

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle der kommensalen Gastrointestinalflora
und der Rezeptoren des angeborenen
Immunsystems bei der akuten Graft-versus-Host-
Erkrankung nach bestrahlungsunabhängiger
Konditionierung im murinen
Transplantationsmodell

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Rita Plickert
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. St. Bereswill
2. Prof. Dr. med. A. Diefenbach
3. Prof. Dr. F. Gunzer

Datum der Promotion: 24.02.2012

Meinen Eltern
Monika und Volker Plickert

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung	2
1.1 Die „Graft-versus-Host-Erkrankung“ beim Menschen	2
1.2 Die Rolle der Rezeptoren des angeborenen Immunsystems bei der Pathogenese der GvHD	6
1.3 Die intestinale mikrobielle Flora bei GvHD	12
1.4 Tiermodelle zur Erforschung der GvHD.....	14
1.5 Molekulare und kulturelle Methoden zur Analyse der Intestinalflora	16
1.6 Fragestellungen, Hypothesen und Ziele	18
1.6.1 Ziele der vorliegenden Arbeit	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	21
2.1.2 Geräte und kommerzielle „Kits“	22
2.1.3 Puffer und Lösungen	22
2.1.4 Oligonukleotidprimer	23
2.1.5 DNA-Längenmarker, Enzyme	23
2.1.6 Antikörper	23
2.1.7 Material für die Tierhaltung	24
2.1.8 Nährmedien	24
2.1.9 Standardisierte Identifizierungssysteme zur mikrobiologischen Diagnostik	24
2.2 Versuchstiere	25
2.2.1 Mausstämme.....	25
2.2.2 Haltungsbedingungen.....	26
2.3 Tierversuche	26
2.3.1 Induktion der GvHD durch Konditionierung und Transplantation.....	26
2.3.2 Behandlung mit MDP und TLR9-Antagonist	27
2.3.3 Generierung und Haltung gnotobiotischer Mäuse	28
2.3.4 Probenentnahme	28
2.4 Kulturelle Analysen der Gastrointestinalflora.....	29
2.4.1 Gewichtsbestimmung des luminalen Inhaltes des Gastrointestinaltraktes.....	29
2.4.2 Kultivierung der Bakterien.....	30

2.4.3 Kulturelle aerobe Analyse	32
2.4.4 Kulturelle anaerobe Analyse	32
2.4.5 Gramfärbung	33
2.4.6 Katalase- und Oxidasetest zur mikrobiologischen Differenzierung	33
2.4.7 Bakterielle Speziesdiagnostik	34
2.4.8 Biochemische Leistungsprüfung zur Speziesdiagnostik	34
2.5 Histopathologische Beurteilung des Gastrointestinaltraktes	35
2.5.1 Herstellung und Schneiden der Paraffinblöcke	35
2.5.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	35
2.5.3 Histopathologische Beurteilung der HE-Präparate	35
2.5.4 Immunhistochemie	36
2.6 DNA-Extraktion und PCR	37
2.6.1 DNA-Extraktion	37
2.6.2 Qualitätskontrolle durch Agarose-Gel-Elektrophorese	38
2.6.3 Amplifikation der bakteriellen DNA	38
2.6.4 Aufreinigung der PCR-Produkte	39
2.7 Molekulare „Fingerprint“-Methode – Denaturierende-Gradienten-Gel-Elektrophorese	39
2.7.1 Herstellung der Polyacrylamid-Gele für die DGGE und Auftrennung der DNA	40
2.7.2 Färbung der DNA	40
2.7.3 Isolierung von DNA aus Polyacrylamid-Gelen	41
2.7.4 Sequenzierung der bakteriellen DNA	41
2.7.5 Identifizierung von Bakterienisolaten	42
2.8 Statistik	42
3. Ergebnisse	43
3.1 Das Überleben und die intestinale Entzündungsreaktion bei akuter GvHD	43
3.1.1 Überleben der Tiere bei GvHD	43
3.1.2 Kinetik der intestinalen Entzündungsreaktion bei GvHD	44
3.1.3 Analyse histochemischer Merkmale im Colon bei GvHD	47
3.1.3.1 Apoptose und Proliferation im Colon bei GvHD	47
3.1.3.2 T-Zellen, regulatorische T-Zellen und Neutrophile im Colon bei GvHD	50
3.1.4 Kulturelle Analysen der Darmflora bei GvHD	53
3.1.4.1 Veränderung der Darmflora bei GvHD bei C57BL/10-Wildtypieren	54
3.1.4.2 Veränderung der Darmflora bei GvHD bei C57BL/6-Wildtypieren	57
3.1.5 Molekulare Analyse der Darmflora durch DGGE bei GvHD	63

3.2 Einfluss der TLRs und des NOD2-Rezeptors auf die Ausbildung einer akuten GvHD	65
3.2.1 Einfluss der TLRs und des NOD2-Rezeptors auf das Überleben bei GvHD	65
3.2.2 Einfluss der TLRs und des NOD2-Rezeptores auf die gastrointestinale Entzündungsreaktion bei GvHD	66
3.2.2.1 Entzündung bei TLR2 ^{-/-} , TLR4 ^{-/-} , TLR2/4 ^{-/-} -Tieren mit iGvHD	66
3.2.2.2 Entzündung bei TLR9 ^{-/-} , TRIF ^{-/-} , NOD2 ^{-/-} - und MyD88 ^{-/-} -Tieren mit iGvHD	68
3.2.3 Einfluss der TLRs und des NOD2-Rezeptors auf die Immunreaktion bei iGvHD	69
3.2.3.1 Apoptose und Proliferation bei TLR2 ^{-/-} , TLR4 ^{-/-} , TLR2/4 ^{-/-} -Tieren im Colon mit GvHD	70
3.2.3.2 T-Zellen, regulatorische T-Zellen und Neutrophile im Colon bei TLR2 ^{-/-} , TLR4 ^{-/-} , TLR2/4 ^{-/-} -Mäusen mit GvHD	71
3.2.3.3 Apoptose und Proliferation bei TLR9 ^{-/-} , TRIF ^{-/-} , NOD2 ^{-/-} - und MyD88 ^{-/-} - Tieren im Colon mit GvHD	72
3.2.3.4 T-Zellen, regulatorische T-Zellen und Neutrophile im Colon bei TLR9 ^{-/-} , TRIF ^{-/-} , NOD2 ^{-/-} - und MyD88 ^{-/-} -Tieren mit GvHD	73
3.2.4 Einfluss der TLRs und des NOD2-Rezeptors auf die Veränderung der Darmflora bei GvHD	75
3.2.4.1 Veränderung der Darmflora bei TLR2 ^{-/-} , TLR4 ^{-/-} , TLR2/4 ^{-/-} -Tieren mit GvHD	75
3.2.4.2 Veränderung der Darmflora bei TLR9 ^{-/-} , TRIF ^{-/-} , NOD2 ^{-/-} - und MyD88 ^{-/-} - Tieren mit GvHD	81
3.3 Akute iGvHD nach Behandlung der Tiere mit MDP und TLR9-Antagonist	88
3.3.1 Apoptose, Proliferation, T-Zellen und Neutrophile im Colon bei GvHD nach Gabe von MDP	88
3.3.2 Apoptose, Proliferation, T-Zellen und Neutrophile im Colon bei GvHD nach Gabe des TLR9-Antagonisten iODN 2088	89
4. Diskussion	91
4.1 Eigenschaften des murinen iGvHD-Modells	91
4.1.1 Konditionierung und Transplantation	91
4.1.2 Das Auftreten akuter intestinaler Entzündung im murinen iGvHD-Modell	92
4.1.3 Immunreaktionen, Apoptose und Proliferation im Colon im murinen iGvHD- Modell	92
4.1.4 Veränderung der Darmflora bei akuter GvHD	93

4.1.5 Besondere Auswirkungen der Konditionierung.....	95
4.2 Einfluss von TLRs und NOD2 auf die akute iGvHD	96
4.2.1 Bedeutung der TLRs bei der akuten iGvHD.....	96
4.2.2 Bedeutung von NOD2 bei der akuten iGvHD	98
4.2.3 Bedeutung der Adapterproteine MyD88 und TRIF bei der akuten iGvHD.....	99
4.2.4 Einfluss der TLRs und von NOD2 auf die Veränderung der Darmflora bei GvHD	99
4.3 Modulation akuter GvHD durch Verabreichung von MDP und TLR9-Antagonist.....	101
Zusammenfassung.....	103
Literaturverzeichnis.....	104
Lebenslauf Rita Plickert	109
Danksagungen	110

Abkürzungsverzeichnis

°C – Grad Celsius	MAMPs – Engl: Microbe-Associated-Molecular-Patterns
A – Adenosin	MD2 – Protein MD 2
Abb. – Abbildung	MDP – Muramyl-dipeptid
Ant. – Antagonist	MgCl ₂ – Magnesiumdichlorid
APC – Engl: Antigen-Presenting-Cell (Antigenpräsentierende Zelle)	MHC – Engl: Major-Histocompatibility-Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
APS – Ammoniumperoxodisulfat	miHA – Engl: Minor-Histocompatibility-Antigens (Nebenhistokompatibilitätskomplex)
Aqua dest. – destilliertes Wasser	MLN – Mesenteriale Lymphknoten
BSA – Bovines-Serum-Albumin	MPO7 – Myeloperoxidase 7
bzw. – beziehungsweise	N – naiv
C – Cytosin	n – Anzahl
ca. – circa	NF-κB – Engl: Nuclear-Factor-Kappa-B
CARD 15 – Engl: Caspase-Recruitment-Domain 15	NK Zellen – Natürliche Killer Zellen
CBF – Campus Benjamin Franklin	NLR – Engl: NOD-like-Receptors
CCM – Charité Campus Mitte	NO – Stickstoffmonoxid
CD – Engl: Cluster of Differentiation	NOD – Engl: Nucleotide-Binding-and-Oligomerization-Domain
CED – Chronisch-Entzündliche-Darmerkrankungen	p – P-Wert
CNA – Colistin / Nalidixin Säure-Agar	PAMPS – Engl: Pathogen-Associated-Molecular-Patterns
CpG – Cytosin-Phosphatidyl-Guanosin	PBS – Engl: Phosphate-Buffered-Saline
d – Tag	PCR – Engl: Polymerase-Chain-Reaction (Polymerasekettenreaktion)
DGGE – Denaturierende-Gradienten-Gel-Elektrophorese	PRR – Engl: Pattern-Recognition-Receptor
DMSO – Dimethylsulfoxid	RIC – Engl: Reduced-Intensity-Conditioning (Konditionierungsansatz mit geringer Intensität)
DNA – Desoxyribonukleinsäure	RIP – Engl: Receptor-Interacting-Protein
dNTP – Engl: desoxy-Ribonukleotidtriphosphat	RNA – Engl. Ribonucleic-Acid (Ribonukleinsäure)
DSS – Engl: Dextrane-Sodium-Sulphate	s – Sekunden
<i>E. coli</i> – <i>Escherichia coli</i>	SNP`s – Single-Nucleotide-Polymorphisms
G – GvHD	SPF – Engl: Special-Pathogen-Free (spezifisch-pathogenfrei)
G – Guanosin	T – Thymidin
g – Erdbeschleunigung	TBI – Engl: Total-Body-Irradiation (Ganzkörperbestrahlung)
g – Gramm	TCR – Engl: T-Cell-Receptor – (T-Zellrezeptor)
GALT – Engl: Gut-Associated-Lymphoid-Tissue	TGGE – Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese
GvHD – Engl: Graft-versus-Host-Disease (Transplantatabstoßungserkrankung)	TLR – Toll-like-Rezeptor
GvL – Engl: Graft-versus-Leukemia (Transplantat-Tumor-Reaktion)	TNBS – Trinitrobenzol-Sulfonsäure
HE – Hämatoxylin-Eosin	TNFα – Tumor-Nekrose-Faktor α
HLA – Humanes-Leukozyten-Antigen	TNFR – Engl: Tumor-Nekrosis-Faktor-Rezeptor
IFN – Interferon	TRIF – Engl: Toll-Receptor-associated Activator of Interferon
iGvHD – intestinale GvHD	μ – Micro
IL – Interleukin	vs. – versus
i.p. – intraperitoneal	v/v – Volumen/Volumen
IRF3 – Engl: Interferon-Regulatory-Factor 3	wt – Wildtyp
k – Kilo	
KBE – Kolonie-bildende-Einheiten	
l – Liter	
LBP – Lipopolysaccharid-bindendes-Protein	
LP – Lipopeptid	
LPS – Lipopolysaccharid	
m – milli	

1. Einleitung

1.1 Die „Graft-versus-Host-Erkrankung“ beim Menschen

Die allogene Stammzelltransplantation ist eine bedeutende Therapieoption für Erkrankungen des blutbildenden Systems. Für die erfolgreiche Anwendung dieser Therapieoption sind die mit der Transplantation potentiell auftretenden Komplikationen von Bedeutung. Neben Infektionen, welche aufgrund der Immunsuppression auftreten können, und bei bösartigen Erkrankungen die Gefahr eines Rezidivs, ist vor allem die Transplantatabstoßungserkrankung (Graft-versus-Host-Disease – GvHD) zu nennen (Welniak *et al.* 2007). Grundlage der GvHD ist eine Reaktion der T-Zellen des Spendertransplantats auf die als fremd erkannten Zellen des Empfängers. Voraussetzungen für die Entwicklung der GvHD wurden in einer Arbeit von Billingham zusammengefasst: Erstens muss eine ausreichende Menge an immunkompetenten Zellen im Transplantat enthalten sein: Zweitens müssen dem Spender bestimmte Isoantigene fehlen, was dazu führt, dass die Empfängerzellen als fremd erkannt werden: Und drittens darf das Immunsystem des Empfängers zumindest so lange nicht in der Lage sein, eine ausreichend starke Immunantwort für das Abstoßen des Transplantats aufzubauen, bis das Transplantat selbst immunologisch aktiv wird (Billingham 1966).

Die GvHD ist eine Hauptursache für die Morbidität und Mortalität nach allogener Stammzelltransplantation, nach der 20 bis 50% der transplantierten Patienten eine GvHD entwickeln (Stelljes *et al.* 2008; Ross & Couriel 2005). Die Mortalität der GvHD wird von unterschiedlichen Faktoren wie Patientenalter, Ansprechen auf Transplantation, zugrunde liegender Grunderkrankung und Komorbidität sowie Konditionierung bestimmt.

Der Schweregrad einer GvHD ist unter anderem abhängig von der Übereinstimmung im Haupthistokompatibilitätskomplex MHC (Major-Histocompatibility-Complex) zwischen Spender und Empfänger (Ferrara *et al.* 1999), der beim Menschen genetisch durch das Humane-Leukozyten-Antigen- (HLA) System kodiert wird. Allerdings kann auch bei Geschwistern, die im genetischen HLA übereinstimmen, nach allogener Stammzelltransplantation eine GvHD auftreten. Basis für diese Erkrankung sind Unterschiede im Nebenhistokompatibilitätskomplex (Minor-Histocompatibility-Antigen – miHA) und andere genetische Unterschiede, welche nicht durch die Histokompatibilitätskomplexe kodiert werden (Ferrara *et al.* 1999; Lew & Smith 2007; Shlomchik 2007; Goulmy 2006; Sun *et al.* 2007; Welniak *et al.* 2007).

Die Reaktion der T-Zellen des Transplantats verursacht eine Vielzahl von Gewebeschäden beim Empfänger. Die akute GvHD ist eine Erkrankung, welche vor allem die folgenden drei

Organsysteme betrifft: Haut, Leber und Gastrointestinaltrakt. Die häufigsten Symptome einer akuten GvHD sind: Abdominale Schmerzen, Diarrhöen, Hepatitis sowie makulopapulöser Ausschlag (Vogelsang *et al.* 2003; Lew & Smith 2007). Die intestinale Manifestation akuter GvHD betrifft mehr als 50% der Patienten (Ross & Couriel 2005). Biopsien des Gastrointestinaltraktes zeigen Apoptosen in den Krypten, Kryptenzerstörungen, fokale Lymphozytenaggregate und flaches Epithel (Holmberg *et al.* 2006; Sale *et al.* 1979; Ross & Couriel 2005; Ross *et al.* 2008; Nguyen *et al.* 2008a). Eine mögliche Erklärung, warum vor allem diese drei Zielorgane betroffen sind, liegt in der Interaktion der „Homing“-Rezeptoren der Leukozyten und im Krankheitsverlauf produzierte Chemokine mit dem Epithel der Zielorgane (Wysocki *et al.* 2005; Sackstein 2006; Welniak *et al.* 2007).

Eine wichtige therapeutische Wirkung der allogenen Stammzelltransplantation ist der Graft-versus-Leukämie- (GvL)-Effekt (Reddy 2003; Shlomchik 2007). Dabei eliminieren Spender T-Zellen die entarteten Zellen des Empfängers und schützen somit vor einem Rezidiv maligner hämatologischer Erkrankungen (Vogelsang *et al.* 2003). Dieser therapeutische Effekt wird durch die Spender T-Zellen verursacht, welche auch für die Gewebeschäden verantwortlich sind und den Empfänger vor Infektionen schützen (Duran-Struuck & Reddy 2008; Shlomchik 2007). Bei malignen hämatologischen Erkrankungen ist daher eine T-Zelldepletion des Transplantats vor der Transplantation nicht sinnvoll. Ziel aktueller Forschungsarbeiten ist es, schweren Verläufen einer GvHD vorzubeugen und zu behandeln, ohne dabei den Graft-versus-Tumor-Effekt zu eliminieren (Blazar & Murphy 2005; Welniak *et al.* 2007).

Es gibt unterschiedliche Zeitpunkte, zu denen eine GvHD auftreten kann. Aufgrund klinischer Beobachtungen wird bis zu 100 Tagen nach Transplantation der GvHD Symptomkomplex als akute GvHD bezeichnet, obwohl die gleichen Symptome auch später auftreten können (Holler 2007, Welniak *et al.* 2007). Zahlreiche Patienten zeigen eine Reaktion auf das Transplantat, welche nicht nur später als 100 Tage nach Transplantation auftritt, sondern auch andere Symptome umfasst (Shlomchik 2007). Dies ist die Grundlage für eine Unterteilung der Symptomkomplexe in „akute“ und „chronische GvHD“. Ungefähr 100 Tage nach Transplantation wird vom Auftreten einer chronischen GvHD gesprochen. Die Anwendung einer solchen zeitlichen Einteilung der GvHD wird zunehmend schwieriger, da die Einführung neuer Techniken der an Intensität reduzierten Konditionierung (RIC – Reduced-Intensity-Conditioning) in den klinischen Alltag das zeitliche Erscheinungsbild der Erkrankung verschoben hat (Holler 2007). Zahlreiche Studien haben ergeben, dass der chronischen GvHD eine andere Pathophysiologie zugrunde liegt als der akuten GvHD (Vogelsang *et al.* 2003; Shlomchik 2007; Welniak *et al.* 2007). Diese Erkenntnisse verdeutlichen, dass eine Einteilung

der auftretenden Symptomkomplexe in akute und chronische GvHD durch den Zeitpunkt alleine nicht ausreichend ist.

Die Pathogenese der GvHD ist komplex und im Detail Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten. Eine Einteilung in drei Phasen ist allgemein anerkannt: Die erste Phase umfasst die Konditionierung, die zweite Phase wird Afferente Phase oder Spender T-Zellaktivierung und Expansion genannt, die dritte Phase als Effektorphase bezeichnet (Reddy 2003; Goker *et al.* 2001).

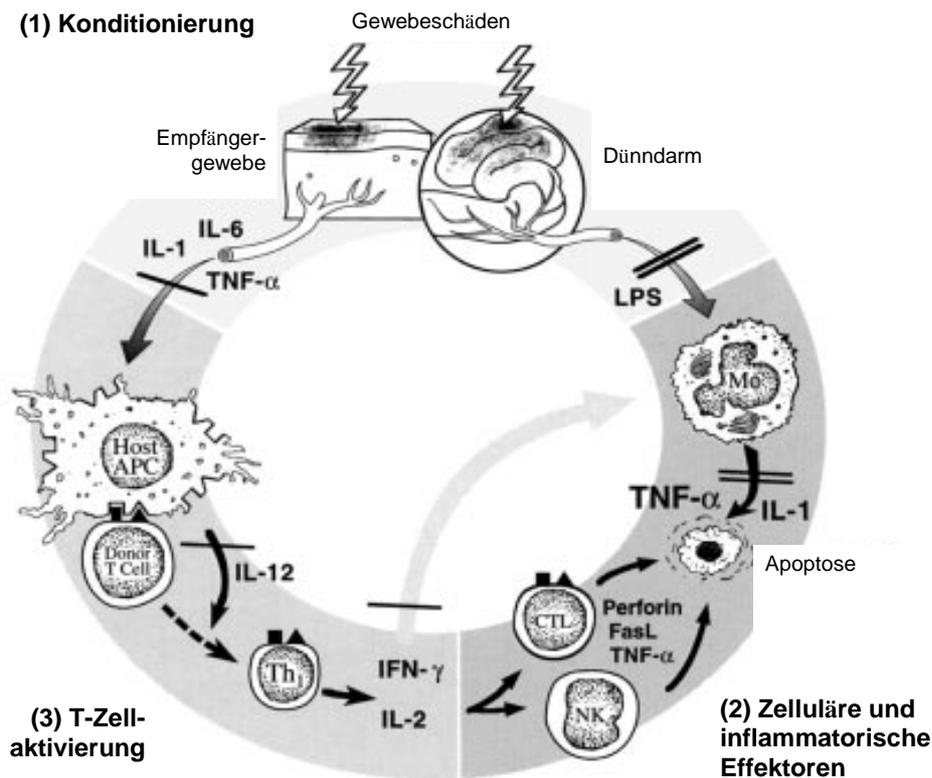


Abb. 1: Pathogenese der akuten GvHD in dem Drei-Phasen-Modell. Die Konditionierung führt über die Spender T-Zellaktivierung zu zellulären und inflammatorischen Effektormechanismen und damit zu Schäden in den Zielorganen (modifiziert nach: Hill & Ferrara 2000).

In der ersten Phase kommt es zu einer Aktivierung der Antigenpräsentierenden Zellen (AntigenPresentingCell – APC). Diese Aktivierung findet größtenteils vor der eigentlichen Transplantation statt. Bedeutend dabei ist die Reaktion des Immunsystems des Empfängers auf die zugrunde liegende Erkrankung, auf auftretende Infektionen und auf die Konditionierung. Die Konditionierung besteht aus Chemotherapie und / oder Bestrahlung. Für die Induktion des Immunsystems beim Empfänger ist die Bestrahlung besonders wichtig, da bei dieser Apoptosen der Epithelzellen unterschiedlicher Gewebe induziert werden (Goker *et al.* 2001; Duran-Struuck & Reddy 2008). Vor allem der Epithelschaden im Gastrointestinaltrakt ist von großer

Bedeutung, da der entstehende Barrierschaden eine Translokation von bakteriellen Produkten wie beispielsweise Lipopolysaccharid (LPS) erlaubt (Reddy 2003; Goker *et al.* 2001; Morris & Hill 2007). Dennoch kann eine GvHD auch nach Konditionierung mit Chemotherapeutika oder sogar ohne Konditionierung auftreten (Holler 2007; Duran-Struuck & Reddy 2008). Durch die Schädigung des Epithels kommt es zu einer Sekretion proinflammatorischer Zytokine und zu verstärkter Expression von Adhäsion-, MHC- und kostimulatorischen Molekülen im geschädigten Epithel. Zusammengefasst stellen diese Veränderungen quasi „Gefahrensignale“ für das Immunsystem des Empfängers dar, welches daraufhin vermehrt APCs exprimiert (Sun *et al.* 2007).

Der Konditionierung kommt bei der Pathogenese der GvHD eine entscheidende Bedeutung zu. Patienten, die mit einer weniger intensiven Konditionierung (RIC) auf die Transplantation vorbereitet werden, zeigen eine geringere Inzidenz für akute GvHD verglichen mit Patienten, bei denen die klassische Konditionierung durchgeführt wurde (Nachbaur *et al.* 2003; Aoudjhane *et al.* 2005).

Bei der Infusion der Spender T-Zellen in den Empfänger, dessen Immunsystem durch die Erkrankung und die Vorbereitung bereits aktiviert ist, kommt es zu einer Interaktion zwischen den Spender T-Zellen und den vermehrt exprimierten APCs des Empfängers (Sun *et al.* 2007). Dies kennzeichnet den Beginn der zweiten Phase der GvHD, welche neben der Interaktion zwischen APCs und Spender T-Zellen, die Aktivierung dieser T-Zellen, deren Proliferation, Differenzierung und Migration umfasst (Reddy 2003).

In der Effektorphase kommt es zu den Gewebeschäden in den einzelnen Zielorganen der GvHD. Dabei schädigen die aktivierten Spender T-Zellen das Gewebe des Empfängers sowohl direkt als auch indirekt (Goker *et al.* 2001).

Dass bei der GvHD besonders solche Organe als Zielorgane gelten, welche verstärkt mit mikrobiellen Organismen in Berührung kommen, lässt an eine besondere Bedeutung des angeborenen Immunsystems bei der Induktion der T-Zellantwort denken (Duran-Struuck & Reddy 2008; Shlomchik 2007).

