstände wurden in ein neues 2 ml SafeSeal-Eppendorf-Gefäß überführt und im Kühlschrank zwischengelagert. Das entstandene Pellet wurde mit 200 μ l Stuhl-Lysepuffer mit Lysozym, bestehend aus 20 mg/ml Lysozym (Sigma-Aldrich) in Stuhl-Lysepuffer (2 ml 1M TRIS HCl pH 8,0, 400 μ l EDTA 0,5 M, 1,2 ml Triton X100, ad 100 ml Aqua destillata), versetzt und auf dem Heizer für 30 Minuten bei 37 °C erwärmt. Danach wurde dieser Mischung 500 μ l ASL-Puffer hinzugegeben und wieder 5 Minuten geschüttelt, 5 Minuten bei 95 °C gekocht, eine Minute bei Raumtemperatur (RT) abgekühlt und danach 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde zum im Kühlschrank gelagerten Überstand hinzugefügt und das Pellet verworfen. Den zusammengeführten Überständen der Probe wurde jeweils eine halbe Inhibit Ex Tablette hinzugegeben und gevortext, bis diese zerfallen war. Es wurde 3 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Nach erneutem Zentrifugieren bei 13.000 rpm für 3 Minuten wurden 400 μ l des Überstands zusammen mit 15 μ l Proteinase K in ein neues 2 ml SafeSeal Eppendorf-Gefäß überführt und mit 2000 μ l AL-Puffer versetzt. Die Mischung wurde für 15 Sekunden gevortext und anschließend für 10 Minuten bei 70 °C erwärmt. Nach kurzem Zentrifugieren wurde 400 μ l Ethanol (Sigma Aldrich) hinzugegeben und das komplette Lysat auf die Silicasäule überführt. Die Silicasäule wurde für 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert und anschließend das collection tube gewechselt. Nach Zugabe von 500 μ l AW1 wurde 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert, das collection tube gewechselt, 500 μ l AW2 zugegeben und 3 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach erneutem Wechsel des collection tubes wurde nochmals 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die an der Silicasäule gebundene DNA wurde mit 100 μ l auf 70 °C vorgeheiztem AE-Puffer in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß durch kurze Zentrifugation eluiert. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

3.3.2.6 DNA-Konzentrationseinstellung zur Vorbereitung für die Sequenzierung

Die Konzentration der aus dem murinen oder humanen Fäzes isolierten DNA wurde am Nano Drop (peQLAB Biotechnologie) vermessen und mit H₂O (B.Braun) auf eine Konzentration von 80 ng/ μ l eingestellt.

3.3.2.7 PCR zur Vorbereitung der Sequenzierung

Es wurde ein Master Mix aus jeweils 39,3 μ l 10x Pfu PCR buffer 1x with Magnesiumsulfat (MgSO₄) (Thermo Scientific), 5,0 μ l dNTP Mix, 10 mM each (Thermo Scientific) und 2,0 μ l Pfu DNA Polymerase 2,5 u/ μ l (Thermo Scientific) multipliziert mit der Probenanzahl plus 1 (n+1) hergestellt. Der PCR-Mix bestand aus 2,5 μ l der auf 80 ng/ μ l eingestellten DNA-Verdünnung, 45,5 μ l des Master-Mix sowie

jeweils 1 μ l des Primer forward und 1 μ l des Primer reverse. Die Primer-Paare wurden probenspezifisch vergeben und als „Barcode“ eingesetzt, sodass nach der Sequenzierung eine Rückverfolgung auf die entsprechende Probe möglich war. Die Amplifikation erfolgte im ThermoCycler (peQLAB Biotechnologie) mit folgendem Programm:

1. 94 °C 3 min
2. 32 Zyklen
 - a. Denaturierung: 94 °C 45 s
 - b. Annealing: 52 °C 60 s
 - c. Elongation: 72 °C 90 s
3. 72 °C 10 min

Eine Kontrolle der erfolgreichen PCR wurde durch Auftragen auf ein Agarose-Gel 2 %, bestehend aus 2 g Agarose (Bio&Sell) in 100 ml 1x TAE-Puffer (verdünnt aus 50x TAE Puffer: 242 g Tris-base, 57 ml Eisessig, 0,5 M EDTA, ad 1000 ml Aqua destillata), und anschließender Gelelektrophorese für ca. 1 h bei 100-130 V erbracht. Die Detektion erfolgte durch Mischung von 5 μ l der PCR-Produkte mit 1 μ l DNA-Dye Non Tox (AppliChem) unter der UV-Kamera (peQLAB Biotechnologie GmbH). Als Standard wurde der Gene Ruler™100 bp Ladder (Fermentas) mitlaufen gelassen.

3.3.2.8 Aufreinigung DNA aus PCR-Mix

Die Aufreinigung der DNA aus dem PCR-Mix wurde mithilfe des QIAquick® PCR Purification Kit von QIAGEN (enthält die Puffer PB und EB sowie die collection tubes und Silicasäulen) durchgeführt. Hierfür wurden 200 μ l PB zum PCR-Produkt hinzugefügt, sodass sich eine gelbe Farbe zeigte. Die Mischung wurde gänzlich auf eine Silicasäule überführt und 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach Wechsel des collection tubes wurden 750 μ l PE auf die Silicasäule pipettiert und anschließend wieder 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach erneutem Wechsel des collection tubes wurde nochmals 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert, das collection tube verworfen und die Silicasäule in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zugabe von 50 μ l EB und Zentrifugation für 1 Minute bei 13.000 rpm wurde die Säule verworfen und das aufgereinigte Produkt bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

3.3.2.9 Deep Sequencing (Next Generation Sequencing)

1. Sequencing: Nach Konzentrations-Vermessung der PCR-Produkte wurden kumulativ 2000 ng der DNA aus den Proben für die Sequenzierung eingesetzt und zusammen in ein 2,0 ml SafeSeal Eppendorf-Gefäß pipettiert. Die eingesetzte Masse pro Probe wurde durch die Division der Gesamtmasse der zu analysierenden DNA, also 2000 ng, durch die Anzahl der zu sequenzierenden Proben bestimmt. Die Sequenzierung der V6 sowie V4 Region des bakteriellen 16S rRNA Gens wurde durch die DKFZ-Genomics and Proteomics Core Facility (TP3, DKFZ, Heidelberg) in einem Illumina MiSeq System (Illumina) durchgeführt.

2. Sequencing: Für das zweite Sequencing wurde das MVZ Labor Dr. Limbach & Kollegen GbR (Heidelberg) beauftragt. Die Sequenzierung wurde für die V3/4 Region in einem Illumina MiSeq System (Illumina) durchgeführt.

3.3.2.10 Auswertung des Sequencings

1. Sequencing (IL-1 β knockout Mäuse und Wildtyp Mäuse): Für die Zuordnung der Sequenzen in der Datenanalyse des Next Generation Sequencings wurde das HITS (Heidelberger Institut für Theoretische Studien) beauftragt. Hierbei wurde eine OTU (Operational Taxonomic Unit) basierte Auswertung verwendet. Außerdem wurde die Datenanalyse des Next Generation Sequencings mit Hilfe der R Software (Version 3.6.3) erarbeitet. Hierbei wurde dada2 für eine RSV (Ribosomal Sequence Variance)

basierte Auswertung verwendet. Die Klassifizierung der Sequenzen wurde unter Anwendung der Silva Database (Version 132) als Datenbank ermittelt. Berechnet wurde die α -Diversität nach Shannon, die Richness, die Evenness und die Dominanz. Die statistische Signifikanz wurde hierbei durch Anwendung des Wilcoxon sum rank Test errechnet. Die β -Diversität Varianz wurde durch Auswertung der principal coordinate analysis (PCoA) und Ermittlung der Signifikanz durch PERMANOVA (Permutational multivariate analysis of variance) basierend auf dem Moirisita-Horn Similaritäts Index analysiert. Außerdem wurden die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf mehreren Stufen der hierarchischen Rangebene der Taxonomie untersucht. Die Auswertung mithilfe der Software R wurde durch Dr. Sébastien Boutin, Heidelberg, durchgeführt.

2. Sequencing (IL-1 β knockout Mäuse und littermate Wildtyp Mäuse): Die Datenanalyse des Next Generation Sequencings wurde mit Hilfe der CLC Biomedical Workbench (V4.0) durchgeführt. Hierbei wurde eine OTU (Operational Taxonomic Unit) basierte Auswertung verwendet. Die Klassifizierung der Sequenzen wurde unter Anwendung von Greengenes (Version 13) als Datenbank ermittelt. Berechnet wurde die α -Diversität nach Shannon, die Richness, die Evenness und die Dominanz. Die statistische Signifikanz wurde hierbei durch Anwendung des Wilcoxon sum rank Test errechnet. Außerdem wurde die Datenanalyse des Next Generation Sequencings mit Hilfe der R Software (Version 3.6.3) erarbeitet. Hierbei wurde dada2 für eine RSV (Ribosomal Sequence Variance) basierte Auswertung verwendet. Die Klassifizierung der Sequenzen wurde unter Anwendung der Silva Database (Version 132) als Datenbank ermittelt. Berechnet wurde die α -Diversität nach Shannon, die Richness, die Evenness und die Dominanz. Des Weiteren wurde die β -Diversität Varianz durch Auswertung der principal coordinate analysis (PCoA) und Ermittlung der Signifikanz durch PERMANOVA (Permutational multivariate analysis of variance) basierend auf dem Moirisita-Horn Similaritäts Index analysiert. Außerdem wurden die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf mehreren Stufen der hierarchischen Rangebene der Taxonomie untersucht. Die Auswertung mithilfe der Software R wurde durch Dr. Sébastien Boutin, Heidelberg, durchgeführt.

3.3.2.11 DNA-Isolation aus Darm-Mukosa

Die DNA-Isolation aus Darmgewebe wurde mithilfe des „High Pure RNA Isolation Kits“ (Roche) durchgeführt. Dieses Kit enthält: Lysepuffer, Silicasäulen, collection tubes, Wash Buffer 1, Wash Buffer 2 und Elutions Buffer. Darm-Mukosa-Scrapings wurden auf Eis aufgetaut. 600,4 μ l des Lysepuffers, bestehend aus 400 μ l Lysepuffer, 0,4 β -Mercaptoethanol (Carl Roth) und 200 μ l PBS (anprotec), wurden jeweils dem Gewebe zugegeben und zuerst mit einer Spritze mit 27 G Kanüle (Becton Dickinson), gefolgt von einer Spritze mit 24 G Kanüle (Becton Dickinson) homogenisiert. Nach einer Wartezeit von 30 Minuten auf Eis wurden die Proben gevortext und auf die im Kit enthaltenen Silicasäulen überführt. Die Silicasäulen wurden bei 13.000 rpm für 1 Minute zentrifugiert und das collection tube ausgekippt. Danach wurden jeweils 500 μ l Wash Buffer 1 zugegeben und 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das collection tube wurde ausgekippt. Von Wash Buffer 2 wurden jeweils 500 μ l auf die Silicasäule gegeben und 2 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das collection tube wurde gewechselt und die Silicasäule nochmals 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Silicasäule wurde auf ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß gesetzt und 30 μ l Elutions Buffer mittig auf die Säule gegeben. Nach 1 Minute Wartezeit wurden die Proben 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert, die Silicasäule verworfen und die erhaltene DNA bei -20 °C gelagert.

3.3.2.12 DNA-Konzentrations-Einstellung zur Vorbereitung auf die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die Konzentration der aus Darm-Mukosa oder Fäzes isolierten DNA wurde am Nano Drop vermessen und mit H₂O (B.Braun) auf eine Konzentration von 80 ng/ μ l eingestellt.

3.3.2.13 mRNA-Isolation aus Darm-Mukosa-Scrapings

Die mRNA-Isolation aus Darmgewebe wurde mithilfe des „High Pure RNA Isolation Kits“ (Roche) durchgeführt. Dieses Kit enthält Lysepuffer, Silicasäulen, collection tubes, DNase, DNase Incubation Buffer, Wash Buffer 1, Wash Buffer 2 und Elutions Buffer. Darm-Mukosa-Scrapings wurden auf Eis aufgetaut. 600,4 μ l des Lysepuffers, bestehend aus 400 μ l Lysepuffer, 0,4 β -Mercaptoethanol (Carl Roth) und 200 μ l PBS (anprotec), wurden jeweils dem Gewebe zugegeben und zuerst mit einer Spritze mit 27 G Kanüle (Becton Dickinson), gefolgt von einer Spritze mit 24 G Kanüle (Becton Dickinson), homogenisiert. Nach einer Wartezeit von 30 Minuten auf Eis wurden die Proben gevortext und auf die im Kit enthaltenen Silicasäulen überführt. Die Silicasäulen wurden bei 13.000 rpm für 1 Minute zentrifugiert und das collection tube ausgekippt. Mittig auf die Silicasäule wurde jeweils 100 μ l DNase-Lösung, bestehend aus 90 μ l DNase Incubation Buffer und 10 μ l DNase, gegeben. Die Proben wurden 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurden jeweils 500 μ l Wash Buffer 1 zugegeben und 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das collection tube wurde ausgekippt. Von Wash Buffer 2 wurden jeweils 500 μ l auf die Silicasäule gegeben und 2 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das collection tube wurde gewechselt und die Silicasäule nochmals 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Silicasäule wurde auf ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß gesetzt und 30 μ l Elutions Buffer mittig auf die Säule gegeben. Nach 1 Minute Wartezeit wurden die Proben 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert, die Silicasäule verworfen und die erhaltene mRNA bei -80 °C gelagert.

3.3.2.14 Gene-Array mit RNA aus Darm-Mukosa

Die isolierte RNA aus den Mukosa-Scrapings der Mäuse wurde zur Durchführung eines Microarrays an die DKFZ-Genomics and Proteomics Core Facility (TP3, DKFZ, Heidelberg) abgegeben. Hierfür wurden jeweils 500 ng der aufgereinigten RNA für den Gene-Array verwendet. Die quantitative Normalisierung sowie die statistische Auswertung (Benjamini-Hochberg) wurde unter Benutzung der Chipster Analysis Software durch die DKFZ-Genomics and Proteomics Core Facility (TP3, DKFZ, Heidelberg) durchgeführt. Nur Daten mit einem p-Wert < 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen und nur bei einer relativen Änderung von ≥ 2 und $\leq 0,5$ wurden diese weiter analysiert.

3.3.2.15 mRNA-Konzentrations-Einstellung zur Vorbereitung auf die cDNA-Synthese

Die Konzentration der aus Darm-Mukosa isolierten mRNA wurde am Nano Drop (peQLAB Biotechnologie) vermessen und mit H₂O (B.Braun) auf eine Konzentration von 50 ng/ μ l eingestellt.

3.3.2.16 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese aus mRNA wurde mithilfe des „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ von Applied Biosystem S durchgeführt. Dieses Kit enthält: 10x RT Puffer, 25x dNTP-Mix, 10x Random Primers, RNase-Inhibitor und Multiscribe Reverse Transcriptase. mRNA-Proben wurden auf Eis aufgetaut. Es wurde ein Master Mix aus jeweils 2,0 μ l 10xRT-Puffer, 0,8 μ l 25x dNTP-Mix, 2,0 μ l 10x RT Random Primers, 1,0 μ l RNase-Inhibitor und 3,2 μ l RNase-freies H₂O (B.Braun) multipliziert mit der Probenanzahl plus 1 (n+1) hergestellt. Jeweils 5 μ l mRNA aus zwei verschiedenen Proben wurde zusammen in ein PCR-Tube gegeben und mit 10 μ l des vorläufigen Master Mix versetzt. Diese Probe entspricht der noRT-Kontrolle. Es wurden daraufhin noch 1,0 μ l Multiscribe Reverse Transcriptase multipliziert mit der Probenanzahl plus 1 (n+1) dem Master Mix hinzugegeben. Jeweils 10 μ l mRNA wurden mit 10 μ l des Master Mix in einem PCR-Tube vermischt. Die cDNA-Synthese erfolgte im ThermoCycler mit folgendem Programm:

1. 110 °C hochheizen
2. 25 °C 10 min
3. 37 °C 2 h
4. 85 °C 5 min

Die Proben wurden mit 60 μ l H₂O (B.Braun) verdünnt und bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

3.3.2.17 Quantitative real time – Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) mit cDNA oder verdünnter DNA

Pro Well wurden 2,5 μ l cDNA oder DNA als Template zusammen mit 9,875 μ l H₂O (B.Braun), jeweils 0,0625 μ l des Primer forwards sowie 0,0625 μ l des Primer reverse sowie 12,5 μ l des TaqMan-real-time PCR Mix (AbGene), bestehend aus Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (applied biosystems) und 2mM MgCl₂ (Thermo Scientific), gemäß der Angaben des Herstellers eingesetzt. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen für jede Probe durchgeführt. Die quantitative real-time PCR wurde am TaqMan ABI Prism[®] 7700 (Applied Biosystems) mit folgendem Programm gefahren:

1. 95 °C 15 min
2. 40 Zyklen:
 - a. 95 °C 15 s
 - b. 60 °C 1 min

Die Quantifizierung der DNA bzw. cDNA Konzentration wurde mit Hilfe des Platin SybrGreen Systems (Invitrogen) durchgeführt. Die quantitativen Ergebnisse der PCR der cDNA wurden relativ zum Housekeeping-Gen β -Aktin durchgeführt ($1/2^{(Ct[\text{Targetgen}] - Ct[\beta\text{-Aktin}])}$) und die DNA-Ergebnisse relativ zur eubakteriellen 16S rRNA Konzentration ($1/2^{(Ct[\text{Targetbakterium}] - Ct[16S\text{ rRNA}])}$).

3.3.2.18 Erzeugung von Gewebeschnitten aus Darm-Gewebe

Die Darmabschnitte wurden zum Einlegen in Paraffin sowie zur Durchführung der Transversalschnitte in die Arbeitsgruppe von Dr. med. Felix Lasitschka gegeben.

3.3.2.19 Gram-Färbung

Zur Durchführung einer Gram-Färbung wurden Gewebeschnitte zuerst für 1 Minute in Kristallviolett-Lösung (BBL Gram Crystal Violet; Becton Dickinson GmbH) und danach für 1 Minute in Lugolsche Lösung (BBL Gram Iodine; Becton Dickinson GmbH) getaucht. Anschließend wurden die Objektträger 5 Sekunden in Entfärber (BBL Gram Decolonizer; Becton Dickinson GmbH) und danach für 1 Minute in Safranin (BBL Gram Safranin; Becton Dickinson GmbH) gegeben. Die Auswertung erfolgte über das Licht-Mikroskop (Leica Microsystems GmbH).

3.3.2.20 Methoden-Etablierung Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) mit anschließender Immunfluoreszenz

Zur Etablierung der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung der Colonschnitte wurden verschiedene Verweildauern im Fixations-Reagenz, verschiedene Schnittführungen, verschiedene Entparaffinierungs-Methoden, verschiedene Pufferlösungen, verschiedene Verweildauern in Pufferlösungen sowie verschiedene Abschnitte des Colons auf ihre Eignung verglichen.

3.3.2.21 Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) sowie Immunfluoreszenz von Gewebeschnitten des Darms von Mäusen

Die Gewebeschnitte des proximalen Colons wurden zum Einlegen in Paraffin sowie zur Durchführung der Transversalschnitte in die Pathologie zur Arbeitsgruppe von Dr. med. Felix Lasitschka gegeben. Zur Entparaffinierung der Gewebeschnitte auf den Objektträgern wurden die Schnitte 10 Minuten in der Heizkammer (Hybridisierungs-Kammer) (Stratagene) bei 60 °C erhitzt. Anschließend wurden die

Schnitte 2x 10 Minuten in Roticlear (Carl Roth GmbH + Co. KG) eingelegt und dazwischen das Medium gewechselt. Danach wurde 5 Minuten mit Ethanol 100 % (Sigma Aldrich) bei Raumtemperatur und 5 Minuten mit Ethanol 96 % (Sigma Aldrich) bei Raumtemperatur entparaffiniert. Die Schnitte wurden luftgetrocknet.

Zur Durchführung der FISH-Färbung wurden die Gewebeschnitte mit 250 μ g pro FISH-Sonde in 50 μ l Hybridisierungspuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,9 M NaCl, 0,1 % SDS) bedeckt und über Nacht bei 50 °C in einer Feuchtkammer im Heizofen inkubiert. Die Schnitte wurden kurz mit auf 50 °C vorgewärmten FISH-Waschpuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,9 M NaCl) abgespült und anschließend 20 Minuten in FISH-Waschpuffer bei 50 °C gewaschen.

Für die anschließende Immunfluoreszenz wurden die Objektträger 30 Minuten bei 4 °C in FISH-Blockpuffer (5 % FCS in PBS) gelagert. 50 μ l des 1:100 in PBS (anprotec) verdünnten Erst-Antikörpers anti-Villin (abcam) oder des 1:200 in PBS (anprotec) verdünnten anti-mouse-Muc2 (abcam) wurden auf den Gewebeschnitt gegeben und 3 Stunden bei 4 °C inkubiert. Nach 5 Minuten Waschen in PBS (anprotec) bei 4 °C wurde der 2. Antikörper anti-mouse IgG Alexa Fluor[®] 488 (abcam) 1:200 in 50 μ l PBS (anprotec) auf den Gewebeschnitt aufgetragen und 1 Stunde bei 4 °C inkubiert. Nach einem wiederholten Waschschrift für 5 Minuten in PBS (anprotec) wurde eine Gegenfärbung mit Bisbenzimid (Hoechst 33258; Sigma-Aldrich) 1:500 in 50 μ l PBS (anprotec) für 20 Minuten bei 4 °C durchgeführt. Nach erneutem 5-minütigem Waschen in PBS (anprotec) und anschließendem Lufttrocknen wurden die Schnitte mit Dako Fluorescence Mounting Medium (Dako GmbH) und einem Deckglas bedeckt und bei 4 °C zum Trocknen gelegt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Konfokal-Mikroskops (Leica Microsystems GmbH).

3.3.2.22 Protein-Isolation aus Darm-Mukosa

Die Mukosa-Scrapings des Maus-Colons wurden in 70 μ l RIPA-Puffer (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X100, 1 % Deoxycholat, 1 mM Natrium Fluorid, 25 mM Tris-base) plus Inhibitoren-Mix (Aprotonin, Leupeptin, Pepstatin) (cOmplete Tablets, Mini EASYpack; Roche) resuspendiert, gevortext und über Nacht bei -20 °C eingefroren. Nach erneutem Auftauen und Vortexen erfolgte ein Abzentrifugieren für 15 Minuten bei 14.000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Gefäß überführt, 10 μ l für die Proteinbestimmung mittels Pierce-Assay entnommen und der Rest bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

3.3.2.23 Pierce-Assay zur Bestimmung der Protein-Konzentration aus Lysaten der Darm-Mukosa

Jeweils 5 μ l der isolierten Proteine wurden mit 20 μ l H₂O (B.Braun) verdünnt und in eine 96 well Platte gegeben. Pro Probe wurden jeweils 180 μ l Pierce-Mix (Pierce BCA Protein Assay, Thermo Scientific) zugegeben und die Platte 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Es wurde eine Doppelbestimmung pro Probe durchgeführt. Die Messung erfolgte am Tecan (Tecan) bei 550 nm. Als Referenz wurde eine Standardverdünnungsreihe mit BSA (AppliChem) in RIPA-Puffer (150 mM Natriumchlorid [NaCl], 1 mM EDTA, 1 % Triton X100, 1 % Deoxycholat, 1 mM Natrium Fluorid, 25 mM Tris-base) und H₂O (B.Braun) verwendet.

Um sie auf die Gelelektrophorese mit anschließendem Western-Blot vorzubereiten, wurden die Proben im Anschluss anhand der errechneten Protein-Konzentration auf eine einheitliche Konzentration eingestellt.

3.3.2.24 Acrylamid-Gelelektrophorese der Proteine aus Darm-Mukosa

Drei Teile der Proben wurden mit einem Teil Natriumdodecylsulfat (SDS) (4fach) (AppliChem) verdünnt und 7 Minuten bei 95 °C erhitzt. Die Proben wurden auf ein Acrylamid-Gel 12 % (1,6 ml Aqua destillata, 2,4 ml Acrylamid (30 %), 2 ml Trenngelpuffer, 5 μ l TEMED, 20 μ l 10 % APS) ins Sammelgel (720 μ l Aqua

destillata, 270 μ l Acrylamid (30%), 1 ml Sammelgelpuffer, 2 μ l TEMED, 10 μ l 10 % APS) aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Als Standard wurde eine Protein Ladder (Fermentas) verwendet. Anschließend wurde mit dem Gel ein Western-Blot durchgeführt.

3.3.2.25 Western-Blot mit Proteinen aus Darm-Mukosa

Der Western-Blot wurde mit der Wet-Blot Methode bzw. mit der Semi-Dry Methode durchgeführt. Hierfür wurde eine Blotting-Membran aus Nitrocellulose (Sigma Aldrich) auf das Gel gelegt und dann im jeweiligen Puffer (Semi Dry [2,93 g Glycin; 5,81 g Tris-base; 0,37 g SDS; 200 ml Methanol; ad 1000 ml Aqua destillata] oder Wet Blot Puffer[25 mM Tris-base; 192 mM Glycin; 10 % Methanol; ad 1000 ml Aqua destillata]) mittels Elektrophorese die Proteine aus dem Gel auf die Membran übertragen. Für einen Wet Blot wurde eine Blot Dauer von 1,5 Stunden und für die Semi Dry Methode eine Blot Dauer von 1 Stunde angesetzt.

Die Membran wurde anschließend in Western Blot Block-Puffer (3% BSA in TBST) eine Stunde geblockt. Der Erst-Antikörper wurde 1:1000 in 20 ml BSA 3 % (AppliChem) in TBST (0,05 % Tween-20 in 1x TBS) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST für je 5 Minuten wurde der Zweit-Antikörper 1:2000 verdünnt in BSA 3 % in TBST für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert; nach anschließendem dreimaligem Waschen für je 5 Minuten in TBST konnte die Detektion mit Hilfe des TMB Substrate Reagent Set (Becton Dickinson GmbH) durchgeführt werden.

3.3.2.26 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) - Analyse mit Antikörpern aus Serum gegen Bakterien

Auf Blutagar-Platten (Becton Dickinson) angezüchtete Bakterien wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß mit PBS (anprotec) resuspendiert und auf 0,5 McFarland (McF) verdünnt. Jeweils 100 μ l dieser Suspension wurden in ein FACS-Röhrchen mit 500 μ l PBS (anprotec) überführt. Die FACS-Röhrchen wurden 8 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Bakterien zweimal mit 500 μ l PBS (anprotec) sowie 8 Minuten Zentrifugation bei 1300 rpm und anschließendem Verwerfen des Überstands gewaschen. Es wurden drei Bedingungen pro Bakterium angewendet:

Als erste Negativkontrolle wurde die Bakteriensuspension noch zweimal mit 500 μ l PBS (anprotec) sowie 8 Minuten Zentrifugation bei 1300 rpm und anschließendem Verwerfen des Überstandes gewaschen. Es fand hierbei weder eine Behandlung mit einem Erst-Antikörper noch mit einem Zweit-Antikörper statt. Die gewaschenen Bakterien wurden am Ende in 250 μ l PBS (anprotec) resuspendiert.

Als zweite Negativkontrolle wurde die Bakteriensuspension noch einmal mit 500 μ l PBS (anprotec) sowie 8 Minuten Zentrifugation bei 1300 rpm und anschließendem Verwerfen des Überstandes gewaschen. Die Bakterien wurden mit dem Zweit-Antikörper anti-mouse IgG PE (Santa Cruz Biotechnology) in einer Verdünnung von 1:100 in PBS (anprotec) für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. 500 μ l PBS (anprotec) wurden hinzugegeben und 8 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und dieser Waschschrift nochmals wiederholt. Die Bakterien wurden in 250 μ l PBS (anprotec) resuspendiert.

Als letzte Bedingung wurde die Bakteriensuspension mit Serum von IL-1 β -KO-Mäusen und littermate Wildtyp Kontrollen als Erst-Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 für 1 Stunde bei 4 °C inkubiert. Danach wurden 500 μ l PBS (anprotec) zugegeben und 8 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt. Danach wurden die Bakterien mit dem Zweit-Antikörper anti-mouse IgG PE (Santa Cruz Biotechnology) in einer Verdünnung von 1:100 in PBS (anprotec) für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. 500 μ l PBS (anprotec) wurden hinzugegeben und 8 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und dieser Waschschrift nochmals wiederholt. Die Bakterien wurden in 250 μ l PBS (anprotec) resuspendiert.

Die Vermessung erfolgte über den FACSCanto (BD Biosciences).

3.3.2.27 Zellkultur

Die Zelllinie HT29/18-N2 wurde durch die Arbeitsgruppe von Marshall H. Montrose, University of Cincinnati zur Verfügung gestellt. HT29/18-N2 Zellen wurden zur Differenzierung zu Goblet-Zellen in Zellkulturmedium ohne Glucose (DMEM „no glucose“, Life Technologies) bei 37 °C gezüchtet. Als Ersatz wurde dem Medium 5 mM Galactose (Sigma Aldrich) hinzugefügt. Der Mediumwechsel der Zellkulturflaschen erfolgte zweimal wöchentlich und die Zellen wurden einmal wöchentlich 1:10 nach einer Behandlung mit 0,005 % Trypsin und 0,05 mM EDTA (anprotec) in PBS (anprotec) gesplittet.

CMT93 Zellen wurden in einem Zellkulturmedium bestehend aus Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM, Life Technologies) mit 10 % FCS (Gibco) bei 37 °C angezüchtet. Der Mediumwechsel der Zellkulturflaschen erfolgte dreimal wöchentlich und die Zellen wurden zweimal wöchentlich 1:4 nach einer Behandlung mit 0,005 % Trypsin und 0,05 mM EDTA (anprotec) in PBS (anprotec) gesplittet.

Colon-26 Zellen wurden in einem Zellkulturmedium bestehend aus RPMI 1640 (anprotec) mit 10% FCS (Gibco) und 2mM L-Glutamin (Sigma Aldrich) bei 37 °C angezüchtet. Der Mediumwechsel der Zellkulturflaschen erfolgte dreimal wöchentlich und die Zellen wurden zweimal wöchentlich 1:4 nach einer Behandlung mit 0,005 % Trypsin und 0,05 mM EDTA (anprotec) in PBS (anprotec) gesplittet.

3.3.2.28 Stimulation der HT29/18-N2-Zellen mit IL-1 β

HT29/18-N2 Zellen wurden in Zellkulturschalen ausgebracht und mit humanem IL-1 β (PeproTech) in einer Konzentration von 100 ng/ μ l stimuliert. Proben wurden zu den Zeitpunkten 0, 8, 16 und 24 Stunden entnommen.

3.3.2.29 Stimulation der CMT93- und Colon-26-Zellen mit IL-1 β

CMT93 Zellen und Colon-26 wurden in Zellkulturschalen ausgebracht und mit murinem IL-1 β (PeproTech) in einer Konzentration von 50 ng/ μ l stimuliert. Proben wurden zu den Zeitpunkten 0, 4, 8 und 24 Stunden entnommen.

3.3.2.30 Lyse der Zellen aus den Zelllinien

Die Zellen wurden mit Hilfe des „High Pure RNA Isolation Kits“ (Roche) lysiert und eine mRNA-Isolation durchgeführt. Im Kit enthalten: Lyspuffer, Silicasäulen, collection tubes, DNase, DNase Incubation Buffer, Wash Buffer 1, Wash Buffer 2 und Elutions Buffer. Die RNA-Isolation wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt und die erhaltene mRNA bei -80 °C gelagert.

3.3.2.31 Wachstumskinetik von Bakterien unter Zugabe von rekombinantem Angiogenin 4 (Ang4)

Die Bakterien *Akkermansia muciniphila*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* sowie *Bacteroides thetaiotaomicron* wurden in ihrer logarithmischen Phase mit 4,5 μ l/ml rekombinantem murinen Angiogenin 4 (Cusabio, CSB-EP661010MO) in Leber/Thio Medium (SIFIN) bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Das Wachstum der Bakterien wurde mit und ohne Angiogenin 4 durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD600) am Tecan (Tecan) bestimmt. Proben wurden nach 0, 4, 8, 16 und 24 Stunden genommen. Des Weiteren wurde eine Negativprobe ohne Zugabe von Bakterien mit und ohne Zusatz des rekombinanten Proteins vermessen.

Die Testung auf Signifikanz wurde mittels Two-Way ANOVA (Analysis of Variance) mit anschließendem Bonferroni post-Test mit Prism – GraphPad (Version 5.0) durchgeführt.

3.3.2.32 Ethikvotum und Projektablauf der Stuhlprobensammlung

Für die Sammlung von Patientenstuhlproben wurde das Projekt „StImAn - Untersuchung des Einflusses von immunsuppressiven Substanzen auf die Bakterienzusammensetzung im Darm“ unter dem Zeichen S-520/2014 bei der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Heidelberg angezeigt. Es liegt ein positives Ethikvotum vor. Hierbei handelt es sich um eine multizentrische, prospektive, unkontrollierte, deskriptive, nicht-interventionelle Registerstudie. Die Studie wurde an folgenden Zentren durchgeführt:

- Universitätsklinikum Heidelberg, Innere Medizin V - Hämatologie, Onkologie, Rheumatologie
- Kinderklinik Garmisch-Partenkirchen gGmbH, Deutsches Zentrum für Kinder- und Jugendrheumatologie, Sozialpädiatrisches Zentrum
- AcuraKliniken Baden-Baden

Es wurden einwilligungsfähige erwachsene Patienten, Jugendliche im Alter von 13 bis 17 Jahren sowie Kinder unter 13 Jahren rekrutiert, die eine Therapie mit Anakinra (Kineret[®], Swedish Orphan Biovitrum) oder Canakinumab (Ilaris[®], Novartis) begannen. Die Patienten gaben jeweils vor Beginn der Therapie sowie 6 Wochen nach Therapiestart eine Stuhlprobe ab. Alle Patienten und gegebenenfalls die Erziehungsberechtigten wurden vor Aufnahme in die Studie aufgeklärt und es liegt von allen rekrutierten Patienten bzw. Erziehungsberechtigten eine unterzeichnete Einverständniserklärung vor (Einwilligungserklärungen, Fragebogen und Patienteninformationen sind in Appendix 1-7 zu finden).

Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert. Die DNA-Aufarbeitung erfolgte analog der Aufarbeitung der Fäzes-Proben der Mäuse (vgl. 3.3.2.5). Die extrahierte DNA wurde nach Vermessung am NanoDrop (peQLAB Biotechnologie) auf eine Konzentration von 80 ng/ μ l eingestellt und danach eine qRT-PCR nach SYBR Green Protocol analog der Analyse der DNA aus dem Fäzes der Mäuse (vgl. 3.3.2.17) durchgeführt.

3.3.2.33 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden in Mittelwert plus Standardabweichung angegeben. Für die Ermittlung des Signifikanzlevels wurde, wenn nicht in den einzelnen Methodenteilen separat ausgewiesen, ein 2-seitiger Student's T-Test mit Prism – GraphPad (Version 5.0) durchgeführt. Alle Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden Werte mit $p < 0,05$ gewertet, wobei hier in statistisch signifikant (*, $p < 0,05$), statistisch sehr signifikant (**, $p < 0,01$) und statistisch hoch signifikant (***, $p < 0,001$) unterschieden wurde.

3.4 Ergebnisse

3.4.1 Next Generation Sequencing von IL-1 β knockout Mäusen und Wildtyp Kontrollen

IL-1 β ist ein proinflammatorisches Zytokin, das bei Infektionen, Entzündungsprozessen oder Gewebsverletzungen eine wichtige Rolle spielt (Chan und Schroder 2020; Mantovani et al. 2019). Durch seine Beeinflussung der Immunantwort des Darms stellt sich die Frage, ob IL-1 β dadurch auch eine Veränderung der Zusammensetzung der Mikrobiota im Darm hervorruft.

Bereits für andere Mitglieder der Interleukin-1-Familie wie beispielsweise Interleukin-36 (IL-36) konnte von Giannoudaki et al. eine Einflussnahme auf die Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms gezeigt werden (Giannoudaki et al. 2019).

Um zu analysieren, was für eine Auswirkung das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit von IL-1 β für die Zusammensetzung des Darmmikrobioms hat, wurde ein Next Generation Sequencing der DNA aus dem Colon-Fäzes von sechs IL-1 β knockout Mäusen sowie sieben Wildtyp Kontrollen in Auftrag gegeben. Die Auswertung dieses Sequencings zeigte eine höhere α -Diversität nach Shannon sowie eine höhere Evenness im Mikrobiom der IL-1 β knockout Tiere, aber auch eine Änderung in der Struktur der Mikrobiota (Daten nicht gezeigt, da keine littermate Kontrollen in diesem Versuch verwendet wurden).

In der Auswertung der einzelnen Sequenzen zeigte sich keine statistisch signifikante Verschiebung in den häufig vorkommenden Familien (s. Abbildung 2).

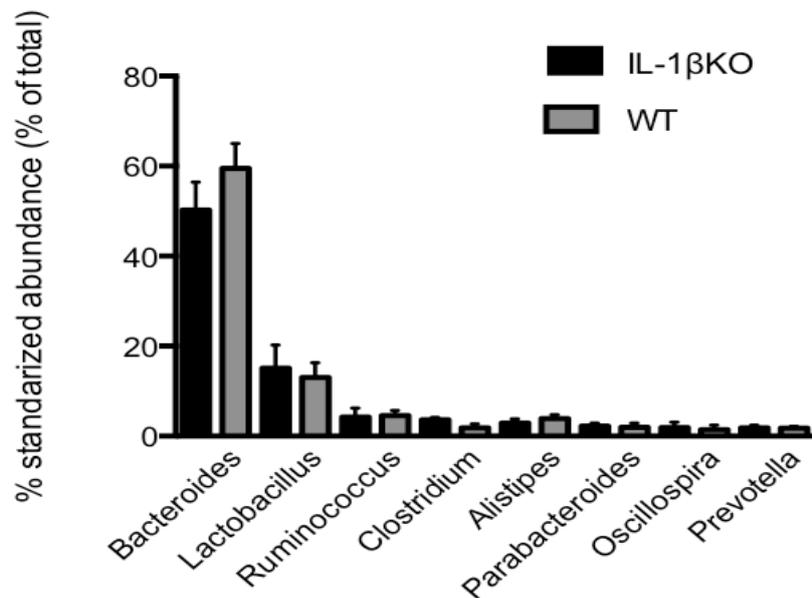


Abbildung 2: Im Next Generation Sequencing zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Häufigkeit stark vertretener Familien. DNA aus Fäzes von sechs IL-1 β knockout Mäusen sowie sieben Wildtyp Kontrollen wurde mittels Next Generation Sequencing auf Unterschiede im Mikrobiom analysiert. Die Zuordnung der Sequenzen wurde durch das HITS (Heidelberger Institut für Klinische Studien) durchgeführt. Der Mittelwert sowie die Standardabweichung wurden ermittelt und das Signifikanzlevel mittels Student's T-Test errechnet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. **IL-1 β** = Interleukin-1 β ; **KO** = knockout; **WT** = Wildtyp

Jedoch für einige wenige Familien wie den Verrucomicrobiaceae (s. Abbildung 3) und den Prevotellaceae ließ sich ein Unterschied feststellen, der sich bei diesen beiden Familien in einem statistisch signifikant höheren Vorkommen bei den IL-1 β knockout Tieren widerspiegelte. Ein statistisch signifikant geringeres Vorkommen verzeichnete ein Vertreter der Familie der Lachnospiraceae sowie die Familie der Muribaculaceae, früher S24-7 genannt. Diese Familie ist ein typischer, hoch prävalenter Vertreter des Mikrobioms der Maus, jedoch kein typischer Teil des humanen Darm-Mikrobioms. Außerdem sind die Daten über die physiologische Relevanz dieser Familie begrenzt, weshalb sich im weiteren Verlauf auf die auch im humanen System vertretenen Familien fokussiert wurde (Lagkouvardos et al. 2019). Die Vertreter der Familie der Prevotellaceae sowie Lachnospiraceae konnten leider aufgrund von fehlenden Einträgen in den verwendeten Datenbanken nicht bis auf Spezieslevel analysiert werden.

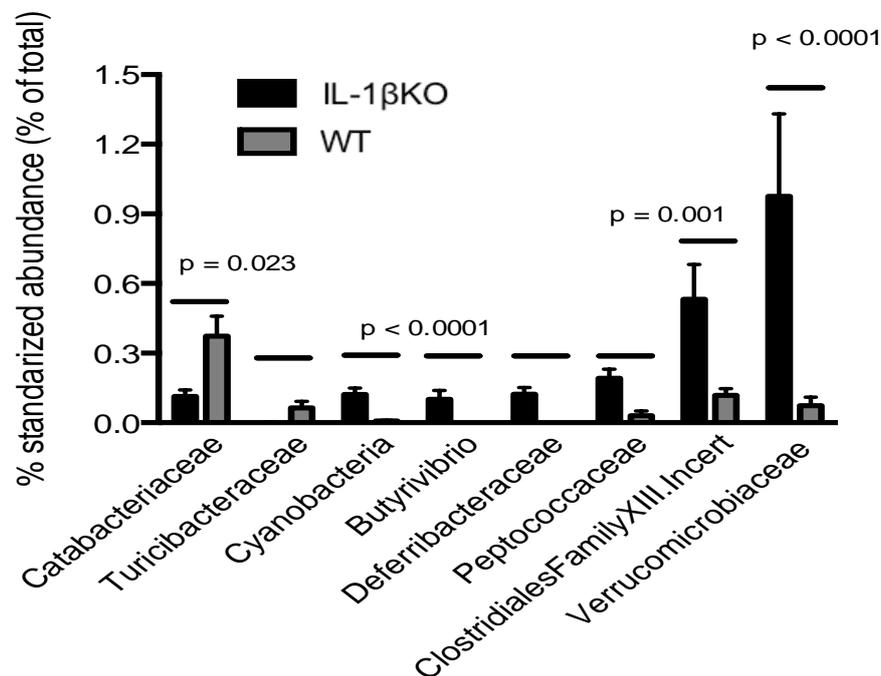


Abbildung 3: Für einige seltener vorkommende Familien zeigte sich in der Häufigkeit ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen IL-1 β knockout Mäusen und Wildtyp Kontrollen. DNA aus Fäzes von sechs IL-1 β knockout Mäusen sowie sieben Wildtyp Kontrollen wurde mittels Next Generation Sequencing auf Unterschiede im Mikrobiom analysiert. Die Zuordnung der Sequenzen wurde durch das HITS (Heidelberger Institut für Theoretische Studien) durchgeführt. Der Mittelwert sowie die Standardabweichung wurden ermittelt und das Signifikanzlevel mittels Student's T-Test errechnet. Als statistisch signifikant wurde ein $p < 0,05$ gewertet. IL-1 β = Interleukin-1 β ; KO = knockout; WT = Wildtyp

Besonders das Bakterium *Akkermansia muciniphila* zeigte ein statistisch hoch signifikant erhöhtes Vorkommen in den IL-1 β knockout Tieren im Vergleich zu ihren Wildtyp Kontrollen (s. Abbildung 4).

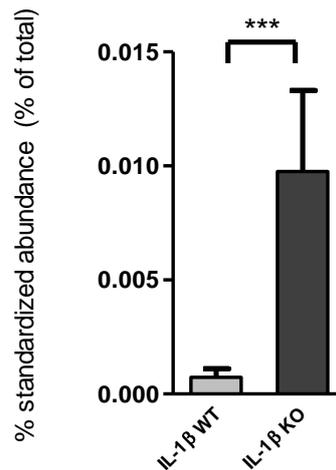


Abbildung 4: Für *Akkermansia muciniphila* zeigte sich ein statistisch hoch signifikanter Unterschied zwischen IL-1 β knockout Mäusen und Wildtyp Kontrollen. DNA aus Fäzes von sechs IL-1 β knockout Mäusen sowie sieben Wildtyp Kontrollen wurde mittels Next Generation Sequencing auf Unterschiede im Mikrobiom analysiert. Die Zuordnung der Sequenzen wurde durch das HITS (Heidelberger Institut für Theoretische Studien) durchgeführt. Der Mittelwert sowie die Standardabweichung wurden ermittelt und das Signifikanzlevel mittels Student's T-Test errechnet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. **IL-1 β** = Interleukin-1 β ; **KO** = knockout; **WT** = Wildtyp

Akkermansia muciniphila ist ein gram-negatives Bakterium. Es gehört zu den Verrucomicrobiaceae (Derrien et al. 2004; Macchione et al. 2019). Das strikt anaerob lebende Bakterium ist für seine Mucin-degradierende Eigenschaft bekannt, wodurch sich auch das Epitheton *muciniphila* – also Mucin-liebend – ergibt (Derrien et al. 2017; Derrien et al. 2004; Zhang et al. 2019a). Das Vorkommen von *A. muciniphila* im Gastrointestinaltrakt ist assoziiert mit gesunden Individuen und einem gesunden metabolischen Status derselben (Dao et al. 2016; Everard et al. 2013; Verhoog et al. 2019). Des Weiteren zeigt sich eine umgekehrte Korrelation mit Adipositas, dem metabolischen Syndrom sowie Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 (Cani und de Vos 2017; Dao et al. 2016; Depommier et al. 2019; Derrien et al. 2017; Everard et al. 2013; Schneeberger et al. 2015). Studien an Diät-induzierten adipösen Mäusen zeigten nach Fütterung von *A. muciniphila* einen Rückgang des Gewichts sowie eine Verbesserung des metabolischen Status der Tiere (Depommier et al. 2019; Derrien et al. 2017; Everard et al. 2013). Ähnliche Effekte ließen sich auch bei übergewichtigen Menschen beobachten (Depommier et al. 2019).

Da die erste Sequenzierung als Wildtyp Kontrollen keine littermate Wildtyp Kontrollen enthielt, wurde der Versuch im Verlauf nochmals mit vier IL-1 β knockout-Mäusen und fünf littermate Wildtyp Kontrollen durchgeführt.

Hier zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der α -Diversität (α -Diversität nach Shannon: $p = 0,06$; Richness: $p = 0,19$; Dominanz: $p = 0,06$; Evenness: $p = 0,19$) (s. Abbildung 5).

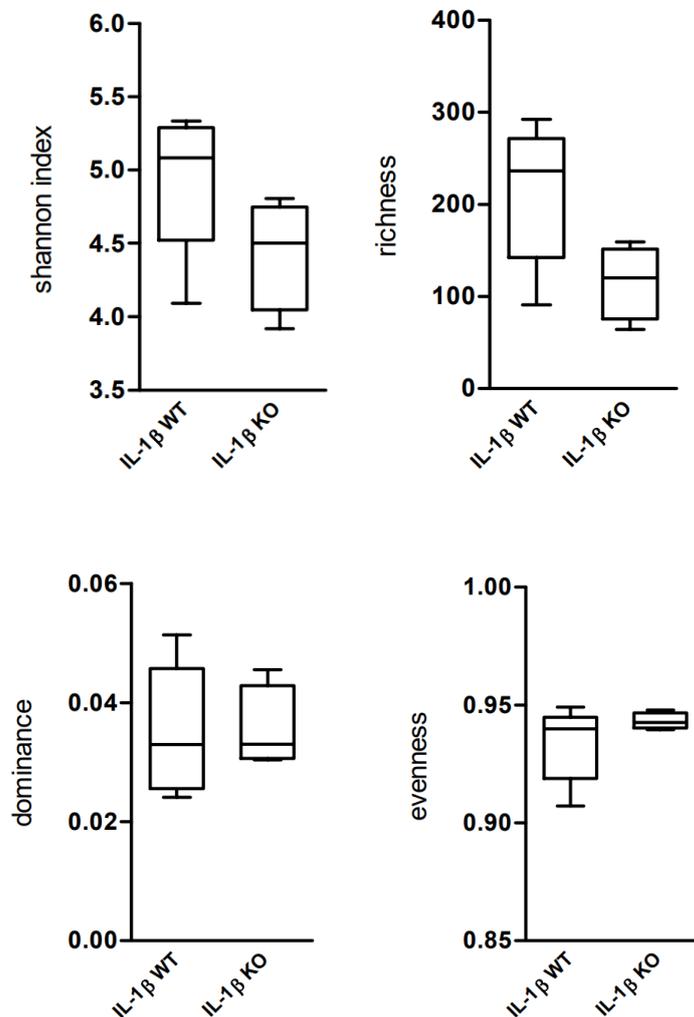


Abbildung 5: Das 2. Sequencing von IL-1 β knockout Tieren verglichen mit littermate Wildtyp Kontrollen zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied in der α -Diversität. DNA aus Fäzes von vier IL-1 β knockout Mäusen sowie fünf littermate Wildtyp Kontrollen wurde mittels Next Generation Sequencing auf Unterschiede im Mikrobiom analysiert. Die Ermittlung der α -Diversität wurde mit Hilfe der Silva Database (Version 132) durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde hierbei durch Anwendung des Wilcoxon sum rank Test errechnet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. **IL-1 β** = Interleukin-1 β ; **KO** = knockout; **WT** = Wildtyp. Adaptiert und modifiziert, nachgedruckt mit Genehmigung von Brill/Wageningen Academic Publishers/Beneficial Microbes: Bechberger, M., Eigenbrod, T., Boutin, S., Heeg, K. und Bode, K. A. (2023). **IL-1 β knockout increases the intestinal abundance of *Akkermansia muciniphila***. Beneficial Microbes, 1-10, doi: <https://doi.org/10.1163/18762891-20220042>. (Bechberger et al. 2023)

Die Principal Coordinates Analyse (PCoA) des zweiten Sequencings zur Beschreibung der β -Diversität ist in Abbildung 6 dargestellt. Es zeigte sich hierbei ein statistisch signifikanter Unterschied in der Struktur der Mikrobiota (PERMANOVA: $R^2=0,55$, p -value=0,01).

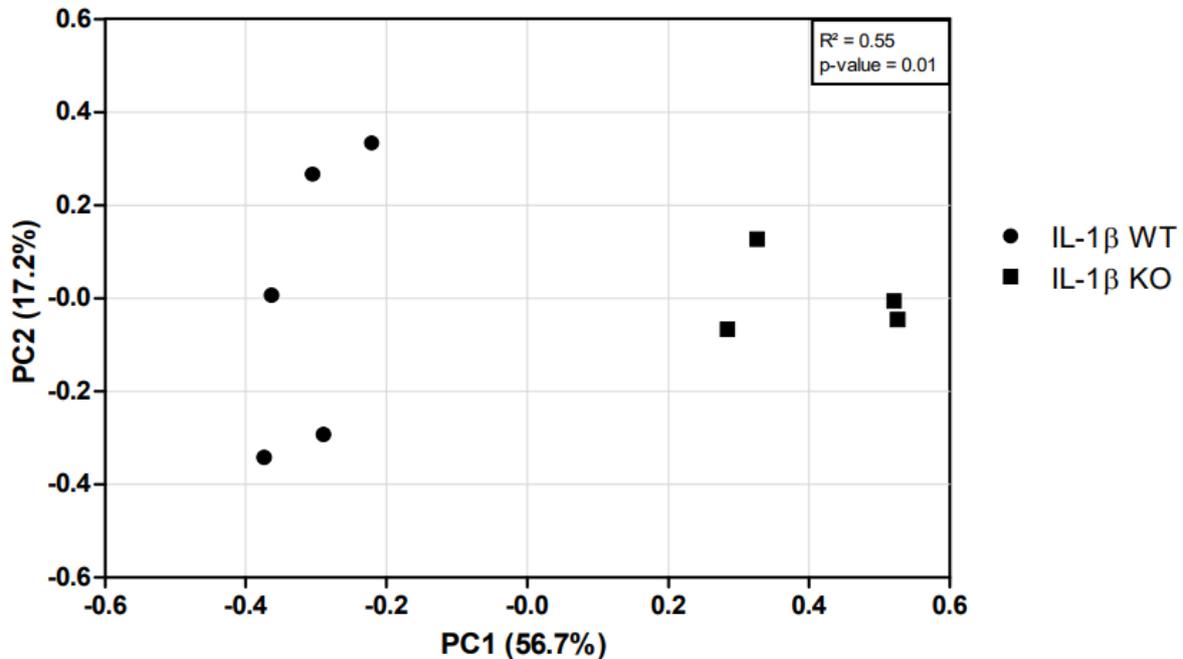


Abbildung 6: Principal Coordinates Analyse (PCoA) zur Darstellung der β -Diversität des 2. Sequencings mit IL-1 β knockout Mäusen und littermate Wildtyp Kontrollen. DNA aus Fäzes von vier IL-1 β knockout Mäusen sowie fünf littermate Wildtyp Kontrollen wurde mittels Next Generation Sequencing auf Unterschiede im Mikrobiom analysiert. Die β -Diversität Varianz wurde durch Auswertung der principal coordinate analysis (PCoA) und Ermittlung der Signifikanz durch PERMANOVA (Permutational multivariate analysis of variance) basierend auf dem Moirisita-Horn Similaritäts Index analysiert. Adaptiert und modifiziert, nachgedruckt mit Genehmigung von Brill/Wageningen Academic Publishers/Beneficial Microbes: Bechberger, M., Eigenbrod, T., Boutin, S., Heeg, K. und Bode, K. A. (2023). **IL-1 β knockout increases the intestinal abundancy of *Akkermansia muciniphila*.** Beneficial Microbes, 1-10, doi: <https://doi.org/10.1163/18762891-20220042>. (Bechberger et al. 2023)

Die statistisch signifikant veränderten Bakterien zwischen den IL-1 β knockout Tieren und den littermate Wildtyp Kontrollen sind in Appendix 8 aufgeführt.

Es bestätigte sich die statistisch hoch signifikante Steigerung des Vorkommens von *Akkermansia muciniphila* in IL-1 β knockout Tieren verglichen mit den littermate Wildtyp Kontrollen auch in diesem Sequencing (s. Abbildung 7).

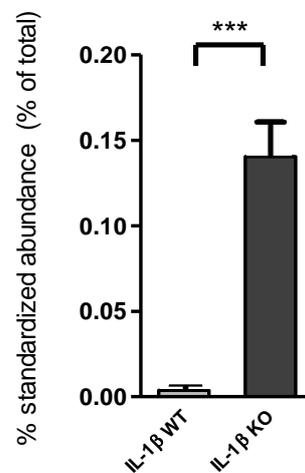


Abbildung 7: Für *Akkermansia muciniphila* zeigte sich auch zwischen IL-1 β knockout Mäusen und littermate Wildtyp Kontrollen eine statistisch hoch signifikant höhere Häufigkeit des Vorkommens. DNA aus Fäzes von vier IL-1 β knockout Mäusen sowie fünf littermate Wildtyp Kontrollen wurde mittels Next Generation Sequencing auf Unterschiede im Mikrobiom mit der CLC Biomedical Workbench unter Verwendung der Greengenes Datenbank analysiert. Der Mittelwert sowie die Standardabweichung wurden ermittelt und das Signifikanzlevel mittels Student's T-Test errechnet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. **IL-1 β** = Interleukin-1 β ; **KO** = knockout; **WT** = Wildtyp

3.4.2 qRT-PCR zur Bestätigung der Ergebnisse aus dem Sequencing

Zur Bestätigung der Ergebnisse des Deep Sequencing der DNA aus dem Fäzes der Mäuse wurde eine quantitative RealTime-PCR (qRT-PCR) nach SYBR-Green Protokoll mit der aus dem Colon-Fäzes gewonnenen DNA von IL-1 β knockout Mäusen sowie littermate Wildtyp Kontrollen durchgeführt. In Übereinstimmung mit den Daten der Sequenzierung war die Konzentration der *Akkermansia muciniphila*-DNA in den Fäzes der IL-1 β knockout Mäuse auch in der qRT-PCR statistisch signifikant erhöht (s. Abbildung 8). Es zeigte sich hier ein stark erhöhtes Vorkommen in den IL-1 β knockout Tieren im Vergleich zu ihren littermate Wildtyp Kontrollen. Als Kontrollkeime wurde sich zum einen für die Enterokokken (*Enterococcus* genus) entschieden, die zwar im Sequencing in den IL-1 β knockout Mäusen tendenziell, aber nicht statistisch signifikant erhöht vorkamen. Des Weiteren wurden als Kontrollen die Laktobacillen (*Lactobacillus* group) sowie *Bacteroides thetaiotaomicron* getestet, die im Sequencing keine statistisch signifikante Änderung des Vorkommens zeigten (s. Abbildung 8).

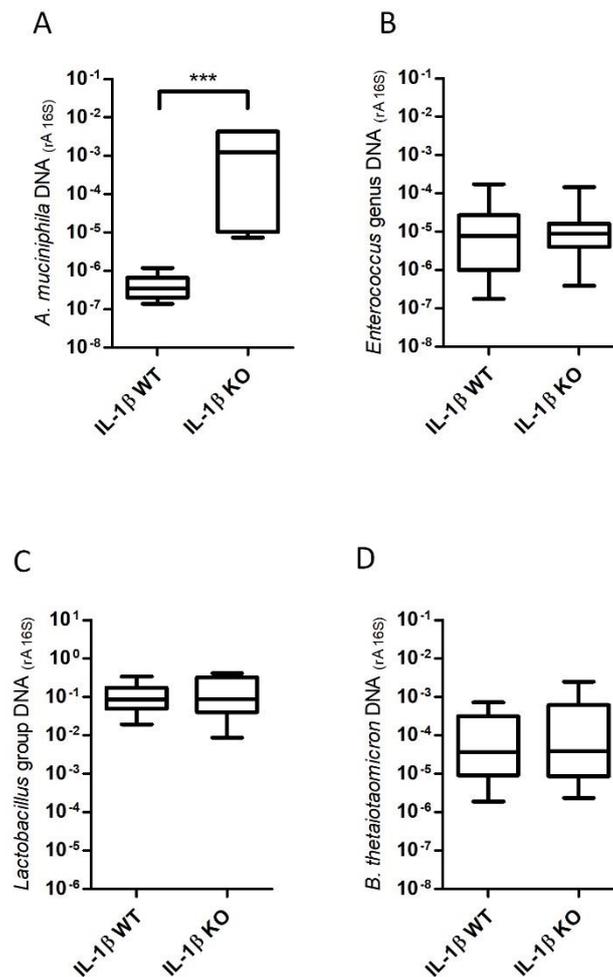


Abbildung 8: Ergebnis der Analyse des Faezes mittels qRT-PCR. Mit DNA aus Fäzes des Colons von IL-1 β knockout Mäusen sowie littermate Wildtyp Kontrollen wurde mit den Primern für die Bakterien *Akkermansia muciniphila* (A), *Enterococcus* genus (B), *Lactobacillus* group (C) und *Bacteroides thetaiotaomicron* (D) eine quantitative RT-PCR nach SYBR Green Protokoll durchgeführt. Probenanzahl ist hierbei n=16 pro Gruppe. Die Intensität der Signale wurde normalisiert zum 16S Gen ausgewertet. Der Mittelwert sowie die Standardabweichung wurden ermittelt und das Signifikanzlevel mittels Student`s T-Test errechnet: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. **IL-1 β** = Interleukin-1 β ; **KO** = knockout; **rA** = relative Abundance; **WT** = Wildtyp. Adaptiert und modifiziert, nachgedruckt mit Genehmigung von Brill/Wageningen Academic Publishers/Beneficial Microbes: Bechberger, M., Eigenbrod, T., Boutin, S., Heeg, K. und Bode, K. A. (2023). **IL-1 β knockout increases the intestinal abundance of *Akkermansia muciniphila*.** Beneficial Microbes, 1-10, doi: <https://doi.org/10.1163/18762891-20220042>. (Bechberger et al. 2023)

Auch über die Zeit ließen sich diese Ergebnisse reproduzieren (s. Abbildung 9).

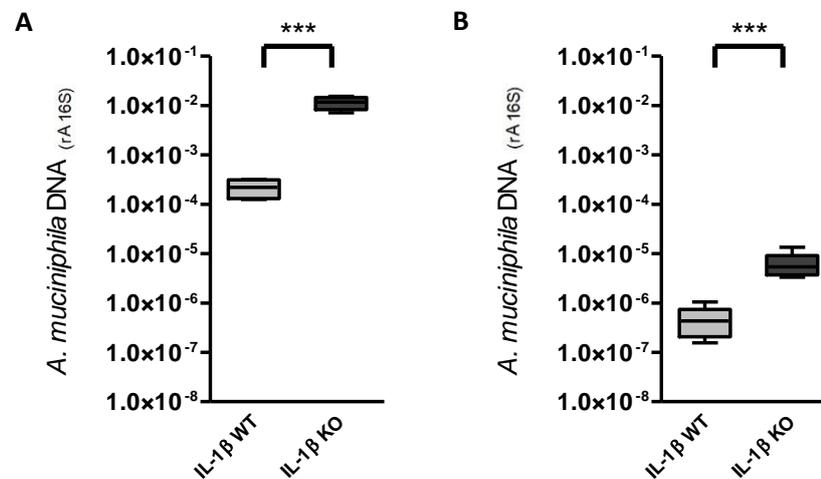


Abbildung 9: *A. muciniphila* zeigt in IL-1 β knockout Mäusen verglichen mit littermate Wildtyp Kontrollen auch nach eineinhalb Jahren Weiterführen der Mauszucht sowie Wechsel der Zucht-Unit ein erhöhtes Vorkommen. Mit DNA aus Fäzes des Colons von IL-1 β knockout Mäusen sowie littermate Wildtyp Kontrollen wurde mit den Primern für das Bakterium *Akkermansia muciniphila* eine quantitative RT-PCR nach SYBR Green Protokoll durchgeführt. Die Intensität der Signale wurde normalisiert zum 16S Gen ausgewertet. Der Mittelwert sowie die Standardabweichung wurden ermittelt und das Signifikanzlevel mittels Student's T-Test errechnet: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. **A:** Analyse zu Beginn des Projekts. Probenanzahl ist hierbei n=4 pro Gruppe. **B:** Analyse 1,5 Jahre nach der Auswertung in A. Probenanzahl ist hierbei n=6. **IL-1 β** = Interleukin-1 β ; **KO** = knockout; **rA** = relative Abundance; **WT** = Wildtyp

3.4.3 Bei den Verschiebungen im Colon-Mikrobiom der IL-1 β knockout Mäuse handelt es sich um einen indirekten Effekt von Interleukin-1 β

Porat et al. postulierten 1991 eine direkte Wirkung von IL-1 β auf Bakterien (Porat et al. 1991). Hierbei beschrieben die Autoren die direkte Wirkung von IL-1 β auf virulente *Escherichia coli* Stämme, die zum Wachstum der Bakterien führen sollte. Diese Wirkung wurde von Porat et al. auf die Bindung von IL-1 β an einen spezifischen IL-1 Rezeptor (IL-1R) auf der Bakterienoberfläche zurückgeführt (Porat et al. 1991). Zur Testung, ob es sich bei den im Deep Sequencing und in der quantitativen real-time PCR beobachteten Verschiebungen im Mikrobiom um einen direkten Effekt von IL-1 β auf Bakterien handelt, wurden vier IL-1R knockout Mäuse sowie vier littermate Wildtyp Kontrollen herangezogen. Bei IL-1R knockout Tieren ist IL-1 β weiterhin vorhanden und kann alle direkten Wirkungen ausüben, jedoch keine dem IL-1R der Mäuse nachgeschalteten Signale auslösen. Die aus dem Colon-Fäzes isolierte DNA dieser Tiere wurde über eine qRT-PCR nach SYBR Green Protokoll analysiert. Hierbei zeigten sich dieselben Verschiebungen wie vorher bei den IL-1 β knockout Mäusen im Vergleich zu ihren littermate Wildtyp Kontrollen (s. Abbildung 10).

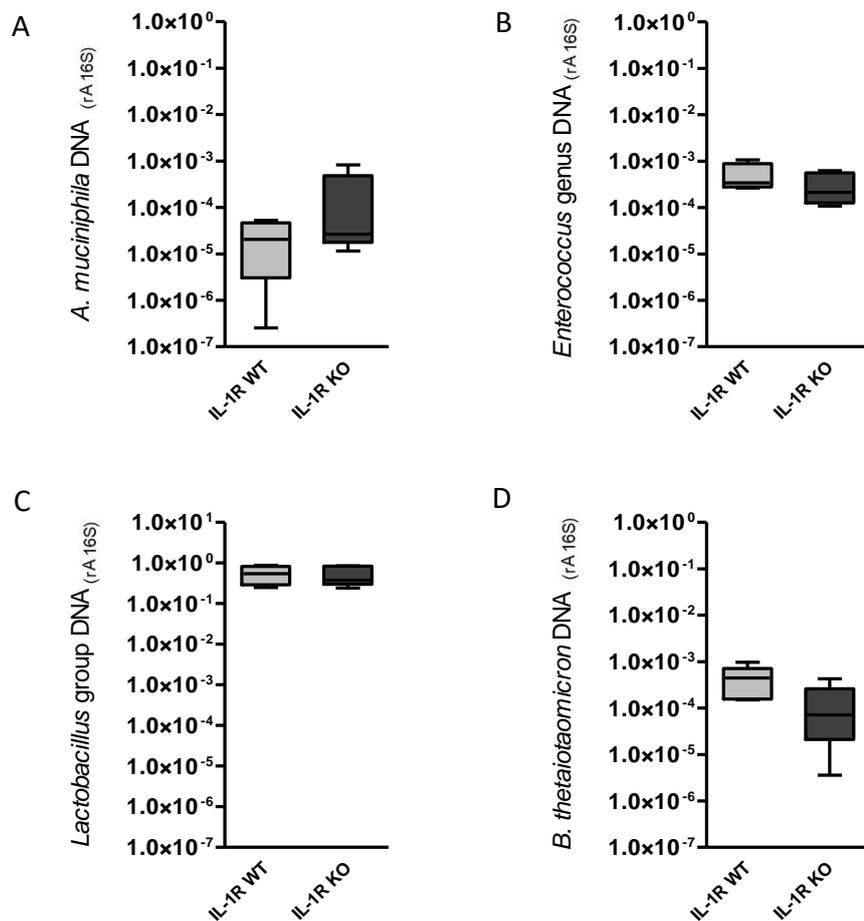


Abbildung 10: In IL-1R knockout Tieren zeigt sich ein erhöhtes Vorkommen von *A. muciniphila*. Mit DNA aus Fäzes des Colons von IL-1R knockout Mäusen sowie littermate Wildtyp Kontrollen wurde mit den Primern für die Bakterien *A. muciniphila* [$p=0,34$] (A), *Enterococcus* genus [$p=0,39$] (B), *Lactobacillus* group [$p=0,90$] (C) und *Bacteroides thetaiotaomicron* [$p=0,16$] (D) eine quantitative RT-PCR nach SYBR Green Protokoll gefahren. Die Intensität der Signale wurde normalisiert zum 16S Gen ausgewertet. Probenanzahl ist hierbei $n=4$ pro Gruppe. Der Mittelwert sowie die Standardabweichung wurden ermittelt und das Signifikanzlevel mittels Student's T-Test errechnet: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$. **IL-1R** = Interleukin-1 Rezeptor; **KO** = knockout; **rA** = relative Abundance; **WT** = Wildtyp

Zwar war bei den IL-1R knockout Mäusen der Unterschied zu ihren littermate Wildtyp Kontrollen nicht statistisch signifikant wie bei den IL-1 β Knockouts, jedoch zeigt die zu erkennende Tendenz der Unterschiede einen Trend hin zu einem indirekten Effekt von IL-1 β über nachgeschaltete Signalkaskaden als Ursache für die Veränderung des Colon-Mikrobioms an.