Inflammatorische Faktoren der Effektorphase sind wichtig für die Stimulation der zytotoxischen T-Zellen und anderer zellulärer Effektormechanismen. Inflammatorische Zytokine wie TNF α und IL1 werden durch Makrophagen nach deren Stimulation produziert. Die Stimulation der Makrophagen ist dabei ein zweistufiger Prozess. Durch die Expression von IFN γ in der zweiten Phase der GvHD wurden diese Makrophagen „voraktiviert“. Das zweite Signal, welches zur Produktion inflammatorischer Zytokine führt, kann durch Toll-like-Rezeptoren (TLRs) geliefert werden (Sun *et al.* 2007). Durch die Barrierschäden, welche durch die Konditionierung

induziert sind, können mikrobielle Produkte, wie LPS und Lipopeptid (LP), TLRs stimulieren (Hill *et al.* 1997). Neben der TLR-Familie ist die Nucleotide-Binding-and-Oligomerization-Domain (NOD)- und NOD-like-Rezeptor (NLR)-Familie wichtig (Sun *et al.* 2007).

Die durch die Makrophagen produzierten inflammatorischen Zytokine wirken verstärkend auf die zellulären Effektormechanismen und verschlimmern somit den bereits vorliegenden Gewebeschaden in der Effektorphase (Reddy 2003). Eine enge Verbindung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem wird dabei durch die Induktion des adaptiven Immunsystems in Form der zytotoxischen T-Zellen nach Erkennung bakterieller Produkte durch die TLRs und NLRs deutlich. Schlussfolgernd kommt es durch die enge Interaktion zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem zu dem für die akute GvHD typischen „Zytokinsturm“.

Vielversprechende therapeutische Möglichkeiten der GvHD eröffnen sich durch eine besondere T-Zellpopulation, den regulatorischen T-Zellen. Diese CD4+CD25+ und FOXP3+ Zellen zeigen kein vermehrtes Vorkommen im Gewebe bei akuter und chronischer GvHD beim Menschen (Rieger *et al.* 2006). Experimentelle Transplantationsmodelle, bei denen regulatorische T-Zellen verabreicht wurden, konnten eine beachtliche positive Beeinflussung der GvHD durch die regulatorischen T-Zellen bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der GvL nachweisen (Nguyen *et al.* 2008b; Trenado *et al.* 2003; Edinger *et al.* 2003).

1.2 Die Rolle der Rezeptoren des angeborenen Immunsystems bei der Pathogenese der GvHD

Um die adaptive Immunantwort und damit eine Elimination von Pathogenen zu induzieren, ist eine Erkennung dieser Pathogene durch Rezeptoren des Immunsystems notwendig. Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRR) sind in der Evolution hoch konservierte Rezeptoren, welche durch Bestandteile mikrobieller Organismen aktiviert werden (Rosenstiel *et al.* 2007). Das angeborene Immunsystem erkennt durch diese Rezeptoren unvariable molekulare Merkmale von Mikroorganismen. Diese Merkmale werden PAMPS – Pathogen-Associated-Molecular-Patterns oder auch MAMPs – Microbe-Associated-Molecular-Patterns genannt, da sie nicht nur Merkmale pathogener Mikroorganismen sind (Medzhitov 2007; Magalhaes *et al.* 2007). Die erkennenden Rezeptoren gehören der TLR- und NLR-Familie an (Delbridge & O’Riordan 2007). In der TLR-Familie sind bisher 13 Rezeptoren (Alexopoulou & Kontoyiannis 2005), in der NLR-Familie 23 Rezeptoren (Xavier & Podolsky 2007), welche für Säugetiere von Bedeutung sind, entdeckt worden.

Nach der Detektion mikrobieller Produkte durch die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems werden Signalkaskaden aktiviert, die durch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B (Nuclear-Factor-Kappa-B) oder IRF3 (Interferon-Regulatory-Factor 3) (Parker *et al.* 2007; Le Bourhis *et al.* 2007; Alexopoulou & Kontoyiannis 2005) zu einer Beeinflussung der Genexpression führen (Delbridge & O’Riordan 2007). Zusammengefasst führt die Stimulation der TL-Rezeptoren über die Transkriptionsfaktoren zu einer Immunantwort, welche aus einer Rekrutierung lokaler Makrophagen zur Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF, Interleukin-1 β und Interleukin-6 besteht (Medzhitov 2007). Die Aktivierung dendritischer Zellen durch die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems führt zur Induktion des adaptiven Immunsystems (Pasare & Medzhitov 2004). Nach einer Stimulation des NOD1- oder NOD2- (auch genannt CARD 15 – Caspase-Recruitment-Domain 15) Rezeptors kommt es über den Transkriptionsfaktor NF- κ B zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (Cario 2005). Damit findet eine Rekrutierung von Neutrophilen zum Ort der Stimulation statt (Medzhitov 2007; Guarner 2006).

Die TLR-Familie betreffend sind für die Signalkaskade fünf unterschiedliche Adapterproteine wichtig, von denen zwei eine besondere Bedeutung haben: MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88) und TRIF (Toll-Receptor-associated Activator of Interferon) (Beutler 2004). Die Signalkaskaden, welche nach der Stimulation der TLRs aktiviert werden, können in einen MyD88-abhängigen Signalweg und einen TRIF-abhängigen (auch MyD88-unabhängigen) Signalweg unterteilt werden (Alexopoulou & Kontoyiannis 2005). Der MyD88-abhängige Signalweg führt nach Stimulation sämtlicher TL-Rezeptoren mit Ausnahme von TLR3 zur Aktivierung von NF- κ B (Yamamoto *et al.* 2003; Watters *et al.* 2007). Der MyD88-unabhängige Signalweg beeinflusst nach Stimulation der Rezeptoren TLR3 und 4 über das Adapterprotein TRIF die Genexpression durch den Transkriptionsfaktor IRF3 (Sabroe *et al.* 2008; Kawai & Akira 2005) und führt damit zu einer Produktion von IFN- β (Yamamoto *et al.* 2003; Parker *et al.* 2007). Die Aktivierung von IFN- β führt neben dem Einfluss von IFN- β selbst auf die Genexpression zu einer Induktion von NF- κ B, die im Vergleich mit dem MyD88-abhängigen Signalweg zeitlich verschoben stattfindet (Youn *et al.* 2005). Die Signalkaskade des TLR3 ist komplett abhängig von TRIF, die Signalkaskade des TLR4 führt sowohl über das Adapterprotein TRIF als auch über MyD88 (Yamamoto *et al.* 2003) zu einer Beeinflussung der Genregulation.

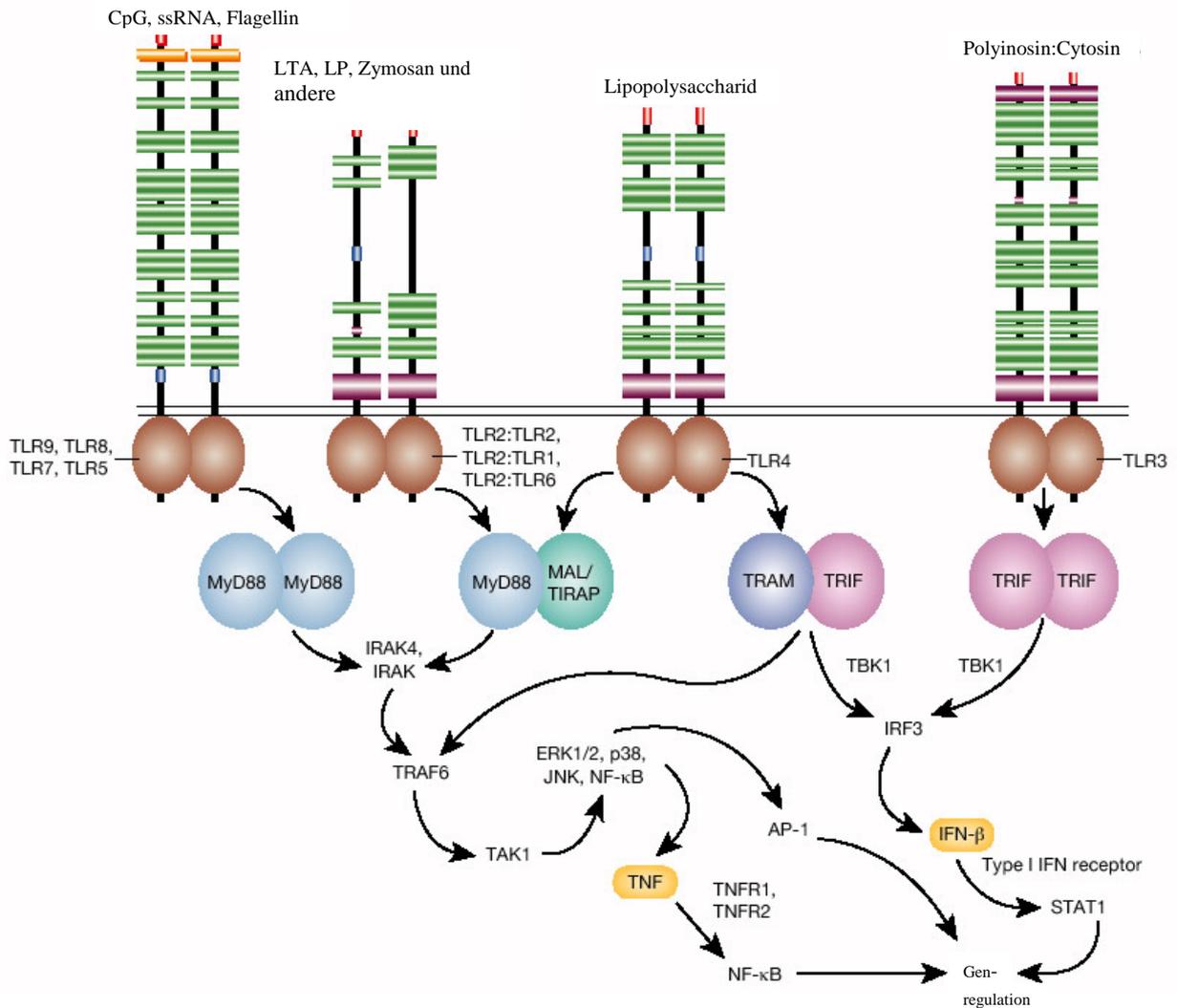


Abb. 2: TLR-Signalkaskaden in der Zelle. Nach der Detektion molekularer Merkmale der Mikroorganismen durch die TLRs kommt es über unterschiedliche Adapterproteine, bei denen vor allem MyD88 und TRIF eine zentrale Rolle spielen, zur Beeinflussung der Genexpression (modifiziert nach: Beutler 2004).

Die NLR-Familie betreffend werden nach Stimulation durch entsprechende Liganden unterschiedliche Signalkaskaden ausgelöst, welche im Falle von NOD1 und NOD2 über unterschiedliche Adapterproteine wie die Receptor-Interacting-Protein (RIP) 2 Kinase zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB führen (Alexopoulou & Kontoyiannis 2005; Magalhaes *et al.* 2007).

Eine Vielzahl von Liganden kann für die TLR- und NLR-Familie benannt werden. Beispielsweise wird der TLR2 durch Zellwandbestandteile grampositiver und gramnegativer Bakterien wie LP und Lipoteichonsäure stimuliert (Travassos *et al.* 2004). Der TLR4 detektiert LPS, ein Bestandteil der Zellwand von gramnegativen Bakterien (Cario 2005; Takeda *et al.* 2003). Nach der Detektion von LPS durch den TLR4 kommt es zu einer Assoziation von LPS,

LBP (Lipopolysachharid-bindendes Protein), CD14, Protein MD2 mit dem TLR4 und damit zu einer Aktivierung des TLR-Signalweges (Gioannini & Weiss 2007; Cario 2005; Takeda *et al.* 2003).

Der TLR9 wird durch die Expression von unmethylierter CpG-DNA (Cytosin-Phosphatidyl-Guanosin) aktiviert, welches Bestandteil der DNA sowohl von Bakterien als auch von Viren ist (Andersen *et al.* 2006; Cario 2005; Krieg 2002).

Ligand des TLR3 ist Doppelstrang-RNA, welche bei zahlreichen Viren zu finden ist (Harris *et al.* 2006).

Die NOD1- und NOD2-Rezeptoren detektieren monomere Fragmente von Peptidoglykanen (Bourhis & Werts 2007). Der NOD2-Rezeptor wird durch Muramyldipeptid (MDP) aktiviert, welches ein Bestandteil von gramnegativen und grampositiven Bakterien ist (Sirard *et al.* 2007; Le Bourhis *et al.* 2007; Watanabe *et al.* 2008; Rosenstiel *et al.* 2007). Peptidoglykane sind Zellwandbestandteile von fast allen Bakterien, daher decken die NOD-Rezeptoren ein breites Feld der molekularen Merkmale der Mikroorganismen ab (Bourhis & Werts 2007).

Die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems sind in einigen Zellpopulationen intra- oder extrazellulär exprimiert, auch eine Sekretion dieser Rezeptoren ist möglich (Alexopoulou & Kontoyiannis 2005; Magalhaes *et al.* 2007). Sowohl bei Makrophagen als auch bei neutrophilen Granulozyten, dendritischen Zellen und weiteren Zellen des angeborenen Immunsystems sind die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems zu finden (Tlaskalová-Hogenová *et al.* 2004; Takeda *et al.* 2003).

Die TLRs kommen extra- und intrazellulär vor (Parker *et al.* 2007; Medzhitov 2007; Cario 2005; Harris *et al.* 2006). Die NLR-Familie ist eine Gruppe zytosolisch vorkommender Rezeptoren (Sirard *et al.* 2007; Medzhitov 2007).

Eine Interaktion zwischen der NLR- und TLR-Familie konnte kürzlich nachgewiesen werden. In einem murinen Colitismodell wurde gezeigt, dass die Verabreichung von MDP zu einer Abmilderung der Colitis führt. Hintergrund dieses Effekts ist eine Inhibition einiger TLRs über die Stimulation des NOD2-Rezeptors (Watanabe *et al.* 2008; Yang *et al.* 2007). Andererseits konnte gezeigt werden, dass NOD2-defiziente Tiere anfälliger für eine durch TNBS-induzierte Colitis sind (Barreau *et al.* 2007).

Das mukosale Immunsystem des Gastrointestinaltraktes hat die Funktion, die Reaktion der Immunzellen des GALT (Gut-Associated-Lymphoid-Tissue) auf invasive Pathogene aufrechtzuerhalten, dabei aber eine Reaktion auf kommensale Bakterien und im Nahrungsbrei enthaltene Antigene zu verhindern. Das GALT besteht aus einem Netzwerk immunkompetenter

Zellen, wie dendritische Zellen, Mastzellen und eosinophilen Granulozyten. Intestinale Epithelzellen können bei Detektion von Pathogenen durch die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems in Interaktion mit mukosalen Lymphozyten treten und damit eine Immunantwort auslösen (Wershil & Furuta 2008).

Um die Homöostase der Gastrointestinalflora, bei gleichzeitiger Elimination von Pathogenen, aufrechtzuerhalten, ist es wichtig, dass die intestinalen Epithelzellen nicht auf die molekularen Merkmale der Mikroorganismen der Kommensalen durch eine Aktivierung des Immunsystems wirken. Unterschiedliche Studien konnten nachweisen, dass intestinale Epithelzellen des Colons im gesunden Zustand eine geringe TLR4- und TLR2-Expression zeigen (Abreu *et al.* 2005; Cario & Podolsky 2000; Melmed *et al.* 2003), wobei für den nach intrazellulär verlagerten TLR4 Funktionsfähigkeit nachgewiesen werden konnte (Hornef *et al.* 2003). Dieser physiologische Zustand ist bei Chronisch-Entzündlichen-Darmerkrankungen (CED) wie Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa gestört. Bei aktiven Schüben der CED konnten auf den intestinalen Epithelzellen des menschlichen und murinen distalen Gastrointestinaltraktes, bei intestinalen Makrophagen und intestinalen dendritischen Zellen eine Zunahme der Expression des TLR4 und TLR2 nachgewiesen werden (Cario & Podolsky 2000; Hausmann *et al.* 2002; Ortega-Cava *et al.* 2003; Hart *et al.* 2005).

Für das Adapterprotein MyD88 konnte eine gleichmäßige Expression in den unterschiedlichen Abschnitten des murinen Gastrointestinaltraktes gezeigt werden (Ortega-Cava *et al.* 2003).

Schlussfolgernd kann das angeborene Immunsystem im Gastrointestinaltrakt vermutlich nicht zwischen Pathogenen und Kommensalen unterscheiden, kann allerdings eine schnelle Reaktion auf eine Invasion der Mukosa durch mikrobielle Organismen aufbauen. Für die schnelle Reaktion des Immunsystems auf eine solche Invasion sind die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems von entscheidender Bedeutung.

Die Bedeutung der TLR- und NLR-Familie für die Pathogenese gastrointestinaler Erkrankungen ist bereits in der Vergangenheit erforscht worden (Van Limbergen *et al.* 2007; Harris *et al.* 2006; Fukata & Abreu 2008). Anstoß für zahlreiche Arbeiten war die Beobachtung, dass spezifische Varianten des NOD2-Rezeptors eine wichtige Prädisposition für Morbus Crohn darstellen (Harris *et al.* 2006).

In einem murinen Modell, bei dem eine Colitis durch das chemische Agens Dextrane-Sodium-Sulphate (DSS) induziert wurde, konnte eine Zunahme der intestinalen Inflammation über die Detektion molekularer Merkmale der Mikroorganismen durch TLR2 und 4 nachgewiesen werden (Heimesaat *et al.* 2007b). Auch die Bedeutung des TLR9 für die Ausbildung einer

chronischen Colitis wurde in mehreren experimentellen Modellen gezeigt (Obermeier *et al.* 2005). Für ein murines Ileitismodell, bei dem die Pathologie durch eine orale Infektion mit 100 Zysten *Toxoplasma gondii* induziert wurde, konnte die Bedeutung des TLR4 in der Pathogenese der Ileitis nachgewiesen werden (Heimesaat *et al.* 2007a).

Dass die TLR-Familie insgesamt für die Induktion intestinaler Entzündung von Bedeutung sein kann, wird durch die Beobachtung deutlich, dass MyD88/IL10-doppelfdefiziente Tiere vor der Ausbildung der für IL10-defiziente Tiere typischen spontanen Colitis geschützt sind (Rakoff-Nahoum *et al.* 2006).

In klinischen Studien wurde die Bedeutung von Mutationen der Rezeptoren des angeborenen Immunsystems auf die Pathogenese von GvHD beim Menschen nachgewiesen. Liegt eine Mutation des NOD2-Rezeptors bei Empfänger und Spender vor, wurde eine höhere Inzidenz einer schweren akuten GvHD festgestellt (Elmaagacli *et al.* 2006; Holler *et al.* 2004, 2006). Bei Verwendung eines Transplantats, welches einer T-Zelldepletion unterzogen wurde, konnte ein gravierender Einfluss von Mutationen des NOD2-Rezeptors gezeigt werden. Bei der Vorlage von NOD2-Varianten war die Zeit des krankheitsfreien Überlebens signifikant reduziert, wobei mehr Todesfälle aufgrund pulmonaler Infektionen vorzufinden waren. Obwohl die letztgenannte Beobachtung nicht auf verändertes Auftreten akuter GvHD zurückzuführen war (Granell *et al.* 2006), zeigen beide Befunde die Bedeutung des NOD2-Rezeptors für eine erfolgreich verlaufende Knochenmarktransplantation.

Untersuchungen des Einflusses von Mutationen des TLR4 auf akute GvHD erbrachten keine einheitlichen Ergebnisse (Elmaagacli *et al.* 2006; Lorenz *et al.* 2001).

Die Bedeutung der Immunrezeptoren des angeborenen Immunsystems für die Ausbildung akuter GvHD wird illustriert durch Ergebnisse unterschiedlicher experimenteller Studien. Vor kurzem erschienene Arbeiten verschiedener Arbeitsgruppen lassen dabei an eine besondere Bedeutung des TLR9 bei der Pathogenese akuter GvHD denken (Durakovic *et al.* 2007; Taylor *et al.* 2008; Calcaterra *et al.* 2008). Bei TLR9^{-/-}-Mäusen konnte ein signifikant besseres Überleben, besseres klinisches Erscheinungsbild und eine Reduktion der intestinalen Entzündung nach bestrahlungsabhängiger Knochenmarktransplantation festgestellt werden (Calcaterra *et al.* 2008). Weiterhin wurde beobachtet, dass die Verabreichung von TLR9-Liganden in einem murinen Transplantationsmodell zu einer schwereren Ausprägung akuter GvHD führt (Taylor *et al.* 2008). In einer klinischen Studie konnte beobachtet werden, dass eine geringere TLR9-Expression zu verbessertem Überleben nach Transplantation führt, während keine Unterschiede bezüglich des Vorkommens von GvHD festgestellt wurden (Elmaagacli *et al.* 2009). Durch eine

weitere klinische Studie wurde die Bedeutung des TLR9 für chronische GvHD aufgezeigt, indem das vermehrte Vorkommen von zirkulierenden B-Zellen mit hoher TLR9-Expression gezeigt wurde (She *et al.* 2007).

Für den TLR4 liegen teilweise widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich der Bedeutung bei der Pathogenese akuter GvHD vor. Ein direkter Antagonismus von LPS durch die Gabe von B975, einem Antagonisten der durch LPS-induzierten Zellantwort, resultierte in einem verbesserten Überleben der Tiere bei geringer ausgeprägter Darmhistopathologie und Reduktion klinischer Zeichen der akuten GvHD (Cooke *et al.* 2001). Diese Beobachtungen werden von dem Befund gestützt, dass eine Transplantation von Knochenmark LPS-resistenter Mäuse zu geringeren TNF α - und LPS-Spiegeln im Serum und darüberhinaus zu einer geringer ausgeprägten akuten intestinalen GvHD (iGvHD) bei den Empfängertieren führt (Cooke *et al.* 1998). Andererseits konnten andere Arbeitsgruppen im murinen Bestrahlungsmodell zeigen, dass das Fehlen des TLR4 nach allogener Knochenmarktransplantation bei den Empfänger-mäusen keine protektive Wirkung zur Folge hat (Calcaterra *et al.* 2008). Weitere Arbeiten lassen zusätzlich an einen Einfluss von TLR7 und 8 auf die Pathogenese dieser Erkrankung denken (Durakovic *et al.* 2007).

In einer *in vitro* Studie konnte der Einfluss von CpG-DNA auf die Proliferation von murinen T-Zellen in der gemischten Lymphozytenkultur nachgewiesen werden. Hierbei wurden syngen und allogen gemischte T-Zellen verglichen, letztere um die T-Zellreaktion bei HLA-Inkompatibilität darzustellen. In dem allogenen „Setting“ konnte eine vermehrte Proliferation von T-Zellen nach Stimulation durch CpG-DNA nachgewiesen werden, was im syngen Ansatz nicht der Fall war (Heimesaat *et al.* 2009; Manuskript eingereicht).

1.3 Die intestinale mikrobielle Flora bei GvHD

Die mikrobielle Darmflora hat zahlreiche physiologische Funktionen bei Säugetieren. Unter anderem verhindern Kommensale die Besiedlung mit potentiell pathogenen Mikroorganismen im Darm (Guarner & Malagelada 2003; Magalhaes *et al.* 2007). Es sind bis zu 400 unterschiedliche Mikroorganismen im Gastrointestinaltrakt zu finden (Othman *et al.* 2008; Zoetendal 2004). In den unterschiedlichen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes bei Säugetieren lassen sich sowohl eine unterschiedliche qualitative Zusammensetzung als auch Unterschiede in der quantitativen Dichte der Flora feststellen. Dabei nehmen die Diversität und die Dichte der Bakterienpopulation vom Magen zum Dickdarm hin zu. Im Colon befinden sich ungefähr 10^{11} bis 10^{12} Bakterien pro Gramm Darminhalt (Othman *et al.* 2008; O'Hara & Shanahan 2006). Die Normalflora des Colons besteht zu ungefähr 99% aus obligat anaeroben Bakterien (Neish 2002; Magalhaes *et al.*

2007), wobei die Gruppen *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Lactobacillales* spp., *Eubacterium* spp., *Fusobacterium* spp. und *Clostridiales* spp. als Repräsentanten zu nennen sind. Weniger häufig vorkommende Bakterien umfassen die Gruppen *Enterococcus* spp. und *Enterobacteriaceae* spp. (Guarner 2006; O'Hara & Shanahan 2006).

Bei unterschiedlichen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes konnte ein Einfluss der mikrobiellen Darmflora auf die Pathogenese nachgewiesen werden (Neish 2002; Guarner 2006). Besondere Bedeutung wird dabei den CED beim Menschen und deren experimentellen Modellen zuteil (Sartor 2008).

Im murinen Ileitismodell, bei dem die zugrundeliegende Immunpathologie durch die Infektion mit *Toxoplasma gondii* induziert wurde, konnten Veränderungen der mikrobiellen Flora im entzündeten Ileum mit Verlust an Diversität in der mikrobiellen Flora, Prädominanz von *Escherichia coli* und *Bacteroides* / *Prevotella* spp. und systemischen Translokationen von *Escherichia coli* und *Bacteroides* / *Prevotella* spp. nachgewiesen werden (Heimesaat *et al.* 2006, 2007a). Die systemischen Translokationen der mikrobiellen Flora verstärkten die vorliegenden Barrierschäden und führten zur Produktion proinflammatorischer Zytokine. Schlussfolgernd kann die beobachtete Veränderung der mikrobiellen Flora als proinflammatorisch bezeichnet werden (Heimesaat *et al.* 2006; Swidsinski *et al.* 2005). Dabei ist zu beachten, dass nur bestimmte Bakterienpopulationen, wie *Enterobacteriaceae*, *Bacteroides* / *Prevotella* und *Enterococcus* spp., nicht aber *Lactobacillus johnsonii* beispielsweise diese Reaktion auslösen (Heimesaat *et al.* 2006 und Heimesaat *et al.* 2009; persönliche Kommunikation; Swidsinski *et al.* 2005). Das proinflammatorische Potential von *Enterococcus faecalis* und *Bacteroides* Spezies wurde in mehreren präklinischen Modellen bestätigt (Sartor *et al.* 2008).

Im murinen DSS-Colitismodell konnten ähnliche Veränderung der Colonflora in Richtung einer proinflammatorischen Flora beobachtet werden, wobei kulturell ein signifikanter Anstieg von *E. coli* im Vergleich zu gesunden Tieren nachgewiesen und zudem durch molekulare Analysen ein Verlust der bakteriellen Diversität der Intestinalflora im Verlauf der Inflammation aufgezeigt wurde (Heimesaat *et al.* 2007b).

Die Bedeutung der Akkumulation von *Enterobacteriaceae* bei der Ausbildung intestinaler Inflammation konnte nicht nur durch Ergebnisse anderer muriner Modelle (Lupp *et al.* 2007), sondern auch durch Studien der CED beim Menschen nachgewiesen werden (Seksik *et al.* 2003; Martinez-Medina *et al.* 2006).

Diese Ergebnisse und der Nachweis der Bedeutung der Rezeptoren des angeborenen Immunsystems für die Pathogenese von GvHD (Reddy 2003) lassen an einen möglichen Einfluss

der Intestinalflora, bzw. einzelner bakterieller Spezies auch bei der Pathogenese von GvHD denken. In murinen Transplantationsmodellen konnte gezeigt werden, dass Tiere, welche ohne oder mit zumindest einer reduzierten bakteriellen Flora gehalten wurden, keine GvHD nach Knochenmarktransplantation trotz HLA-Inkompatibilität entwickelten (Van Bekkum *et al.* 1974; Heidt & Vossen 1992). Diese Befunde wurden durch klinische Studien untermauert (Vossen *et al.* 1990; Beelen *et al.* 1999), bei denen unter anderem eine Dekontamination durch Ciprofloxacin allein mit einer kombinierten Dekontamination aus Ciprofloxacin plus Metronidazol verglichen wurde. Patienten, welche die kombinierte Dekontamination erhalten hatten, entwickelten weniger häufig eine GvHD Grad II bis Grad IV als jene Patienten, die mit Ciprofloxacin alleine behandelt worden waren (Beelen *et al.* 1999). Ein protektiver Effekt bestimmter Bakterienspezies konnte ebenfalls in klinischen Studien nachgewiesen werden. Bei einer Gabe von *Lactobacillus rhamnosus GG* vor und nach Knochenmarktransplantation konnte ein besseres Überleben der Patienten und eine geringere Ausprägung akuter GvHD gezeigt werden (Gerbitz *et al.* 2004).

1.4 Tiermodelle zur Erforschung der GvHD

Die Erforschung eines möglichen Einflusses der intestinalen Flora auf die Entwicklung der GvHD beim Menschen gestaltet sich schwierig, da die Intestinalflora des Menschen interindividuellen Schwankungen unterworfen ist (Sghir *et al.* 2000; Hopkins *et al.* 2001). Weiterhin umfasst die Therapie der Stammzelltransplantation und deren Komplikationen auch individuell verschiedene Antibiotikainterventionen mit entsprechendem direktem Einfluss auf die Darmflora. Für eine systematische Untersuchung der GvHD ist daher das Mausmodell besser geeignet (Blazar & Murphy 2005; Welniak *et al.* 2007). Die Induktion der GvHD wird dabei durch die Anwendung von Chemotherapeutika / Bestrahlung als Konditionierung und schließlich durch die eigentliche Induktion der GvHD, die Transplantation der allogenen Spenderzellen, erreicht. Bei der Induktion der GvHD sind zahlreiche Einflussfaktoren zu beachten, wie beispielsweise der Typus und die Menge der transplantierten Zellen, die genetische Herkunft der Spenderzellen und der Empfängertiere, die mikrobielle Besiedlung der Tiere, das Alter der Tiere, die Dosis der Bestrahlung und die verabreichten Chemotherapeutika. Je nachdem welche Aspekte der GvHD erforscht werden sollen, werden diese Variablen auf das Tiermodell entsprechend angepasst. Bei einem Vergleich der aus unterschiedlichen Tiermodellen gewonnenen Ergebnisse muss daher zwingend auf die Vergleichbarkeit dieser Variablen geachtet werden (Blazar & Murphy 2005; Welniak *et al.* 2007).

In vielen Tiermodellen wird die Ganzkörperbestrahlung (TBI – Total-Body-Irradiation) angewandt, wobei die dosisabhängige schädigende Wirkung der Bestrahlung vor allem auf den Darm beachtet werden muss. Im murinen Modell konnte unter intensivierter TBI eine verstärkte Schädigung der gastrointestinalen Barriere und erhöhte LPS-Spiegel im Serum im Vergleich zu einer schwächeren Bestrahlungsdosis nachgewiesen werden. Tiere, bei denen eine höhere Bestrahlungsdosis angewendet wurde, erkrankten schwerer an GvHD, hatten eine stärker ausgeprägte Entzündung im Darm und eine verstärkte Sekretion von TNF α . Dies konnte in unterschiedlichen genetischen Hintergründen und verschiedenen genetischen Kombinationen von Spenderzellen und Empfängertieren nachgewiesen werden (Hill *et al.* 1997). Aufgrund der nachgewiesenen schädigenden Wirkung der Bestrahlung auf den Intestinaltrakt wurde in dem von uns verwendeten Modell, in dem vor allem die Auswirkungen der GvHD auf den Darm untersucht werden sollten, auf TBI verzichtet und stattdessen Chemotherapeutika für die Konditionierung verwendet.

Beim Menschen werden zunehmend alternative Konditionierungen verwendet, welche gegebenenfalls auf die Ganzkörperbestrahlung verzichten (RIC) (Harousseau 2007; Welniak *et al.* 2007). Hintergrund der alternativen Konditionierung ist das Ziel, die Therapieoption der Stammzelltransplantation für eine größere Patientenzahl zugänglich zu machen (Mielcarek *et al.* 2003; Sorrow *et al.* 2004; Beelen *et al.* 2005). Diese Konditionierungsansätze beruhen unter anderem auf der Anwendung von Busulfan, Treosulfan, Cyclophosphamid oder Fludarabine (Casper *et al.* 2004; Aoudjhane *et al.* 2005; Beelen *et al.* 2005). Vorteile dieser Anwendung im Vergleich zu TBI sind die ausbleibenden Nebenwirkungen der Bestrahlung bei eintretender Knochenmarkdepletion (Casper *et al.* 2004; Schmidt-Hieber *et al.* 2007). Die Auswirkungen von RIC auf iGvHD erscheinen in klinischen Studien viel versprechend (Mielcarek *et al.* 2003, Sorrow *et al.* 2004). Beim Menschen wird bevorzugt Treosulfan verwendet, da Treosulfan im Vergleich zu Busulfan nicht die Gefahr einer venösen Verschlusskrankheit birgt. Zusätzlich kann bei der Anwendung von Treosulfan reduzierte hepatotoxische Nebenwirkungen bei gleicher zytoreduktiver Wirkung im Vergleich zu Busulfan beobachtet werden (Casper *et al.* 2004; Scheulen *et al.* 2000). Bei Balb/c- und C57BL/6-Mäusen konnte eine effektive myeloablative Wirkung sowohl von Treosulfan als auch von Busulfan nachgewiesen werden (Sjöo *et al.* 2006; Ploemacher *et al.* 2004). In einem murinen bestrahlungsunabhängigen Transplantationsmodell, beruhend auf einer Konditionierung durch Busulfan und Cyclophosphamid, konnte nach allogener Transplantation das Auftreten akuter GvHD gezeigt werden (Sadeghi *et al.* 2008). Beim Menschen wird Treosulfan mit Fludarabine (Casper *et al.* 2004; Shimoni *et al.* 2007; Blau *et al.* 2007) oder Cyclophosphamid (Beelen *et al.* 2005; Scheulen *et al.* 2000) kombiniert. Bei

der Anwendung von Fludarabine ist eine fünfmalige Infusion des Chemotherapeutikums nötig (Casper *et al.* 2004), während bei Cyclophosphamid nur eine einmalige Injektion notwendig ist (Scheulen *et al.* 2000). Aufgrund des niedrigeren Infektionsrisikos bei weniger Injektionen wurde in dem von uns verwendeten Modell Treosulfan mit Cyclophosphamid kombiniert.

Um eine HLA-Inkompatibilität zu erhalten, wurden in dem von uns verwendeten Modell Knochenmark und Milzzellen von Balb/c-Mäusen in einen genetischen C57BL/10- und C57BL/6-Hintergrund transplantiert. Dabei wurden sowohl Wildtypiere als auch Tieren mit Mutationen bzw. Deletion im angeborenen Immunsystem als Empfängertiere verwendet. Es wurden 5×10^6 Knochenmarkzellen und 3×10^6 Milzzellen durch Injektion in die Schwanzvene transplantiert (Heimesaat *et al.* 2009; Manuskript eingereicht).

Vor Beginn der vorliegenden Arbeit wurde in einem Pilotexperiment am Tag 11, 28 und 50 nach der Transplantation den Tieren Blut abgenommen und am Ende des Experimentes von den überlebenden Tieren Knochenmark gewonnenen, um Chimärismusanalysen durchzuführen. Diese Analyse ergab, dass es in diesem Modell bei ungefähr 92% der Tiere zu einem „Engraftment“ des Transplantats kam (Heimesaat *et al.* 2009; Manuskript eingereicht). Bei einem Vergleich zwischen syngen und allogenen transplantierten Tieren konnte eine allogene Induktion der GvHD nachgewiesen werden. Nur allogenen transplantierte Tiere entwickelten histopathologische Veränderungen in Leber, Milz, Niere, Magen, Dünndarm und Colon. Die allogenen transplantierten Tiere zeigten vermehrte klinische Zeichen einer GvHD wie Gewichtsverlust, Aktivitätseinschränkungen und struppiges Fell im Vergleich mit den syngen transplantierten Tieren (Heimesaat *et al.* 2009; Manuskript eingereicht). Im Darm allogenen transplantierte Tiere zeigten sich histopathologische Merkmale einer schweren iGvHD wie vermehrte Apoptosen, Kryptenzerstörungen und abgeflachtes Epithel (Heimesaat *et al.* 2009; Manuskript eingereicht). Diese Ergebnisse untermauern die Eignung der verwendeten Chemotherapeutika und Transplantation zur Untersuchung der Darm-GvHD.

1.5 Molekulare und kulturelle Methoden zur Analyse der Intestinalflora

Die mikrobielle Besiedlung des Darmes bei Säugetieren ist nicht nur abhängig von der Interaktion zwischen Wirt und Mikroorganismen (Cario 2005; Guarner & Malagelada 2003), sondern auch von zahlreichen anderen physiologischen Faktoren im Darmlumen wie beispielsweise pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck, Redoxpotential und der Verfügbarkeit von Substraten (Cummings *et al.* 1987).

Die Analyse einer mikrobiellen Flora kann sowohl durch kulturabhängige als auch durch kulturunabhängige Verfahren geschehen. Nachteil der kulturabhängigen Verfahren ist vor allem

die relativ geringe Anzahl der kultivierbaren Spezies. Für den Gastrointestinaltrakt des Menschen wird geschätzt, dass zwischen 20 bis 40% der vorkommenden Bakterienspezies kulturell nachgewiesen wurden (Tannock 2002; Tlaskalová-Hogenová *et al.* 2004; Magalhaes *et al.* 2007). Technische Fortschritte in der kulturunabhängigen Analyse von komplexen mikrobiellen Habitaten haben Schätzungen hervorgebracht, dass nur ungefähr 0,1% der gesamten mikrobiellen Flora überhaupt kulturell nachgewiesen wurden (Amann *et al.* 1995; Torsvik *et al.* 1990). Ursache für den schwierigen kulturellen Nachweis einer Vielzahl von bakteriellen Spezies sind unklare Wachstumsbedingungen der unterschiedlichen Spezies, limitierte biochemische Leistungsprüfmethoden zur Spezies-Identifizierung, Selektivität der Nachweismedien und die Kultivierungsprozedur selbst, welche für die Mikroorganismen schädlich sein kann. Auch dass die Mehrheit vor allem der distalen mikrobiellen Flora des Intestinaltraktes strikt anaerobe Bedingungen zur Kultivierung benötigt, erschwert die Nachweisquote komplexer Habitats. Weiterhin kann bei der *in vitro* Kultivierung die Interaktion zwischen Wirt und Mikroorganismen nicht aufrechterhalten werden (Zoetendal *et al.* 2004; Tannock 2001, 2002; Magalhaes *et al.* 2007). Schlussfolgernd lässt die alleinige kulturelle Analyse vermutlich keine zuverlässige Aussage über die Diversität und Zusammensetzung komplexer mikrobieller Ökosysteme zu (Ward *et al.* 1990; Amann *et al.* 1995; Torsvik *et al.* 1990; Bull *et al.* 2000; Tannock 1999).

Molekulare Methoden haben in den letzten Jahren die Erkenntnisse über das mikrobielle intestinale Ökosystem bei Säugetieren bedeutend erweitert. Merkmal dieser molekularen Methoden ist dabei der Vergleich von Nukleinsäuresequenzen (Zoetendal *et al.* 2004; Tannock 2001). Von besonderer Bedeutung ist dafür die Analyse des 16S rRNA-Genes. Dieses Gen ist bei allen Prokaryonten vorhanden und hochkonserviert (Tannock 1999). Die vergleichende Analyse dieses Genes ermöglicht die Anwendung so genannter „Fingerprint“-Methoden, wie Denaturierender-Gradienten-Gel-Elektrophorese (DGGE, Muyzer *et al.* 1993) sowie Temporäre Temperatur- oder Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese (TTGE/TGGE, Muyzer & Smalla 1998). Diese beiden Methoden basieren auf der Polymerase-Chain-Reaktion (PCR – Polymerasekettenreaktion) und einer sequenzabhängigen und temperaturabhängigen Auftrennung anhand eines chemischen oder temperaturabhängigen Gradienten in einem Polyacrylamid-Gel, welche als Ergebnis den genetischen „Fingerabdruck“ in dem Gel darstellt (Tannock 2001; Bull *et al.* 2000; Muyzer & Smalla 1998).

Aber auch die Anwendung dieser kulturunabhängigen, molekularen Methoden zur Analyse des intestinalen Ökosystems haben ihre Begrenzungen (Furrie 2006). Zum einen erfassen sie auch abgestorbene mikrobielle Organismen, welche im Wirt keine Funktion haben. Weitere

Fehlerquellen umfassen die technische Durchführung, wie beispielsweise Fehler bei der Probengewinnung, bei der DNA-Extraktion, bei der PCR-Amplifikation, bei der Auftrennung der DNA und der Datenanalyse (von Wintzingerode *et al.* 1997; Dahllöf 2002). Einige Bakterien besitzen mehrere unterschiedliche Kopien des 16S rRNA-Genes, andererseits können mehrere Bakterienspezies zu einer Position im Gel wandern (Nübel *et al.* 1996; Donskey *et al.* 2003). Die Anwendung dieser molekularen Methoden wird weiterhin durch den Nachweis erschwert, dass eine unterschiedliche Diversität zwischen Mukosa-assoziierten Bakterienflora und der von Faeces besteht (Zoetendal *et al.* 2002; Lepage *et al.* 2005; Eckburg *et al.* 2005). Außerdem muss sowohl für die kulturelle als auch für die Anwendung molekularer Methoden darauf hingewiesen werden, dass eine Analyse der Zusammensetzung und Funktion der Faecesflora keine Rückschlüsse auf die mikrobielle Besiedlung anderer Abschnitte des Gastrointestinaltraktes zulässt (Zoetendal *et al.* 2004; Marteau *et al.* 2001; Hayashi *et al.* 2005). Zusammenfassend erlaubt die kombinierte Anwendung von kulturabhängigen und kulturunabhängigen Methoden zur Analyse der Intestinalflora die umfassendsten Einblicke in die Diversität und Funktion der intestinalen Flora.

1.6 Fragestellungen, Hypothesen und Ziele

Bei akuter GvHD ist zu beobachten, dass vor allem jene Organe von den Gewebeschädigungen der Effektorphase betroffen sind, welche in enger Verbindung mit der mikrobiellen Flora der Umwelt des Transplantatempfängers stehen (Duran-Struuck & Reddy 2008; Shlomchik 2007). Zahlreiche Darstellungen der Pathogenese der GvHD gehen von einer Translokation bakterieller Bestandteile und deren Detektion durch die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems aus. Die Bedeutung der Integrität der Darmmukosa für diese Translokationen wird durch Studien am Menschen bewiesen. Patienten mit stark ausgeprägter GvHD zeigen demnach eine stärker ausgebildete Permeabilität der intestinalen Mukosa als Patienten mit nur geringgradig ausgeprägter GvHD (Johansson & Ekman 2007). Für die Induktion des gastrointestinalen Barrierschadens ist die Intensität der Konditionierung von Bedeutung (Johansson *et al.* 2001; Hill & Ferrara 2000). Einen großen Einfluss zur Induktion des charakteristischen „Zytokinsturms“ scheint der Translokation des bakteriellen Bestandteil LPS und dessen Detektion durch TLR4 zuzukommen (Hill *et al.* 1997; Cooke *et al.* 1998, 2001). Dennoch haben Studien über einen möglichen Zusammenhang von Mutationen des TLR4 und dem Auftreten akuter GvHD beim Menschen widersprüchliche Ergebnisse erbracht (Lorenz *et al.* 2001; Elmaagacli *et al.* 2006). Dass die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems bei der Pathogenese von GvHD dennoch eine Bedeutung haben könnten, wird dadurch deutlich, dass

Mutationen des NOD2-Rezeptors bei Spender und Empfänger des Transplantats eine Prädisposition für das Auftreten einer schweren akuten GvHD darstellen (Elmaagacli *et al.* 2006; Holler *et al.* 2004, 2006). Auch die Ergebnisse muriner Studien bezüglich der Bedeutung des TLR9 zur Induktion einer akuten GvHD sind richtungsweisend (Taylor *et al.* 2008; Calcaterra *et al.* 2008). Die möglichen Funktionen der Adapterproteine MyD88 und TRIF wurden bislang bei akuter iGvHD lediglich lückenhaft untersucht.

Hinweisend auf die Bedeutung der bakteriellen Intestinalflora bei der Pathogenese von akuter GvHD sind Studien, welche einen protektiven Einfluss einer kombinierten Antibiotikaintervention oder der Anwendung von Probiotika bei akuter GvHD nachweisen konnten (Beelen *et al.* 1999; Gerbitz *et al.* 2004). Detaillierte Analysen zu möglichen Veränderungen der Intestinalflora bei akuter GvHD fehlen bislang.

Einige Studien in murinen Modellen und am Menschen zeigen zwischen CED und GvHD Parallelen auf, wie beispielsweise den Einfluss von Mutationen des NOD2-Rezeptors als Prädisposition und den Einfluss von anaeroben Bakterienpopulationen der intestinalen Flora auf den Krankheitsverlauf (Heimesaat *et al.* 2006; Beelen *et al.* 1999; Elmaagacli *et al.* 2006; Gerbitz *et al.* 2004; Harris *et al.* 2006). Kürzlich konnte in unterschiedlichen murinen Modellen der CED die Bedeutung der kommensalen Darmflora für die Immunpathogenese in Interaktion mit den Rezeptoren des angeborenen Immunsystems nachgewiesen werden (Heimesaat *et al.* 2007a, 2007b; Rakoff-Nahoum *et al.* 2006).

Zusammenfassend weisen die dargestellten Ergebnisse bisheriger Studien auf eine bedeutende Rolle der gastrointestinalen Flora in Interaktion mit den Rezeptoren der angeborenen Immunität für die Pathogenese der GvHD hin. Dennoch fehlen bislang murine Studien, welche die gastrointestinale Flora bei GvHD analysieren.

Die Anwendung geeigneter Tiermodelle zur Erforschung der Pathogenese von GvHD ermöglichen wertvolle Einblicke, da im Vergleich zu Studien am Menschen eine bessere Vergleichbarkeit der *in vivo* Situation bei Veränderungen im Immunsystem erfolgen und gleichzeitig auf eine therapeutische Intervention verzichtet werden kann. In dem von uns verwendeten murinen Transplantationsmodell, bei dem eine GvHD nach Konditionierung durch Treosulfan und Cyclophosphamid durch die Gabe von allogenen Knochenmark- und Milzzellen („MHC-Mismatch“) induziert wurde, wurden Tiere mit unterschiedlichen Veränderungen von Komponenten des angeborenen Immunsystems verglichen. Hierfür verwendeten wir sowohl C57BL/10- als auch C57BL/6-Wildtypmäuse und verglichen diese mit Tieren aus dem gleichen genetischen Hintergrund, welche Mutationen bzw. eine Deletion des TLR4-, TLR2-, TLR9-, NOD2-Rezeptors und der Adaptermoleküle TRIF und MyD88 hatten. Durch die Verwendung

von Agonisten und Antagonisten konnte festgestellt werden, ob akute GvHD möglicherweise über die selektive Stimulation bzw. Antagonisierung der Rezeptoren des angeborenen Immunsystems positiv beeinflusst werden kann.

Der Vergleich zwischen den unterschiedlichen Genotypen erfolgte durch Beobachtung der Überlebensraten der Versuchstiere, detaillierte kulturelle und molekulare Analysen der gastrointestinalen Flora, histopathologische und immunhistochemische Untersuchungen.