3.4.4 Genexpressionsmuster aus Mukosa-Scrapings zeigt Unterschiede in der Expression antibakterieller Peptide

Da ein indirekter Effekt von IL-1 β über nachgeschaltete Signale für die Verschiebungen in der Zusammensetzung des Colon-Mikrobioms verantwortlich sein musste, wurde die Genexpression in der Colon-Mukosa von zwei IL-1 β knockout Mäusen sowie zwei littermate Wildtyp Kontrollen nach Isolation der mRNA mit Hilfe eines Gene-Arrays verglichen. Hierbei zeigten sich hauptsächlich Unterschiede in der Expression von antibakteriellen Peptiden. Die Auflistung statistisch signifikant veränderter mRNAs mit einem fold-change ≥ 2 oder $\leq 0,5$ ist in Appendix 9 aufgeführt. Die größte Differenz ließ sich in der in den IL-1 β knockout Tieren erniedrigten Expression des Peptids Angiogenin 4 (Ang4) feststellen (vgl. Abbildung 11). Die zweitgrößte Abweichung zu einer erniedrigten Expression in den IL-1 β knockout Mäusen zeigte Resistin like molecule β (Retnlb), gefolgt von der Protein Phosphatase 1 Regulatory Inhibitor Subunit 14D (Ppp1r14d) (vgl. Abbildung 11).

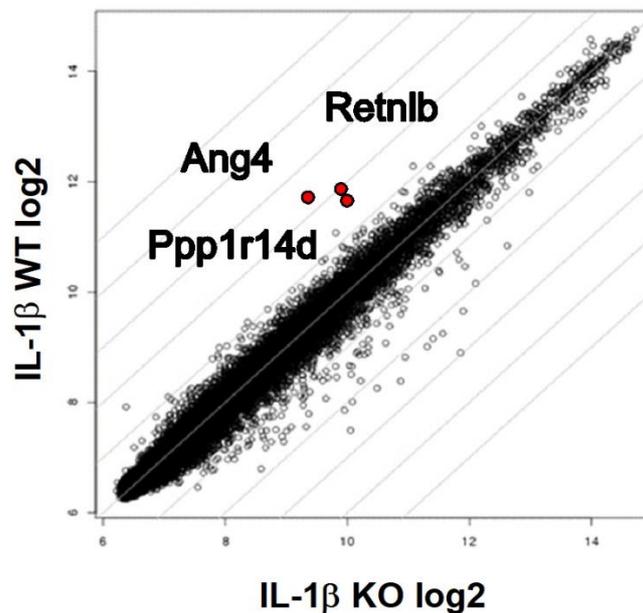


Abbildung 11: Der Hauptunterschied auf Genexpressionsebene der intestinalen Mukosazellen zwischen IL-1 β knockout und littermate Wildtyp Mäusen zeigt sich in der Expression antimikrobieller Peptide. Mit RNA aus Scrapings des Colons von IL-1 β knockout Mäusen sowie littermate Wildtyp Kontrollen wurde ein Expressionsprofiling durch die DKFZ-Genomics and Proteomics Core Facility (TP3, DKFZ, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Die Daten wurden quantitativ normalisiert und statistisch mit Hilfe der Chipster Analysis Software analysiert. Probenanzahl n=2 pro Gruppe. Als statistisch signifikant wurde ein $p < 0,05$ gewertet. **Ang4** = Angiogenin 4; **IL-1 β** = Interleukin-1 β ; **KO** = knockout; **Ppp1r14d** = Protein Phosphatase 1 Regulatory Inhibitor Subunit 14D; **Retnlb** = Resistin like molecule β ; **WT** = Wildtyp. Adaptiert und modifiziert, nachgedruckt mit Genehmigung von Brill/Wageningen Academic Publishers/Beneficial Microbes: **Bechberger, M., Eigenbrod, T., Boutin, S., Heeg, K. und Bode, K. A. (2023). IL-1 β knockout increases the intestinal abundance of *Akkermansia muciniphila*.** Beneficial Microbes, 1-10, doi: <https://doi.org/10.1163/18762891-20220042>. (Bechberger et al. 2023)

Ang4 gehört zur Gruppe der Angiogenine. Hierbei handelt es sich um angiogene Ribonukleasen. Ang4 besitzt zusätzlich jedoch antimikrobielle Eigenschaften (Crabtree et al. 2007; Ganz 2003; Hooper et al. 2003; Walker et al. 2013).

Weitere mRNAs für Peptide, die in der Immunantwort eine Rolle spielen und in den IL-1 β knockout Tieren im Vergleich zu ihren littermate Wildtyp Kontrollen erniedrigt vorkamen, waren Resistin like molecule β (Retnlb), auch RELM- β genannt, Interleukin-22 (IL-22) sowie Interleukin-17 (IL-17). Bei Retnlb handelt es sich um ein Cystein-reiches, antimikrobielles Protein, welches durch Goblet-Zellen sezerniert wird (Morampudi et al. 2016; Watanabe et al. 2020). IL-17 wird unter anderem durch TH17 Zellen aus der Lamina propria synthetisiert, jedoch sind auch CD8+ T-Zellen sowie B-Zellen und Paneth-Zellen in der Lage, IL-17 zu produzieren. IL-17 ist an der Abwehr von Pathogenen im Darm beteiligt. Hierbei löst eine Stimulation mit IL-17 die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, antimikrobiellen Peptiden oder anderen Stoffen zur Abwehr der Pathogene aus. Oft besteht hierbei ein Synergismus zwischen IL-17 und IL-22 (Zwicky et al. 2020). IL-22 ist sowohl ein pro- als auch ein antiinflammatorisches Zytokin. Es kann durch TH17 Zellen, aber auch durch CD4+ T-Zellen, NK-Zellen sowie neutrophile Granulozyten ausgeschüttet werden (Zhang et al. 2019b). Laut Walker et al. führt die Stimulation von Paneth-Zellen durch IL-17 und IL-22 aus TH17-Zellen, deren Freisetzung unter anderem durch IL-1 β ausgelöst werden kann, zur Produktion von Angiogenin 4 (Parks et al. 2015; Walker et al. 2013).

In den Wildtyp Tieren hingegen zeigte sich eine höhere Expression der mRNA für β -Defensin 2 (Defb2), Reg3 β und Reg3 γ . Defb2 gehört zu den β -Defensinen und ist ein antimikrobielles Peptid, was beispielweise gegen gram-negative Bakterien sowie Hefen wirken kann (Boniotto et al. 2003). Reg3 β und Reg3 γ sind C-Type Lektine, die auch eine antibakterielle Wirkung besitzen (Frazier et al. 2020; van Ampting et al. 2012).

Protein Phosphatase 1 Regulatory Inhibitor Subunit (Ppp1r14d), auch Gut and Brain Phosphatase Inhibitor (GBPI) genannt, ist ein Inhibitor der Serin/Threonin Phosphatase Aktivität der Protein Phosphatase 1 (PP1). Da keine antimikrobielle Aktivität von Ppp1r14d bis dato bekannt ist, wurde der Fokus im weiteren Verlauf auf die im Gene Array gefundenen Unterschiede in der Expression der für antimikrobielle Peptide codierenden mRNA gelegt.

3.4.5 Bestätigung der Ergebnisse des Gene-Arrays durch qRT-PCR

Zur Bestätigung der Ergebnisse des Gene-Arrays wurde die aus Colon-Mukosa von IL-1 β knockout Mäusen sowie littermate Wildtyp Kontrollen isolierte mRNA nach Umschreiben in komplementäre DNA (cDNA) mittels qRT-PCR nach SYBR-Green Protokoll analysiert. Für Ang4 ließen sich die Ergebnisse aus dem Gene-Array bestätigen (s. Abbildung 12).

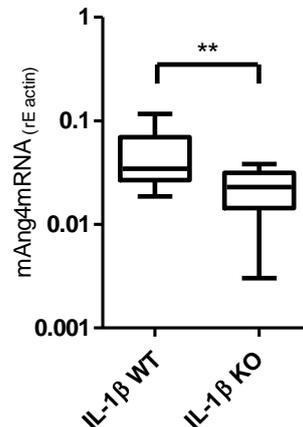


Abbildung 12: Expression der mRNA für Ang4 ist erniedrigt im Colon von Interleukin-1 β knockout Mäusen. Mit mRNA aus Scrapings des Colons von IL-1 β knockout Mäusen sowie littermate Wildtyp Kontrollen wurde nach Umschreiben in cDNA mit den Primern für das murine Peptid Ang4 eine quantitative RT-PCR nach SYBR Green Protokoll gefahren. Die Intensität der Signale wurde normalisiert zum house keeping Gen β -Aktin ausgewertet. Probenanzahl ist hierbei n=12 pro Gruppe. Der Mittelwert sowie die Standardabweichung wurden ermittelt und das Signifikanzlevel mittels Student's T-Test errechnet: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. **Ang4** = Angiogenin 4; **IL-1 β** = Interleukin-1 β ; **KO** = knockout; **rE** = relative Expression; **WT** = Wildtyp. Adaptiert und modifiziert, nachgedruckt mit Genehmigung von Brill/Wageningen Academic Publishers/Beneficial Microbes: Bechberger, M., Eigenbrod, T., Boutin, S., Heeg, K. und Bode, K. A. (2023). **IL-1 β knockout increases the intestinal abundance of *Akkermansia muciniphila*.** Beneficial Microbes, 1-10, doi: <https://doi.org/10.1163/18762891-20220042>. (Bechberger et al. 2023)

Die Unterschiede bei Retnlb zeigten eine ähnliche Tendenz wie im Gene-Array, jedoch waren die Ergebnisse hierbei nicht statistisch signifikant (s. Abbildung 13).

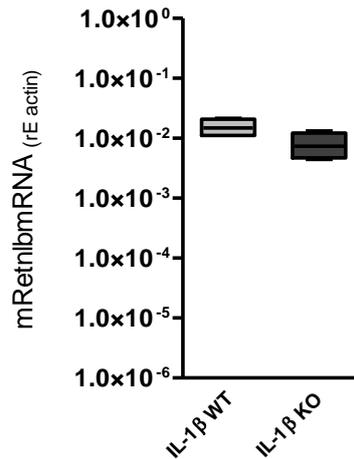


Abbildung 13: Bildung von Retnlb zeigt in der qRT-PCR der Colon-mRNA keine statistisch signifikanten Unterschiede, jedoch die gleiche Tendenz wie im Gene-Array. Mit mRNA aus Scrapings des Colons von IL-1 β knockout Mäusen sowie littermate Wildtyp Kontrollen wurde nach Umschreiben in cDNA mit den Primern für das murine Peptid Retnlb eine quantitative RT-PCR nach SYBR Green Protokoll gefahren. Die Intensität der Signale wurde normalisiert zum house keeping Gen β -Aktin ausgewertet. Probenanzahl ist hierbei n=4 pro Gruppe. Der Mittelwert sowie die Standardabweichung wurden ermittelt und das Signifikanzlevel mittels Student's T-Test errechnet: p=0,06. **IL-1 β** = Interleukin-1 β ; **KO** = knockout; **rE** = relative Expression; **Retnlb** = Resistin-like beta; **WT** = Wildtyp

Für die Peptide Defb2 sowie Reg3 β und Reg3 γ zeigten sich in der qRT-PCR keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen IL-1 β knockout Mäusen und littermate Wildtyp Kontrollen (s. Abbildung 14). Auch die Tendenz bei der Analyse der qRT-PCR konnte die Tendenz der Ergebnisse des Gene-Arrays nicht bestätigen.

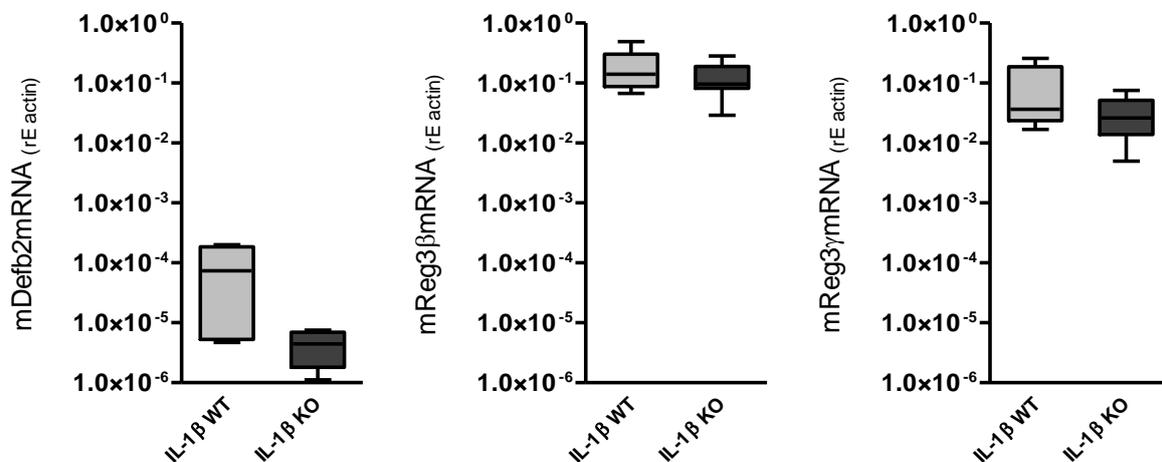


Abbildung 14: Expression von Defb2 sowie Reg3 β und Reg3 γ zeigt in der qRT-PCR der Colon-mRNA keine statistisch signifikanten Unterschiede. Mit mRNA aus Scrapings des Colons von IL-1 β knockout Mäusen sowie littermate Wildtyp Kontrollen wurde nach Umschreiben in cDNA mit den Primern für die murinen Peptide Defb2, Reg3 β und Reg3 γ eine quantitative RT-PCR nach SYBR Green Protokoll gefahren. Die Intensität der Signale wurde normalisiert zum house keeping Gen β -Aktin ausgewertet. Probenanzahl ist hierbei n=4 pro Gruppe für Defb2 sowie n=10 pro Gruppe für Reg3 β und Reg3 γ . Der Mittelwert sowie die Standardabweichung wurden ermittelt und das Signifikanzlevel mittels Student's T-Test errechnet: Defb2 – p=0,14; Reg3 β – p=0,20; Reg3 γ – p=0,06. **Defb2** = β -Defensin 2; **IL-1 β** = Interleukin-1 β ; **KO** = knockout; **rE** = relative Expression; **Reg3 β** = Regenerating islet-derived protein 3 β ; **Reg3 γ** = Regenerating islet-derived protein 3 γ ; **WT** = Wildtyp

Ebenso zeigte sich für die Interleukine IL-17 sowie IL-22 nicht dieselbe Tendenz wie im Gene-Array. Hierbei ist auch zu beachten, dass die Unterschiede der durch die qRT-PCR erhaltenen Resultate keine Signifikanz aufweisen (s. Abbildung 15).

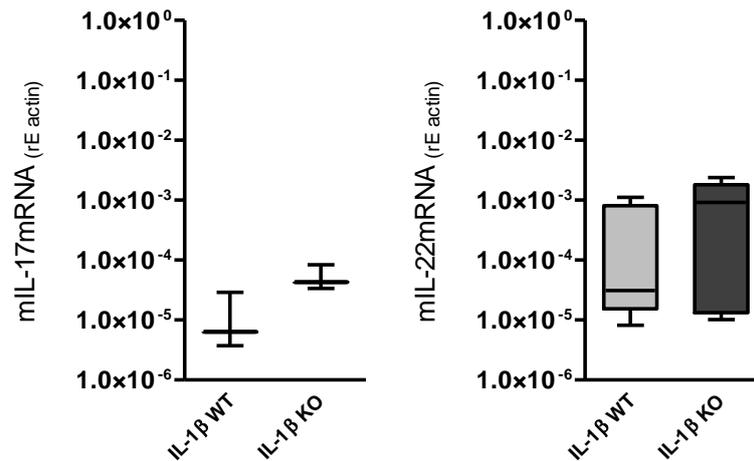


Abbildung 15: Expression von IL-17 sowie IL-22 zeigt in der qRT-PCR der Colon-mRNA keine statistisch signifikanten Unterschiede. Mit mRNA aus Scrapings des Colons von IL-1 β knockout Mäusen sowie littermate Wildtyp Kontrollen wurde nach Umschreiben in cDNA mit den Primern für die murinen Peptide IL-17 und IL-22 eine quantitative RT-PCR nach SYBR Green Protokoll gefahren. Die Intensität der Signale wurde normalisiert zum house keeping Gen β -Aktin ausgewertet. Probenanzahl ist hierbei n=3 pro Gruppe für IL-17 sowie n=6 pro Gruppe für IL-22. Der Mittelwert sowie die Standardabweichung wurden ermittelt und das Signifikanzlevel mittels Student's T-Test errechnet: IL-17 – p=0,08; IL-22 – p=0,18. **IL-1 β** = Interleukin-1 β ; **IL-17** = Interleukin 17; **IL-22** = Interleukin 22; **KO** = knockout; **rE** = relative Expression; **WT** = Wildtyp

Aus diesem Grund erfolgte im Verlauf die Fokussierung auf das antimikrobielle Peptid Angiogenin 4.

3.4.6 Ermittlung der Expression von Angiogenin 4 auf Protein-Level erweist sich als schwierig

Die Unterschiede von Angiogenin 4 auf mRNA-Level müssen nicht zwangsläufig zu einer erhöhten Bildung des antibakteriellen Peptids führen. Deshalb wurde der Vergleich der Ang4 Konzentration auf Protein-Level zwischen IL-1 β knockout Mäusen und littermate Wildtyp Kontrollen angestrebt. Auf dem Markt befindlich gab es jedoch nur einen Antikörper gegen humanes Angiogenin (ANG) (Santa Cruz Biotechnology). Dieser wies jedoch laut Hersteller eine Kreuzreaktivität gegen murines Angiogenin 1 (Ang1), Angiogenin 2 (Ang2), Angiogenin 3 (Ang3) sowie Ang4 aus.

Aus der Colon-Mukosa von IL-1 β knockout Tieren sowie littermate Wildtyp Kontrollen wurden Proteine isoliert und mit Hilfe eines Western-Blots analysiert. Die Membran wurde mit dem anti-ANG Antikörper 1:1000 in 3% BSA über Nacht inkubiert und anschließend mit dem Zweit-Antikörper anti-goat IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology) behandelt. Die Ergebnisse wurden auf murines β -Aktin normalisiert. Hierbei war kein Trend zwischen den Knockout und Wildtyp Tieren erkennbar.

Betrachtet man jedoch die unterschiedliche Größe der murinen Angiogenine, die mit diesem Antikörper detektiert werden können, so lässt sich feststellen, dass die zu erwartenden Banden mit

Angiogenin 1 (mAng1) bei 16,2 kDa, Angiogenin 2 (mAng2) bei 16,6 kDa, Angiogenin 3 (mAng3) bei 16,7 kDa und Angiogenin 4 (mAng4) bei 16,4 kDa sehr nah beieinander liegen. Somit ist bei hoher Expression eines der anderen Peptide eine Detektion der Ang4 Konzentration auf Protein-Level nicht möglich. Die Expression der mRNA von Ang1, Ang2, Ang 3 sowie Ang4 aus Mukosa-Scrapings von C57BL/6 Mäusen wurde nach Umschreiben in cDNA über eine qRT-PCR nach SYBR-Green Protokoll analysiert. Hierbei ergab sich neben der hohen Expression des antimikrobiellen Peptids Ang4 auch eine hohe Expression der mRNA von Ang2, was keine antibakterielle, sondern eine angiogene Wirkung besitzt (s. Abbildung 16). Hierdurch ist eine Quantifizierung von Angiogenin 4 auf Protein-Level durch eine Western-Blot Analyse aufgrund der Kreuzreaktivität mit anderen Angiogeninen nicht möglich.

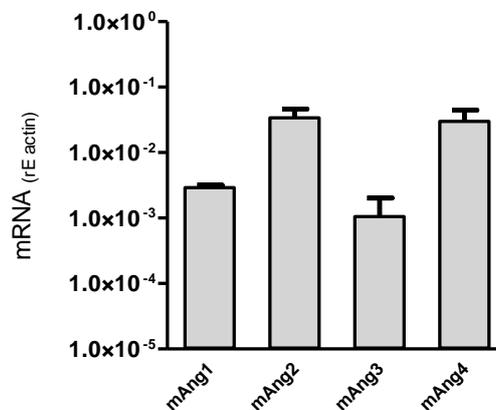


Abbildung 16: Analyse der Expression der mRNA der verschiedenen Angiogenine in C57BL/6 Mäusen. Die Expression der mRNA der vier murinen Angiogenine mAng1, mAng2, mAng3 und mAng4 wurde durch Analyse der aus Mukosa-Scrapings von zwei C57BL/6 Mäusen aus der Zucht der IL-1 β -Mäuse isolierten mRNA mittels quantitativer real-time PCR verglichen. Die Intensität der Signale wurde normalisiert zum house keeping Gen β -actin ausgewertet. Probenanzahl ist hierbei n=4 pro Gruppe. Der Mittelwert sowie die Standardabweichung wurden ermittelt. In dieser Analyse zeigte sich neben einer hohen Expression von mAng4 auch eine starke Expression des Angiogenins mAng2, was im Gegensatz zu mAng4 keine antibakterielle, sondern eine angiogene Wirkung besitzt. **mAng1** = murines Angiogenin 1; **mAng2** = murines Angiogenin 2; **mAng3** = murines Angiogenin 3; **mAng4** = murines Angiogenin 4; rE = relative Expression

Als Alternative zum Mausmodell wurde außerdem versucht in murinen Colon-Zelllinien durch Stimulation mit IL-1 β und/oder LPS eine erhöhte Expression von Angiogenin 4 zu erreichen. Jedoch war weder in CMT93 noch in Colon-26 Zellen – auch bereits auf mRNA-Level – ein Trend zu erkennen.

3.4.7 Rekombinantes mouse Angiogenin 4 zeigt eine direkte Wirkung auf das Bakterienwachstum von *A. muciniphila*, jedoch nicht auf das Wachstum von *E. faecium*, *E. faecalis* und *B. thetaiotaomicron*

Da eine Quantifizierung der Angiogenin 4 Konzentration auf Protein-Level durch eine Western Blot Analyse nicht möglich war, wurde die direkte, antibakterielle Wirkung von murinem Angiogenin 4 auf das Wachstum von *Akkermansia muciniphila* sowie auf das Wachstum der verwendeten Referenzkeime *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* sowie *Bacteroides thetaiotaomicron* untersucht. Hierfür wurden die Bakterien in Thio/Leber-Medium (SIFIN) angezüchtet und bei Eintritt in die log-Phase mit rekombinantem mouse Ang4 (Cusabio) in einer Konzentration von 4,5 $\mu\text{g/ml}$ versetzt. Die Proben wurden bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

Bereits an den Zeitpunkten 4 Stunden und 8 Stunden nach Ang4 Zugabe ließ sich ein verlangsamtes Wachstum von *Akkermansia muciniphila* feststellen. Jedoch erst am Zeitpunkt 16 Stunden nach Zugabe des rekombinanten Proteins konnte eine Signifikanz der Ergebnisse erreicht werden. Bei keinem der anderen Bakterien zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Bakteriensuspension mit und ohne Zugabe von Ang4. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt.

Die 24 h nach Zugabe des rekombinanten Proteins reduzierte Effektivität das Wachstum von *A. muciniphila* zu hemmen kann möglicherweise auf die mit der Zeit verringerte Stabilität des Proteins zurückgeführt werden.

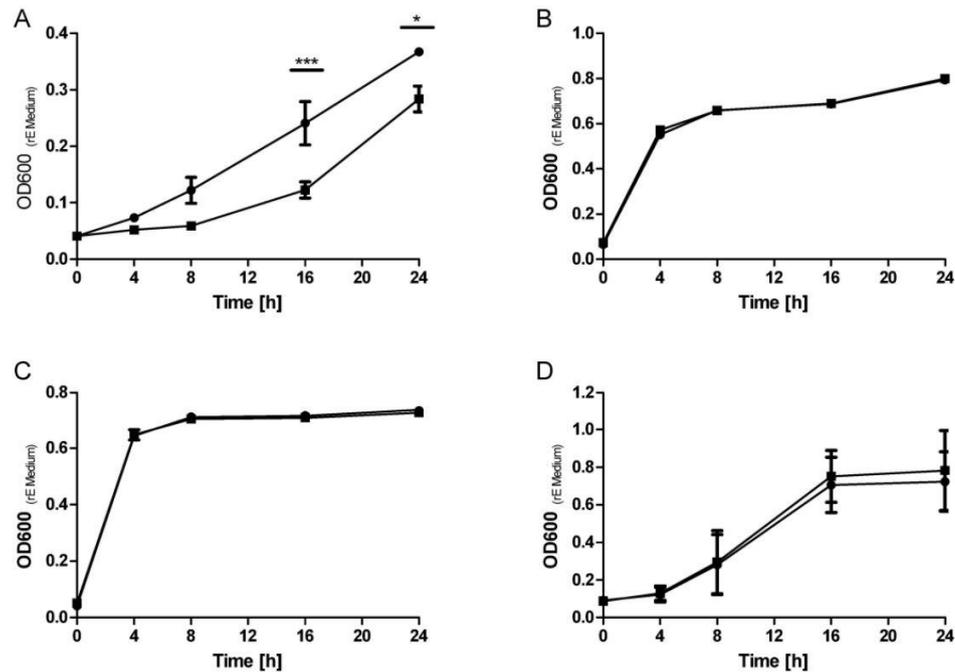


Abbildung 17: Rekombinantes murines Angiogenin 4 zeigt einen direkten antibakteriellen Effekt gegen *Akkermansia muciniphila*. Bakterien in der logarithmischen Phase wurden inkubiert mit 4,5 $\mu\text{g/ml}$ rekombinantes murines Angiogenin 4 in Leber/Thio Medium bei 37 $^{\circ}\text{C}$. *Akkermansia muciniphila* und *Bacteroides thetaiotaomicron* wurden in einer Anaerobier-Box bebrütet, wohingegen *Enterococcus faecium* sowie *Enterococcus faecalis* bei Normoxie inkubiert wurden. Das Wachstum der Bakterien wurde analysiert über die Messung der OD600 des Mediums an den Zeitpunkten 0h, 4h, 8h, 16h und 24h. Die Extinktion der zu analysierenden Bakteriensuspensionen wurde normalisiert auf das Wachstumsmedium. Der Versuch wurde dreimalig durchgeführt. Die Daten werden hier gezeigt als Mittelwert \pm Standardabweichung. Die Testung auf Signifikanz wurde mittels Two-Way ANOVA (Analysis of Variance) mit anschließendem Bonferroni post-Test durchgeführt: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (A) *Akkermansia muciniphila* (B) *Enterococcus faecalis* (C) *Enterococcus faecium* (D) *Bacteroides thetaiotaomicron*. \blacktriangle ohne Zusatz von Ang4; \blacksquare mit Zusatz von Ang4; **Ang4** = Angiogenin 4; **rE** = relative Extinktion. Adaptiert und modifiziert, nachgedruckt mit Genehmigung von Brill/Wageningen Academic Publishers/Beneficial Microbes: Bechberger, M., Eigenbrod, T., Boutin, S., Heeg, K. und Bode, K. A. (2023). **IL-1 β knockout increases the intestinal abundance of *Akkermansia muciniphila***. Beneficial Microbes, 1-10, doi: <https://doi.org/10.1163/18762891-20220042>. (Bechberger et al. 2023)

3.4.8 Expression von Mukus-Bestandteilen

Akkermansia muciniphila ist ein Mukus-liebendes Bakterium. Eine Hypothese des erhöhten Auffindens von *Akkermansia muciniphila* in IL-1 β knockout Mäusen im Vergleich zu ihren littermate Wildtyp Kontrollen war daher, dass Mukus-Bestandteile erhöht produziert werden und *A. muciniphila* sich in diesem Bereich vermehrt ansiedeln kann. Dao et al. beschrieben bereits eine Erhöhung der Mukus-Dicke sowie ein gesteigertes Auffinden von Goblet-Zellen bei Anwesenheit von *A. muciniphila* (Dao et al. 2016).

Ein wichtiger Bestandteil des Mukus sind die Mucine. Hierbei handelt es sich um Glykoproteine, die eine hochglykosilierte Struktur aufweisen. Mucine dienen als Hauptstrukturbestandteil des Mukus und bilden durch Quervernetzungen eine gelartige Schicht, die als physikalische Abwehr- und Schutzschicht über der Epithelschicht zu finden ist (Corfield 2015).

Die Ergebnisse des Gene-Arrays der Mukosa-Scrapings der IL-1 β knockout sowie littermate Wildtyp Mäuse zeigten sowohl eine Erhöhung als auch eine Erniedrigung der Gen-Expression verschiedener Mucine, zusammengefasst in Tabelle 3.

Tabelle 3: Ergebnisse der Expressions-Analyse von Mucinen im GeneArray von IL-1 β knockout Mäusen im Vergleich zu littermate Wildtyp Kontrollen. Aus Mukosa-Scrapings des Colons von zwei IL-1 β knockout Mäusen und zwei littermate Wildtyp Mäusen wurde die mRNA isoliert und mit Hilfe eines Gene Arrays das Gen-Expressionsmuster der Gruppen verglichen. In der Tabelle sind alle in den Scrapings gefundenen Mucine aufgeführt und der Faktor angegeben, um welchen sie in den IL-1 β knockout Tieren im Vergleich zu den littermate Kontroll-Mäusen erhöht beziehungsweise erniedrigt vorkamen. Bei einigen Mucinen kam es zu mehreren Hits aufgrund der Ableitung unterschiedlicher Genregionen sowie alternativem Splicing. Die Ergebnisse ergeben sich aus den Mittelwerten der Proben und der Errechnung der relativen Änderung (foldchange) der Proben der IL-1 β knockout Tiere im Vergleich zu den littermate Wildtyp Kontrollen. **IL-1 β** = Interleukin-1 β ; **Muc1** = Mucin 1; **Muc2** = Mucin 2; **Muc3** = Mucin 3; **Muc4** = Mucin 4; **Muc5ac** = Mucin 5ac; **Muc6** = Mucin 6; **Muc10** = Mucin 10; **Muc13** = Mucin 13; **Muc15** = Mucin 15; **Muc16** = Mucin 16; **Muc20** = Mucin 20

Mucin	erhöht in IL-1 β knockout Mäusen	erniedrigt in IL-1 β knockout Mäusen
Muc1		0,9811 0,7542 0,7050 0,6315
Muc2	1,0972	0,9580
Muc3	1,1044 1,0800	
Muc4		0,9522 0,8787
Muc5ac	1,0680 1,0392	
Muc6		0,9105
Muc10	1,0522	0,9669
Muc13	1,3241	0,9966
Muc15		0,9873
Muc16		0,9277
Muc20		0,9362

Mucin2 (Muc2) ist die hauptsächliche strukturgebende Komponente des Mukus im Colon. Burger-van Paassen et al. sahen bei Muc2-Defizienz eine Hochregulation von Reg3 β und Reg3 γ , jedoch nicht von Ang4 (Burger-van Paassen et al. 2012). Aufgrund des Einflusses auf die antimikrobielle Antwort im Darm wurde die Expression von Muc2 nochmals über qRT-PCR näher betrachtet.

Die Analyse der mRNA-Expression von Muc2 in den Mukosa-Scrapings über qRT-PCR nach SYBR Green Protokoll (s. Abbildung 18) sowie die makroskopische Betrachtung des Mukus der IL-1 β knockout Mäuse sowie der littermate Wildtyp Kontrollen zeigten auch keinen Trend.

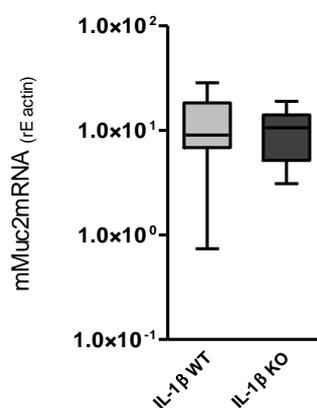


Abbildung 18: Muc2 zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Expression zwischen IL-1 β knockout Mäusen und littermate Wildtyp Kontrollen. Aus IL-1 β knockout und littermate Wildtyp Mäusen wurde mRNA der Colon-Scrapings isoliert und nach Umschreiben in cDNA das Gen Muc2 über quantitative RT-PCR nach SYBR Green Protokoll analysiert. Die Intensität der Signale wurde normalisiert zum house keeping Gen β -Aktin ausgewertet. Probenanzahl ist hierbei n=10 pro Gruppe. Der Mittelwert sowie die Standardabweichung wurden ermittelt und das Signifikanzlevel mittels Student's T-Test errechnet: p=0,65. **IL-1 β** = Interleukin-1 β ; **KO** = knockout; **Muc2** = Mucin 2; **rE** = relative Expression; **WT** = Wildtyp

3.4.9 Eindringen von Bakterien in den Mukus

Da es keine statistisch signifikante Veränderung der Mukus-Bestandteile zu detektieren gab, war eine weitere Hypothese das verbesserte Penetrationsvermögen des Mukus-liebenden Bakteriums *Akkermansia muciniphila* in den Mukus des Colons. Hierfür wurde DNA aus den Colon-Mukosa-Scrapings von vier IL-1 β knockout Mäusen und vier littermate Wildtyp Kontrollen isoliert und die Konzentration von *Akkermansia muciniphila* sowie der Referenzkeime *Enterococcus genus*, welche zwar in den knockout Tieren vermehrt zu finden sind, jedoch keine vergleichbare Affinität zum Mukus besitzen, sowie den im Fäzes nicht statistisch signifikant quantitativ veränderten *Bacteroides thetaiotaomicron* über eine qRT-PCR nach SYBR Green Protokoll analysiert (s. Abbildung 19). Die

Mukosa-Scrapings enthalten keine makroskopisch sichtbaren Fäzes-Reste mehr und zeigen dadurch nur die in den Mukus penetrierten Bakterien. *Akkermansia muciniphila* zeigte hierbei eine erhöhte Konzentration im Mukus der IL-1 β knockout Mäuse verglichen zu ihren littermate Wildtyp Kontrollen. Bei den Referenzkeimen, die generell nur in sehr geringer Anzahl im Mukus gefunden wurden, ließ sich keine Veränderung des Penetrationsvermögens feststellen.

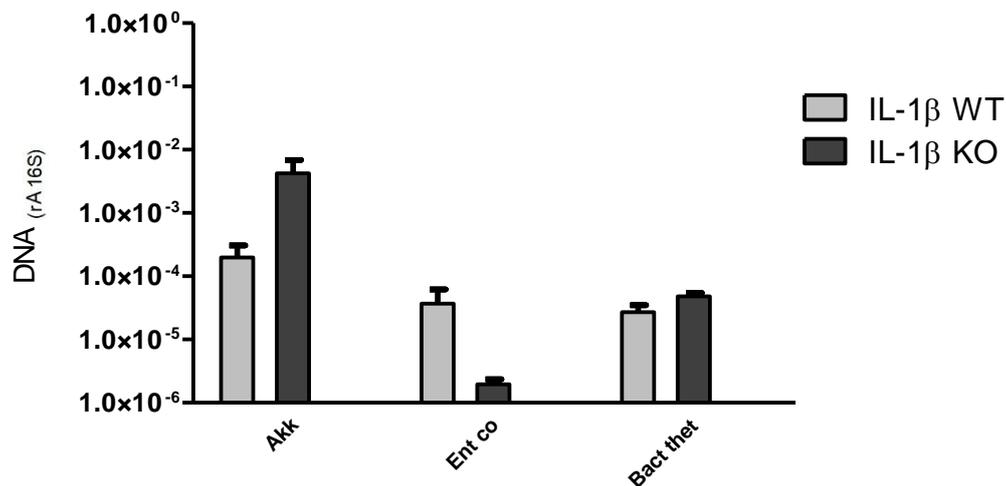


Abbildung 19: *Akkermansia muciniphila* zeigt in IL-1 β knockout Mäusen eine erhöhte Penetration in den Mukus. Aus den Colon-Scrapings von IL-1 β knockout Mäusen und littermate Wildtyp Kontrollen wurde die DNA isoliert und mittels quantitativer RT-PCR nach SYBR Green Protokoll das Vorkommen der Bakterien *Akkermansia muciniphila*, *Enterococcus* genus sowie *Bacteroides thetaiotaomicron* analysiert. Die Intensität der Signale wurde normalisiert zum 16S Gen ausgewertet. Probenanzahl war hierbei n=4 pro Gruppe. Der Mittelwert sowie die Standardabweichung wurden ermittelt und das Signifikanzlevel mittels Student's T-Test errechnet: Akk – p=0,18; Ent co – p=0,20; Bact thet – p=0,09. **Akk** = *Akkermansia muciniphila*; **Bact thet** = *Bacteroides thetaiotaomicron*; **Ent co** = *Enterococcus* genus; **KO** = knockout; **rA** = relative Abundance; **WT** = Wildtyp

3.4.10 Methoden-Etablierung eines Fluoreszenz in-situ Hybridisierungs (FISH)-Assays mit anschließender Immunfluoreszenz

Um die Lokalisation der Bakterien im Darm festzustellen, wurde eine Methoden-Etablierung einer Fluoreszenz in-situ Hybridisierung mit anschließender Immunfluoreszenz durchgeführt. Die Fluoreszenz in-situ Hybridisierung sollte die Bakterien generell und speziell das Bakterium *Akkermansia muciniphila* markieren und die anschließende Immunfluoreszenz zur besseren Sichtbarkeit der Abgrenzung zwischen Darmepithel und Lumen herangezogen werden.

Für die Methodenetablierung wurden, wenn nicht explizit anders erwähnt, Wildtyp Mäuse verwendet.

3.4.10.1 Entparaffinierung der Gewebeschnitte

Für die Entparaffinierung der Gewebeschnitte wurden folgende Protokolle miteinander verglichen (s. Tabelle 4).

Tabelle 4: Entparaffinierungsprotokolle 1, 2 und 3. Diese Tabelle zeigt drei verschiedene Protokolle zur Entparaffinierung von Gewebeschnitten des Colons. **min** = Minuten; **RT** = Raumtemperatur

Entparaffinierung nach Protokoll 1	Entparaffinierung nach Protokoll 2	Entparaffinierung nach Protokoll 3
2x 15 min in Ethanol 95 % bei RT	20 min Erhitzen bei 42 °C 2x 15 min in Xylol bei RT	30 min Erhitzen bei 42 °C 2x 10 min Roticlear bei RT 2x 5 min Ethanol 100 % bei RT 1x 5 min Ethanol 96 % bei RT 1x 5 min Ethanol 70 % bei RT 1x 5 min Ethanol 50 % bei RT 1x 2 min Aqua destillata bei RT

Bei Protokoll 1 erfolgte keine Entparaffinierung. Protokoll 2 wurde aufgrund der höheren Toxizität von Xylol abgebrochen, da mit Protokoll 3 eine gute Entparaffinierung der Gewebeschnitte erfolgte.

3.4.10.2 Etablierung der Immunfluoreszenz

Zuerst wurde die Immunfluoreszenz mit einer anti-Muc2 Färbung etabliert, da es in der Arbeitsgruppe bereits etablierte Protokolle für die Immunfluoreszenz-Färbung gab. Hierfür wurden die Gewebeschnitte nach der Entparaffinierung nach Protokoll 3 zum Blocken für 2 Stunden unter Schwenken in 10 % FCS in PBS gegeben. Daraufhin wurde der Erstantikörper anti-Muc2 in einer Konzentration von 1:200 in 50 μ l 10 % FCS in PBS auf den Objektträger geben, mit Parafilm bedeckt und in der Feuchtkammer bei 4 °C über Nacht gelagert. Nach kurzem Waschen und anschließendem dreimaligem Waschen für 5 Minuten in 10 % FCS in PBS auf dem Schüttler wurde der Zweitantikörper Anti-mouse Alexa Fluor 488 1:200 in 50 μ l 10 % FCS in PBS auf den Objektträger gegeben, mit Parafilm abgedeckt und für 1 Stunde bei 4 °C in einer Feuchtkammer gelagert. Danach wurde nochmals kurz mit 10 % FCS in PBS gewaschen und eine Gegenfärbung mit Bisbenzimid 1:500 in 10 % FCS in PBS durchgeführt. Hiervon wurden wieder 50 μ l auf den Objektträger gegeben, dieser mit Parafilm abgedeckt und für 20 Minuten bei 4 °C in der Feuchtkammer gefärbt. Nach kurzem Waschen und danach dreimaligem Waschen für 5 Minuten in 10 % FCS auf dem Schüttler wurde nochmals kurz mit PBS gewaschen. Die Schnitte wurden getrocknet und mit Dako Fluorescence Mounting Medium eingedeckelt. Die Aushärtung erfolgte bei 4 °C unter Lichtschutz und die Auswertung durch Konfokalmikroskopie. Die Ergebnisse zeigten, dass das Protokoll der Immunfluoreszenz auch für die Anfärbung von Gewebeschnitten des Colons geeignet ist (Ergebnisse nicht abgebildet).

3.4.10.3 Etablierung der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH)

Für die Entparaffinierung wurde in diesem Teil mit Protokoll 3 weitergearbeitet. Als erstes FISH-Protokoll wurde ein Ablauf angelehnt an die normale Immunfluoreszenz-Färbung gewählt. Hierfür wurden die Schnitte nach Entparaffinierung 2 Stunden in 10 % FCS in PBS geblockt. Danach wurde 2x 5 Minuten in Ethanol 95 % gewaschen. Es wurden 500 ng der FISH Sonde für 16S gekoppelt an Cy3 ad 50 μ l FISH-Hybridisierungs-Puffer auf den Objektträger gegeben, mit Parafilm bedeckt, für 30 Minuten auf 60 °C erhitzt und danach über Nacht bei 50 °C im Heizofen unter Lichtschutz gelagert. Nach dreimaligem Waschen für 5 Minuten in 10 % FCS in PBS wurde für 10 min in FISH Waschpuffer gewaschen. Danach erfolgte eine Gegenfärbung mit Bisbenzimid 1:500 in 10 % FCS in PBS für 20 Minuten bei 4 °C. Nach erneutem dreimaligen 5-minütigem Waschen in 10 % FCS in PBS wurden die Proben nochmals für 5 Minuten in PBS gewaschen, mit Dako Fluorescence Mounting Medium eingedeckelt und nach Trocknen durch Konfokalmikroskopie ausgewertet. Hierbei stellte sich heraus, dass die Gewebeschnitte vollkommen zerstört waren und Risse gebildet hatten. Diese Tatsache wurde auf das zu starke Eintrocknen der Proben während der Lagerung über Nacht im Heizofen bei 50 °C zurückgeführt.

Als Lösung hierfür wurde der Versuch nochmals durchgeführt, jedoch diesmal die Hybridisierung über Nacht in einer Feuchtkammer durchgeführt. Diesmal waren die Proben nicht zerstört, jedoch im Konfokalmikroskop keine Bakterien zu erkennen. Dies kann mehrere Gründe haben.

Einer hierfür war möglicherweise die Auswahl eines falschen Darmabschnitts oder einer falschen Schnitttechnik. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden die Gewebeschnitte vom distalen Colon erstellt. Aus diesem Grund wurden sowohl das proximale, als auch das distale Colon entnommen, aus beiden Teilen die Herstellung von sowohl Longitudinal- als auch Transversalschnitten veranlasst und nach der Entparaffinierung eine Gramfärbung durchgeführt (s. Abbildung 20). Es zeigte sich, dass in den Schnitten des Colons kaum Bakterien vorzufinden waren, im proximalen Colon jedoch eine Vielzahl davon. Dies wurde zurückgeführt auf die hohe Reibung, die beim Absetzen von Fäzes entsteht und dadurch die Bakterenschicht mit herauslösen kann. Die Transversalschnitte stellten sich für die Auswertung als geeigneter heraus, da in den Longitudinalschnitten teilweise eine Überlagerung mit Gewebe zu sehen war. Deshalb wurden ab diesem Zeitpunkt nur noch Transversalschnitte des proximalen Colons verwendet.

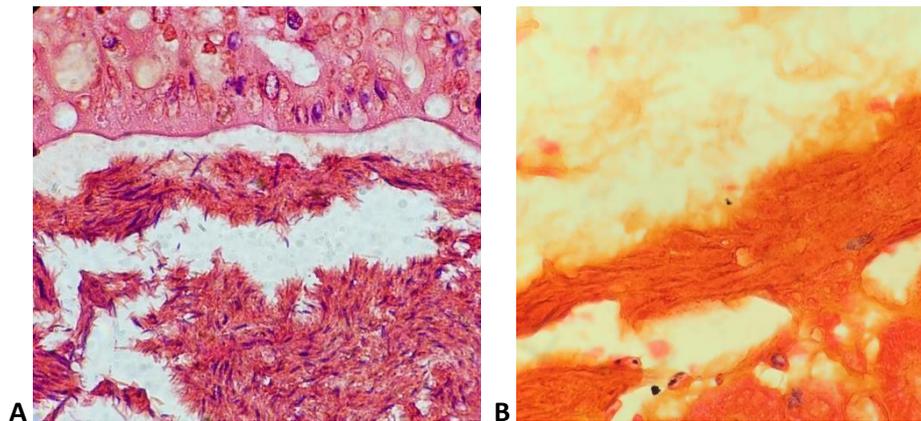


Abbildung 20: Gram-Färbung zur Überprüfung der Anwesenheit von Bakterien. Aus Wildtyp Mäusen wurde ein Teil des Colons entnommen und in Paraffin eingelegt. Nach Entparaffinierung wurde eine Gramfärbung zur Überprüfung der Anwesenheit von Bakterien in den Gewebeschnitten durchgeführt. **A:** Proximaler Colon, Transversalschnitt; **B:** Distaler Colon, Longitudinalschnitt

Ein weiterer Grund für die Abwesenheit von Bakterien konnte jedoch auch ein Herauslösen der Bakterien durch Schütteln oder zu starkes Waschen sein. Deshalb wurden mit den neuen Schnitten nochmals die Entparaffinierung sowie der FISH nach dem letzten Protokoll durchgeführt und nach jedem Schritt eine Gramfärbung angehängt, um zu sehen, ob noch ausreichend Bakterien in den Schnitten vorhanden waren. Es stellte sich heraus, dass die Bakterienzahl bis zum Ende der Färbungen stark reduziert war (Ergebnisse nicht dargestellt). Auch bei der Wiederholung der Färbung mit Einfügen einer Hitzefixierung der Schnitte nach der Entparaffinierung erbrachte der Vorgang keine Verbesserung des Befunds.

Aus diesem Grund musste eine Reduktion der Waschzeiten bzw. Waschschrte sowie eine Variation der verwendeten Puffer durchgeführt werden. Hierfür wurden FISH und Immunfluoreszenz kombiniert, da durch das Hinzufügen aller Waschschrte beider Protokolle noch ein schlechteres Ergebnis erwartet wurde und nur durch Optimierung aller Schritte ein gutes Endergebnis zu erreichen war.

3.4.10.4 Optimierung von FISH mit Immunfluoreszenz

Allgemein wurde ab diesem Punkt auf jegliches Waschen oder Blocken unter Schütteln verzichtet und alle Block- und Waschschrte ohne Schüttler durchgeführt.

Ausgehend von folgendem Protokoll wurden in den nächsten Schritten Variationen der Durchführung vorgenommen:

Die Entparaffinierung wurde nach Protokoll 3 durchgeführt. Danach wurden die Schnitte 2 Stunden in 10 % FCS in PBS geblockt. Anschließend wurde zweimal 5 Minuten in Ethanol 95 % gewaschen. Es wurden 500 ng der FISH Sonde für 16S gekoppelt an Cy3 ad 50 μ l FISH-Hybridisierungs-Puffer auf den Objektträger gegeben, mit Parafilm bedeckt, für 30 Minuten auf 60 °C erhitzt und danach über Nacht bei 50 °C im Heizofen in einer Feuchtkammer unter Lichtschutz gelagert. Nach dreimaligem Waschen für 5 Minuten in 10 % FCS in PBS wurde für 10 Minuten in FISH-Waschpuffer gewaschen. Nach nochmaligem Blocken für 30 Minuten in 10 % FCS in PBS bei 4 °C wurde der Erstantikörper anti-Muc2 in einer Konzentration von 1:200 in 50 μ l 10 % FCS in PBS auf den Objektträger gegeben, mit Parafilm bedeckt und in der Feuchtkammer bei 4 °C über Nacht gelagert. Nach kurzem Waschen und anschließendem dreimaligem Waschen für 5 Minuten in 10 % FCS in PBS wurde der Zweitantikörper Anti-mouse Alexa Fluor 488 1:200 in 50 μ l 10 % FCS in PBS auf den Objektträger gegeben, mit Parafilm abgedeckt und für 1 Stunde bei 4 °C in einer Feuchtkammer gelagert. Danach wurde nochmals kurz mit 10 % FCS in PBS gewaschen und eine Gegenfärbung mit Bisbenzimid 1:500 in 10 % FCS in PBS durchgeführt. Hiervon wurden wieder 50 μ l auf den Objektträger gegeben, dieser mit Parafilm abgedeckt und für 20 Minuten bei 4 °C in der Feuchtkammer gefärbt. Nach kurzem Waschen und danach dreimaligen Waschen für 5 Minuten in 10 % FCS in PBS wurde nochmals 5 Minuten mit PBS gewaschen. Die Schnitte wurden getrocknet und mit Dako Fluorescence Mounting Medium eingedeckelt. Die Aushärtung erfolgte bei 4 °C unter Lichtschutz und die Auswertung durch Konfokalmikroskopie.

a) Variation der Entparaffinierungszeit

Während der Entparaffinierung durchlaufen die Gewebeschnitte eine lange Waschphase in verschiedenen Lösungen. Um die Waschzeiten generell zu senken, wurde Protokoll 3 mit einem neuen Protokoll – Protokoll 4 – auf die Effektivität der Entparaffinierung hin verglichen (s. Tabelle 5). Protokoll 4 besaß weniger Waschschrte und würde somit ein geringeres Herauswaschen von Bakterien begünstigen, falls eine ausreichende Entparaffinierung gewährleistet ist. Durch die zusätzliche Mitaufnahme einer Erhitzung während der ersten Entparaffinierungsschritte sollte eine effektive Entparaffinierung trotz Einsparung von vier Waschschrten erfolgen.

Tabelle 5: Gegenüberstellung der Entparaffinierungsprotokolle 3 und 4. In dieser Tabelle ist die Durchführung der Protokolle 3 und 4 zur Entparaffinierung von Gewebeschnitten des Colons aufgeführt. **min** = Minuten; **RT** = Raumtemperatur

Entparaffinierung nach Protokoll 3	Entparaffinierung nach Protokoll 4
- 30 min Erhitzen bei 42 °C	- 10 min Erhitzen auf 60 °C
- 2x 10 min Roticlear bei RT	- 2x 10 min Roticlear bei 60 °C
- 2x 5 min Ethanol 100 % bei RT	- 1x 5 min Ethanol 100 % bei RT
- 1x 5 min Ethanol 96 % bei RT	- 1x 5 min Ethanol 96 % bei RT
- 1x 5 min Ethanol 70 % bei RT	
- 1x 5 min Ethanol 50 % bei RT	
- 1x 2 min Aqua destillata bei RT	

Bei Vergleich der Entparaffinierung nach Protokoll 3 und Protokoll 4 stellte sich heraus, dass auch durch Protokoll 4 eine effektive Entparaffinierung erfolgte und sich dadurch für Protokoll 4 aufgrund der Einsparung von vier Waschschritten entschieden wurde.

b) Variation der Block- und Waschzeiten nach der Entparaffinierung und vor der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung

Es wurde getestet, ob eine Reduktion der Blockzeit und eine Reduktion der Waschschrritte nach der Entparaffinierung der Gewebeschnitte vor der Durchführung der Hybridisierung zu einem akzeptablen Hybridisierungsergebnis bei Reduktion des Herauslösens von Bakterien führen kann (s. Tabelle 6).

Tabelle 6: Gegenüberstellung der zu testenden Variationen des Blockens und Waschens nach Entparaffinierung und vor Durchführung der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung. In dieser Tabelle ist die vorausgegangene Methode sowie vier alternativ zu testende Methoden zum Blocken nach Entparaffinierung sowie des Waschens nach dem Blocken vor Durchführung der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung aufgeführt. **FCS** = Fetal calf serum; **FISH** = Fluoreszenz in-situ Hybridisierung; **h** = Stunden; **min** = Minuten; **PBS** = phosphat buffered saline

Protokoll	Blocken nach Entparaffinierung	Waschen nach Blocken vor FISH
vorher	2 h in 10 % FCS in PBS	2x 5 min in Ethanol 95 %
Neu 1	30 min in 10 % FCS in PBS	1x 5 min in Ethanol 95 %
Neu 2	30 min in 10 % FCS in PBS	-
Neu 3	-	-
Neu 4	5 min in 10 % FCS in PBS	-

Im Vergleich zum Ursprungsprotokoll gab es auch in Protokoll Neu 1 und Neu 2 nach Auswertung über die Konfokalmikroskopie ein starkes Herauswaschen von Bakterien. Zwischen Neu 3 und Neu 4 zeigte sich kein wesentlicher Unterschied im Hintergrundrauschen, weshalb auch auf den zusätzlichen Schritt des Blockens nach Entparaffinierung vor Durchführung des FISHs verzichtet werden konnte. Zu diesem Zeitpunkt wurde das Protokoll in folgenden Ablauf geändert:

Die Entparaffinierung wurde nach Protokoll 4 durchgeführt. ~~Danach wurden die Schnitte 2 h in 10 % FCS in PBS geblockt. Anschließend wurde 2x 5 Minuten in Ethanol 95 % gewaschen.~~ Es wurden 500 ng

der FISH Sonde für 16S gekoppelt an Cy3 ad 50 μ l FISH-Hybridisierungs-Puffer auf den Objektträger gegeben, mit Parafilm bedeckt, für 30 Minuten auf 60 °C erhitzt und danach über Nacht bei 50 °C im Heizofen in einer Feuchtkammer unter Lichtschutz gelagert. [...]

c) Beeinflussung der Hybridisierungsreaktion durch Zugabe verschiedener Substanzen

Es wurde versucht, durch Eingriff in die Hybridisierungsreaktion eine stärkere bzw. schnellere Färbung der Proben durch die Hybridisierungssonden zu erreichen und dadurch eine geringere Hybridisierungszeit bei gleichem Endergebnis zu erzielen. Außerdem wurde versucht, die Hybridisierungszeit durch Zugabe eines „Hybridisierungs-Verbesserers“ zu senken (s. Tabelle 7).

Lysozym sollte hierbei zu einer besseren Durchgängigkeit der Strukturen der Gewebeschnitte führen und damit eine erhöhte Penetrationsfähigkeit der Sonden zu den Bakterien ermöglichen. PolyDIDC (Poly-deoxy-inosinic-deoxy-cytidylic acid) hingegen sollte als eine Art Block-Agens fungieren.

Tabelle 7: Gegenüberstellung der zu testenden Variationen der Hybridisierung bei Durchführung der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung. In dieser Tabelle ist die vorausgegangene Methode sowie drei alternativ zu testende Methoden zur möglichen Verbesserung der Hybridisierung bei Durchführung der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung sowie eine Methode zur Reduktion der Hybridisierungsdauer aufgeführt. **FISH** = Fluoreszenz in-situ Hybridisierung; **min** = Minuten; **PolyDIDC** = Poly-deoxy-inosinic-deoxy-cytidylic acid; **ü.N.** = über Nacht

Protokoll	Zusatz zu 500 ng Sonde in 50 μ l FISH-Hybridisierungspuffer	Hybridisierungs-Zeit und -Temperatur
vorher	-	30 min bei 60 °C danach ü.N. bei 50 °C
Neu 1	1 μ g/ μ l Lysozym	30 min bei 60 °C danach ü.N. bei 50 °C
Neu 2	PolyDIDC 1:20	30 min bei 60 °C danach ü.N. bei 50 °C
Neu 3	-	30 min bei 60 °C danach 4 h bei 50 °C

Die Auswertung erfolgte am Konfokalmikroskop. Bei Protokoll Neu 3 wurde ein geringeres Signal für die Fluoreszenz in-situ Hybridisierung gefunden. Deshalb war davon auszugehen, dass die alleinige Reduktion der Hybridisierungszeit zu keiner Verbesserung der Ergebnisse führen würde. Für Protokoll Neu 2 ließ sich kein Unterschied zum ursprünglichen Protokoll feststellen. Auch durch Protokoll Neu 1 konnte keine Verbesserung der Hybridisierung erreicht werden. Nur eine geringe Reduktion des Hintergrundrauschens war zu erkennen. Deshalb wurde entschieden, weder die Hybridisierungszeit zu reduzieren noch mit dem Zusatz von möglichen „Hybridisierungs-Verbesserern“ zu arbeiten.

d) Variation der Block- und Waschzeiten nach der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung und vor der Immunfluoreszenz

Als nächstes wurde der Einfluss der Wasch- und Blockzeit direkt im Anschluss an die Fluoreszenz in-situ Hybridisierung vor Beginn der Durchführung der Immunfluoreszenz (IF) getestet (s. Tabelle 8).

Tabelle 8: Gegenüberstellung der zu testenden Variationen des Waschens sowie des Blockens nach der Hybridisierung bei Durchführung der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung. In dieser Tabelle ist die vorausgegangene Methode sowie sechs alternativ zu testende Methoden zum Waschen und Blocken nach Hybridisierung bei Durchführung der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung aufgeführt. **FCS** = Fetal calf serum; **FISH** = Fluoreszenz in-situ Hybridisierung; **min** = Minuten; **PBS** = Phosphat buffered saline

Protokoll	Waschen nach FISH	Blocken nach FISH (bei 4 °C)
vorher	3x 5 min in 10 % FCS in PBS 10 min in FISH Waschlösung	30 min in 10 % FCS in PBS
Neu 1	-	30 min in 10 % FCS in PBS
Neu 2	20 min in FISH Waschlösung bei 50 °C	30 min in 10 % FCS in PBS
Neu 3	-	5 min in 10 % FCS in PBS
Neu 4	20 min in FISH Waschlösung bei 50 °C	5 min in 10 % FCS in PBS
Neu 5	-	-
Neu 6	20 min in FISH Waschlösung bei 50 °C	-

Bei den Protokollen Neu 1, Neu 3, Neu 4, Neu 5 und Neu 6 ließ sich ein zu hohes Signal und starkes Hintergrundrauschen feststellen. Dies lag zum einen an einem zu geringen Herauswaschen der nicht gebundenen Sonden, zum anderen an einem zu geringen Blocken vor Durchführung der Immunfluoreszenz. Protokoll Neu 2 zeigte im Vergleich zum Ursprungsprotokoll ein nur geringes Signalrauschen bei Reduktion von drei Waschschrritten. Die höhere Temperatur des neuen Waschschrtritts ermöglichte eine langsamere Abkühlung der Proben und dadurch besseres Entfernen der nicht gebundenen Sonde. Die Ergebnisse dieses Versuchsteils sind in Abbildung 21 zusammengefasst.

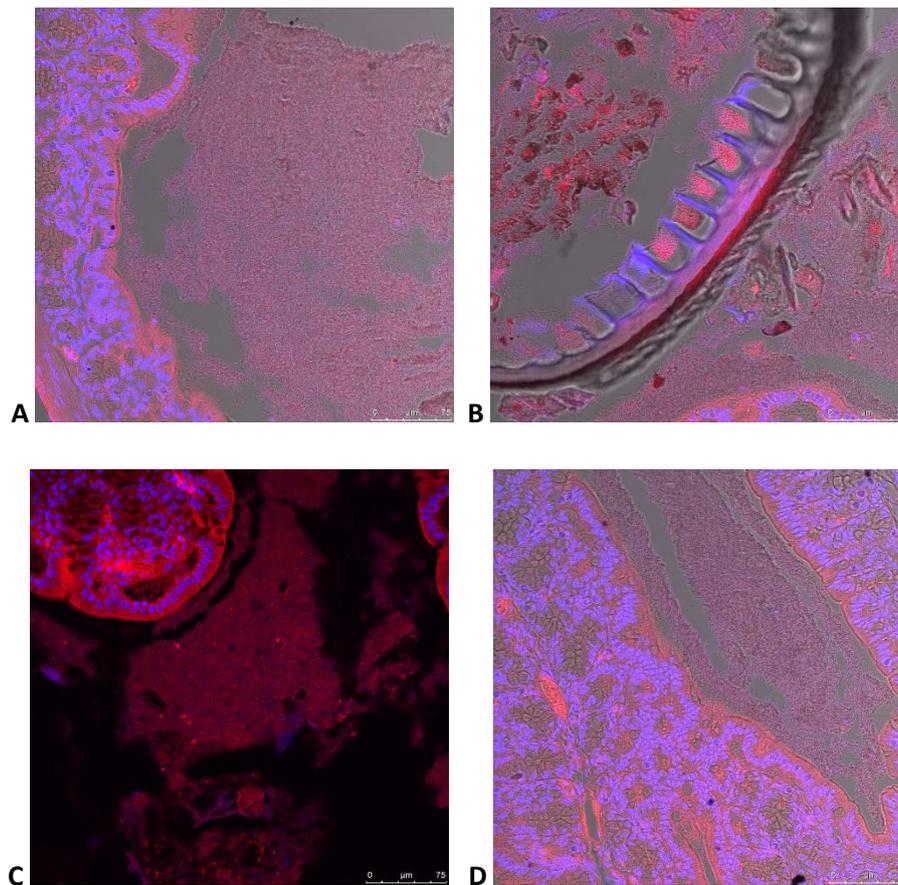


Abbildung 21: Beispiele der Testung neuer Wasch- und Blockmethoden nach Durchführung der Hybridisierung im FISH-Assay. Gewebeschnitte des proximalen Colons wurden entparaffiniert, es wurde eine Fluoreszenz in-situ Hybridisierung mit einer 16S-Sonde und anschließend eine Immunfluoreszenz für anti-Muc2 durchgeführt. **Blau:** Bisbenzimid-Färbung; **Rot:** Muc2-Färbung. **A + B:** Methode 5 – kein Waschen und Blocken nach FISH und vor IF. **C + D:** Methode 6 – 20 min Waschen mit FISH-Waschpuffer bei 50 °C, kein Blocken. Bei C ist kein durchlichtmikroskopisches Bild hinterlegt.

Aus diesem Grund wurde das Protokoll wie folgt geändert:

[...] Es wurden 500 ng der FISH Sonde für 16S gekoppelt an Cy3 ad 50 μ l FISH-Hybridisierungs-Puffer auf den Objektträger gegeben, mit Parafilm bedeckt, für 30 Minuten auf 60 °C erhitzt und danach über Nacht bei 50 °C im Heizofen in einer Feuchtkammer unter Lichtschutz gelagert. ~~Nach dreimaligem Waschen für 5 Minuten in 10 % FCS in PBS wurde~~ Es wurde für ~~10~~ 20 Minuten in FISH Waschpuffer gewaschen. Nach nochmaligem Blocken für 30 Minuten in 10 % FCS in PBS bei 4 °C wurde der Erstantikörper anti-Muc2 in einer Konzentration von 1:200 in 50 μ l 10 % FCS in PBS auf den Objektträger geben, mit Parafilm überdeckt und in der Feuchtkammer bei 4 °C über Nacht gelagert.
[...]

e) Variation der Konzentration von FCS in PBS zum Blocken

Es wurde getestet, ob eine Reduktion des FCS von 10 % in PBS zu 5 % in PBS eine ausreichende Qualität des Blockens gewährleistet und zu einer Verbesserung der Signale führt. Dies konnte durch Herabsenken der FCS-Konzentration erreicht werden (Ergebnisse nicht abgebildet).

f) Variation der Waschzeiten, Puffer und Inkubationszeit der Immunfluoreszenz

Eine weitere Reduktion von Waschschritten konnte über Variation der Waschhäufigkeit während der Durchführung der Immunfluoreszenz erfolgen. Außerdem sollte getestet werden, ob eine Reduktion der langen Inkubationszeit des Erstantikörpers möglich wäre. Des Weiteren wurde getestet, ob der Waschpuffer sowie der Puffer zur Aufnahme der Antikörper von 10% FCS in PBS in reines PBS verändert werden kann. Das Waschen der Gewebeschnitte wurde im neuen Protokoll bei 4 °C durchgeführt, um nicht durch höhere Temperatur ein Ablösen des Probenmaterials zu begünstigen (s. Tabelle 9).