1.6.1 Ziele der vorliegenden Arbeit

- Den Einfluss der TLRs, deren Adapterproteine und des NOD2-Rezeptors auf die Überlebensraten bei akuter GvHD in einem murinen Transplantationsmodell aufzeigen
- Die Veränderungen der intestinalen Flora im Verlauf einer akuten GvHD darstellen
- Den Einfluss der TLRs, deren Adapterproteine und des NOD2-Rezeptors auf die mikrobielle Intestinalflora bei akuter GvHD feststellen
- Den Einfluss der TLRs, deren Adapterproteine und des NOD2-Rezeptors auf die Ausbildung histopathologischer Veränderungen bei akuter GvHD bestimmen
- Die Immunreaktion im Colon nach Transplantation bei Tieren ohne und mit Mutationen bzw. Deletion im angeborenen Immunsystem analysieren
- Feststellen, ob durch die Stimulation bzw. die Antagonisierung der TLRs / des NOD2-Rezeptors der Verlauf der akuten GvHD beeinflusst werden kann

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Chemikalien und Hersteller

Substanz	Hersteller
Agarose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumchlorid	Roth
Ammoniumperoxodisulfat	Roth
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Bromphenolblau	Bio – Rad, München, Deutschland
Ciprofloxacin	Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland
Cyclophosphamid	Baxter, Deerfield, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA, Pasching, Österreich
Eisessig (glacial)	Merck
Entellan®	Merck
Eosin	Merck
Ethanol	JJ Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromidlösung 1%	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure	Roth
Forene®	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
Formaldehyd	Roth
Formaldehyd Lösung 4% gepuffert	Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland
Formamid deionisiert	Roth
Glycerin	Roth
Gram's crystal violet Solution	Fluka, Steinheim, Deutschland
Gram's safranin Solution	Fluka
Hämalaun nach Mayer	Merck
Harnstoff	Roth
Imipenem	MSD, Haar, Deutschland
Isoamylalkohol	Sigma – Aldrich, München, Deutschland
Isopropylalkohol 100%	Herbeta Arzneimittel
Lugols Lösung	Merck
Metronidazol	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Microbiologica Bactident® Oxidase	Merck
Muramyl-dipeptid (MDP)	Sigma, Osterode, Deutschland
Natriumchlorid	Roth
Rapid Gel XL 40%	USB, Cleveland, USA
Roti®Phenol	Roth
Salzsäure	Merck
Silbernitrat	Roth
SYBR Green I	Fluka
TEMED: N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin	Roth
TLR9-Antagonist iODN 2088	Zur Verfügung gestellt von Prof. Marina Freudenberg (Max – Planck – Institut für Immunbiologie, Freiburg im Breisgau)
TMB: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	Sigma – Aldrich
Treosulfan	Medac, Wesel, Deutschland
Trichloromethan (Chloroform)	Merck
Tris-Buffered Saline	Dako, Glostrup, Dänemark
Vancomycin	Cell Pharm, Bad Vilbel, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%	ROTIPURAN, Karlsruhe, Deutschland
Xylencyanol FF	Bio – Rad, Hercules, USA
Xylene (Xylol)	J.T. Baker, Phillipsburg, USA

2.1.2 Geräte und kommerzielle „Kits“

Tabelle 2: Geräte

Gerätbezeichnung	Hersteller
Horizontale Gel Elektrophorese	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Vacuum Zentrifuge	Heraeus Instruments
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
FastPrep FP120	Bio 101, La Jolla, USA
Model 475 Gradient Delivery System	Bio – Rad
GeneGenius	Syngene, Cambridge, England
Microprozessor pH meter ph3000	WTW, Weilheim, Deutschland
Anaerobier-Töpfe	Oxoid, Wesel, Deutschland
AnaeroGen®-Beutel	Oxoid
Anaerostat®	Merck
GelBond PAG Film	Biozym, Hessisch – Oberdorf, Deutschland
DCode Universal Mutation Detection System	Bio – Rad
DGene	Bio – Rad
CEQ®8000 Genetic Analysis System	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
SpectraFluor Plus	Tecan, Crailsheim, Deutschland
Microm HM 355	MICROM GmbH, Walldorf, Deutschland
Zeiss Standard 25	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Objekträger	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Capillary Gap Microscope Slides	Dako
TEC5 EME-2 5230 TecTM Tissue Tek®	Sakura, Staufen, Deutschland
Shandon EXCELSIOR ES	Thermo Electro Corporation, Waltham, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Deckgläser	Menzel – Gläser, Braunschweig, Deutschland

Tabelle 3: Kommerzielle „Kits“

Kitbezeichnung	Hersteller
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
DTCS® Quick Start Kit	Beckman Coulter
QIAmp DNA Mini Kit	Qiagen
CleanSEQ®	Agencourt, Beverly, USA
StreptavidinAP Kit (K5005)	Dako
Envision Peroxidase Kit (K4010)	Dako

2.1.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
Agarose-Gel Probenpuffer	1,5 g Ficoll, 25 mg Bromphenolblau, 25 mg Xylen Cyanol FF, Aqua dest. auf 10 ml
Lysispuffer	10 mmol Tris pH 8,0 (Salzsäure), 150 mmol Natriumchlorid, 20 mmol EDTA, 1% SDS, Aqua dest. auf 100 ml
Färbelösung	1 g Silbernitrat, 3,5 ml 37% Formaldehyd, Aqua dest. auf 1000 ml
Entwickler	67,4 g Natriumcarbonat-Decahydrat, 1 ml 2% Natriumthiosulfatlösung (w/v), 3,5 ml 37% Formaldehyd, Aqua dest. auf 1000 ml
PCR-Puffer (10x)	100 mmol Tris-Salzsäure, pH 8,3, 500 mmol Kaliumchlorid
Polyacrylamid-Gel (für DGGE)	21 g Harnstoff, 5 ml Rapid Gel XL (40%), 6 ml 10x TBE, 500 µl DMSO, Aqua dest. auf 50 ml: Polymerisierung mit 292 µl APS (10%), 30 µl TEMED
Stammlösung I 0%	50 ml RapidGel XL (40%), 2,5 ml TAE (50x), 5 ml Glycerin, Aqua dest. auf 250 ml

Stammlösung II 100%	105,4 g Harnstoff, 100 ml Formamid, 50 ml RapidGel XL (40%), 2,5 ml TAE (50x), 5 ml Glycerin, Aqua dest. auf 250 ml
TAE-Puffer (50x)	242 g Tris-Base, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 500 mmol EDTA, Aqua dest. auf 1000 ml
TBE-Puffer (10x) (für Agarose-Gel)	108 g Tris-Base, 27,5 g Borsäure, 7,3 g EDTA, Aqua dest. auf 1000 ml
TE-Puffer	0,01 M Tris-Salzsäure, pH 7,6, 1 mmol EDTA
Erythrozytenlysepuffer	8,29 g Ammoniumchlorid, 1,0 g Kaliumhydrogencarbonat, 0,372 g EDTA Titriplex III, Aqua dest. auf 1000 ml

2.1.4 Oligonukleotidprimer

Tabelle 5: Oligonukleotidprimer

Primer – Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	16S Positionen (<i>E.coli</i> -Zählung)	Orientierung
TPU1 / 8f	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	08:27	F
RTU8	AAGGAGGTGATCCANCCRCA	1541:1522	R
HDA1GC	CGCCCGGGCGCGCCCGGGCGGAGT GGCGGGGGCACGGGGGACTCCTAC GGGAGGCAGC	339-360	F+GC
HDA2	GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC	539-518	R
16S 968F-GC	CGCCCGGGCGCGCCCGG GGCGGGGGGGGGCACGGG GGGAACGCGAAGAACCTTAC	968-84	F+GC
16S 1378R	AACGCGAAGAACCTTAC	1401-1378	R

2.1.5 DNA-Längenmarker, Enzyme

Tabelle 6: Längenmarker, Enzyme

Produktbezeichnung	Hersteller
Gene Ruler 50 bp DNA Ladder (0,5µg/µl)	Fermentas, St. Leon – Rot, Deutschland
Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus	Fermentas
Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (0,5µg/µl)	Fermentas
Ampli Taq DNA Polymerase	Applied Biosystems, Foster City, USA
Proteinase K	Roth
Lysozym	Fluka

2.1.6 Antikörper

Tabelle 7: Antikörper

Antikörper	Hersteller	Lösung
Myeloperoxidase (MPO7)	Dako	1:10000
cleaved Caspase3	Cell Signaling, Danvers, USA	1:200
CD3	Dako	1:10
FOXP3	eBioscience, San Diego, USA	1:100
Ki67	Dako	1:500
biotinylated donkey anti-rat rabbit anti-rat	Dianove, Hamburg, Deutschland Dako	

2.1.7 Material für die Tierhaltung

Tabelle 8: Materialien für die Tierhaltung

Material	Bezeichnung	Hersteller
Käfige (Haltung)	Makrolonkäfige Typ III	Ebeco, Castrop – Rauxel, Deutschland
Käfige (Zucht)	Makrolonkäfige Typ II-lang	Ebeco
Einstreu	sniff ¾ Faser	sniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland
Futter (Haltung)	V1530-300R/M-H	sniff Spezialdiäten GmbH
Futter (Zucht)	V1124-300	sniff Spezialdiäten GmbH

2.1.8 Nährmedien

Tabelle 9: Nährmedien

Name	Firma / Art. Nr.	Einsatzbereich
Columbia SB 5% Agar	Oxiod, PB5039A	Fester, nicht selektiver Universalnährboden, Wachstum anspruchsvoller Mikroorganismen
Columbia SB 5% CNA	BD, 257306	Selektivnährboden für grampositive Kokken, zum Beispiel Enterokokken, Staphylokokken
MacConkey Nr. 3	Oxiod, PO5002A	Selektivnährboden für <i>Enterobacteriaceae</i> , Nachweis einer Laktosespaltung durch die Bildung von Acetaldehyd – Laktose-positiv à rötliche bis lila Farbreaktion Laktose-negativ à blaß
Columbia SB und Vitamin K + Haemin und Kanamycin / Vancomycin	Heipha, Dr. Müller GmbH 382e	Selektivnährboden, enthält Kanamycin und Vancomycin. Quantifizierung von <i>Bacteroides</i> / <i>Prevotella</i> spp. bei anaerober Bebrütung
Rogosa-Agar	Merck, 1.05413.0500	Selektivnährboden für <i>Lactobacillus</i> spp.
Hirn-Herz-Glucose-Bouillon	Oxoid, CM0225B	Flüssigvollmedium (Anreicherungsmedium)

2.1.9 Standardisierte Identifizierungssysteme zur mikrobiologischen Diagnostik

Tabelle 10: Systeme

Bezeichnung	Hersteller	Identifizierungsspektrum
Api [®] 10 S „Bunte Reihe“	bioMérieux Abteilung Medizinische Mikrobiologie der Charité	<i>Enterobacteriaceae</i> , andere gramnegative Stäbchen <i>Enterobacteriaceae</i> und Antibiogramm
Api [®] rapid ID 32 A	bioMérieux	anaerobe Bakterien
Api [®] 50 CH / CHL	bioMérieux	<i>Lactobacillus</i> spp. und verwandte Spezies
Api [®] rapid ID 32 STREP	bioMérieux	Streptokokken und andere grampositive Kokken

2.2 Versuchstiere

2.2.1 Mausstämme

Tabelle 11: Mausstämme

Bezeichnung	Wildtypstamm	Kreuzungsstatus – August 2008
C57BL/10	C57BL/10	Inzucht (100%)
C57BL/6	C57BL/6	Inzucht (100%)
Balb/c	Balb/c	Inzucht (100%)
TLR2 ^{-/-}	C57BL/10-ScSn	TLR2 ^{-/-} - 6x auf C57BL/10-ScSn rückgekreuzt
TLR4 ^{-/-}	C57BL/10-ScN	Inzucht (100%), natürlicher TLR4-Defekt
TLR2/4 ^{-/-}	C57BL/10-ScSn/ScN	TLR2 ^{-/-} - 7x auf C57BL/10-ScN rückgekreuzt
TLR9 ^{-/-}	C57BL/6	Erzeugung mittels homologer Rekombination TLR9 ^{-/-} - 3x auf C57BL/6 rückgekreuzt
TRIF ^{-/-}	C57BL/6	Erzeugung mittels Mutagenese bei männlichen C57BL/6-Mäusen
NOD2 ^{-/-}	C57BL/6	NOD2 ^{-/-} - 6x auf C57BL/6 rückgekreuzt
MyD88 ^{-/-}	C57BL/6	Erzeugung mittels Gentergeting

Die TLR2^{-/-}-, TLR4^{-/-}-, TLR2/4^{-/-}-, TLR9^{-/-}- und TRIF^{-/-}-Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Marina Freudenberg (Max – Planck – Institut für Immunbiologie, Freiburg im Breisgau), die MyD88^{-/-}-Tiere von Prof. Ulrich Steinhoff (Max – Planck – Institut für Infektionsimmunologie, Berlin) zur Verfügung gestellt und die NOD2^{-/-}-Tiere bei The Jackson Laboratories (Bar Harbor, USA) kommerziell erworben.

Die TLR4(TLR4^{-/-})-Defizienz kam aufgrund einer spontanen homozygoten Deletion des TLR4-Genes (Merlin *et al.* 2001) mit daraus resultierendem kompletten Funktionsverlust zustande.

Die TLR2(TLR2^{-/-})-Defizienz wurde mittels Gentergeting erzeugt und in der Folge auf einen C57BL/10ScSn-Hintergrund gekreuzt (Werts *et al.* 2001; Lembo *et al.* 2003). Die TLR2^{-/-}-Tiere wurden schließlich sechsfach mit C57BL/10ScSn-Tieren rückgekreuzt.

Die TLR2/4(TLR2/4^{-/-})-Defizienz wurden durch Kreuzung von TLR2^{-/-}-C57BL/10ScSn- mit TLR4^{-/-}-C57BL/10ScN-Mäusen erzeugt und durch siebenfache Rückkreuzung eine Inzucht generiert (Lembo *et al.* 2003).

Die TLR9(TLR9^{-/-})-Defizienz wurden mittels homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen erzeugt. Der produzierte Vektor wurde in C57BL/6-Blastozysten injiziert. Die Nachkommen wurden untereinander gekreuzt, um homozygote Nachkommen zu erhalten (Hemmi *et al.* 2000). Es erfolgte eine dreifache Rückkreuzung auf den genetischen C57BL/6-Hintergrund (Kalis *et al.* 2005).

Die Erzeugung der NOD2(NOD2^{-/-})-Defizienz erfolgte mittels Gentergeting. Das Konstrukt wurde in 129S1/Sv-Stammzellen integriert und in die Blastozysten von C57BL/6-Tiere injiziert. Die Rückkreuzung erfolgte sechsfach auf den C57BL/6-Hintergrund (Kobayashi *et al.* 2005). Die NOD2^{-/-}-Tiere wurden bei The Jackson Laboratories (Bar Harbor, USA) gekauft.

Die TRIF(TRIF^{-/-})-Defizienz wurden durch die Gabe von *N*-Ethyl-*N*-Nitro-Sourea, welches eine Mutagenese der Keimbahn bedingt, an männliche Mäuse erzeugt. Abschließend wurde eine Inzucht der Tiere generiert (Hoebe *et al.* 2003).

Die Herstellung der MyD88(MyD88^{-/-})-Defizienz erfolgte durch Ausschaltung des MyD88-Genes mittels homologer Rekombination in der Stammzelle (Adachi *et al.* 1998).

Die Züchtung der verwendeten Mausstämmen erfolgte im Forschungszentrum für Experimentelle Medizin (FEM) in Berlin-Steglitz. Sämtliche Experimente wurden gemäß den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

2.2.2 Haltungsbedingungen

Die für diese Arbeit verwendeten Tiere wurden im Forschungszentrum für Experimentelle Medizin (Berlin) gehalten. Für die Tierversuche wurden Tiere des gleichen Geschlechtes, zwischen zehn und 14 Wochen alt, verwendet. In den Räumen der Tierhaltung wurden folgende Bedingungen geschaffen: Spezifisch-Pathogenfrei (SPF), 21°C, 50% relative Luftfeuchte, 12 / 12 Stunden Hell- und Dunkelrhythmus. Während des gesamten Versuchablaufes hatten die Tiere freien Zugang zu Leitungswasser und Futter. Einmal die Woche wurden die Tiere in Käfige mit frischem Einstreu, frischem Leitungswasser und autoklaviertem Futter gesetzt.

2.3 Tierversuche

Die Tierversuche der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen des Tierversuchvorhabens 0126/05 und des Tötungsantrages 0046/05 durchgeführt. Die Dauer der Genehmigung ist der Tötungsanzeige war vom 24.02.2005 bis zum 28.02.2009, das Tierversuchvorhabens war vom 10.08.2005 bis zum 31.08.2009 befristet.

2.3.1 Induktion der GvHD durch Konditionierung und Transplantation

Die myeloablative Konditionierung erfolgte durch die Gabe von Treosulfan (Medac) und Cyclophosphamid (Baxter). Am Tag drei (d-3) bis zum Tag eins (d-1) vor Transplantation wurde den Tieren 2000 mg Treosulfan pro kg Körpergewicht intraperitoneal (i.p.) gespritzt, am Tag eins (d-1) vor Transplantation zusätzlich 200 mg Cyclophosphamid pro kg Körpergewicht i.p. verabreicht (Abb. 3).

Am Tag null (d0) erfolgte die Stammzelltransplantation. Dazu wurde von Balb/c-Mäusen die Milzen, der Femur, die Tibia und die Fibula asserviert. Für die anschließende Zell-Präparation wurde aus den Knochen mithilfe von sterilen Phosphate-Buffered-Saline (PBS; PAA) das Knochenmark gespült, die Milzen in PBS suspendiert und einer Erythrozytenlyse zugeführt. Um zu gewährleisten, dass jedem Tier dieselbe Menge an Stammzellen zugeführt wurde, erfolgte die Zählung der asservierten Zellen und das Volumen der Zelllösung wurde entsprechend angepasst. Abschließend wurden die gewonnenen Zellen aus beiden Geweben zusammengeführt. Den zu transplantierenden Mäusen wurden 5×10^6

Knochenmarkzellen und 3×10^6 Milzzellen, gelöst in 0,3 ml PBS, durch Injektion in die Schwanzvene verabreicht.

2.3.2 Behandlung mit MDP und TLR9-Antagonist

MDP (Sigma) wurde in einer Dosis von 100 μg , gelöst in 0,3 ml sterilen PBS, den zu transplantierenden C57BL/6-Wildtypen i.p. verabreicht. Die Verabreichung erfolgte parallel zur Konditionierung an drei Folgetagen (d-3, d-2, d-1) vor Transplantation.

Der TLR9-Antagonist iODN 2088 wurde freundlicherweise von Prof. Marina Freudenberg (Max – Planck – Institut für Immunbiologie, Freiburg im Breisgau) zur Verfügung gestellt. Dieser wurde einer weiteren Gruppe von C57BL/6-Wildtypen am Tag zwei (d2) nach Transplantation in einer Dosierung von 200 μg , gelöst in 0,3 ml sterilen PBS, i.p. gespritzt.

Parallel zu beiden Behandlungsgruppen wurde zur internen Kontrolle einer weiteren Gruppe C57BL/6-Wildtypen zu den gleichen Zeitpunkten PBS i.p. verabreicht und diese Tiere analog zu den Behandlungsgruppen konditioniert, transplantiert und im weiteren Experimentalverlauf wie die anderen transplantierten Tiere beobachtet. Am Tag neun erfolgte die planmäßige Probenentnahme.

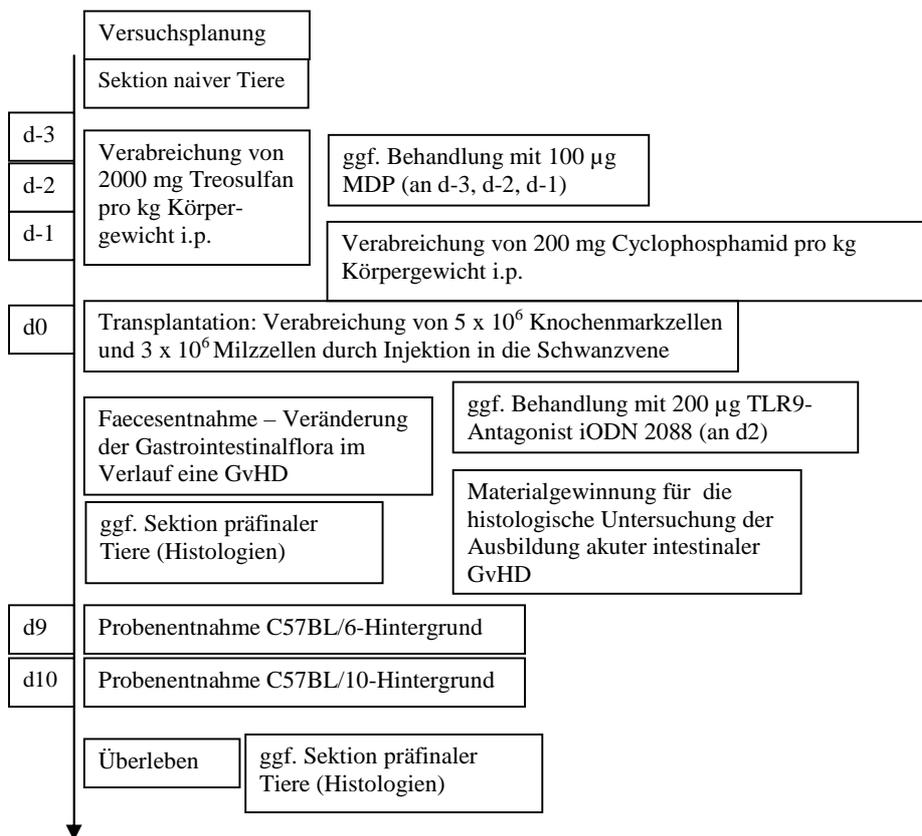


Abb. 3: Übersicht über den zeitlichen Experimentalverlauf. „d“ gibt als Tag die Zeitpunkte der durchgeführten Arbeitsschritte an.

2.3.3 Generierung und Haltung gnotobiotischer Mäuse

Um die Gastrointestinalflora der Tiere zu eradizieren, wurden die Tiere zunächst in autoklavierte Käfige mit Abdeckhauben transferiert und unter den genannten Bedingungen gehalten (2.2.2). Ein Antibiotikaregime, bestehend aus Ciprofloxacin (200 mg / l; Bayer Vital), Metronidazol (1 g / l; Fresenius), Ampicillin (1 g / l; Ratiopharm), Imipenem (250 mg / l; MSD) und Vancomycin (500 mg / l; Cell Pharm) wurde über das Trinkwasser ad libitum über die Zeit von mehreren Wochen verabreicht. Einmal wöchentlich wurde von den Tieren unter sterilen Bedingungen Faecesproben gewonnen. Diese wurden in Hirn-Herz-Glucose-Bouillon (Oxiod) bei 37°C bebrütet. Bei Eintrübung, spätestens aber nach einer Woche, erfolgte der fraktionierte Ausstrich auf entsprechende Nährmedien.

War in der Folge von drei Wochen im Faeces der Tiere keine kultivierbaren Spezies zu finden, erfolgte die Induktion der GvHD durch Konditionierung und Transplantation (2.3.1) unter sterilen Bedingungen.

2.3.4 Probenentnahme

Falls kein Überleben der Tiere beurteilt werden sollte, erfolgte am Tag neun bzw. zehn nach Stammzelltransplantation die Tötung der Mäuse durch das Inhalationsnarkotikum Forene® (Abbott). Die Sektion von Mäusen im C57BL/6-Hintergrund erfolgte am Tag neun, im C57BL/10-Hintergrund am Tag zehn nach Stammzelltransplantation. Diese Zeitpunkte wurden ausgewählt, um die stärkste Ausprägung der intestinalen GvHD (iGvHD) darzustellen (Abb. 3). Präfinale Tiere wurden gegebenenfalls vor dem geplanten Sektionstag zur Materialgewinnung für histologische Untersuchungen und naive Tiere als gesunde Vergleichsgruppe seziiert.

Nach der Tötung wurden die Tiere einer Ganzkörperdesinfektion durch Eintauchen in 70% Isopropylalkohol (v/v, Herbeta Arzneimittel) unterzogen. Brust- und Bauchfell wurden steril eröffnet, anschließend wurde der Situs durch einen Y-Schnitt des Peritoneums eröffnet. Es erfolgte zunächst eine makroskopische Beurteilung der Organe. Dabei wurde der Gastrointestinaltrakt insbesondere bezüglich Einblutungen, Stenosen, Organgröße, Stuhlkonsistenz beurteilt und auf Neoplasien geachtet. Der Darm wurde vom Mesenterium gelöst und aus dem Situs entnommen.

Zur Florenanalyse der einzelnen Abschnitte des Gastrointestinaltraktes wurde aus Magen, Jejunum, Ileum und Colon jeweils luminaler Inhalt in ein Eppendorftube, gefüllt mit 1,5 ml sterilen 0,9% NaCl (Roth), überführt. Bis zum Ende der Probenentnahme wurden die Eppendorftubes auf Eis gelagert. Aufgrund der mechanischen Belastung eignete sich der Darmabschnitt, aus dem der luminaler Inhalt gewonnen wurde, nicht zur mikroskopischen Beurteilung und wurde verworfen. Die restlichen Darmabschnitte wurden in Einbettkassetten für Histologien gelegt und in 5% Formalin fixiert (Abb. 4).

Um Veränderungen der Gastrointestinalflora im Verlauf einer akuten GvHD festzustellen, wurde vor, am Tag und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transplantation Faeces der lebenden Tiere in Eppendorftubes mit 1,5 ml sterilen 0,9% NaCl asserviert.

Um die Auswirkungen der allogenen Stammzelltransplantation auf den Gastrointestinaltrakt zu untersuchen, wurden weiterhin Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Versuchablaufes (beispielsweise vor Konditionierung, bei der Transplantation und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transplantation) sezirt und die Darmabschnitte zur histologischen Untersuchung asserviert.

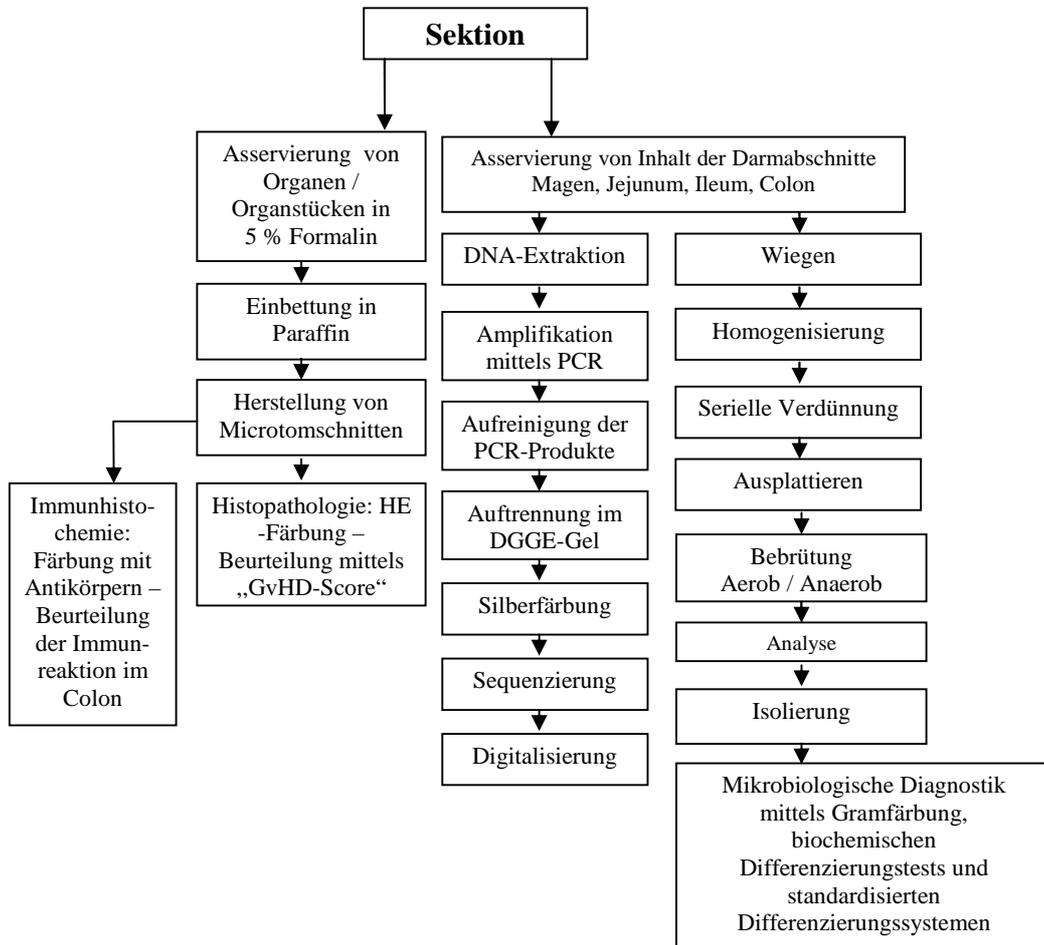


Abb. 4: Übersicht über die Probenentnahme

2.4 Kulturelle Analysen der Gastrointestinalflora

2.4.1 Gewichtsbestimmung des luminalen Inhaltes des Gastrointestinaltraktes

Bei der kulturellen Analyse wurde die enthaltene Bakterienmenge auf das Gewicht des gewonnenen luminalen Inhaltes des Gastrointestinaltraktes bezogen. Dazu wurden die mit 1,5 ml sterilen 0,9% NaCl gefüllten Eppendorftubes vor und nach Zugabe des luminalen Magen- / Darminhaltes gewogen und die Differenz errechnet.