Tabelle 9: Gegenüberstellung verschiedener Immunfluoreszenzprotokolle. In dieser Tabelle sind Variationen der Durchführung der Immunfluoreszenz nach FISH von Gewebeschnitten des Colons aufgeführt. **FCS** = Fetal calf serum; **h** = Stunden; **min** = Minuten; **PBS** = Phosphat buffered saline; **ü.N.** = über Nacht

Protokoll	Immunfluoreszenz alt	Immunfluoreszenz neu
Erstantikörper	anti-Muc2 1:200 in 10 % FCS in PBS ü.N. bei 4 °C	anti-Muc2 1:200 in PBS 3 h bei 4 °C
Waschen	1x kurz in 10 % FCS in PBS 3x 5 min in 10 % FCS in PBS	1x kurz in PBS 1x 5 min in PBS bei 4 °C
Zweitantikörper	Anti-mouse Alexa Fluor 488 1:200 in 10 % FCS in PBS 1 h bei 4 °C	Anti-mouse Alexa Fluor 488 1:200 in PBS 1 h bei 4 °C
Waschen	1x kurz in 10 % FCS in PBS	1x kurz in PBS 1x 5 min in PBS bei 4 °C
Gegenfärben	Bisbenzimid 1:500 in 10 % FCS in PBS 20 min bei 4 °C	Bisbenzimid 1:500 in PBS 20 min bei 4 °C
Waschen	1x kurz waschen in 10 % FCS in PBS 3x 5 min in 10 % FCS in PBS 1 x 5 min in PBS	1x kurz in PBS 1x 5 min in PBS bei 4 °C

Die Änderung zum neuen Immunfluoreszenz-Protokoll erbrachte eine Steigerung des FISH-Signals (Ergebnisse nicht abgebildet), deshalb wurde das Protokoll wie folgt geändert:

[...] Nach nochmaligem Blocken für 30 Minuten in 10 % FCS in PBS bei 4 °C wurde der Erstantikörper anti-Muc2 in einer Konzentration von 1:200 in 50 μ l ~~10 % FCS in~~ PBS auf den Objektträger geben, mit Parafilm überdeckt und in der Feuchtkammer bei 4 °C ~~über Nacht~~ für 3 Stunden gelagert. Nach kurzem Waschen und anschließendem ~~dreimaligem~~ Waschen für 5 Minuten in ~~10 % FCS in~~ PBS wurde der Zweitantikörper Anti-mouse Alexa Fluor 488 1:200 in 50 μ l ~~10 % FCS in~~ PBS auf den Objektträger

gegeben, mit Parafilm abgedeckt und für 1 Stunde bei 4 °C in einer Feuchtkammer gelagert. Danach wurde nochmals kurz und anschließend für 5 Minuten mit ~~10 % FCS in PBS~~ gewaschen und eine Gegenfärbung mit Bisbenzimid 1:500 in ~~10 % FCS in PBS~~ durchgeführt. Hiervon wurden wieder 50 μ l auf den Objektträger gegeben, dieser mit Parafilm abgedeckt und für 20 Minuten bei 4 °C in der Feuchtkammer gefärbt. Nach kurzem Waschen ~~und danach dreimaligen Waschen für 5 Minuten in 10 % FCS~~ wurde nochmals 5 Minuten mit PBS gewaschen. Die Schnitte wurden getrocknet und mit Dako Fluorescence Mounting Medium eingedeckelt. Die Aushärtung erfolgte bei 4 °C unter Lichtschutz und die Auswertung durch Konfokalmikroskopie.

g) Variation der Gegenfärbung mit Bisbenzimid in Inkubationszeit und Konzentration

Um eine weitere Inkubationszeit zu kürzen, wurde ausprobiert, ob eine Erhöhung der Konzentration von Bisbenzimid von 1:500 auf 1 μ g/ml in PBS eine Reduktion der Inkubationszeit von 20 Minuten auf 5 Minuten möglich macht.

Dies führte jedoch zu dem Ergebnis, dass die Bisbenzimid-Färbung der Zellkerne den Rest der Färbung durch ein zu hohes Signal komplett überdeckte (s. Abbildung 22). Deshalb wurde die Bisbenzimid-Färbung bei 1:500 in PBS für 20 Minuten bei 4 °C belassen.

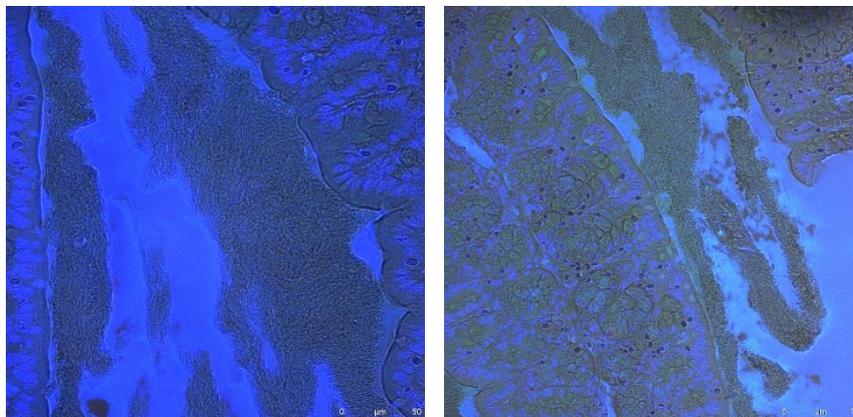


Abbildung 22: Durchführung einer Fluoreszenz in-situ Hybridisierung mit 16S-Cy3 Sonde sowie einer Immunfluoreszenz mit anti-Muc2. Es wurde Gewebe vom proximalen Colon von Wildtyp Mäusen entnommen und nach Entparaffinierung, FISH-Färbung für 16S (grün) sowie einer Immunfluoreszenz gegen Muc2 (rot) eine Gegenfärbung mit 1 μ g/ml Bisbenzimid (blau) für 5 Minuten in PBS durchgeführt. **FISH** = Fluoreszenz in-situ Hybridisierung; **Muc2** = Mucin 2

h) Variation der Fixationszeit in Methanol-Carnoy's fixative

Um weitere Zeit des Darmgewebes in verschiedenen Lösungen einzusparen, wurde die Fixationszeit nach Entnahme des Darmgewebes bis zur Dehydrierung in der Pathologie variiert. Es wurde eine

Fixationszeit von 4 Stunden mit einer Fixationszeit von 2 Stunden und von 1 Stunde verglichen. Hierbei zeigte sich bei einer Fixationszeit von 2 Stunden und 1 Stunde ein intensiveres Signal als bei einer Fixationszeit von 4 Stunden. Jedoch war bei einer Fixationszeit von 1 Stunde noch keine gänzliche Durchdringung des Darmgewebes mit Methanol-Carnoy's fixative zu beobachten. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 23 aufgeführt.

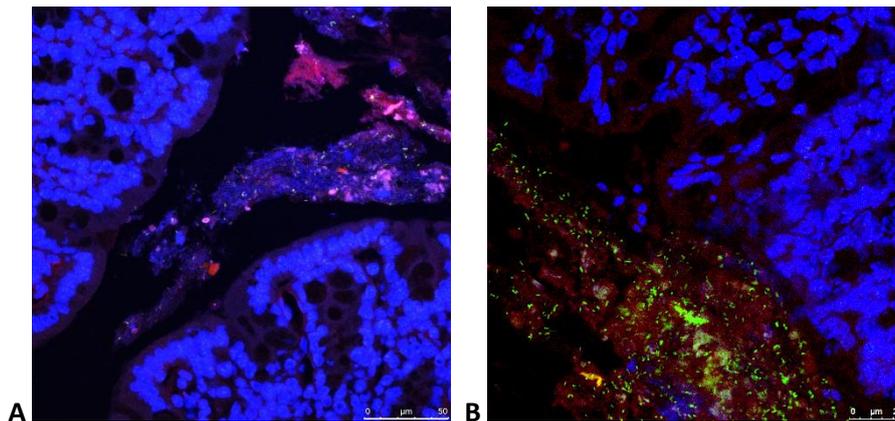


Abbildung 23: Vergleich der Fixationszeit für Colon-Gewebe vor einer Fluoreszenz in-situ Hybridisierung mit anschließender Immunfluoreszenz. Es wurde Gewebe vom proximalen Colon von Wildtyp Mäusen entnommen und nach Entparaffinierung, FISH-Färbung für 16S (grün) sowie einer Immunfluoreszenz gegen Muc2 (rot) eine Gegenfärbung mit Bisbenzimid (blau) durchgeführt. Hierbei wurden die Fixationszeiten bis zum Dehydrieren der Proben vor Einbettung in Paraffin verglichen. **A:** Fixationszeit von 4 h; **B:** Fixationszeit von 2 h. **FISH** = Fluoreszenz in-situ Hybridisierung; **Muc2** = Mucin 2

i) Endprotokoll FISH plus Immunfluoreszenz mit anti-Muc2

Ab diesem Zeitpunkt wurde das Protokoll in folgendes Endprotokoll umgewandelt:

Nach Entnahme eines Teils des proximalen Colons wurde das Gewebe für 2 Stunden in Methanol-Carnoy's fixative fixiert und anschließend in der Pathologie in der Arbeitsgruppe von Dr. med. Felix Lasitschka dehydriert und in Paraffin eingelegt. Es wurden Transversalschnitte angefertigt. Diese wurden zur Entparaffinierung für 10 Minuten auf 60 °C erhitzt. Danach wurden die Objektträger zweimal für 10 Minuten bei 60 °C in Roticlear eingelegt. Daraufhin wurde einmal für 5 Minuten in Ethanol 100 % bei Raumtemperatur und danach einmal für 5 Minuten in Ethanol 96 % bei Raumtemperatur entparaffiniert.

Es wurden 500 ng der FISH Sonde für 16S gekoppelt an Cy3 ad 50 μ l FISH-Hybridisierungs-Puffer auf den Objektträger gegeben, mit Parafilm bedeckt, für 30 min auf 60 °C erhitzt und danach über Nacht bei 50 °C im Heizofen unter Lichtschutz gelagert. Es wurde für 20 min in FISH Waschpuffer gewaschen.

Nach nochmaligem Blocken für 30 Minuten in 10 % FCS in PBS bei 4 °C wurde der Erstantikörper anti-Muc2 in einer Konzentration von 1:200 in 50 μ l PBS auf den Objektträger gegeben, mit Parafilm überdeckt und in der Feuchtkammer bei 4 °C für 3 Stunden gelagert. Nach kurzem Waschen und anschließendem Waschen für 5 Minuten in PBS wurde der Zweitantikörper Anti-mouse Alexa Fluor 488 1:200 in 50 μ l PBS auf den Objektträger gegeben, mit Parafilm abgedeckt und für 1 Stunde bei 4 °C in einer Feuchtkammer gelagert. Danach wurde nochmals kurz und anschließend für 5 Minuten mit PBS gewaschen und eine Gegenfärbung mit Bisbenzimid 1:500 in PBS durchgeführt. Hiervon wurden wieder 50 μ l auf den Objektträger gegeben, dieser mit Parafilm abgedeckt und für 20 Minuten bei 4 °C in der Feuchtkammer gefärbt. Nach kurzem Waschen wurde nochmals 5 Minuten mit PBS gewaschen. Die Schnitte wurden getrocknet und mit Dako Fluorescence Mounting Medium eingedeckelt. Die Aushärtung erfolgte bei 4 °C unter Lichtschutz und die Auswertung durch Konfokalmikroskopie. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 24 abgebildet.

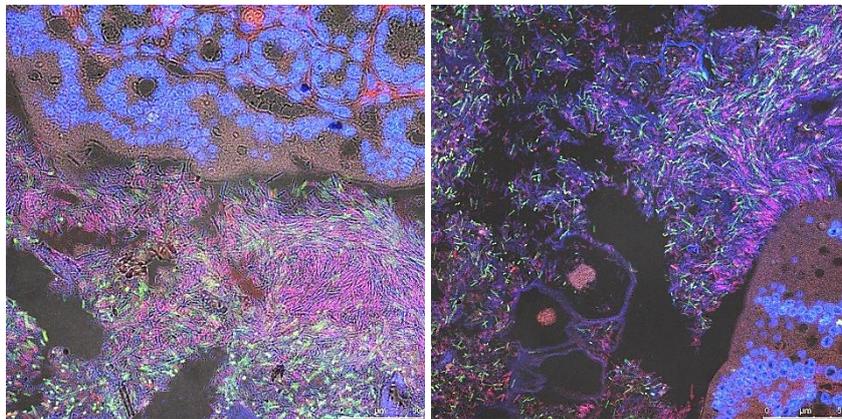


Abbildung 24: Beispielabbildungen nach Durchführung des endgültigen Protokolls der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung mit anschließender Immunfluoreszenz in Colon-Gewebe. Es wurde Gewebe vom proximalen Colon von Wildtyp Mäusen entnommen und nach Entparaffinierung, FISH-Färbung für 16S (grün) sowie einer Immunfluoreszenz gegen Muc2 (rot) eine Gegenfärbung mit Bisbenzimid (blau) durchgeführt. **FISH** = Fluoreszenz in-situ Hybridisierung; **Muc2** = Mucin 2

3.4.10.5 Positivprobe und Negativkontrollen

Um Anfärbung falscher Strukturen durch die Hybridisierungssonden auszuschließen und ihre Eigenschaften in der Färbung von *Akkermansia muciniphila* bzw. in der Färbung von allen Bakterien über 16S zu bestätigen, wurden Positiv- und Negativproben für die 16S-Cy3 sowie die Akk-Cy5 Sonde durchgeführt. Die Sonde für *Akkermansia* wurde als Positivprobe an *Akkermansia muciniphila* getestet und als Negativprobe an *Staphylococcus aureus*. Für die 16S Sonde erfolgte die Positivkontrolle an *Akkermansia muciniphila* und *Staphylococcus aureus*. Des Weiteren wurde eine Positivprobe für eine Doppelfärbung mit der Akk-Cy5 und der 16S-Cy3 Sonde mit *Akkermansia muciniphila* durchgeführt, sowie eine Doppelfärbung als Negativkontrolle für die Akk-Cy5-Sonde an *Staphylococcus aureus* mit

Akk-Cy5 und 16S-Cy3. Hierfür wurden die Bakterien auf einen Objektträger ausgestrichen und nach Hitze-fixierung 500 ng der Sonde bzw. jeweils 500 ng je Sonde ad 50 μ l Hybridisierungspuffer für 30 Minuten im Heizofen bei 60 °C erhitzt und danach erfolgte die Hybridisierung über Nacht bei 50 °C im Heizofen in einer Feuchtkammer unter Lichtschutz. Danach wurden die Schnitte kurz mit FISH-Waschpuffer gewaschen und danach in Waschpuffer für 20 Minuten bei 50 °C gelegt. Nach Zudeckeln mit Dako Fluorescence Mounting Medium und Trocknung wurden die Proben über Konfokalmikroskopie ausgewertet. Das Emissionsmaximum der verwendeten Fluorophore lag für die Akk-Cy5 Sonde bei 666 nm und der 16S-Cy3 Sonde bei 568 nm (Cullander 1994; Ueberfeld und Walt 2004). Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 25 und Abbildung 26 abgebildet.

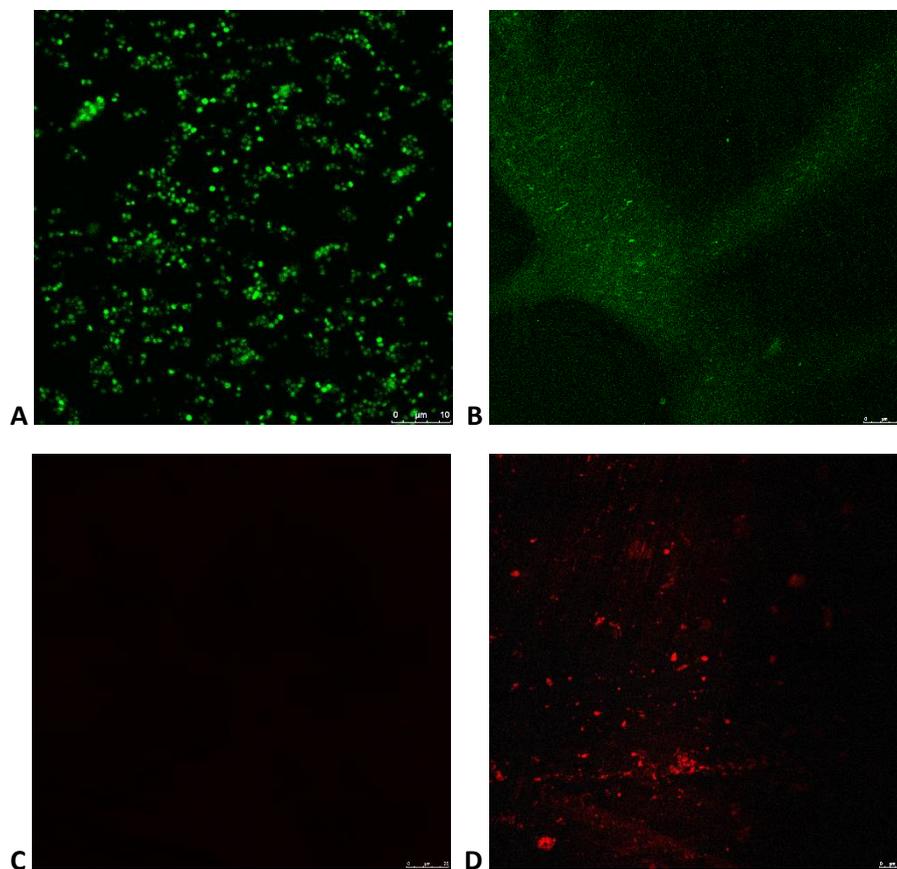


Abbildung 25: Positiv-Kontrolle und Negativ-Kontrolle der FISH-Sonden bei Verwendung von nur einer Sonde. Es wurden Bakterien auf einen Objektträger ausgestrichen und nach Hitze-fixierung eine Fluoreszenz in-situ Hybridisierung durchgeführt. Die Auswertung erfolgte am Konfokalmikroskop. Grün: 16S-Cy3; Rot: Akk-Cy5 **A:** Positiv-Kontrolle für die 16S-Cy3 Sonde, verwendeter Keim *Staphylococcus aureus*; **B:** Positiv-Kontrolle für 16S-Cy3 Sonde, verwendeter Keim *Akkermansia muciniphila*; **C:** Negativ-Kontrolle Akk-Cy5 Sonde, verwendeter Keim *Staphylococcus aureus*; **D:** Positiv-Kontrolle Akk-Cy5 Sonde, verwendeter Keim *Akkermansia muciniphila*. **FISH** = Fluoreszenz in-situ Hybridisierung

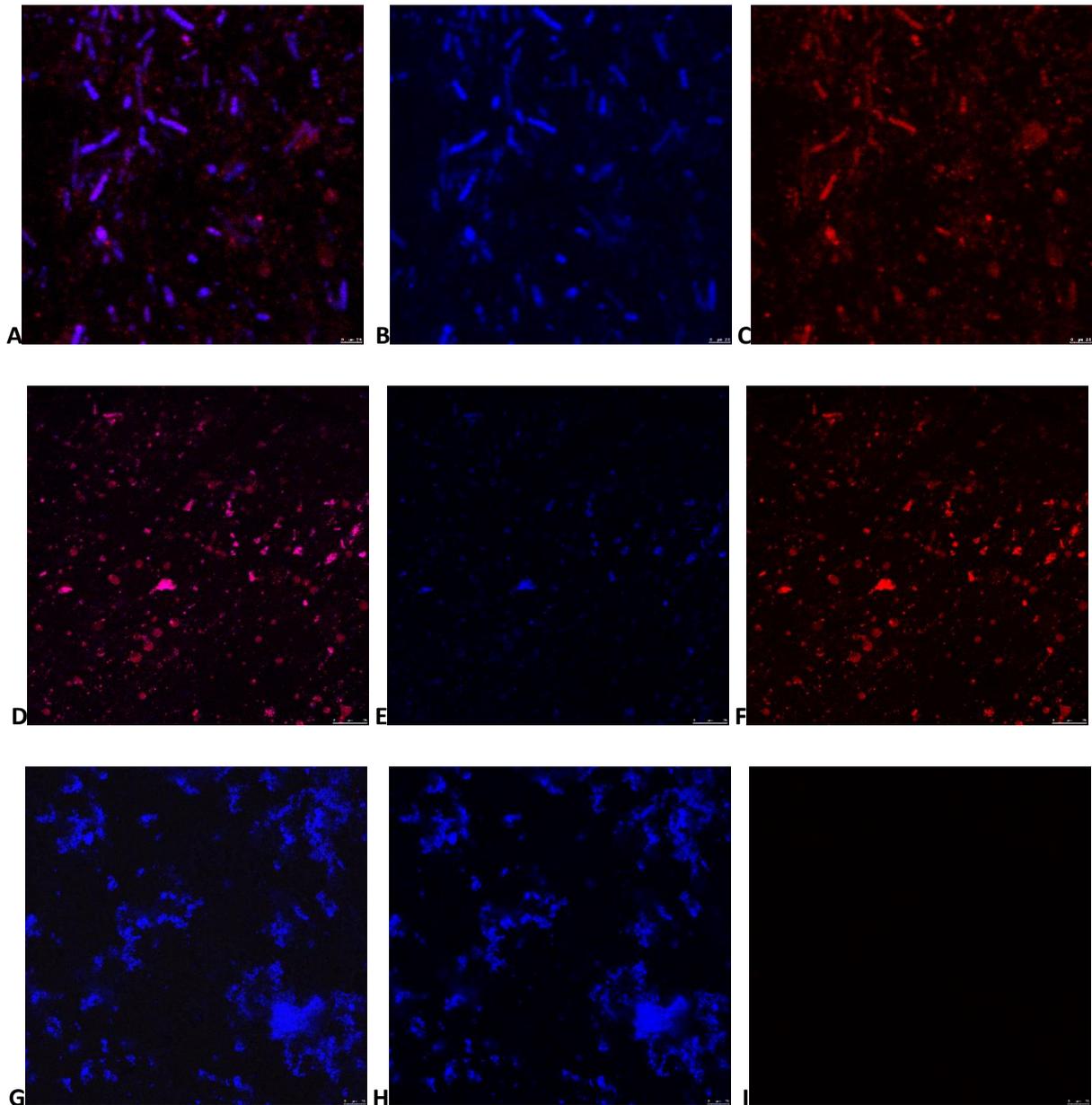


Abbildung 26: Positiv-Kontrolle und Negativ-Kontrolle der FISH-Sonden bei Doppelfärbung unter Verwendung beider Sonden. Es wurden Bakterien auf einen Objektträger ausgestrichen und nach Hitze-fixierung eine Fluoreszenz in-situ Hybridisierung durchgeführt. Die Auswertung erfolgte am Konfokalmikroskop. Blau: 16S-Cy3; Rot: Akk-Cy5; Lila: Überlagerung beider Sonden **A-F:** Positiv-Kontrolle für die 16S-Cy3 Sonde plus Akk-Cy5 Sonde, verwendeter Keim *Akkermansia muciniphila*; **A-C** von links nach rechts: Merge der Kanäle, Kanal für 16S-Cy3 Signal, Kanal für Akk-Cy5 Signal; **D-F** von links nach rechts: Merge der Kanäle, Kanal für 16S-Cy3 Signal, Kanal für Akk-Cy5 Signal. **G-I:** Negativ-Kontrolle für Akk-Cy5 Sonde bei gleichzeitiger Verwendung der 16S-Cy3 Sonde, verwendeter Keim *Staphylococcus aureus*; **G-I** von links nach rechts: Merge der Kanäle, Kanal für 16S-Cy3 Signal, Kanal für Akk-Cy5 Signal. **FISH** = Fluoreszenz in-situ Hybridisierung

Für die Doppelfärbung von 16S-Cy3 und Akk-Cy5 wurde auch das gesamte Protokoll an einer IL-1 β knockout Maus kontrolliert. Hier funktionierte die Doppelfärbung, sobald *Akkermansia* vorhanden war. Ein Beispiel ist in Abbildung 27 gezeigt.

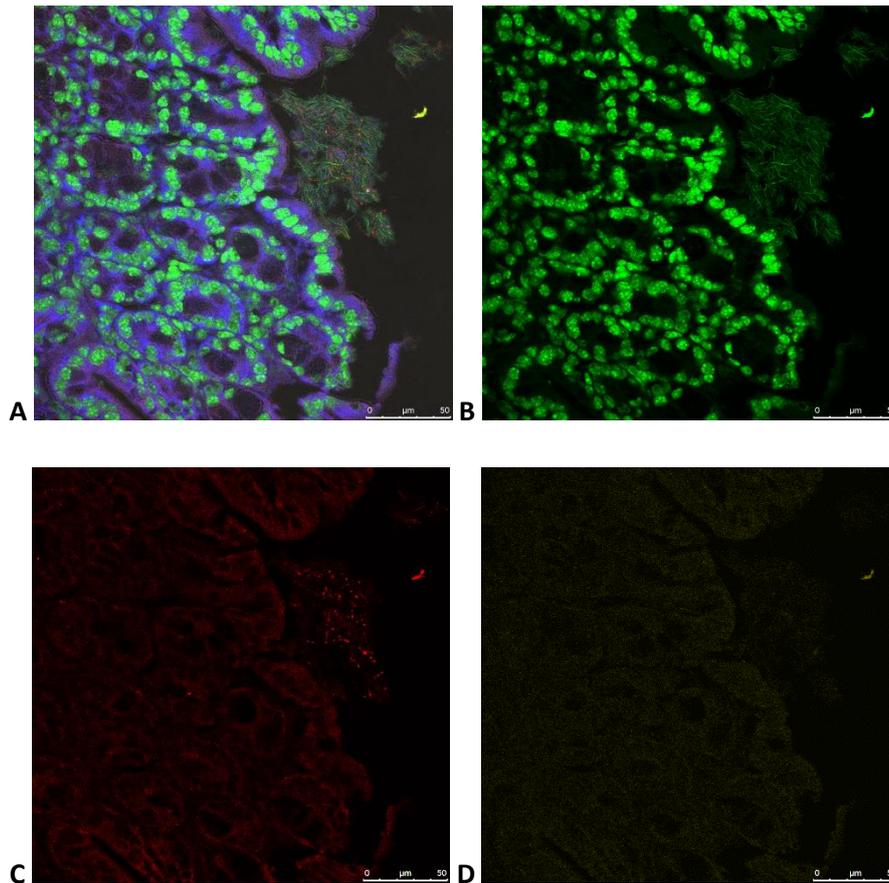


Abbildung 27: Kontrolle der gleichzeitigen Verwendung der 16S-Cy3 sowie Akk-Cy5 Sonde bei der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung mit anschließender Immunfluoreszenz mit anti-Muc2. Es wurde proximales Colon einer IL-1 β knockout Maus entnommen, Transversalschnitte erstellt und nach Entparaffinierung eine Fluoreszenz in-situ Hybridisierung mit 16S-Cy3 sowie Akk-Cy5 mit anschließender Immunfluoreszenz mit anti-Muc2 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte am Konfokalmikroskop. Grün: Bisbenzimidid; Blau: Muc2; Rot: 16S-Cy3; Gelb: Akk-Cy5 **A:** Merge der vier Kanäle. **B:** Kanal für Bisbenzimidid. **C:** Kanal für 16S-Cy3. **D:** Kanal für Akk-Cy5. **B-D:** In allen Kanälen ist im oberen rechten Quadranten ein Signal zu sehen. **FISH** = Fluoreszenz in-situ Hybridisierung

Des Weiteren wurde eine Negativkontrolle für die Immunfluoreszenz mit dem Zweitantikörper Anti-mouse Alexa Fluor 488 1:200 in PBS durchgeführt, um eine Testung des Bindungsverhaltens ohne Anwesenheit des üblichen Targets zu erproben (Ergebnisse nicht abgebildet). Hierfür wurde das Protokoll ohne Zugabe der Hybridisierungs-Sonden sowie ohne Zugabe des Erstantikörpers durchgeführt. Es zeigte sich keine Bindung des Zweitantikörpers bei Abwesenheit des Erstantikörpers (Ergebnisse nicht abgebildet).

3.4.10.6 Anti-Villin

Es wurde eine Alternative bzw. zweite Möglichkeit zur anti-Muc2 Immunfluoreszenz gesucht, da Muc2 nur eines der Mucine des Mukus darstellt und durch Konformationsänderungen möglicherweise in manchen Schnitten nicht optimal zur Kenntlichmachung der Trennung zwischen Darmgewebe und Lumen durch schwächere Bindung des Antikörpers geeignet ist. Daher wurde zusätzlich eine

Immunfluoreszenz mit anti-Villin etabliert. Villin ist ein Aktin-bindendes Protein, welches auf den Mikrovilli zu finden ist (Boller et al. 1988; Bretscher und Weber 1979). Anti-Villin sollte nicht im Mukus, sondern nur an der Mukosa-Oberfläche befindlich sein. Somit wird keine Überlagerung mit Bisbenzimid oder der 16S-Sonde erwartet, wie es bei Muc2 der Fall sein kann. Das Protokoll wurde beibehalten, jedoch wurde statt anti-Muc2 als Erstantikörper anti-Villin in einer Konzentration von 1:100 eingesetzt. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 28 aufgeführt.

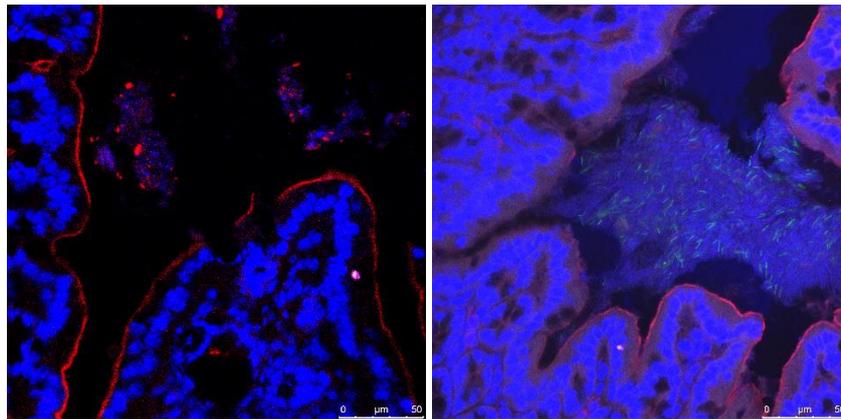


Abbildung 28: Durchführung einer Fluoreszenz in-situ Hybridisierung mit der Hybridisierungssonde 16S-Cy3 mit anschließender Immunfluoreszenz mit anti-Villin. Es wurde proximales Colon einer Wildtyp Maus entnommen, Transversalschnitte erstellt und nach Entparaffinierung eine Fluoreszenz in-situ Hybridisierung mit 16S-Cy3 mit anschließender Immunfluoreszenz mit anti-Villin durchgeführt. Die Auswertung erfolgte am Konfokalmikroskop. Beide Abbildungen stellen Beispiele für die Ergebnisse dieses Teilversuchs dar. Blau: Bisbenzimid; Rot: Villin; Gelb: 16S-Cy3

Anti-Villin zeigte ein gutes Signal im Konfokalmikroskop und eignete sich als Alternative zu anti-Muc2.

3.4.11 Vergleich der Penetration in den Mukus sowie der Quantität von *Akkermansia muciniphila* über den FISH-Assay mit anschließender Immunfluoreszenz

Zum Vergleich der Penetration von Bakterien im Allgemeinen und speziell *Akkermansia muciniphila* in den Mukus zur Mukosa-Oberfläche des Darms wurde eine Fluoreszenz in-situ Hybridisierung mit anschließender Immunfluoreszenz zur besseren Sichtbarkeit der Grenze zwischen Darmoberfläche und Darmlumen durchgeführt. Hierfür wurde ein Stück des proximalen Colons von IL-1 β knockout Mäusen sowie littermate Wildtyp Kontrollen entnommen. Auch von IL-1R knockout Tieren sowie littermate Wildtyp Kontrollen wurde ein Teil des proximalen Colons entnommen. Dieser wurde nach zweistündiger Fixierung in Methanol-Carnoy's fixative in der Pathologie von der Arbeitsgruppe von Dr. med. Felix Lasitschka dehydriert, in Paraffin eingelegt und mit dem Mikrotom Transversalschnitte erstellt. Nach Rücküberführung der Proben wurden die Gewebeschnitte entparaffiniert und anschließend eine Fluoreszenz in-situ Hybridisierung mit der Hybridisierungssonde 16S-Cy3 zur

Markierung aller Bakterien bzw. mit der Hybridisierungs-Sonde Akk-Cy5 zur Markierung von *Akkermansia muciniphila* mit anschließender Immunfluoreszenz gegen anti-Muc2, welches in einer Konzentration von 1:200 eingesetzt wurde, bzw. anti-Villin, welches in einer Konzentration von 1:100 eingesetzt wurde, durchgeführt. Als Zweitantikörper diente anti-Mouse Alexa Fluor 488 in einer Konzentration von 1:200. Anschließend erfolgte eine Gegenfärbung der DNA mit Bisbenzimid 1:500 in PBS für 20 Minuten bei 4 °C. Die Auswertung fand am Konfokalmikroskop statt.

Akkermansia muciniphila hat nur ein sehr geringes Vorkommen im Mikrobiom. Zwar ist es überrepräsentiert in IL-1 β knockout sowie IL-1R knockout Mäusen, jedoch stellt sich das Auffinden in den Gewebeschnitten trotzdem schwer dar.

Generell lässt sich bei IL-1 β knockout Mäusen sowie IL-1R knockout Mäusen im Vergleich zu ihren littermate Wildtyp Kontrollen eine stärkere Penetration von Bakterien durch den Mukus an die Zelloberfläche des Darmgewebes feststellen (s. Abbildung 29, Abbildung 30). Auch zeigt sich tendenziell eine gesteigerte Auffindbarkeit des Bakteriums *Akkermansia muciniphila* sowie eine geringere Distanz zur Mukosa-Oberfläche in den Gewebeschnitten der Knockout-Tiere (s. Abbildung 31, Abbildung 32, Abbildung 33). In den folgenden Abbildungen sind Beispiele für die beschriebenen Erkenntnisse gezeigt.

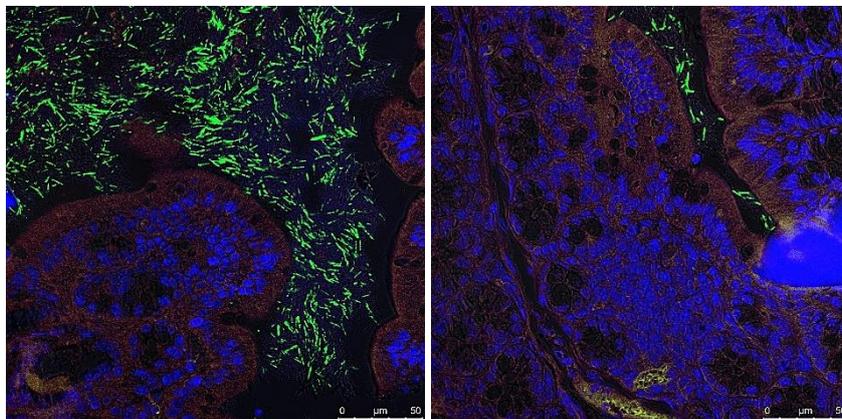


Abbildung 29: Die Distanz zwischen Mukosa-Oberfläche und Bakterien im proximalen Colon von IL-1 β knockout Mäusen ist sehr gering, sodass kein innerer Mukus-Layer mehr erkennbar ist. Es wurde proximaler Colon von IL-1 β knockout Mäusen sowie littermate Wildtyp Kontrollen entnommen, Transversalschnitte erstellt und nach Entparaffinierung eine Fluoreszenz in-situ Hybridisierung mit 16S-Cy3 mit anschließender Immunfluoreszenz mit anti-Muc2 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte am Konfokalmikroskop. Hier dargestellt sind Ergebnisse der IL-1 β knockout Mäuse. Beide Abbildungen stellen Beispiele für die Ergebnisse dieses Teilversuchs dar. Blau: Bisbenzimid; Rot: Muc2; Grün: 16S-Cy3. **IL-1 β** = Interleukin-1 β ; **Muc2** = Mucin2

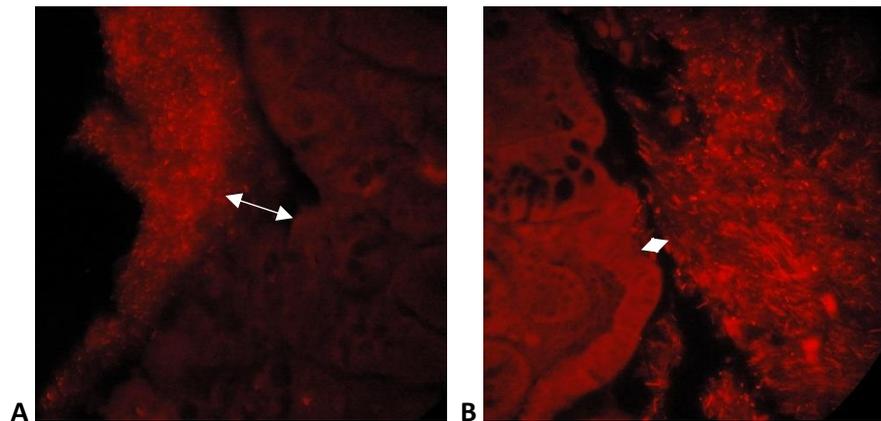


Abbildung 30: Während bei IL-1R Wildtyp Tieren eine Trennung zwischen innerem und äußerem Mucus-Layer erkennbar ist, können bei IL-1R knockout Tieren Bakterien bis zur Mukosa-Oberfläche durchdringen. Es wurde proximaler Colon von IL-1R knockout Mäusen sowie littermate Wildtyp Kontrollen entnommen, Transversalschnitte erstellt und nach Entparaffinierung eine Fluoreszenz in-situ Hybridisierung mit 16S-Cy3 mit anschließender Immunfluoreszenz mit anti-Muc2 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte am Konfokalmikroskop. Hier dargestellt sind Ergebnisse bei Durchsicht durch das Okular des Konfokalmikroskops. **A:** Wildtyp; **B:** IL-1R knockout. **IL-1R** = Interleukin-1-Rezeptor; **Muc2** = Mucin2

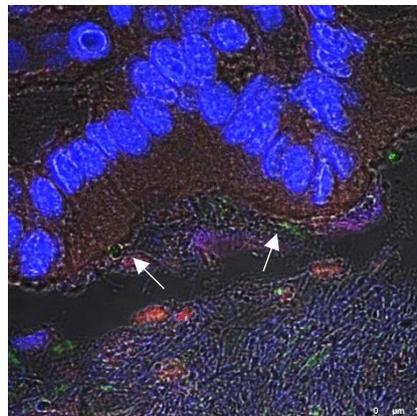


Abbildung 31: Bakterien können bei IL-1R knockout Tieren bis zur Mukosa-Oberfläche durchdringen. Es wurde proximaler Colon von IL-1R knockout Mäusen sowie littermate Wildtyp Kontrollen entnommen, Transversalschnitte erstellt und nach Entparaffinierung eine Fluoreszenz in-situ Hybridisierung mit 16S-Cy3 mit anschließender Immunfluoreszenz mit anti-Muc2 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte am Konfokalmikroskop. Blau: Bisbenzimid; Rot: Muc2; Grün: 16S-Cy3. **IL-1R** = Interleukin-1-Rezeptor; **Muc2** = Mucin2

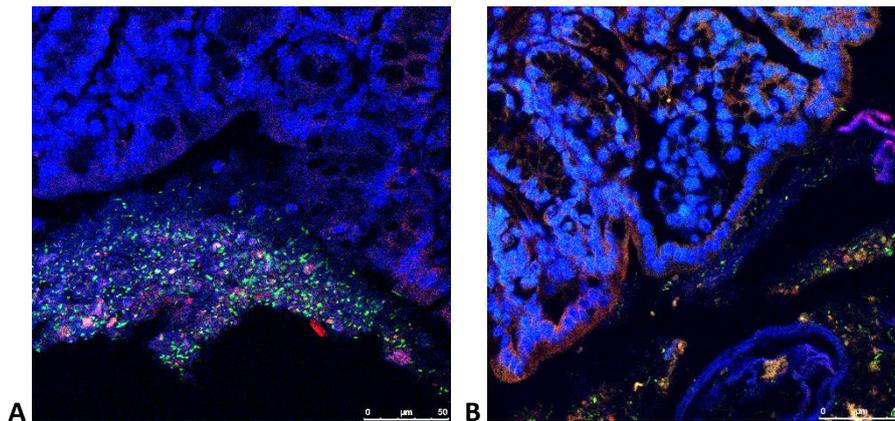


Abbildung 32: Bakterien ist es bei IL-1R knockout Mäusen möglich, durch den Mukus bis zur Mukosa-Oberfläche zu gelangen. Es wurde proximales Colon von IL-1R knockout Mäusen sowie littermate Wildtyp Kontrollen entnommen, Transversalschnitte erstellt und nach Entparaffinierung eine Fluoreszenz in-situ Hybridisierung mit 16S-Cy3 mit anschließender Immunfluoreszenz mit anti-Muc2 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte am Konfokalmikroskop. Blau: Bisbenzimid; Rot: Muc2; Grün: 16S-Cy3. **A:** Repräsentatives Beispiel einer IL-1R Wildtyp Maus. **B:** Repräsentatives Beispiel einer IL-1R knockout Maus. **IL-1R** = Interleukin-1-Rezeptor; **Muc2** = Mucin2

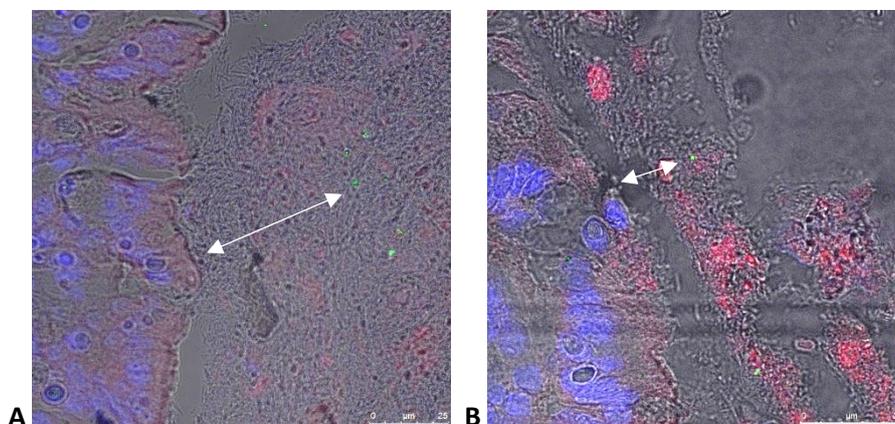


Abbildung 33: Die Distanz zwischen auffindbarer *Akkermansia muciniphila* in Gewebeschnitten des proximalen Colons bei IL-1R knockout Mäusen ist geringer im Vergleich zu ihren littermate Wildtyp Kontrollen. Es wurde proximales Colon von IL-1R knockout Mäusen sowie littermate Wildtyp Kontrollen entnommen, Transversalschnitte erstellt und nach Entparaffinierung eine Fluoreszenz in-situ Hybridisierung mit Akk-Cy5 mit anschließender Immunfluoreszenz mit anti-Muc2 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte am Konfokalmikroskop. Blau: Bisbenzimid; Rot: Muc2; Grün: Akk-Cy5. **A:** Repräsentatives Beispiel einer IL-1R Wildtyp Maus. **B:** Repräsentatives Beispiel einer IL-1R knockout Maus. **Akk** = *Akkermansia muciniphila*; **IL-1R** = Interleukin-1-Rezeptor; **Muc2** = Mucin2

3.4.12 Untersuchung der IgG-Bindung an Bakterien

Der Mukus zusammen mit den in ihm angereicherten antimikrobiellen Peptiden soll einen direkten Kontakt von Mikroorganismen mit der Epithelschicht verhindern. Bakterien, die es schaffen, die Mukus-Barriere zu überwinden, besitzen eine höhere Wahrscheinlichkeit, auch die Darm-Blut-Barriere zu passieren und mit dem systemischen Immunsystem in Berührung zu kommen. Um zu untersuchen, ob eine erhöhte Exposition des systemischen Immunsystems mit *Akkermansia muciniphila* in IL-1 β knockout Mäusen verglichen mit ihren littermate Wildtyp Kontrollen zu finden ist, wurde das Serum der Mäuse entnommen und die darin enthaltenen IgG als Erstantikörper gegen die Bakterien *Akkermansia muciniphila*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* sowie *Bacteroides thetaiotaomicron* eingesetzt. Hierfür wurden jeweils 0,5 McFarland der Bakterien in PBS suspendiert, gewaschen und mit dem Serum von IL-1 β knockout Mäusen bzw. von littermate Wildtyp Mäusen in einer Verdünnung von 1:100 in PBS für 1 Stunde bei 4 °C inkubiert. In diesem Fall dienen die im Maus-Serum enthaltenen IgG Antikörper als Erstantikörper gegen die Bakterien. Ein erhöhter Kontakt mit dem systemischen Immunsystem sollte demnach auch zu einer erhöhten Bildung von IgG gegen das Bakterium führen. Da *Akkermansia muciniphila* in den vorausgegangenen Versuchen eine erhöhte Penetration in den Mukus zeigte, wurde hier auch eine erhöhte IgG Bildung erwartet. Bei den Enterokokken, die zwar ein (nicht signifikant) erhöhtes Vorkommen in IL-1 β knockout Mäusen zeigten, jedoch keine erhöhte Penetration in den Mukus nachgewiesen werden konnte, sollte demnach keine erhöhte Bildung von IgG in den IL-1 β Knockouts erfolgen. Auch bei *Bacteroides thetaiotaomicron* wurde keine erhöhte IgG Bildung erwartet. Als Zweitantikörper wurde ein an PE gekoppelter anti-mouse-IgG-Antikörper eingesetzt. Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:100 den Proben zugegeben und der Ansatz für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels Fluorescence activated cell sorting (FACS) (s. Abbildung 34). In ersten Versuchen konnte bei Einsatz von Serum der IL-1 β knockout Tiere eine Erhöhung der an Serum-Antikörper gebundenen *Akkermansia* auf einen Prozentsatz von 89,7 % im Vergleich zu den an Serum-Antikörper der littermate Wildtyp Kontrollen gebundenen *Akkermansia* in Höhe von 22,8 % festgestellt werden. Dies entsprach einer Vervierfachung der gebundenen *Akkermansia muciniphila*. Die Referenzkeime für die Enterokokken – *E. faecium* und *E. faecalis* – wurden sowohl von den Serum-Antikörpern der IL-1 β knockout Mäuse als auch von den Serum-Antikörpern der littermate Wildtyp Kontrollen erwartungsgemäß nur in geringem Maße gebunden. Auch bei *Bacteroides thetaiotaomicron* ließ sich dies bestätigen (s. Abbildung 34).

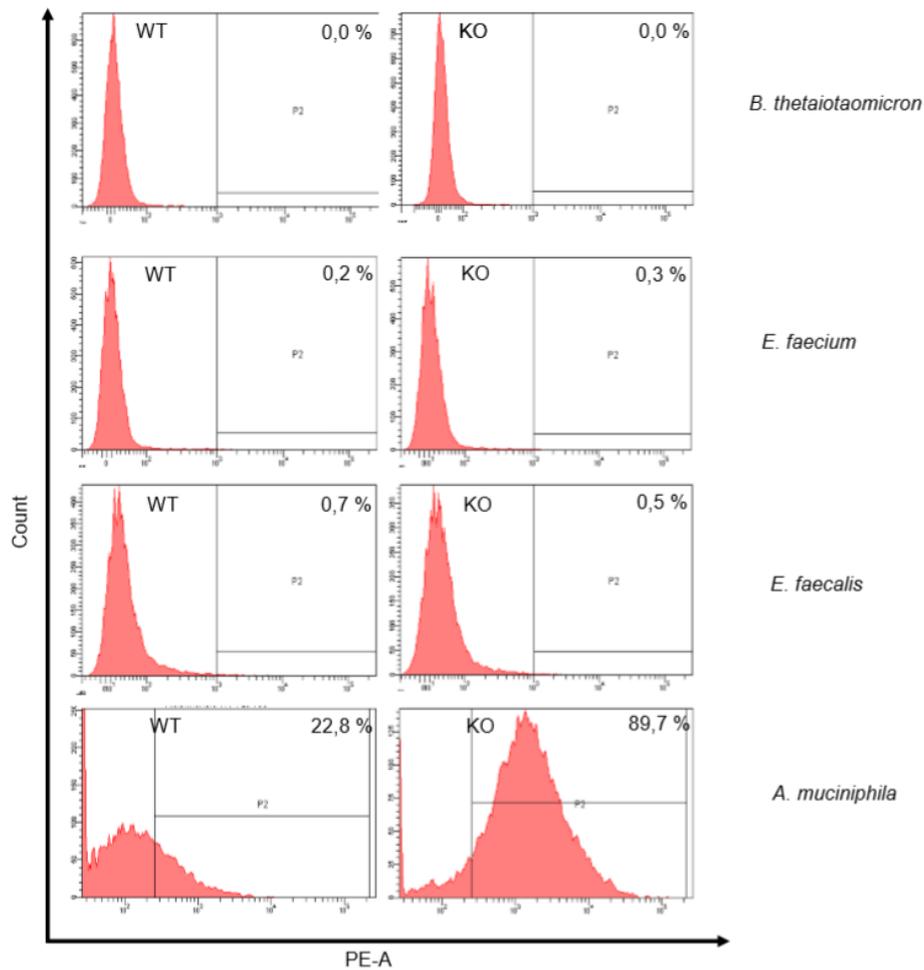


Abbildung 34: Bei IL-1 β knockout Tieren gibt es eine erhöhte Bildung von IgG gegen *Akkermansia muciniphila*. Jeweils 0,5 McFarland der Bakterien *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* wurden in PBS gewaschen und mit Serum von IL-1 β knockout Mäusen sowie littermate Wildtyp Kontrollen als Erstantikörper behandelt. Nach Färbung mittels anti-mouse-IgG-PE wurden die an Serum-Antikörper gebundenen Bakterien über FACS analysiert. Zur Normalisierung wurden Negativproben mit Zugabe des Zweitantikörpers ohne Zugabe von Serum verwendet. Untereinander aufgetragen sind die Ergebnisse für die Bakterien *B. thetaiotaomicron*, *E. faecium*, *E. faecalis* sowie *A. muciniphila*. Die auf der linken Seite befindlichen Analysen wurden mit Serum eines Wildtyp Tieres in einer Verdünnung von 1:100 in PBS behandelt, die rechts abgebildeten Proben mit Serum einer IL-1 β knockout Maus in einer Verdünnung von 1:100 in PBS (n=1). **FACS** = Fluorescence activated cell Sorting; **IL-1 β** = Interleukin-1 β ; **KO** = knockout; **WT** = Wildtyp

Die Ergebnisse der Vorversuche ließen sich jedoch nicht nach Wiederholung mit dem Serum anderer Mäuse aus einem späteren Versuch mit Signifikanz reproduzieren.

3.4.13 Übertragbarkeit auf den Menschen

Die Übertragbarkeit von Ergebnissen vom Mausmodell auf das Humansystem ist nicht zwangsläufig gegeben. Das Mikrobiom sowie die Proteinausstattung unterscheiden sich in Teilen. Deshalb war eine Fragestellung, ob die Ergebnisse auch in humanen Zelllinien oder in Patienten reproduziert werden können.

Während es in Mäusen vier verschiedene Angiogenine gibt, ist im Menschen nur ein Angiogenin – ANG – vorzufinden (Hooper et al. 2003). Deshalb musste in der Übertragbarkeit auf den Menschen auf dieses zurückgegriffen werden. Laut Hooper et al. zeigt auch das humane Angiogenin, welches während einer Entzündungsreaktion in der Leber gebildet wird und eine erhöhte Konzentration während der Akuten Phase Reaktion im Serum aufweist, neben seiner angiogenen auch eine antimikrobielle Wirkung gegen typische humanpathogene Mikroorganismen (Hooper et al. 2003). Auch die Expression im Darm konnte nachgewiesen werden (Sun et al. 2021).

Es wurde die humane Zelllinie HT29/18-N2 angezchtet, bei der es sich um Darmzellen handelt, die einen Monolayer bilden und eine hohe Anzahl an Goblet-Zellen aufweisen. Forman et al. zeigten, dass bei Mäusen im Colon Goblet-Zellen für die Produktion von Angiogenin 4 verantwortlich sind (Forman et al. 2012). Andere Publikationen zeigen auch Paneth-Zellen als Ursprung für die Freisetzung von Angiogenin 4. HT29/18-N2 Zellen wurden mit 100 ng/ μ l humanem IL-1 β stimuliert und Proben nach 0, 8, 16 und 24 Stunden genommen. Hierbei zeigte sich nach mRNA-Isolation und qRT-PCR kein Trend zu einer Induktion der Expression von ANG. Es zeigte sich nach weiteren Untersuchungen in dieser Zelllinie auch im unstimulierten Zustand eine erhöhte Expression des Interleukin-1 Rezeptor Typ II, der zu einer Inhibierung der IL-1 β Signaltransduktion führt (Schlüter et al. 2018). Deshalb wurde die Arbeit an der humanen Zelllinie HT28/18-N2 eingestellt.

Die Übertragbarkeit auf Menschen wurde deshalb durch Zuhilfenahme des therapeutisch eingesetzten Interleukin-1 Rezeptor-Antagonisten Anakinra (Kineret[®]) sowie des gegen IL-1 β gerichteten monoklonalen Antikörpers Canakinumab (Ilaris[®]) untersucht. Es wurden Patienten rekrutiert, die aufgrund ihrer Grunderkrankung eine Therapie mit einem der beiden Wirkstoffe starten sollten. Hierbei wurde nicht in die Therapieentscheidung des Arztes eingegriffen. Beide Wirkstoffe werden nur noch selten eingesetzt. Die hauptsächlich mit diesen Wirkstoffen therapierte Indikation ist heute noch das Cryopyrin-assoziierte periodische Syndrom. Aufgrund des seltenen Auftretens dieses Syndroms stellte sich der Einschluss von Patienten als schwierig dar.

In die Studie wurden insgesamt drei Patienten eingeschlossen. Alle drei Patienten begannen eine Therapie mit Anakinra. Zwei davon (Patient 1 und Patient 2) beendeten die Therapie jedoch vor Ablauf der sechs Wochen Therapiedauer aufgrund von starken Nebenwirkungen. Aus diesem Grund konnten

beide Patienten nicht ausgewertet werden. Es wurde DNA aus den Stuhlproben von Patient 3 „vorher“ – also vor Beginn der Therapie – und „nachher“ – also sechs Wochen nach Therapiestart unter laufender Therapie mit Anakinra – isoliert und mittels qRT-PCR nach SYBR Green Protokoll analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 35 aufgeführt. Es wurden die Bakterien *Akkermansia muciniphila*, *Enterococcus* genus sowie *Lactobacillus* group und *Bacteroides thetaiotaomicron* analysiert. Hierbei waren die im Mausmodell beobachteten Änderungen auch für diesen Patienten gültig: Sowohl *Akkermansia muciniphila* als auch *Enterococcus* genus waren nach sechs Wochen Anakinra-Therapie vermehrt im Fäzes des Patienten vorzufinden. *Lactobacillus* group sowie *Bacteroides thetaiotaomicron* zeigten hingegen keine Änderung unter der Therapie.

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen ist durch die Ergebnisse eines Patienten zwar nicht abschließend zu klären, jedoch lassen sie zumindest eine Übertragbarkeit erahnen.

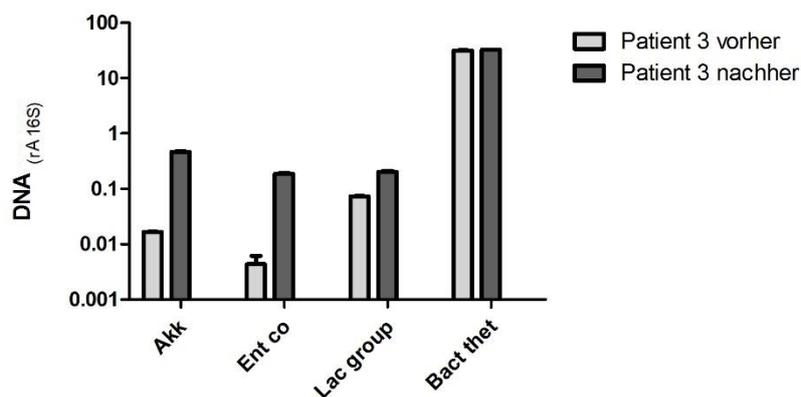


Abbildung 35: Auswertung der Stuhlproben von Patient 3 vor und sechs Wochen nach Beginn einer Therapie mit Anakinra. Es wurde eine Stuhlprobe des Patienten vor Beginn sowie sechs Wochen nach Therapiestart mit Anakinra genommen und die DNA auf die zuvor im Mausmodell untersuchten Bakterien *Akkermansia muciniphila* (Akk), *Enterococcus* genus (Ent co), *Lactobacillus* group (Lac group) sowie *Bacteroides thetaiotaomicron* (Bact thet) untersucht. Die Intensität der Messergebnisse wurde normalisiert auf das 16S Gen. Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt und der Mittelwert mit Standardabweichung ermittelt. **Akk** = *Akkermansia muciniphila*; **Bact thet** = *Bacteroides thetaiotaomicron*; **Ent co** = *Enterococcus* genus; **Lac group** = *Lactobacillus* group; **rA** = relative Abundance

3.5 Diskussion

Das Mikrobiom und das Immunsystem sind wichtige Einflussfaktoren für die Gesundheit eines Individuums. Immer mehr Daten geben Hinweise darauf, dass sich beide Systeme gegenseitig beeinflussen können und somit auch der Immunstatus des Wirts einen Einfluss auf die Zusammensetzung seines Darmmikrobioms haben kann (Zheng et al. 2020).

Interleukin-1 β ist ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin, das in der Immunantwort eine tragende Rolle spielt (Chen und Schroder 2013). Nachdem bereits erhöhte Interleukin-1 β Spiegel neben Veränderungen in der Zusammensetzung des Darmmikrobioms in einigen Erkrankungen wie Adipositas gezeigt wurden (Everard et al. 2013; Schneeberger et al. 2015), sollte in dieser Arbeit der direkte Einfluss von IL-1 β auf die Zusammensetzung des Darmmikrobioms sowie die Faktoren, die im Zusammenhang mit dieser Veränderung stehen könnten, untersucht werden.

3.5.1 Das Fehlen von IL-1 β führt zu einer Verschiebung in der Zusammensetzung der Mikrobiota des Darms, besonders im Vorkommen von *Akkermansia muciniphila*

Um Rückschlüsse auf den Einfluss von IL-1 β auf die Zusammensetzung der Colon-Mikrobiota zu erlangen, wurde DNA aus dem Fäzes von IL-1 β knockout Tieren und Wildtyp Kontrollen mittels Next Generation Sequencing analysiert. Diese Methode erlaubt es einen tieferen Einblick in die qualitative und quantitative Beschaffenheit des Darmmikrobioms zu erlangen, der vor Einführung des Verfahrens aufgrund der Nicht-Kultivierbarkeit vieler Kommensalen nicht erreicht werden konnte. Das erste Sequencing zeigte eine höhere α -Diversität nach Shannon bei den IL-1 β knockout Tieren sowie eine statistisch signifikant höhere Evenness des Mikrobioms derselben. Diese Ergebnisse ließen sich jedoch nicht im zweiten Sequencing bestätigen. Zum einen wurden für das erste Sequencing keine littermate Wildtyp Kontrollen verwendet, was jedoch im zweiten Sequencing der Fall war, um die nicht vorhandene Verwandtschaft der Tiere als Confounder auszuschließen. Des Weiteren wurden im Gegensatz zum ersten Sequencing, bei dem die Regionen V6 und V4 untersucht wurden, im zweiten Sequencing die V3/4 Region näher betrachtet. Möglicherweise handelt es sich deshalb nicht um einen Maus-, sondern einen Primer-Effekt.

Im Next Generation Sequencing zeigten sich für die hoch prävalenten Gruppen, die man im Darm erwartet, keine statistisch signifikanten Änderungen. Für einige weniger stark vertretene Familien wurde jedoch eine statistisch hoch signifikante Alteration im Vorkommen beobachtet. Hierzu zählen zum einen die Prevotellaceae sowie die Verrucomicrobiaceae, die in den IL-1 β knockout Tieren stärker vertreten waren, sowie die Muribaculaceae und Lachnospiraceae, die einen Rückgang in der Quantität ihres Auftretens in den IL-1 β knockout Tieren verzeichneten.

Für die Vertreter der Familien der Prevotellaceae und Lachnospiraceae war durch fehlende Einträge in den verwendeten Datenbanken keine weitere Klassifikation auf Spezieslevel möglich. Bei den Muribaculaceae handelt es sich um eine Familie, die einen typischen Vertreter des Mikrobioms von Mäusen darstellt. Im Humansystem spielt die Familie jedoch eine stark untergeordnete Rolle und die physiologische Relevanz als Kommensale des Menschen ist bis dato nicht bekannt (Lagkouvardos et al. 2019). Aus diesen Gründen wurden die im Vorkommen veränderten Vertreter der Familien der Prevotellaceae sowie der Muribaculaceae und Lachnospiraceae im weiteren Verlauf dieses Promotionsprojektes nicht weiter betrachtet.

Einen wichtigen Vertreter der Verrucomicrobiaceae stellt das gramnegative, mukusliebende Bakterium *Akkermansia muciniphila* dar. Dieses Bakterium zeigte in beiden Sequencings einen statistisch hoch signifikanten Anstieg der Prävalenz in den IL-1 β knockout Tieren, was sich auch durch eine anschließende qRT-PCR verifizieren ließ. Auch über die Zeit war weiterhin ein statistisch hoch signifikanter Unterschied zu beobachten, jedoch zeigte sich in der späteren Analyse eine geringere Prävalenz von *Akkermansia muciniphila*. Zu erwähnen ist hierbei, dass zwischen beiden Versuchen sowohl ein Embryo-Transfer als auch ein Unit-Wechsel im Tierstall durchgeführt wurde, was zu einer Veränderung des absoluten Auftretens eines Bakteriums in der Mikrobiota des Darms führen kann (Hugenholtz und de Vos 2018). Möglicherweise kam durch den Wechsel in eine andere Zucht-Unit auch eine Ernährungsumstellung auf die Mäuse zu, was auch zu einer Änderung in der Quantität einiger Bakterien führen kann (Hugenholtz und de Vos 2018).

A. muciniphila ist ein Bakterium mit großer physiologischer Relevanz. Es wird assoziiert mit positiven Effekten auf die intestinale Homöostase und wird immer wieder als Indikator für ein gesundes Darm-Mikrobiom beschrieben. *Akkermansia muciniphila* ist besonders in schlanken Menschen zu finden. Bei Übergewicht oder sogar Adipositas kommt das Bakterium hingegen gar nicht oder nur in geringen Mengen in der Darmmikrobiota vor (Everard et al. 2013). Auch in Diabetikern findet man das Bakterium nur selten (Everard et al. 2013). *A. muciniphila* zeigt bei jüngeren Menschen ein höheres Vorkommen. Die Besiedlung mit diesem Bakterium beginnt schon im Kindesalter, erreicht seinen höchsten Punkt bei jungen Erwachsenen und nimmt dann im Alter wieder ab (Collado et al. 2007). Zeigt sich *A. muciniphila* hierbei vermehrt in der frühen Kindheit als Kommensale im Darm, besitzt dieses Bakterium protektive Effekte in der Diabetes mellitus Typ I Entwicklung (Hansen et al. 2012). Auch der Einfluss auf den Glucose- sowie Fettstoffwechsel ist beschrieben (Depommier et al. 2019; Macchione et al. 2019; Plovier et al. 2017). Interleukin-1 β zeigt sich erhöht bei inflammatorischen Prozessen (Yazdi und Ghoreschi 2016). In Tierversuchen mit Diät-induzierter Adipositas wurde eine beginnende Inflammation in Mäusen nachgewiesen, die invers mit dem Auftreten von *A. muciniphila* korrelierte (Everard et al. 2013; Schneeberger et al. 2015). Bei Patienten mit metabolischem Syndrom,

einer Erkrankung mit immer höherer Prävalenz in der heutigen Zeit, zeigt sich eine low-grade Inflammation des Fettgewebes, die typischerweise mit erhöhten IL-1 β Leveln einhergeht (Weisberg et al. 2003). Auch andere Erkrankungen wie beispielweise die Psoriasis oder Diabetes mellitus sind mit erhöhten IL-1 β Spiegeln verbunden (Candela et al. 2012; Tan et al. 2018; Xu et al. 2020). Für all diese Erkrankungen ist jedoch auch ein geringeres Vorkommen von *Akkermansia muciniphila* in der Mikrobiota des Darms beschrieben (Candela et al. 2012; Tan et al. 2018; Xu et al. 2020), was die Vermutung einer inversen Korrelation der Player Interleukin-1 β und *Akkermansia muciniphila* zulässt.

Während bis dato nur eine Korrelation zwischen basalen inflammatorischen Prozessen und einer Abwesenheit beziehungsweise verminderten Anwesenheit des Bakteriums *Akkermansia muciniphila* gezeigt werden konnte, beweisen die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit das erste Mal einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von IL-1 β und der Häufigkeit des Auftretens von *A. muciniphila*. Aus den Daten lässt sich ableiten, dass *Akkermansia muciniphila* sehr sensibel auf das Vorhandensein einer basalen Inflammation reagiert.

Durch die direkte Korrelation der IL-1 β Spiegel mit der Prävalenz von *Akkermansia muciniphila* sind auch Effekte von Medikamenten möglicherweise besser erklärbar. Für Metformin ist bekannt, dass es neben seinen bekannten Wirkungen auch eine Vermehrung der Prävalenz von *Akkermansia muciniphila* in der Mikrobiota des Darms fördert (Lee et al. 2018). Hierdurch kann zusätzlich positiv auf die metabolischen Zustände der häufig mit dem metabolischen Syndrom einhergehenden Erkrankung Diabetes mellitus durch das Bakterium eingewirkt werden (Lee et al. 2018). Diverse Publikationen zeigen jedoch auch eine Reduktion der IL-1 β Produktion unter Metformin (Germeyer et al. 2011; Kelly et al. 2015; Xu et al. 2017). Möglicherweise wird durch die durch Metformin verminderte Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β das Wachstum von *Akkermansia muciniphila* begünstigt, das wiederum positive Effekte in den metabolischen Prozessen der Patienten ausüben kann.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Beobachtung, dass das Mikrobiom einen Einfluss auf die Ansprechrate von Immun-Checkpoint-Inhibitoren wie Nivolumab oder Ipilimumab besitzt (Gopalakrishnan et al. 2018a; Gopalakrishnan et al. 2018c). Hierbei wurde bei Respondern vermehrt unter anderem *Akkermansia muciniphila* in der Mikrobiota des Darms entdeckt im Vergleich zu den Patienten, die kein Ansprechen auf die Therapie zeigten. Jiang et al. beschrieben jedoch auch, dass Patienten mit fortgeschrittenem Malignem Melanom erhöhte IL-1 β Level vorzuweisen haben und bei Therapieversagen mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren auch erhöhte IL-1 β Spiegel eine Rolle spielten. Sie erklärten diese Beobachtung durch eine systemische Immunsuppression, die auf einer über lange Zeit andauernden Produktion und dadurch Akkumulation von inflammatorischen Faktoren wie Interleukin-1 β und der darauf entwickelten erhöhten Anzahl an immunsuppressiven Zelltypen gründet (Jiang et al. 2015). Kaplanov et al. beschrieben in ihrer Arbeit an Mäusen einen synergistischen Effekt

der Inhibition von Interleukin-1 β zusammen mit der Behandlung mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren (Kaplanov et al. 2019). Möglicherweise lässt sich auch dies mit den Ergebnissen dieser Promotionsarbeit erklären, indem eine in einem fortgeschrittenerem Tumorstadium befindliche Malignität eine erhöhte Inflammation mit sich bringt. Die hieraus resultierenden angestiegenen IL-1 β Spiegel sind assoziiert mit einem geringeren Auftreten von *Akkermansia muciniphila*, was wiederum als Indikator für ein schlechteres Ansprechen auf die Checkpoint-Inhibitor-Therapie angesehen werden kann.

3.5.2 Die verminderte Expression von Angiogenin 4 steht im Zusammenhang mit dem erhöhten Vorkommen von *Akkermansia muciniphila*

Porat et. al beschrieben in ihrer Arbeit, dass Interleukin-1 β einen direkten Einfluss auf das Wachstum von Bakterien besitzen kann (Porat et al. 1991). Um zu überprüfen, ob IL-1 β über eine direkte Interaktion mit den Bakterien zur Verschiebung in der Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms führt, wurde eine qRT-PCR mit der aus dem Fäzes von Interleukin-1 Rezeptor (IL-1R) knockout Tieren und littermate Wildtyp Kontrollen isolierten DNA gefahren und auf die bei den IL-1 β Knockouts evaluierten Keime untersucht. Hierbei zeigte sich für *Akkermansia muciniphila* auch ein geringeres Vorkommen in den IL-1R knockout Tieren als in ihren littermate Wildtyp Kontrollen. Da in diesen Tieren IL-1 β vorhanden ist, jedoch seine Wirkung über nachgerichtete Signalkaskaden über den Interleukin-1 Rezeptor nicht ausführen kann, kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass Interleukin-1 β nicht direkt, sondern indirekt durch den Anstoß weiterer Mechanismen die Zusammensetzung des Darmmikrobioms ändert. Die Ergebnisse der IL-1R knockout Tiere zeigten sich zwar nicht so eindrucksvoll wie die der IL-1 β knockout Tiere, allerdings muss hier auch beachtet werden, dass auch die Wirkung von IL-1 α durch eine IL-1R Defizienz nicht ausgeübt werden kann. Yegorov et al. beobachteten in ihrer Arbeit das erste Mal eine mögliche Assoziation zwischen IL-1 α und einer Veränderung des Darm-Mikrobioms (Yegorov et al. 2020), was jedoch noch nicht vollständig untersucht ist und möglicherweise zu den in dieser Promotionsarbeit ermittelten, weniger stark ausgeprägten Effekten führte. Auch Needell et al. zeigten an Ratten durch eine Therapie mit Anakinra, einem IL-1R-Antagonisten, einen ähnlichen Effekt wie in dieser Promotionsarbeit in den IL-1 β knockout Tieren sowie den IL-1R knockout Tieren beobachtet werden konnte (Needell et al. 2017).

Zum besseren Verständnis der Faktoren, die bei einem Knockout von IL-1 β zu einer Verschiebung im Mikrobiom des Colons führen können, wurde daher eine vergleichende Genexpressionsanalyse mittels Gene Array gemacht und die Ergebnisse durch eine quantitative RT-PCR auf ihre Konsistenz überprüft. Der Gene Array wurde ursprünglich mit drei Mäusen je Gruppe durchgeführt, jedoch war der Lauf der

dritten Maus nicht auswertbar und konnte aus Kostengründen nicht wiederholt werden. Aufgrund der Probenzahl von n=2 ist die Bestätigung der Ergebnisse durch die quantitative RT-PCR umso wichtiger.

Im Gene Array fielen hauptsächlich antimikrobielle Peptide auf, die entweder in den IL-1 β knockout Tieren eine verminderte oder erhöhte Expression hatten. Das Gen, das die stärkste Abweichung zeigte, war hierbei Angiogenin 4 (Ang4), gefolgt von Resistin like β (Retnlb) und Protein Phosphatase 1 Regulatory Inhibitor Subunit (Ppp1r14d). Die statistisch signifikant niedrigere Expression von Angiogenin 4 konnte auch in der qRT-PCR bestätigt werden.

Angiogenin 4 zählt zu den antimikrobiellen Peptiden. Sowohl über das Wirkspektrum, den Herkunftsort, die Expression als auch die vorgeschalteten Signalkaskaden, die zur Expression und Freisetzung von Angiogenin 4 führen, ist bis heute noch kaum etwas bekannt. Während im Dünndarm die Paneth-Zellen als Ursprung postuliert werden, gibt es Hinweise im Colon, dass Goblet-Zellen Ang4 produzieren können (Burger-van Paassen et al. 2012; Ganz 2003; Hooper et al. 2003; Walker et al. 2013). Verschiedene Mechanismen lösen hierbei die Expression aus: Die Sekretion von Ang4 kann im Dünndarm durch Paneth-Zellen z.B. durch Stimulation mit Interleukin-17 (IL-17) und Interleukin-22 (IL-22) erfolgen, die wiederum durch Stimulation mit Interleukin-23 (IL-23) oder alternativ durch Stimulation mit IL-1 β aus TH17 Zellen freigesetzt werden können (Burger-van Paassen et al. 2012; Dmitrieva-Posocco et al. 2019; Ganz 2003; Hooper et al. 2003; Noor et al. 2016; Parks et al. 2015; Shi et al. 2017; Walker et al. 2013). In einem Infektionsmodell zeigte sich im Colon die Freisetzung von Ang4 aus Goblet-Zellen durch Interleukin-13 (IL-13) (Burger-van Paassen et al. 2012; Forman et al. 2012; Noor et al. 2016). Um diese publizierten Beobachtungen auf Übertragbarkeit der in IL-1 β knockout Mäusen herabgesenkten Expression von Ang4 zu prüfen, wurden die Daten des Gene Arrays für IL-17, IL-22 und IL-13 herangezogen. IL-13 wurde im Gene Array nur leicht erniedrigt in den IL-1 β knockout Tieren exprimiert, jedoch nicht statistisch signifikant niedriger als in den littermate Wildtyp Kontrollen. Da es sich jedoch in der oben erwähnten Arbeit um ein Infektionsmodell handelt, ist die Übertragbarkeit auf einen nicht-infektiösen Zustand nicht zwangsläufig gegeben (Forman et al. 2012). Seregin et al. beschrieben eine Interleukin-18 (IL-18) abhängige Kolonisationsresistenz für *Akkermansia muciniphila* (Seregin et al. 2017). Es gibt jedoch keinen publizierten Zusammenhang zwischen Interleukin-18 und der Sekretion von Ang4 und auch die Daten aus dem Gene Array zeigten nur eine minimal geringere Expression in den IL-1 β knockout Tieren verglichen mit den littermate Wildtyp Kontrollen. Eine Möglichkeit der Sekretion im Colon könnte analog zum Dünndarm eine IL-17 und IL-22 getriggerte Freisetzung aus Goblet-Zellen sein. IL-22 hat im Darm unter anderem die Funktion, die Integrität der mukosalen Barriere aufrecht zu halten, IL-17 führt durch Rekrutierung von Neutrophilen und der Induktion der Produktion von antimikrobiellen Peptiden zu einer Abwehr von Pathogenen und verhindert hierdurch deren Invasion (Chen und Schroder 2013). Sowohl IL-17 als auch

IL-22 zeigten im Gene Array eine reduzierte Expression in den IL-1 β knockout Tieren, doch konnten diese Ergebnisse in der qRT-PCR nicht bestätigt werden, wodurch die Expressions- bzw. Freisetzunginduktion des antimikrobiellen Peptids Angiogenin 4 in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden konnte.

Resistin like molecule β (Retnlb) ist auch für seine antimikrobielle Wirkung bekannt und wird aus Goblet Zellen im Colon freigesetzt (Morampudi et al. 2016; Watanabe et al. 2020). Es zeigte zwar im Gene Array eine stark erniedrigte Expression, aber diese konnte in der qRT-PCR nicht bestätigt werden.

Die dritthöchste Abweichung hin zur erniedrigten Expression in den IL-1 β knockout Mäusen zeigte sich für die Protein Phosphatase 1 Regulatory Inhibitor Subunit (Ppp1r14d). Das Gen wird exprimiert im Gehirn, Magen, Dünndarm, Colon sowie der Niere. Durch die regulative Aktivität auf die Protein Phosphatase 1 (PP1) ist Ppp1r14d in der Lage, auf wichtige zelluläre Prozesse wie Transkription, Proteinbiosynthese, aber auch auf Muskelkontraktion, Zellteilung und Signaltransduktion Einfluss zu nehmen (Karthik und Ravikumar 2011; Liu et al. 2004). Karthik und Ravikumar beschrieben Ppp1r14d als metabolisches Signalprotein im Gehirn in Zusammenhang mit Diabetes mellitus in Ratten (Karthik und Ravikumar 2011). Ob Ppp1r14d auch im Darm im Kontext mit Diabetes mellitus eine Rolle spielt, ist bis dato aber nicht bekannt. Da *Akkermansia muciniphila* bei Diabetes mellitus erniedrigt vorkommt bei gleichzeitig erhöhten Interleukin-1 β Spiegeln, könnte möglicherweise eine Assoziation zu dem in Diabetes mellitus erhöhten Ppp1r14d gezogen werden. Jedoch kann dies auch nur ein Nebenschauplatz sein, der nichts mit der Veränderung der Zusammensetzung der Mikrobiota im Darm zu tun hat. Da Ppp1r14d noch nicht mit einer antimikrobiellen Wirkung in Verbindung gebracht wurde, gab es in dieser Arbeit keine weitere Verfolgung dieses Ansatzes.

Neben den vermindert exprimierten Genen wurden auch erhöht exprimierte Gene, die für antimikrobielle Peptide kodieren, in den IL-1 β knockout Tieren im Vergleich zu ihren littermate Wildtyp Kontrollen gefunden. Die hauptsächlichen Funde waren hierbei das Defensin Defb2 sowie die zwei C-Type Lektine Reg3 β und Reg3 γ . Laut Derrien et al. und Hänninen et al. bewirkt die erhöhte Anwesenheit von *A. muciniphila* im Darm eine erhöhte Expression von Reg3 γ (Derrien et al. 2017; Hänninen et al. 2018), wohingegen eine Diät-induzierte Adipositas, die auch mit einem verminderten Vorkommen von *A. muciniphila* in der Mikrobiota des Darms assoziiert ist, laut Frazier et al. mit einer erniedrigten Expression von Reg3 γ einhergeht (Everard et al. 2013; Frazier et al. 2020). Diese Beobachtungen konnten im Gene Array nicht bestätigt werden, sondern zeigten eher eine gegenläufige Tendenz. Jedoch wurde in der darauffolgenden qRT-PCR keine Signifikanz für diese drei antimikrobiellen Peptide erreicht.

Über *Akkermansia muciniphila* ist bekannt, dass es ein mucin-liebendes Bakterium ist, welches auch Mucine degradieren kann (Derrien et al. 2017; Derrien et al. 2004; Zhang et al. 2019a). Dao et al. beschrieben eine Assoziation einer erhöhten Mukus-Dicke sowie einer vermehrten Anzahl an Goblet-Zellen mit einem erhöhten Vorkommen von *A. muciniphila* (Dao et al. 2016). Deshalb lag nahe, dass möglicherweise eine höhere Dicke durch eine eventuell gesteigerte Produktion der Hauptbestandteile des Mukus – der Mucine – zu einem Vorteil für *A. muciniphila* und dadurch zu einem erhöhten Vorkommen geführt haben könnte. Weder im Gene Array oder in der qRT-PCR, noch bei makroskopischer Betrachtung ließ sich eine erhöhte Mukus-Dicke bestätigen. Auch der nochmals näher betrachtete Hauptbestandteil des Mukus, Muc2, zeigte in der Genexpression keinen Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Burger-van Paassen et al. beschrieben bei Muc2-Defizienz eine Beeinflussung der Expression antimikrobieller Peptide in Form einer Hochregulation von Reg3 β und Reg3 γ (Burger-van Paassen et al. 2012), die jedoch in diesem Promotionsprojekt keine statistisch signifikante Änderung in der Expression zwischen IL-1 β knockout Tieren und den Wildtyp Kontrollen zeigten, wohingegen Angiogenin 4 laut Burger-van Paassen et al. unbeeinflusst vom Fehlen des Hauptmucusbestandteils blieb (Burger-van Paassen et al. 2012). Dies passt auch zu den Ergebnissen, dass für Reg3 β und Reg3 γ , sowie für Muc2 keine statistisch signifikanten Änderungen in der Expression gefunden wurden.

Da Angiogenin 4 das einzige antimikrobielle Peptid mit statistisch signifikantem Unterschied sowohl in der Genexpressionsanalyse mittels Gene Array zwischen IL-1 β knockout Mäusen und littermate Wildtyp Kontrollen als auch in der qRT-PCR war, wurde sich in der weiteren Arbeit auf dieses Gen fokussiert.

Aufgrund der Tatsache, dass die Expression eines Gens nicht zwangsläufig zu einer erhöhten Proteinproduktion führt, sollte eine Genexpressionsanalyse auch immer auf Protein-Level kontrolliert werden. Da es jedoch keinen monoklonalen Antikörper zur Detektion von Angiogenin 4 gibt, war die Detektion weder über Western Blot noch über ELISA möglich. Als einziger Antikörper mit Kreuzreaktivität zu murinem Ang4 wurde der Antikörper anti-ANG der Firma Santa Cruz Biotechnology gefunden. Dieser besitzt jedoch auch eine Kreuzreaktivität zu den anderen Angiogeninen Ang1, Ang2 und Ang3, die in der Maus zu finden sind und auch im Darm exprimiert werden. Hierbei zeigt besonders Ang2 eine ähnliche hohe Expression wie das zu untersuchende Ang4, weshalb auch dieser Antikörper nicht in Frage kam und eine quantitative Aussage auf Protein-Level nicht möglich war.

Studien an Mäusen zeigten bereits, dass *Akkermansia muciniphila* als Kommensale im Darm, besonders im Colon, einen Einfluss auf die Genexpression sowohl immunregulatorischer als auch metabolischer Prozesse ausüben kann (Derrien et al. 2011; Lukovac et al. 2014). Unbekannt bleibt jedoch weiterhin, ob es spezifische Effekte von *Akkermansia muciniphila* auf die Genexpression

antimikrobieller Peptide oder umgekehrt von diesen Peptiden auf *A. muciniphila* gibt. Everard et al. zeigten, dass eine Kolonisation mit lebendiger *Akkermansia* auch einen Einfluss auf die Produktion einiger antimikrobieller Peptide haben kann (Everard et al. 2013). Die Autoren diskutierten diese Beobachtung als Schaffen eines Überlebensvorteils der eigenen Spezies, da beispielsweise durch Induktion der Expression von Reg3 γ ein reduzierter Wettbewerb um die vorhandenen Ressourcen für *Akkermansia muciniphila* favorisiert wird sowie eine Langzeit-Toleranz des Wachstums des mukusliebenden Bakteriums gewährleistet werden könnte. Leider wurde in dieser Studie nicht Angiogenin 4 mitbetrachtet, sondern sich auf andere antimikrobiellen Peptide wie Reg3 γ fokussiert (Everard et al. 2013).

Aus diesem Grund wurde als Alternative zur Quantifizierung auf Protein-Level die direkte Wirkung von Angiogenin 4 auf *Akkermansia muciniphila* und andere Bakterien untersucht, um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob ein Zusammenhang der inversen Korrelation zwischen Ang4 und *A. muciniphila* plausibel ist. Hierbei konnte interessanterweise eine statistisch signifikante Wachstumshemmung von *A. muciniphila* durch Zugabe des rekombinanten Ang4-Proteins gezeigt werden, während die zum Vergleich herangezogenen Bakterien *E. faecalis*, *E. faecium* sowie *Bacteroides thetaiotaomicron* nicht durch das Protein in ihrem Wachstum beeinflusst wurden. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass ein Zusammenhang zwischen der erniedrigten Expression von Angiogenin 4 und dem erhöhten Vorkommen von *Akkermansia muciniphila* bei Fehlen von Interleukin-1 β besteht.

3.5.3 Durch die verminderte Expression von Angiogenin 4 scheint eine erhöhte Penetration von *Akkermansia muciniphila* durch den Mukus an die Mukosaoberfläche ermöglicht zu werden

Der Mukus bildet eine wichtige Barriere zwischen Darmlumen und Mukosaoberfläche und gehört damit zu einer der Schutzfunktionen, die das intestinale Immunsystem gegen die Invasion von Pathogenen, aber auch von Kommensalen aufzubieten hat. Außerdem fungiert er als eine Art Schwamm, der antimikrobielle Peptide aufnimmt, sie stabilisiert und eine Art Gradient schafft, der dazu führt, dass zwar im äußeren Mukuslayer eine Kolonisation möglich und auch erwünscht ist, der innere Mukuslayer hingegen nur eine geringe Anzahl an Bakterien aufzuweisen hat. Beim Wegfall bzw. der reduzierten Expression des antimikrobiellen Peptids Ang4 stellte sich die Frage, ob ein mukusliebendes Bakterium wie *Akkermansia muciniphila* eine höhere Chance hat, weiter in den Mukus zu penetrieren und sich dort anzusiedeln. Bereits in der qRT-PCR der DNA der von IL-1 β knockout Tieren sowie littermate Wildtyp Kontrollen gewonnenen Mukosascrapings, die auch die im Mukus, jedoch nicht die im Stuhl befindliche eubakterielle DNA enthalten, zeigte sich, dass *A. muciniphila* generell stärker im Mukus präsent ist als die betrachteten Referenzkeime, aber auch in den IL-1 β knockout Tieren die Tendenz zu einer erhöhten Kolonisation des Mukus aufweist.

Durch die Etablierung einer probenschonenden Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) mit einer Sonde für *Akkermansia muciniphila* sowie einer universellen 16S Sonde mit anschließender Immunfluoreszenz zur besseren Lokalisation der Bakterien im Darmlumen, konnte eine stärkere Penetration von Bakterien zur Mukosaoberfläche sowohl in die IL-1 β Knockouts als auch in den IL-1R Knockouts im Vergleich zu ihren Wildtyp Kontrollen gezeigt werden. Da *Akkermansia muciniphila* jedoch nur einen sehr geringen prozentualen Anteil der Mikrobiota des Darms ausmacht, war das Auffinden in den Proben im Vergleich zu den mit der 16S Sonde erzielten Signale geringer. Nichtsdestotrotz zeigte sich eine höhere Distanz des Auffindungsortes von *Akkermansia muciniphila* im FISH Assay in Wildtyp Tieren im Vergleich zu den knockout Tieren.

Da keine Forschungsergebnisse hierzu in der Literatur beschrieben sind, ist ein Vergleich mit anderen Daten nicht möglich.

Aufgrund der Hinweise auf eine erhöhte Penetration des Bakteriums *Akkermansia muciniphila* durch den Mukus an die Mukosaoberfläche stellt sich die Frage, ob hierdurch eine erhöhte Exposition des Bakteriums gegenüber dem systemischen Immunsystem besteht, was zu einer erhöhten Immunglobulin G (IgG) Produktion führen würde. Bis dato ist noch nicht bekannt, ob *Akkermansia muciniphila* durch die Mukosaoberfläche in den Körper invadiert und dadurch mit dem systemischen Immunsystem in Berührung kommen kann. Um dieser Überlegung auf den Grund zu gehen, wurde die Bindung der Antikörper aus dem Serum von IL-1 β knockout Tieren verglichen mit den Antikörpern aus dem Serum von littermate Wildtyp Kontrollen an *A. muciniphila* sowie andere Bakterien mittels Fluorescence activated cell sorting (FACS) analysiert. Im ersten Versuch zeigte sich hierbei nur eine schwache Bindung an die verwendeten Referenzkeime *E. faecalis*, *E. faecium* und *B. thetaiotaomicron* sowohl für die IL-1 β Knockouts, als auch für die Wildtyp Kontrollen. Bei *Akkermansia muciniphila* hingegen zeigte sich eine stark erhöhte Bindung von IgG aus dem Serum der IL-1 β knockout Mäuse an die Bakterien, was einen Anhaltspunkt für eine erhöhte vorangegangene Exposition dieses Bakteriums gegenüber dem systemischen Immunsystem darstellen kann. Leider konnten diese Ergebnisse in weiteren Versuchen nicht mit Signifikanz bestätigt werden, da aufgrund des Todes einer IL-1 β Zuchtmaus eine Wildtyp Verpaarung notwendig wurde, um die Zucht neu aufzubauen. Hierdurch kam es lange Zeit zu einer gemeinsamen Haltung von Wildtyp- und Knockout-Tieren. Durch Koprophagie und dem damit verbundenen Mikrobiota-Austausch der Versuchsgruppen war die Aussagekraft der während dieser Zeit gewonnenen Proben nur begrenzt.

3.5.4 Die Ergebnisse aus den IL-1 β knockout Mäusen scheinen auch auf Menschen unter Therapie mit dem IL-1R Antagonisten Anakinra (Kineret[®]) übertragbar zu sein

Die Erkenntnisse aus Forschungsergebnissen zur Mikrobiota sind nicht ohne Weiteres von der Maus auf den Menschen übertragbar. Zwar sind die meisten Genera sowohl im Menschen, als auch in der Maus vorhanden, jedoch zeigen sich oft Unterschiede in der Häufigkeit des Vorkommens einzelner Spezies, begründet durch andere physiologische Umstände sowie unterschiedliche Ernährung (Hugenholtz und de Vos 2018). Auch gibt es bestimmte Keime, die eher typisch für ihren Wirt sind und deshalb nur in geringem Maße in anderen Lebewesen gefunden werden. Ein Beispiel hierfür ist *Mucispirillum schaedleri*, welches den Mukuslayer von Mäusen kolonisiert, aber eher untypisch für das Darm-Mikrobiom des Menschen ist (Hugenholtz und de Vos 2018). Auch die im Next Generation Sequencing gefundene Familie der Muribaculaceae ist ein typischer Kommensale des Mäuse-Colons, spielt jedoch nur eine untergeordnete Rolle in der humanen Mikrobiota (Lagkouvardos et al. 2019). Des Weiteren muss für eine bessere Übertragbarkeit auf den Menschen im Tiermodell auf eine strenge Reproduzierbarkeit aller Faktoren, die einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Mikrobiota besitzen, geachtet werden. Hierzu zählen Faktoren wie beispielsweise die Ernährung, der Lebensraum, das Alter der Versuchstiere und die Unit des Tierstalls, die für alle Versuchstiere gleich gehandhabt wird. Weiterhin muss mit littermate Kontrollen gearbeitet werden, um auch die nicht vorhandene Verwandtschaft als Confounder auszuschließen, sowie eine streng getrennte Haltung der einzelnen Versuchsgruppen gewährleistet sein, da sonst durch Koprophagie eine Verfälschung der Ergebnisse zu erwarten ist (Hugenholtz und de Vos 2018).

Da *Akkermansia muciniphila* ein mukusliebendes Bakterium ist, muss auch der Unterschied im Aufbau des Mukus zwischen Maus und Mensch in die Betrachtung mit einbezogen werden. Zwar ist die Mukuspermeabilität vergleichbar und Muc2 bildet sowohl im humanen als auch im murinen Mukuslayer die Hauptkomponente, jedoch befinden sich im Darm von Mäusen niedrigere Sauerstoff-Level und es lässt sich ein anderes Glykan-Profil im Mukus feststellen (Hugenholtz und de Vos 2018).

Im Verlauf der Promotionsarbeit kristallisierte sich Ang4 als möglicher Kandidat heraus, dessen erniedrigte Expression zu einem erhöhten Vorkommen des Bakteriums *Akkermansia muciniphila* führen kann. Ang4 ist im Humansystem nicht vorhanden. Ein Vertreter der Angiogenine im Humansystem, der ähnliche Aufgaben in der antimikrobiellen Abwehr ausüben kann, ist das Protein Angiogenin (ANG) (Hooper et al. 2003; Sun et al. 2021). Sun et al. zeigten in ihrer Arbeit, dass ANG eine antimikrobielle Wirkung im Darm besitzt und möglicherweise auch zu einer Änderung in der Zusammensetzung der Mikrobiota des Darms führen kann. Sie schlossen hierdurch auf eine wichtige Funktion des Proteins in der Homöostase des Darms (Sun et al. 2021). Um zu untersuchen, ob IL-1 β auch einen Einfluss auf die Produktion von ANG im Humansystem besitzt, wurde die humane Zelllinie

HT29/18-N2 herangezogen. Forman et al. beschrieben im Colon die Goblet Zellen als möglichen Ursprung von Angiogenin 4 (Forman et al. 2012). Die Zelllinie HT29/18-N2 besitzt eine hohe Anzahl an Goblet Zellen im Vergleich zu anderen humanen Darmzelllinien (Lencer et al. 1990). Durch die Behandlung mit IL-1 β konnte jedoch keine Induktion der Ausschüttung von ANG erzielt werden. Dies könnte möglicherweise an der in dieser Zelllinie vermehrten Expression des Interleukin-1 Rezeptor Typ II liegen, dessen Anwesenheit zu einer Hemmung der Signaltransduktion von IL-1 β führt (Schlüter et al. 2018). Eine andere Möglichkeit ist, dass IL-1 β nicht direkt, sondern über andere Mediatoren wirkt. Möglicherweise sind Immunzellen wie TH17-Zellen, Makrophagen oder andere Gewebetypen notwendig, die durch IL-1 β zur Ausschüttung von beispielsweise Zytokinen angeregt werden, die dann wiederum direkt oder über weitere Kaskaden zur Produktion oder Freisetzung von Angiogenin aus der Goblet Zelle führen. Auch ist es möglich, dass die Goblet Zelle unter physiologischen Bedingungen nicht die Quelle von Angiogenin ist, da dies bis jetzt nur für Ang4 in einem Infektionsmodell nachgewiesen werden konnte (Forman et al. 2012). Hier hätten möglicherweise Versuche unter Kokultivierung der Zelllinie mit Immunzellen zum Erfolg führen können.

Im Humansystem steht im Gegensatz zum Tiermodell nicht die Möglichkeit eines Knockouts zur Verfügung, um die Ergebnisse zu reproduzieren. Auf dem Markt befinden sich jedoch Wirkstoffe wie Anakinra, ein IL-1R Antagonist, der u.a. bei der rheumatoiden Arthritis zum Einsatz kommt. Des Weiteren ist Canakinumab, ein humaner monoklonaler anti-IL-1 β -Antikörper zur Therapie beim Familiären Mittelmeerfieber, bei periodischen Fiebersyndromen, dem Still-Syndrom oder den Cryopyrin-assoziierten periodischen Syndromen zugelassen. Canakinumab besitzt auch eine Wirkung bei der rheumatoiden Arthritis und Diabetes mellitus, die mit einem erhöhten IL-1 β Level einhergehen (Dhimolea 2010). Anakinra und Canakinumab besitzen auch eine Zulassung für die juvenile idiopathische Arthritis. Hier wurde durch Stoll et al. eine erhöhte Kolonisation mit *Akkermansia muciniphila* im Darm beschrieben, jedoch ist die juvenile idiopathische Arthritis ein sehr heterogenes Krankheitsbild, bei der nicht zwangsläufig ein erhöhter IL-1 β Level gegeben ist und somit die kontroversen Daten erklärbar sind (Militaru und Sabau 2011; Stoll et al. 2014). Es wurden Patienten rekrutiert, die neu auf eine Therapie mit Anakinra oder Canakinumab eingestellt werden sollten. Stuhlproben wurden vor und sechs Wochen nach Beginn der Therapie genommen und die Veränderung mittels qRT-PCR analysiert. Es konnte kein Patient mit Canakinumab eingeschlossen werden, da eine Therapieeinstellung auf dieses Medikament nur eine kleine Patientengruppe betrifft und nur noch selten vorkommt. Auch für Anakinra ist es schwierig, Patienten zu rekrutieren, da es nicht mehr zur First-line Therapie in der rheumatoiden Arthritis sowie den Cryopyrin-assoziierten periodischen Syndromen zählt. Es konnten drei Patienten eingeschlossen werden, die indikationsgerecht auf Anakinra eingestellt werden sollten. Allerdings war am Ende nur ein Patient

auswertbar, da zwei Patienten aufgrund von starken Nebenwirkungen die Therapie bereits vor Abgabe der zweiten Stuhlprobe abbrechen mussten. Durch Auswertung nur eines Patienten konnte zwar keine Signifikanz der Ergebnisse abgeleitet werden, aber für *Akkermansia muciniphila* zeigte sich nach sechswöchiger Therapie mit dem IL-1R-Antagonisten Anakinra eine Steigerung des Vorkommens im Fäzes. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass die Ergebnisse auch auf den Menschen übertragbar sein könnten. Die Daten dieses Patienten stehen auch im Einklang mit den durch Needell et al. publizierten Daten einer Behandlung von Ratten mit Anakinra, bei denen nach fünf Tagen auch eine Steigerung des Vorkommens von *Akkermansia* im Fäzes festzustellen war (Needell et al. 2017).

3.5.5 Schlussfolgerung

Diese Arbeit gibt zum ersten Mal einen Einblick in die direkte Wirkung von Interleukin-1 β auf die Zusammensetzung der Darm-Mikrobiota. Es konnte eine inverse Korrelation zwischen IL-1 β und dem Auftreten des mit einem gesunden Körper assoziierten Bakteriums *Akkermansia muciniphila* gezeigt werden. Die Untersuchungen dieses Promotionsprojektes geben Hinweise darauf, dass IL-1 β – direkt oder über andere zwischengeschaltete Mediatoren – zu einer Produktion des antimikrobiellen Peptids Angiogenin 4 im Colon führt, welches eine Wachstumshemmung von *Akkermansia muciniphila* bewirkt. Fehlt jedoch IL-1 β , kommt es zur verminderten Produktion von Angiogenin 4 und *Akkermansia muciniphila* kann vermehrt als Kommensale beobachtet werden. Aus dieser Arbeit ergeben sich Anhaltspunkte, dass *Akkermansia muciniphila* hierdurch verstärkt durch den Mukus zur Gewebeoberfläche penetrieren und infolgedessen mit dem systemischen Immunsystem in Berührung kommen kann, was möglicherweise eine erhöhte IgG Antwort nach sich zieht. Der sich aus dieser Arbeit ergebende, vermutet zugrunde liegende Mechanismus ist in Abbildung 36 dargestellt.

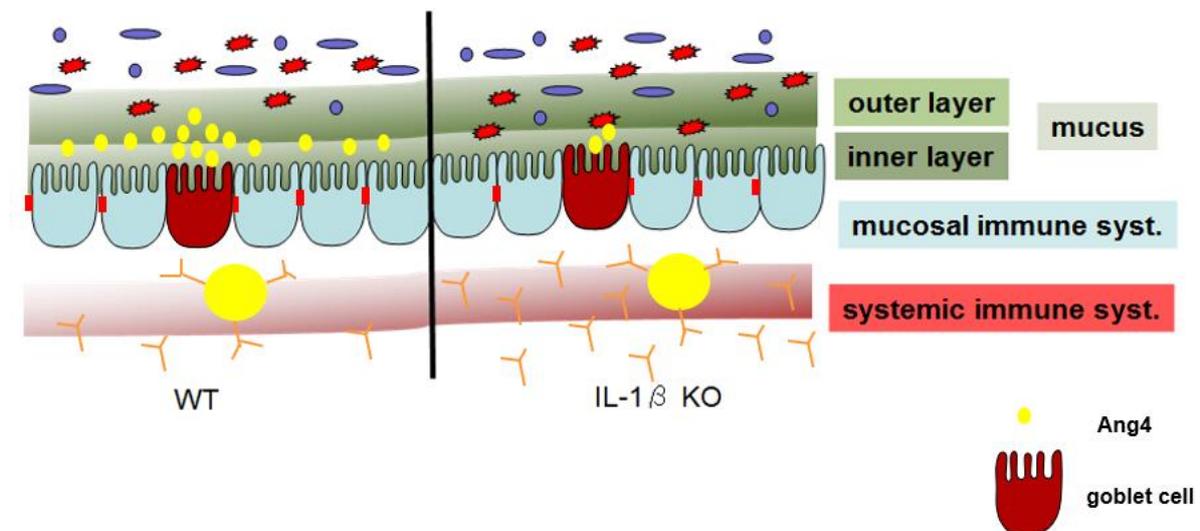


Abbildung 36: Vermuteter zugrundeliegender Mechanismus der Erhöhung von *Akkermansia muciniphila* im Mikrobiom von IL-1 β knockout Mäusen. Interleukin-1 β führt direkt oder über Signalkaskaden zur Ausschüttung von Angiogenin 4 aus Goblet Zellen in den Mucus, der Angiogenin 4 stabilisiert und einen Gradienten des antimikrobiellen Peptids aufbaut, sodass Bakterien von der Mukosaoberfläche ferngehalten werden. Bei IL-1 β Defizienz kommt es zu einer erniedrigten Freisetzung von Angiogenin 4 in den Mucus, wodurch Bakterien wie z.B. *A. muciniphila* in höherer Anzahl anwesend sein können und darüber hinaus stärker in und durch den Mucus penetrieren können, wodurch es nach stattgefundener Exposition zu einer systemischen Immunantwort kommen kann. **Ang4** = Angiogenin 4; **IL-1 β** = Interleukin-1 β ; **KO** = Knockout; **WT** = Wildtyp

Durch die Untersuchung eines Patienten mit Neueinstellung auf einen IL-1R-Antagonisten ergeben sich Hinweise, dass diese Daten möglicherweise auch auf das Humansystem übertragbar sind.

3.5.6 Ausblick

Die vorgestellten Daten geben das erste Mal eine Evidenz für den durch Interleukin-1 β ausgelösten Effekt auf den Grad der Kolonisation des Colons durch *Akkermansia muciniphila*. IL-1 β könnte hierbei der fehlende Link zwischen der Anwesenheit einer Inflammation und der Suppression des Vorkommens des mit Gesundheit assoziierten Bakteriums in vielen Erkrankungen sein, die mit einer chronischen Inflammation verbunden sind.

Für eine saubere Beweisführung wäre eine Behandlung von Interleukin-1 β knockout Mäusen mit Interleukin-1 β notwendig, um zu sehen, ob die Verschiebung im Mikrobiom durch diese Maßnahme umkehrbar wäre. In der Promotionsarbeit wurde jedoch aus ethischen Gründen darauf verzichtet, da die Gabe von Interleukin-1 β schwer zu titrieren ist und deshalb – besonders in IL-1 β naiven Mäusen – schnell zu einer überschießenden Inflammation führen kann, die auch den Tod der Versuchstiere auslösen könnte. Auch ist nicht bekannt, ob Interleukin-1 β die weiteren Signalkaskaden von luminal

oder von der Blutseite triggert, was die Auswahl des Applikationsweges für das Zytokin noch erschwert hätte. Eine Alternative wäre hierfür die Behandlung von Wildtyp Mäusen mit dem IL-1R Antagonisten Anakinra oder dem monoklonalen anti-IL-1 β Antikörper Canakinumab, die dieselben Ergebnisse wie die Versuche mit IL-1 β knockout sowie IL-1R knockout Tieren liefern sollten. Needell et al. führten bereits eine Behandlung von Ratten mit Anakinra durch, wodurch eine vermehrte Besiedlung der Versuchstiere mit *Akkermansia* gezeigt werden konnte (Needell et al. 2017).

Da in diesem Projekt der Mechanismus, der zur Sekretion von Angiogenin 4 bzw. ANG führt, nicht abschließend geklärt werden konnte, sollten weitere Untersuchungen hierzu erfolgen. Dabei wäre es eine Möglichkeit Darmzell-Linien zusammen mit Immunzellen zu kultivieren und so möglicherweise die Zwischenschritte von der Interleukin-1 β Freisetzung bis hin zur Ang4 bzw. ANG Sekretion zu ergründen. Besonders die Versuche an Colon-Zelllinien ohne erkennbaren Trend nach Stimulation mit IL-1 β sprechen dafür, dass dazwischengeschaltene Signalkaskaden an der Freisetzung von Angiogenin 4 mitbeteiligt sind. Da *Akkermansia muciniphila* laut Derrien et al. auch selbst zu einer Veränderung der Genexpression immunregulatorischer Mediatoren führen kann (Derrien et al. 2011), könnte auch eine Kokultivierung der Darm-Zellen zusammen mit *Akkermansia muciniphila* mit oder ohne Immunzellen einen Einblick in die immunologischen Prozesse geben.

Berücksichtigt man die positiven Effekte von *Akkermansia muciniphila* auf die intestinale Homöostase, aber auch auf viele metabolische Prozesse des Wirts, so geben die hier vorgestellten Daten eine Grundlage für die Entwicklung einer Therapie unter Verwendung dieses Bakteriums. Bei übergewichtigen und adipösen Personen wurden bereits positive Effekte bezüglich der Gewichtsreduktion durch Gabe von *Akkermansia muciniphila* als Probiotikum erzielt (Depommier et al. 2019). In Zukunft könnte dieser Therapieansatz jedoch auch für andere Erkrankungen, die eine basale Inflammation durch erhöhte IL-1 β Spiegel aufweisen, dienlich sein. Hierbei könnten neben metabolischen Erkrankungen wie Adipositas, das metabolische Syndrom oder Diabetes mellitus auch Erkrankungen wie Psoriasis oder andere autoinflammatorische Krankheitsbilder mögliche Indikationen für diese Probiotika-Gabe darstellen. Außerdem könnte in diesem Zusammenhang untersucht werden, ob eine Verschiebung des pathophysiologischen Zustands, der einhergeht mit dem durch IL-1 β ausgelösten Defizits an *Akkermansia muciniphila* als wichtiger Einflussfaktor auf die intestinale Homöostase, in Richtung Normalisierung durch orale Zufuhr dieses interessanten Bakteriums als Probiotikum erreicht werden kann. Ein weiterer Ansatzpunkt zur Wiederherstellung der intestinalen Homöostase in Erkrankungen mit erhöhtem IL-1 β Level könnte in der Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers gegen Angiogenin 4 bzw. ANG sein, der dessen Wirkung im Darm unterbindet und somit eine stärkere Ansiedlung mit *Akkermansia muciniphila* möglich machen könnte.

3.6 Zusammenfassung

Die Erforschung des Mikrobioms erhält in der heutigen Zeit durch die immer stärkere Evidenz seiner Bedeutung in Gesundheit und Krankheit einen hohen Stellenwert. Die gegenseitige Beeinflussung zwischen der Mikrobiota und dem Wirt bedürfen hierbei einer genauen Betrachtung. Besonders die Rolle des Immunsystems rückt dabei in den Fokus des Interesses. Interleukin-1 β ist ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin, welches auch bei der Aufrechterhaltung der Homöostase des Darms mitbeteiligt ist. Diese Arbeit gibt neue Einblicke in die Rolle von Interleukin-1 β bei der Beeinflussung der Zusammensetzung des Mikrobioms des Darms und in die Faktoren, die mit dieser Änderung assoziiert sind.

Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich durch einen knockout von Interleukin-1 β in Mäusen kein Einfluss auf die hoch prävalenten Vertreter der Darm-Mikrobiota ergibt. Jedoch zeigt sich ein vermehrtes Vorkommen der Familien Prevotellaceae sowie Verrucomicrobiaceae, sowie eine verminderte Besiedlung mit Bakterien der Familie Muribaculaceae und einem Vertreter der Familie der Lachnospiraceae. Zu den Verrucomicrobiaceae zählt das gram-negative, mukusliebende Bakterium *Akkermansia muciniphila*, welches bei einer Interleukin-1 β Defizienz bei Mäusen stark erhöht vorkommt. Sowohl im Next Generation Sequencing, als auch in der quantitativen Real Time-Polymerase Chain Reaction sind diese Ergebnisse aus dem Colon-Fäzes für das Bakterium *Akkermansia muciniphila* auch über einen langen Zeitraum konsistent. Eine Wiederholung der Untersuchungen mit der quantitativen Real Time – Polymerase Chain Reaction an Interleukin-1 Rezeptor knockout Tieren verglichen mit littermate Wildtyp Kontrollen zeigt eine ähnliche Tendenz hin zu einer Vermehrung der Besiedlung mit *Akkermansia muciniphila*, wodurch eine direkte Interaktion von Interleukin-1 β als Grund für die gefundene Verschiebung ausgeschlossen werden kann und eine indirekte Beeinflussung über zwischengeschaltete Signalkaskaden als zugrundeliegender Mechanismus gilt. Das antimikrobielle Peptid Angiogenin 4, dessen Expression bei Fehlen von Interleukin-1 β stark herabgesetzt ist, ist ein möglicher Kandidat, der für die Quantität des Vorkommens von *Akkermansia muciniphila* verantwortlich ist. Es zeigt eine inverse Korrelation zum Auftreten des Bakteriums und besitzt eine statistisch hoch signifikante wachstumshemmende Wirkung auf *Akkermansia muciniphila*. Ergebnisse dieser Arbeit konnten zeigen, dass durch die Änderungen in der Expression, besonders des antimikrobiellen Peptids Angiogenin 4 und die verstärkte Besiedlung mit *Akkermansia muciniphila* eine vermehrte Penetration des Bakteriums in den Mukus, sogar bis hin zur Mukosaoberfläche ermöglicht wird. Dieser Ortswechsel kann zu einem erhöhten Kontakt mit dem systemischen Immunsystem führen, wodurch eine stärkere Immunglobulin G Produktion gegen *Akkermansia muciniphila* beobachtet werden kann.

Das Bakterium *Akkermansia muciniphila* gilt als Indikator für ein gesundes Mikrobiom in einem gesunden Wirt. *Akkermansia muciniphila* kann positive Effekte auf metabolische Prozesse im Körper ausüben. So beeinflusst es den Fett- und Glucosestoffwechsel und kann bei adipösen Individuen zu einem Gewichtsverlust führen. *Akkermansia muciniphila* ist in Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Adipositas oder dem metabolischen Syndrom sowie in vielen chronisch entzündlichen Erkrankungen nur in geringem Maße in der Mikrobiota des Darms anzutreffen. Bei all diesen Erkrankungen zeigt sich eine basale Inflammation, die mit erhöhten Interleukin-1 β Leveln einhergeht. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass die verminderte Besiedlung mit dem gesundheitsfördernden Bakterium *Akkermansia muciniphila* durch das verstärkte Vorhandensein von Interleukin-1 β hervorgerufen wird. Das Zytokin führt hierbei zur Sekretion von antimikrobiellen Peptiden wie Angiogenin 4, die in den Mukus freigesetzt und durch diesen stabilisiert werden. Dies wiederum führt zu einem erschwerten Eindringen des mukuskolonisierenden Bakteriums.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit das erste Mal eine direkte Korrelation zwischen Interleukin-1 β und der quantitativen Zusammensetzung der Mikrobiota im Darm, die die Beobachtungen bei vielen Erkrankungen mit basaler Inflammation und erhöhten Interleukin-1 β Leveln erklären kann. Durch die physiologische Bedeutung von *Akkermansia muciniphila* auf die intestinale Homöostase und die metabolische Gesundheit des Wirts können diese Ergebnisse durch das Verständnis des Zusammenhangs zwischen Interleukin-1 β und *Akkermansia muciniphila* Hinweise in Richtung einer therapeutischen Anwendung des Bakterium als Probiotikum nicht nur bei metabolischen, sondern auch bei chronisch inflammatorischen Erkrankungen geben.

4 Projekt 2: Einfluss von Rituximab und Ciclosporin durch Regulierung des adaptiven Immunsystems auf das Mikrobiom des Darms

4.1 Einleitung

4.1.1 Das Mikrobiom

Dieser Teil der Einleitung wird im Abschnitt 1.2 näher ausgeführt.

4.1.2 Das Immunsystem

Dieser Teil der Einleitung wird im Abschnitt 1.1 näher ausgeführt.

4.1.3 Rituximab

Rituximab ist ein chimärer, monoklonaler Antikörper, der als Monotherapie oder in Kombination mit Chemotherapie zur Behandlung von B-Zell-Malignitäten wie dem Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) (Seyfizadeh et al. 2016) oder der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) oder bei Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise der rheumatoiden Arthritis (Bennett et al. 2015) oder Pemphigus vulgaris eingesetzt wird (Pierpont et al. 2018). Rituximab ist gegen das glykosylierte Transmembran-Phosphoprotein CD20 auf B-Zellen gerichtet. Dieses Oberflächenprotein wird sowohl auf sich entwickelnden B-Zellen als auch auf malignen B-Zellen exprimiert. CD20 ist ein spezifisches Antigen für B-Zellen und ist nicht auf anderen Körperzellen vorhanden (Pierpont et al. 2018; Schioppo und Ingegnoli 2017).

4.1.3.1 Wirkmechanismus von Rituximab

Rituximab löst durch die Bindung an das Oberflächenprotein CD20 eine B-Zell-Depletion aus und schwächt dadurch die adaptive Immunantwort. Der Zelltod der B-Zellen wird hierbei durch vier verschiedene Mechanismen ausgelöst (Pierpont et al. 2018), bei denen sowohl Caspase-abhängige als auch Caspase-unabhängige Wege eine Rolle spielen. Zum einen wird durch die Bindung von Rituximab an CD20 der C1-Komplex rekrutiert, der die klassische Komplementkaskade triggert und zur Bildung des Membranangriffskomplex (MAC – membrane attack complex) führt. Dieser wiederum leitet eine Porenbildung mit anschließender Zelllyse ein. Diesen Teil der Wirkung von Rituximab nennt man Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC – Complement-dependent cytotoxicity) (Golay und Introna 2012; Pierpont et al. 2018). Der zweite Mechanismus ist die Rekrutierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) nach Bindung von Rituximab an CD20 durch die Erkennung über FcγRIII. Hierbei erfolgt ein Perforin-Release, der zur Porenbildung der Zielzelle und damit zu deren Permeabilisierung führt, sowie die Freisetzung von Granzyme B, das den programmierten Zelltod u.a. über Spalten bzw. Aktivieren von Caspasen herbeiführt. Dieser Mechanismus wird als Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC – Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) bezeichnet (Bartlett et al. 2011;

Einleitung

Herndler-Brandstetter et al. 2017; Lopez-Lastra und Di Santo 2017; Osińska et al. 2014). Ein weiterer Mechanismus ist die Erkennung der Bindung von Rituximab an CD20 durch Makrophagen über den Fcγ-Rezeptor, die eine Phagozytose der Zielzellen einleitet. Hierbei spricht man von Antikörper-abhängiger Phagozytose (ADP – Antibody-dependent Phagocytosis) (Golay und Introna 2012). Der vierte Mechanismus ist die direkte Tötung der Zielzelle durch Rituximab. Dies erfolgt ohne Einschalten von Effektor-Mechanismen des Immunsystems (Bezombes et al. 2011; Ivanov et al. 2009; Weiner 2010). Der genaue Mechanismus hierbei ist jedoch noch nicht bekannt (Pierpont et al. 2018; Seyfizadeh et al. 2016).

4.1.3.2 Rituximab und der Einfluss auf das Mikrobiom

Über den Einfluss einer Therapie mit Rituximab auf das Mikrobiom im Allgemeinen oder auf das Mikrobiom des Darms bestehen bis dato noch keine Erkenntnisse.

4.1.4 Ciclosporin

Bei Ciclosporin, auch Cyclosporin A genannt, handelt es sich um ein Immunsuppressivum. Es ist zugelassen zur Prophylaxe der Abstoßung allogener Transplantate nach Organtransplantation sowie nach allogener Knochenmark- und Stammzelltransplantation, zur Prophylaxe und Behandlung der Graft-versus-Host Disease (GvHD) sowie zur Behandlung von Abstoßungsreaktionen. Aufgrund seiner Wirkung als Immunsuppressivum ist der Einfluss auf Autoimmunerkrankungen auch ein interessanter Aspekt (Paziana et al. 2013; Tapia et al. 2021).

4.1.4.1 Wirkmechanismus von Ciclosporin

Die Hauptwirkung entsteht durch die intrazelluläre Bindung von Ciclosporin an das Immunophilin Cyclophilin. Der Komplex aus Ciclosporin und Cyclophilin bindet daraufhin an Calcineurin. Calcineurin ist eine Protein-Phosphatase, die durch die Bindung an NFAT (nuclear factor of activated thymocytes) und gemeinsame Translokation in den Zellkern die Transkription von Interleukin-2 (IL-2) und anderen Genprodukten induziert. Durch die Blockade von Calcineurin wird somit die Bildung von IL-2 über diesen Weg inhibiert. Die Wirkung zeigt sich am stärksten in CD4-positiven T-Helfer-Lymphozyten. IL-2 spielt eine wichtige Rolle in der T-Zell-Proliferation. Die Gabe von Ciclosporin greift somit in die adaptive Immunantwort ein und wirkt so Transplantatabstoßungen oder auch Autoimmunerkrankungen entgegen (Liddicoat und Lavelle 2019; Schroeder und Herzig 1998).

Ein weiterer Wirkmechanismus von Ciclosporin zeigt sich im Eingriff in das angeborene Immunsystem über die Wirkung an dendritischen Zellen sowie Makrophagen und Neutrophilen. Dendritische Zellen sind wichtig für das T-Zell-Priming. Ciclosporin moduliert hier die Expression der Oberflächenmoleküle, die für die Aktivierung von T-Zellen verantwortlich sind. Außerdem wird die Zytokin-Sekretion moduliert, wodurch es zu einer veränderten T-Zell-Antwort kommt. Bei Makrophagen und

Neutrophilen zeigt sich unter Ciclosporin Therapie eine verringerte Produktion von Zytokinen, die unter physiologischen Bedingungen eine protektive Rolle in der Pathogenabwehr spielen, jedoch unter pathophysiologischen Umständen zur Transplantatabstoßung oder Autoimmunität führen können. Ciclosporin hemmt die Freisetzung dieser Faktoren und wirkt somit auch über diesen Weg der Transplantatabstoßung sowie der Autoimmunität entgegen (Liddicoat und Lavelle 2019).

4.1.4.2 Einfluss von Ciclosporin auf das Mikrobiom

Es gibt uneindeutige Aussagen über den Einfluss von Ciclosporin auf das Mikrobiom im Allgemeinen und spezieller auf das Mikrobiom des Darms.

O'Reilly et al. untersuchten den Effekt von Ciclosporin auf Patienten und werteten Stuhlproben vor und nach einer siebentägigen Ciclosporin Therapie aus. Hierbei zeigte sich zwar ein Anstieg von N-Pyruvat und Acetat, jedoch schrieben die Autoren diesen Effekt nicht Ciclosporin, sondern anderen Bestandteilen der Ciclosporin-enthaltenden Mikrosphären zu. Nach sieben Tagen Therapie ließ sich in dieser Untersuchung dementsprechend kein Unterschied feststellen (O'Reilly et al. 2020).

Romito et al. untersuchten Einflussfaktoren auf die Entwicklung einer gingivalen Hyperplasie nach Herztransplantation unter anderem auf Unterschiede in der Zusammensetzung der Mikrobiota. Hier ließ sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit bzw. ohne Ciclosporin Therapie feststellen (Romito et al. 2004).

Jia et al. hingegen sahen einen Unterschied in Untersuchungen an Ratten mit orthotroper Lebertransplantation. Hierbei wurden Kontrolltiere ohne Transplantation, Tiere mit einer Transplantation eines Isografts, Tiere mit der Transplantation eines Allografts ohne Ciclosporin Therapie sowie Tiere mit der Transplantation eines Allografts mit Ciclosporin Therapie auf die Leberfunktion sowie die Zusammensetzung des Mikrobioms untersucht. Die Ciclosporin Therapie erfolgte hierbei oral über 28 Tage. Bei den Tieren der letzten Gruppe (Allograft plus Ciclosporin Therapie) zeigte sich im Vergleich zu den Tieren mit Allograft ohne Ciclosporin Therapie eine Reduktion des Clostridien-Clusters I, des Clostridien-Clusters XIV sowie der Enterobacteriaceen. Erhöht wurde das Bakterium *Faecalibacterium prausnitzii* vorgefunden. Das Mikrobiom der Tiere mit Allograft und Ciclosporin Therapie ähnelte somit mehr dem Mikrobiom der Kontrolltiere ohne Transplantation sowie der Tiere mit transplantiertem Isograft. Die Autoren gingen hierbei von einer Neigung der Restaurierung des Mikrobioms durch Ciclosporin aus (Jia et al. 2019).

4.2 Zielsetzung

In diesem Teilprojekt soll der Einfluss einer Therapie von Rituximab (B-Zell-Antwort) und Ciclosporin (T-Zell-Antwort) auf das Mikrobiom des Darms analysiert werden:

1. Zeigt sich im Mausmodell nach drei Wochen ein Unterschied im Mikrobiom des Darms unter einer Therapie mit intravenös verabreichtem Rituximab im Vergleich zu einer Therapie mit intravenös verabreichtem Placebo?
2. Zeigt sich hierbei ein Unterschied in der α - oder β -Diversität?
3. Zeigt sich beim Menschen ein Unterschied vor und sechs Wochen nach Beginn einer Therapie mit Rituximab?
4. Zeigen sich hierbei Unterschiede in der α - oder β -Diversität?
5. Gibt es in der Veränderung des Mikrobioms Unterschiede zwischen einer Rituximab Monotherapie und einer Therapie mit Rituximab plus Chemotherapie?
6. Lassen sich die Erkenntnisse aus dem Tierversuch auf das Humansystem übertragen?
7. Zeigt sich im Mausmodell nach drei Wochen ein Unterschied im Mikrobiom des Darms unter einer Therapie mit intraperitoneal appliziertem Ciclosporin im Vergleich zu einer Therapie mit intraperitoneal appliziertem Placebo?
8. Zeigt sich hierbei ein Unterschied in der α - oder β -Diversität?

Das Projekt soll somit einen Einblick in den Einfluss des adaptiven Immunsystems auf die Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms geben.

4.3 Material und Methoden

4.3.1 Material

4.3.1.1 Geräte

Heizer	Eppendorf Thermomixer® Comfort; Eppendorf
Illumina Sequencer	Illumina MiSeq System; Illumina
NanoDrop	ND-1000 Spektrophotometer; peQLAB Biotechnologie
Schüttler für DNA-Isolation	IKA VIBRAX VXR; IKA Werke
ThermoCycler	peQLAB Biotechnologie GmbH
Zentrifuge klein	Biofuge pico; Heraeus

4.3.1.2 Verbrauchsmaterial

1,5 ml Eppendorf-Gefäß (Eppi)	Eppendorf Tubes; Eppendorf
2,0 ml Safe Seal Eppi	Eppendorf Safe Lock Tubes; Eppendorf
Kanüle i.p. Gabe 26 G x ½	TERUMO SurGuard2; Terumo Corporation
Kanüle i.v. Gabe 27 G x ¾	BD Microlance™ 3; Becton Dickinson GmbH
Spritzen 1 ml	BD Plastipak™ Luer Lok™; Becton Dickinson GmbH
Kühlakkus	Carl Roth GmbH + Co. KG
Stuhluntersuchungsröhrchen	Sarstedt AG & Co.
Versandboxen	Sarstedt AG & Co.

4.3.1.3 Chemikalien

Chloroform	AppliChem
EDTA	AppliChem
Eisessig	Merck KGaA
Ethanol	Sigma Aldrich
Glasbeads	Carl Roth GmbH + Co. KG
Lysozym	Sigma Aldrich
Methanol	vwr chemicals
PBS (w/o Ca & Mg)	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline w/o Calcium w/o Magnesium; anprotec
RNAse-freies H ₂ O	Aqua ad injectabilia Braun 10 ml; B. Braun
Tris-HCl	Carl Roth GmbH + Co. KG
Triton X100	Merck KGaA

4.3.1.4 Puffer

Methanol-Carnoy's fixative

- Methanol 6 ml
- Chloroform 3 ml
- Eisessig 1 ml

Stuhl-Lysepuffer

- 2 ml 1M Tris-HCl pH 8,0
- 400 µl EDTA 0,5 M
- 1,2 ml Triton X100
- Ad 100 ml Aqua destillata

Stuhl-Lysepuffer mit Lysozym (pro Probe, angesetzt als n+1)

Projekt 2: Einfluss von Rituximab und Ciclosporin durch Regulierung des adaptiven Immunsystems auf das Mikrobiom des Darms

Material und Methoden

Placebo in Form von 0,9 %iger Natriumchlorid-Lösung (B.Braun) intravenös über die Schwanzvene einmal wöchentlich für drei Wochen appliziert.

4.3.2.3 Behandlung der Mäuse mit Ciclosporin

Zwölf sechs Wochen alte, weibliche C57BL/6N Mäuse (Charles River) wurden für drei Wochen zusammengehalten, um eine Angleichung des Mikrobioms der Mäuse zu gewährleisten. Danach wurde sechs Mäusen täglich für 21 Tage Ciclosporin (Sandimmun®, Novartis Pharma) intraperitoneal in einer Dosierung von 35 mg/kg Körpergewicht (KG) appliziert. Den anderen sechs Mäusen wurde 250 µl Placebo in Form von 0,9 %iger Natriumchlorid-Lösung (B.Braun) intraperitoneal täglich über einen Zeitraum von 21 Tagen appliziert.

4.3.2.4 Probenentnahme

Die Mäuse wurden durch eine CO₂-Narkose und anschließender zervikaler Dislokation getötet. Es wurden Blut, ein Stück des proximalen Colons, Fäzes von Colon, Caecum und Dünndarm sowie Scrapings der Darm-Mukosa in den Abschnitten Colon, Caecum und Dünndarm entnommen.

Das Blut wurde bei 13.000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, das Serum in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die Proben bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Das entnommene Darmstück wurde in Methanol-Carnoy's fixative (Methanol : Chloroform : Eisessig 6:3:1) bei 2-8 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Der Fäzes wurde bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Die Mukosa-Scrapings wurden bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Die Weiterverarbeitung des Serums, des entnommenen Darmstücks sowie der Mukosa-Scrapings stellen keinen Teil dieser Arbeit dar und werden deshalb im folgenden Abschnitt nicht mehr aufgeführt.

4.3.2.5 Ethikvotum und Projektablauf der Stuhlprobensammlung

Für die Sammlung von Patientenstuhlproben wurde das Projekt „Etablierung einer Stuhlbank zur Analyse der Bakterienzusammensetzung im Darm“ unter dem Zeichen S-655/2012 bei der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Heidelberg angezeigt. Es liegt ein positives Ethikvotum vor. Hierbei handelt es sich um eine monozentrische, prospektive, unkontrollierte, deskriptive, nicht-interventionelle Registerstudie.

Es wurden volljährige, einwilligungsfähige Patienten rekrutiert, die eine Therapie mit Rituximab (MabThera®, Roche) begannen. Die Patienten gaben jeweils vor Beginn der Therapie sowie sechs Wochen nach Therapiestart eine Stuhlprobe ab. Alle Patienten wurden vor Aufnahme in die Studie aufgeklärt und es liegt von allen rekrutierten Patienten eine unterzeichnete Einverständniserklärung vor. Des Weiteren wurde die sonstige Medikation der Patienten erfasst.

4.3.2.6 DNA-Aufreinigung aus Fäzes

Aus Fäzes der Mäuse oder Stuhl der Patienten wurde mithilfe des „QIAmp DNA Stool Kit“ von QIAGEN DNA isoliert. Dieses Kit enthält: ASL Puffer, Inhibit Ex Tabletten, Proteinase K, AL-Puffer, Silicasäulen, collection tubes, AW1 Puffer, AW2 Puffer, AE Puffer. Hierfür wurden die Proben auf Eis aufgetaut. Der Fäzes wurde in einem 2 ml SafeSeal Eppendorf-Gefäß mit 700 µl ASL-Puffer und Glasbeads (Carl Roth GmbH + Co. KG) versetzt. Diese wurden auf dem Schüttler (IKA VIBRAX VXR; IKA Werke) 5 Minuten geschüttelt, danach 5 Minuten auf dem Heizer (Eppendorf) bei 95 °C gekocht, eine Minute abkühlen

gelassen, nochmals 3 Minuten geschüttelt und anschließend 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden in ein neues 2 ml SafeSeal-Eppendorf-Gefäß überführt und im Kühlschrank zwischengelagert. Das entstandene Pellet wurde mit 200 µl Stuhl-Lysepuffer mit Lysozym, bestehend aus 20 mg/ml Lysozym (Sigma-Aldrich) in Stuhl-Lysepuffer (2 ml 1M TRIS HCl pH 8,0, 400 µl EDTA 0,5 M, 1,2 ml Triton X100 ad 100 ml Aqua destillata), versetzt und auf dem Heizer für 30 Minuten bei 37 °C erwärmt. Danach wurden dieser Mischung 500 µl ASL-Puffer hinzugegeben und wieder 5 Minuten geschüttelt, 5 Minuten bei 95 °C gekocht, eine Minute bei Raumtemperatur abgekühlt und danach 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde zum im Kühlschrank gelagerten Überstand hinzugefügt und das Pellet verworfen. Den zusammengeführten Überständen der Probe wurde jeweils eine halbe Inhibit Ex Tablette hinzugegeben und gevortext, bis diese zerfallen war. Es wurde 3 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Nach erneutem Zentrifugieren bei 13.000 rpm für 3 Minuten wurden 400 µl des Überstands zusammen mit 15 µl Proteinase K in ein neues 2 ml SafeSeal Eppendorf-Gefäß überführt und mit 2000 µl AL-Puffer versetzt. Die Mischung wurde für 15 Sekunden gevortext und anschließend für 10 Minuten bei 70 °C erwärmt. Nach kurzem Zentrifugieren wurde 400 µl Ethanol (Sigma Aldrich) hinzugegeben und das komplette Lysat auf die Silicasäule überführt. Die Silicasäule wurde für 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert und anschließend das collection tube gewechselt. Nach Zugabe von 500 µl AW1 wurde 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert, das collection tube gewechselt, 500 µl AW2 zugegeben und 3 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach erneutem Wechsel des collection tubes wurde nochmals 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die an der Silicasäule gebundene DNA wurde mit 100 µl auf 70 °C vorgeheiztem AE-Puffer in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß durch kurze Zentrifugation eluiert. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

4.3.2.7 DNA-Konzentrationseinstellung zur Vorbereitung für die Sequenzierung

Die Konzentration der aus dem murinen oder humanen Fäzes isolierten DNA wurde am Nano Drop (peQLAB Biotechnologie) vermessen und mit H₂O (B.Braun) auf eine Konzentration von 80 ng/µl eingestellt.

4.3.2.8 Deep Sequencing (Next Generation Sequencing)

Die Proben wurden zur Sequenzierung an das MVZ Labor Dr. Limbach & Kollegen GbR (Heidelberg) gegeben. Die Sequenzierung der V3/4 Region wurde mit Hilfe des Illumina MiSeq Systems (Illumina) durchgeführt.

4.3.2.9 Auswertung des Sequencings

Die Datenanalyse des Next Generation Sequencings wurde mit Hilfe der CLC Biomedical Workbench (V4.0) durchgeführt. Hierbei wurde eine OTU (Operational Taxonomic Unit) basierte Auswertung verwendet. Die Klassifizierung der Sequenzen wurde unter Anwendung von Greengenes (Version 13) als Datenbank ermittelt, danach fand noch ein BLASTing über die NCBI (National Center of Biotechnology Information) Datenbank statt. Berechnet wurde die α -Diversität nach Shannon, die Richness, die Evenness und die Dominanz. Die statistische Signifikanz wurde hierbei bei den Mäusen durch Anwendung des Wilcoxon sum rank Test errechnet. Des Weiteren wurde die β -Diversität Varianz durch Auswertung der principal coordinate analysis (PCoA) und Ermittlung der Signifikanz durch PERMANOVA (Permutational multivariate analysis of variance) basierend auf dem Bray-Curtis Index analysiert. Außerdem wurden die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf mehreren Stufen der hierarchischen Rangebene der Taxonomie untersucht. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz kam hierbei der Student's T-Test zur Anwendung. Die Statistik wurde mit Hilfe von Prism – GraphPad (Version 5.0) durchgeführt. Als signifikant wurden Werte mit $p < 0,05$ gewertet. Des Weiteren wurde eine Heat Map der hochprävalenten Keime pro Probe bzw. Versuchstier erstellt.