2.4.2 Kultivierung der Bakterien

Weder die Überwucherung noch die zu geringe Bewachsung der Agarplatten ermöglichte eine Differenzierung und Quantifizierung der mikrobiellen Gastrointestinalflora. Um die Auswertung zu optimieren, wurden unterschiedliche Verdünnungsstufen verwendet. Als optimal für die Analyse der Colon-, Ileum- und Jejunumflora erwies sich das Auftragen von unverdünntem Darminhalt, zusammen mit der Verwendung von zwei Verdünnungen um jeweils zwei logarithmische Stufen (Abb. 5, 6). Für die Analyse der Magenflora wurde der Mageninhalt unverdünnt und in einer 1:100 Verdünnung auf Nährböden aufgetragen (Abb. 7). Zunächst wurde dazu der in den Eppendorftubes enthaltene Magen- und Darminhalt mit einem sterilen Tupfer homogenisiert. Um eine 1:100 Verdünnung zu erhalten, wurden 100 µl des Homogenats in ein Falcon Tube, gefüllt mit 10 ml sterilen 0,9% NaCl, überführt. Aus diesem Falcon Tube wurden wiederum 100 µl Inhalt entnommen und in ein weiteres, mit 10 ml sterilen 0,9% NaCl gefülltes Tube gegeben, um eine 1:10000 Verdünnung zu erzeugen.

Die Verwendung der Verdünnungsstufen ermöglichte weiterhin eine interne Qualitätskontrolle, da zwischen den unterschiedlichen Verdünnungsstufen eine Differenz der Keimzahl von zwei logarithmischen Stufen bestehen sollte.

Aufgrund der unterschiedlichen mikrobiellen Besiedlung des Gastrointestinaltraktes wurde die Verwendung der Universal- und Selektivnährböden (Tabelle 9) in unterschiedlichen Verdünnungsstufen auf die zu analysierenden Abschnitte des Gastrointestinaltraktes angepasst (Abb. 5, 6, 7).

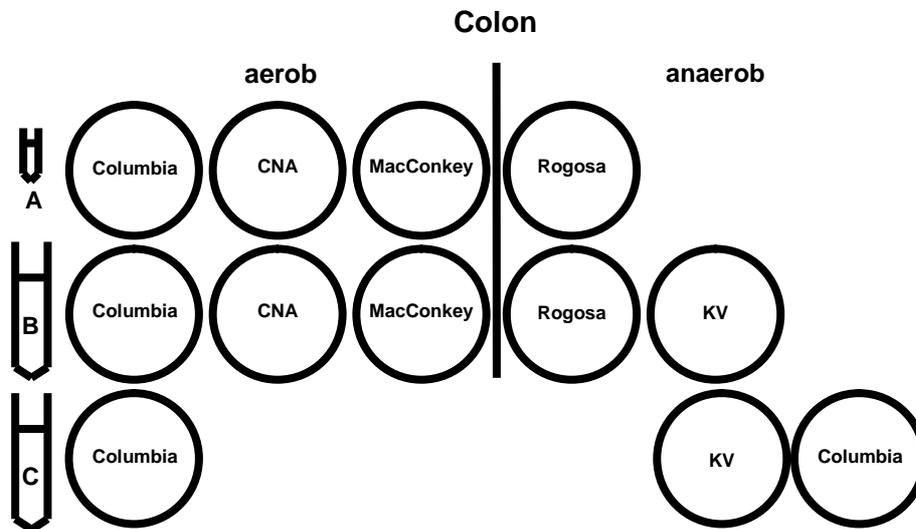


Abb. 5: Schematische Darstellung der verwendeten Nährböden für die kulturelle Analyse der Colonflora. „A“ ist unverdünnter Organinhalt. „B“ zeigt die 1:100 Verdünnung an. „C“ stellt die 1:10000 Verdünnung dar.

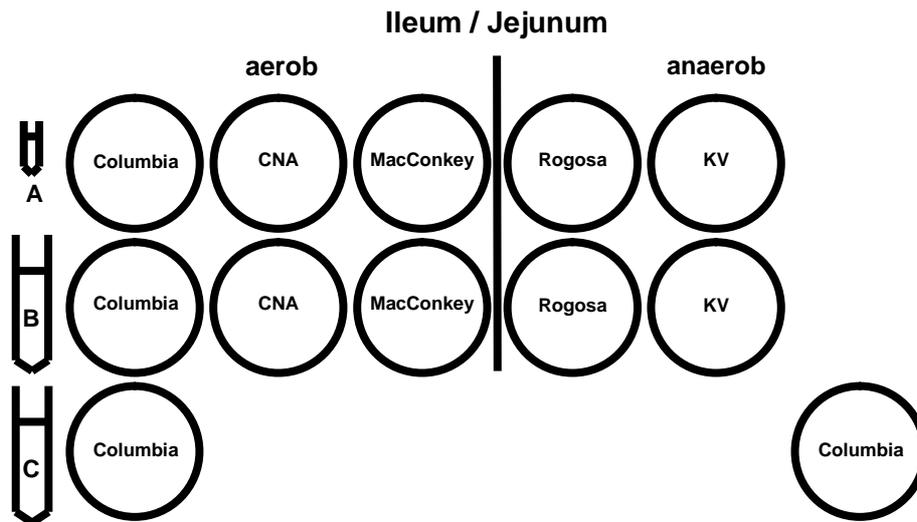


Abb. 6: Schematische Darstellung der verwendeten Nährböden für die kulturelle Analyse der Ileum- und Jejunumflora. „A“ ist unverdünnter Organinhalt. „B“ zeigt die 1:100 Verdünnung an. „C“ stellt die 1:10000 Verdünnung dar.

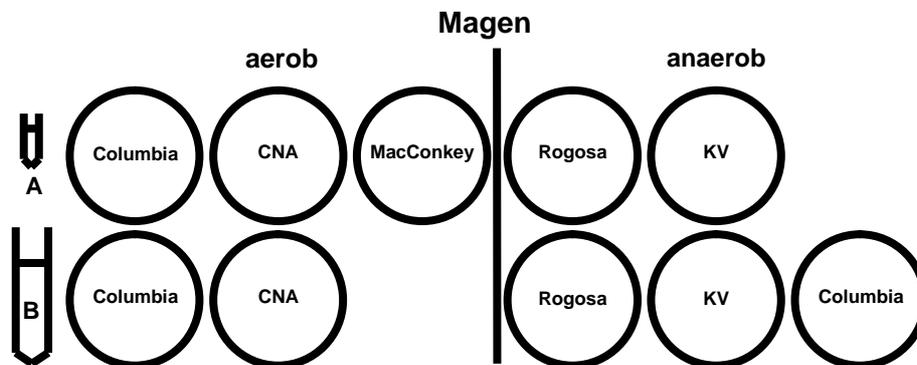


Abb. 7: Schematische Darstellung der verwendeten Nährböden für die kulturelle Analyse der Magenflora. „A“ ist unverdünnter Organinhalt. „B“ zeigt die 1:100 Verdünnung an.

Es wurden jeweils 100 µl des unverdünnten Magen- / Darminhaltes und der Verdünnungsstufen auf die Nährböden aufgebracht und mit einem Glasspatel gleichmäßig ausplattiert. Anschließend erfolgte die aerobe Bebrütung der Columbia- (Oxid), MacConkey- (Oxid) und Colistin / Nalidixin Säure (CNA)-Agares (BD). Um optimales Wachstum zu erreichen, wurden die Columbia- und CNA-Nährböden bei 37°C bei 5% CO₂ inkubiert. Für die MacConkey-Agares war eine Bebrütung bei 37°C und normaler Atmosphäre ausreichend. Die anaerobe Bebrütung der Kanamycin / Vancomycin (KV)- (Heipha), Rogosa- (Merck) und weiterer Columbia-Nährböden erfolgte bei 37°C. Um eine sauerstofffreie Atmosphäre zu erzeugen, wurden in Anaerobiatöpfen unter der Verwendung des AnaeroGen® Systems (Oxid) bebrütet. Zur Kontrolle der anaeroben Atmosphäre im Topf wurden spezielle Indikatorstreifen verwendet (AnaeroTest, Oxid).

2.4.3 Kulturelle aerobe Analyse

Sowohl für die aerobe als auch für die anaerobe Analyse der Intestinalflora ist zu beachten, dass es sich um eine rein deskriptive Beschreibung anhand von Koloniemorphologien handelt. Die Quantifizierung der Kolonie-bildenden-Einheiten (KBE) unterschiedlicher Morphotypen erfolgte nach folgendem Prinzip:

Tabelle 12: Quantifizierung der KBE

Gezählte KBE	Notierte KBE
1	10 ¹
10	10 ²
100	10 ³
1000	10 ⁴
beginnend konfluierend	10 ⁵
konfluierend	10 ⁶
Überwucherung	>10 ⁶

Um die Quantifizierung zu präzisieren, wurden Abstufungen zwischen den notierten logarithmischen Zahlen vorgenommen. Bei 500 gezählten KBE wurde beispielsweise 10³⁻⁴ aufgeschrieben.

Die Begutachtung der aerob bebrüteten Platten erfolgte nach 24 und 48 Stunden.

Bei der Begutachtung nach 24 Stunden wurden die unterschiedlichen Koloniemorphologien dokumentiert und quantifiziert. Fragliche Kolonimorphen wurden auf Universal- und Selektivnährböden isoliert, um nach weiteren 24 Stunden Bebrütung Gramfärbungen (2.4.5), mikrobiologische Differenzierungstests (2.4.6, 2.4.8) und gegebenenfalls eine Sequenzierung (2.7.4, 2.7.5) vorzunehmen. Falls bei der Subkultivierung keine Reinkultur angelegt werden konnte, waren zumindest für die Anwendung der Differenzierungssysteme und der Sequenzierung weitere Isolierungen bis zur Reinkultur notwendig. Nach der Begutachtung wurden die Nährböden für weitere 24 Stunden inkubiert. Für die Sequenzierung und Differenzierungstests wurden Subkultivierungen von Columbia-Nährböden verwendet.

Um minimale Konzentrationen von Bakterienpopulationen im Faeces nachzuweisen, wurde 100 µl des Faeceshomogenats in eine Hirn-Herz-Glucose-Bouillon überführt, 24 Stunden bebrütet und auf entsprechende Nährmedien fraktioniert ausgestrichen.

Bei der zweiten Begutachtung wurden Koloniemorphologien, welche nach 24 Stunden Bebrütung noch nicht gewachsen waren, dokumentiert, quantifiziert und die notierten Ergebnisse der ersten Begutachtung gegebenenfalls korrigiert. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurden außerdem die Rogosa-Nährböden begutachtet, so dass ein Vergleich zwischen aeroben und anaeroben Wachstum von *Lactobacillus* spp. möglich war.

2.4.4 Kulturelle anaerobe Analyse

Bei der rein deskriptiven Analyse der anaeroben Bakterienpopulation wurde grundsätzlich die gleiche Methodik der Quantifizierung (Tabelle 12) und Differenzierung wie bei der aeroben Analyse verwendet.

Die Begutachtung der anaeroben Nährböden erfolgte nach 48 und 72 Stunden anaerober Bebrütung. Nach 48 Stunden wurde die Quantifizierung der *Lactobacillus* spp. auf Rogosa-Nährböden vorgenommen.

Nach 72 Stunden erfolgte die Begutachtung der anaerob bebrüteten KV- und Columbia-Nährböden. Nach Dokumentation und Quantifizierung der Morphotypen wurde fakultativ anaerobes von obligat anaerobem Wachstum differenziert. Dazu wurden repräsentative Morphotypen von einem anaerob inkubierten Nährboden auf zwei Columbia-Nährböden subkultiviert (fraktionierter Ausstrich). Eine dieser zwei Platten wurde aerob, die andere anaerob bebrütet. Die Begutachtung der aerob bebrüteten Platte erfolgte nach 24 und 48 Stunden, die der anaerob bebrüteten Platte nach 72 Stunden Inkubation. Beim Ablesen dieser Platten wurde nicht nur die Koloniemorphologie notiert, sondern auch bis in welchen Ausstrich Wachstum vorzufinden war. Bei strikt anaeroben Bakterienspezies war lediglich auf dem anaerob bebrüteten Nährboden ein Wachstum, bei fakultativen anaeroben Bakterienspezies war kein unterschiedliches Wachstumsverhalten auf der anaerob und aerob bebrüteten Platte, bei mikroaerophilen Wachstum war bei der aerob bebrüteten Platte im ersten Ausstrich minimales Wachstum und Wachstum bis zum dritten Ausstrich bei der anaerob inkubierten Platte zu beobachten.

Anschließend konnte von den Subkulturen Gramfärbungen (2.4.5), mikrobielle Differenzierungstests (2.4.6 und 2.4.8) und Sequenzierungen (2.7.4, 2.7.5) angefertigt werden. Wie bei der aeroben Diagnostik waren Sequenzierung und die Anwendung von Differenzierungssystemen nur bei Reinkulturen möglich.

2.4.5 Gramfärbung

Zunächst wurde eine KBE von einer zu untersuchenden Koloniemorphologie mit einem sterilen Glasstab aufgenommen und auf einen gereinigten Objektträger mit einem Tropfen 0,9% steriler NaCl-Lösung gebracht. Das Präparat wurde luftgetrocknet und für zwei Minuten in Methanol fixiert. Die Gramfärbung erfolgte nach folgendem Protokoll:

Tabelle 13: Protokoll der Gramfärbung

Arbeitsschritt	Dauer
Gram's crystal violet Solution	2 Minuten
Spülen mit Aqua dest.	kurz
Lugols Lösung	2 Minuten
Spülen mit Aqua dest.	kurz
Ethanol 96%	10-15 s
Spülen mit Aqua dest.	kurz
Gram's safranin Solution	1 Minute
Spülen mit Aqua dest.	kurz

Die Präparate wurden anschließend luftgetrocknet und in Ölimmersion bei 1000facher Vergrößerung mikroskopiert. Dokumentiert wurde neben dem Färbeverhalten (grampositiv / gramnegativ) die Bakterienform (Kokken / Stäbchen).

2.4.6 Katalase- und Oxidasetest zur mikrobiologischen Differenzierung

Um bereits vor der Sequenzierung Hinweise auf die Bakteriengattung zu erhalten, wurden folgende mikrobiologische Differenzierungstests verwendet:

1. Katalase-Test:

Prinzip: Toxisches Wasserstoffperoxid wird durch das Enzym Katalase in Wasser und Sauerstoff gespalten. Die Entstehung von Sauerstoff wird durch Bläschenbildung angezeigt.

Differenzierung (Beispiel): Das Enzym Katalase ist grundsätzlich bei Staphylokokken vorhanden. Eine Differenzierung von Staphylokokken gegen andere grampositive Kokken, wie beispielsweise Enterokokken und Streptokokken wird ermöglicht.

Durchführung: Von einem Nährboden wird eine KBE aufgenommen und in einen Tropfen 10% Wasserstoffperoxid (ROTIPURAN) gebracht. Katalase-positive-Kulturen liegen bei „Sprudeln“ vor.

2. Oxidase-Test:

Prinzip: Das Enzym Oxidase führt zu einer Oxidation von Cytochrom. Die Oxidation resultiert in einem Farbumschlag.

Differenzierung (Beispiel): *Pseudomonas* spp. ist Oxidase-positiv. Die Differenzierung dieser Bakteriengattung von beispielsweise *Enterobacteriaceae* spp. wird ermöglicht.

Durchführung: Eine KBE wird auf einen Oxidase-Teststreifen (Microbiologica Bactident® Oxidase; Merck) aufgebracht. Eine Oxidase-positive-Reaktion wird durch blauvioletten Farbumschlag angezeigt.

2.4.7 Bakterielle Speziesdiagnostik

Die Spezies der in Reinkultur angelegten Subkulturen wurde bestimmt. Je nach Fragestellung wurden dafür kommerzielle Differenzierungssysteme (Tabelle 10 und 2.4.8) oder aber die Sequenzierung (2.7.4, 2.7.5) verwendet.

2.4.8 Biochemische Leistungsprüfung zur Speziesdiagnostik

Neben den kommerziell erwerblichen Api® Systemen (bioMérieux) wurde die „Bunte Reihe“ (Abteilung Medizinische Mikrobiologie der Charité) verwendet.

Die Speziesdiagnostik erfolgt bei diesen Verfahren durch eine biochemische Leistungsprüfung des jeweiligen Bakteriums. Enzymatische Reaktionen resultieren in einem Farbumschlag des Substrats, der numerisch kodiert und über entsprechende Bibliotheken einer Bakterienspezies zugeordnet werden kann.

Um zu bestimmen, welches System (Tabelle 10) verwendet werden sollte, wurden die Ergebnisse der Kulturmorphologie auf den unterschiedlichen Nährböden, der Gramfärbung und der mikrobiologischen Differenzierungstests verwendet.

2.5 Histopathologische Beurteilung des Gastrointestinaltraktes

2.5.1 Herstellung und Schneiden der Paraffinblöcke

Bei der Probenentnahme wurden die entnommenen Darmabschnitte in Einbettkassetten für Histologien gelegt und in 5% Formaldehyd (Herbeta Arzneimittel) fixiert. Im Institut für Pathologie der Charité CBF erfolgte durch eine absteigende Alkoholreihe die Entfernung des Formalins aus den Gewebestücken (Shandon EXCELSIOR ES). Die Abschnitte des Gastrointestinaltraktes wurden in Paraffin eingebettet (TEC5 EME-2 5230 Tec™ Tissue Tek®). Mikrotomschnitte von 4,5 µm Dicke (Microm HM 355, MICROM GmbH) wurden angefertigt und über Nacht bei 60°C auf Objektträgern (R. Langenbrinck) fixiert.

2.5.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die histopathologische Bewertung wurden die angefertigten Präparate mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Folgendes Protokoll wurde verwendet:

Tabelle 14: Protokoll der HE-Färbung

Arbeitsschritt	Dauer
Absteigende Alkoholreihe	
Xylol	5 Minuten
Xylol	5 Minuten
Isopropanol absolut	Mehrfach tauchen
96% Ethanol	Mehrfach tauchen
80% Ethanol	Mehrfach tauchen
70% Ethanol	Mehrfach tauchen
Aqua dest.	Mehrfach tauchen
Hämatoxylin	
Aqua dest.	3 Minuten
1% HCL Alkohol	Mehrfach tauchen
Aqua dest.	Kurz tauchen
Spülen und Bläuen in Leitungswasser	Mehrfach tauchen
Aqua dest.	5 Minuten
Eosin	Mehrfach tauchen
	30 s bis 1 Minute
Aufsteigende Alkoholreihe	
70% Ethanol	Kurz tauchen
80% Ethanol	Mehrfach tauchen
96% Ethanol	Mehrfach tauchen
Isopropanol absolut	Mehrfach tauchen
Xylol	Lagerung bis zur Eindeckung
Xylol	Lagerung bis zur Eindeckung

Abschließend wurden die angefertigten Präparate mit Entellan® (Merck) eingedeckt.

2.5.3 Histopathologische Beurteilung der HE-Präparate

Die histopathologische Begutachtung der HE-gefärbten Schnitte wurde mit einem Lichtmikroskop (Standard 25, Zeiss) unter Verwendung eines standardisierten Protokolls (Sale *et al.* 1979) vorgenommen.

Die Beurteilung erfolgte mittels Vergabe von Punktwerten zwischen null und vier. Dabei kodierten die einzelnen Punktwerte für folgende morphologische Merkmale:

Tabelle 15: Pathohistologischer „GvHD-Score“

Punktwert	Morphologisches Merkmal
0	normales Erscheinungsbild
1	vermehrt Apoptosen in den Krypten und an der Oberfläche
2	gesamte Krypten apoptotisch
3	in Krypten fehlen komplett die Epithelzellen, Basallamina bildet die Oberfläche der Krypten (so genannte „Kryptendropouts“);
4	abgeflachte Mukosa

Die jeweils ausgeprägteste auffindbare Läsion bestimmte den zu vergebenen histologischen „GvHD-Score“ für ein Präparat. Um die Ausprägung der Gewebeschäden im gesamten Gastrointestinaltrakt zu beurteilen, wurde ein „kumulativer“ Wert verwendet, bei dem die durch den „GvHD-Score“ vergebenen Punktwerte der einzelnen Darmabschnitte (Magen / Jejunum, Ileum und Colon) addiert wurden (ein Punktwert zwischen 0 bis 12 Punkten pro Tier wurde errechnet).

Die Beurteilung erfolgte geblindet durch drei Untersucher unabhängig voneinander. Die drei Ergebnisse pro Präparat wurden addiert und der Mittelwert gebildet.

2.5.4 Immunhistochemie

Um Merkmale der Immunreaktion, wie beispielsweise das Vorkommen von T-Zellen, regulatorischen T-Zellen und neutrophilen Zellen im Gewebe und Gewebereaktionen wie Apoptosen und Proliferation nachzuweisen, wurden immunhistochemische Nachweisverfahren verwendet. Grundlage der immunhistochemischen Verfahren ist der Nachweis eines Epitopes durch spezifische Antikörper. Der Nachweis der spezifischen Epitope (beispielsweise der Immunzellen, proliferierender und apoptotischer Zellen) kann entweder direkt oder indirekt erfolgen. Bei dem direkten Nachweis ist der verwendete Antikörper chemisch markiert. Diese Markierung wird durch die Zugabe eines Substrates sichtbar. Bei der indirekten Methode wird nach dem antigenspezifischen Antikörper ein markierter Sekundärantikörper hinzugefügt, welcher wiederum durch die Zugabe eines Substrates nachgewiesen wird.

Für die Immunhistochemie wurde zunächst von den eingebetteten Paraffinblöcken mithilfe des Microtoms (Microm HM355, MICROM GmbH) Schnitte von 4,5 µm Dicke angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte deparaffinisiert, mittels Mikrowellenhitze behandelt (Heat induced epitope retrieval) und anschließend in kaltem Wasser gespült. Es folgte ein Waschschriff in Tris-Puffer (pH 7,5; Dako), gefolgt von der Inkubation mit dem Primärantikörper gegen Myeloperoxidase (MPO7, Dako), CD3 (Dako), FOXP3 (eBioscience), Ki67 (TEC-3; Dako) und Caspase3 (Cell Signaling). Der Primärantikörper wurde für 30 Minuten inkubiert. Als zweiter Antikörper wurde der biotinhaltige Esel Anti-Kaninchen (Dianova) oder der Kaninchen Anti-Ratte Antikörper (Dako) benutzt. Zur Anwendung des zweiten Antikörpers wurde entweder StreptavidinAP (K5005, Dako) oder Peroxidase (K4010, Dako) gemäß Herstelleranweisung verwendet. Als Chromogen für die Entwicklung der Peroxidase wurde

hochsensitives Diaminobenzidine verwendet (DAB), dabei betrug die Entwicklungszeit ungefähr zehn Minuten. Für die Entwicklung der alkalischen Phosphatase wurde Fast Red als Chromogen benutzt. Um Negativkontrollen zu erhalten, wurde bei der Färbung der Primärantikörper nicht angewendet.

Pro Tier wurde die durchschnittliche Anzahl der Immunzellen mikroskopisch bestimmt, indem in fünf bis sechs unabhängigen Gesichtsfeldern (400fache Vergrößerung) die positiv gefärbten Zellen gezählt wurden.

Die immunhistochemischen Arbeiten entstanden in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Pathologie, Charité, CBF (Prof. Dr. Christoph Loddenkemper, Simone Spieckermann).

2.6 DNA-Extraktion und PCR

2.6.1 DNA-Extraktion

Der aus den unterschiedlichen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes entnommene lumenale Inhalt wurden in 1,5 ml sterilen 0,9% NaCl suspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

Nach dem Auftauen und der Resuspension des Darminhaltes wurden 300 µl des Stuhls, 250 µl Lysispuffer und 20 µl Proteinase K (20 mg/ml, Sigma – Aldrich) gemischt und im Heizblock bei 57°C für 60 Minuten inkubiert (Thermomixer 5436, Eppendorf). Anschließend wurde das Gemisch in Reaktionsgefäße mit ungefähr 300 mg Zirkonium-, „Beads“, (Durchmesser 0,1 mm – Biospec) überführt. Es erfolgte die Zugabe von jeweils 150 µl Roti[®]Phenol (Roth) und Chloroform-Isoamylalkohol (Merck) (24:1; v/v). Im Homogenisator (FastPrep FP120, Bio101) wurden die Reaktionsgefäße bei Stufe 5,5 nun 2 x 30 s geschüttelt. Anschließend wurde bei 14000 U/min 7 Minuten lang zentrifugiert (Biofuge Fresco, Heraeus Instruments). Es entstand eine DNA-haltige wässrige Phase, die abgehoben und in ein neues Gefäß überführt wurde. Die letzten Arbeitsschritte wurden wiederholt: Zu dem Überstand wurden wieder 150 µl Chloroform-Isoamylalkohol hinzugefügt, erneut bei gleicher Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand abgehoben.