Projekt 2: Einfluss von Rituximab und Ciclosporin durch Regulierung des adaptiven Immunsystems auf das Mikrobiom des Darms

Material und Methoden

Zusätzlich wurde die Datenanalyse des Next Generation Sequencings für die α -Diversität mit Hilfe der R Software erarbeitet. Hierbei wurde dada2 für eine RSV (Ribosomal Sequence Variance) basierte Auswertung verwendet. Die Klassifizierung der Sequenzen wurde unter Anwendung der Silva Database (Version 132) als Datenbank ermittelt. Berechnet wurde die α -Diversität nach Shannon, die Richness, die Evenness und die Dominanz. Die statistische Signifikanz wurde bei den Mäusen durch Anwendung des Wilcoxon sum rank Test und bei den Humandaten mittels linear mixed model errechnet. Die Auswertung mithilfe der Software R wurde durch Dr. Sébastien Boutin, Heidelberg, durchgeführt.

4.4 Ergebnisse

4.4.1 Ergebnisse des Next Generation Sequencings des Tierversuchs mit Rituximab

Es wurden sechs C57BL/6N Mäuse mit 375 mg/m² Rituximab i.v. einmal wöchentlich für drei Wochen als Verum sowie sechs C57BL/6N Mäuse mit Natriumchlorid 0,9 % i.v. einmal wöchentlich für drei Wochen als Placebo behandelt. Eine Maus im Verum-Arm (Maus 2) bekam bei der ersten Injektion eine Infusionsreaktion und musste getötet werden. Diese Maus konnte nicht in die Auswertung einfließen.

Es wurde ein Next Generation Sequencing für die 16S Region V3/4 durchgeführt. Hierfür wurde DNA aus Fäzes des Colons der Versuchstiere isoliert. Das Next Generation wurde in einem Illumina MiSeq System (Illumina) durch das MVZ Labor Dr. Limbach & Kollegen GbR (Heidelberg) durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software CLC Biomedical Workbench (Version 4.0) unter Verwendung der Datenbank Greengenes (Version 13.0) für die Zuordnung der Sequenzen, sowie mit der R Software (Version 3.6.3) unter Verwendung der SILVA Database (Version 132) für die Zuordnung der Sequenzen. Die Auswertung über die R Software wurde durch Dr. Sébastien Boutin durchgeführt.

Zwischen den Versuchsgruppen zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der α -Diversität, hier beispielsweise am Shannon-Diversitäts Index gezeigt (s. Abbildung 37) ($p=0,79$). Auch in der β -Diversität war kein statistisch signifikanter Unterschied festzustellen (PERMANOVA: $p=0,06$) (s. Abbildung 38).

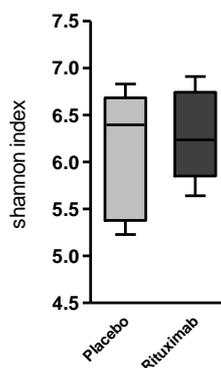


Abbildung 37: Vergleich des Shannon-Diversitäts Index zwischen Placebo Tieren und Verum (Rituximab) Tieren. DNA aus Fäzes von sechs mit Placebo behandelten sowie fünf mit Rituximab behandelten Mäusen wurde mittels Next Generation Sequencing auf Unterschiede im Mikrobiom analysiert. Die Ermittlung des Shannon-Diversitäts Index wurde mit Hilfe der R Software (Version 3.6.3) durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde hierbei durch Anwendung des Wilcoxon sum rank Test errechnet: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

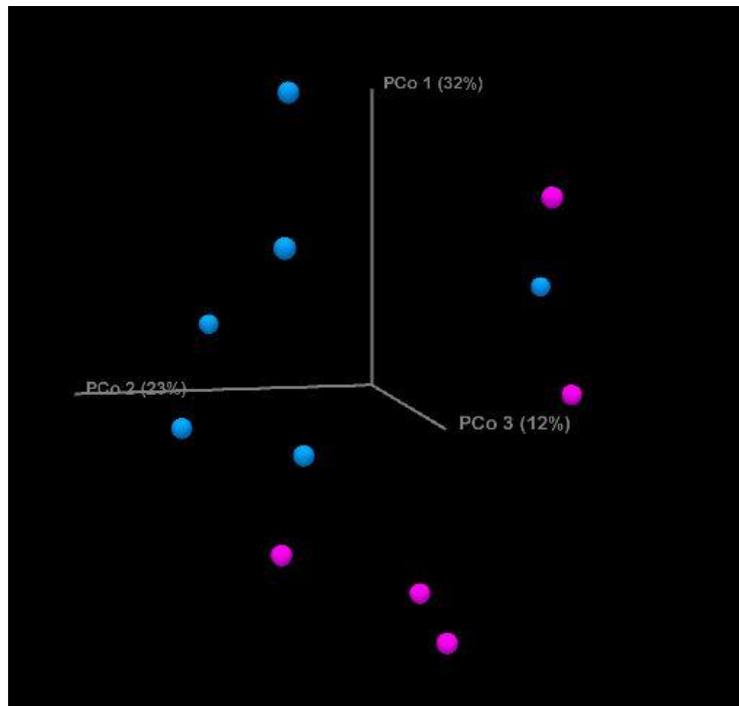


Abbildung 38: Principal Coordinates Analyse (PCoA) zur Darstellung der β -Diversität des Sequencings von mit Rituximab bzw. Placebo behandelten Mäusen. DNA aus Fäzes von fünf mit Rituximab und sechs mit Placebo behandelten Mäusen wurde mittels Next Generation Sequencing auf Unterschiede im Mikrobiom analysiert. Die β -Diversität Varianz wurde durch Auswertung der principal coordinate analysis (PCoA) und Ermittlung der Signifikanz durch PERMANOVA (Permutational multivariate analysis of variance) basierend auf dem Bray-Curtis Index analysiert. Blau: Placebo; Pink: Rituximab.

Die Heat Map zeigt die Änderung in der Häufigkeit des Vorkommens stark vertretener Keime zwischen den Placebo und Verum Mäusen (s. Abbildung 39).

Nach Zuordnung der Sequenzen ergaben sich die in Abbildung 40 und Abbildung 41 sowie Tabelle 14 (im Appendix 10) aufgeführten statistisch signifikanten Veränderungen im Mikrobiom zwischen der Placebo und der Verum (Rituximab) Gruppe.

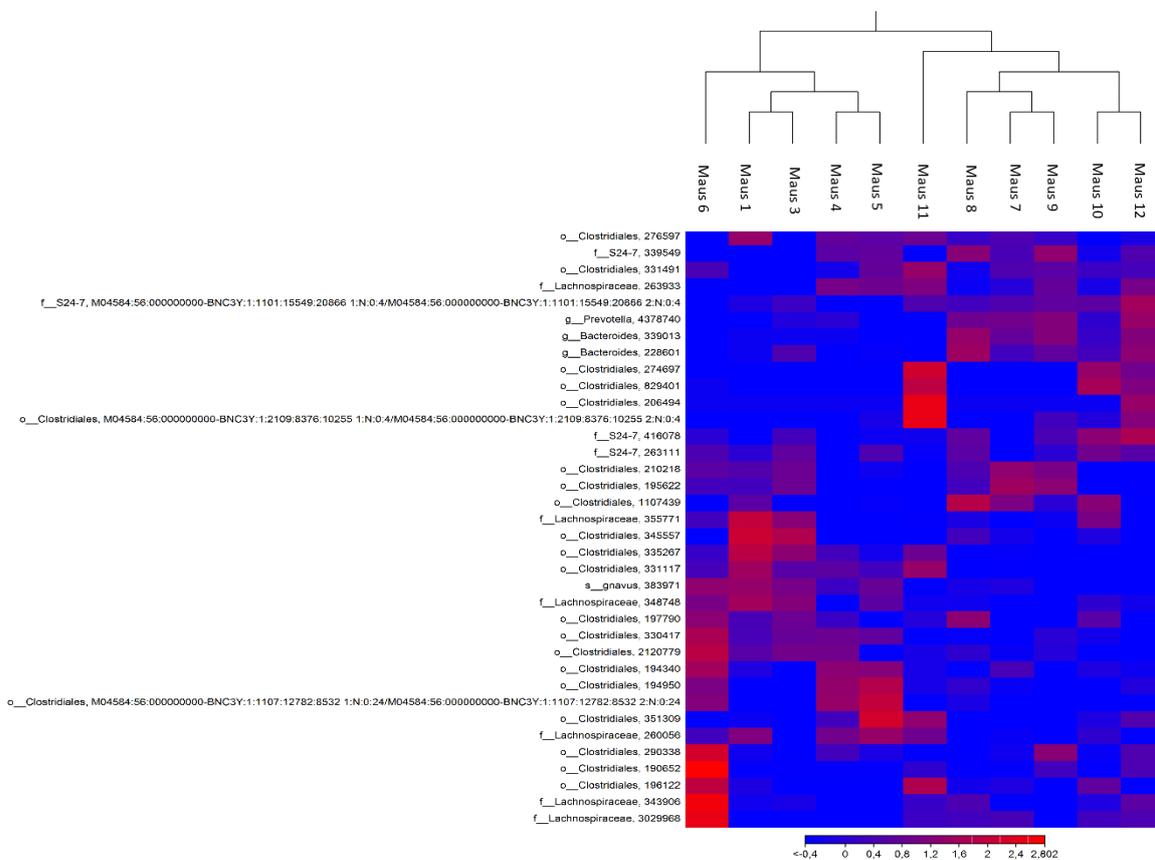


Abbildung 39: Heat Map der Änderung in der Häufigkeit des Vorkommens stark verteilter Keime zwischen den Placebo und Verum Mäusen. DNA aus Fäzes von den sechs mit Placebo behandelten und fünf mit Rituximab therapierten Mäusen wurde mittels Next Generation Sequencing auf Unterschiede im Mikrobiom analysiert. Die Zuordnung der Sequenzen wurde mit Hilfe der Software CLC Biomedical Workbench (Version 4.0) unter Verwendung der Datenbank Greengenes (Version 13.0) durchgeführt. Maus 1-6: Rituximab, Maus 7-12 Placebo.

Die Zuordnung der Sequenzen mit anschließender quantitativer Auswertung der einzelnen Spezies ergab eine erhöhte Besiedlung der Mäuse der Verum-Gruppe mit Bakterien der Ordnung Clostridiales, hierunter vermehrt der Familie der Lachnospiraceae wie *Roseburia*, *Lachnoclostridium* sowie *Eisenbergiella* (s. Abbildung 40 sowie Tabelle 14 im Appendix 10). In den mit Placebo behandelten Tieren fand man hingegen mehr Muribaculaceae (S24-7) als in den mit Rituximab behandelten Mäusen (s. Abbildung 41 sowie Tabelle 14 im Appendix 10).

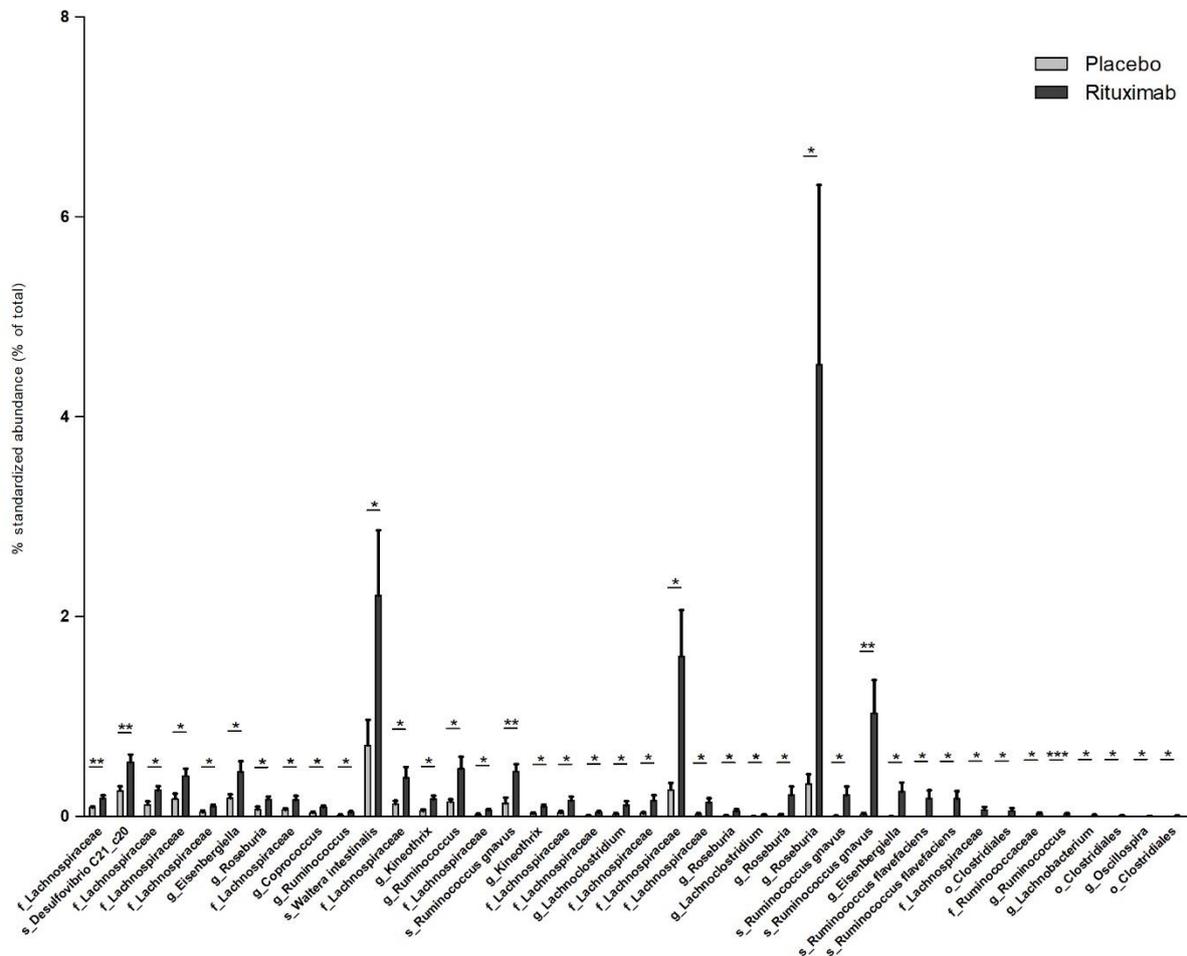


Abbildung 40: Im Next Generation Sequencing zeigte sich für diese Keime ein statistisch signifikant höheres Vorkommen im Mikrobiom der mit Rituximab behandelten Tiere. DNA aus Fäzes von sechs mit Placebo behandelten und fünf mit Rituximab therapierten Mäusen wurde mittels Next Generation Sequencing auf Unterschiede im Mikrobiom analysiert. Die Zuordnung der Sequenzen wurde mit Hilfe der Software CLC Biomedical Workbench (Version 4.0) unter Verwendung der Datenbank Greengenes (Version 13.0) durchgeführt. Der Mittelwert sowie die Standardabweichung wurden ermittelt und das Signifikanzlevel mittels Student's T-Test errechnet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Abgebildet sind alle Keime, die ein statistisch signifikant höheres Vorkommen in den mit Rituximab behandelten Versuchstieren zeigten.

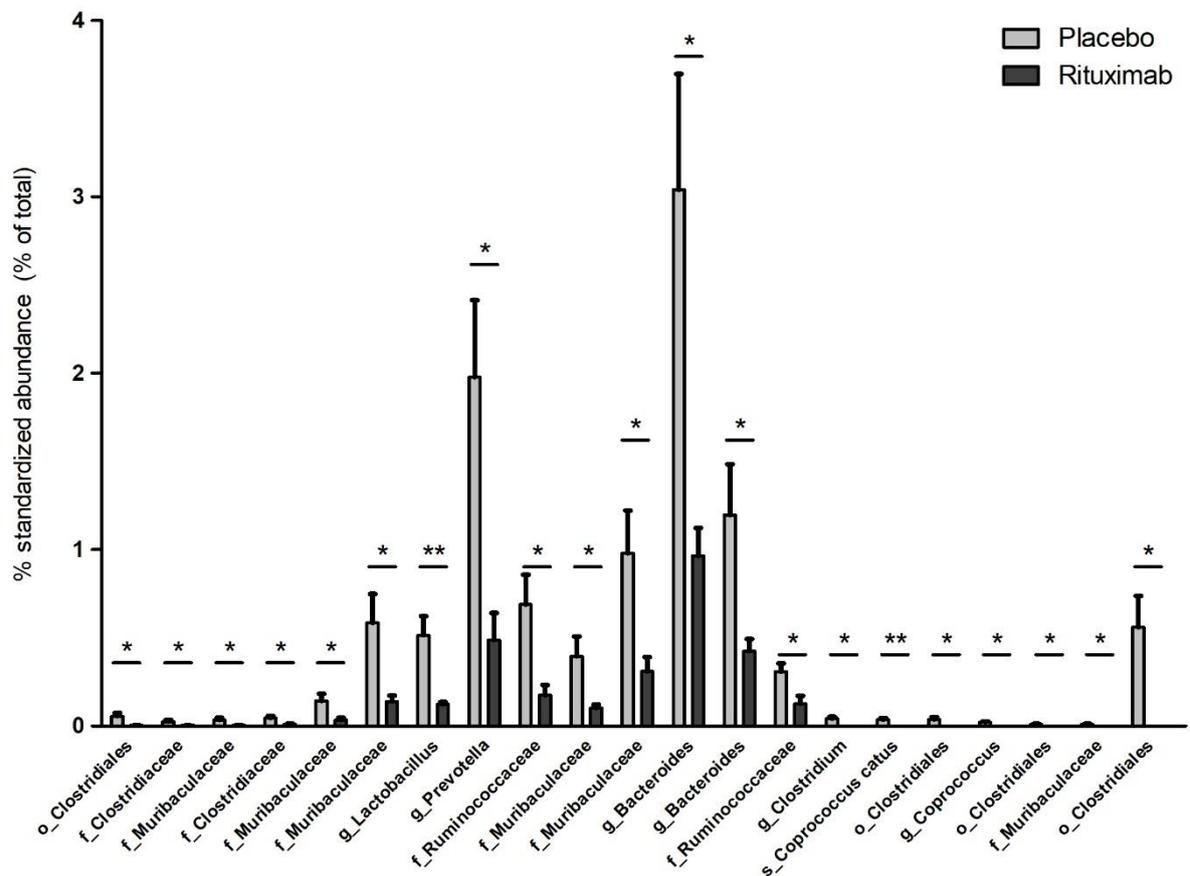


Abbildung 41: Im Next Generation Sequencing zeigte sich für diese Keime ein statistisch signifikant niedrigeres Vorkommen im Mikrobiom der mit Rituximab behandelten Tiere. DNA aus Fäzes von sechs mit Placebo behandelten und fünf mit Rituximab therapierten Mäusen wurde mittels Next Generation Sequencing auf Unterschiede im Mikrobiom analysiert. Die Zuordnung der Sequenzen wurde mit Hilfe der Software CLC Biomedical Workbench (Version 4.0) unter Verwendung der Datenbank Greengenes (Version 13.0) durchgeführt. Der Mittelwert sowie die Standardabweichung wurden ermittelt und das Signifikanzlevel mittels Student`s T-Test errechnet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Abgebildet sind alle Keime, die ein statistisch signifikant niedrigeres Vorkommen in den mit Rituximab behandelten Versuchstieren im Vergleich zu den mit Placebo behandelten Mäusen zeigten.

Ergebnisse

4.4.2 Ergebnisse des Next Generation Sequencings von Patienten unter Rituximab Therapie

4.4.2.1 Patientencharakteristik

Es wurden sieben Patienten eingeschlossen, von denen drei Patienten Rituximab als Monotherapie sowie vier Patienten Rituximab in Kombination mit Chemotherapie erhielten. Die Patientencharakteristika sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10: Patientencharakteristik der Rituximab-Patienten. In dieser Tabelle ist die Patientencharakteristik der Patienten dargestellt, aufgeschlüsselt nach Alter, Geschlecht, Therapieregimen und zugrundeliegender Erkrankung, die zur Rituximab Therapie führte. **CHOP** = Cyclophosphamid + Doxorubicin + Vincristin + Prednisolon/Prednison; **CLL** = Chronische lymphatische Leukämie; **M** = Männlich; **W** = Weiblich.

	Alle Patienten	Patienten mit Rituximab Monotherapie	Patienten mit Rituximab Kombinationstherapie
Alter [Jahre]	60 (32-80)	47 (32-61)	70 (58-80)
Geschlecht	M: 4 W: 3	M: 1 W: 2	M: 3 W: 1
Kombinations- therapie	Monotherapie: 3 + Bendamustin: 2 + Brentuximab-vedotin: 1 + CHOP: 1	-	+ Bendamustin: 2 + Brentuximab-vedotin: 1 + CHOP: 1
Grunderkrankung	CLL: 2 Lymphom: 5	Lymphom: 3	CLL: 2 Lymphom: 2

4.4.2.2 Ergebnisse des Next Generation Sequencings

Um die Relevanz der im Tiermodell gefundenen Erkenntnisse für das Humansystem zu überprüfen, wurde Fäzes der Patienten vor Beginn und sechs Wochen nach Beginn der Rituximab Therapie gesammelt, DNA isoliert sowie ein Next Generation Sequencing für die 16S Region V3/4 durchgeführt. Das Next Generation wurde in einem Illumina MiSeq Systems (Illumina) durch das MVZ Labor Dr. Limbach & Kollegen GbR (Heidelberg) durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software CLC Biomedical Workbench (Version 4.0) unter Verwendung der Datenbank Greengenes (Version 13.0) für die Zuordnung der Sequenzen. Zusätzlich erfolgte durch Dr. Sébastien Boutin eine Auswertung der α -Diversität mittel R Software (Version 3.6.3) unter der Verwendung der Silva Database (V132).

Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der α -Diversität vor sowie nach sechswöchiger Therapie mit Rituximab, wie in Abbildung 42 beispielhaft an der Diversität nach Shannon gezeigt ($p=0,35$). Auch in der β -Diversität war kein statistisch signifikanter Unterschied festzustellen (PERMANOVA: $p=0,90$) (s. Abbildung 43).

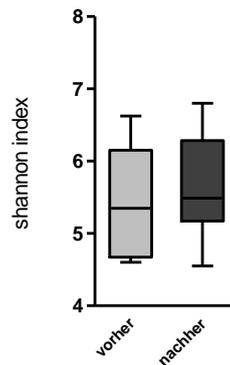


Abbildung 42: Der Shannon-Diversitäts Index für die Patienten unter Therapie mit Rituximab zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied zum Ausgangswert. DNA aus Fäzes von sieben Patienten vor und sechs Wochen nach Initiierung einer Therapie mit Rituximab wurde mittels Next Generation Sequencing auf Unterschiede im Mikrobiom analysiert. Die Ermittlung des Shannon-Diversitäts Index wurde mit Hilfe der R Software (Version 3.6.3) durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde hierbei durch Anwendung des linear mixed model errechnet: $p=0,35$.

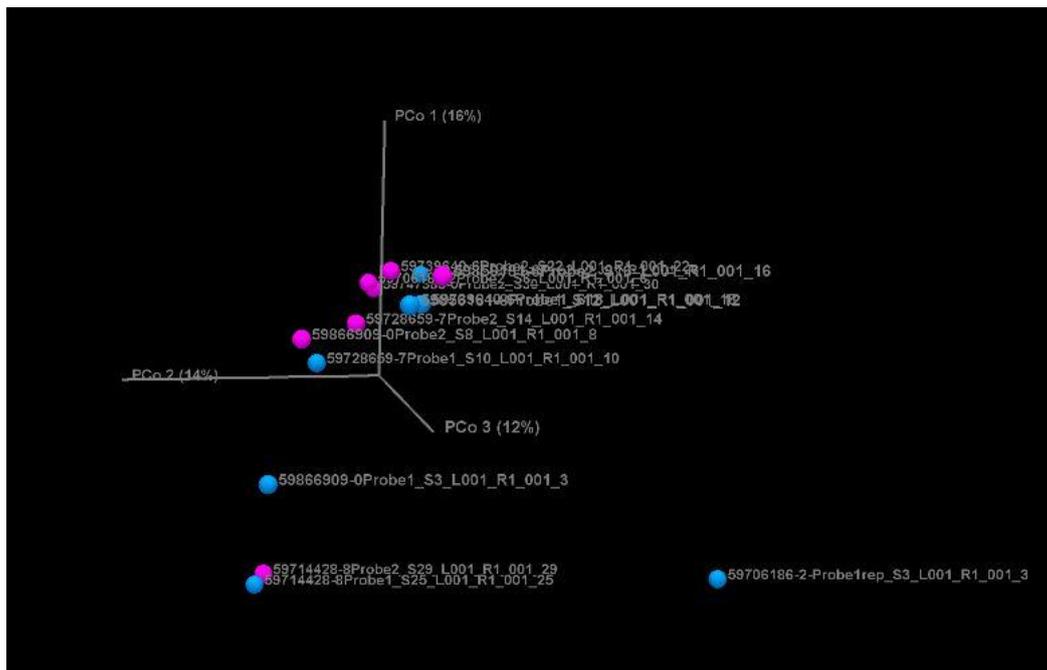


Abbildung 43: Principal Coordinates Analyse (PCoA) zur Darstellung der β -Diversität des Sequencings von Patienten vor und sechs Wochen nach Beginn einer Therapie mit Rituximab. DNA aus Fäzes von sieben Patienten vor und sechs Wochen nach Beginn einer Therapie mit Rituximab wurde mittels Next Generation Sequencing auf Unterschiede im Mikrobiom analysiert. Die β -Diversität Varianz wurde durch Auswertung der principal coordinate analysis (PCoA) und Ermittlung der Signifikanz durch PERMANOVA (Permutational multivariate analysis of variance) basierend auf dem Bray-Curtis Index analysiert. Blau: vor Beginn der Therapie; Pink: sechs Wochen nach Beginn der Therapie.

Projekt 2: Einfluss von Rituximab und Ciclosporin durch Regulierung des adaptiven Immunsystems auf das Mikrobiom des Darms

Ergebnisse

Die Heat Map zeigt die Änderung in der Häufigkeit des Vorkommens stark verteilter Keime in Patienten vor und nach sechswöchiger Therapie mit Rituximab (s. Abbildung 44).

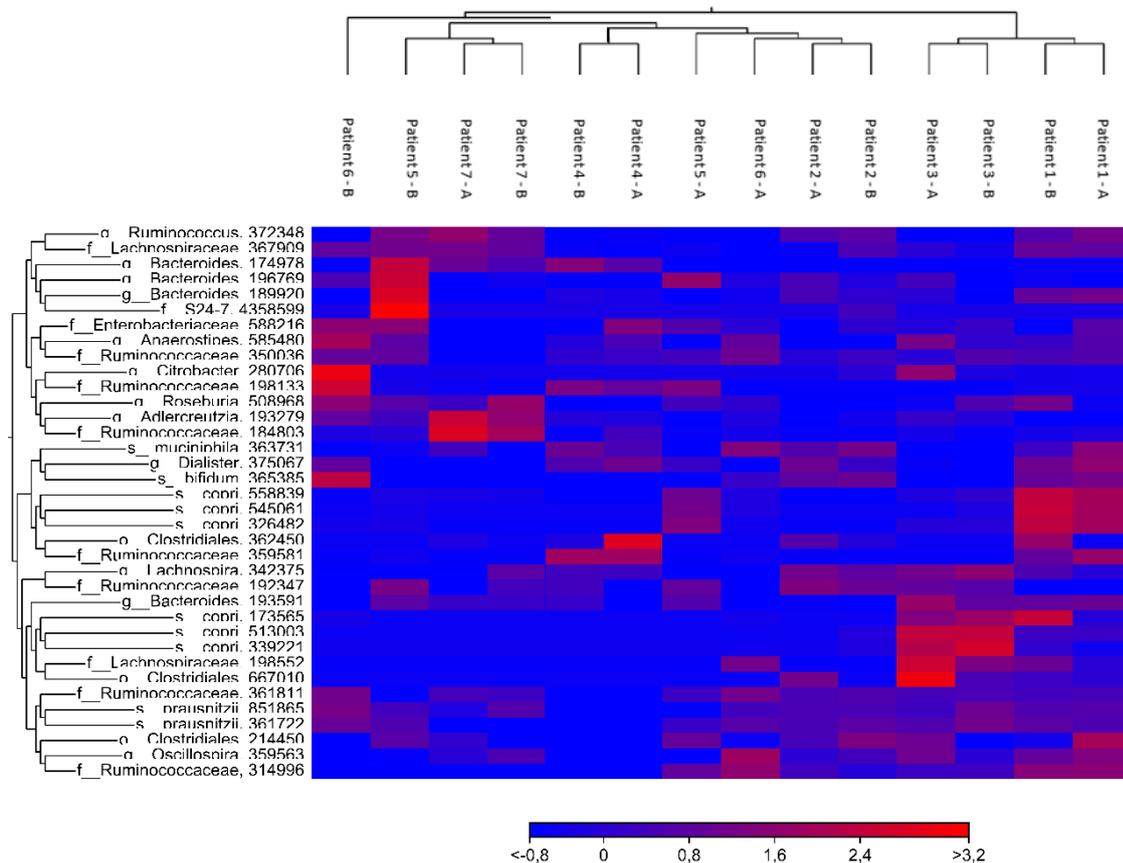


Abbildung 44: Heat Map der Änderung in der Häufigkeit des Vorkommens stark verteilter Keime in Patienten vor und nach sechswöchiger Therapie mit Rituximab. DNA aus Fäzes von sieben Patienten wurde vor und nach sechswöchiger Therapie mit Rituximab mittels Next Generation Sequencing auf Unterschiede im Mikrobiom analysiert. Die Zuordnung der Sequenzen wurde mit der Software CLC Biomedical Workbench (Version 4.0) unter Verwendung der Datenbank Greengenes (Version 13.0) durchgeführt. A: vor Beginn der Therapie; B: 6 Wochen nach Beginn der Therapie mit Rituximab. Patient 1-3: Monotherapie mit Rituximab; Patient 4-7 Kombinationstherapie mit Rituximab und anderen Therapeutika.

Auch in den Patienten zeigte sich sechs Wochen nach Beginn der Therapie mit Rituximab eine Steigerung in der Familie der Lachnospiraceae für Bakterien wie *Roseburia*. Wurden alle sieben eingeschlossenen Patienten zusammen ausgewertet, so ergaben sich nur wenige statistisch signifikante Änderungen in der Quantität der Kolonisation durch diese Bakterien (s. Abbildung 45 sowie Tabelle 15 im Appendix 11). Hier zeigten sich Lachnospiraceae wie *Roseburia* oder *Agathobacter*, sowie Ruminococcaceae wie *Faecalibacterium prausnitzii* als hauptsächliche Unterschiede nach sechswöchiger Therapie mit Rituximab.

Ergebnisse

Bei der Betrachtung der Patienten unter Monotherapie erreichten mehr Sequenzen eine statistisch signifikante Änderung, jedoch waren es dieselben Bakterien, die auch schon in der Gesamtauswertung der Patienten gefunden wurden (s. Abbildung 46 sowie Tabelle 16 im Appendix 12): Es trat eine statistisch signifikant höhere Kolonisation nach sechswöchiger Therapie im Vergleich zum Ausgangswert für die Familie der Lachnospiraceae wie Bakterien der Gattungen *Roseburia*, *Agathobacter* oder *Blautia* auf, sowie bei den Ruminococcaceae wie *Faecalibacterium prausnitzii*. Eine statistisch signifikant geringere Kolonisation in den Patienten mit Monotherapie ließ sich hingegen für ein Bakterium der Gattung *Ruminococcus*, ein Bakterium der Familie der Ruminococcaceae sowie *Streptococcus mutans* feststellen.

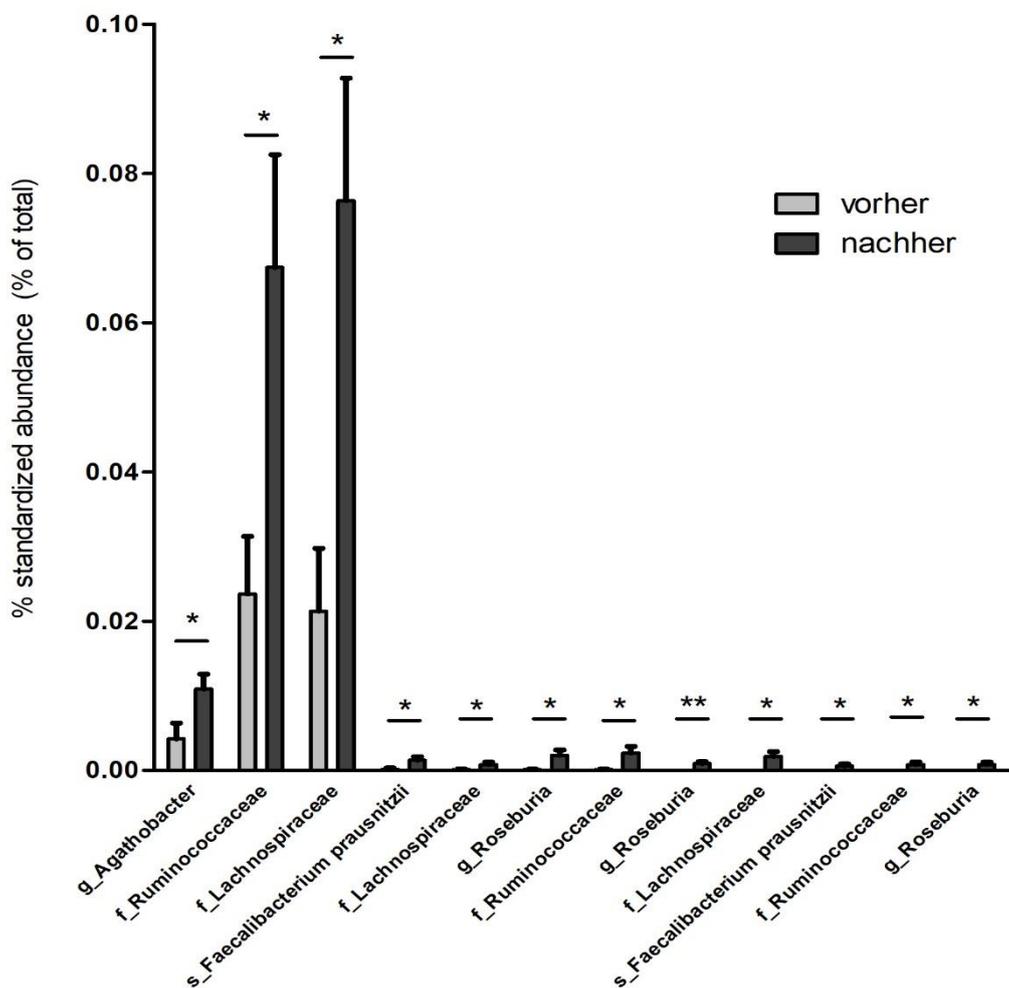


Abbildung 45: Im Next Generation Sequencing zeigte sich für diese Keime ein statistisch signifikanter Unterschied im prozentualen Vorkommen vor und nach sechswöchiger Rituximab Therapie. DNA aus Fäzes von sieben Patienten wurde vor und nach sechswöchiger Therapie mit Rituximab mittels Next Generation Sequencing auf Unterschiede im Mikrobiom analysiert. Die Zuordnung der Sequenzen wurde mit Hilfe der Software CLC Biomedical Workbench (Version 4.0) unter Verwendung der Datenbank Greengenes (Version 13.0) durchgeführt. Der Mittelwert sowie die Standardabweichung wurden ermittelt und das Signifikanzlevel mittels Student`s T-Test errechnet: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

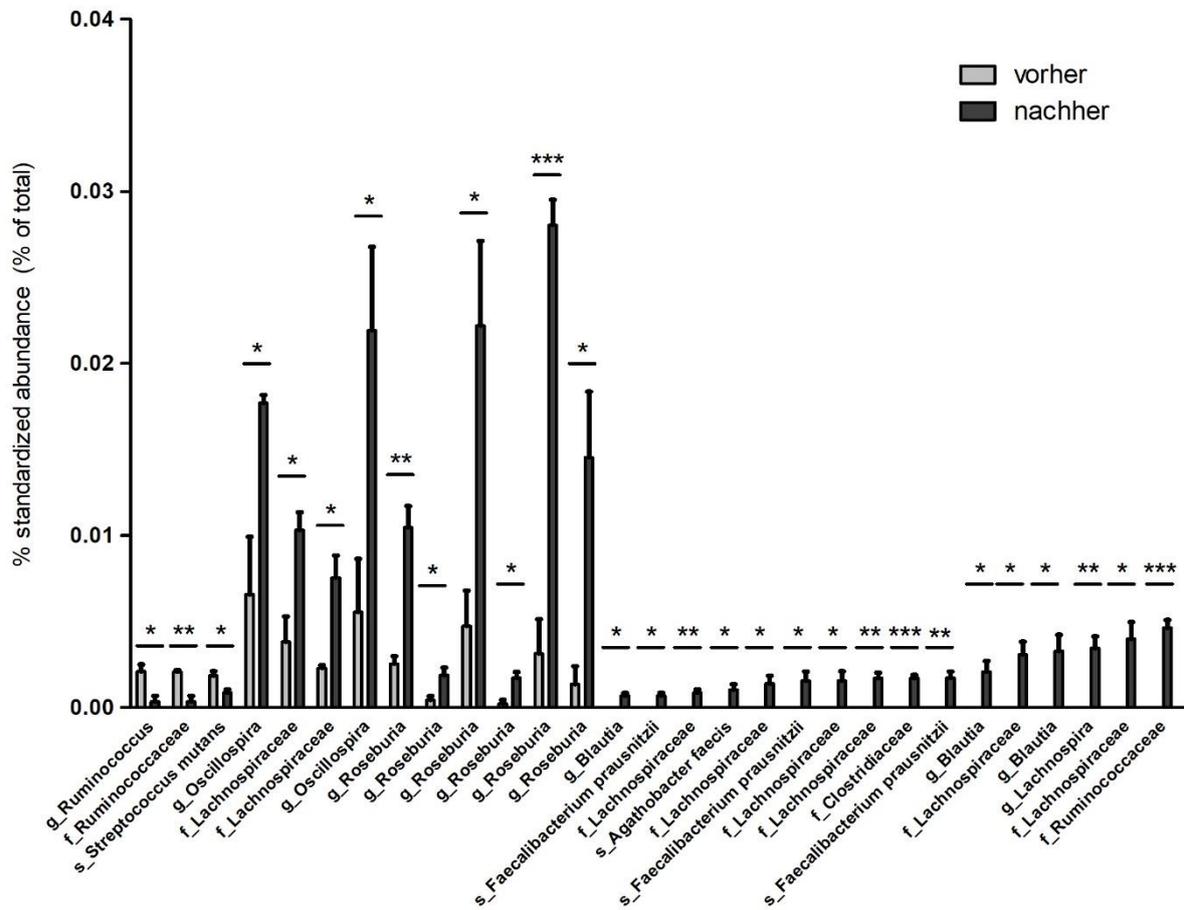


Abbildung 46: Im Next Generation Sequencing zeigte sich für diese Keime ein statistisch signifikanter Unterschied im prozentualen Vorkommen vor und nach sechswöchiger Rituximab Monotherapie. DNA aus Fäzes von drei Patienten wurde vor und nach sechswöchiger Therapie mit Rituximab mittels Next Generation Sequencing auf Unterschiede im Mikrobiom analysiert. Die Zuordnung der Sequenzen wurde mit Hilfe der Software CLC Biomedical Workbench (Version 4.0) unter Verwendung der Datenbank Greengenes (Version 13.0) durchgeführt. Der Mittelwert sowie die Standardabweichung wurden ermittelt und das Signifikanzlevel mittels Student's T-Test errechnet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Ergebnisse

4.4.3 Ergebnisse des Next Generation Sequencings des Tierversuchs mit Ciclosporin

Es wurden sechs C57BL/6N Mäuse mit 35 mg/kg KG Ciclosporin intraperitoneal einmal täglich für drei Wochen als Verum sowie sechs C57BL/6N Mäuse mit Natriumchlorid 0,9 % intraperitoneal einmal täglich für drei Wochen als Placebo behandelt.

Es wurde ein Next Generation Sequencing für die 16S Region V3/4 durchgeführt. Hierfür wurde DNA aus Fäzes des Colons der Versuchstiere isoliert. Das Next Generation wurde in einem Illumina MiSeq System (Illumina) durch das MVZ Labor Dr. Limbach & Kollegen GbR (Heidelberg) durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software CLC Biomedical Workbench (Version 4.0) unter Verwendung der Datenbank Greengenes (Version 13.0) für die Zuordnung der Sequenzen. Eine Maus im Placebo-Arm (Maus 20) war nach dem Sequencing aufgrund einer zu geringen Anzahl und Qualität der Sequenzen nicht auswertbar und wurde deshalb nicht in die Ergebnisse mit einbezogen.

Zwischen den Versuchsgruppen zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der α -Diversität, hier beispielsweise am Shannon-Diversitäts Index gezeigt (s. Abbildung 47) ($p=0,71$). Für die β -Diversität hingegen war ein statistisch signifikanter Unterschied in der Struktur der Mikrobiota festzustellen (PERMANOVA: $p\text{-value}= 0,00649$) (s. Abbildung 48).

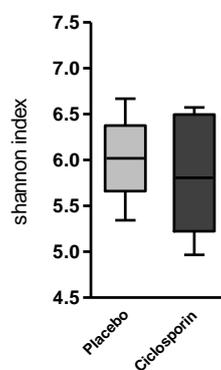


Abbildung 47: Vergleich des Shannon-Diversitäts Index zwischen Placebo und Verum (Ciclosporin) Tieren. DNA aus Fäzes von fünf mit Placebo sowie sechs mit Ciclosporin behandelten Mäusen wurde mittels Next Generation Sequencing auf Unterschiede im Mikrobiom analysiert. Die Ermittlung des Shannon-Diversitäts Index wurde mit Hilfe der CLC Biomedical Workbench (Version 4.0) durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde hierbei durch Anwendung des Wilcoxon-Mann-Whitney-Test errechnet: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

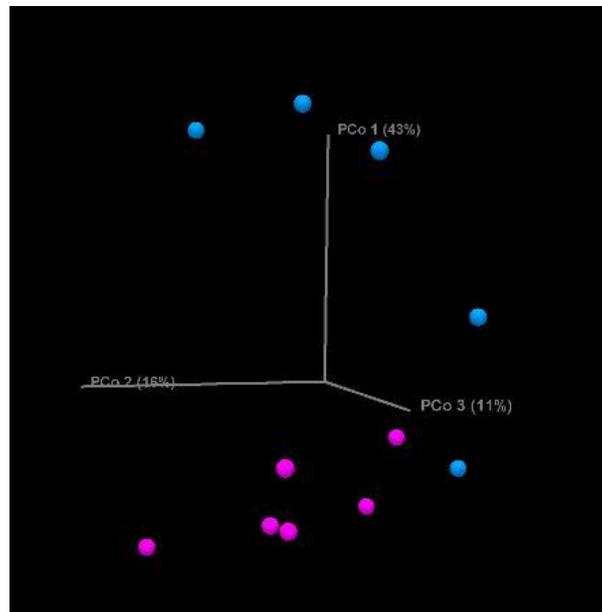


Abbildung 48: Principal Coordinates Analyse (PCoA) des Sequencings von mit Ciclosporin bzw. Placebo behandelten Mäusen. DNA aus Fäzes von sechs mit Ciclosporin und fünf mit Placebo behandelten Mäusen wurde mittels Next Generation Sequencing auf Unterschiede im Mikrobiom analysiert. Die β -Diversität Varianz wurde durch Auswertung der principal coordinate analysis (PCoA) und Ermittlung der Signifikanz durch PERMANOVA (Permutational multivariate analysis of variance) basierend auf dem Bray-Curtis Index analysiert. Blau: Placebo; Pink: Ciclosporin.

Nach Zuordnung der Sequenzen ergaben sich die in Abbildung 50 und Abbildung 51 aufgeführten statistisch signifikanten Veränderungen im Mikrobiom zwischen der Placebo und der Verum (Ciclosporin) Gruppe. In Abbildung 50 und Abbildung 51 werden nur die Bakterien mit einem \log_2 fold change $\geq 2,5$ oder $\leq -2,5$ aufgeführt. Die statistisch signifikant veränderten Bakterien mit \log_2 fold changes zwischen $-2,5$ und $2,5$ sind in Appendix 13 (Tabelle 17) aufgelistet.

Unter Therapie mit Ciclosporin war eine statistisch signifikant niedrigere Kolonisation mit Bakterien der Familie Clostridiaceae zu beobachten. Für die Familie der Lachnospiraceae war das Bild sehr uneinheitlich, da einige Spezies davon erhöht und andere vermindert vorkamen. Ähnlich verhielt es sich bei der Familie der Muribaculaceae. Auch die Heat Map der Mäuse zeigte eine sehr variable interindividuelle Bakteriensignatur in den einzelnen Mäusen verglichen mit anderen Tieren ihrer Versuchsgruppe (s. Abbildung 49). Ein interessanter Keim, der in der Verum Gruppe eine verstärkte Kolonisation vorwies, war das Bakterium *Turicibacter sanguinis* (s. Abbildung 50 und Tabelle 11).

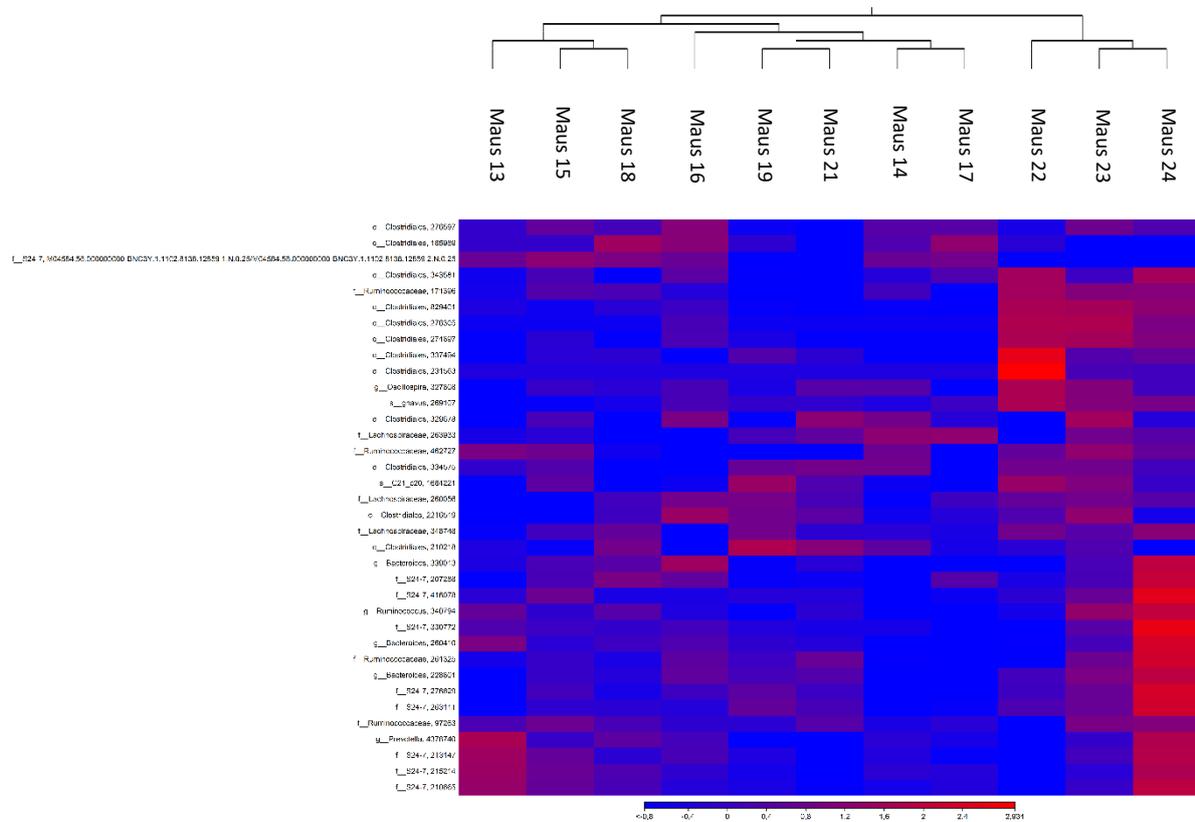


Abbildung 49: Heat Map der Änderung in der Häufigkeit des Vorkommens stark verteilter Keime zwischen den Placebo und Verum (Ciclosporin) Mäusen. DNA aus Fäzes von fünf mit Placebo behandelten und sechs mit Ciclosporin therapierten Mäusen wurde mittels Next Generation Sequencing auf Unterschiede im Mikrobiom analysiert. Die Zuordnung der Sequenzen wurde mit Hilfe der Software CLC Biomedical Workbench (Version 4.0) unter Verwendung der Datenbank Greengenes (Version 13.0) durchgeführt. Maus 13-18: Ciclosporin, Maus 19-24: Placebo.

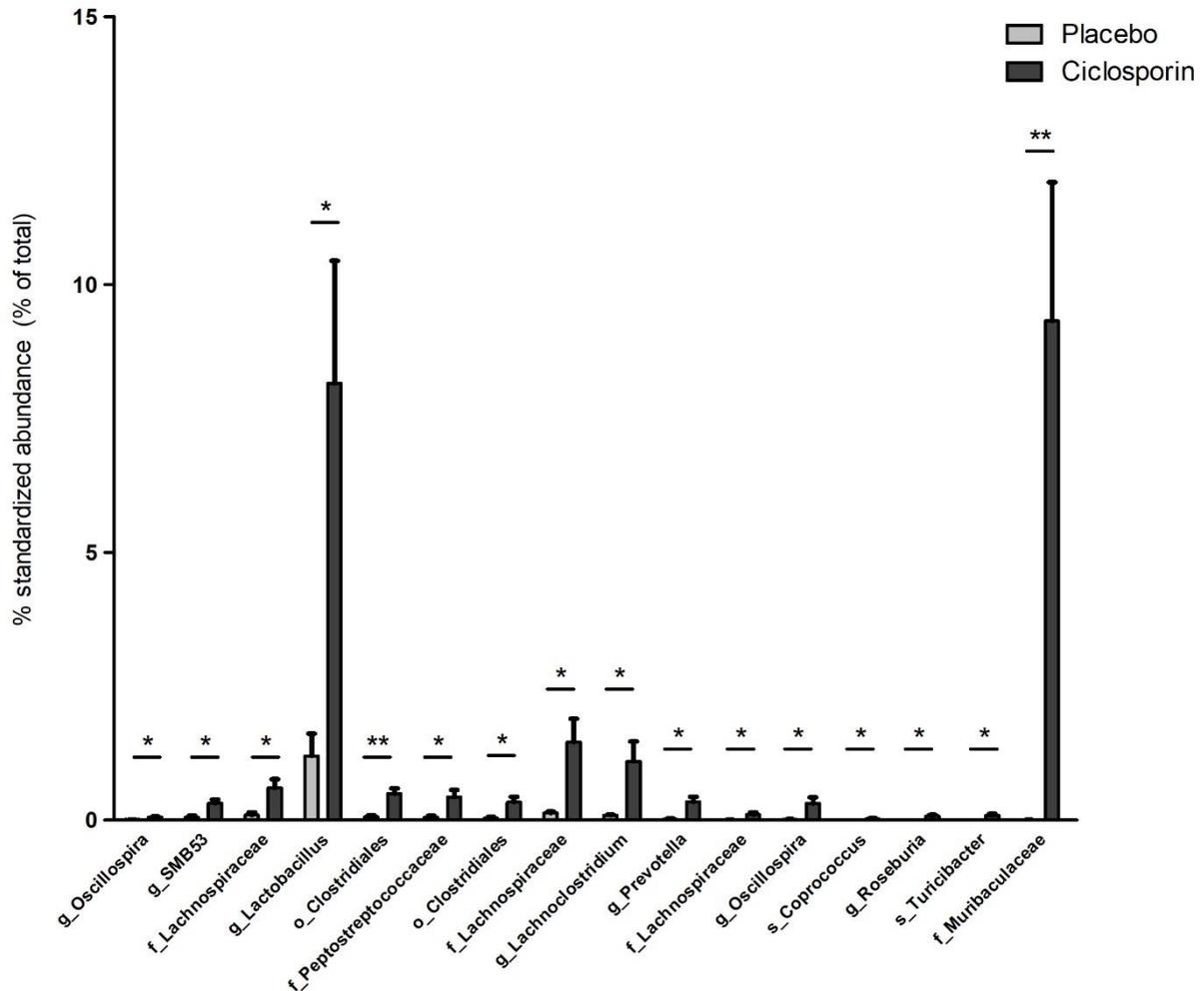


Abbildung 50: Im Next Generation Sequencing zeigte sich für diese Keime ein statistisch signifikant höheres Vorkommen im Mikrobiom der mit Ciclosporin behandelten Tiere. DNA aus Fäzes von fünf mit Placebo behandelten und sechs mit Ciclosporin therapierten Mäusen wurde mittels Next Generation Sequencing auf Unterschiede im Mikrobiom analysiert. Die Zuordnung der Sequenzen wurde mit Hilfe der Software CLC Biomedical Workbench (Version 4.0) unter Verwendung der Datenbank Greengenes (Version 13.0) durchgeführt. Der Mittelwert sowie die Standardabweichung wurden ermittelt und das Signifikanzlevel mittels Student's T-Test errechnet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Abgebildet sind alle Keime, die ein statistisch signifikant höheres Vorkommen in den mit Ciclosporin behandelten Versuchstieren zeigten.

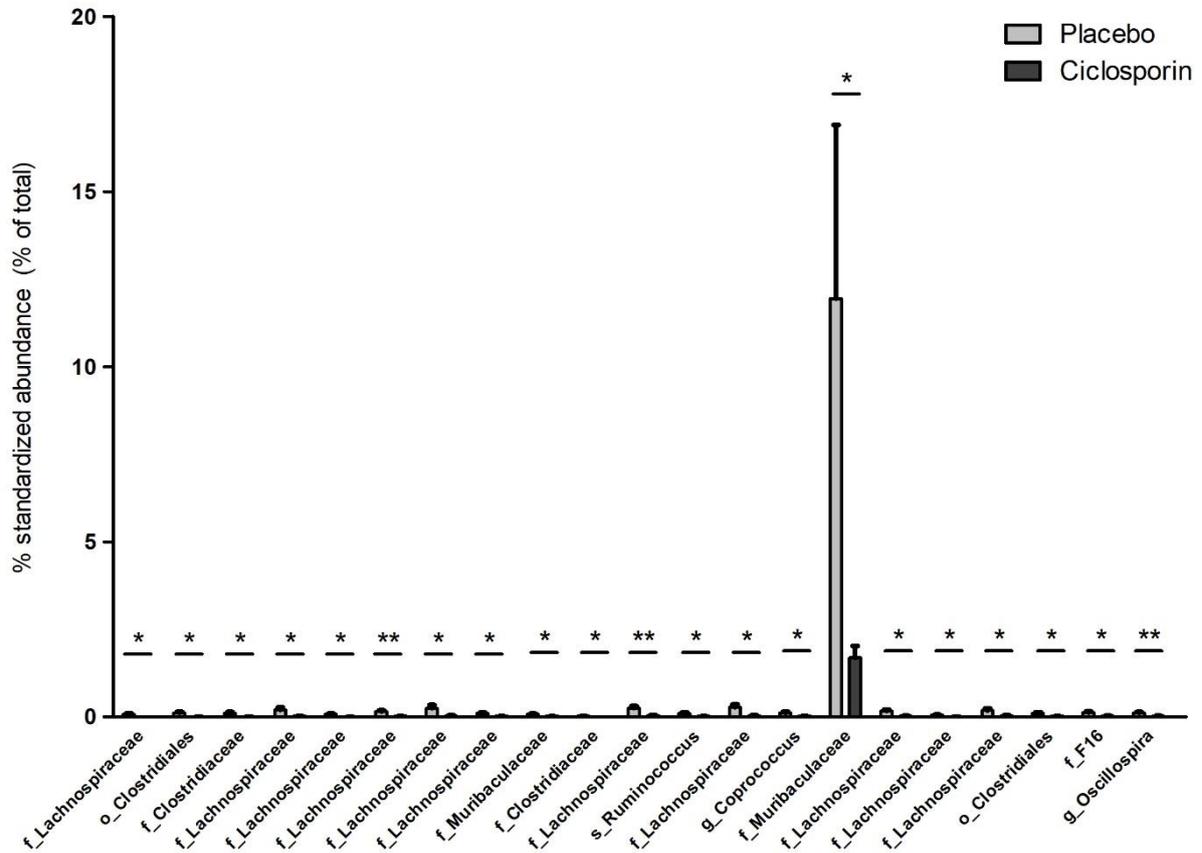


Abbildung 51: Im Next Generation Sequencing zeigte sich für diese Keime ein statistisch signifikant niedrigeres Vorkommen im Mikrobiom der mit Ciclosporin behandelten Tiere. DNA aus Fäzes von fünf mit Placebo behandelten und sechs mit Ciclosporin therapierten Mäusen wurde mittels Next Generation Sequencing auf Unterschiede im Mikrobiom analysiert. Die Zuordnung der Sequenzen wurde mit Hilfe der Software CLC Biomedical Workbench (Version 4.0) unter Verwendung der Datenbank Greengenes (Version 13.0) durchgeführt. Der Mittelwert sowie die Standardabweichung wurden ermittelt und das Signifikanzlevel mittels Student's T-Test errechnet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Abgebildet sind alle Keime, die ein statistisch signifikant niedrigeres Vorkommen in den mit Ciclosporin behandelten Versuchstieren im Vergleich zu den mit Placebo behandelten Mäusen zeigten.

Da der log2 fold change der einzelnen Bakterien in Abbildung 50 und Abbildung 51 aufgrund der stark vertretenen Familie der Muribaculaceae sowie *Lactobacillus* nicht gut zu erkennen ist, findet sich in Tabelle 11 eine tabellarische Darstellung der statistisch signifikant veränderten Sequenzen mit \log_2 fold change $\geq 2,5$ oder $\leq -2,5$.

Tabelle 11: Ergebnisse des Next Generation Sequencings mit DNA aus Fäzes des Tierversuchs mit Ciclosporin versus Placebo. In dieser Tabelle sind die statistisch signifikanten Unterschiede aus dem Next Generation Sequencing mit DNA aus Fäzes von fünf mit Placebo und sechs mit Ciclosporin behandelten Tieren zusammengeführt, bei denen ein log₂ fold change $\geq 2,5$ oder $\leq -2,5$ festgestellt wurde. Angegeben ist die letzte mögliche Zuordnungsstufe nach Analyse durch die CLC Biomedical Workbench (Version 4.0) unter Zuhilfenahme der Datenbank Greengenes (Version 13.0) zur Zuordnung der Sequenzen. Anschließend fand teilweise noch ein BLASTing über die NCBI (National Center of Biotechnology Information) Datenbank statt. Weitere Angaben beziehen sich auf das prozentuale Vorkommen der gefundenen Bakterien in den Versuchsgruppen sowie den log₂ fold change und die Signifikanz der Ergebnisse durch Anwendung des Student's T-Test. Als statistisch signifikant wurde ein $p < 0,05$ gewertet. **MW** = Mittelwert; **o** = Ordnung; **f** = Familie; **g** = Gattung; **s** = Spezies

Taxonomie – letzte Stufe der möglichen Zuordnung	% Abundance MW vorher	% Abundance MW nachher	log ₂ fold change % abundance	pvalue
f_Lachnospiraceae	0,0733	0,0024	-4,9606	0,0312
o_Clostridiales	0,1120	0,0047	-4,5689	0,0180
f_Clostridiaceae	0,0979	0,0064	-3,9422	0,0373
f_Lachnospiraceae	0,1948	0,0172	-3,5048	0,0360
f_Lachnospiraceae	0,0708	0,0066	-3,4262	0,0260
f_Lachnospiraceae	0,1506	0,0160	-3,2321	0,0024
f_Lachnospiraceae	0,2410	0,0276	-3,1273	0,0461
f_Lachnospiraceae	0,0940	0,0113	-3,0564	0,0138
f_Muribaculaceae	0,0711	0,0087	-3,0302	0,0474
f_Clostridiaceae	0,0189	0,0024	-3,0047	0,0258
f_Lachnospiraceae	0,2486	0,0328	-2,9211	0,0078
s_Ruminococcus gnavus	0,0938	0,0126	-2,8956	0,0477
f_Lachnospiraceae	0,2732	0,0375	-2,8659	0,0115
g_Coproccoccus	0,1145	0,0158	-2,8585	0,0117
f_Muribaculaceae	11,9376	1,6824	-2,8269	0,0484
f_Lachnospiraceae	0,1643	0,0237	-2,7944	0,0106
f_Lachnospiraceae	0,0484	0,0071	-2,7754	0,0285
f_Lachnospiraceae	0,1841	0,0309	-2,5750	0,0233
o_Clostridiales	0,0966	0,0166	-2,5383	0,0464
f_F16	0,1160	0,0203	-2,5183	0,0492
g_Oscillospira	0,1129	0,0198	-2,5140	0,0081
g_Oscillospira	0,0095	0,0561	2,5648	0,0134
g_SMB53	0,0522	0,3148	2,5929	0,0124
f_Lachnospiraceae	0,0936	0,6024	2,6863	0,0207
g_Lactobacillus	1,1961	8,1539	2,7692	0,0235
o_Clostridiales	0,0621	0,4916	2,9842	0,0041
f_Peptostreptococcaceae	0,0534	0,4316	3,0136	0,0313
o_Clostridiales	0,0368	0,3367	3,1947	0,0253
f_Lachnospiraceae	0,1359	1,4540	3,4191	0,0233
g_Lachnoclostridium	0,0879	1,0977	3,6423	0,0365
g_Prevotella	0,0174	0,3396	4,2886	0,0143
f_Lachnospiraceae	0,0037	0,1046	4,8214	0,0447
g_Oscillospira	0,0093	0,3078	5,0423	0,0481
s_Coproccoccus catus	0,0008	0,0274	5,0797	0,0461

Projekt 2: Einfluss von Rituximab und Ciclosporin durch Regulierung des adaptiven Immunsystems auf das Mikrobiom des Darms

Ergebnisse

g_Roseburia	0,0015	0,0727	5,6388	0,0248
s_Turicibacter sanguinis	0,0008	0,0858	6,7264	0,0478
f_Muribaculaceae	0,0038	9,3166	11,2465	0,0100

4.5 Diskussion

Das adaptive Immunsystem spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenabwehr sowie der Erhaltung der Homöostase des Körpers. Es schützt nicht nur vor fremden Strukturen, sondern dient auch zur Regulation der Immunantwort, um den Körper vor einer überschießenden Immunreaktion zu schützen. Ist diese Balance gestört, kann es auf der einen Seite zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Pathogenen oder entarteten Strukturen kommen, auf der anderen Seite aber auch zu einer überschießenden Immunantwort in Richtung Autoimmunerkrankung oder Transplantatabstoßung (Kumar et al. 2018; Okumura und Takeda 2016).

Auch die Interaktion zwischen Mikrobiom und Immunsystem rückt in diesem Kontext immer weiter in den Fokus des Interesses. Bei Autoimmunerkrankungen sowie Transplantatabstoßungen wurden in den letzten Jahren mehr und mehr Hinweise auf eine veränderte Zusammensetzung der Darm-Mikrobiota gefunden, die auch auf die Immunantwort Einfluss nehmen kann (Bromberg et al. 2018; De Luca und Shoenfeld 2019; McIntosh et al. 2018; Rey et al. 2018; Sepulveda et al. 2019; Yue et al. 2019).

Bei Erkrankungen mit fehlgeleiteter Immunantwort ist teilweise eine Therapie mit Substanzen notwendig, die diese wieder modulieren. Rituximab führt hierbei zu einer B-Zell-Depletion und hat damit einen Einfluss auf die humorale Immunantwort, während Ciclosporin seine Hauptwirkung über die Beeinflussung von T-Zellen zeigt (Liddicoat und Lavelle 2019; Pierpont et al. 2018; Schroeder und Herzig 1998). Da beide Wirkmechanismen einen großen Einschnitt in die Immunantwort bedeuten, sollte dieses Teilprojekt den Einfluss der Modulation des Immunsystems durch diese beiden Substanzen auf das Mikrobiom und die möglicherweise daraus resultierenden Konsequenzen erforschen.

4.5.1 Eine Therapie mit Rituximab führt zu einer Verschiebung im Mikrobiom

Rituximab führt über ein Binden an CD20 auf den B-Zellen durch vier verschiedene Mechanismen zu einer B-Zell-Depletion. Der Wirkstoff wird in diversen Autoimmunerkrankungen sowie in hämatoonkologischen Malignitäten eingesetzt (Bennett et al. 2015; Seyfizadeh et al. 2016). Bis dato ist noch nicht bekannt, ob und in welchem Maße es durch Rituximab zu einer Veränderung der Darm-Mikrobiota kommt. Durch eine Therapie mit Rituximab sollte eine gehemmte IgA-Bildung im Darm erfolgen, wodurch hauptsächlich eine Änderung des Vorkommens Mucus-liebender bzw. besonders nah am Darmepithel vorzufindender Bakterien erwartet wurde.

Um diese Hypothese zu überprüfen wurden Mäuse intravenös mit Rituximab oder Placebo über drei Wochen behandelt und anschließend Fäzes des Colons mittels Next Generation Sequencing auf

Unterschiede in der Zusammensetzung des Mikrobioms untersucht. Zusätzlich wurden von Patienten, die neu auf Rituximab eingestellt wurden, eine Stuhlprobe vor und sechs Wochen nach Beginn der Therapie auf Unterschiede im Mikrobiom über das NGS analysiert. Hierbei zeigte sich weder bei den Mäusen, noch im Humansystem eine Änderung in der α -Diversität nach Shannon, der Evenness, der Richness sowie der Dominanz zwischen den Versuchsgruppen. Auch in der β -Diversität war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festzustellen.

Nach Zuordnung der Sequenzen wurde auf Unterschiede auf Familien-, Gattungs- bzw. Spezies-Level geschaut. Hierbei zeigte sich eine statistisch signifikante Erhöhung von Bakterien der Familie der Lachnospiraceae sowohl im Tierversuch als auch bei den Patientenproben. Im Tierversuch waren besonders erhöht Lachnospiraceae wie *Eisenbergiella*, *Roseburia*, *Lachnoclostridium* und *Kineothrix* zu finden. Teilweise war eine Zuordnung auf Spezies-Level jedoch durch fehlende Einträge in der Greengenes Datenbank nicht möglich, auch nach zusätzlichem Blasten über die NCBI Datenbank. Zusätzlich zeigte sich eine erhöhte Kolonisation mit *Ruminococcus gnavus*. Im Tierversuch wurde auch eine erniedrigte Besiedlung mit Muribaculaceae beobachtet. Im Humanversuch war ein großer Unterschied in der Anzahl der statistisch signifikanten Änderung zu finden je nach Subgruppe, die betrachtet wurde. Während in der Analyse, die alle eingeschlossenen Patienten beinhaltet, nur wenige Bakterien eine statistisch signifikante Änderung vorwiesen, war die Anzahl bei den Patienten unter Monotherapie um einiges größer. Dies kann durch die Heterogenität der Patienten, die verschiedene Therapieregime erhielten, und durch die zusätzliche Gabe von Chemotherapeutika ausgelöst worden sein. Auch die Prämedikation der Patienten mit beispielsweise Corticosteroiden kann einen Bias darstellen, jedoch zeigt sich eine enorm geringere Halbwertszeit der Prämedikation im Vergleich zu Rituximab, wodurch eine Verschiebung nach sechs Wochen eher auf Rituximab bzw. zusätzlich auf die Chemotherapie zurückzuführen sein sollte. Des Weiteren muss beachtet werden, dass es sich im Humansystem um Patienten mit einer pathophysiologisch veränderten Immunantwort sowie möglicherweise auch durch die Grunderkrankung veränderten Mikrobiota-Zusammensetzung handelt. Durch eine Therapie, die in diese Pathophysiologie eingreift, könnte das zuvor bestehende aggressive Milieu verringert, die Autoimmunkonstellation gehemmt, die lokale und systemische Entzündung verringert und damit Pathobionten zurückgedrängt werden, die dann wiederum Nischen für andere Bakterien schaffen um sich dort ansiedeln und möglicherweise zu einer daraus resultierende Eubiose führen zu können. Im Maussystem handelt es sich um gesunde Tiere, bei denen eine andere Grundsituation vorzufinden ist und deshalb möglicherweise Unterschiede festzustellen sein könnten. Trotzdem waren die gefundenen, statistisch signifikant veränderten Bakterien in beiden Analysen ähnlich. Bei beiden waren wieder Vertreter der Familie der Lachnospiraceae erhöht

vorzufinden. Hierunter fielen wiederum *Roseburia*, *Agathobacter* sowie *Blautia*. Zusätzlich konnte eine verstärkte Besiedlung mit dem Bakterium *Faecalibacterium prausnitzii* festgestellt werden.

Fast alle dieser Keime werden in der Literatur mit einem gesunden Mikrobiom assoziiert:

Bei *Roseburia* (z.B. *Roseburia intestinalis*) handelt es sich um ein anaerobes, grampositives Bakterium, was als ein Indikatorkeim für eine gesunde Darm-Mikrobiota angesehen wird (Duncan et al. 2002; Huang et al. 2021a). Es ist vermindert in Patienten mit rheumatoider Arthritis, Sarkopenie und entzündlichen Darmerkrankungen vorzufinden, die alle mit einem proinflammatorischen Metagenom assoziiert sind (Forbes et al. 2018; Kang et al. 2021; Quan et al. 2018; Zhu et al. 2018). Auch zeigt dieses Bakterium eine negative Korrelation mit der Entwicklung von Atherosklerose (Kasahara et al. 2018). *Roseburia* ist ein Butyrat-Bildner (Duncan et al. 2002; Hold et al. 2003; Kang et al. 2021; Kasahara et al. 2018; Takahashi et al. 2016). Durch die Bildung von Butyrat hat dieses Bakterium die Möglichkeit die Exkretion von Interleukin-17 (IL-17) zu hemmen. Außerdem zeigt es eine Verschiebung der T-Zell-Differenzierung hin zu T_{reg} und hierdurch wiederum eine erhöhte Interleukin-10 (IL-10) Sekretion, die einen antiinflammatorischen Effekt besitzt (Shen et al. 2018; Zhu et al. 2018). Auch der Supernatant dieses Bakteriums hat noch die Möglichkeit die Expression von Interleukin-6 (IL-6) in Makrophagen zu hemmen, wodurch eine Senkung des Vorkommens von inflammatorischen Makrophagen und TH17 Zellen erreicht wird. Dieser Effekt führt zu einer Verbesserung von entzündlichen Darmerkrankungen (Luo et al. 2019).

Auch bei *Eisenbergiella* handelt es sich um ein anaerobes, Butyrat produzierendes Bakterium (Amir et al. 2014), genau wie bei *Kineothrix* (Haas und Blanchard 2017; Liddicoat et al. 2020), *Lachnoclostridium* (Kang et al. 2021), *Agathobacter (faecis)* (Huang et al. 2021a; Rosero et al. 2016) und *Blautia* (Takahashi et al. 2016). Alle diese Keime sind assoziiert mit einem gesunden Mikrobiom und kommen erniedrigt in inflammatorischen Krankheitsbildern vor (Ferrere et al. 2021; Hua et al. 2020; Huang et al. 2021a; Kang et al. 2021; Keshavarzian et al. 2015; Moon et al. 2020; Takahashi et al. 2016).

Bei *Faecalibacterium prausnitzii* handelt es sich um ein Bakterium der Familie der Ruminococcaceae, das immer wieder in Zusammenhang mit einem gesunden Darm-Mikrobiom publiziert wird (Ganesan et al. 2018; Huang et al. 2021a; Lapiere et al. 2020; Lopez-Siles et al. 2017; Ma et al. 2020). Auch bei *Faecalibacterium* handelt es sich um einen Butyrat-Bildner, der mit antiinflammatorischen Effekten in Verbindung gebracht wird (De Luca und Shoenfeld 2019; Huang et al. 2021a; Nilsen et al. 2020; Takahashi et al. 2016). Man findet dieses Bakterium kaum bei Patienten mit rheumatoider Arthritis und anderen Autoimmunerkrankungen, entzündlichen Darmerkrankungen sowie bei Parkinson Patienten, bei denen auch eine proinflammatorische Dysbiose im Darm diskutiert wird (Chen et al. 2016; De Luca und Shoenfeld 2019; Gioia et al. 2020; Joossens et al. 2011; Keshavarzian et al. 2015).

Faecalibacterium prausnitzii wird auch als Indikatorkeim für ein gutes Ansprechen auf eine Therapie mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren wie Nivolumab, Ipilimumab oder Pembrolizumab beschrieben (Miller und Carson 2020).

Ruminococcus gnavus wird als proinflammatorisches Bakterium gesehen, welches vermehrt in entzündlichen Krankheitsbildern wie der Spondylarthritis, in entzündlichen Darmerkrankungen, aber auch in Patienten mit Cystischer Fibrose oder Leberzirrhose gefunden wird (Breban et al. 2017; Danilova et al. 2019; Debyser et al. 2016; Dubinsky et al. 2021; Joossens et al. 2011; Shao et al. 2018). Meist gibt es hierbei eine negative Korrelation zwischen dem vermehrten Auftreten von *Ruminococcus gnavus* und dem Butyrat-Level bzw. dem Vorkommen von Butyrat-bildenden Bakterien wie beispielsweise *Faecalibacterium prausnitzii* oder *Roseburia* (Cui et al. 2018; Danilova et al. 2019; Debyser et al. 2016; Dubinsky et al. 2021; Fuentes et al. 2017; Joossens et al. 2011; Shao et al. 2018). Es wird diskutiert, dass der proinflammatorische Effekt hierbei durch einen erhöhten Abbau von Mukus-Bestandteilen durch *Ruminococcus gnavus* und dadurch eine verminderte intestinale Barrierefunktion ausgelöst wird, die zu einer systemischen Inflammation führen kann (Shao et al. 2018). Durch seine Assoziation mit dem Mukus gehört das Bakterium *Ruminococcus gnavus* zu der Gruppe der Bakterien, die durch eine gehemmte IgA-Bildung im Darm nach der aufgestellten Hypothese einen Überlebensvorteil durch Therapie mit Rituximab erhalten könnte.

Muribaculaceae (S24-7) sind eine Familie von Bakterien, die im Maus-Mikrobiom stark vertreten sind. Im Humansystem spielen sie eher eine untergeordnete Rolle (Lagkouravdos et al. 2019). Bakterien dieser Familie sind assoziiert mit der Bildung von Propionat (Smith et al. 2019).

Bemerkenswert an den Ergebnissen dieses Teilprojekts ist, dass hauptsächlich Butyrat-Bildner statistisch signifikant erhöht nach einer Behandlung mit Rituximab vorkamen. Während im Tierversuch auch noch *Ruminococcus gnavus* eine verstärkte Kolonisation in den Versuchstieren zeigte, ließ sich diese kontroverse Entdeckung, die im Kontrast zu der ansonsten publizierten negativen Korrelation zwischen der Besiedlung von Butyrat-Bildnern und *Ruminococcus gnavus* (Cui et al. 2018; Debyser et al. 2016; Dubinsky et al. 2021; Fuentes et al. 2017; Joossens et al. 2011) steht, nicht im Humansystem bestätigen. Auch die Erniedrigung der Muribaculaceae war im Humansystem nicht zu beobachten.

Bei Butyrat handelt es sich um eine kurzkettige Fettsäure (short chain fatty acid – SCFA). SCFAs sind Stoffwechselprodukte, die von Bakterien durch Fermentationsprozesse synthetisiert werden (Koh et al. 2016). Neben Butyrat sind auch noch SCFAs wie Propionat und Acetat als wichtige Player im Darm bekannt (Koh et al. 2016). SCFAs haben immunmodulatorische Eigenschaften (Chen et al. 2017; Stammler et al. 2015). Butyrat zeigt sich antiinflammatorisch und beweist in vielen entzündlichen Erkrankungen wie beispielsweise entzündlichen Darmerkrankungen, aber auch

Autoimmunerkrankungen eine krankheitsverbessernde Wirkung (Alrafas et al. 2019; Gioia et al. 2020; Yue et al. 2019). Ein vermindertes Vorkommen von Butyrat bzw. Butyrat-bildenden Bakterien ist meist assoziiert mit diesen entzündlichen Krankheitsbildern (Bai et al. 2021; Chen et al. 2021; He et al. 2020; Hui et al. 2019; Kasahara et al. 2018; Takahashi et al. 2020; Takahashi et al. 2016). Erhöht man die Zufuhr von Butyrat entweder durch orale Gabe oder auch durch die Ansiedlung von Butyrat-Bildnern, so kommt es durch das Butyrat zu einer Histondeacetylase (HDAC) – Inhibition. Hierdurch wiederum findet eine Histon-Hyperacetylierung in der Promotor Region von follikulären regulatorischen T-Zellen statt, wodurch diese zu einer verminderten Produktion von Autoantikörpern führen können (Takahashi et al. 2020). Außerdem kommt es unter einem erhöhten Butyrat-Spiegel zu einer Hemmung der IL-1 β , Interleukin-16 (IL-16), sowie Interleukin-17A (IL-17A) Produktion. Auch führt es zu einer Verschiebung der T-Zell-Differenzierung hin zu regulatorischen T-Zellen (T_{reg}), die vermehrt Interleukin-10 (IL-10) produzieren, was wiederum einen Rückgang von TH17 Zellen auslöst (Hui et al. 2019). Zusätzlich ist eine vermehrte Expression des Tight Junctions Protein durch Butyrat beschrieben, was zu einer verminderten intestinalen Permeabilität sowie einer geringeren Translokation von Bakterien und somit zu einer niedrigeren systemischen Inflammation führt (Takahashi et al. 2016). Die Hemmung von IL-6 durch *Roseburia* und die damit verbundene Modulation inflammatorischer Makrophagen wird auch auf die Wirkung von Butyrat zurückgeführt (Luo et al. 2019). Während erhöhte Level an SCFAs vorwiegend als Benefit für den Wirt beschrieben werden, gibt es auch Daten, die auf negative Folgen erhöhter SCFA-Spiegel hinweisen. Hier zeigt sich beispielweise in adipösen Mäusen ein erhöhter SCFA-Spiegel. SCFAs könnten hierbei möglicherweise auch als Energiequelle benutzt werden (Koh et al. 2016).

Rituximab greift über eine B-Zell-Depletion in Autoimmunerkrankungen oder andere entzündliche Prozesse ein. Jedoch zeigen sich in solchen Erkrankungen auch oft andere Zytokine oder Zellen des Immunsystems erhöht, die durch den Wirkmechanismus von Rituximab nicht beeinflusst werden sollten. Möglicherweise stellt jedoch das erhöhte Vorkommen von Butyrat-bildenden Bakterien in mit Rituximab behandelten Mäusen und Menschen eine Möglichkeit dar, auch auf andere Player in diesen Erkrankungen Einfluss zu nehmen. Cross et al. beschrieben, dass unter einer Therapie mit Rituximab nicht nur eine B-Zell-Depletion, sondern auch eine verminderte Anzahl an T-Zellen in der Zerebrospinalflüssigkeit vorzufinden ist (Cross et al. 2006). Diese Entdeckung wäre dementsprechend durch eine Modulation der T-Zell-Antwort durch Butyrat zu erklären.

Die rheumatoide Arthritis ist ein typisches Krankheitsbild, bei der Rituximab zum Einsatz kommt. Die rheumatoide Arthritis ist beschrieben als eine Erkrankung, bei der sowohl T-Zellen als auch B-Zellen sowie viele Zytokine wie Interleukin-1 β , Interleukin-6, Interleukin-12, Interleukin-17, Interleukin-18, Interleukin-33 und viele weitere beteiligt sind (De Luca und Shoenfeld 2019; Dudics et al. 2018). Auch

zeigen sich vermehrt inflammatorische Makrophagen sowie eine erhöhte Translokation von Bakterien aus dem Darm in diesen Patienten (du Teil Espina et al. 2019). Hier könnte die durch Butyrat zu erreichende erniedrigte bakterielle Translokation sowie eine Beeinflussung der TH17 Antwort, eine erniedrigte Expression proinflammatorischer Zytokine und die Runterregulation von inflammatorischen Makrophagen zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes führen.

Auch bei anderen Autoimmunerkrankungen wird oft eine erhöhte TH17 Anzahl gefunden, während die T_{reg} Anzahl verringert ist (Chen et al. 2017). Hier kann Rituximab durch die Erhöhung des Vorkommens von Butyrat-Bildnern eine Verschiebung der T-Zell-Differenzierung hin zu regulatorischen T-Zellen erwirken und eine Besserung der Autoimmunerkrankungen auslösen.

Yamaguchi et al. beschrieben beim idiopathischen nephrotischen Syndrom, bei dem Rituximab bei Versagen von Ciclosporin zum Einsatz kommt, eine negative Korrelation zwischen dem Butyrat-Spiegel und einem Rückfall (Yamaguchi et al. 2021). Auch hier könnte durch Rituximab die zusätzliche Erhöhung des Butyrat-Spiegels durch die vermehrte Kolonisation mit Butyrat-bildenden Bakterien einen positiven Effekt auf den Fortgang der Erkrankung haben.

Ein weiteres Krankheitsbild, bei dem Rituximab zum Einsatz kommt, ist die Graft-versus-Host Disease (GvHD), eine gefürchtete Komplikation nach allogenen Stammzelltransplantationen (Bates et al. 2009). Auch hier ist eine Assoziation zwischen niedrigem Butyrat-Spiegel und dem erhöhten Risiko der Entwicklung einer GvHD publiziert (Mathewson et al. 2016). Die Supplementation mit Butyrat führt hierbei zu einer Protektion vor der GvHD (Gilbert et al. 2003; Markey et al. 2020; Mathewson et al. 2016). McManigle et al. führen die Wirksamkeit von Rituximab bei der GvHD auf eine gestörte B-Zell-Homöostase zurück (McManigle et al. 2019), jedoch wäre auch hier die immunmodulatorische Wirkung durch die Erhöhung von Butyrat eine denkbare weitere Wirkweise.

Die hier aufgeführte Literatur steht in Einklang mit den Resultaten dieser Promotionsarbeit. Es handelt sich bei diesen Ergebnissen um erstmalig gefundene Erkenntnisse, die einen Einblick in pleiotrope, in der Literatur noch nicht beschriebene Effekte einer Therapie mit Rituximab geben.

Die Ergebnisse aus diesem Teilprojekt geben Hinweise darauf, dass sowohl in der Maus als auch im Humansystem die Gabe von Rituximab zu einer erhöhten Ansiedlung von Butyrat-bildenden, anaeroben Bakterien führt, die in der Lage sind durch die Produktion von Butyrat eine antiinflammatorische Wirkung auf den Wirt auszuüben. Dieser Mechanismus kann zusätzlich zu den vier Mechanismen, die zu einer B-Zell-Depletion führen, als fünfter Wirkmechanismus in der Modulation des Immunsystems durch Rituximab gezählt werden.

4.5.2 Unter Therapie mit Ciclosporin zeigt sich eine erhöhte Kolonisation mit dem Bakterium *Turicibacter sanguinis*

Ciclosporin greift über eine Inhibition der IL-2 Bildung in die T-Zell-Proliferation ein und kann auch auf die Wirkung von dendritischen Zellen sowie Makrophagen und Neutrophilen einen Einfluss haben, was auch in einer verringerten Produktion von Zytokinen sichtbar wird (Liddicoat und Lavelle 2019; Schroeder und Herzig 1998).

Zur Untersuchung des Einflusses von Ciclosporin auf die Zusammensetzung der Darm-Mikrobiota wurden Mäuse mit Ciclosporin oder Placebo über drei Wochen behandelt und anschließend der Colon-Faezes mittels NGS auf Unterschiede im Mikrobiom zwischen den Versuchsgruppen untersucht. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Änderungen in der α -Diversität nach Shannon, der Evenness, der Richness oder der Dominanz, was sich auch mit den Untersuchungen von Romito et al. deckt (Romito et al. 2004). Für die β -Diversität hingegen war ein statistisch signifikanter Unterschied in der Struktur der Mikrobiota festzustellen. Es zeigte sich dennoch in den Versuchstieren eine sehr heterogene Mikrobiota in den einzelnen Mäusen. Möglicherweise war für eine deutlichere Verschiebung die Therapiezeit mit diesem Wirkstoff zu kurz oder es hätte eine höhere Dosis Anwendung finden müssen. Für die meisten Familien lies sich keine eindeutige Tendenz in Richtung Erhöhung oder Erniedrigung der Kolonisation beschreiben. Dies betraf z.B. Vertreter der Familie der Lachnospiraceae sowie der Familie der Muribaculaceae.

Nur für das Bakterium *Turicibacter sanguinis* zeigte sich ein eindeutiges Ergebnis in Richtung der statistisch signifikanten Erhöhung in den mit Ciclosporin behandelten Mäusen. Bei *Turicibacter sanguinis* handelt es sich um ein grampositives, anaerobes Bakterium (Bosshard et al. 2002). Es spielt eine wichtige Rolle für den Lipid- und Steroid-Metabolismus des Wirts und ist fähig, Serotonin aus Enterochromaffinen Zellen aufzunehmen (Hoffman und Margolis 2020). *Turicibacter sanguinis* ist ein sehr kontrovers diskutiertes Bakterium. Während Dillon et al. die Besiedlung mit *Turicibacter* als etwas vorteilhaftes für den Wirt sehen (Dillon et al. 2021), verdichten sich Hinweise, dass *Turicibacter* auch negative Effekte im Sinne einer proinflammatorischen Wirkung auf den Wirt ausüben kann (Wang et al. 2018). Dillon et al. schreiben *Turicibacter* eine wichtige Wirkung durch die Regulierung von Wirtsgenen, die im Lipid- und Steroidstoffwechsel eine Rolle spielen, zu und beschreiben durch dieses Bakterium einen erniedrigten Triglyceridspiegel und eine geringe Adipozytengröße (Dillon et al. 2021). Fung et al. führen die Nebenwirkungen von Selektiven Serotonin Reuptake Hemmern (SSRI) wie Fluoxetin auf eine durch die Gabe von SSRI verminderte Kolonisation mit *Turicibacter sanguinis* zurück, wodurch es zu einer Veränderung des Lipidmetabolismus und dadurch zu einer Gewichtserhöhung, einer Vermehrung des Fettgewebes und einem erhöhten Triglycerid-Spiegel kommen soll (Fung et al. 2019). Wei et al. sehen im Auftreten von *Turicibacter* ein Zeichen für ein funktionierendes

Immunsystem, da es in ihren Untersuchungen bei immundefizienten Mäusen nicht gefunden wurde (Wei et al. 2021). Auch eine immunmodulatorische Wirkung des Bakteriums wird diskutiert (Cuív et al. 2011; Wei et al. 2021).

Andere Quellen hingegen sehen eine Korrelation zwischen *Turicibacter* und einer Inflammation des Wirts. Auch den Zusammenhang zwischen der Kolonisation mit *Turicibacter* und einer Entwicklung von Tumoren ist beschrieben (Goodrich et al. 2016; Hoffman und Margolis 2020; Zackular et al. 2013). Das Bakterium ist assoziiert mit niedrigen High Density Lipoprotein (HDL) Spiegeln sowie mit Erkrankungen des Glucose- und Lipid-Metabolismus (Del Chierico et al. 2021; Wu et al. 2020), wobei *Turicibacter* eher zu Beginn einer Diabetes mellitus Entwicklung vorzufinden ist, im weiteren Verlauf der Erkrankung jedoch erniedrigt zu sein scheint und auch mit niedrigen Blutglucose-Spiegeln einhergehen soll (Wu et al. 2020; Zhou et al. 2019). Auch bei der Entwicklung eines metabolischen Syndroms sowie einer Atherosklerose und bei Hypertension lässt sich *Turicibacter* vermehrt in der Mikrobiota des Darms finden (Huang et al. 2021b; Lai et al. 2018). Das Wachstum von *Turicibacter sanguinis* wird durch ein erhöhtes Angebot an Gallensäuren gefördert (Kemis et al. 2019). Außerdem wurde beschrieben, dass Schweine, deren Darmmikrobiota vermehrt *Turicibacter* enthält, eine bessere Wachstumsleistung im Sinne von Fettgenerierung verzeichneten (Wang et al. 2019; Wei et al. 2021).

Ciclosporin besitzt neben den erwünschten Wirkungen auch eine hohe Nebenwirkungsrate sowie Toxizität. Möglicherweise können einige dieser Nebenwirkungen auch mit dem Bakterium *Turicibacter sanguinis* in Zusammenhang stehen, oder die vermehrte Kolonisation mit diesem Bakterium durch die Nebenwirkungen von Ciclosporin ausgelöst worden sein.

Ciclosporin kann zu einer Akkumulation von Gallensäuren führen (Sharanek et al. 2015), was zum Überlebensvorteil für *Turicibacter sanguinis* werden kann (Kemis et al. 2019). Degi et al. zeigten bei Kindern unter Ciclosporin Therapie erhöhte Cholesterolspiegel sowie die Tendenz zum Übergewicht (Dégi et al. 2019). Diese Nebenwirkungen könnten zum einen mit den Beobachtungen bei Schweinen zur verbesserten Wachstumsleistung, aber auch mit einem Eingriff in den Lipidmetabolismus durch *Turicibacter* im Einklang stehen (Huang et al. 2021b; Lai et al. 2018; Wang et al. 2019). Kockx et al. beschrieben die Hyperlipidämie und die Entwicklung einer Atherosklerose als mit einer Therapie mit Ciclosporin assoziierte Nebenwirkung (Kockx et al. 2010), die möglicherweise auch durch *Turicibacter* mit begünstigt werden könnten (Huang et al. 2021b; Lai et al. 2018). Jedoch kann in diesem Projekt nicht abschließend geklärt werden, ob *Turicibacter sanguinis* nur durch Ciclosporin erhöht den Darm kolonisieren, oder ob es auch andere Faktoren der Ciclosporin Therapie wie beispielweise beobachtete Nebenwirkungen mitbeeinflussen kann.

4.5.3 Schlussfolgerung

Dieses Teilprojekt zeigt, dass die Beeinflussung des adaptiven Immunsystems durch Eingriff in die B-Zell- oder T-Zell-Antwort eine Verschiebung in der Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms bewirken kann, die jedoch positive, aber auch negative Folgen mit sich bringen könnte.

Eine Therapie mit Rituximab führt zu einer Verschiebung der Darm-Mikrobiota hin zu Butyrat-bildenden, anaeroben Bakterien wie beispielsweise *Roseburia* oder *Faecalibacterium prausnitzii*. Durch diese Keime kann eine antiinflammatorische Wirkung ausgeübt und dadurch der Verlauf von entzündlichen Erkrankungen positiv beeinflusst werden. Diese Daten lassen sich sowohl im Tierversuch bei Mäusen als auch im Humansystem feststellen. Die Verschiebung der T-Zell-Antwort hin zu regulatorischen T-Zellen und die antiinflammatorischen Effekte durch die erhöhte Sekretion von IL-10 sowie die Augmentation inflammatorischer Makrophagen sowie proinflammatorischer Zytokine können durch Butyrat ausgelöst werden, was als fünfter Wirkmechanismus von Rituximab betrachtet werden kann.

Inwiefern die B-Zell-Depletion direkt zur Erhöhung der Kolonisation mit Butyrat-Produzieren führt, konnte in diesem Projekt nicht geklärt werden. Jedoch wäre dies weitere Investigationen wert.

Unter einer Therapie mit Ciclosporin ließen sich bei Mäusen keine großen Veränderungen in der Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms feststellen. Als Bakterium mit erhöht statistisch signifikantem Vorkommen zeigte sich *Turicibacter sanguinis*, dessen Wirkung in der Literatur noch sehr kontrovers zwischen einem Pathobiont oder einem vorteilhaften Kommensalen diskutiert wird. Die Eigenschaften von *Turicibacter sanguinis* in der Möglichkeit Einfluss auf den Lipid- und Steroid-Metabolismus zu nehmen, könnte mit Nebenwirkungen von Ciclosporin wie beispielsweise der Gewichtszunahme oder der Entwicklung von Atherosklerose zusammenhängen (Del Chierico et al. 2021; Dillon et al. 2021; Huang et al. 2021b; Lai et al. 2018; Wang et al. 2019).

4.5.4 Ausblick

Die Beeinflussung des Mikrobioms durch das adaptive Immunsystem stellt ein großes Feld an noch nicht gänzlich verstandenen Wechselwirkungen zwischen dem Wirt und seiner Kommensalen dar. Die hier gezeigten Daten aus dem Next Generation Sequencing geben Einblicke in diese Mechanismen.

Für Rituximab lässt sich ein klarer Zusammenhang zwischen der Veränderung in der Mikrobiota unter Therapie und einer zusätzlichen antiinflammatorischen und dadurch positiven Beeinflussung der Grunderkrankungen ziehen. Zwar wurde in diesem Projekt nur eine geringe Patientenzahl verwendet und im Humansystem war das Patientenkollektiv sehr heterogen, jedoch sind die Ergebnisse über alle Versuchsgruppen – Maus und Mensch – konsistent. Diese Ergebnisse bedürfen im Verlauf noch

weiteren Überprüfungen durch eine quantitative RT-PCR sowie der Messung von Butyrat-Spiegeln unter Therapie. Auch sollte eine größere Patientenzahl mit homogenerem Krankheitsbild und definierter Co-Medikation rekrutiert werden, um die Beobachtungen weiter zu validieren und den Bias möglichst klein zu halten. Auch der zugrundeliegende Mechanismus der Erhöhung von Butyrat-Bildnern in Zusammenhang mit einer B-Zell-Depletion benötigt weiterer Erforschung.

Diese Untersuchung könnte einen Anstoß in Richtung Supplementation von Butyrat in entzündlichen Erkrankungen wie entzündlichen Darmerkrankungen, Autoimmunerkrankungen aber auch anderen Erkrankungen mit proinflammatorischem Metagenom liefern. Auch ist es denkbar Butyrat-Bildner als Probiotika einzusetzen. Hierfür würden beispielsweise *Roseburia* oder *Faecalibacterium prausnitzii* in Frage kommen, die möglicherweise zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes führen könnten. Für *Roseburia* sind jedoch auch Daten in Richtung einer „microbe-autoreactive B cell axis“ (Reijm et al. 2020; Ruff et al. 2019) publiziert, bei der durch die starke Ähnlichkeit eines Epitops von *Roseburia intestinalis* zu einem B-Zell-Autoantigen eine erhöhte Bildung von Antikörpern gegen das Bakterium und dadurch jedoch auch eine Autoimmunität zur Entwicklung des Antiphospholipid-Syndroms ausgelöst werden kann. Deshalb muss eine Gabe dieses Bakteriums kritisch überdacht werden (Reijm et al. 2020; Ruff et al. 2019).

Für Ciclosporin zeigte sich in diesem Projekt keine große Veränderung in der Darm-Mikrobiota unter Therapie. Hierbei könnten jedoch eine zu kurze Therapiedauer oder zu niedrige Dosis eine Rolle gespielt haben. Auch konnte hier nicht abschließend geklärt werden, ob das erhöhte Vorkommen des Bakteriums *Turicibacter sanguinis* unter Ciclosporin in den Mäusen positive oder negative Folgen mit sich bringt, ob sein Wachstum durch die Therapie mit Ciclosporin nur begünstigt wird, oder ob es auch einen Beitrag zu dessen Nebenwirkungen leistet. Hierzu ist die publizierte Literatur noch zu inkonsistent im Hinblick auf die Rolle des Bakteriums *Turicibacter sanguinis* als Kommensale oder Pathobiont und bedarf deshalb weiterer Untersuchungen. Auch die Übertragbarkeit auf den Menschen sollte durch das Überprüfen der Ergebnisse im Humansystem analysiert werden.

Interessant im Hinblick auf die Beeinflussung des Mikrobioms durch das adaptive Immunsystem wäre, ob auch andere gegen B- oder T-Zellen gerichtete Therapien zu ähnlichen Ergebnissen führen. Außerdem wäre die gleichzeitige Beeinflussung von B-Zellen und T-Zellen oder einzelner Subgruppen einer näheren Betrachtung wert.

4.6 Zusammenfassung

Die gegenseitige Einflussnahme des Mikrobioms und des Immunsystems seines Wirtes rücken zunehmend in den Fokus des Interesses. Es gibt immer mehr sich verhärtende Hinweise auf eine Beeinflussung der Gesundheit eines Individuums durch die Zusammensetzung der Darm-Mikrobiota und der hieraus resultierenden Modulation des Immunsystems. Neben dem angeborenen Immunsystem besitzt das adaptive Immunsystem eine wichtige Rolle in der Pathogenabwehr, aber auch in der Aufrechterhaltung der Homöostase, um weder eine Pathogeninvasion, noch eine überschießende Immunreaktion oder Autoimmunität zuzulassen. Der Einfluss des adaptiven Immunsystems über B-Zellen und T-Zellen auf das Mikrobiom des Darms ist hierbei noch nicht vollständig verstanden. Vor diesem Hintergrund wurde in diesem Teilprojekt die Auswirkung eines Eingriffs in die humorale Immunantwort über eine Gabe von Rituximab und damit verbundener B-Zell-Depletion, sowie der Einfluss auf die zelluläre Immunantwort über eine Gabe von Ciclosporin, welches hauptsächlich über eine Modulation der T-Zell-Antwort seine Wirkung entfaltet, erforscht.

Die Therapie von C57BL/6N Mäusen mit 375 mg/m² einmal wöchentlich verabreichtem intravenösem Rituximab versus Placebo für drei Wochen sowie eine sechswöchige Therapie von Patienten mit Rituximab zur Untersuchung des B-Zell-Einflusses auf die Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms zeigten nach Analyse mittels Next Generation Sequencing keinen Unterschied in der α -Diversität nach Shannon, der Evenness, der Richness, der Dominanz sowie der β -Diversität zwischen den Versuchsgruppen. Auch die Betrachtung der Subgruppe der Patienten, die eine Monotherapie mit Rituximab erhielten, zeigte hierbei keine Änderung. Bei Untersuchung der einzelnen Sequenzen ließ sich eine statistisch signifikante Erhöhung von Butyrat-bildenden Bakterien wie *Roseburia* und anderen Vertretern der Familie der Lachnospiraceae sowie *Faecalibacterium prausnitzii* feststellen. Butyrat zählt zu den kurzkettigen Fettsäuren, die im Darm durch Fermentationsprozesse anaerober Bakterien gebildet werden. Butyrat besitzt eine antiinflammatorische Wirkung und zeigt eine inverse Korrelation zu Erkrankungen, die mit inflammatorischen Prozessen einhergehen wie beispielsweise der rheumatoiden Arthritis oder entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn. Denkbar ist, dass Rituximab über die Erhöhung der Kolonisation des Darms mit Butyrat-bildenden Bakterien eine Erhöhung des Butyrat-Spiegels erreicht, was über die verminderte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 β , Interleukin-6, Interleukin-17, sowie dem daraus resultierenden verminderten Zirkulieren von inflammatorischen Makrophagen und anderen Immunzellen eine antiinflammatorische Wirkung ausübt. Außerdem kann durch Butyrat eine Verschiebung der T-Zell-Differenzierung hin zu regulatorischen T-Zellen stattfinden, die durch das antiinflammatorische Zytokin Interleukin-10 die Anzahl an Typ17-T-Helfer-Zellen reduziert. Außerdem könnte die erhöhte Expression des Proteins für Tight Junctions durch Butyrat zu einer erniedrigten

bakteriellen Translokation aus dem Darm eine weitere positive Modulation von Autoimmunerkrankungen oder anderen mit Inflammation einhergehenden Erkrankungen erwirken. Somit lässt sich dieser Wirkmechanismus als zusätzlicher therapeutischer Effekt einer Rituximab Gabe beschreiben, der nicht zu einer Augmentation der B-Zell-Antwort, sondern zu einer Modulation anderer an der Immunantwort beteiligten Mitspieler wie T-Zellen, Zytokinen und Makrophagen führt. Dies könnte in der Zukunft als eine neue Therapiemöglichkeit durch Gabe von Butyrat-Bildnern als Probiotikum oder dem Fermentationsprodukt Butyrat als Ergänzung für ein besseres Outcome von Patienten mit inflammatorisch getriggerten Erkrankungen dienen.

Die Therapie von C57BL/6N Mäusen mit 35 mg/kg KG täglich intraperitoneal verabreichtem Ciclosporin versus Placebo über drei Wochen zur Erforschung des T-Zell-Einflusses auf die Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms zeigte nach Analyse mittels Next Generation Sequencing keinen Unterschied in der α -Diversität nach Shannon, der Evenness, der Richness sowie der Dominanz zwischen den Verum und Placebo Mäusen. Für die β -Diversität hingegen war ein statistisch signifikanter Unterschied in der Struktur der Mikrobiota festzustellen. Bei Betrachtung der Sequenzen zeigte sich im Vergleich der Versuchstiere ein sehr heterogenes Bild. Als statistisch signifikant in den mit Ciclosporin behandelten Mäusen erhöht vorkommendes Bakterium fand man *Turicibacter sanguinis*. Dieses Bakterium wird in der Literatur sehr kontrovers diskutiert, scheint aber bei erhöhtem Vorkommen an Gallensäuren oder Serotonin im Darm einen Wachstumsvorteil zu besitzen und wird als wichtiger Einflussfaktor auf den Lipid- und Steroidstoffwechsel des Wirts gehandelt. Auch eine vermehrte Fettbildung scheint mit diesem Bakterium einherzugehen. Ciclosporin besitzt neben seinen therapeutischen Effekten auch ein großes Maß an Nebenwirkungen, wozu beispielsweise eine Akkumulation von Gallensäuren gehört. Diese könnte ursächlich für die vermehrte Kolonisation mit *Turicibacter* verantwortlich sein. Möglicherweise kann dieses Bakterium auch Nebenwirkungen wie Gewichtszunahme oder die Entwicklung von Atherosklerose und erhöhten Cholesterol-Spiegeln in Patienten unter Ciclosporin Therapie mit begünstigen. Dies kann jedoch zum jetzigen Zeitpunkt nur gemutmaßt und nicht abschließend geklärt werden. Hierfür wären weiterführende Studien, möglicherweise eine Therapie über einen längeren Zeitraum oder mit höheren Dosen von Ciclosporin, sowie eine Untersuchung zur Übertragbarkeit auf den Menschen von Nutzen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Beeinflussung des adaptiven Immunsystems einen Einfluss auf die Mikrobiota des Darms besitzen kann, der sowohl positive als auch möglicherweise negative Effekte mit sich bringen kann.

5 Gesamtdiskussion und Ausblick

5.1 Diskussion

Das Immunsystem ist eine wichtige Instanz des Körpers im Kampf gegen Pathogene oder körperfremde Substanzen. Es bildet ein überlebenswichtiges Abwehrschild, wodurch eine Schädigung des Körpers vermieden wird. Jedoch kann das Immunsystem auch zu pathophysiologischen Zuständen beitragen, indem es eine fehlgeleitete, entweder zu niedrige oder auch überschießende Immunantwort bildet. Kommt die Homöostase aus dem Gleichgewicht, kann es zu Infektionen, aber auch zur Inflammation oder Autoimmunität kommen (Chaplin 2010; Cheng et al. 2019; Gopalakrishnan et al. 2018a; Shi et al. 2017). Das Mikrobiom spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung, aber auch in der Funktion des Immunsystems (Malla et al. 2018; Ottman et al. 2012; Peterson et al. 2015; Schippa und Conte 2014; Shi et al. 2017). In den letzten Jahren kristallisieren sich stetig neue Erkenntnisse über die gegenseitige Beeinflussung der Mikrobiota des Darms und des Immunsystems heraus. Sowohl für die Gesundheit des Wirts als auch für viele Erkrankungen lassen sich inzwischen Zusammenhänge mit bestimmten Eigenschaften der Mikrobiota erkennen. So spricht beispielweise eine hohe Diversität der Mikrobiota sowie eine Richness für ein gesundes Mikrobiom, wohingegen eine hohe Dominanz eher für ein Ungleichgewicht steht und oft mit pathophysiologischen Zuständen assoziiert ist. Auch bestimmte Keime können entweder als vorteilhaft im Hinblick auf die Wirts-Gesundheit, oder als potentielle Pathobionten gelten (Belizário et al. 2018; Chaput et al. 2017; Dao et al. 2016; Gopalakrishnan et al. 2018a; Gopalakrishnan et al. 2018b; Li et al. 2017a; Malla et al. 2018; Matson et al. 2018; Ottman et al. 2012; Peterson et al. 2015; Schippa und Conte 2014; Shi et al. 2017; Wang et al. 2020; Wolff et al. 2019; Wu et al. 2016).

In dieser Arbeit sollte der Einfluss wichtiger Mitspieler in der Immunantwort auf die Zusammensetzung des Mikrobioms und der damit assoziierten Faktoren näher untersucht werden. Für das angeborene Immunsystem wurde hierfür das wichtige proinflammatorische Zytokin Interleukin-1 β betrachtet, welches auch einen Einfluss auf das adaptive Immunsystem besitzt (Chan und Schroder 2020; Dinarello 1988; Garlanda et al. 2013; Kahlenberg und Kang 2020; Osborn et al. 2008). Interleukin-1 β ist assoziiert mit inflammatorischen Prozessen und zeigt erhöhte Spiegel in vielen Erkrankungen wie Adipositas, dem metabolischen Syndrom sowie Diabetes mellitus, bei denen eine basale Inflammation vorhanden ist (Candela et al. 2012; Tan et al. 2018; Weisberg et al. 2003; Xu et al. 2020; Yazdi und Ghoreschi 2016). Besonders Erkrankungen wie Adipositas, Diabetes mellitus und das metabolische Syndrom werden durch ihre immer höher werdende Prävalenz zu relevanten Erkrankungen, deren Pathophysiologie einer näheren Betrachtung würdig ist. Während bis dato nur eine inverse Korrelation von Interleukin-1 β und dem für ein gesundes Mikrobiom stehenden Bakterium *Akkermansia muciniphila* in diesen mit basal erhöhten IL-1 β Leveln einhergehenden Erkrankungen beschrieben wurde (Candela et al. 2012;

Everard et al. 2013; Tan et al. 2018; Weisberg et al. 2003; Xu et al. 2020), zeigt diese Arbeit zum ersten Mal den direkten Zusammenhang zwischen einem Fehlen von Interleukin-1 β und einer verstärkten Kolonisation mit *Akkermansia muciniphila*. *Akkermansia muciniphila* besitzt protektive Effekte in Hinblick auf die Entwicklung von Adipositas und anderen pathologischen Stoffwechszuständen, kann jedoch auch zur Umkehr dieser Zustände beitragen (Cani und de Vos 2017; Depommier et al. 2019; Derrien et al. 2017; Everard et al. 2013; Hansen et al. 2012; Macchione et al. 2019; Plovier et al. 2017). In dieser Arbeit konnte Angiogenin 4 als möglicher Kandidat präsentiert werden, über den Interleukin-1 β die Kolonisation mit *Akkermansia muciniphila* geringhält. Das antimikrobiell wirksame Peptid (Crabtree et al. 2007; Ganz 2003; Hooper et al. 2003; Walker et al. 2013) zeigt eine direkte, wachstumshemmende Wirkung auf das Bakterium. Durch diese Entdeckung könnte Angiogenin 4 als möglicher Angriffspunkt für zielgerichtete Therapien in der Zukunft erforscht werden, um eine Konversion eines Mikrobioms unter einer basalen Inflammation hin zu einem Mikrobiom mit „guten“ Keimen zu erwirken.

Für das adaptive Immunsystem wurde die Wirkung auf die humorale Immunantwort durch die Gabe von Rituximab, einem monoklonalen anti-CD20 Antikörper, untersucht. Der bekannte Wirkmechanismus von Rituximab besteht in der Erzielung einer B-Zell-Depletion (Pierpont et al. 2018). Jedoch gibt es auch Daten zur Modulation anderer Immunzellen unter der Therapie mit Rituximab, deren Mechanismus noch unklar war (Cross et al. 2006). Unter einer Therapie mit Rituximab zeigte sich in diesem Promotionsprojekt sowohl im Tierversuch als auch im Humansystem eine Steigerung der Kolonisation mit Butyrat-bildenden Bakterien wie beispielsweise *Roseburia* und andere Vertreter der Familie der Lachnospiraceae sowie dem Bakterium *Faecalibacterium prausnitzii*. Das Vorkommen dieser Bakterien ist assoziiert mit einem guten Gesundheitsstatus ihres Wirts (Ferrere et al. 2021; Ganesan et al. 2018; Hua et al. 2020; Huang et al. 2021a; Kang et al. 2021; Keshavarzian et al. 2015; Lapierre et al. 2020; Lopez-Siles et al. 2017; Ma et al. 2020; Moon et al. 2020; Takahashi et al. 2016). Das Fehlen dieser Bakterien hingegen spricht oft für das Vorhandensein von inflammatorischen Krankheitsbildern wie beispielsweise der rheumatoiden Arthritis, dem systemischen Lupus erythematodes oder auch chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn (Chen et al. 2016; De Luca und Shoenfeld 2019; Forbes et al. 2018; Gioia et al. 2020; Joossens et al. 2011; Kang et al. 2021; Kasahara et al. 2018; Keshavarzian et al. 2015; Quan et al. 2018; Zhu et al. 2018). Aus dieser verstärkten Kolonisation lässt sich auch eine verstärkte Bildung von Butyrat folgern. Butyrat zählt zu den Short Chain Fatty Acids und besitzt eine antiinflammatorische Wirkung. Butyrat führt hierbei zu einer verminderten Produktion proinflammatorischer Zytokine, zu einer geringeren Anzahl an inflammatorischen Makrophagen, zu einer erhöhten Expression des Tight Junctions Proteins und dadurch geringerer bakterieller Translokation aus dem Darm sowie zu einer Verschiebung der T-Zell-Differenzierung hin zu regulatorischen T-Zellen, die wiederum das antiinflammatorische Zytokin IL-10

produzieren und hierdurch zu einer geringeren TH17-Antwort führen (Chen et al. 2017; Hui et al. 2019; Koh et al. 2016; Luo et al. 2019; Stammler et al. 2015; Takahashi et al. 2020; Takahashi et al. 2016). Diese immunmodulatorische Wirkung über die vermehrte Ansiedlung von Butyrat-bildenden Bakterien kann als zusätzlicher Wirkmechanismus von Rituximab betrachtet werden, da es hierdurch auch zu einer Verbesserung des Krankheitsstatus der Patienten unter Rituximab-Therapie in inflammatorischen Krankheitsbildern wie der rheumatoiden Arthritis oder auch der GvHD kommen könnte (Alrafas et al. 2019; Gioia et al. 2020; Yue et al. 2019).

Die zelluläre Immunantwort des adaptiven Immunsystems wurde über die Gabe von Ciclosporin in Mäusen untersucht. Hierbei zeigte sich ein sehr heterogenes interindividuelles Mikrobiom in den Versuchstieren. Als Bakterium mit statistisch signifikant höherer Kolonisation in den mit Ciclosporin behandelten Tieren konnte das Bakterium *Turicibacter sanguinis* beobachtet werden. Dieses Bakterium wird in der verfügbaren Literatur sehr kontrovers diskutiert und seine Bedeutung in Gesundheit und Erkrankungen des Wirts ist bis dato noch nicht klar. Es besitzt Einfluss auf den Lipid- und Steroid-Stoffwechsel des Wirts und scheint auch auf die Entwicklung von Atherosklerose oder auch einer Gewichtszunahme eine Rolle zu spielen (Dillon et al. 2021; Fung et al. 2019; Goodrich et al. 2016; Hoffman und Margolis 2020; Huang et al. 2021b; Lai et al. 2018; Wang et al. 2018; Wu et al. 2020). Möglicherweise wird durch eine erhöhte Akkumulation von Gallensäuren, einer bekannten Nebenwirkung einer Ciclosporin Therapie (Sharanek et al. 2015), die Ansiedlung dieses Bakteriums begünstigt, da eine höhere Anwesenheit von Gallensäuren im Darm ein Überlebensvorteil für *Turicibacter* darstellt (Kemis et al. 2019). Für Ciclosporin sind auch Nebenwirkungen wie die Entwicklung einer Adipositas oder Atherosklerose unter Therapie bekannt (Dégi et al. 2019). Inwiefern *Turicibacter sanguinis* diese Nebenwirkungen möglicherweise begünstigt, kann zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht abschließend durch die kontroverse Datenlage zu diesem Bakterium geklärt werden (Huang et al. 2021b; Kockx et al. 2010; Lai et al. 2018; Wang et al. 2019).

5.2 Ausblick

Diese Promotionsarbeit gibt neue Einblicke in die Beeinflussung der Mikrobiota durch das Immunsystem. Besonders die positiven Effekte durch *Akkermansia muciniphila* oder auch durch die Butyrat-bildenden Bakterien *Roseburia*, andere Lachnospiraceae sowie das Bakterium *Faecalibacterium prausnitzii* könnten als Sprungbrett für die Entwicklung neuer Therapien dienen. Denkbar wäre hier beispielsweise die Gabe von *Akkermansia muciniphila* als Probiotikum zur Wiederherstellung eines „gesunden“ Mikrobioms unter pathophysiologischen Zuständen wie Adipositas, Diabetes mellitus oder dem metabolischen Syndrom. *Roseburia* oder ein Butyrat-bildender Lachnospiraceae-Bakterienmix als Probiotikum wären eine Möglichkeit, eine Verbesserung des

Krankheitsstatus von Patienten mit inflammatorischen Krankheitsbildern wie der rheumatoiden Arthritis oder auch dem systemischen Lupus erythematodes herbeizuführen, wenn die Basistherapie nicht ausreicht. Auch *Faecalibacterium prausnitzii* als Probiotikum wäre in dieser Indikation denkbar. Alternativ könnte hier auch eine Substitution mit Butyrat durch orale Gabe erfolgen, um die antiinflammatorische Wirkung zu nutzen. Besonders im Hinblick auf publizierte Daten zur Entwicklung einer Autoimmunerkrankung durch eine Therapie mit *Roseburia* aufgrund eines sich stark ähnelnden Epitops wäre eher die direkte Gabe von Butyrat anstatt des Umwegs über die Ansiedlung von Butyrat-bildenden Bakterien zu favorisieren (Reijm et al. 2020; Ruff et al. 2019).

Angiogenin 4 wäre auch ein interessanter Angriffspunkt für eine zielgerichtete Therapie. So könnte möglicherweise durch die Entwicklung eines Antikörpers – im Humansystem gegen ANG statt Ang4 – eine Vermehrung von *Akkermansia muciniphila* im Darm erwirkt werden, ohne über die nebenwirkungsreiche Blockade des IL-1R oder eines Antikörpers gegen IL-1 β zu gehen. Inwiefern dies tatsächlich zu einer Erhöhung von *A. muciniphila* führt und wie verträglich eine solche Therapie ist, ist zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch nicht abzuschätzen.

Die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit können als Grundstock für die weitere Untersuchung des Einflusses des Immunsystems auf die Zusammensetzung der Mikrobiota des Darms dienen. Die Übertragbarkeit auf den Menschen wurde in diesem Projekt nur an geringen Patientenzahlen und auch heterogenen Krankheitsbildern evaluiert. Auch die Erforschung von anderen, ins Immunsystem eingreifenden Substanzen, beispielsweise anderen gegen CD20 gerichteten Antikörpern oder auch der Einfluss einer CAR-T-Zell-Therapie (Chimäre Antigen-Rezeptor-T-Zell-Therapie), könnten zur Untermauerung der in dieser Arbeit aufgestellten Hypothese dienen oder auch weitere Aspekte beleuchten, wenn beispielweise andere Oberflächenmarker angesteuert werden.

Zusammenfassend bietet diese Arbeit sowohl eine Einsicht in neue Aspekte der Beeinflussung des Mikrobioms durch das Immunsystem und den damit verbundenen Faktoren als auch Anhaltspunkte für mögliche Targets in der Therapie von inflammatorischen Krankheitsbildern.

6 Zusammenfassung

Die Erforschung des Mikrobioms erhält in der heutigen Zeit durch die immer stärkere Evidenz seiner Bedeutung in Gesundheit und Krankheit einen hohen Stellenwert. Die gegenseitige Beeinflussung zwischen der Mikrobiota und dem Wirt, besonders die Rolle des Immunsystems, bedarf hierbei einer genauen Betrachtung. Interleukin-1 β ist ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin, B-Zellen und T-Zellen sind wichtige Komponenten des adaptiven Immunsystems. All diese Mitspieler sind bei der Aufrechterhaltung der Homöostase des Darms mitbeteiligt. Diese Arbeit gibt neue Einblicke in die Rolle von Interleukin-1 β , B-Zellen und T-Zellen bei der Beeinflussung der Zusammensetzung des Mikrobioms des Darms und in die Faktoren, die mit diesen Änderungen assoziiert sind.

Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich durch einen knockout von Interleukin-1 β in Mäusen kein Einfluss auf die hoch prävalenten Vertreter der Darm-Mikrobiota ergibt. Jedoch zeigt sich ein vermehrtes Vorkommen der Familie der Verrucomicrobiaceae. Zu den Verrucomicrobiaceae zählt das gram-negative, mukusliebende Bakterium *Akkermansia muciniphila*, welches bei einer Interleukin-1 β Defizienz bei Mäusen stark erhöht vorkommt. Sowohl im Next Generation Sequencing als auch in der quantitativen Real Time- Polymerase Chain Reaction sind diese Ergebnisse aus dem Colon-Fäzes für das Bakterium *Akkermansia muciniphila* auch über einen langen Zeitraum konsistent. Das antimikrobielle Peptid Angiogenin 4, dessen Expression bei Fehlen von Interleukin-1 β stark herabgesetzt ist, ist ein möglicher Kandidat, der für die Quantität des Vorkommens von *Akkermansia muciniphila* verantwortlich ist. Es zeigt eine inverse Korrelation zum Auftreten des Bakteriums und besitzt eine statistisch hoch signifikante wachstumshemmende Wirkung auf *Akkermansia muciniphila*. Ergebnisse dieser Arbeit konnten zeigen, dass durch die Änderungen in der Expression, besonders der des antimikrobiellen Peptids Angiogenin 4, und durch die verstärkte Besiedlung mit *Akkermansia muciniphila* eine vermehrte Penetration des Bakteriums in den Mukus ermöglicht wird. Dieser Ortswechsel kann zu einem erhöhten Kontakt mit dem systemischen Immunsystem führen, wodurch eine stärkere Immunglobulin G Produktion gegen *Akkermansia muciniphila* beobachtet wurde.

Das Bakterium *Akkermansia muciniphila* gilt als Indikator für ein gesundes Mikrobiom in einem gesunden Wirt. *Akkermansia muciniphila* kann positive Effekte auf metabolische Prozesse im Körper ausüben. So beeinflusst es den Fett- und Glucosestoffwechsel und kann bei adipösen Individuen zu einem Gewichtsverlust führen. *Akkermansia muciniphila* ist in Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Adipositas oder dem metabolischen Syndrom, sowie in vielen chronisch entzündlichen Erkrankungen, nur in geringem Maße in der Mikrobiota des Darms anzutreffen. Bei all diesen Erkrankungen zeigt sich eine basale Inflammation, die mit erhöhten Interleukin-1 β Leveln einhergeht. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass die verminderte Besiedlung mit dem gesundheitsfördernden Bakterium *Akkermansia muciniphila* durch das verstärkte Vorhandensein von Interleukin-1 β hervorgerufen wird. Das Zytokin führt hierbei zur Sekretion von antimikrobiellen Peptiden wie Angiogenin 4, die in den Mukus freigesetzt und durch diesen stabilisiert werden. Dies wiederum führt zu einem erschwerten Eindringen des mukuskolonisierenden Bakteriums. Zusammenfassend zeigt diese Arbeit das erste Mal eine direkte Korrelation zwischen Interleukin-1 β und der quantitativen Zusammensetzung der

Mikrobiota im Darm, die die Beobachtungen bei vielen Erkrankungen mit basaler Inflammation und erhöhten Interleukin-1 β Leveln erklären kann. Durch die physiologische Bedeutung von *Akkermansia muciniphila* auf die intestinale Homöostase und die metabolische Gesundheit des Wirts können diese Ergebnisse Hinweise in Richtung einer therapeutischen Anwendung des Bakteriums als Probiotikum nicht nur bei metabolischen, sondern auch bei chronisch inflammatorischen Erkrankungen geben.

Die Therapie von C57BL/6N Mäusen mit 375 mg/m² einmal wöchentlich verabreichtem intravenösem Rituximab versus Placebo sowie eine sechswöchige Therapie von Patienten mit Rituximab zur Erforschung des B-Zell-Einflusses führen zu keinem Unterschied in der α - und β -Diversität. Bei Betrachtung der einzelnen Sequenzen zeigt sich eine statistisch signifikante Erhöhung von Butyrat-bildenden Bakterien wie *Roseburia* und anderen Lachnospiraceae sowie *Faecalibacterium prausnitzii*. Butyrat zählt zu den kurzkettigen Fettsäuren, die im Darm durch Fermentationsprozesse anaerober Bakterien gebildet werden. Butyrat besitzt eine antiinflammatorische Wirkung und zeigt eine inverse Korrelation zu Erkrankungen, die mit inflammatorischen Prozessen einhergehen. Denkbar ist, dass Rituximab über die Erhöhung der Kolonisation des Darms mit Butyrat-bildenden Bakterien eine Erhöhung des Butyrat-Spiegels erreicht, was über die Beeinflussung sowohl des intestinalen als auch des systemischen Immunsystems eine positive Modulation von Autoimmunerkrankungen oder anderen mit Inflammation einhergehenden Erkrankungen erwirken kann. Somit lässt sich dieser Wirkmechanismus als zusätzlicher therapeutischer Effekt einer Rituximab Gabe beschreiben, der nicht zu einer Augmentation der B-Zell-Antwort, sondern zu einer Modulation anderer an der Immunantwort beteiligten Mitspieler wie T-Zellen, Zytokinen und Makrophagen führt. Dies könnte in der Zukunft als eine neue Therapiemöglichkeit durch Gabe von Butyrat-Bildnern als Probiotikum oder dem Fermentationsprodukt Butyrat als Ergänzung für ein besseres Outcome von Patienten mit inflammatorisch getriggerten Erkrankungen dienen.

Die Therapie von C57BL/6N Mäusen mit 35 mg/kg täglich intraperitoneal verabreichtem Ciclosporin versus Placebo zur Erforschung des T-Zell-Einflusses zeigt nach drei Wochen zwar keinen Unterschied in der α -Diversität, jedoch in der β -Diversität eine statistisch signifikante Änderung in der Struktur der Mikrobiota. Als statistisch signifikant in den mit Ciclosporin behandelten Mäusen erhöht vorkommendes Bakterium erscheint *Turicibacter sanguinis*. Dieses Bakterium wird in der Literatur sehr kontrovers diskutiert, scheint aber bei erhöhtem Vorkommen an Gallensäuren im Darm einen Wachstumsvorteil zu besitzen und wird als wichtiger Einflussfaktor auf den Lipid- und Steroidstoffwechsel des Wirts gehandelt. Auch eine vermehrte Fettbildung scheint mit diesem Bakterium einherzugehen. *Turicibacter sanguinis* könnte durch eine durch Ciclosporin verursachte Akkumulation von Gallensäuren einen Überlebensvorteil erhalten und möglicherweise an der Entwicklung oder Ausprägung von mit Ciclosporin assoziierten Nebenwirkungen wie der Entwicklung von Adipositas, erhöhten Fettwerten oder Atherosklerose beteiligt sein. Der Zusammenhang kann zum jetzigen Zeitpunkt jedoch nur gemutmaßt und sollte durch weitere Studien näher erforscht werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auch eine Beeinflussung des adaptiven Immunsystems einen Einfluss auf die Mikrobiota des Darms besitzen kann, der sowohl positive als auch möglicherweise negative Effekte mit sich bringen kann.

7 Literaturverzeichnis

Acosta-Rodriguez, E. V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A. und Sallusto, F. (2007). **Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells.** *Nat Immunol* 8, 942-949, doi: 10.1038/ni1496.

Alrafas, H. R., Busbee, P. B., Nagarkatti, M. und Nagarkatti, P. S. (2019). **Resveratrol modulates the gut microbiota to prevent murine colitis development through induction of Tregs and suppression of Th17 cells.** *J Leukoc Biol* 106, 467-480, doi: 10.1002/jlb.3a1218-476rr.

Amir, I., Bouvet, P., Legeay, C., Gophna, U. und Weinberger, A. (2014). **Eisenbergiella tayi gen. nov., sp. nov., isolated from human blood.** *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 907-914, doi: 10.1099/ijs.0.057331-0.

Bai, Y., Li, Y., Marion, T., Tong, Y., Zaiss, M. M., Tang, Z., Zhang, Q., Liu, Y. und Luo, Y. (2021). **Resistant starch intake alleviates collagen-induced arthritis in mice by modulating gut microbiota and promoting concomitant propionate production.** *J Autoimmun* 116, 102564, doi: 10.1016/j.jaut.2020.102564.

Bartlett, D. L., Thirunavukarasu, P. und Neal, M. D. (2011). **Surgical oncology**, JP Medical Ltd.

Bates, J. S., Engemann, A. M. und Hammond, J. M. (2009). **Clinical utility of rituximab in chronic graft-versus-host disease.** *Ann Pharmacother* 43, 316-321, doi: 10.1345/aph.1L386.

Bechberger, M., Eigenbrod, T., Boutin, S., Heeg, K. und Bode, K. A. (2023). **IL-1 β knockout increases the intestinal abundance of Akkermansia muciniphila.** *Beneficial Microbes*, 1-10, doi: <https://doi.org/10.1163/18762891-20220042>.

Belizário, J. E., Faintuch, J. und Garay-Malpartida, M. (2018). **Gut Microbiome Dysbiosis and Immunometabolism: New Frontiers for Treatment of Metabolic Diseases.** *Mediators Inflamm* 2018, 2037838, doi: 10.1155/2018/2037838.

Bennett, J. L., O'Connor, K. C., Bar-Or, A., Zamvil, S. S., Hemmer, B., Tedder, T. F., von Büdingen, H.-C., Stuve, O., Yeaman, M. R. und Smith, T. J. (2015). **B lymphocytes in neuromyelitis optica.** *Neurology-Neuroimmunology Neuroinflammation* 2, e104.

Bezombes, C., Fournié, J.-J. und Laurent, G. (2011). **Direct Effect of Rituximab in B-Cell-Derived Lymphoid Neoplasias: Mechanism, Regulation, and Perspectives.** *Molecular Cancer Research* 9, 1435-1442.

Boller, K., Arpin, M., Pringault, E., Mangeat, P. und Reggio, H. (1988). **Differential distribution of villin and villin mRNA in mouse intestinal epithelial cells.** *Differentiation* 39, 51-57.

Boniotto, M., Tossi, A., DelPero, M., Sgubin, S., Antcheva, N., Santon, D., Masters, J. und Crovella, S. (2003). **Evolution of the beta defensin 2 gene in primates.** *Genes Immun* 4, 251-257, doi: 10.1038/sj.gene.6363958.

Bosshard, P. P., Zbinden, R. und Altwegg, M. (2002). **Turicibacter sanguinis gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, Gram-positive bacterium.** *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 1263-1266, doi: 10.1099/00207713-52-4-1263.

Breban, M., Tap, J., Leboime, A., Said-Nahal, R., Langella, P., Chiocchia, G., Furet, J. P. und Sokol, H. (2017). **Faecal microbiota study reveals specific dysbiosis in spondyloarthritis.** *Ann Rheum Dis* 76, 1614-1622, doi: 10.1136/annrheumdis-2016-211064.

Bretscher, A. und Weber, K. (1979). **Villin: the major microfilament-associated protein of the intestinal microvillus.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76, 2321-2325.

Bromberg, J. S., Hittle, L., Xiong, Y., Saxena, V., Smyth, E. M., Li, L., Zhang, T., Wagner, C., Fricke, W. F. und Simon, T. (2018). **Gut microbiota-dependent modulation of innate immunity and lymph node remodeling affects cardiac allograft outcomes.** *JCI insight* 3.

Burger-van Paassen, N., Loonen, L. M., Witte-Bouma, J., Korteland-van Male, A. M., de Bruijn, A. C., van der Sluis, M., Lu, P., Van Goudoever, J. B., Wells, J. M., Dekker, J., Van Seuning, I. und Renes, I. B. (2012). **Mucin Muc2 deficiency and weaning influences the expression of the innate defense genes Reg3 β , Reg3 γ and angiogenin-4.** *PLoS One* 7, e38798, doi: 10.1371/journal.pone.0038798.

Cammarota, G., Ianaro, G., Tilg, H., Rajilić-Stojanović, M., Kump, P., Satokari, R., Sokol, H., Arkkila, P., Pintus, C., Hart, A., Segal, J., Aloj, M., Masucci, L., Molinaro, A., Scaldaferrri, F., Gasbarrini, G., Lopez-Sanroman, A., Link, A., de Groot, P., de Vos, W. M., Högenauer, C., Malfertheiner, P., Mattila, E., Milosavljević, T., Nieuwdorp, M., Sanguinetti, M., Simren, M. und Gasbarrini, A. (2017). **European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice.** *Gut* 66, 569-580, doi: 10.1136/gutjnl-2016-313017.

Candela, M., Rampelli, S., Turroni, S., Severgnini, M., Consolandi, C., De Bellis, G., Masetti, R., Ricci, G., Pession, A. und Brigidi, P. (2012). **Unbalance of intestinal microbiota in atopic children.** *BMC Microbiol* 12, 95, doi: 10.1186/1471-2180-12-95.

Cani, P. D. und de Vos, W. M. (2017). **Next-Generation Beneficial Microbes: The Case of Akkermansia muciniphila.** *Front Microbiol* 8, 1765, doi: 10.3389/fmicb.2017.01765.

Chan, A. H. und Schroder, K. (2020). **Inflammasome signaling and regulation of interleukin-1 family cytokines**. *J Exp Med* 217, doi: 10.1084/jem.20190314.

Chaplin, D. D. (2010). **Overview of the immune response**. *J Allergy Clin Immunol* 125, S3-23, doi: 10.1016/j.jaci.2009.12.980.

Chaput, N., Lepage, P., Coutzac, C., Soularue, E., Le Roux, K., Monot, C., Boselli, L., Routier, E., Cassard, L., Collins, M., Vaysse, T., Marthey, L., Eggermont, A., Asvatourian, V., Lanoy, E., Mateus, C., Robert, C. und Carbonnel, F. (2017). **Baseline gut microbiota predicts clinical response and colitis in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab**. *Ann Oncol* 28, 1368-1379, doi: 10.1093/annonc/mdx108.