Anschließend wurde eine Ethanol-fällung vorgenommen. Dazu wurde das gewonnene Lysat aus der Phenol-Chloroform-Extraktion mit 2,5 µl Fällungslösung auf 10 µl Lysat (v/v) gemischt. Zu dem Gemisch wurde außerdem 30 µl eiskalter Ethanol (100% v/v ; JJ Baker) pro 10 µl Lysat (v/v) zugegeben, und anschließend über Nacht stehen gelassen. Die gefällte DNA wurde 30 Minuten bei +4°C in einer Kühlzentrifuge bei einer Geschwindigkeit von 13000 g (Biofuge Fresco, Heraeus Instruments) zentrifugiert. Es erfolgten zwei Waschschrte, bei denen jeweils der Überstand verworfen, 1 ml eiskalter Ethanol (70% v/v) zugegeben, 5 Minuten bei 13000 g zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen wurde. Abschließend wurde die DNA in der Vakuumzentrifuge (SpeedVac, Haeraeus Instruments) zehn Minuten lang getrocknet. Die Resuspension erfolgte in 100 µl TE-Puffer. Nach Zugabe des Puffers wurde die DNA zur Homogenisierung über eine Zeitspanne von ca. zehn Minuten geschüttelt. Die extrahierte DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.6.2 Qualitätskontrolle durch Agarose-Gel-Elektrophorese

Zu folgenden Zeitpunkten im Ablauf des Experiments erfolgte eine Kontrolle der Ergebnisse der letzten Arbeitsschritte durch Auftrennung der DNA in einem Agarose-Gel: Nach DNA-Extraktion, nach der PCR und nach Aufreinigung der DNA-Produkte. Dazu wurden 100 ml 1x TBE-Puffer mit 1% bis 3% Agarose (Roth) gemischt. Die zu verwendende Menge an Agarose war abhängig von der Amplikonlänge des PCR-Produktes.

Nach Zugabe der Agarose zu dem TBE-Puffer wurde das Gemisch bis zum Schmelzpunkt erhitzt. Anschließend wurde 1 µl (10 mg/ml) Ethidiumbromid (Roth) hinzugegeben, gemischt und die Flüssigkeit in eine geeignete Form zum Aushärten gegossen.

Die DNA wurde im Verhältnis 1 : 1 mit Agarose-Gel-Probenpuffer versetzt und auf das ausgehärtete Gel gebracht. Außerdem wurde auf das Gel ein Standard in Form einer 50 und 100 Basenpaar-„Ladder“ aufgetragen (GeneRuler 50 bp DNA ladder, GeneRuler 100 bp DNA ladder, Fermentas).

Die Auftrennung erfolgte in 1x TBE bei einer Laufzeit von mindestens 30 Minuten bei einer Stromstärke von 130 Volt in einer Horizontalen Gel Elektrophorese (PeqLab). Das Gel wurde mit Hilfe von UV-Licht (GeneGenius, Syngene) analysiert, durch das sich aufgrund der Verwendung des Ethidiumbromids die DNA als Bande darstellte. Abschließend wurde das Gel photographisch dokumentiert.

2.6.3 Amplifikation der bakteriellen DNA

Um die „Fingerprint“-Methoden durchzuführen, war es nötig zunächst die bakterielle DNA mithilfe der PCR im T3 Thermocycler (Biometra) (Tabelle 17, 18) zu amplifizieren.

Für die molekulare Analyse mittels DGGE wurden Sequenzen aus der 16S Region der bakteriellen rRNA verwendet. Folgende Primer wurden für die DGGE verwendet: 16S 968GC (forward) / 16S 1378 (reverse) und HDA1GC (forward) / HDA2 (reverse) (Tabelle 5).

Für beide Ansätze wurde das gleiche Protokoll verwendet:

Tabelle 16: PCR-Protokoll für die Amplifikation bakterieller DNA vor der DGGE

Auqa dest.	10x Buffer	25mM MgCl ₂	10mM dNTP	20mg/ml BSA	Primer forward
35,5 µl	5 µl	5 µl	1 µl	1 µl	0,5 µl
Primer reverse	Taq-Polymerase	DNA (Template)			
0,5 µl	0,5 µl	1 µl			
Gesamtvolumen des Ansatzes pro Probe: 50 µl					

Tabelle 17: Programm des T3 Thermocyclers für die Amplifikation bakterieller DNA vor der DGGE, für den Primer HDA 1 GC / HDA 2

PCR-Programm für die Primer HDA1 GC / HDA2		
Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95,0°C	00:02:00 Stunden
2. Denaturierung	94,0°C	00:00:30 Stunden
3. Bindung der Oligonukleotide	61,0°C	00:01:00 Stunden
4. Strangverlängerung	72,0°C	00:01:00 Stunden
5. Finale Strangverlängerung	72,0°C	00:07:00 Stunden
6. Pause	4,0°C	Pause
jeweils 36 Zyklen von Schritt 2, 3, 4		
Gesamtzeit: 02:22:16 Stunden		

Tabelle 18: Programm des T3 Thermocyclers für die Amplifikation bakterieller DNA vor der DGGE, für den Primer 16S 968 GC / 16 S 1378

PCR-Programm für die Primer 16S 968 GC / 16S 1378		
Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95,0°C	00:07:00 Stunden
2. Denaturierung	93,0°C	00:00:30 Stunden
3. Bindung der Oligonukleotide	60,0°C	00:01:00 Stunden
4. Strangverlängerung	72,0°C	00:01:00 Stunden
5. Finale Strangverlängerung	72,0°C	00:00:30 Stunden
6. Pause	4,0°C	Pause
jeweils 30 Zyklen von Schritt 2, 3, 4		
Gesamtzeit: 02:32:22 Stunden		

Als Positivkontrolle wurde bei jeder Durchführung *E. coli* DNA verwendet, als Negativkontrolle Aqua dest.. Nach Durchführung der PCR erfolgte eine Kontrolle mittels Auftrennung der DNA in einem Agarose-Gel.

2.6.4 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden mithilfe des QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Um eine möglichst gleiche Konzentration von DNA in den PCR-Produkten zu erhalten, wurde die verwendete Puffermenge, in der das PCR-Produkt nach der Aufreinigung gelöst wurde, auf die enthaltene DNA-Menge angepasst. An die Aufreinigung schloss sich die Durchführung der DGGE an.

2.7 Molekulare „Fingerprint“-Methode – Denaturierende-Gradienten-Gel-Elektrophorese

Durch Anwendung sogenannter molekularer „Fingerprint“-Methoden kann unter anderem die bakterielle Diversität in der intestinalen Mikroflora von Säugetieren festgestellt werden. In der DGGE wird ein sequenzabhängiger Schmelzpunkt bei gleich langen DNA-Fragmenten genutzt. Dazu werden zunächst die DNA-Fragmente amplifiziert. Die Primer 16S 968F-GC und 16S 1378R binden an die variablen Regionen 6 bis 8 des 16S rRNA-Gens. Das entstehende PCR-Produkt ist ungefähr 400 Basenpaare groß (modifiziert nach Nübel *et al.* 1996). Die Primer HDA1GC und HDA2GC binden an die variablen

Regionen 2 bis 3 des 16S rRNA-Gens. Das so amplifizierte PCR-Produkt ist ca. 200 Basenpaare groß (Walter *et al.* 2000, 2001). Sowohl der Primer 16S 968GC als auch der Primer HDA1GC tragen am 5'-Ende eine 40 Basenpaare lange GC-reiche Sequenz, welche die so genannte GC-Klammer bilden. Diese GC-Klammer verhindert die komplette Trennung beider DNA-Stränge voneinander, was die Laufgeschwindigkeit der DNA im Gel verlangsamt und dadurch die Unterscheidung von einer größeren Anzahl von DNA-Fragmenten ermöglicht.

Die sequenzabhängige Auftrennung basiert auf der verringerten elektrophoretischen Mobilität von teilweise denaturierter DNA. Die Gele, welche für die Auftrennung bei der DGGE verwendet werden, enthalten einen linearen Harnstoff-Formamid-Gradienten. Aufgrund der Sequenz eines DNA-Fragmentes kommt es an einer bestimmten Stelle in dem Gel zu einer partiellen Denaturierung der Fragmente, was die Migration durch das Gel stark verlangsamt (Muyzer & Smalla 1998; Tannock 1999, 2002).

2.7.1 Herstellung der Polyacrylamid-Gele für die DGGE und Auftrennung der DNA

Die aufgereinigten PCR-Produkte (30 µl bis 50 µl) wurden mit speziellen DGGE-Puffer im Verhältnis von 1: 1 versetzt. Anschließend wurde die Apparatur zum Gießen des Gels nach Angabe des Herstellers vorbereitet (Bio – Rad). Es erfolgte die Herstellung der Lösung für das 8% Polyacrylamid-Gel, wobei der jeweils zu erzeugende Harnstoff-Formamid-Gradient beachtet werden musste. Die dazu verwendeten Gradienten waren abhängig von den in der PCR verwendeten Primern. Für die Primer 16S 968 GC / 16S 1378 wurde ein 35% zu 60% Gradient verwendet, für die HDA 1 GC / HDA 2 Primer wurde ein Gradient von 30% zu 50% verwendet. Der Gradient wurde durch die Mischung der Stammlösungen (I – 0% denaturierende Eigenschaften; Stammlösung II – 100% denaturierende Eigenschaften) erreicht. Nach Herstellung der Lösungen wurden die Polymerisation durch Zugabe von 10% Ammoniumperoxisulfat (30µl/10ml APS; Roth) und 13µl/10ml Tetramethylethyldiamin (TEMED; Roth) initiiert. Es erfolgte das Gießen des Gels auf einer Trägerfolie (GelBond PAG Film, Biozym). Dabei wurde der Gradient manuell durch Verwendung eines Gradientenmischers (Modell 475 Gradient Delivery System, Bio – Rad) erzeugt. Abschließend härtete das Gel aus. Nach der Auftragung erfolgte die Auftrennung der DNA in 0,5x TAE-enthaltendem Puffer (v/v) in einer geeigneten Apparatur (DCode Universal Mutation Detection System, Bio – Rad). Die Laufbedingungen in der Apparatur waren abhängig von den in der PCR verwendeten Primern: Für 16S 968 / 16S 1378 betrug dies 16 Stunden bei einer Stromstärke von 80 V und einer Temperatur von 60°C, während für HDA 1 GC / HDA 2 Primer 5 Stunden bei einer Stromstärke von 130 Volt und einer Temperatur von 60°C zu veranschlagen waren.

2.7.2 Färbung der DNA

An die DGGE schloss sich nach Entnahme der Gele aus der Apparatur direkt die Silberfärbung an, durch welche die 16S rRNA-Genfragmente der Bakterien sichtbar gemacht wurden. Die Silberfärbung erfolgte in folgenden Schritten: Fixierung, Sensitivierung, Spülen in Aqua dest., Färbung, Spülen in Aqua dest., Entwicklung, Abstoppen der Entwicklung und Lagerung. Zunächst erfolgte die Fixierung 30 Minuten

lang in einer Lösung mit 30% Ethanol (v/v; JJ Baker) und 10% Essigsäure (v/v; Roth). Es schloss sich die Sensitivierung an über zweimal 30 Minuten in einer Lösung mit 30% Ethanol (v/v). Anschließend wurde das Gel fünfmal zehn Minuten lang in destilliertem Wasser gewaschen. Das Gel wurde danach 30 Minuten lang in Färbelösung, zudem kurz in destilliertem Wasser gewaschen und die Banden mithilfe des Entwicklers sichtbar gemacht. Die Entwicklung wurde mittels 10%iger Essigsäure gestoppt.

Abschließend erfolgte eine Digitalisierung der Gele. Die Lagerung der in Folie eingeschweißten Gele erfolgte in der Stopplösung, dunkel und bei Raumtemperatur.

2.7.3 Isolierung von DNA aus Polyacrylamid-Gelen

Um die sich darstellenden 16S rRNA-Genfragmente Bakterienarten zuordnen zu können, wurden einzelne Banden der DGGE-Gele sequenziert. Dazu wurden die Gele nicht der Silberfärbung zugeführt, sondern stattdessen mit SYBR Green I (Fluka) gefärbt. Die Färbung erfolgte in einer Lösung von 10 µl 10000fach Konzentrat in 100 ml Aqua dest. für 20 Minuten. Die Banden wurden mithilfe von UV-Licht sichtbar gemacht (GeneGenius, Syngene) und mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Die Gelbanden wurden in 100 µl Aqua dest. über Nacht bei 37°C in einem Schüttler (Thermomixer 5436, Eppendorf) gelöst. Die erhaltene Mischung wurde der Reamplifikation mit den Primern 16S 968 (forward) / 16S 1378 (reverse) zugeführt, wobei dasselbe PCR-Protokoll und T3 Thermocycler-Programm wie bei der Amplifikation für die DGGE verwendet wurden (Tabelle 16). Abschließend wurden die PCR-Produkte durch Verwendung der Primer 16S-968 (forward) sequenziert.

2.7.4 Sequenzierung der bakteriellen DNA

Um Genfragmente der DGGE-Gele und Bakterienisolate eindeutig einem Genotyp zuzuordnen, wurden die amplifizierten und durch das QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigten PCR-Produkte sequenziert.

Nach der Aufreinigung der PCR-Produkte durch das QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) wurde die Sequenzierreaktion im T3 Thermocycler durch Verwendung des DTCS® Quick Start Kit (Beckman Coulter) mit folgenden Ansatz durchgeführt: 4 µl Master Mix, 100 mol aufgereinigtes PCR-Produkt, 1,6 µM Primer, aufgefüllt mit Aqua dest. bis 20 µl. Der Reaktionsansatz hatte ein Gesamtvolumen von 20 µl. Die Sequenzierreaktion (29mal: 95°C/20 s; 58°C/30 s; 72°C/1 min) im T3 Thermocycler wurde nach einer initialen Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten durchgeführt.

Die erhaltenen Produkte wurden mit dem CleanSEQ® Kit (Agencourt) gereinigt und in Formamid resuspendiert. Die Sequenzierung erfolgte im CEQ®8000-Gerät (Beckman Coulter) bei einer Kapillartemperatur von 50°C. Die initiale Denaturierung erfolgte bei 90°C für 120 Sekunden. Die Injektion geschah für 15 Sekunden bei 2.0 kV und die Separation bei 4.0 kV für 110 Minuten im LPA I Gel (GenomeLab®).

Abschließend wurde durch einen Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit öffentlichen Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>; <http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch>) eine Zuordnung der

Bakterienisolate ermöglicht. Für diese Zuordnung wurde die CEQ[®]8000-Software (Beckman Coulter) verwendet.

2.7.5 Identifizierung von Bakterienisolaten

Um ausgewählte Bakterienisolate der kulturellen Analyse zu identifizieren, wurde neben der Verwendung biochemischer Differenzierungssysteme (2.4.8) die Isolate sequenziert. Dazu wurde zunächst die DNA extrahiert und amplifiziert. Die Arbeitsschritte der Extraktion waren analog zu dem verwendeten Protokoll bei der DNA-Extraktion aus Stuhl für die Auftrennung in der DGGE (2.6.1). Es wurde lediglich auf die Verwendung der Zirkonium „Beads“ verzichtet.

Bei der PCR wurde die komplette 16rRNA mithilfe der Primer TPU1 (forward) und RTU8 (reverse) unter der Verwendung des gleichen PCR-Protokolls zur Amplifikation der 16S rRNA (2.6.3) amplifiziert. Folgendes Programm des T3 Thermocycler wurde genutzt:

Tabelle 19: Programm des T3 Thermocyclers für die Amplifikation bakterieller DNA vor der DGGE, für den Primer TPU1 / RTU8

PCR-Programm für die Primer TPU1 / RTU8		
Schritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95,0°C	00:06:00 Stunden
2. Denaturierung	95,0°C	00:00:45 Stunden
3. Bindung der Oligonukleotide	56,0°C	00:00:45 Stunden
4. Strangverlängerung	72,0°C	00:03:00 Stunden
5. Finale Strangverlängerung	72,0°C	00:05:00 Stunden
6. Pause	4,0°C	Pause
jeweils 29 Zyklen von Schritt 2, 3, 4		
Gesamtzeit: 03:12:49 Stunden		

Die Sequenzierung erfolgte im CEQ[®]8000-Gerät (Beckman Coulter) (2.7.4).

Die molekularen Analysen erfolgten in enger Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Stefan Bereswill, Dr. André Fischer und Gernot Reifenberger (Charité, CBF Abteilung Mikrobiologie).

2.8 Statistik

Die statistische Ermittlung der Signifikanzniveaus, der Mittelwerte und der Standardabweichungen erfolgte, soweit nicht anders angegeben, durch den Student`s-T-Test. Für die statistische Auswertung der kulturellen Analysen wurde alternativ der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Der Log-Rank-Test wurde genutzt, um Kaplan-Meier-Überlebensanalysen durchzuführen. Die Signifikanzniveaus sind mit Sternen gekennzeichnet: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,005.

3. Ergebnisse

3.1 Das Überleben und die intestinale Entzündungsreaktion bei akuter GvHD

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der Intestinalflora und von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems auf die Ausbildung einer iGvHD zu untersuchen. Mäuse, welche eine Defizienz für den TLR2-, TLR4- und TLR2/4-Rezeptor hatten, waren im genetischen C57BL/10-Hintergrund gezüchtet worden. Tiere, defizient für den TLR9-, NOD2-Rezeptor und die Adapterproteine MyD88 und TRIF hatten einen genetischen C57BL/6-Hintergrund. Sämtliche Untersuchungen erfolgten im entsprechenden genetischen Hintergrund.

Zunächst wurde untersucht, mit welchen Überlebensraten, Veränderung der mikrobiellen Flora, histopathologischen und immunologischen Veränderungen eine allogene Stammzelltransplantation bei C57BL/10- und C57BL/6-Wildtypmäuern einherging.

3.1.1 Überleben der Tiere bei GvHD

Um die Auswirkungen der Konditionierung und der allogenen Stammzelltransplantation auf den Gesamtorganismus festzustellen, wurde in einem initialen Experiment das Überleben weiblicher C57BL/6- und C57BL/10-Wildtypmäuse nach Transplantation beobachtet.

Bei den C57BL/6-Wildtypmäuern verstarben die ersten Tiere am Tag sechs nach Transplantation. Von diesem Zeitpunkt ausgehend, war eine starke Abnahme der Überlebensrate bis zu Tag 16 nach Transplantation zu beobachten. Am Tag neun nach Transplantation waren noch ungefähr 30% der transplantierten Tiere am Leben, am Tag 16 nach Transplantation lebten lediglich noch ungefähr 4% der transplantierten Tiere (Abb. 8).

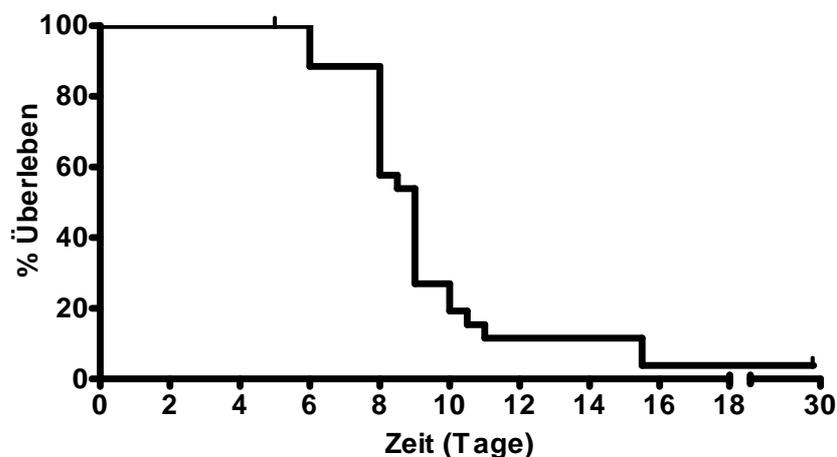


Abb. 8: Überlebensraten weiblicher C57BL/6-Wildtypmäuse nach allogener Stammzelltransplantation. Beobachtet wurden in zwei unabhängigen Experimenten 26 Tiere bis zum Tag 29 nach Konditionierung und Transplantation. „0“ gibt den Zeitpunkt der Transplantation an. Zwischen Tag sechs und 16 nach Transplantation war eine erhöhte Sterberate der transplantierten Tiere zu beobachten.

Bei den C57BL/10-Wildtypmäußen wurde in einem Pilotexperiment das Überleben weiblicher Tiere bis zu Tag 18 nach Transplantation beobachtet. Bei den Tieren dieses Genotypes verstarben die ersten Tiere am Tag acht nach Transplantation. Bis zu Tag 11 nach Transplantation nahm die Überlebensrate der transplantierten Tiere bis auf ungefähr 70% ab. Bis zum Ende des beobachteten Zeitraums war nach Tag 11 kein weiteres Tier verstorben (Abb. 9).

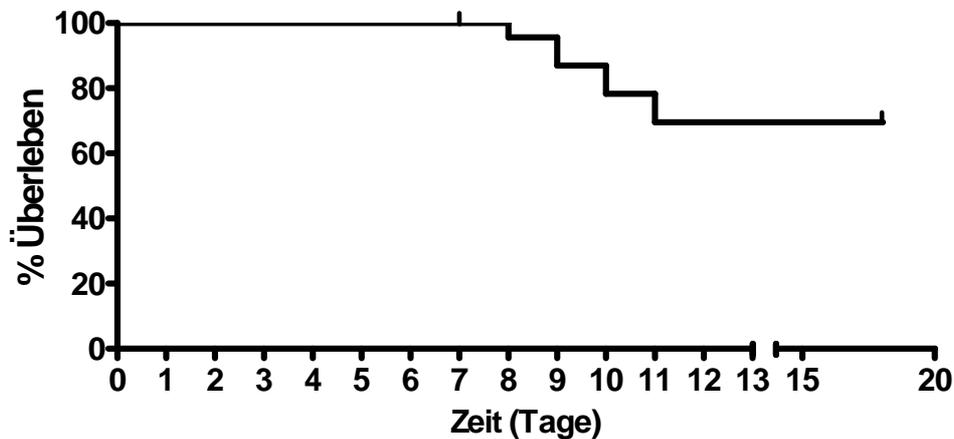


Abb. 9: Überlebensanalyse weiblicher C57BL/10-Wildtypmäuse nach allogener Stammzelltransplantation. 23 Tiere wurden bis zum Tag 18 nach Konditionierung und Transplantation beobachtet. „0“ gibt den Zeitpunkt der Transplantation an. Die Sterberate zwischen Tag sieben und 11 nach Transplantation betrug ungefähr 30%.

Schlussfolgernd zeigten in dem beobachteten Zeitrahmen die C57BL/6-Wildtypmäuse eine höhere Empfindlichkeit auf die Transplantation verglichen mit den C57BL/10-Wildtypmäußen. Dies illustriert die Notwendigkeit einer getrennten Analyse beider genetischen Hintergründe.

3.1.2 Kinetik der intestinalen Entzündungsreaktion bei GvHD

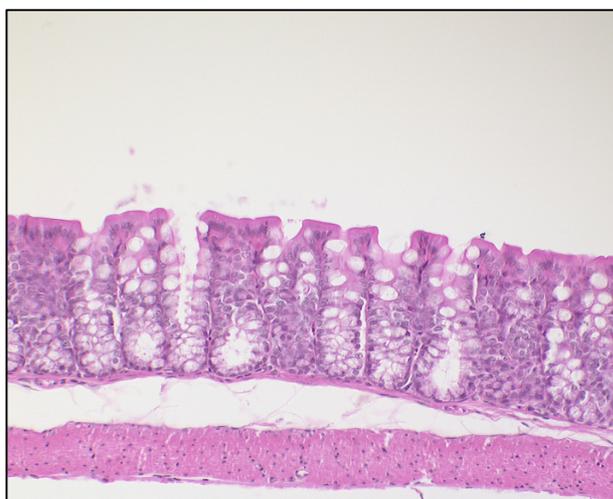
Obwohl die Analyse der Überlebensraten beider Wildtypstämme den Einfluss der allogenen Stammzelltransplantation auf den Gesamtorganismus illustrierte, war durch diese eher „globale“ Analysen die Auswirkung der Transplantation auf den Gastrointestinaltrakt im speziellen nicht festzustellen.

Um das Ausmaß der intestinalen Entzündungszeichen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transplantation zu bestimmen, wurde von vier bis fünf C57BL/10-Mäusen Gewebeproben für histologische Untersuchungen asserviert und die intestinale Entzündungsreaktion mittels eines „GvHD-Scores“ mikroskopisch beurteilt. Die Entnahme der Gewebeproben erfolgte von nicht konditionierten und transplantierten Tieren (d-4 – naive Tiere als Negativkontrollen), begann bei konditionierten und transplantierten Tieren am Tag 2 nach der Transplantation (d2) und wurde bis zu Tag 16 nach Transplantation alle zwei Tage durchgeführt. Aufgrund später durchgeführter Experimente konnten die histologischen Analysen am Tag zehn ergänzt werden, so dass zu

diesem Zeitpunkt insgesamt 14 Tiere analysiert wurden. Von zwei Tieren wurde zu späteren Zeitpunkten, in Abhängigkeit vom klinischen Zustand der Tiere nach Tag 30 nach Transplantation, Gewebeproben zur histologischen Analyse gewonnen.

Bei nicht konditionierten bzw. transplantierten Tieren wurden bewertungsgemäß weder im Magen / Jejunum, noch im Ileum und Colon Merkmale der iGvHD festgestellt (Abb. 10A). Bei transplantierten Tieren hingegen waren Zeichen gastrointestinaler GvHD, wie Apoptosen, Kryptendropouts und flache Mukosa zu finden (Abb. 10B).