Chassaing, B. und Gewirtz, A. T. (2014). **Gut microbiota, low-grade inflammation, and metabolic syndrome**. *Toxicol Pathol* 42, 49-53, doi: 10.1177/0192623313508481.

Chen, B., Sun, L. und Zhang, X. (2017). **Integration of microbiome and epigenome to decipher the pathogenesis of autoimmune diseases**. *J Autoimmun* 83, 31-42, doi: 10.1016/j.jaut.2017.03.009.

Chen, J., Wright, K., Davis, J. M., Jeraldo, P., Marietta, E. V., Murray, J., Nelson, H., Matteson, E. L. und Taneja, V. (2016). **An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis**. *Genome Med* 8, 43, doi: 10.1186/s13073-016-0299-7.

Chen, K. W. und Schroder, K. (2013). **Antimicrobial functions of inflammasomes**. *Curr Opin Microbiol* 16, 311-318, doi: 10.1016/j.mib.2013.02.004.

Chen, L., Zhou, X., Wang, Y., Wang, D., Ke, Y. und Zeng, X. (2021). **Propionate and Butyrate Produced by Gut Microbiota after Probiotic Supplementation Attenuate Lung Metastasis of Melanoma Cells in Mice**. *Mol Nutr Food Res* 65, e2100096, doi: 10.1002/mnfr.202100096.

Cheng, H. Y., Ning, M. X., Chen, D. K. und Ma, W. T. (2019). **Interactions Between the Gut Microbiota and the Host Innate Immune Response Against Pathogens**. *Front Immunol* 10, 607, doi: 10.3389/fimmu.2019.00607.

Collado, M. C., Derrien, M., Isolauri, E., de Vos, W. M. und Salminen, S. (2007). **Intestinal integrity and Akkermansia muciniphila, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults, and the elderly**. *Appl Environ Microbiol* 73, 7767-7770, doi: 10.1128/aem.01477-07.

Corfield, A. P. (2015). **Mucins: a biologically relevant glycan barrier in mucosal protection**. *Biochim Biophys Acta* 1850, 236-252, doi: 10.1016/j.bbagen.2014.05.003.

Corrêa-Oliveira, R., Fachi, J. L., Vieira, A., Sato, F. T. und Vinolo, M. A. (2016). **Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids**. *Clin Transl Immunology* 5, e73, doi: 10.1038/cti.2016.17.

Crabtree, B., Holloway, D. E., Baker, M. D., Acharya, K. R. und Subramanian, V. (2007). **Biological and structural features of murine angiogenin-4, an angiogenic protein**. *Biochemistry* 46, 2431-2443, doi: 10.1021/bi062158n.

Cross, A. H., Stark, J. L., Lauber, J., Ramsbottom, M. J. und Lyons, J. A. (2006). **Rituximab reduces B cells and T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients**. *J Neuroimmunol* 180, 63-70, doi: 10.1016/j.jneuroim.2006.06.029.

Cui, X., Ye, L., Li, J., Jin, L., Wang, W., Li, S., Bao, M., Wu, S., Li, L., Geng, B., Zhou, X., Zhang, J. und Cai, J. (2018). **Metagenomic and metabolomic analyses unveil dysbiosis of gut microbiota in chronic heart failure patients**. *Sci Rep* 8, 635, doi: 10.1038/s41598-017-18756-2.

Cuív, P., Klaassens, E. S., Durkin, A. S., Harkins, D. M., Foster, L., McCorrison, J., Torralba, M., Nelson, K. E. und Morrison, M. (2011). **Draft genome sequence of *Turicibacter sanguinis* PC909, isolated from human feces**. *J Bacteriol* 193, 1288-1289, doi: 10.1128/jb.01328-10.

Cullander, C. (1994). **Imaging in the far-red with electronic light microscopy: requirements and limitations**. *J Microsc* 176, 281-286, doi: 10.1111/j.1365-2818.1994.tb03526.x.

Danilova, N. A., Abdulkhakov, S. R., Grigoryeva, T. V., Markelova, M. I., Vasilyev, I. Y., Boulygina, E. A., Ardatskaya, M. D., Pavlenko, A. V., Tyakht, A. V., Odintsova, A. K. und Abdulkhakov, R. A. (2019). **Markers of dysbiosis in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease**. *Ter Arkh* 91, 17-24, doi: 10.26442/00403660.2019.04.000211.

Dao, M. C., Everard, A., Aron-Wisnewsky, J., Sokolovska, N., Prifti, E., Verger, E. O., Kayser, B. D., Levenez, F., Chilloux, J., Hoyles, L., Dumas, M. E., Rizkalla, S. W., Doré, J., Cani, P. D. und Clément, K. (2016). **Akkermansia muciniphila and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology**. *Gut* 65, 426-436, doi: 10.1136/gutjnl-2014-308778.

De Luca, F. und Shoenfeld, Y. (2019). **The microbiome in autoimmune diseases**. *Clinical & Experimental Immunology* 195, 74-85.

Debyser, G., Mesuere, B., Clement, L., Van de Weygaert, J., Van Hecke, P., Duytschaever, G., Aerts, M., Dawyndt, P., De Boeck, K., Vandamme, P. und Devreese, B. (2016). **Faecal proteomics: A tool to investigate dysbiosis and inflammation in patients with cystic fibrosis**. *J Cyst Fibros* 15, 242-250, doi: 10.1016/j.jcf.2015.08.003.

Dégi, A. A., Bárczi, A., Szabó, D., Kis, É., Reusz, G. S. und Dezsófi, A. (2019). **Cardiovascular Risk Assessment in Pediatric Liver Transplant Patients**. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 68, 377-383, doi: 10.1097/mpg.0000000000002196.

Del Chierico, F., Manco, M., Gardini, S., Guarrasi, V., Russo, A., Bianchi, M., Tortosa, V., Quagliariello, A., Shashaj, B., Fintini, D. und Putignani, L. (2021). **Fecal microbiota signatures of insulin resistance, inflammation, and metabolic syndrome in youth with obesity: a pilot study**. *Acta Diabetol* 58, 1009-1022, doi: 10.1007/s00592-020-01669-4.

Depommier, C., Everard, A., Druart, C., Plovier, H., Van Hul, M., Vieira-Silva, S., Falony, G., Raes, J., Maiter, D., Delzenne, N. M., de Barsey, M., Loumaye, A., Hermans, M. P., Thissen, J. P., de Vos, W. M. und Cani, P. D. (2019). **Supplementation with Akkermansia muciniphila in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study**. *Nat Med* 25, 1096-1103, doi: 10.1038/s41591-019-0495-2.

Derrien, M., Belzer, C. und de Vos, W. M. (2017). **Akkermansia muciniphila and its role in regulating host functions**. *Microb Pathog* 106, 171-181, doi: 10.1016/j.micpath.2016.02.005.

Derrien, M., Van Baarlen, P., Hooiveld, G., Norin, E., Müller, M. und de Vos, W. M. (2011). **Modulation of Mucosal Immune Response, Tolerance, and Proliferation in Mice Colonized by the Mucin-Degrader Akkermansia muciniphila**. *Front Microbiol* 2, 166, doi: 10.3389/fmicb.2011.00166.

Derrien, M., Vaughan, E. E., Plugge, C. M. und de Vos, W. M. (2004). **Akkermansia muciniphila gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium**. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 1469-1476, doi: 10.1099/ijs.0.02873-0.

Dhimolea, E. (2010). **Canakinumab**. *MAbs* 2, 3-13, doi: 10.4161/mabs.2.1.10328.

Dillon, K. M., Morrison, H. A., Powell, C. R., Carrazzone, R. J., Ringel-Scaia, V. M., Winckler, E. W., Council-Troche, R. M., Allen, I. C. und Matson, J. B. (2021). **Targeted Delivery of Persulfides to the Gut: Effects on the Microbiome**. *Angew Chem Int Ed Engl* 60, 6061-6067, doi: 10.1002/anie.202014052.

Dinarello, C. A. (1988). **Biology of interleukin 1**. *Faseb j* 2, 108-115.

Ding, S., Xu, S., Ma, Y., Liu, G., Jang, H. und Fang, J. (2019). **Modulatory Mechanisms of the NLRP3 Inflammasomes in Diabetes**. *Biomolecules* 9, doi: 10.3390/biom9120850.

Dmitrieva-Posocco, O., Dzutsev, A., Posocco, D. F., Hou, V., Yuan, W., Thovarai, V., Mufazalov, I. A., Gunzer, M., Shilovskiy, I. P., Khaitov, M. R., Trinchieri, G., Waisman, A. und Grivennikov, I. A. (2021). **IL-1 β and IL-18 are essential for the development of the gut microbiome**. *Nat Immunol* 22, 1000-1010, doi: 10.1038/s41590-021-0140-2.

S. I. (2019). **Cell-Type-Specific Responses to Interleukin-1 Control Microbial Invasion and Tumor-Elicited Inflammation in Colorectal Cancer.** *Immunity* 50, 166-180.e167, doi: 10.1016/j.immuni.2018.11.015.

du Teil Espina, M., Gabarrini, G., Harmsen, H. J. M., Westra, J., van Winkelhoff, A. J. und van Dijk, J. M. (2019). **Talk to your gut: the oral-gut microbiome axis and its immunomodulatory role in the etiology of rheumatoid arthritis.** *FEMS Microbiol Rev* 43, 1-18, doi: 10.1093/femsre/fuy035.

Dubinsky, V., Reshef, L., Rabinowitz, K., Yadgar, K., Godny, L., Zonensain, K., Wasserberg, N., Dotan, I. und Gophna, U. (2021). **Dysbiosis in Metabolic Genes of the Gut Microbiomes of Patients with an Ileo-anal Pouch Resembles That Observed in Crohn's Disease.** *mSystems* 6, doi: 10.1128/mSystems.00984-20.

Dudics, S., Langan, D., Meka, R. R., Venkatesha, S. H., Berman, B. M., Che, C. T. und Moudgil, K. D. (2018). **Natural Products for the Treatment of Autoimmune Arthritis: Their Mechanisms of Action, Targeted Delivery, and Interplay with the Host Microbiome.** *Int J Mol Sci* 19, doi: 10.3390/ijms19092508.

Duncan, S. H., Hold, G. L., Barcenilla, A., Stewart, C. S. und Flint, H. J. (2002). **Roseburia intestinalis sp. nov., a novel saccharolytic, butyrate-producing bacterium from human faeces.** *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 52, 1615-1620.

Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J. P., Druart, C., Bindels, L. B., Guiot, Y., Derrien, M., Muccioli, G. G., Delzenne, N. M., de Vos, W. M. und Cani, P. D. (2013). **Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 9066-9071, doi: 10.1073/pnas.1219451110.

Ferrere, G., Tidjani Alou, M., Liu, P., Goubet, A. G., Fidelle, M., Kepp, O., Durand, S., Iebba, V., Fluckiger, A., Daillère, R., Thelemaque, C., Grajeda-Iglesias, C., Alves Costa Silva, C., Aprahamian, F., Lefevre, D., Zhao, L., Ryffel, B., Colomba, E., Arnedos, M., Drubay, D., Rauber, C., Raoult, D., Asnicar, F., Spector, T., Segata, N., Derosa, L., Kroemer, G. und Zitvogel, L. (2021). **Ketogenic diet and ketone bodies enhance the anticancer effects of PD-1 blockade.** *JCI Insight* 6, doi: 10.1172/jci.insight.145207.

Forbes, J. D., Chen, C. Y., Knox, N. C., Marrie, R. A., El-Gabalawy, H., de Kievit, T., Alfa, M., Bernstein, C. N. und Van Domselaar, G. (2018). **A comparative study of the gut microbiota in immune-mediated inflammatory diseases-does a common dysbiosis exist?** *Microbiome* 6, 221, doi: 10.1186/s40168-018-0603-4.

Forman, R. A., deSchoolmeester, M. L., Hurst, R. J., Wright, S. H., Pemberton, A. D. und Else, K. J. (2012). **The goblet cell is the cellular source of the anti-microbial angiogenin 4 in the large intestine post Trichuris muris infection.** *PLoS One* 7, e42248, doi: 10.1371/journal.pone.0042248.

Frazier, K., Kambal, A., Zale, E. A., Pierre, J. F., Hubert, N., Miyoshi, S., Miyoshi, J., Ringus, D., Harris, D. und Yang, K. (2020). **High fat diet disrupts diurnal interactions between REG3g and small intestinal gut microbes resulting in metabolic dysfunction.** bioRxiv.

Fuentes, S., Rossen, N. G., van der Spek, M. J., Hartman, J. H., Huuskonen, L., Korpela, K., Salojärvi, J., Aalvink, S., de Vos, W. M., D'Haens, G. R., Zoetendal, E. G. und Ponsioen, C. Y. (2017). **Microbial shifts and signatures of long-term remission in ulcerative colitis after faecal microbiota transplantation.** *Isme j* 11, 1877-1889, doi: 10.1038/ismej.2017.44.

Fuhri Snethlage, C. M., Nieuwdorp, M. und Hanssen, N. M. J. (2021). **Faecal microbiota transplantation in endocrine diseases and obesity.** *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 35, 101483, doi: 10.1016/j.beem.2020.101483.

Fung, T. C., Vuong, H. E., Luna, C. D., Pronovost, G. N., Aleksandrova, A. A., Riley, N. G., Vavilina, A., McGinn, J., Rendon, T. und Forrest, L. R. (2019). **Intestinal serotonin and fluoxetine exposure modulate bacterial colonization in the gut.** *Nature microbiology* 4, 2064-2073.

Gallenga, C. E., Pandolfi, F., Caraffa, A., Kritas, S. K., Ronconi, G., Toniato, E., Martinotti, S. und Conti, P. (2019). **Interleukin-1 family cytokines and mast cells: activation and inhibition.** *J Biol Regul Homeost Agents* 33, 1-6.

Ganesan, K., Chung, S. K., Vanamala, J. und Xu, B. (2018). **Causal relationship between diet-induced gut microbiota changes and diabetes: A novel strategy to transplant *Faecalibacterium prausnitzii* in preventing diabetes.** *International journal of molecular sciences* 19, 3720.

Ganz, T. (2003). **Angiogenin: an antimicrobial ribonuclease.** *Nat Immunol* 4, 213-214, doi: 10.1038/ni0303-213.

Garlanda, C., Dinarello, C. A. und Mantovani, A. (2013). **The interleukin-1 family: back to the future.** *Immunity* 39, 1003-1018, doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.010.

Garrett, W. S., Lord, G. M., Punit, S., Lugo-Villarino, G., Mazmanian, S. K., Ito, S., Glickman, J. N. und Glimcher, L. H. (2007). **Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system.** *Cell* 131, 33-45, doi: 10.1016/j.cell.2007.08.017.

Germeyer, A., Jauckus, J., Zorn, M., Toth, B., Capp, E. und Strowitzki, T. (2011). **Metformin modulates IL-8, IL-1 β , ICAM and IGFBP-1 expression in human endometrial stromal cells.** *Reprod Biomed Online* 22, 327-334, doi: 10.1016/j.rbmo.2010.11.006.

Giannoudaki, E., Hernandez-Santana, Y. E., Mulfaul, K., Doyle, S. L., Hams, E., Fallon, P. G., Mat, A., O'Shea, D., Kopf, M., Hogan, A. E. und Walsh, P. T. (2019). **Interleukin-36 cytokines alter the intestinal microbiome and can protect against obesity and metabolic dysfunction.** *Nat Commun* 10, 4003, doi: 10.1038/s41467-019-11944-w.

Gilbert, K. M., Boger, S. und Fifer, E. K. (2003). **Butyric acid derivative induces allospecific T cell anergy and prevents graft-versus-host disease.** *Immunopharmacol Immunotoxicol* 25, 13-27, doi: 10.1081/iph-120018280.

Gioia, C., Lucchino, B., Tarsitano, M. G., Iannuccelli, C. und Di Franco, M. (2020). **Dietary Habits and Nutrition in Rheumatoid Arthritis: Can Diet Influence Disease Development and Clinical Manifestations?** *Nutrients* 12, doi: 10.3390/nu12051456.

Girtsman, T. A., Beamer, C. A., Wu, N., Buford, M. und Holian, A. (2014). **IL-1R signalling is critical for regulation of multi-walled carbon nanotubes-induced acute lung inflammation in C57Bl/6 mice.** *Nanotoxicology* 8, 17-27, doi: 10.3109/17435390.2012.744110.

Golay, J. und Introna, M. (2012). **Mechanism of action of therapeutic monoclonal antibodies: promises and pitfalls of in vitro and in vivo assays.** *Archives of biochemistry and biophysics* 526, 146-153.

Goodrich, J. K., Davenport, E. R., Waters, J. L., Clark, A. G. und Ley, R. E. (2016). **Cross-species comparisons of host genetic associations with the microbiome.** *Science* 352, 532-535, doi: 10.1126/science.aad9379.

Gopalakrishnan, V., Helmink, B. A., Spencer, C. N., Reuben, A. und Wargo, J. A. (2018a). **The Influence of the Gut Microbiome on Cancer, Immunity, and Cancer Immunotherapy.** *Cancer Cell* 33, 570-580, doi: 10.1016/j.ccell.2018.03.015.

Gopalakrishnan, V., Spencer, C. N., Nezi, L., Reuben, A., Andrews, M., Karpinets, T., Prieto, P., Vicente, D., Hoffman, K. und Wei, S. (2018b). **Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients.** *Science* 359, 97-103.

Gopalakrishnan, V., Spencer, C. N., Nezi, L., Reuben, A., Andrews, M. C., Karpinets, T. V., Prieto, P. A., Vicente, D., Hoffman, K., Wei, S. C., Cogdill, A. P., Zhao, L., Hudgens, C. W., Hutchinson, D. S., Manzo, T., Petaccia de Macedo, M., Cotechini, T., Kumar, T., Chen, W. S., Reddy, S. M., Szczepaniak Sloane, R., Galloway-Pena, J., Jiang, H., Chen, P. L., Shpall, E. J., Rezvani, K., Alousi, A. M., Chemaly, R. F., Shelburne, S., Vence, L. M., Okhuysen, P. C., Jensen, V. B., Swennes, A. G., McAllister, F., Marcelo Riquelme Sanchez, E., Zhang, Y., Le Chatelier, E., Zitvogel, L., Pons, N., Austin-Breneman, J. L., Haydu, L. E., Burton, E. M., Gardner, J. M., Sirmans, E., Hu, J., Lazar, A. J., Tsujikawa, T., Diab, A., Tawbi, H., Glitza, I. C., Hwu, W. J., Patel, S. P., Woodman, S. E., Amaria, R. N., Davies, M. A., Gershenwald, J. E., Hwu, P., Lee, J. E., Zhang, J., Coussens, L. M., Cooper, Z. A., Futreal, P. A., Daniel, C. R., Ajami, N. J., Petrosino, J. F., Tetzlaff, M. T., Sharma, P., Allison, J. P., Jenq, R. R. und Wargo, J. A. (2018c). **Gut microbiome modulates response to**

anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science* 359, 97-103, doi: 10.1126/science.aan4236.

Haas, K. N. und Blanchard, J. L. (2017). **Kineothrix alysoides, gen. nov., sp. nov., a saccharolytic butyrate-producer within the family Lachnospiraceae.** *Int J Syst Evol Microbiol* 67, 402-410, doi: 10.1099/ijsem.0.001643.

Hänninen, A., Toivonen, R., Pöysti, S., Belzer, C., Plovier, H., Ouwerkerk, J. P., Emani, R., Cani, P. D. und De Vos, W. M. (2018). **Akkermansia muciniphila induces gut microbiota remodelling and controls islet autoimmunity in NOD mice.** *Gut* 67, 1445-1453, doi: 10.1136/gutjnl-2017-314508.

Hansen, C. H., Krych, L., Nielsen, D. S., Vogensen, F. K., Hansen, L. H., Sørensen, S. J., Buschard, K. und Hansen, A. K. (2012). **Early life treatment with vancomycin propagates Akkermansia muciniphila and reduces diabetes incidence in the NOD mouse.** *Diabetologia* 55, 2285-2294, doi: 10.1007/s00125-012-2564-7.

He, H., Xu, H., Xu, J., Zhao, H., Lin, Q., Zhou, Y. und Nie, Y. (2020). **Sodium Butyrate Ameliorates Gut Microbiota Dysbiosis in Lupus-Like Mice.** *Front Nutr* 7, 604283, doi: 10.3389/fnut.2020.604283.

Herndler-Brandstetter, D., Shan, L., Yao, Y., Stecher, C., Plajer, V., Lietzenmayer, M., Strowig, T., De Zoete, M. R., Palm, N. W. und Chen, J. (2017). **Humanized mouse model supports development, function, and tissue residency of human natural killer cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, E9626-E9634.

Hoffman, J. M. und Margolis, K. G. (2020). **Building community in the gut: a role for mucosal serotonin.** *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 17, 6-8, doi: 10.1038/s41575-019-0227-6.

Hold, G. L., Schwiertz, A., Aminov, R. I., Blaut, M. und Flint, H. J. (2003). **Oligonucleotide probes that detect quantitatively significant groups of butyrate-producing bacteria in human feces.** *Applied and environmental microbiology* 69, 4320-4324.

Hooper, L. V., Stappenbeck, T. S., Hong, C. V. und Gordon, J. I. (2003). **Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity.** *Nat Immunol* 4, 269-273, doi: 10.1038/ni888.

Hua, X., Zhu, J., Yang, T., Guo, M., Li, Q., Chen, J. und Li, T. (2020). **The Gut Microbiota and Associated Metabolites Are Altered in Sleep Disorder of Children With Autism Spectrum Disorders.** *Front Psychiatry* 11, 855, doi: 10.3389/fpsy.2020.00855.

Huang, C., Li, X., Wu, L., Wu, G., Wang, P., Peng, Y., Huang, S., Yang, Z., Dai, W., Ge, L., Lyu, Y., Wang, L. und Zhang, A. (2021a). **The effect of different dietary structure on gastrointestinal dysfunction in children with cerebral palsy and epilepsy based on gut microbiota.** *Brain Dev* 43, 192-199, doi: 10.1016/j.braindev.2020.09.013.

Huang, K., Liu, C., Peng, M., Su, Q., Liu, R., Guo, Z., Chen, S., Li, Z. und Chang, G. (2021b). **Glycoursodeoxycholic Acid Ameliorates Atherosclerosis and Alters Gut Microbiota in Apolipoprotein E-Deficient Mice.** *J Am Heart Assoc* 10, e019820, doi: 10.1161/jaha.120.019820.

Hugenholtz, F. und de Vos, W. M. (2018). **Mouse models for human intestinal microbiota research: a critical evaluation.** *Cell Mol Life Sci* 75, 149-160, doi: 10.1007/s00018-017-2693-8.

Hui, W., Yu, D., Cao, Z. und Zhao, X. (2019). **Butyrate inhibit collagen-induced arthritis via Treg/IL-10/Th17 axis.** *Int Immunopharmacol* 68, 226-233, doi: 10.1016/j.intimp.2019.01.018.

Ivanov, A., Beers, S. A., Walshe, C. A., Honeychurch, J., Alduaij, W., Cox, K. L., Potter, K. N., Murray, S., Chan, C. H. und Klymenko, T. (2009). **Monoclonal antibodies directed to CD20 and HLA-DR can elicit homotypic adhesion followed by lysosome-mediated cell death in human lymphoma and leukemia cells.** *The Journal of clinical investigation* 119, 2143-2159.

Jia, J., Tian, X., Jiang, J., Ren, Z., Lu, H., He, N., Xie, H., Zhou, L. und Zheng, S. (2019). **Structural shifts in the intestinal microbiota of rats treated with cyclosporine A after orthotopic liver transplantation.** *Frontiers of medicine* 13, 451-460.

Jiang, H., Gebhardt, C., Umansky, L., Beckhove, P., Schulze, T. J., Utikal, J. und Umansky, V. (2015). **Elevated chronic inflammatory factors and myeloid-derived suppressor cells indicate poor prognosis in advanced melanoma patients.** *Int J Cancer* 136, 2352-2360, doi: 10.1002/ijc.29297.

Joossens, M., Huys, G., Cnockaert, M., De Preter, V., Verbeke, K., Rutgeerts, P., Vandamme, P. und Vermeire, S. (2011). **Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives.** *Gut* 60, 631-637, doi: 10.1136/gut.2010.223263.

Kahlenberg, J. M. und Kang, I. (2020). **Advances in Disease Mechanisms and Translational Technologies: Clinicopathologic Significance of Inflammasome Activation in Autoimmune Diseases.** *Arthritis Rheumatol* 72, 386-395, doi: 10.1002/art.41127.

Kang, L., Li, P., Wang, D., Wang, T., Hao, D. und Qu, X. (2021). **Alterations in intestinal microbiota diversity, composition, and function in patients with sarcopenia.** *Sci Rep* 11, 4628, doi: 10.1038/s41598-021-84031-0.

Kaplanov, I., Carmi, Y., Kornetsky, R., Shemesh, A., Shurin, G. V., Shurin, M. R., Dinarello, C. A., Voronov, E. und Apte, R. N. (2019). **Blocking IL-1 β reverses the immunosuppression in mouse breast cancer and synergizes with anti-PD-1 for tumor abrogation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* *116*, 1361-1369, doi: 10.1073/pnas.1812266115.

Karthik, D. und Ravikumar, S. (2011). **Characterization of the brain proteome of rats with diabetes mellitus through two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry.** *Brain Res* *1371*, 171-179, doi: 10.1016/j.brainres.2010.11.066.

Kasahara, K., Krautkramer, K. A., Org, E., Romano, K. A., Kerby, R. L., Vivas, E. I., Mehrabian, M., Denu, J. M., Bäckhed, F. und Lusic, A. J. (2018). **Interactions between Roseburia intestinalis and diet modulate atherogenesis in a murine model.** *Nature microbiology* *3*, 1461-1471.

Kelly, B., Tannahill, G. M., Murphy, M. P. und O'Neill, L. A. (2015). **Metformin Inhibits the Production of Reactive Oxygen Species from NADH:Ubiquinone Oxidoreductase to Limit Induction of Interleukin-1 β (IL-1 β) and Boosts Interleukin-10 (IL-10) in Lipopolysaccharide (LPS)-activated Macrophages.** *J Biol Chem* *290*, 20348-20359, doi: 10.1074/jbc.M115.662114.

Kemis, J. H., Linke, V., Barrett, K. L., Boehm, F. J., Traeger, L. L., Keller, M. P., Rabaglia, M. E., Schueler, K. L., Stapleton, D. S., Gatti, D. M., Churchill, G. A., Amador-Noguez, D., Russell, J. D., Yandell, B. S., Broman, K. W., Coon, J. J., Attie, A. D. und Rey, F. E. (2019). **Genetic determinants of gut microbiota composition and bile acid profiles in mice.** *PLoS Genet* *15*, e1008073, doi: 10.1371/journal.pgen.1008073.

Keshavarzian, A., Green, S. J., Engen, P. A., Voigt, R. M., Naqib, A., Forsyth, C. B., Mutlu, E. und Shannon, K. M. (2015). **Colonic bacterial composition in Parkinson's disease.** *Mov Disord* *30*, 1351-1360, doi: 10.1002/mds.26307.

Kitamoto, S., Nagao-Kitamoto, H., Jiao, Y., Gilliland, M. G., 3rd, Hayashi, A., Imai, J., Sugihara, K., Miyoshi, M., Brazil, J. C., Kuffa, P., Hill, B. D., Rizvi, S. M., Wen, F., Bishu, S., Inohara, N., Eaton, K. A., Nusrat, A., Lei, Y. L., Giannobile, W. V. und Kamada, N. (2020). **The Intermucosal Connection between the Mouth and Gut in Commensal Pathobiont-Driven Colitis.** *Cell* *182*, 447-462.e414, doi: 10.1016/j.cell.2020.05.048.

Kockx, M., Jessup, W. und Kritharides, L. (2010). **Cyclosporin A and atherosclerosis--cellular pathways in atherogenesis.** *Pharmacol Ther* *128*, 106-118, doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.06.001.

Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P. und Bäckhed, F. (2016). **From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites.** *Cell* *165*, 1332-1345, doi: 10.1016/j.cell.2016.05.041.

Kumar, P., Bhattacharya, P. und Prabhakar, B. S. (2018). **A comprehensive review on the role of co-signaling receptors and Treg homeostasis in autoimmunity and tumor immunity.** *Journal of autoimmunity* 95, 77-99.

Lachmann, H. J., Kone-Paut, I., Kuemmerle-Deschner, J. B., Leslie, K. S., Hachulla, E., Quartier, P., Gitton, X., Widmer, A., Patel, N. und Hawkins, P. N. (2009). **Use of canakinumab in the cryopyrin-associated periodic syndrome.** *N Engl J Med* 360, 2416-2425, doi: 10.1056/NEJMoa0810787.

Lagkouvardos, I., Lesker, T. R., Hitch, T. C. A., Gálvez, E. J. C., Smit, N., Neuhaus, K., Wang, J., Baines, J. F., Abt, B., Stecher, B., Overmann, J., Strowig, T. und Clavel, T. (2019). **Sequence and cultivation study of Muribaculaceae reveals novel species, host preference, and functional potential of this yet undescribed family.** *Microbiome* 7, 28, doi: 10.1186/s40168-019-0637-2.

Lai, K. P., Ng, A. H., Wan, H. T., Wong, A. Y., Leung, C. C., Li, R. und Wong, C. K. (2018). **Dietary Exposure to the Environmental Chemical, PFOS on the Diversity of Gut Microbiota, Associated With the Development of Metabolic Syndrome.** *Front Microbiol* 9, 2552, doi: 10.3389/fmicb.2018.02552.

Lapiere, A., Geiger, M., Robert, V., Demarquay, C., Auger, S., Chadi, S., Benadjaoud, M., Fernandes, G., Milliat, F. und Langella, P. (2020). **Prophylactic Faecalibacterium prausnitzii treatment prevents the acute breakdown of colonic epithelial barrier in a preclinical model of pelvic radiation disease.** *Gut microbes* 12, 1812867.

Lee, H., Lee, Y., Kim, J., An, J., Lee, S., Kong, H., Song, Y., Lee, C. K. und Kim, K. (2018). **Modulation of the gut microbiota by metformin improves metabolic profiles in aged obese mice.** *Gut Microbes* 9, 155-165, doi: 10.1080/19490976.2017.1405209.

Lencer, W. I., Reinhart, F. D. und Neutra, M. R. (1990). **Interaction of cholera toxin with cloned human goblet cells in monolayer culture.** *Am J Physiol* 258, G96-102, doi: 10.1152/ajpgi.1990.258.1.G96.

Li, J., Zhao, F., Wang, Y., Chen, J., Tao, J., Tian, G., Wu, S., Liu, W., Cui, Q. und Geng, B. (2017a). **Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension.** *Microbiome* 5, 14.

Li, J., Zhao, F., Wang, Y., Chen, J., Tao, J., Tian, G., Wu, S., Liu, W., Cui, Q., Geng, B., Zhang, W., Weldon, R., Auguste, K., Yang, L., Liu, X., Chen, L., Yang, X., Zhu, B. und Cai, J. (2017b). **Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension.** *Microbiome* 5, 14, doi: 10.1186/s40168-016-0222-x.

Liddicoat, A. M. und Lavelle, E. C. (2019). **Modulation of innate immunity by cyclosporine A.** *Biochemical pharmacology*.

Liddicoat, C., Sydnor, H., Cando-Dumancela, C., Dresken, R., Liu, J., Gellie, N. J. C., Mills, J. G., Young, J. M., Weyrich, L. S., Hutchinson, M. R., Weinstein, P. und Breed, M. F. (2020). **Naturally-diverse airborne environmental microbial exposures modulate the gut microbiome and may provide anxiolytic benefits in mice.** *Sci Total Environ* 701, 134684, doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134684.

Liu, Q. R., Zhang, P. W., Lin, Z., Li, Q. F., Woods, A. S., Troncoso, J. und Uhl, G. R. (2004). **GBPI, a novel gastrointestinal- and brain-specific PP1-inhibitory protein, is activated by PKC and inactivated by PKA.** *Biochem J* 377, 171-181, doi: 10.1042/bj20030128.

Lopez-Lastra, S. und Di Santo, J. P. (2017). **Modeling natural killer cell targeted immunotherapies.** *Frontiers in immunology* 8, 370.

Lopez-Siles, M., Duncan, S. H., Garcia-Gil, L. J. und Martinez-Medina, M. (2017). **Faecalibacterium prausnitzii: from microbiology to diagnostics and prognostics.** *The ISME journal* 11, 841-852.

Lukovac, S., Belzer, C., Pellis, L., Keijser, B. J., de Vos, W. M., Montijn, R. C. und Roeselers, G. (2014). **Differential modulation by Akkermansia muciniphila and Faecalibacterium prausnitzii of host peripheral lipid metabolism and histone acetylation in mouse gut organoids.** *mBio* 5, doi: 10.1128/mBio.01438-14.

Luo, W., Shen, Z., Deng, M., Li, X., Tan, B., Xiao, M., Wu, S., Yang, Z., Zhu, C. und Tian, L. (2019). **Roseburia intestinalis supernatant ameliorates colitis induced in mice by regulating the immune response.** *Molecular medicine reports* 20, 1007-1016.

Ma, J., Sun, L., Liu, Y., Ren, H., Shen, Y., Bi, F., Zhang, T. und Wang, X. (2020). **Alter between gut bacteria and blood metabolites and the anti-tumor effects of Faecalibacterium prausnitzii in breast cancer.** *BMC microbiology* 20, 1-19.

Macchione, I. G., Lopetuso, L. R., Ianiro, G., Napoli, M., Gibiino, G., Rizzatti, G., Petito, V., Gasbarrini, A. und Scaldaferri, F. (2019). **Akkermansia muciniphila: key player in metabolic and gastrointestinal disorders.** *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 23, 8075-8083, doi: 10.26355/eurrev_201909_19024.

Malla, M. A., Dubey, A., Kumar, A., Yadav, S., Hashem, A. und Abd Allah, E. F. (2018). **Exploring the Human Microbiome: The Potential Future Role of Next-Generation Sequencing in Disease Diagnosis and Treatment.** *Front Immunol* 9, 2868, doi: 10.3389/fimmu.2018.02868.

Mantovani, A., Dinarello, C. A., Molgora, M. und Garlanda, C. (2019). **Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity**. *Immunity* 50, 778-795, doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.012.

Markey, K. A., Schluter, J., Gomes, A. L. C., Littmann, E. R., Pickard, A. J., Taylor, B. P., Giardina, P. A., Weber, D., Dai, A., Docampo, M. D., Armijo, G. K., Slingerland, A. E., Slingerland, J. B., Nichols, K. B., Brereton, D. G., Clurman, A. G., Ramos, R. J., Rao, A., Bush, A., Bohannon, L., Covington, M., Lew, M. V., Rizzieri, D. A., Chao, N., Maloy, M., Cho, C., Politikos, I., Giral, S., Taur, Y., Pamer, E. G., Holler, E., Perales, M. A., Ponce, D. M., Devlin, S. M., Xavier, J., Sung, A. D., Peled, J. U., Cross, J. R. und van den Brink, M. R. M. (2020). **The microbe-derived short-chain fatty acids butyrate and propionate are associated with protection from chronic GVHD**. *Blood* 136, 130-136, doi: 10.1182/blood.2019003369.

Marrs, T. und Walter, J. (2021). **Pros and cons: Is faecal microbiota transplantation a safe and efficient treatment option for gut dysbiosis?** *Allergy* 76, 2312-2317, doi: 10.1111/all.14750.

Mathewson, N. D., Jenq, R., Mathew, A. V., Koenigskecht, M., Hanash, A., Toubai, T., Oravec-Wilson, K., Wu, S. R., Sun, Y., Rossi, C., Fujiwara, H., Byun, J., Shono, Y., Lindemans, C., Calafiore, M., Schmidt, T. M., Honda, K., Young, V. B., Pennathur, S., van den Brink, M. und Reddy, P. (2016). **Gut microbiome-derived metabolites modulate intestinal epithelial cell damage and mitigate graft-versus-host disease**. *Nat Immunol* 17, 505-513, doi: 10.1038/ni.3400.

Matson, V., Fessler, J., Bao, R., Chongsuwat, T., Zha, Y., Alegre, M. L., Luke, J. J. und Gajewski, T. F. (2018). **The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients**. *Science* 359, 104-108, doi: 10.1126/science.aao3290.

McIntosh, C. M., Chen, L., Shaiber, A., Eren, A. M. und Alegre, M.-L. (2018). **Gut microbes contribute to variation in solid organ transplant outcomes in mice**. *Microbiome* 6, 1-12.

McManigle, W., Youssef, A. und Sarantopoulos, S. (2019). **B cells in chronic graft-versus-host disease**. *Hum Immunol* 80, 393-399, doi: 10.1016/j.humimm.2019.03.003.

Mendiola, A. S. und Cardona, A. E. (2018). **The IL-1 β phenomena in neuroinflammatory diseases**. *J Neural Transm (Vienna)* 125, 781-795, doi: 10.1007/s00702-017-1732-9.

Mertens, M. und Singh, J. A. (2009). **Anakinra for rheumatoid arthritis: a systematic review**. *J Rheumatol* 36, 1118-1125, doi: 10.3899/jrheum.090074.

Militaru, A. S. und Sabau, I. (2011). **Correlations Between Clinical Forms and Biomarkers in Juvenile Idiopathic Arthritis**. *Annals of RSCB* 16, 182-187.

Miller, P. L. und Carson, T. L. (2020). **Mechanisms and microbial influences on CTLA-4 and PD-1-based immunotherapy in the treatment of cancer: A narrative review.** *Gut Pathogens* 12, 1-10.

Moon, J., Choi, S. H., Yoon, C. H. und Kim, M. K. (2020). **Gut dysbiosis is prevailing in Sjögren's syndrome and is related to dry eye severity.** *PLoS One* 15, e0229029, doi: 10.1371/journal.pone.0229029.

Morampudi, V., Dalwadi, U., Bhinder, G., Sham, H. P., Gill, S. K., Chan, J., Bergstrom, K. S., Huang, T., Ma, C., Jacobson, K., Gibson, D. L. und Vallance, B. A. (2016). **The goblet cell-derived mediator RELM- β drives spontaneous colitis in Muc2-deficient mice by promoting commensal microbial dysbiosis.** *Mucosal Immunol* 9, 1218-1233, doi: 10.1038/mi.2015.140.

Mortha, A., Chudnovskiy, A., Hashimoto, D., Bogunovic, M., Spencer, S. P., Belkaid, Y. und Merad, M. (2014). **Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis.** *Science* 343, 1249288, doi: 10.1126/science.1249288.

Needell, J. C., Dinarello, C. A., Ir, D., Robertson, C. E., Ryan, S. M., Kroehl, M. E., Frank, D. N. und Zipris, D. (2017). **Implication of the intestinal microbiome as a potential surrogate marker of immune responsiveness to experimental therapies in autoimmune diabetes.** *PLoS One* 12, e0173968, doi: 10.1371/journal.pone.0173968.

Nilsen, M., Madelen Saunders, C., Leena Angell, I., Arntzen, M., Lødrup Carlsen, K. C., Carlsen, K. H., Haugen, G., Hagen, L. H., Carlsen, M. H., Hedlin, G., Jonassen, C. M., Nordlund, B., Rehbinder, E. M., Skjerven, H. O., Snipen, L., Staff, A. C., Vettukattil, R. und Rudi, K. (2020). **Butyrate Levels in the Transition from an Infant- to an Adult-Like Gut Microbiota Correlate with Bacterial Networks Associated with Eubacterium Rectale and Ruminococcus Gnavus.** *Genes (Basel)* 11, doi: 10.3390/genes11111245.

Noor, Z., Burgess, S. L., Watanabe, K. und Petri, W. A., Jr. (2016). **Interleukin-25 Mediated Induction of Angiogenin-4 Is Interleukin-13 Dependent.** *PLoS One* 11, e0153572, doi: 10.1371/journal.pone.0153572.

O'Reilly, C., O'Sullivan, Ó., Cotter, P. D., O'Connor, P. M., Shanahan, F., Cullen, A., Rea, M. C., Hill, C., Coulter, I. und Ross, R. P. (2020). **Encapsulated cyclosporine does not change the composition of the human microbiota when assessed ex vivo and in vivo.** *Journal of Medical Microbiology*, jmm001130.

Okumura, R. und Takeda, K. (2016). **Maintenance of gut homeostasis by the mucosal immune system.** *Proceedings of the Japan Academy, Series B* 92, 423-435.

Osborn, O., Gram, H., Zorrilla, E. P., Conti, B. und Bartfai, T. (2008). **Insights into the roles of the inflammatory mediators IL-1, IL-18 and PGE2 in obesity and insulin resistance.** *Swiss Med Wkly* 138, 665-673.

Osińska, I., Popko, K. und Demkow, U. (2014). **Perforin: an important player in immune response.** *Central-European journal of immunology* 39, 109.

Ottman, N., Smidt, H., de Vos, W. M. und Belzer, C. (2012). **The function of our microbiota: who is out there and what do they do?** *Front Cell Infect Microbiol* 2, 104, doi: 10.3389/fcimb.2012.00104.

Parks, O. B., Pociask, D. A., Hodzic, Z., Kolls, J. K. und Good, M. (2015). **Interleukin-22 Signaling in the Regulation of Intestinal Health and Disease.** *Front Cell Dev Biol* 3, 85, doi: 10.3389/fcell.2015.00085.

Paziana, K., Del Monaco, M., Cardonick, E., Moritz, M., Keller, M., Smith, B., Coscia, L. und Armenti, V. (2013). **Ciclosporin use during pregnancy.** *Drug Saf* 36, 279-294, doi: 10.1007/s40264-013-0034-x.

Peterson, C. T., Sharma, V., Elmén, L. und Peterson, S. N. (2015). **Immune homeostasis, dysbiosis and therapeutic modulation of the gut microbiota.** *Clin Exp Immunol* 179, 363-377, doi: 10.1111/cei.12474.

Pierpont, T. M., Limper, C. B. und Richards, K. L. (2018). **Past, present, and future of rituximab—the world's first oncology monoclonal antibody therapy.** *Frontiers in oncology* 8, 163.

Plovier, H., Everard, A., Druart, C., Depommier, C., Van Hul, M., Geurts, L., Chilloux, J., Ottman, N., Duparc, T., Lichtenstein, L., Myridakis, A., Delzenne, N. M., Klievink, J., Bhattacharjee, A., van der Ark, K. C., Aalvink, S., Martinez, L. O., Dumas, M. E., Maiter, D., Loumave, A., Hermans, M. P., Thissen, J. P., Belzer, C., de Vos, W. M. und Cani, P. D. (2017). **A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice.** *Nat Med* 23, 107-113, doi: 10.1038/nm.4236.

Porat, R., Clark, B. D., Wolff, S. M. und Dinarello, C. A. (1991). **Enhancement of growth of virulent strains of *Escherichia coli* by interleukin-1.** *Science* 254, 430-432.

Quan, Y., Song, K., Zhang, Y., Zhu, C., Shen, Z., Wu, S., Luo, W., Tan, B., Yang, Z. und Wang, X. (2018). **Roseburia intestinalis-derived flagellin is a negative regulator of intestinal inflammation.** *Biochemical and biophysical research communications* 501, 791-799.

Reijm, S., Kissel, T. und Toes, R. (2020). **Checkpoints controlling the induction of B cell mediated autoimmunity in human autoimmune diseases.** *European Journal of Immunology* 50, 1885-1894.

Rey, K., Manku, S., Enns, W., Van Rossum, T., Bushell, K., Morin, R. D., Brinkman, F. S. und Choy, J. C. (2018). **Disruption of the gut microbiota with antibiotics exacerbates acute vascular rejection.** *Transplantation* 102, 1085.

Rogier, R., Ederveen, T. H. A., Boekhorst, J., Wopereis, H., Scher, J. U., Manasson, J., Frambach, S., Knol, J., Garssen, J., van der Kraan, P. M., Koenders, M. I., van den Berg, W. B., van Hijum, S. und Abdollahi-Roodsaz, S. (2017). **Aberrant intestinal microbiota due to IL-1 receptor antagonist deficiency promotes IL-17- and TLR4-dependent arthritis.** *Microbiome* 5, 63, doi: 10.1186/s40168-017-0278-2.

Romito, G. A., Pustiglioni, F. E., Saraiva, L., Pustiglioni, A. N., Lotufo, R. F. M. und Stolf, N. A. G. (2004). **Relationship of subgingival and salivary microbiota to gingival overgrowth in heart transplant patients following cyclosporin A therapy.** *Journal of periodontology* 75, 918-924.

Rosero, J. A., Killer, J., Sechovcová, H., Mrázek, J., Benada, O., Fliegerová, K., Havlík, J. und Kopečný, J. (2016). **Reclassification of *Eubacterium rectale* (Hauduroy et al. 1937) Prévot 1938 in a new genus *Agathobacter* gen. nov. as *Agathobacter rectalis* comb. nov., and description of *Agathobacter ruminis* sp. nov., isolated from the rumen contents of sheep and cows.** *Int J Syst Evol Microbiol* 66, 768-773, doi: 10.1099/ijsem.0.000788.

Ruff, W. E., Dehner, C., Kim, W. J., Pagovich, O., Aguiar, C. L., Andrew, T. Y., Roth, A. S., Vieira, S. M., Kriegel, C. und Adeniyi, O. (2019). **Pathogenic autoreactive T and B cells cross-react with mimotopes expressed by a common human gut commensal to trigger autoimmunity.** *Cell host & microbe* 26, 100-113. e108.

Sánchez-Samper, E., Gómez-Gallego, C., Andreo-Martínez, P., Salminen, S. und Ros, G. (2017). **Mice gut microbiota programming by using the infant food profile. The effect on growth, gut microbiota and the immune system.** *Food Funct* 8, 3758-3768, doi: 10.1039/c7fo00819h.

Sanna, S., van Zuydam, N. R., Mahajan, A., Kurilshikov, A., Vich Vila, A., Vösa, U., Mujagic, Z., Masclee, A. A. M., Jonkers, D., Oosting, M., Joosten, L. A. B., Netea, M. G., Franke, L., Zhernakova, A., Fu, J., Wijmenga, C. und McCarthy, M. I. (2019). **Causal relationships among the gut microbiome, short-chain fatty acids and metabolic diseases.** *Nat Genet* 51, 600-605, doi: 10.1038/s41588-019-0350-x.

Schioppo, T. und Ingegnoli, F. (2017). **Current perspective on rituximab in rheumatic diseases.** *Drug design, development and therapy* 11, 2891.

Schippa, S. und Conte, M. P. (2014). **Dysbiotic events in gut microbiota: impact on human health**. *Nutrients* 6, 5786-5805, doi: 10.3390/nu6125786.

Schlüter, T., Schelmbauer, C., Karram, K. und Mufazalov, I. A. (2018). **Regulation of IL-1 signaling by the decoy receptor IL-1R2**. *J Mol Med (Berl)* 96, 983-992, doi: 10.1007/s00109-018-1684-z.

Schneeberger, M., Everard, A., Gómez-Valadés, A. G., Matamoros, S., Ramírez, S., Delzenne, N. M., Gomis, R., Claret, M. und Cani, P. D. (2015). **Akkermansia muciniphila inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice**. *Sci Rep* 5, 16643, doi: 10.1038/srep16643.

Schroeder, F. und Herzig, S. (1998). **Ciclosporin**. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift* 123, 121-122.

Seo, S. U., Kamada, N., Muñoz-Planillo, R., Kim, Y. G., Kim, D., Koizumi, Y., Hasegawa, M., Himpsl, S. D., Browne, H. P., Lawley, T. D., Mobley, H. L., Inohara, N. und Núñez, G. (2015). **Distinct Commensals Induce Interleukin-1 β via NLRP3 Inflammasome in Inflammatory Monocytes to Promote Intestinal Inflammation in Response to Injury**. *Immunity* 42, 744-755, doi: 10.1016/j.immuni.2015.03.004.

Sepulveda, M., Pirozzolo, I. und Alegre, M.-L. (2019). **Impact of the microbiota on solid organ transplant rejection**. *Current opinion in organ transplantation* 24, 679.

Seregin, S. S., Golovchenko, N., Schaf, B., Chen, J., Pudlo, N. A., Mitchell, J., Baxter, N. T., Zhao, L., Schloss, P. D. und Martens, E. C. (2017). **NLRP6 protects Il10 $^{-/-}$ mice from colitis by limiting colonization of Akkermansia muciniphila**. *Cell reports* 19, 733-745.

Seyfizadeh, N., Seyfizadeh, N., Hasenkamp, J. und Huerta-Yepe, S. (2016). **A molecular perspective on rituximab: a monoclonal antibody for B cell non Hodgkin lymphoma and other affections**. *Critical reviews in oncology/hematology* 97, 275-290.

Shao, L., Ling, Z., Chen, D., Liu, Y., Yang, F. und Li, L. (2018). **Disorganized Gut Microbiome Contributed to Liver Cirrhosis Progression: A Meta-Omics-Based Study**. *Front Microbiol* 9, 3166, doi: 10.3389/fmicb.2018.03166.

Sharanek, A., Burban, A., Humbert, L., Bachour-El Azzi, P., Felix-Gomes, N., Rainteau, D. und Guillouzo, A. (2015). **Cellular Accumulation and Toxic Effects of Bile Acids in Cyclosporine A-Treated HepaRG Hepatocytes**. *Toxicol Sci* 147, 573-587, doi: 10.1093/toxsci/kfv155.

Shen, Z., Zhu, C., Quan, Y., Yang, J., Yuan, W., Yang, Z., Wu, S., Luo, W., Tan, B. und Wang, X. (2018). **Insights into Roseburia intestinalis which alleviates experimental colitis pathology**

by inducing anti-inflammatory responses. Journal of gastroenterology and hepatology 33, 1751-1760.

Shi, N., Li, N., Duan, X. und Niu, H. (2017). **Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system.** Mil Med Res 4, 14, doi: 10.1186/s40779-017-0122-9.

Shin, J. I., Lee, K. H., Joo, Y. H., Lee, J. M., Jeon, J., Jung, H. J., Shin, M., Cho, S., Kim, T. H., Park, S., Jeon, B. Y., Jeong, H., Lee, K., Kang, K., Oh, M., Lee, H., Lee, S., Kwon, Y., Oh, G. H. und Kronbichler, A. (2019). **Inflammasomes and autoimmune and rheumatic diseases: A comprehensive review.** J Autoimmun 103, 102299, doi: 10.1016/j.jaut.2019.06.010.

Shornick, L. P., De Togni, P., Mariathasan, S., Goellner, J., Strauss-Schoenberger, J., Karr, R. W., Ferguson, T. A. und Chaplin, D. D. (1996). **Mice deficient in IL-1 β manifest impaired contact hypersensitivity to trinitrochlorobenzene.** J Exp Med 183, 1427-1436, doi: 10.1084/jem.183.4.1427.

Smith, B. J., Miller, R. A., Ericsson, A. C., Harrison, D. C., Strong, R. und Schmidt, T. M. (2019). **Changes in the gut microbiome and fermentation products concurrent with enhanced longevity in acarbose-treated mice.** BMC Microbiol 19, 130, doi: 10.1186/s12866-019-1494-7.

Stammler, D., Eigenbrod, T., Menz, S., Frick, J. S., Sweet, M. J., Shakespear, M. R., Jantsch, J., Siegert, I., Wölfle, S., Langer, J. D., Oehme, I., Schaefer, L., Fischer, A., Knievel, J., Heeg, K., Dalpke, A. H. und Bode, K. A. (2015). **Inhibition of Histone Deacetylases Permits Lipopolysaccharide-Mediated Secretion of Bioactive IL-1 β via a Caspase-1-Independent Mechanism.** J Immunol 195, 5421-5431, doi: 10.4049/jimmunol.1501195.

Stockmann, P., Wehrhan, F., Schwarz-Furlan, S., Stelzle, F., Trabert, S., Neukam, F. W. und Nkenke, E. (2011). **Increased human defensin levels hint at an inflammatory etiology of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: an immunohistological study.** J Transl Med 9, 135, doi: 10.1186/1479-5876-9-135.

Stoll, M. L., Kumar, R., Morrow, C. D., Lefkowitz, E. J., Cui, X., Genin, A., Cron, R. Q. und Elson, C. O. (2014). **Altered microbiota associated with abnormal humoral immune responses to commensal organisms in enthesitis-related arthritis.** Arthritis research & therapy 16, 1-10.

Sun, D., Bai, R., Zhou, W., Yao, Z., Liu, Y., Tang, S., Ge, X., Luo, L., Luo, C., Hu, G. F., Sheng, J. und Xu, Z. (2021). **Angiogenin maintains gut microbe homeostasis by balancing α -Proteobacteria and Lachnospiraceae.** Gut 70, 666-676, doi: 10.1136/gutjnl-2019-320135.

Suriano, F., Bindels, L. B., Verspreet, J., Courtin, C. M., Verbeke, K., Cani, P. D., Neyrinck, A. M. und Delzenne, N. M. (2017). **Fat binding capacity and modulation of the gut microbiota both**

determine the effect of wheat bran fractions on adiposity. *Sci Rep* 7, 5621, doi: 10.1038/s41598-017-05698-y.

Takahashi, D., Hoshina, N., Kabumoto, Y., Maeda, Y., Suzuki, A., Tanabe, H., Isobe, J., Yamada, T., Muroi, K., Yanagisawa, Y., Nakamura, A., Fujimura, Y., Saeki, A., Ueda, M., Matsumoto, R., Asaoka, H., Clarke, J. M., Harada, Y., Umemoto, E., Komatsu, N., Okada, T., Takayanagi, H., Takeda, K., Tomura, M. und Hase, K. (2020). **Microbiota-derived butyrate limits the autoimmune response by promoting the differentiation of follicular regulatory T cells.** *EBioMedicine* 58, 102913, doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102913.

Takahashi, K., Nishida, A., Fujimoto, T., Fujii, M., Shioya, M., Imaeda, H., Inatomi, O., Bamba, S., Sugimoto, M. und Andoh, A. (2016). **Reduced Abundance of Butyrate-Producing Bacteria Species in the Fecal Microbial Community in Crohn's Disease.** *Digestion* 93, 59-65, doi: 10.1159/000441768.

Tan, L., Zhao, S., Zhu, W., Wu, L., Li, J., Shen, M., Lei, L., Chen, X. und Peng, C. (2018). **The Akkermansia muciniphila is a gut microbiota signature in psoriasis.** *Exp Dermatol* 27, 144-149, doi: 10.1111/exd.13463.

Tapia, C., Nessel, T. A. und Zito, P. M. (2021). **Cyclosporine.** In: StatPearls, StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC., Treasure Island (FL).

Tian, P., Li, B., He, C., Song, W., Hou, A., Tian, S., Meng, X., Li, K. und Shan, Y. (2016). **Antidiabetic (type 2) effects of Lactobacillus G15 and Q14 in rats through regulation of intestinal permeability and microbiota.** *Food Funct* 7, 3789-3797, doi: 10.1039/c6fo00831c.

Ueberfeld, J. und Walt, D. R. (2004). **Reversible ratiometric probe for quantitative DNA measurements.** *Anal Chem* 76, 947-952, doi: 10.1021/ac035093s.

van Ampting, M. T., Loonen, L. M., Schonewille, A. J., Konings, I., Vink, C., Iovanna, J., Chamillard, M., Dekker, J., van der Meer, R., Wells, J. M. und Bovee-Oudenhoven, I. M. (2012). **Intestinally secreted C-type lectin Reg3b attenuates salmonellosis but not listeriosis in mice.** *Infect Immun* 80, 1115-1120, doi: 10.1128/iai.06165-11.

Verhoog, S., Taneri, P. E., Roa Díaz, Z. M., Marques-Vidal, P., Troup, J. P., Bally, L., Franco, O. H., Glisic, M. und Muka, T. (2019). **Dietary Factors and Modulation of Bacteria Strains of Akkermansia muciniphila and Faecalibacterium prausnitzii: A Systematic Review.** *Nutrients* 11, doi: 10.3390/nu11071565.

Vich Vila, A., Collij, V., Sanna, S., Sinha, T., Imhann, F., Bourgonje, A. R., Mujagic, Z., Jonkers, D., Masclee, A. A. M., Fu, J., Kurilshikov, A., Wijmenga, C., Zhernakova, A. und Weersma, R. K.

(2020). **Impact of commonly used drugs on the composition and metabolic function of the gut microbiota.** *Nat Commun* 11, 362, doi: 10.1038/s41467-019-14177-z.

Walker, C. R., Hautefort, I., Dalton, J. E., Overweg, K., Egan, C. E., Bongaerts, R. J., Newton, D. J., Cruickshank, S. M., Andrew, E. M. und Carding, S. R. (2013). **Intestinal intraepithelial lymphocyte-enterocyte crosstalk regulates production of bactericidal angiogenin 4 by Paneth cells upon microbial challenge.** *PLoS One* 8, e84553, doi: 10.1371/journal.pone.0084553.

Walters, K. E. und Martiny, J. B. H. (2020). **Alpha-, beta-, and gamma-diversity of bacteria varies across habitats.** *PLoS One* 15, e0233872, doi: 10.1371/journal.pone.0233872.

Wang, L., Tang, L., Feng, Y., Zhao, S., Han, M., Zhang, C., Yuan, G., Zhu, J., Cao, S., Wu, Q., Li, L. und Zhang, Z. (2020). **A purified membrane protein from Akkermansia muciniphila or the pasteurised bacterium blunts colitis associated tumourigenesis by modulation of CD8(+) T cells in mice.** *Gut*, doi: 10.1136/gutjnl-2019-320105.

Wang, X., Tsai, T., Deng, F., Wei, X., Chai, J., Knapp, J., Apple, J., Maxwell, C. V., Lee, J. A., Li, Y. und Zhao, J. (2019). **Longitudinal investigation of the swine gut microbiome from birth to market reveals stage and growth performance associated bacteria.** *Microbiome* 7, 109, doi: 10.1186/s40168-019-0721-7.

Wang, Y., Xie, Q., Sun, S., Huang, B., Zhang, Y., Xu, Y., Zhang, S. und Xiang, H. (2018). **Probiotics-fermented Massa Medicata Fermentata ameliorates weaning stress in piglets related to improving intestinal homeostasis.** *Appl Microbiol Biotechnol* 102, 10713-10727, doi: 10.1007/s00253-018-9438-y.

Watanabe, K., Itoh, K., Park, S. H., Kaku, M., Ishii, K., Sasano, H., Naitoh, T., Unno, M. und Fukushima, K. (2020). **Resistin-like molecule beta, a colonic epithelial protein, exhibits antimicrobial activity against Staphylococcus aureus including methicillin-resistant strains.** *Surg Today* 50, 920-930, doi: 10.1007/s00595-020-01974-z.

Weber, A., Wasiliew, P. und Kracht, M. (2010). **Interleukin-1beta (IL-1beta) processing pathway.** *Sci Signal* 3, cm2, doi: 10.1126/scisignal.3105cm2.

Wei, X., Bottoms, K. A., Stein, H. H., Blavi, L., Bradley, C. L., Bergstrom, J., Knapp, J., Story, R., Maxwell, C., Tsai, T. und Zhao, J. (2021). **Dietary Organic Acids Modulate Gut Microbiota and Improve Growth Performance of Nursery Pigs.** *Microorganisms* 9, doi: 10.3390/microorganisms9010110.

Weiner, G. J. (2010). **Rituximab: mechanism of action.** Beitrag präsentiert bei: Seminars in hematology (Elsevier).

Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L. und Ferrante, A. W., Jr. (2003). **Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue.** *J Clin Invest* 112, 1796-1808, doi: 10.1172/jci19246.

Wolff, D., Frese, C., Schoilew, K., Dalpke, A., Wolff, B. und Boutin, S. (2019). **Amplicon-based microbiome study highlights the loss of diversity and the establishment of a set of species in patients with dentin caries.** *PLoS One* 14, e0219714, doi: 10.1371/journal.pone.0219714.

Wu, M., Yang, S., Wang, S., Cao, Y., Zhao, R., Li, X., Xing, Y. und Liu, L. (2020). **Effect of Berberine on Atherosclerosis and Gut Microbiota Modulation and Their Correlation in High-Fat Diet-Fed ApoE^{-/-} Mice.** *Front Pharmacol* 11, 223, doi: 10.3389/fphar.2020.00223.

Wu, X., He, B., Liu, J., Feng, H., Ma, Y., Li, D., Guo, B., Liang, C., Dang, L., Wang, L., Tian, J., Zhu, H., Xiao, L., Lu, C., Lu, A. und Zhang, G. (2016). **Molecular Insight into Gut Microbiota and Rheumatoid Arthritis.** *Int J Mol Sci* 17, 431, doi: 10.3390/ijms17030431.

Xu, X., Lin, S., Chen, Y., Li, X., Ma, S., Fu, Y., Wei, C., Wang, C. und Xu, W. (2017). **The Effect of Metformin on the Expression of GPR109A, NF- κ B and IL-1 β in Peripheral Blood Leukocytes from Patients with Type 2 Diabetes Mellitus.** *Ann Clin Lab Sci* 47, 556-562.

Xu, Y., Wang, N., Tan, H. Y., Li, S., Zhang, C. und Feng, Y. (2020). **Function of Akkermansia muciniphila in Obesity: Interactions With Lipid Metabolism, Immune Response and Gut Systems.** *Front Microbiol* 11, 219, doi: 10.3389/fmicb.2020.00219.

Yamaguchi, T., Tsuji, S., Akagawa, S., Akagawa, Y., Kino, J., Yamanouchi, S., Kimata, T., Hashiyada, M., Akane, A. und Kaneko, K. (2021). **Clinical Significance of Probiotics for Children with Idiopathic Nephrotic Syndrome.** *Nutrients* 13, doi: 10.3390/nu13020365.

Yazdi, A. S. und Ghoreschi, K. (2016). **The Interleukin-1 Family.** *Adv Exp Med Biol* 941, 21-29, doi: 10.1007/978-94-024-0921-5_2.

Yegorov, S., Babenko, D., Kozhakhmetov, S., Akhmaltdinova, L., Kadyrova, I., Nurgozhina, A., Nurgazyev, M., Good, S. V., Hortelano, G. H., Yermekbayeva, B. und Kushugulova, A. (2020). **Psoriasis Is Associated With Elevated Gut IL-1 α and Intestinal Microbiome Alterations.** *Front Immunol* 11, 571319, doi: 10.3389/fimmu.2020.571319.

Yue, M., Tao, Y., Fang, Y., Lian, X., Zhang, Q., Xia, Y., Wei, Z. und Dai, Y. (2019). **The gut microbiota modulator berberine ameliorates collagen-induced arthritis in rats by facilitating the generation of butyrate and adjusting the intestinal hypoxia and nitrate supply.** *Faseb j* 33, 12311-12323, doi: 10.1096/fj.201900425RR.

Zackular, J. P., Baxter, N. T., Iverson, K. D., Sadler, W. D., Petrosino, J. F., Chen, G. Y. und Schloss, P. D. (2013). **The gut microbiome modulates colon tumorigenesis.** *mBio* 4, e00692-00613, doi: 10.1128/mBio.00692-13.

Zhang, T., Li, Q., Cheng, L., Buch, H. und Zhang, F. (2019a). **Akkermansia muciniphila is a promising probiotic.** *Microb Biotechnol* 12, 1109-1125, doi: 10.1111/1751-7915.13410.

Zhang, X., Liu, S., Wang, Y., Hu, H., Li, L., Wu, Y., Cao, D., Cai, Y., Zhang, J. und Zhang, X. (2019b). **Interleukin-22 regulates the homeostasis of the intestinal epithelium during inflammation.** *International journal of molecular medicine* 43, 1657-1668.

Zhen, Y. und Zhang, H. (2019). **NLRP3 Inflammasome and Inflammatory Bowel Disease.** *Front Immunol* 10, 276, doi: 10.3389/fimmu.2019.00276.

Zheng, D., Liwinski, T. und Elinav, E. (2020). **Interaction between microbiota and immunity in health and disease.** *Cell Res* 30, 492-506, doi: 10.1038/s41422-020-0332-7.

Zhou, W., Xu, H., Zhan, L., Lu, X. und Zhang, L. (2019). **Dynamic Development of Fecal Microbiome During the Progression of Diabetes Mellitus in Zucker Diabetic Fatty Rats.** *Front Microbiol* 10, 232, doi: 10.3389/fmicb.2019.00232.

Zhu, C., Song, K., Shen, Z., Quan, Y., Tan, B., Luo, W., Wu, S., Tang, K., Yang, Z. und Wang, X. (2018). **Roseburia intestinalis inhibits interleukin-17 excretion and promotes regulatory T cells differentiation in colitis.** *Molecular medicine reports* 17, 7567-7574.

Zwicky, P., Unger, S. und Becher, B. (2020). **Targeting interleukin-17 in chronic inflammatory disease: A clinical perspective.** *The Journal of experimental medicine* 217.

8 Eigene Veröffentlichungen

Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgehen:

Bechberger, M., Eigenbrod, T., Boutin, S., Heeg, K. und Bode, K. A. (2023). **IL-1 β knockout increases the intestinal abundancy of *Akkermansia muciniphila*.** Beneficial Microbes, 1-10, doi: <https://doi.org/10.1163/18762891-20220042>.