A Gesund



B Nach Transplantation

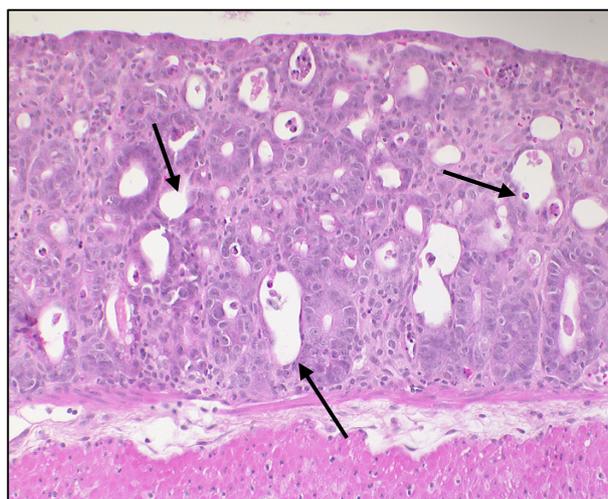


Abb. 10: Die Ausbildung der Merkmale gastrointestinaler GvHD bei allogenen transplantierten Mäusen. Dargestellt sind entsprechende HE-Färbungen des Colons. Vom gesunden Zustand ausgehend (A) führte die Transplantation zur Ausbildung histopathologischer Merkmale (sogenannte „Kryptendropouts“ und Apoptosen, mit Pfeilen gekennzeichnet) der akuten GvHD im Darm (B).

Bereits am Tag zwei nach Transplantation war eine Entzündung zwischen Grad 0,5 (\pm 0,47) im Magen / Jejunum und 1,03 (\pm 1,28) im Colon zu finden (Abb. 11). Im Ileum betrug der Entzündungsgrad zu diesem Zeitpunkt 0,81 (\pm 0,41). Bei den am Tag vier asservierten Gewebeproben konnte im Magen / Jejunum und Ileum eine geringer ausgeprägte Entzündungsreaktion, verglichen mit Tag zwei, gefunden werden (Magen / Jejunum: $0,31 \pm 0,32$, Ileum: $0,25 \pm 0,18$). Im Colon war für diesen Zeitpunkt hingegen eine ähnlich stark ausgeprägte Reaktion wie am Tag zwei zu sehen ($1,06 \pm 1,42$). Bis zum Tag zehn nach Transplantation konnte eine Zunahme der Entzündung in allen drei Darmabschnitten nachgewiesen werden. Dabei waren für alle drei Organabschnitte zu diesem Zeitpunkt die gastrointestinalen Entzündungszeichen am stärksten ausgeprägt. Im Magen / Jejunum konnte ein „GvHD-Score“ von $1,93 \pm 0,78$, im Ileum von $1,56 \pm 0,55$ und im Colon von $3,11 \pm 0,45$ ermittelt werden. Nachfolgend kam es zu einer Abmilderung dieser Entzündungszeichen. 16

Tage nach Transplantation war im Magen / Jejunum ein Punktwert von 0,31 ($\pm 0,32$), im Colon ein Wert von 0,94 ($\pm 0,6$) zu finden, während im Ileum zu diesem Zeitpunkt keine Zeichen einer iGvHD mehr erkennbar waren. Des Weiteren konnten am Tag 33 und 43 nach Transplantation in keinem der drei beurteilten Organsysteme Zeichen einer gastrointestinalen GvHD nachgewiesen werden. Der Vergleich zwischen dem Zeitpunkt der stärksten intestinalen Entzündung mit den naiven Tieren und den Tieren, die am Tag 33 und 43 nach Transplantation seziiert worden waren, zeigte für alle drei Organsysteme signifikante Unterschiede hinsichtlich des Schweregrades der Darm-GvHD (Abb. 11). Im Colon war die Entzündung zu allen analysierten Zeitpunkten am stärksten ausgeprägt.

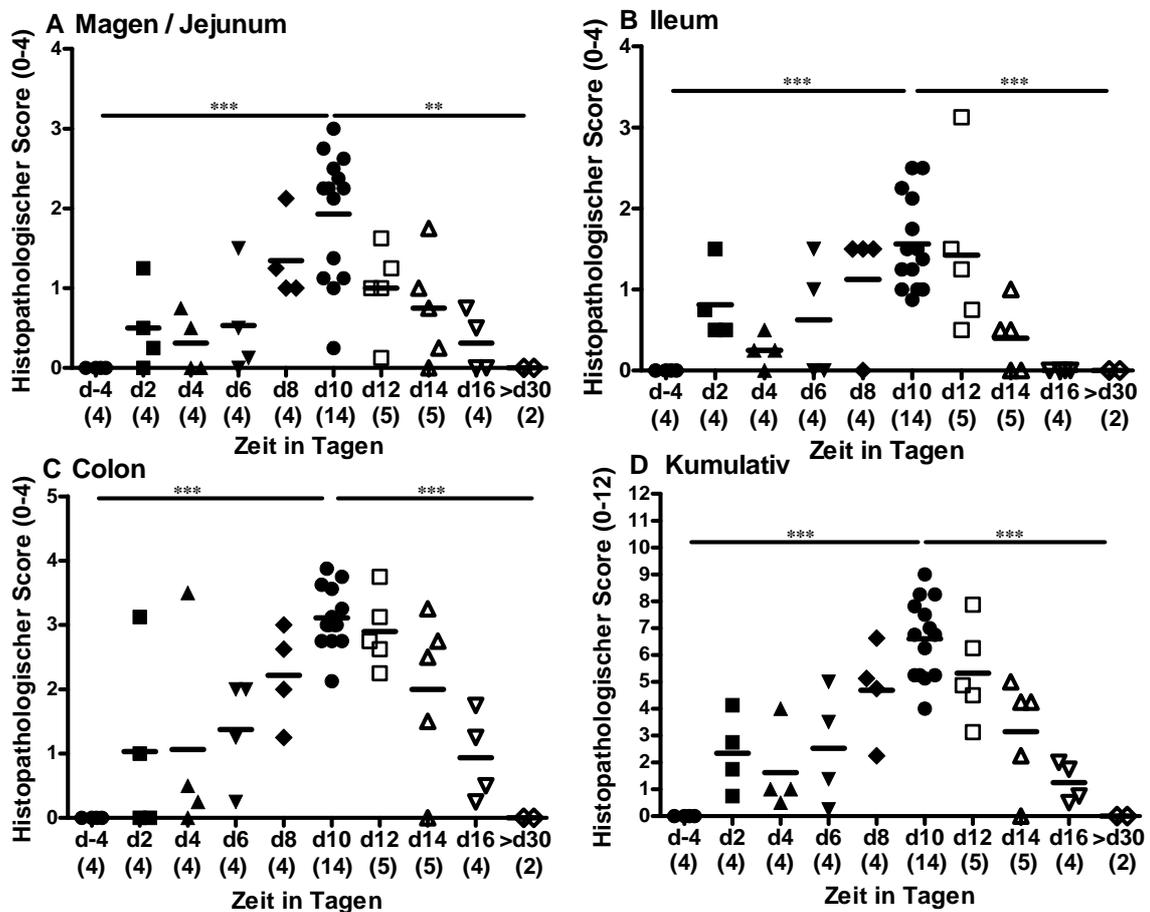


Abb. 11: Die Ausbildung gastrointestinaler Entzündungszeichen im Verlauf der akuten GvHD bei C57BL/10-Wildtypmäußen. Für diese Analysen wurde von gesunden (d-4) und transplantierten (d2 bis >d30) Tieren die entsprechenden Darmabschnitte histopathologisch untersucht. In allen untersuchten Organsystemen (A – Magen / Jejunum; B – Ileum; C – Colon; D – „kumulativ“) war ein Maximum der gastrointestinalen Entzündung am Tag zehn nach Transplantation festzustellen. Die Anzahl der analysierten Tiere ist in Klammern angegeben. Die Analysen erfolgten aus zwei unabhängigen Experimenten. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$).

Bei C57BL/6-Wildtyp-tieren wurde nicht die Dynamik der histopathologischen gastrointestinalen Veränderungen beurteilt. Aufgrund der Erkenntnisse der Überlebensanalysen wurde am Tag neun nach Transplantation, auf dem Höhepunkt der Entzündung, Gewebeproben asserviert und im Vergleich zu naiven Tieren analysiert. Wie bei den C57BL/10-Wildtyp-tieren war bei den naiven C57BL/6-Tieren keine Anzeichen intestinaler Entzündung erkennbar. Am Tag neun nach Transplantation konnte im Magen / Jejunum ein „GvHD-Score“ von 2,14 ($\pm 0,71$), im Ileum 1,46 ($\pm 0,77$) und im Colon von 2,60 ($\pm 0,71$) dokumentiert werden (nicht dargestellt). Auch bei den C57BL/6-Wildtyp-tieren waren die Entzündungszeichen im Colon stärker ausgeprägt als in den proximalen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes (nicht dargestellt).

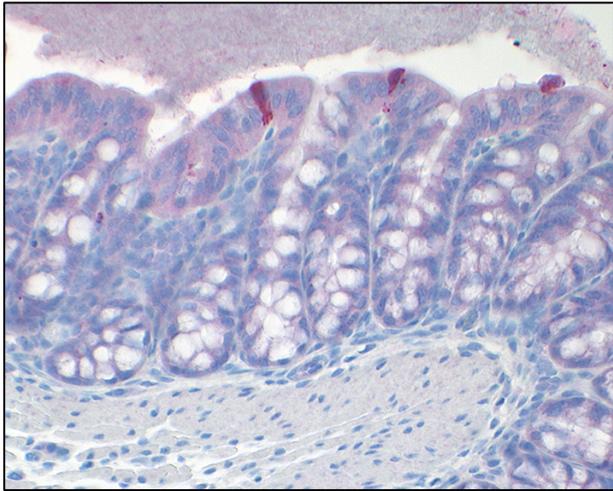
3.1.3 Analyse histochemischer Merkmale im Colon bei GvHD

Da in distalen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes die iGvHD am stärksten ausgeprägt war, erfolgten die histochemischen Analysen im Colon. Hierfür wurden zum entsprechenden Zeitpunkt, an dem die Darm-GvHD am stärksten ausgeprägt war (d9 im C57BL/6-Hintergrund, d10 im C57BL/10-Hintergrund), die *in situ* Analysen durchgeführt. Darüberhinaus wurde bei C57BL/10-Tieren die Kinetik der immunhistopathologischen Veränderungen beurteilt. Folgende Zellmerkmale wurden untersucht: Caspase3, CD3, FOXP3, MPO7 und Ki67 (TEC3).

3.1.3.1 Apoptose und Proliferation im Colon bei GvHD

Caspase3 (Abb. 12), als Effektormolekül der Apoptose, zeigte bei C57BL/10-Wildtyp-tieren einen kontinuierlichen Anstieg bis Tag zehn nach Transplantation (Abb. 14A). Bei transplantierten C57BL/6- und C57BL/10-Tieren konnte am Tag neun bzw. zehn nach Transplantation eine signifikante Akkumulation von Caspase3-positiven Zellen im Colon im Vergleich zu gesunden Tieren beobachtet werden (beide $p < 0,0005$; Abb. 14A, 15A). Die in den HE-gefärbten Schnitten erhobenen histopathologischen Befunde wurden durch das vermehrte Vorkommen apoptotischer Zellen bei transplantierten Tieren bestätigt.

A Gesund



B Nach Transplantation

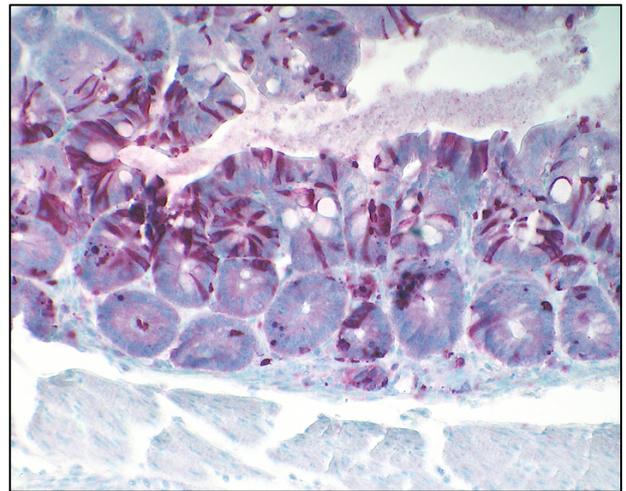
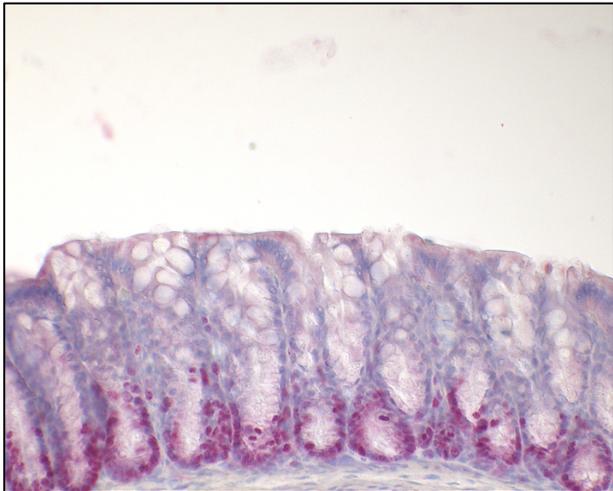


Abb. 12: Apoptotische Zellen, nachgewiesen durch den zellulären Marker Caspase3 im Colon gesunder (A) und transplantierten Mäuse (B). Infolge der Färbung erscheinen Caspase3-positive Zellen rötlich.

Ki67 (Abb. 13) wird als zellulärer Marker für Proliferationsvorgänge verwendet und zeigt bei GvHD beispielsweise das Ausmaß der Regeneration von Läsionen im Gewebe an. Auch bei diesem Marker konnte eine signifikante Erhöhung bei transplantierten C57BL/10- und C57BL/6-Tieren auf dem Höhepunkt der Entzündung im Vergleich mit nicht transplantierten Tieren gezeigt werden (beide $p < 0,0005$; Abb. 14B, 15B).

A Gesund



B Nach Transplantation



Abb. 13: Proliferierende Zellen, dargestellt mittels Ki67 im Colon gesunder (A) und transplantierten Mäuse (B). Die Färbung lässt die Ki67-positiven Zellen rötlich erscheinen.

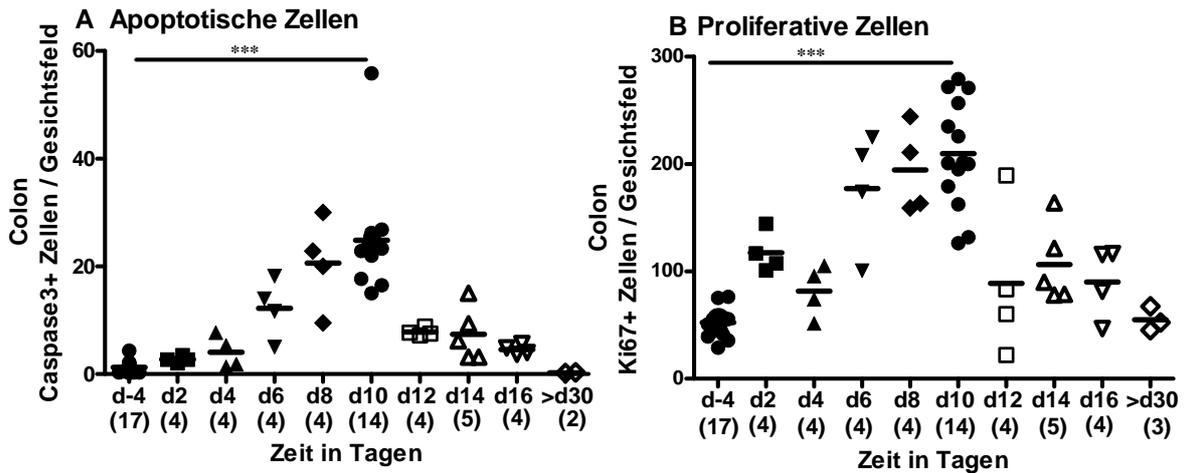


Abb. 14: Apoptotische (Caspase3-positiv – A) und proliferierende (Ki67-positiv – B) Zellen bei der Ausbildung der akuten GvHD im Colon von C57BL/10-Wildtypmieren *in situ*. Für diese Kinetikanalysen wurde die Anzahl apoptotischer und proliferierender Zellen bei naiven (d-4), und transplantierten Tieren (d2 bis >d30) in Colon-Gewebeschnitten bestimmt. Die Analyse erfolgte aus zwei unabhängigen Experimenten, die Anzahl der analysierten Tiere ist in Klammern angegeben. Signifikanzniveaus sind durch Sternchen gekennzeichnet (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$).

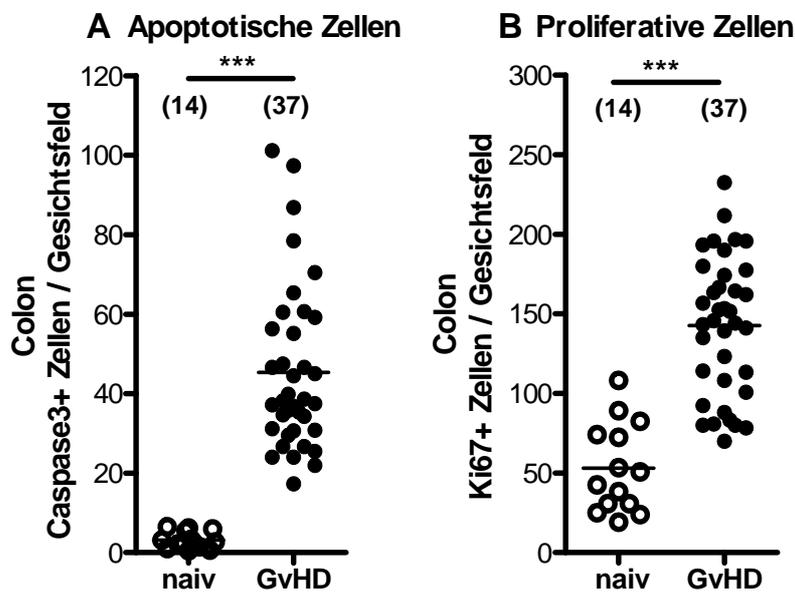
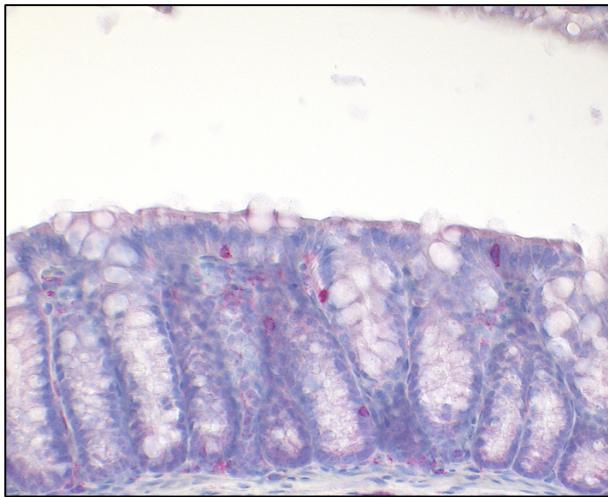


Abb. 15: Apoptotische (Caspase3-positiv – A) und proliferierende Zellen (Ki67-positiv – B) bei akuter GvHD im Colon von C57BL/6-Wildtypmieren *in situ*. Offene Symbole stehen für naive Tiere, geschlossene für konditionierte und transplantierte Tiere am Tag neun nach Transplantation. Gezeigt sind die Ergebnisse von vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. In Klammern ist die Anzahl der analysierten Tiere angegeben. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$).

3.1.3.2 T-Zellen, regulatorische T-Zellen und Neutrophile im Colon bei GvHD

Da die iGvHD unter anderem durch das Vorhandensein von T-Zellen im Gewebe vermittelt wird, wurde im folgenden CD3-positive T-Zellen im Colon bestimmt (Abb. 16). Bei transplantierten C57BL/6- und C57BL/10-Wildtyptieren war im Vergleich zu gesunden Tieren ein signifikanter Anstieg von CD3-positiven T-Zellen festzustellen (beide $p < 0,0005$; Abb. 19A, 20A). Die Beobachtung des zeitlichen Ablaufes der Immunreaktion bei C57BL/10-Wildtyptieren zeigte, dass die höchste Anzahl von CD3-positiven Zellen im Colon am Tag zehn nach Transplantation zu finden war (Abb. 19A). Zum gleichen Zeitpunkt konnten die ausgeprägtesten histopathologischen Veränderungen im Colon mikroskopisch nachgewiesen werden (Abb. 11C).

A Gesund



B Nach Transplantation

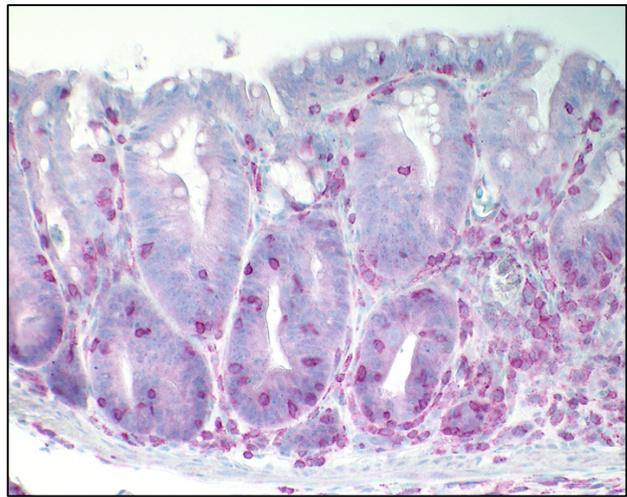
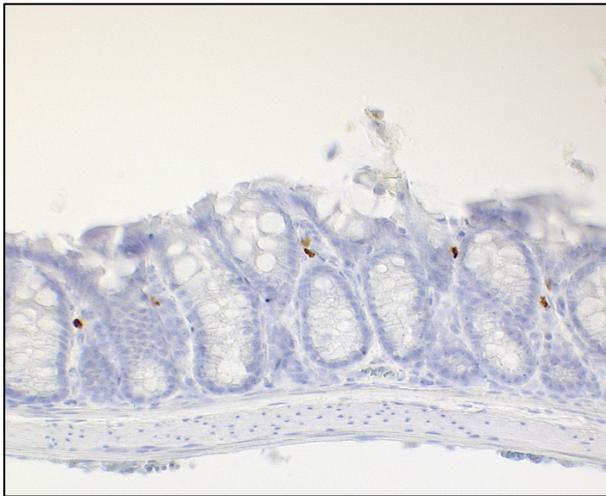


Abb. 16: T-Zellen, nachgewiesen durch CD3 im Colon gesunder (A) und transplantierten Mäuse (B). Nach der Färbung erscheinen CD3-positive Zellen rötlich.

FOXP3 (Abb. 17) gilt als Marker für regulatorische T-Zellen. Weder bei transplantierten C57BL/6- noch bei C57BL/10-Wildtyptieren konnte ein signifikanter Anstieg regulatorischer T-Zellen im gastrointestinalen Gewebe transplantierten Tiere am Tag neun / zehn nach Transplantation nachgewiesen werden (Abb. 19B, 20B). Im zeitlichen Verlauf der GvHD-Entwicklung nach Transplantation konnte kein relevanter Anstieg von FOXP3-positiven Zellen im Colon *in situ* im Vergleich zu naiven Tieren festgestellt werden (Abb. 19B).

A Gesund



B Nach Transplantation

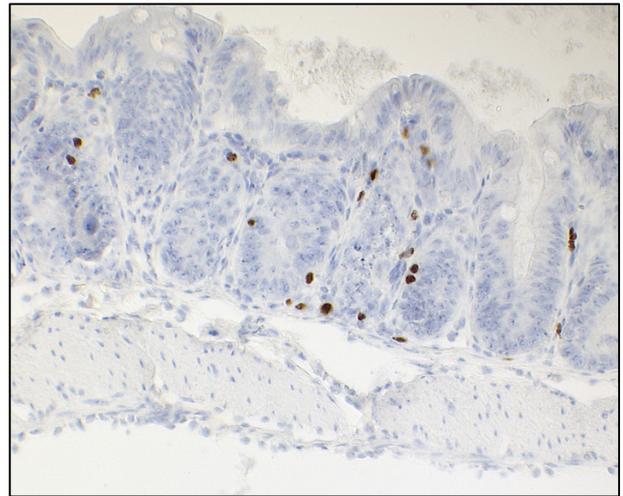
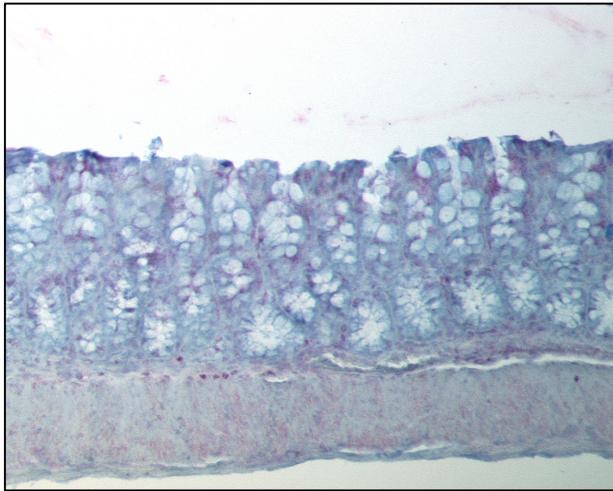


Abb. 17: Regulatorische T-Zellen, nachgewiesen durch den zellulären Marker FOXP3 im Colon gesunder (A) und transplantierten Mäuse (B). Nach der Färbung erscheinen FOXP3-positive Zellen bräunlich.