Abstracts + Oral Presentations

Bechberger, M., Hoppe-Tichy, T., Bode, K. (2015). **Kurzvorträge der 4. LAUD-Forschungstagung: Wirt-Mikrobiota-Interaktion. Einfluss von IL-1 auf das intestinale Mikrobiom.** Krankenhauspharmazie 36, 252-253

Bechberger, M., Hoppe-Tichy, T., Heeg, K., Bode, K.A. (2017). **Kurzvorträge der 7. LAUD-Forschungs- und Doktorandentagung: Wirt-Mikrobiota Interaktion. Beeinflussung des intestinalen Mikrobioms durch IL-1.** Krankenhauspharmazie 38, 556

Oral Presentations

Bechberger, M., Heeg, K., Bode, K.A. (2016). **The Influence of IL-1beta on the gut microbiome.** 20. Symposium „Infektion und Immunabwehr“ der Deutschen Gesellschaft für Immunologie e.V. in Rothenfels; 09.-11.03.2016

Weitere Publikationen:

Freischmidt, H., Armbruster, J., Bonner, E., Guehring, T., Nurjadi, D., Bechberger, M., Sonntag, R., Schmidmaier, G., Grützner, P. A. und Helbig, L. (2021). **Systemic Administration of PTH Supports Vascularization in Segmental Bone Defects Filled with Ceramic-Based Bone Graft Substitute.** Cells 10, 2058.

Jungreithmayr, V., Haefeli, W. E. und Seidling, H. M. (2023). **Workflow, Time Requirement, and Quality of Medication Documentation with or without a Computerized Physician Order Entry System-A Simulation-Based Lab Study.** Methods Inf Med 62, 40-48, doi: 10.1055/s-0042-1758631.

Abstracts + Poster

Bechberger, M., Schwald, M., Hoppe-Tichy, T. (2015). **Posterausstellung und Kurzvorträge beim ADKA-Kongress in Mannheim: Arzneimittelanalyse gefäßchirurgischer Patienten.** Krankenhauspharmazie 36, 323

Bechberger, M., Meyle, E., Hoppe-Tichy, T. (2015). **Posterausstellung und Kurzvorträge beim ADKA-Kongress in Mannheim: Erkennen mikrobiologischer Kontaminationen von Media Fills in der aseptischen Herstellung.** Krankenhauspharmazie 36, 323-324

Ehmann, M., Bechberger, M., Pietsch, G., Hoppe-Tichy, T. (2018). **Posterausstellung und Kurzvorträge beim ADKA-Kongress in Stuttgart: Etablierung des Lumitesters zum Ausschluss von Kontaminationen in parenteraler Nährlösung.** Krankenhauspharmazie 38, 209-210

Bechberger, M., Tapija, E., Hoppe-Tichy, T. (2021). **Posterausstellung und Kurzvorträge beim ADKA-Kongress: Partikelkontamination – der ewige Feind.** Krankenhauspharmazie 42, 228-229

Tapija, E., Bechberger, M., Hoppe-Tichy, T. (2021). **Posterausstellung und Kurzvorträge beim ADKA-Kongress: Die Odyssee der Suche nach einem geeigneten Reinigungsmittel für das aseptische Arbeiten.** Krankenhauspharmazie 42, 237-238

9 Appendix

9.1 Appendix 1 – Studie Untersuchung des Einflusses von immunsuppressiven Substanzen auf die Bakterienzusammensetzung im Darm – Patienteninformation



UniversitätsKlinikum Heidelberg

Zentrum für Infektiologie
Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Im Neuenheimer Feld 324
D-69120 Heidelberg

Heidelberg, den 12.02.2018

PATIENTENINFORMATION zur Studie Untersuchung des Einflusses von immunsuppressiven Substanzen auf die Bakterienzusammensetzung im Darm

Liebe/r Patient/in,

Sie wurden für diese Studie ausgewählt, da Sie eine Therapie mit dem Medikament Kineret® (Wirkstoff Anakinra) bzw. Ilaris® (Wirkstoff Canakinumab) beginnen. Diese Medikamente wirken einem Botenstoff des Immunsystems, IL-1 entgegen, damit aus einer übersteigerten Immunreaktion wieder eine normale wird. Uns ist es im Mausmodell gelungen zu zeigen, dass IL-1 Knock Out Mäuse, also solche Mäuse, die kein IL-1 produzieren können, ein erhöhtes Vorkommen einer bestimmten Gruppe von Bakterien im Stuhl zeigen, für die es Hinweise gibt, dass sie einen positiven Einfluss auf die Gesundheit besitzen.

Um zu untersuchen, ob diese Bakterien wie zu erwarten unter einer Therapie mit den oben genannten Medikamenten vermehrt nachgewiesen werden können, bitten wir Sie jeweils vor Beginn Ihrer Therapie mit Kineret® oder Ilaris®, als auch 6 Wochen nach Beginn der Therapie eine Stuhlprobe abzugeben. In dem Stuhl wird molekularbiologisch die Menge der Bakterien vor und nach der Therapie verglichen. Um optimale Ergebnisse zu erzielen, bitten wir Sie die Proben gekühlt zu lagern bzw. uns möglichst schnell zukommen zu lassen.

Zu Beginn der Therapie kann dies natürlich in der behandelnden Klinik erfolgen. Sollte es nicht möglich sein, stellen wir Ihnen Probenröhrchen und geeignete Versandboxen mit unserer Adresse und Porto zur Verfügung, damit sie zu hause die Probe nehmen und dann an uns versenden können. Die zweite Stuhlprobe kann am Vortag oder am Morgen Ihres Kontrolltermins daheim erfolgen bzw. von zu hause direkt an uns verschickt werden, falls kein Kontrolltermin vorgesehen ist. Auch hierfür stellen wir Ihnen eine Versandbox und Probenröhrchen zur Verfügung, welches Sie für den Transport oder den Versand nutzen können

Durch die Teilnahme an der Studie resultieren keine möglichen unerwünschten Wirkungen oder Risiken, da kein Eingriff in die Therapie erfolgt. Die studienbedingten Maßnahmen nehmen jeweils einen Zeitraum von ca. 10 Minuten in Anspruch.

Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig. Sie können Ihr Einverständnis jederzeit, ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile für Ihre weitere medizinische Versorgung, zurückziehen. Bei Rücktritt von der Studie kann auf Wunsch bereits gewonnenes Daten-/Probenmaterial vernichtet werden. Sie können sich beim Ausscheiden aus der Studie entscheiden, ob Sie mit der Auswertung des Materials bzw. Ihrer Studiendaten einverstanden sind oder nicht. Sollten Sie zu einem späteren Zeitpunkt Ihre Entscheidung ändern wollen, setzen Sie sich bitte mit dem Studienarzt in Verbindung.

Während der Studie werden medizinische Befunde von Ihnen erhoben und in der Prüfstelle in Ihrer persönlichen Akte niedergeschrieben und/oder elektronisch gespeichert. Die für die Studie wichtigen Daten werden zusätzlich in pseudonymisierter Form gespeichert, ausgewertet und gegebenenfalls weitergegeben. Die Daten sind gegen unbefugten Zugriff gesichert. Die Daten werden zum Aufbau eines Registers genutzt. Die zukünftige Nutzung dieses Registers erfolgt nur durch das Studienpersonal zur Auswertung der Bakterienzusammensetzung des Stuhls und ist auf maximal zehn Jahre nach Studienbeginn begrenzt. Nach Beendigung der Studie werden die Daten gelöscht.

Für Rückfragen stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung:

Maren Bechberger	06221 56 34961	maren.bechberger@med.uni-heidelberg.de
Dr. Konrad Bode	06221 56 38920	konrad.bode@labor-limbach.de

9.2 Appendix 2 – Studie Untersuchung des Einflusses von immunsuppressiven Substanzen auf die Bakterienzusammensetzung im Darm – Patienteninformation Jugendliche



UniversitätsKlinikum Heidelberg

Zentrum für Infektiologie
Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Im Neuenheimer Feld 324
D-69120 Heidelberg

Heidelberg, den 12.02.2018

PATIENTENINFORMATION für Jugendliche (13-17 Jahre) und deren Erziehungsberechtigte zur Studie Untersuchung des Einflusses von immunsuppressiven Substanzen auf die Bakterienzusammensetzung im Darm

Liebe/r Patient/in, liebe/r Erziehungsberechtigte/r,

Sie wurden für diese Studie ausgewählt, da Sie eine Therapie mit dem Medikament Kineret® (Wirkstoff Anakinra) bzw. Ilaris® (Wirkstoff Canakinumab) beginnen. Diese Medikamente wirken einem Botenstoff des Immunsystems, IL-1 entgegen, damit aus einer übersteigerten Immunreaktion wieder eine normale wird. In Vorversuchen ist es uns gelungen zu zeigen, dass das Fehlen des Botenstoffes IL-1 ein erhöhtes Vorkommen einer bestimmten Gruppe von Bakterien im Stuhl begünstigt. Für diese Bakterien gibt es Hinweise, dass sie einen positiven Einfluss auf die Gesundheit besitzen.

Um zu untersuchen, ob diese Bakterien wie zu erwarten unter einer Therapie mit den oben genannten Medikamenten vermehrt nachgewiesen werden können, bitten wir Sie jeweils vor Beginn Ihrer Therapie mit Kineret® oder Ilaris®, als auch 6 Wochen nach Beginn der Therapie eine Stuhlprobe abzugeben. In dem Stuhl wird molekularbiologisch die Menge der Bakterien vor und nach der Therapie verglichen. Um optimale Ergebnisse zu erzielen, bitten wir Sie die Proben gekühlt zu lagern bzw. uns möglichst schnell zukommen zu lassen.

Zu Beginn der Therapie kann dies natürlich in der behandelnden Klinik erfolgen. Sollte es nicht möglich sein, stellen wir Ihnen Probenröhrchen und Versandboxen mit unserer Adresse und Porto zur Verfügung, damit sie zu hause die Probe nehmen und dann an uns versenden können. Die zweite Stuhlprobe kann am Vortag oder am Morgen Ihres Kontrolltermins daheim erfolgen bzw. von zu hause direkt an uns verschickt werden, falls kein Kontrolltermin vorgesehen ist. Auch hierfür stellen wir Ihnen eine Versandbox und Probenröhrchen zur Verfügung, welches Sie für den Transport oder den Versand nutzen können

Durch die Teilnahme an der Studie resultieren keine möglichen unerwünschten Wirkungen oder Risiken, da kein Eingriff in die Therapie erfolgt. Die studienbedingten Maßnahmen nehmen jeweils einen Zeitraum von ca. 10 Minuten in Anspruch.

Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig. Sie können Ihr Einverständnis jederzeit, ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile für Ihre weitere medizinische Versorgung, zurückziehen. Bei Rücktritt von der Studie kann auf Wunsch bereits gewonnenes Daten-/Probenmaterial vernichtet werden. Sie können sich beim Ausscheiden aus der Studie entscheiden, ob Sie mit der Auswertung des Materials bzw. Ihrer Studiendaten einverstanden sind oder nicht. Sollten Sie zu einem späteren Zeitpunkt Ihre Entscheidung ändern wollen, setzen Sie sich bitte mit dem Studienarzt in Verbindung.

Während der Studie werden medizinische Befunde von Ihnen erhoben und in der Prüfstelle in Ihrer persönlichen Akte niedergeschrieben und/oder elektronisch gespeichert. Die für die Studie wichtigen Daten werden zusätzlich in pseudonymisierter Form gespeichert, ausgewertet und gegebenenfalls weitergegeben. Die Daten sind gegen unbefugten Zugriff gesichert. Die Daten werden zum Aufbau eines Registers genutzt. Die zukünftige Nutzung dieses Registers erfolgt nur durch das Studienpersonal zur Auswertung der Bakterienzusammensetzung des Stuhls und ist auf maximal zehn Jahre nach Studienbeginn begrenzt. Nach Beendigung der Studie werden die Daten gelöscht.

Für Rückfragen stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung:

Maren Bechberger	06221 56 34961	maren.bechberger@med.uni-heidelberg.de
Dr. Konrad Bode	06221 56 38920	konrad.bode@labor-limbach.de

9.3 Appendix 3 – Studie Untersuchung des Einflusses von immunsuppressiven Substanzen auf die Bakterienzusammensetzung im Darm – Patienteninformation Eltern



Universitätsklinikum Heidelberg

Zentrum für Infektiologie
Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Im Neuenheimer Feld 324
D-69120 Heidelberg

Heidelberg, den 12.02.2018

PATIENTENINFORMATION zur Studie Untersuchung des Einflusses von immunsuppressiven Substanzen auf die Bakterienzusammensetzung im Darm

Liebe/r Erziehungsberechtigte/r,

Ihr Kind wurde für diese Studie ausgewählt, da es eine Therapie mit dem Medikament Kineret® (Wirkstoff Anakinra) bzw. Ilaris® (Wirkstoff Canakinumab) beginnt. Diese Medikamente wirken einem Botenstoff des Immunsystems, IL-1 entgegen, damit aus einer übersteigerten Immunreaktion wieder eine normale wird. Uns ist es im Mausmodell gelungen zu zeigen, dass IL-1 Knock Out Mäuse, also solche Mäuse, die kein IL-1 produzieren können, ein erhöhtes Vorkommen einer bestimmten Gruppe von Bakterien im Stuhl zeigen, für die es Hinweise gibt, dass sie einen positiven Einfluss auf die Gesundheit besitzen.

Um zu untersuchen, ob diese Bakterien wie zu erwarten unter einer Therapie mit den oben genannten Medikamenten vermehrt nachgewiesen werden können, bitten wir jeweils vor Beginn Ihrer Therapie mit Kineret® oder Ilaris®, als auch 6 Wochen nach Beginn der Therapie um die Abgabe einer Stuhlprobe. In dem Stuhl wird molekularbiologisch die Menge der Bakterien vor und nach der Therapie verglichen. Um optimale Ergebnisse zu erzielen, bitten wir Sie die Proben gekühlt zu lagern bzw. uns möglichst schnell zukommen zu lassen.

Zu Beginn der Therapie kann dies natürlich in der behandelnden Klinik erfolgen. Sollte es nicht möglich sein, stellen wir Ihnen geeignete Proberöhrchen und Versandboxen mit unserer Adresse und Porto zur Verfügung, damit Sie zu Hause die Probe nehmen und dann an uns versenden können. Die zweite Stuhlprobe kann am Vortag oder am Morgen des Kontrolltermins daheim erfolgen bzw. von zu Hause direkt an uns verschickt werden, falls kein Kontrolltermin vorgesehen ist. Auch hierfür stellen wir Ihnen eine Versandbox und Proberöhrchen zur Verfügung, welches Sie für den Transport oder den Versand nutzen können.

Durch die Teilnahme an der Studie resultieren keine möglichen unerwünschten Wirkungen oder Risiken, da kein Eingriff in die Therapie erfolgt. Die studienbedingten Maßnahmen nehmen jeweils einen Zeitraum von ca. 10 Minuten in Anspruch.

Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig. Sie können Ihr Einverständnis jederzeit, ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile für Ihre weitere medizinische Versorgung, zurückziehen. Bei Rücktritt

von der Studie kann auf Wunsch bereits gewonnenes Daten-/Probenmaterial vernichtet werden. Sie können sich beim Ausscheiden aus der Studie entscheiden, ob Sie mit der Auswertung des Materials bzw. der Studiendaten Ihres Kindes einverstanden sind oder nicht. Sollten Sie zu einem späteren Zeitpunkt Ihre Entscheidung ändern wollen, setzen Sie sich bitte mit dem Studienarzt in Verbindung. Während der Studie werden medizinische Befunde von Ihrem Kind erhoben und in der Prüfstelle in seiner persönlichen Akte niedergeschrieben und/oder elektronisch gespeichert. Die für die Studie wichtigen Daten werden zusätzlich in pseudonymisierter Form gespeichert, ausgewertet und gegebenenfalls weitergegeben. Die Daten sind gegen unbefugten Zugriff gesichert. Die Daten werden zum Aufbau eines Registers genutzt. Die zukünftige Nutzung dieses Registers erfolgt nur durch das Studienpersonal zur Auswertung der Bakterienzusammensetzung des Stuhls und ist auf maximal zehn Jahre nach Studienbeginn begrenzt. Nach Beendigung der Studie werden die Daten gelöscht.

Für Rückfragen stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung:

Maren Bechberger	06221 56 34961	maren.bechberger@med.uni-heidelberg.de
Dr. Konrad Bode	06221 56 38920	konrad.bode@labor-limbach.de

9.4 Appendix 4 – Studie Untersuchung des Einflusses von immunsuppressiven Substanzen auf die Bakterienzusammensetzung im Darm – Fragebogen für Teilnehmer



UniversitätsKlinikum Heidelberg

FRAGEBOGEN für Teilnehmer an der Studie Untersuchung des Einflusses von immunsuppressiven Substanzen auf die Bakterienzusammensetzung im Darm

1. Basisdaten:

Name: _____ Vorname: _____ Geboren: _____

Studienpseudonym (wird von Studienpersonal ausgefüllt): _____

Datum und Art der Probengewinnung: _____

Größe: _____ Gewicht: _____

Herkunft: _____

Auslandsaufenthalte (>4 Wochen): _____

Stuhlgewohnheiten (Häufigkeit): _____

Spezielle Diäten: vegetarisch vegan

Allergien/Unverträglichkeiten: _____

2. Erkrankungen/Operationen:

Leiden oder litten Sie an einer Erkrankung?

Grunderkrankung: _____

Sonstige Erkrankung: _____

Bösartige Tumorerkrankungen: _____

Akute Gastroenteritis (Durchfallerkrankung):

in den letzten 4 Wochen in den letzten 8 Wochen

zum jetzigen Zeitpunkt nein

Voroperationen an Magen oder Darm: _____

Bestrahlungstherapie an Magen oder Darm: ja nein

3. Medikamente:

Nehmen oder nahmen Sie eines der folgenden Präparate ein?

Antibiotika (Name): _____

in den letzten 4 Wochen Regelmäßig, mind. 3 mal pro Jahr

zum jetzigen Zeitpunkt nein

Glucocorticoide („Cortison“): ja nein

Andere Medikamente: _____

Appendix

Appendix 5 – Studie Untersuchung des Einflusses von immunsuppressiven Substanzen auf die Bakterienzusammensetzung im Darm – Einwilligungserklärung für Teilnehmer

9.5 Appendix 5 – Studie Untersuchung des Einflusses von immunsuppressiven Substanzen auf die Bakterienzusammensetzung im Darm – Einwilligungserklärung für Teilnehmer



UniversitätsKlinikum Heidelberg

EINWILLIGUNGSERKLÄRUNG für Teilnehmer an der Studie Untersuchung des Einflusses von immunsuppressiven Substanzen auf die Bakterienzusammensetzung im Darm

Erhalt Patienteninformation: ja nein

Mit meiner Unterschrift bestätige ich, dass ich über den Inhalt der Studie sowohl schriftlich als auch mündlich ausreichend aufgeklärt wurde. Eventuelle Fragen konnten im Aufklärungsgespräch beantwortet werden. Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig. Das Einverständnis kann jederzeit, ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile für die weitere medizinische Versorgung, zurückgezogen werden.

Bei Rücktritt von der Studie bin ich mit der Auswertung meines (Daten-) Materials einverstanden ja nein

Sollten sich durch die Analyse meiner Daten für meine Gesundheit relevante Zufallsbefunde ergeben möchte ich darüber informiert werden nicht darüber informiert werden.

Ich wurde darüber aufgeklärt und stimme zu, dass meine in der Studie erhobenen Daten in pseudonymisierter Form aufgezeichnet, ausgewertet und ggf. auch in pseudonymisierter Form weitergegeben werden können. Dritte erhalten jedoch keinen Einblick in personenbezogene Unterlagen. Bei der Veröffentlichung von Ergebnissen der Studie wird mein Name ebenfalls nicht genannt.

Ort, Datum

Unterschrift Studienteilnehmer

Name in Druckbuchstaben

Ort, Datum

Unterschrift aufklärender Arzt

Name in Druckbuchstaben

Version 1 (09.10.2014)

9.6 Appendix 6 – Studie Untersuchung des Einflusses von immunsuppressiven Substanzen auf die Bakterienzusammensetzung im Darm – Einwilligungserklärung für Jugendliche



UniversitätsKlinikum Heidelberg

EINWILLIGUNGSERKLÄRUNG für Teilnehmer (13-17 Jahre) und Erziehungsberechtigte bzw. gesetzliche Vertreter der Teilnehmer an der Studie Untersuchung des Einflusses von immunsuppressiven Substanzen auf die Bakterienzusammensetzung im Darm

Erhalt Patienteninformation: ja nein

Mit meiner Unterschrift bestätige ich, dass ich über den Inhalt der Studie sowohl schriftlich als auch mündlich ausreichend aufgeklärt wurde. Eventuelle Fragen konnten im Aufklärungsgespräch beantwortet werden. Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig. Das Einverständnis kann jederzeit, ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile für die weitere medizinische Versorgung, zurückgezogen werden.

Bei Rücktritt von der Studie bin ich mit der Auswertung meines (Daten-) Materials einverstanden ja nein

Sollten sich durch die Analyse meiner Daten für meine Gesundheit relevante Zufallsbefunde ergeben möchte ich darüber informiert werden nicht darüber informiert werden.

Ich wurde darüber aufgeklärt und stimme zu, dass die in der Studie erhobenen Daten in pseudonymisierter Form aufgezeichnet, ausgewertet und ggf. auch in pseudonymisierter Form weitergegeben werden können. Dritte erhalten jedoch keinen Einblick in personenbezogene Unterlagen. Bei der Veröffentlichung von Ergebnissen der Studie wird der Name des Studienteilnehmers ebenfalls nicht genannt.

Ort, Datum

Unterschrift Studienteilnehmer

Name in Druckbuchstaben

Appendix

Appendix 6 – Studie Untersuchung des Einflusses von immunsuppressiven Substanzen auf die Bakterienzusammensetzung im Darm – Einwilligungserklärung für Jugendliche

Ort, Datum

Unterschrift beider Erziehungsberechtigten bzw. gesetzlicher Vertreter

Name in Druckbuchstaben

Ort, Datum

Unterschrift aufklärender Arzt

Name in Druckbuchstaben

9.7 Appendix 7 – Studie Untersuchung des Einflusses von immunsuppressiven Substanzen auf die Bakterienzusammensetzung im Darm – Einwilligungserklärung für Eltern



UniversitätsKlinikum Heidelberg

EINWILLIGUNGSERKLÄRUNG für Erziehungsberechtigte bzw. gesetzliche Vertreter der Teilnehmer an der Studie Untersuchung des Einflusses von immunsuppressiven Substanzen auf die Bakterienzusammensetzung im Darm

Erhalt Patienteninformation: ja nein

Mit meiner Unterschrift bestätige ich, dass ich über den Inhalt der Studie sowohl schriftlich als auch mündlich ausreichend aufgeklärt wurde. Eventuelle Fragen konnten im Aufklärungsgespräch beantwortet werden. Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig. Das Einverständnis kann jederzeit, ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile für die weitere medizinische Versorgung, zurückgezogen werden.

Bei Rücktritt von der Studie bin ich mit der Auswertung des (Daten-) Materials einverstanden
 ja nein

Sollten sich durch die Analyse der Daten für die Gesundheit meines Kindes relevante Zufallsbefunde ergeben möchte ich

darüber informiert werden nicht darüber informiert werden.

Ich wurde darüber aufgeklärt und stimme zu, dass die in der Studie erhobenen Daten in pseudonymisierter Form aufgezeichnet, ausgewertet und ggf. auch in pseudonymisierter Form weitergegeben werden können. Dritte erhalten jedoch keinen Einblick in personenbezogene Unterlagen. Bei der Veröffentlichung von Ergebnissen der Studie wird der Name des Kindes ebenfalls nicht genannt.

Ort, Datum

Unterschrift beider Erziehungsberechtigten bzw. gesetzliche Vertreter

Name in Druckbuchstaben

Version 3 (12.02.2018)

Appendix

Appendix 7 – Studie Untersuchung des Einflusses von immunsuppressiven Substanzen auf die Bakterienzusammensetzung im Darm – Einwilligungserklärung für Eltern

Ort, Datum

Unterschrift aufklärender Arzt

Name in Druckbuchstaben

Appendix

Appendix 8 – Next Generation Sequencing IL-1 β knockout Mäuse versus littermate Wildtyp Kontrollen, statistisch signifikante Ergebnisse

9.8 Appendix 8 – Next Generation Sequencing IL-1 β knockout Mäuse versus littermate Wildtyp Kontrollen, statistisch signifikante Ergebnisse

Tabelle 12: Ergebnisse des Next Generation Sequencings mit DNA aus Fäzes von IL-1 β knockout Tieren und littermate Wildtyp Kontrollen. In dieser Tabelle sind die statistisch signifikanten Unterschiede aus dem Next Generation Sequencing mit DNA aus Fäzes von vier IL-1 β knockout Mäusen und fünf littermate Wildtyp Mäusen zusammengeführt. Die statistische Signifikanz wurde mittels Student’s T-Test ermittelt. Als statistisch signifikant wurde ein $p < 0,05$ gewertet. Adaptiert und modifiziert, nachgedruckt mit Genehmigung von Brill/Wageningen Academic Publishers/Beneficial Microbes: Bechberger, M., Eigenbrod, T., Boutin, S., Heeg, K. und Bode, K. A. (2023). **IL-1 β knockout increases the intestinal abundancy of *Akkermansia muciniphila*.** Beneficial Microbes, 1-10, doi: <https://doi.org/10.1163/18762891-20220042>. (Bechberger et al. 2023)

log2 Fold Change	pvalue	padj	Phylum	Class	Order	Family	Genus
8,8	1,24E-08	3,68E-07	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae_NK4A136_group
7,4	2,23E-03	2,00E-02	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae_NK4A136_group
7,2	3,10E-03	2,30E-02	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	Flavonifractor
6,4	5,50E-03	3,26E-02	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	A2
6,0	2,60E-03	2,11E-02	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiales_vadinBB60_group	NA
5,8	4,03E-03	2,56E-02	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	
5,5	4,55E-05	6,75E-04	Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Akkermansiaceae	Akkermansia
-4,8	8,08E-04	1,03E-02	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae_NK4A136_group
-6,0	3,67E-03	2,51E-02	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	NA
-6,2	2,24E-03	2,00E-02	Patescibacteria	Saccharimonadia	Saccharimonadales	Saccharimonadaceae	Candidatus_Saccharimonas
-6,5	1,71E-03	1,90E-02	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Ruminococcaceae	NA
-7,6	4,99E-06	8,88E-05	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae_NK4A136_group
-9,3	6,90E-07	1,53E-05	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	Lachnospiraceae_NK4A136_group
-20,0	5,95E-10	2,65E-08	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Lachnospiraceae	NA

Appendix

Appendix 9 – Genexpressionsanalyse von Mucosascrapings von IL-1 β knockout Mäusen versus littermate Wildtyp Kontrollen, statistisch signifikante Ergebnisse mit fold changes ≥ 2 oder $< 0,5$

9.9 Appendix 9 – Genexpressionsanalyse von Mucosascrapings von IL-1 β knockout

Mäusen versus littermate Wildtyp Kontrollen, statistisch signifikante Ergebnisse mit fold changes ≥ 2 oder $< 0,5$

Tabelle 13: Ergebnisse der Genexpressionsanalyse mit mRNA aus Mucosascrapings von IL-1 β knockout Tieren und littermate Wildtyp Kontrollen. Mit RNA aus Scrapings des Colons von IL-1 β knockout Mäusen sowie littermate Wildtyp Kontrollen wurde ein Expressionsprofiling durch die DKFZ-Genomics and Proteomics Core Facility (TP3, DKFZ, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Die Daten wurden quantitativ normalisiert und statistisch mit Hilfe der Chipster Analysis Software analysiert. Probenanzahl n=2 pro Gruppe. Als statistisch signifikant wurde ein $p < 0,05$ nach Anwendung des Student's T-Test gewertet. In dieser Tabelle sind die Ergebnisse mit fold-change ≥ 2 oder $\leq 0,5$ aufgeführt. Adaptiert und modifiziert, nachgedruckt mit Genehmigung von Brill/Wageningen Academic Publishers/Beneficial Microbes: Bechberger, M., Eigenbrod, T., Boutin, S., Heeg, K. und Bode, K. A. (2023). **IL-1 β knockout increases the intestinal abundance of *Akkermansia muciniphila*.** Beneficial Microbes, 1-10, doi: <https://doi.org/10.1163/18762891-20220042>. (Bechberger et al. 2023)

fold-change	Symbol	Probe_Sequence
7,77513868	Cd74	TTGAGACTGGTGTCTGTTTCATCGTCCCAGGACACGGCAAATGAAGTCAG
5,89353343	H2-Aa	CTGAATTTTGTCTTCTGTCATCTTCCAAGTTACATCTACTGCAGACTCTC
5,62695227	H2-Ab1	CCAGTTCATGGGCGAGTGCTACTTCCACACGGGACGCAGCGCATAACGAT
4,99246897	Cd74	ACAGAAGGAGGACGCTGGAGGGCCTTGCTGGCTACCGCTATCTAAAGGGA
4,92743623	Osr2	CTCTAGAAAAGCCACACTACCCCTTCCAAACCAGCATGTGCTAGATCC
4,76323494	H2-Ab1	TCTCAGACTGTAAGACCTGAATGTCTCTGCTCCGAATTCCTGACTGCCAG
4,74721323	Osr2	GAGCTCTGTACATAATATTGTGGGTCTTCGTCCGGTCTGTCTGTCTGTTT
4,69256677	H2-Ab1	CTGAGTCTGCCTGGAGCAAATGTTGAGCGGCATCGGGGGCTGCGTGCTT
4,3671752	LOC641240	CTGCTTCGAATTCCTGACTGCCAGTCTACCTGCCACTCCGACTCAGAGTC
4,28519179	H2-Eb1	GTCTCCATGCCATGAAAACATGTCTGCTTGCCCCACATCCCTCCAGAGA
4,21521092	Indo	GCTCTCTGAGTTGGCCTTAGTGTAGCAAGCTCCACTTCTATCAGGGCAC
3,85977486	Osta	GGCTGGCAGCTCCATGTGACTATAGGGATGAAGGTAAGTGCAAGTGGGT
3,55384581	Hoxb7	GGAGCCCTGAGGATCCACTAGCTTCTGCGTCTGGTGCAATTTGGCTGCTG
3,46137832	Cd74	TTCCGTCCTCAAGTGCAGCAGAGAACGGTAACATTTGCCACTCCAGTGCCA
3,43229583	Igh-VJ558	CACCCAGAAGACCATCGACCGTCTGTCGGGTAACCACCAATGTCAGCGG
3,40156418	Hoxb7	CGGAAGGACATTATCTACCTGTTCTGTGGCTTTCTGGAATGTGCCTCCCC
3,18229355	H2-DMb1	CTTCAGGACACCCACTTTCTGTGTCATACTGCCTTATTAGGTCCCC
2,98916074	Prkg2	CTCCAGGGCTCCTTAGACACCAGGGATCTTTACAGCATCCTTAAGTGGGG
2,97272145	Hoxb5	AGTGAGCGGGTGGATGCTGTGCTACGTGTGAAATCTGCTTTGCCAGGCC
2,94116127	Hkdc1	CCAGGTACTGTTTATCATTATCATGTGACACAGTAGGTGTCGCTGTTTTCTG
2,93770358	Amn	CTAGGCTTCTAACCTGTGGACTGTTACCCCTCGGAGACCGTACTTCT
2,9271837	LOC631037	CCCCTGCGCTTTTCTCTGAGAATATGACAGGACGGCATCCCTTTGCCT
2,88304126	Ubd	GGGGATGACCACGGGGATGCGGTGATGAGAAGCTCAAAGCCGATTTCTCT
2,87129957	Tgfb1	GGAAAGCCTTGGCATGGTTCTGTAAGCTTTGTACCGCTGGAGAAACGG
2,78406579	Cyp4b1	CCAGCTCAGCAAGCCAGTAACCTTTGTGGATGGCCGCTCTACTCTGCAG
2,75946584	Defb37	AGCATGTATTGAGAATAAAGACACCTGTGCGCTCAAGAACTGCCACGCC
2,7588761	Igk-C	GACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTACGTTGACCAAGGACGAGTA
2,69350661	Prap1	GATGAAGAAGTCCCCAGTCACGGCCATCCTGTATCGTCAGGTGCTGCA
2,68268824	LOC100047674	CCAGCACATTGTTAAACCATGGACAGATAGAGGGGGCAGAGCTGGAAC

Appendix

Appendix 9 – Genexpressionsanalyse von Mucosascrapings von IL-1 β knockout Mäusen versus littermate Wildtyp Kontrollen, statistisch signifikante Ergebnisse mit fold changes ≥ 2 oder $< 0,5$

2,67149088	Igh-VJ558	GCGTGATCAGCTGAAATCTGGAACAGGGTGACCAGTACTCTGCATGG
2,58084725	A530050D06Rik	CTGCTAAGGGACCTCAGGCACGTGCCAGCCGATTGACCCGCTACTATGTT
2,57549933	2310079G19Rik	TCCTTTTAGCTGAACTTCTTGGTGCCTTAAGGGTGTGTACTACTT
2,54447474	BC018371	TACATAAGCACCCCTCCCTGGCCTGCACTCCCGGCCAATAATTATTGTT
2,53259579	Sgk2	GGCTGCCAGAAACCGTCTGGTGGCTTCTTTAGTGTGCTGTAATCTCC
2,51599659	9830134K01Rik	GCCGCCCTTGCTGGTGTGGTGTGGCATTAAATAAGCGTGTGCAGTGAAG
2,50931988	Cacna1h	CCCTCCATCCCAGGCTGTCAGGCTCAGGCTTATTGACATCCATTGCT
2,48130625	Acaa1b	GTGGGCACTGGGGCATCCAATCCGGTCTCTCGGTCGAACCAAGACAGT
2,46166449	H2-DMa	TCTTCTCTGCTCCAGAGACCGTGTGCTCAGGTGACTGATTCTTCAAGG
2,43321533	Adra2a	CAACCTGTTTCTACTTATTTTAGGCAGACTGTGGAAGCCTGTGATCTG
2,37965974	Reg3b	GAACCCATCTACTGCCTTAGACCGTGTCTTCTGTGGCAGCTTGTCAAGAG
2,37809366	Mylk	TCAGGGAGTCCCGCCACTTCCAGATAGACTACGACGAAGACGGCAACTGC
2,36428689	Cyp2c65	CCAGAGTTCTGGGATTCATATATAGCCCTGCACAACTGATCTATGTCC
2,35107062	Isx	CGTGTACTTGTTCATGATGTCCATACTGAACACTGAGCATTGTGCACTTG
2,33859526	LOC100047200	CTTGGGAGGCCACCATAGAACCCTCTAATTTTTTCATAGACTCTGGCAT
2,32823573	Sgk2	GAGAGAAAGGGGAGGATGTAGGTGACCAGCACTCTGGGAGAGAGCCTCTT
2,31004983	Abcd3	ACTCGTTAGGTTTAGCCCGAGATGACTTGTGCCATGTAGCTCTGTTT
2,30907864	H2-T18	TCAAACCTACATTAGCCGTATCCCTGTACAGCCAACCTTCTGGTCC
2,30669094	Cyp2c65	TCCCAACCCAGAGAAGTTTGACCCAGTCACTTCTGGATGAGCGTGGC
2,30166659	LOC100047628	GAGCAGCACCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCT
2,29944706	Fabp6	ACCGTGAAGATGGAGGGTGGCAAGGTGGTGGCAGAGTCCCAACTATCA
2,29273072	Slc30a10	GGGTTGACACGGGAGAGCCATCCTTCTGGAGGCTGAGGTTATGTTAC
2,29259573	Aldh1a1	GAATAGAAGGATAGATATAAGCGCAAGCTCTGTAACTCCGTCATGACC
2,26877416	6430537F04	CTGTGAAGATATTTGCCCTGCGTCTTCAATTCGTTGTGTGCAACTGC
2,26771991	LOC665506	CTCTTCTCTCCATGGATATCCATCTTCTCCTGTGACACCTTGACTCT
2,25552023	Hmgcs2	TCCCAAGAAGCCACCTGTGCACTTTGGCATGAATGTTCTATCCCTCA
2,23191544	Saa3	GAGGACTCAAGAGCTGACCAGTTTGCCAAAGTGGGGCCGGAGTGCCAA
2,23187355	H2-DMb2	TCCTACGGGGACGTCTACACCTGCGTGGTTCAGCACAGCGGGACCTCTGA
2,22659061	Tph1	AGTTGCGGTATGACCTTGATGTCATCAGTATGCCCTCGTAGGGTCACC
2,22436471	Clec2e	AGCCAGCATCACCTCTCTCATGTCTCCATTTGGTTCTGGGACTGTT
2,2218078	4933428A15Rik	CCATGGCTTGATCCATCTGTAGTCTGATTGTTGCTTAATAAAGGGT
2,17768675	Mgll	AGCCCCAGTTCCTTAGAGATAGGGGAACAGCCTCCCTCCACCATGTGAGC
2,16086744	Laptm5	GTTCCCACTGTACCTGTGCTATTGCTTGTATGACTTGAAGAAGGGCC
2,15913295	LOC100047674	GCTGACGAGCGACCTTGGCTACAGGTGTCGCTCTCACACGCTTTTTT
2,14709288	Ccl5	CAACTATTGGAGATGAGCTAGGATAGAGGGTTTCTTGATTCTGACCCTG
2,13368627	H2-DMa	CCTTGGCCTCGGTGTGCTAGGCACCATATGGGCAATTGCTTCTTCTCT
2,12467634	LOC100044218	CCTCACAGAGTTTCTCCATCTTCCCTCTTCTGCAATAAAGTCCAG
2,11993577	4933439C20Rik	CCTCACACTAGGGACACCTGGGGAGATGGACATTCCAGTACAAAGAAGG
2,11656026	Zmi1	GGTGTGCCAGGTTGTCGGCTCACATGAGTCCCATCTGTAATCTTTGTC
2,1162097	Nr1h4	CAAGGCTTCAGGAAACCCCACTGGCATGCCCTTTTGGCCTAATTAATCA
2,11539981	5730559C18Rik	TCTAGACAAGTTGTTCTGTTTCTCGGCTCTCTGTCTGCTGACTACC
2,11486711	Hbb-b1	CACCACCTGGGCAAGGATTTACCCCCGCTGCACAGGCTGCCTTCCAAAA
2,10741722	Hoxb6	CCACCTTGGCCTCATCAGGCTCTCTGGTGAAGTGAAGTGGACTCAC
2,10353446	Pdk4	GCAGTGACTTTCACAGCAGGACTTGTACTCCACATTGGTTGATCACACA
2,0874729	Fmo5	GCAGGGTCTTTAATGCTTGACTCTGTTGTGTTTCTAGCACTGCACAGC
2,08731717	B930090K24Rik	CCAGCGCATTAAAGCTCCCTTAGCCAACCTCCACACATTCACACTGTGAGC
2,06655279	Pcsk5	CGAAGGCATTTTCCCGAGGGTATGTCAAGGGTATTAAATGCAGGAATCT

Appendix

Appendix 9 – Genexpressionsanalyse von Mucosascrapings von IL-1 β knockout Mäusen versus littermate Wildtyp Kontrollen, statistisch signifikante Ergebnisse mit fold changes ≥ 2 oder $< 0,5$

2,06610409	4833414E09Rik	CTCTGCACCCAGTCTATAGTTCTCAGACGGAGCACTGCTGTATATATAA
2,06364608	Hbb-b1	TGGCCTGAATCACTTGGACAGCCTCAAGGGCACCTTGCCAGCCTCAGTG
2,0534157	Tbx3	GGTCTTATTCCAGGTCAGGAGATGGCTAATCCACACTAGCAAGCCTAGG
2,03703232	Tcf25	CTCAGCCTGGGAACCTTAGAGGAACTGGAAGGGCTGGAAGTGTCCGAGC
2,03378343	Dcn	GTGCGTTCTGCCATTCAACTTGGAACTACAAGTAACCTCAGACGGCCT
2,02375546	4933407C03Rik	TCTTATTCGATGGAGACCATGCTTCGGTTGTTTTATACTTTGCCAGGTAA
2,01484714	Hoxd4	GGCAGGAGCTACTGAGAACATAAACCTTGGCGAGTCATAAACTCCTGA
2,0050637	Mylk	GCTGCATTGCCACTTCTCCCTGTTTCGCTTCTCTTAAGCAGTTTCAAT
0,49945475	LOC386199	GACAAAACCAAGTTCACACAATATCTTTCCACGAATCCAGCCCTTCAAGG
0,49309413	1200015F23Rik	GTCACACCTACCTACGAGGACAAAAGGAGCCAGCACAGCCCAGGTAAGT
0,48731147	LOC100043609	CTGAACAACCTGGCCTAGAGAAAACCTTCCCACTGAGACAACCTCCTCGC
0,47080278	LOC270589	ACCCAAAGCGAGGCAACGCTGGAGATAGAAACCTAGGAAGGAGATCTGG
0,46900878	LOC386256	CCAACACTGTCACCTCAGCCAGTCTGGGCACCCCAACATACCCAAAAAG
0,43551761	Insl5	CCATGAAGGAACTCAGCACCTCTGTTAGGATGCGCCCAACCCCTTGGA
0,41638234	Saa1	GCTCAGTAGGTTGTGCTGGGGCCTGAGGGTGGGTCTGGGCTTCTTCT
0,34244771	Svs4	CCTGGATGGCATTACTTCCATGCTTGTGTTGCTTGGAGTTCTTAAACC
0,31154947	Ppp1r14d	CCTGACCTGGATACTGGCTGAAAAGTCTTGGATATGGACAAGGGCTGCAG
0,25956407	Retnlb	CCCCTGATAGTCCCAGGGAACGCGCAATGCTCCTTTGAGTCTTGGTGG
0,20415195	Ang4	CCTGCCACTTCGATGAGTCTTTATCAGTCCGTAGACAGCAGGCCCTG

Appendix

Appendix 10 – Next Generation Sequencing Tierversuch Rituximab versus Placebo, statistisch signifikante Ergebnisse

9.10 Appendix 10 – Next Generation Sequencing Tierversuch Rituximab versus Placebo, statistisch signifikante Ergebnisse

Tabelle 14: Ergebnisse des Next Generation Sequencings mit DNA aus Fäzes des Tierversuchs mit Rituximab versus Placebo. In dieser Tabelle sind die statistisch signifikanten Unterschiede aus dem Next Generation Sequencing mit DNA aus Fäzes von sechs mit Placebo behandelten und fünf mit Rituximab behandelten Tieren zusammengeführt. Angegeben ist die letzte mögliche Zuordnungsstufe nach Analyse durch die CLC Biomedical Workbench (Version 4.0) unter Zuhilfenahme der Datenbank Greengenes (Version 13.0) zur Zuordnung der Sequenzen. Anschließend fand noch ein BLASTing über die NCBI (National Center of Biotechnology Information) Datenbank statt. Weitere Angaben beziehen sich auf das prozentuale Vorkommen der gefundenen Bakterien in den Versuchsgruppen sowie den log2foldchange und die Signifikanz der Ergebnisse durch Anwendung des Student's T-Test. Als statistisch signifikant wurde ein $p < 0,05$ gewertet. **MW** = Mittelwert; **o** = Ordnung; **f** = Familie; **g** = Gattung; **s** = Spezies

Taxonomie – letzte Stufe der möglichen Zuordnung	% Abundance MW Placebo	% Abundance MW Verum	log2 fold change % abundance	pvalue
g_Eisenbergiella	0,0016	0,2500	7,2718	0,0142
s_Ruminococcus gnavus	0,0220	1,0368	5,5555	0,0077
s_Ruminococcus gnavus	0,0050	0,2138	5,4081	0,0278
g_Roseburia	0,3260	4,5221	3,7939	0,0296
g_Roseburia	0,0179	0,2171	3,5982	0,0294
g_Lachnospiraceae	0,0016	0,0153	3,2235	0,0196
g_Roseburia	0,0085	0,0565	2,7366	0,0240
f_Lachnospiraceae	0,0234	0,1414	2,5960	0,0138
f_Lachnospiraceae	0,2676	1,6047	2,5840	0,0114
f_Lachnospiraceae	0,0313	0,1590	2,3462	0,0378
g_Lachnospiraceae	0,0245	0,1158	2,2431	0,0350
f_Lachnospiraceae	0,0086	0,0405	2,2348	0,0406
f_Lachnospiraceae	0,0357	0,1594	2,1584	0,0171
g_Kineothrix	0,0277	0,1002	1,8563	0,0136
s_Ruminococcus gnavus	0,1317	0,4516	1,7774	0,0067
f_Lachnospiraceae	0,0193	0,0630	1,7069	0,0190
g_Ruminococcus	0,1475	0,4790	1,6998	0,0163
g_Kineothrix	0,0552	0,1743	1,6597	0,0107
f_Lachnospiraceae	0,1246	0,3906	1,6489	0,0272
s_Waltera intestinalis	0,7101	2,2125	1,6395	0,0473
g_Ruminococcus	0,0147	0,0437	1,5676	0,0289
g_Coproccoccus	0,0375	0,0947	1,3358	0,0189
f_Lachnospiraceae	0,0655	0,1646	1,3287	0,0455
g_Roseburia	0,0704	0,1713	1,2835	0,0322
g_Eisenbergiella	0,1849	0,4469	1,2734	0,0350
f_Lachnospiraceae	0,0426	0,1030	1,2733	0,0375
f_Lachnospiraceae	0,1766	0,4079	1,2081	0,0249
f_Lachnospiraceae	0,1179	0,2652	1,1700	0,0193
s_Desulfovibrio C21_c20	0,2569	0,5454	1,0858	0,0074
f_Lachnospiraceae	0,0913	0,1832	1,0046	0,0096
f_Ruminococcaceae	0,3080	0,1265	-1,2840	0,0226

Appendix

Appendix 10 – Next Generation Sequencing Tierversuch Rituximab versus Placebo, statistisch signifikante Ergebnisse

g_Bacteroides	1,1963	0,4248	-1,4936	0,0419
g_Bacteroides	3,0400	0,9649	-1,6556	0,0206
f_Muribaculaceae	0,9794	0,3091	-1,6639	0,0390
f_Muribaculaceae	0,3950	0,1019	-1,9551	0,0448
f_Ruminococcaceae	0,6890	0,1747	-1,9795	0,0265
g_Prevotella	1,9782	0,4870	-2,0221	0,0156
g_Lactobacillus	0,5144	0,1236	-2,0569	0,0098
f_Muribaculaceae	0,5840	0,1394	-2,0671	0,0400
f_Muribaculaceae	0,1423	0,0339	-2,0720	0,0494
f_Clostridiaceae	0,0450	0,0095	-2,2498	0,0287
f_Muribaculaceae	0,0346	0,0026	-3,7547	0,0382
f_Clostridiaceae	0,0260	0,0018	-3,8693	0,0349
o_Clostridiales	0,0563	0,0026	-4,4581	0,0215
g_Clostridium	0,0416	0,0000		0,0101
s_Coproccoccus catus	0,0364	0,0000		0,0056
o_Clostridiales	0,0379	0,0000		0,0396
g_Coproccoccus	0,0201	0,0000		0,0396
o_Clostridiales	0,0095	0,0000		0,0306
f_Muribaculaceae	0,0097	0,0000		0,0380
s_Ruminococcus flavefaciens	0,0000	0,1824		0,0295
s_Ruminococcus flavefaciens	0,0000	0,1808		0,0249
f_Lachnospiraceae	0,0000	0,0677		0,0237
o_Clostridiales	0,0000	0,0582		0,0492
f_Ruminococcaceae	0,0000	0,0286		0,0351
g_Ruminococcus	0,0000	0,0266		0,0007
g_Lachnobacterium	0,0000	0,0118		0,0459
o_Clostridiales	0,0000	0,0100		0,0452
g_Oscillospira	0,0000	0,0051		0,0241
o_Clostridiales	0,0000	0,0060		0,0297

Appendix

Appendix 11 – Next Generation Sequencing Stuhlproben Patienten unter Rituximab Therapie, statistisch signifikante Ergebnisse aller eingeschlossenen Patienten

9.11 Appendix 11 – Next Generation Sequencing Stuhlproben Patienten unter Rituximab Therapie, statistisch signifikante Ergebnisse aller eingeschlossenen Patienten

Tabelle 15: Ergebnisse des Next Generation Sequencings mit DNA aus Fäzes von Patienten unter Rituximab Therapie. In dieser Tabelle sind die statistisch signifikanten Unterschiede aus dem Next Generation Sequencing mit DNA aus Fäzes von sieben mit Rituximab behandelten Patienten vor und sechs Wochen nach Beginn der Therapie zusammengeführt. Angegeben ist die letzte mögliche Zuordnungsstufe nach Analyse durch die CLC Biomedical Workbench (Version 4.0) unter Zuhilfenahme der Datenbank Greengenes (Version 13.0) zur Zuordnung der Sequenzen. Anschließend fand teilweise noch ein BLASTing über die NCBI (National Center of Biotechnology Information) Datenbank statt. Weitere Angaben beziehen sich auf das prozentuale Vorkommen der gefundenen Bakterien in den Versuchsgruppen sowie den log2foldchange und die Signifikanz der Ergebnisse durch Anwendung des Student's T-Test. Als statistisch signifikant wurde ein $p < 0,05$ gewertet. **MW** = Mittelwert; **o** = Ordnung; **f** = Familie; **g** = Gattung; **s** = Spezies

Taxonomie – letzt Stufe der möglichen Zuordnung	% Abundance MW vorher	% Abundance MW nachher	log2 fold change % abundance	pvalue
g_Agathobacter	0,0042	0,0109	1,3729	0,0417
f_Ruminococcaceae	0,0236	0,0674	1,5130	0,0242
f_Lachnospiraceae	0,0213	0,0764	1,8398	0,0115
s_Faecalibacterium prausnitzii	0,0002	0,0014	2,8261	0,0313
f_Lachnospiraceae	0,0001	0,0008	3,0068	0,0478
g_Roseburia	0,0001	0,0020	4,4101	0,0217
f_Ruminococcaceae	0,0001	0,0023	4,6259	0,0276
g_Roseburia	0,0000	0,0009		0,0069
f_Lachnospiraceae	0,0000	0,0019		0,0151
s_Faecalibacterium prausnitzii	0,0000	0,0006		0,0449
f_Ruminococcaceae	0,0000	0,0008		0,0498
g_Roseburia	0,0000	0,0008		0,0267

Appendix

Appendix 12 – Next Generation Sequencing Stuhlproben Patienten unter Rituximab Therapie, statistisch signifikante Ergebnisse der eingeschlossenen Patienten unter Rituximab Monotherapie

9.12 Appendix 12 – Next Generation Sequencing Stuhlproben Patienten unter Rituximab Therapie, statistisch signifikante Ergebnisse der eingeschlossenen Patienten unter Rituximab Monotherapie

Tabelle 16: Ergebnisse des Next Generation Sequencings mit DNA aus Fäzes von Patienten unter Rituximab Monotherapie. In dieser Tabelle sind die statistisch signifikanten Unterschiede aus dem Next Generation Sequencing mit DNA aus Fäzes von drei mit Rituximab behandelten Patienten vor und sechs Wochen nach Beginn der Monotherapie zusammengeführt. Angegeben ist die letzte mögliche Zuordnungsstufe nach Analyse durch die CLC Biomedical Workbench (Version 4.0) unter Zuhilfenahme der Datenbank Greengenes (Version 13.0) zur Zuordnung der Sequenzen. Anschließend fand teilweise noch ein BLASTing über die NCBI (National Center of Biotechnology Information) Datenbank statt. Weitere Angaben beziehen sich auf das prozentuale Vorkommen der gefundenen Bakterien in den Versuchsgruppen sowie den log2foldchange und die Signifikanz der Ergebnisse durch Anwendung des Student's T-Test. Als statistisch signifikant wurde ein $p < 0,05$ gewertet. **MW** = Mittelwert; **o** = Ordnung; **f** = Familie; **g** = Gattung; **s** = Spezies

Taxonomie – letzte Stufe der möglichen Zuordnung	% Abundance MW vorher	% Abundance MW nachher	log2 fold change % abundance	pvalue
g_Ruminococcus	0,0021	0,0003	-2,6070	0,0324
f_Ruminococcaceae	0,0021	0,0003	-2,5991	0,0080
s_Streptococcus mutans	0,0019	0,0009	-1,1006	0,0351
g_Oscillospira	0,0066	0,0177	1,4306	0,0306
f_Lachnospiraceae	0,0038	0,0103	1,4379	0,0229
f_Lachnospiraceae	0,0023	0,0076	1,7156	0,0152
g_Oscillospira	0,0056	0,0219	1,9789	0,0469
g_Roseburia	0,0025	0,0105	2,0443	0,0039
g_Roseburia	0,0004	0,0019	2,0869	0,0435
g_Roseburia	0,0047	0,0222	2,2258	0,0306
g_Roseburia	0,0002	0,0017	2,9162	0,0228
g_Roseburia	0,0031	0,0280	3,1560	0,0006
g_Roseburia	0,0014	0,0145	3,4220	0,0294
f_Ruminococcaceae	0	0,0046		0,0005
f_Lachnospiraceae	0	0,0031		0,0157
f_Lachnospiraceae	0	0,0017		0,0062
g_Lachnospira	0	0,0034		0,0077
g_Blautia	0	0,0021		0,0297
s_Agathobacter faecis	0	0,0010		0,0297
g_Blautia	0	0,0033		0,0271
f_Lachnospiraceae	0	0,0040		0,0160
f_Lachnospiraceae	0	0,0009		0,0089
g_Blautia	0	0,0007		0,0161
f_Lachnospiraceae	0	0,0016		0,0457
s_Faecalibacterium prausnitzii	0	0,0017		0,0089
s_Faecalibacterium prausnitzii	0	0,0016		0,0422
s_Faecalibacterium prausnitzii	0	0,0007		0,0161

Appendix

Appendix 13 – Next Generation Sequencing Tierversuch Ciclosporin versus Placebo, statistisch signifikante Ergebnisse mit log2 fold changes zwischen -2,5 und 2,5

9.13 Appendix 13 – Next Generation Sequencing Tierversuch Ciclosporin versus Placebo, statistisch signifikante Ergebnisse mit log2 fold changes zwischen -2,5 und 2,5

Tabelle 17: Ergebnisse des Next Generation Sequencings mit DNA aus Fäzes des Tierversuchs mit Ciclosporin versus Placebo. In dieser Tabelle sind die statistisch signifikanten Unterschiede aus dem Next Generation Sequencing mit DNA von fünf mit Placebo behandelten und sechs mit Ciclosporin behandelten Tieren zusammengeführt, bei denen ein log2 fold change zwischen -2,5 und 2,5 festgestellt wurde. Angegeben ist die letzte mögliche Zuordnungsstufe nach Analyse durch die CLC Biomedical Workbench (Version 4.0) unter zu Hilfenahme der Datenbank Greengenes (Version 13.0) zur Zuordnung der Sequenzen. Weitere Angaben beziehen sich auf das prozentuale Vorkommen der gefunden Bakterien in den Versuchsgruppen sowie den log2 fold change und die Signifikanz der Ergebnisse durch Anwendung des Student's T-Test. Als statistisch signifikant wurde ein $p < 0,05$ gewertet. **MW** = Mittelwert; **k** = Kingdom/Reich; **p** = Phylum/Stamm ; **c** = Klasse; **o** = Ordnung; **f** = Familie; **g** = Gattung; **s** = Spezies

Taxonomie	% Abundance MW Placebo	% Abundance MW Ciclo	log2 fold change % abundance	pvalue
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__, g__, s__	0,3696	0,0679	-2,4446	0,0289
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__, g__, s__	0,1973	0,0367	-2,4277	0,0202
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__, g__, s__	0,0730	0,0137	-2,4173	0,0096
k__Bacteria, p__Actinobacteria, c__Coriobacteriia, o__Coriobacteriales, f__Coriobacteriaceae, g__Adlercreutzia, s__	0,0769	0,0150	-2,3621	0,0268
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__, g__, s__	0,2980	0,0592	-2,3312	0,0251
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__, g__, s__	0,4176	0,0883	-2,2417	0,0444
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__Ruminococcaceae, g__, s__	0,0360	0,0079	-2,1899	0,0355
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__, g__, s__	0,1005	0,0229	-2,1363	0,0330
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__Ruminococcaceae, g__Ruminococcus, s__	0,7708	0,1772	-2,1211	0,0072
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__, g__, s__	0,4791	0,1101	-2,1210	0,0276
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__, g__, s__	0,2051	0,0504	-2,0239	0,0232
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__, g__, s__	0,2380	0,0601	-1,9859	0,0093
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__, g__, s__	0,6848	0,1780	-1,9442	0,0160
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__Lachnospiraceae, g__, s__	0,1406	0,0369	-1,9289	0,0392
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__, g__, s__	0,1500	0,0410	-1,8708	0,0117
k__Bacteria, p__Proteobacteria, c__Deltaproteobacteria, o__Desulfovibrionales, f__Desulfovibrionaceae, g__Desulfovibrio, s__C21_c20	1,1093	0,3090	-1,8438	0,0203
k__Bacteria, p__Bacteroidetes, c__Bacteroidia, o__Bacteroidales, f__Bacteroidaceae, g__Bacteroides, s__	4,4787	1,2703	-1,8179	0,0212
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__, g__, s__	0,3460	0,0985	-1,8129	0,0433
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__Ruminococcaceae, g__, s__	0,0582	0,0172	-1,7627	0,0473
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__Lachnospiraceae, g__Dorea, s__	0,2440	0,0732	-1,7368	0,0158
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__Lachnospiraceae, g__Coprococcus, s__	0,1485	0,0475	-1,6448	0,0271
k__Bacteria, p__Actinobacteria, c__Coriobacteriia, o__Coriobacteriales, f__Coriobacteriaceae, g__Adlercreutzia, s__	0,1325	0,0464	-1,5130	0,0216
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__Ruminococcaceae, g__, s__	0,0761	0,0272	-1,4833	0,0142
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__, g__, s__	0,2431	0,1003	-1,2777	0,0345
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__, g__, s__	0,1379	0,0587	-1,2314	0,0428
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__Ruminococcaceae, g__Oscillospira, s__	0,1404	0,0605	-1,2153	0,0199
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__Lachnospiraceae, g__, s__	4,6997	2,4594	-0,9343	0,0447
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__Ruminococcaceae, g__Oscillospira, s__	0,5054	0,3531	-0,5172	0,0321

Appendix

Appendix 13 – Next Generation Sequencing Tierversuch Ciclosporin versus Placebo, statistisch signifikante Ergebnisse mit log2 fold changes zwischen -2,5 und 2,5

k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__Lachnospiraceae, g__, s__	0,0630	0,1318	1,0641	0,0157
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__, g__, s__	0,9515	2,1552	1,1796	0,0456
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__, g__, s__	0,4478	1,0606	1,2440	0,0413
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__, g__, s__	0,0172	0,0583	1,7631	0,0027
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__, g__, s__	0,0380	0,1452	1,9336	0,0240
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__Lachnospiraceae, g__, s__	0,0247	0,0974	1,9800	0,0417
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__, g__, s__	0,0114	0,0518	2,1844	0,0463
k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia, o__Clostridiales, f__Lachnospiraceae, g__[Ruminococcus], s__ s__gnavus	0,2410	1,1892	2,3031	0,0056
k__Bacteria, p__Bacteroidetes, c__Bacteroidia, o__Bacteroidales, f__S24-7, g__, s__	1,0780	5,9140	2,4558	0,0229
k__Bacteria, p__Bacteroidetes, c__Bacteroidia, o__Bacteroidales, f__S24-7, g__, s__	0,2391	1,3308	2,4768	0,0054
k__Bacteria, p__Bacteroidetes, c__Bacteroidia, o__Bacteroidales, f__S24-7, g__, s__	0,0519	0,2902	2,4830	0,0164

10 Curriculum vitae

PERSONALIEN

Name: Maren Bechberger
Geburtsdatum: 21.10.1988
Geburtsort: Heidelberg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

SCHULISCHER WERDEGANG

09/1995-07/1999 Mönchsbergschule St. Leon
09/1999 – 06/2008 Gymnasium Walldorf
17.06.2008 Abitur
17.06.2008 Erwerb des Graecums
17.06.2008 Erwerb des Großen Latinums
17.06.2008 Erwerb des Zertifikates des „Europäischen Gymnasiums“

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

09/2008 – 10/2012 Studium der Pharmazie an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
31.08.2010 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
11.10.2012 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
18.12.2013 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
18.12.2013 Approbation als Apothekerin

BERUFLICHER WERDEGANG

11/2012 – 04/2013 Pharmazeutin im Praktikum, Arnika-Apotheke St. Leon-Rot
05/2013 – 10/2013 Pharmazeutin im Praktikum, Apotheke des Universitätsklinikums Heidelberg

Curriculum vitae

Seit 01/2014	Apothekerin in der Apotheke des Universitätsklinikums Heidelberg
01/2014 – 11/2018	Weiterbildung zur Fachapothekerin für Klinische Pharmazie
07.11.2018	Abschluss der Weiterbildung und Anerkennung der Gebietsbezeichnung „Fachapothekerin für Klinische Pharmazie“
Seit 01/2014	Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Promotion (Dr. sc. hum.) Universitätsklinikum Heidelberg, Zentrum für Infektiologie, Abteilung Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
15.11.2021 – 19.11.2021	Teilnahme am Kurs „ABS fellow“
14.03.2022 – 18.03.2022	Teilnahme am Kurs „ABS advanced“
28.10.2022 – 29.10.2022	Teilnahme am Kurs „ABS expert“
29.10.2022	Erwerb des Titels „ABS Expertin (DGI)“
Seit 02/2023	Weiterbildung zur Fachapothekerin mit der Bereichsbezeichnung „Infektiologie“

11 Danksagung

Mein großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. Klaus Heeg für die vortreffliche Betreuung während meiner Promotionszeit und für die Möglichkeit, in seine Arbeitsgruppe zu wechseln. Auch bedanke ich mich für die gewinnbringenden Arbeitsgruppen-Besprechungen, in denen durch gemeinsames Brain Storming viele neue Aspekte aufgeworfen wurden.

Ich möchte mich bei meinem Betreuer Dr. med. Konrad Alexander Bode bedanken, der mich während der gesamten Promotionszeit als mein direkter Ansprechpartner begleitet hat und mit dem ich auch außerhalb von wissenschaftlichen Fragestellungen oft gute Gespräche führen konnte.

Ich danke Dr. rer. nat. Sébastien Boutin für die Unterstützung in der Auswertung der Next Generation Sequencings.

Mein Dank gilt der gesamten ehemaligen AG Bode sowie der AG Heeg für den stetigen wissenschaftlichen Austausch, der oft neue Lösungsansätze und Ideen brachte. Auch danke ich der gesamten Forschungsabteilung der Medizinischen Mikrobiologie und Hygiene für die Freundschaft, die vielen schönen, gemeinsamen Erlebnisse und die gute Arbeitsatmosphäre, die die Freude an der Forschung weiter gefördert haben.

Rebecca Benz, Selina Hassel sowie Delal Sahin danke ich für ihre technische Unterstützung.

Ich danke meiner gesamten Familie, besonders meinen Eltern, für die bedingungslose Liebe und Unterstützung, die sie mir in meinem Leben - auch besonders in der Promotionszeit - zukommen ließen, und dafür, dass sie mich auch in schweren Phasen immer wieder aufgefangen haben.

Meiner Schwester Daniela Merten danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit auf Rechtschreibfehler und grammatikalische Unkorrektheiten zu durchforsten.

Ich danke Herrn Dr. rer. nat. Torsten Hoppe-Tichy für die Möglichkeit, diese Dissertation am Universitätsklinikum Heidelberg durchzuführen und gleichzeitig als Apothekerin in der Apotheke des Universitätsklinikums tätig zu sein.

Mein Dank gilt auch allen meinen lieben Kollegen aus der Apotheke des Universitätsklinikums Heidelberg, mit denen es bis heute eine Freude ist zu arbeiten und die es mir ermöglichen, meine Arbeit jeden Tag mit Vergnügen anzutreten. Besonders bedanke ich mich hierbei bei meinen Kollegen, mit denen ich mir ein Büro teile: Dr. sc. hum. Eva Over, Sabine Hericks und Daniel Seebach-Schielzeth, die nicht nur immer für einen da sind, sondern mit denen man auch sehr viel Spaß im Arbeitsalltag haben kann!

Danksagung

Des Weiteren danke ich meinen Kollegen der Orthopädie und Unfallchirurgie des Universitätsklinikums in Schlierbach für die gute interdisziplinäre Zusammenarbeit und die Kooperation in vielen Forschungsthemen.

Meinen Kooperationspartnern Herrn PD Dr. Norbert Blank (Universitätsklinikum Heidelberg, Innere Medizin V - Hämatologie, Onkologie, Rheumatologie), Prof. Dr. med. Thomas Luft (Universitätsklinikum Heidelberg, Innere Medizin V - Hämatologie, Onkologie, Rheumatologie), Prof. Dr. Johannes-Peter Haas (Kinderklinik Garmisch-Partenkirchen gGmbH, Deutsches Zentrum für Kinder- und Jugendrheumatologie, Sozialpädiatrisches Zentrum) sowie Prof. Dr. Christoph Fiehn (AcuraKliniken Baden-Baden) danke ich für die Zusammenarbeit, die Rekrutierung von Patienten und die Bereitstellung von Stuhlproben.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. med. Felix Lasitschka und seiner Medizinisch-technischen Assistentin Mona Clauter der Gewebekbank für entzündliche Erkrankungen Heidelberg für die Produktion der Gewebeschnitte.

Ich danke Herrn Marshall H. Montrose, PhD und seiner Arbeitsgruppe an der University of Cincinnati für die Bereitstellung der Zelllinie HT29/18-N2 und die wertvollen Tipps im Umgang mit den Zellen.

12 Eidesstattliche Versicherung

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema „Das Immunsystem – Regelgröße zur Beeinflussung der Zusammensetzung des Mikrobioms?“ handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.
2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.
3. Die Arbeit oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.
4. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.
5. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt. Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Ort und Datum

Unterschrift