MPO7 wird bei myeloiden Zellen des Immunsystems, wie beispielsweise neutrophilen Granulozyten, gefunden (Abb. 18). Zusammen mit CD3 ist MPO7 ein wichtiger Marker für das Vorhandensein von Effektorzellen der GvHD. Bei transplantierten C57BL/6- und C57BL/10-Wildtyptieren war auf dem Höhepunkt der Inflammation ein signifikanter Anstieg der MPO7-positiven Zellen im Vergleich mit nicht transplantierten Tieren (C57BL/10: $p < 0,05$; Abb. 19C; C57BL/6: $p < 0,005$; Abb. 20C) zu beobachten. Im zeitlichen Verlauf der GvHD zeigten C57BL/10-Tiere einen Anstieg der MPO7-positiven Zellen im Colon bis zu Tag 16 (Abb. 19C). Bei dieser Zellpopulation ist allerdings zu beachten, dass sowohl bei gesunden als auch bei transplantierten C57BL/6- und C57BL/10-Wildtyptieren eine relativ geringe Anzahl MPO7-positiver Zellen im Colon nachweisbar war, so dass die festgestellten Veränderungen nur diskret ausgebildet waren.

A Gesund



B Nach Transplantation

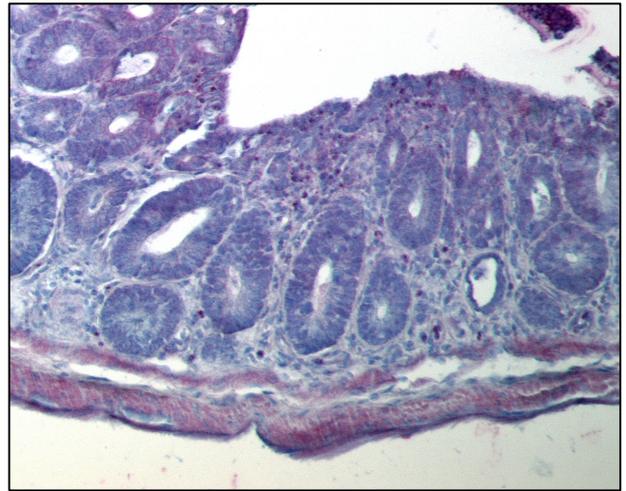


Abb. 18: Neutrophile, nachgewiesen durch MPO7 im Colon gesunder (A) und transplantiertier Mäuse (B). Durch der Färbung erscheinen die MPO7-positive Zellen bräunlich.

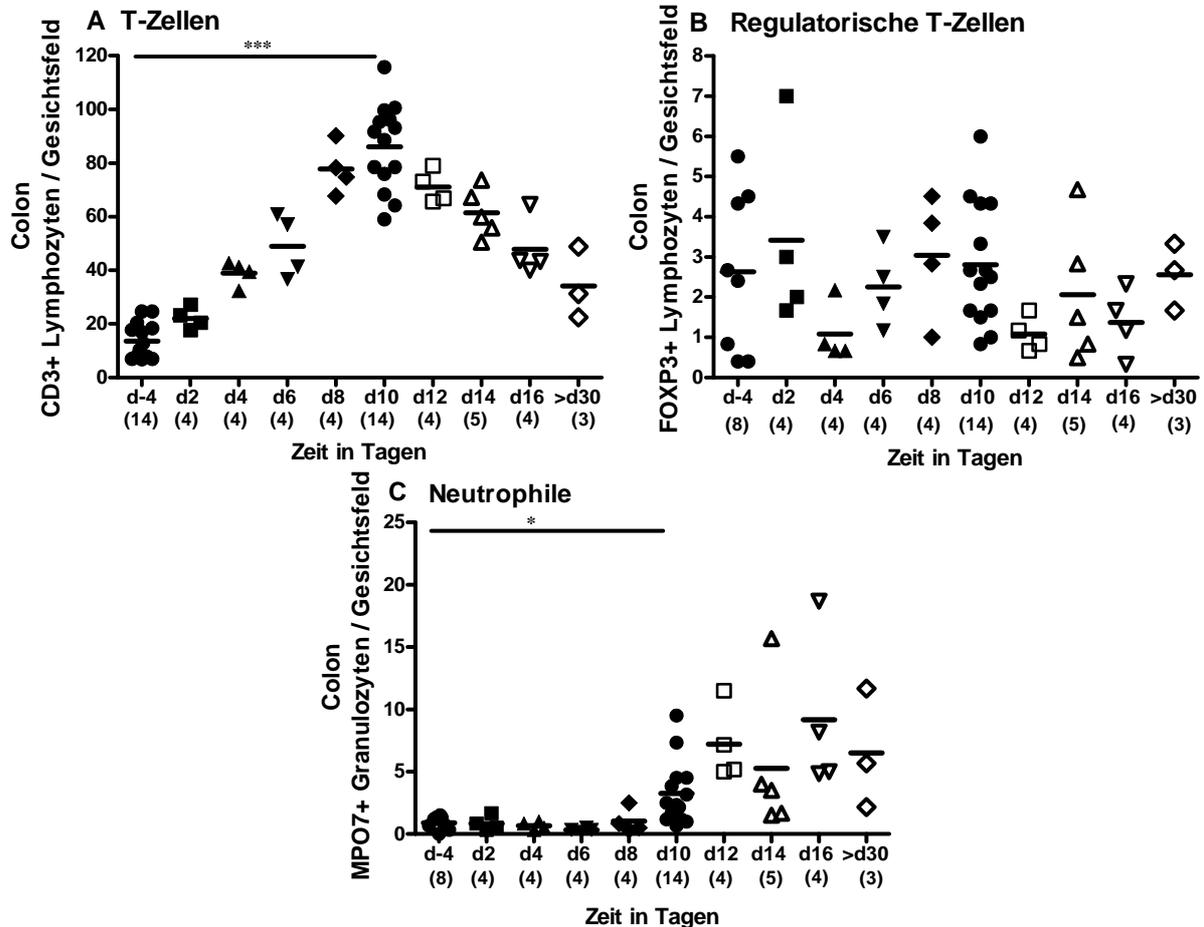


Abb. 19: Ausbildung der Immunreaktion bei akuter GvHD im Colon von C57BL/10-Wildtyp-tieren. Gezeigt sind T-Zellen (CD3-positiv – A), regulatorische T-Zellen (FOXP3-positiv – B) und neutrophile Granulozyten (MPO7-positiv – C) bei naiven (d-4) und transplantierten Tieren (d2 bis >d30). Die Analyse erfolgte aus zwei unabhängigen Experimenten, die Anzahl der analysierten Tiere ist in Klammern angegeben. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen dargestellt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$).

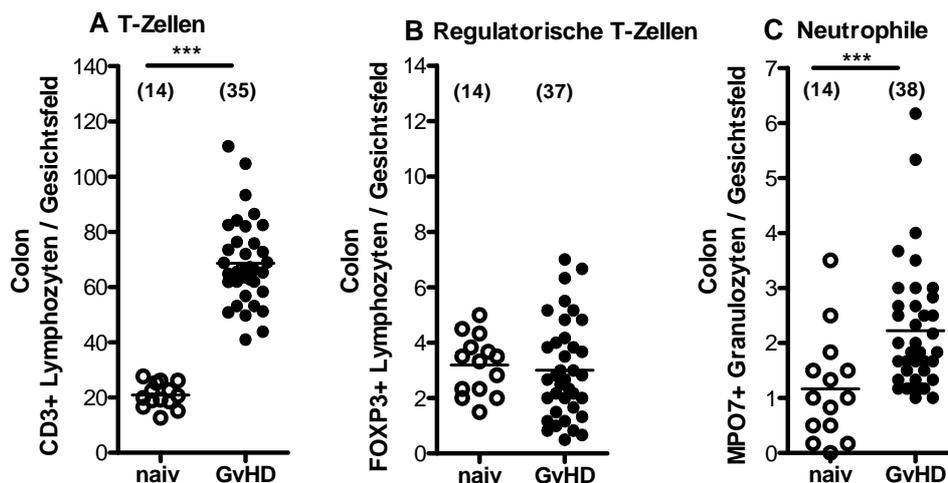


Abb. 20: Die Ausbildung der Immunreaktion im Colon transplantiertes C57BL/6-Wildtypiere. Gezeigt sind T-Zellen (CD3-positiv – A), regulatorische T-Zellen (FOXP3-positiv – B) und neutrophile Granulozyten (MPO7-positiv – C) bei naiven Tieren (offene Zeichen) und transplantierten Tieren am Tag neun nach Transplantation (geschlossene Symbole). Dargestellt sind die Ergebnisse von vier Experimenten. In Klammern ist die Anzahl der analysierten Tiere angegeben. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$).

Diese Analysen zeigen, dass die allogene Stammzelltransplantation in dem von uns verwendeten Modell zu Immunreaktionen im Colon führte. Die stattfindenden Immunreaktionen standen im engen zeitlichen Zusammenhang mit den histopathologischen Veränderungen im Gastrointestinaltrakt und legten demnach die Auswirkung der allogenen Stammzelltransplantation auf das mukosale Immunsystem im Colon nahe.

3.1.4 Kulturelle Analysen der Darmflora bei GvHD

Zur Feststellung von Veränderungen der Gastrointestinalflora im Verlauf einer akuten iGvHD wurden umfangreiche qualitative und quantitative Analysen der kultivierbaren Intestinalflora durchgeführt. Neben der Analyse der Faecesflora bei der Entwicklung der GvHD bei C57BL/6-Wildtypieren erfolgte eine Untersuchung der luminalen mikrobiellen Flora in Magen, Jejunum, Ileum und Colon nicht transplantiertes C57BL/10- und C57BL/6-Tiere im Vergleich mit Tieren desselben Genotypes auf dem Höhepunkt der gastrointestinalen Entzündung nach Transplantation. Ziel dieser Untersuchungen war es aufzuzeigen, welche Bakteriengruppen in welcher Menge in den einzelnen Darmabschnitten nachweisbar waren und ob und inwiefern die Ausbildung einer akuten GvHD das Vorkommen dieser Bakterienpopulationen beeinflusst.

3.1.4.1 Veränderung der Darmflora bei GvHD bei C57BL/10-Wildtyptieren

Im gesunden Zustand war die Faecesflora der C57BL/10-Tiere geprägt von einer Prädominanz aerober grampositiver Stäbchen und Kokken, anaerober gramnegativer Stäbchen und im geringeren Maße *Enterobacteriaceae* (Abb. 21).

Diese Faecesflora zeigte bei der Entwicklung der akuten GvHD folgende Veränderungen: Bei C57BL/10-Wildtyptieren konnte ein Anstieg aerober grampositiver Kokken (vor allem Enterokokken) um zwei logarithmische Stufen (von $1,78 \times 10^7 \pm 3,15 \times 10^7$ KBE/g auf $1,84 \times 10^9 \pm 1,57 \times 10^{10}$ KBE/g; $p < 0,01$), *Enterobacteriaceae* (*E. coli*) um fünf logarithmische Stufen (von $3,82 \times 10^4 \pm 5,99 \times 10^6$ KBE/g auf $1,7 \times 10^9 \pm 2,3 \times 10^9$ KBE/g; $p < 0,005$) sowie eine Abnahme aerober grampositiver Stäbchen (vor allem *Lactobacillus* spp. von $2,38 \times 10^9 \pm 4,77 \times 10^8$ KBE/g auf $1,84 \times 10^9 \pm 9,11 \times 10^8$ KBE/g; $p < 0,05$) im Faeces erkrankter Tiere am Tag zehn nach Transplantation nachgewiesen werden. Keine signifikante Veränderung wurde bei anaeroben gramnegativen Stäbchen (vor allem *Bacteroides* / *Prevotella* spp.) bei C57BL/10-Tieren nachgewiesen (Abb. 21). Die Gesamtbakterienlast stieg auf dem Höhepunkt der Inflammation von $4,17 \times 10^9 \pm 9,11 \times 10^8$ KBE/g auf $7,85 \times 10^9 \pm 2,04 \times 10^{10}$ KBE/g an ($p < 0,05$; Abb. 21).

In initialen kulturellen Analysen konnte festgestellt werden, dass weder qualitative noch quantitative Unterschiede zwischen Colon- und Faecesflora bestanden. Die Ergebnisauswertung der kulturellen Analyse von Colon- und Faecesflora erfolgte daher mitunter gepoolt, aufgrund der Daten unabhängig voneinander durchgeführter Experimente.

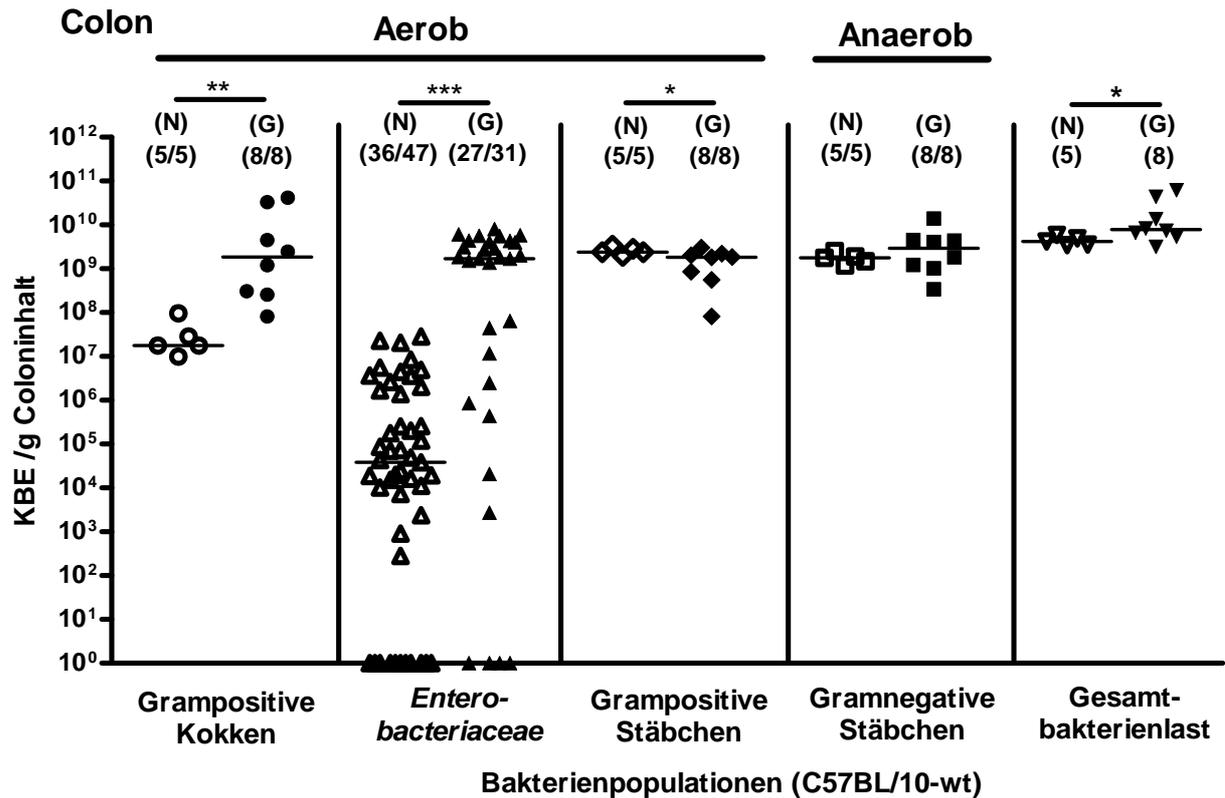


Abb. 21: Veränderung der Colonflora bei akuter GvHD bei transplantierten C57BL/10-Wildtypmieren. In Klammern ist die jeweilige Anzahl der analysierten Tiere angegeben, zusätzlich ist der positive Nachweis angezeigt. Die offenen Zeichen stehen für gesunde Tiere („N“ – naiv), die geschlossenen für transplantierte Tiere am Tag zehn nach Transplantation („G“ – GvHD). Dargestellt sind die gepoolten Ergebnisse von mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$).

Im Ileum wurde bei C57BL/10-Wildtypmieren ein signifikanter Anstieg der *Enterobacteriaceae* im Vergleich zu gesunden Tieren (von $6,22 \times 10^3 \pm 7,47 \times 10^5$ KBE/g auf $2,8 \times 10^7 \pm 1,5 \times 10^{10}$ KBE/g; $p < 0,01$) dokumentiert (Abb. 22A). Im Jejunum war ebenfalls ein signifikanter Anstieg der *Enterobacteriaceae* im Vergleich zu gesunden Tieren (von $1,44 \times 10^4 \pm 2,8 \times 10^5$ KBE/g auf $1,06 \times 10^7 \pm 2,1 \times 10^9$ KBE/g; $p < 0,005$) zu verzeichnen (Abb. 22B).

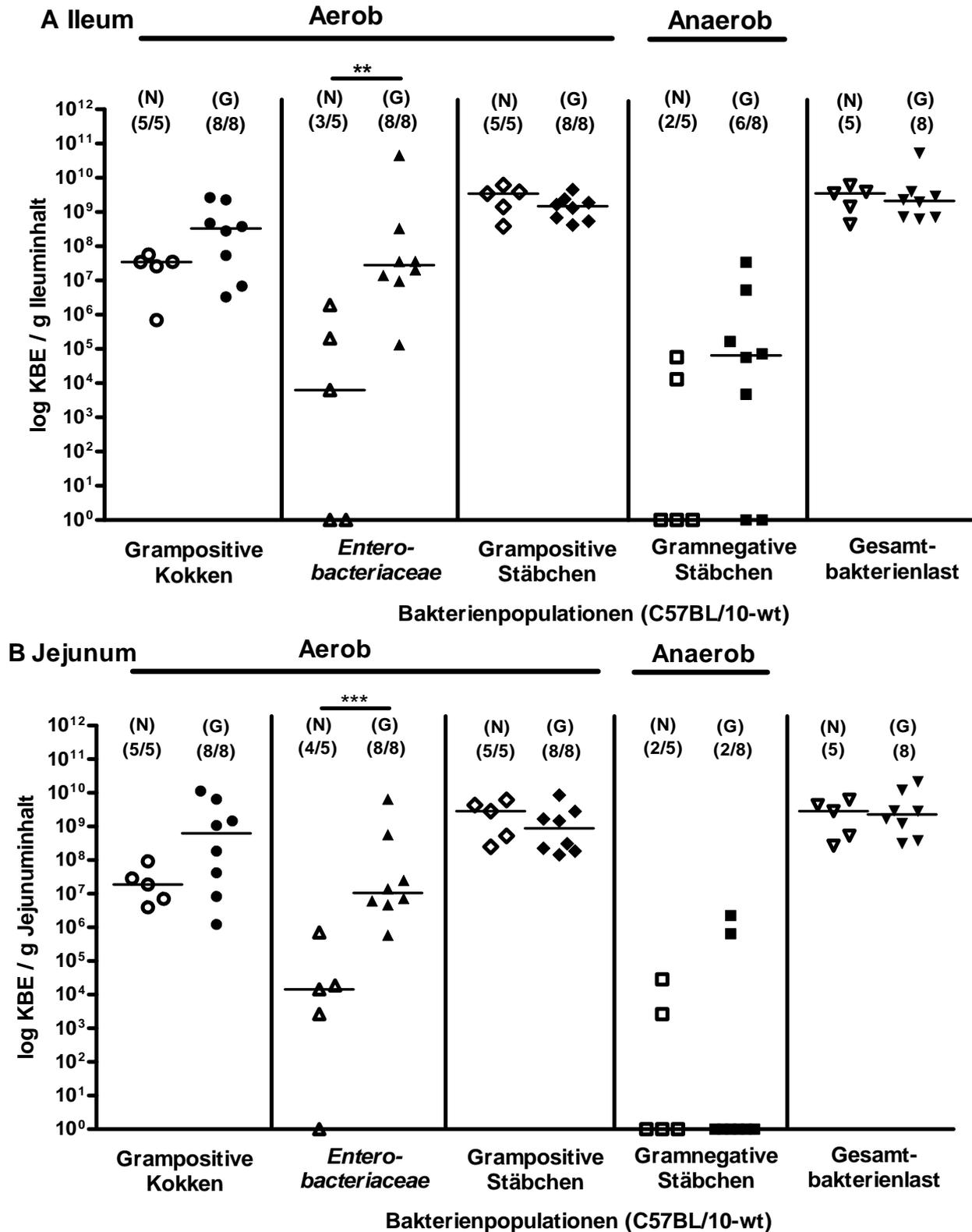


Abb. 22: Veränderung der Ileum- (A) und Jejunumflora (B) bei transplantierten C57BL/10-Wildtypmieren am Tag zehn nach Transplantation. Offene Symbole stehen für naive Tiere, geschlossene für konditionierte und transplantierte Tiere am Tag zehn nach Transplantation. In Klammern ist die Anzahl der analysierten Tiere und der positive Nachweis dargestellt. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$).

Im Magen von C57BL/10-Wildtyptieren war nach Transplantation ein signifikant geringerer Nachweis aerober grampositiver Stäbchen (von $1,68 \times 10^9 \pm 1,94 \times 10^9$ KBE/g auf $6,97 \times 10^8 \pm 7,07 \times 10^8$ KBE/g; $p < 0,05$) und der anaeroben gramnegativen Stäbchen (von $9,33 \times 10^6 \pm 2,23 \times 10^7$ KBE/g auf $1,00 \times 10^0 \pm 8,89 \times 10^2$ KBE/g; $p < 0,05$; Abb. 23) aufzuzeigen.

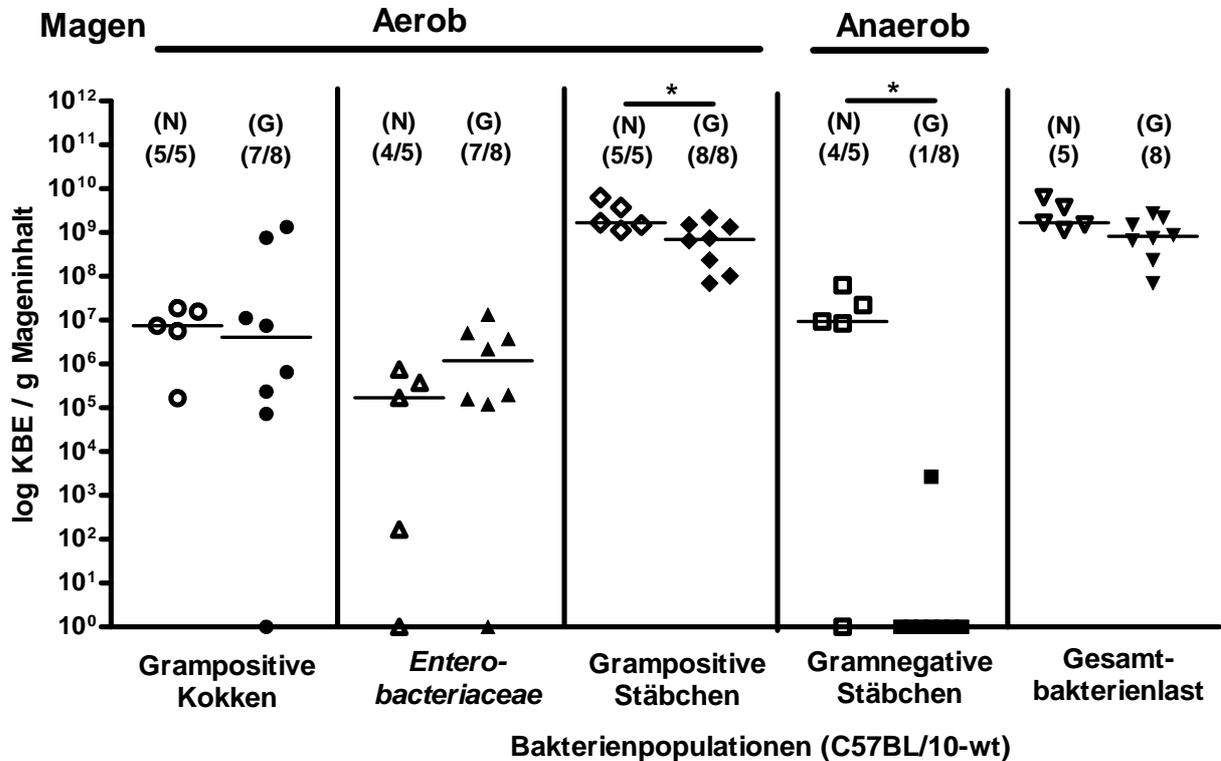


Abb. 23: Die Veränderung der Magenflora bei transplantierten C57BL/10-Tieren. Offene Symbole stehen für naive Tiere, geschlossene für konditionierte und transplantierte Tiere am Tag zehn nach Transplantation. In Klammern ist die Anzahl der analysierten Tiere und der positive Nachweis dargestellt. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$).

3.1.4.2 Veränderung der Darmflora bei GvHD bei C57BL/6-Wildtyptieren

Auch bei den C57BL/6-Tieren war die Faecesflora im gesunden Zustand gekennzeichnet von einem Vorkommen aerober grampositiver Stäbchen und Kokken, anaerober gramnegativer Stäbchen und einem geringeren Vorkommen von *Enterobacteriaceae* (Abb. 24).

Bei C57BL/6-Wildtyptieren war eine ähnliche Veränderung der Flora wie bei den C57BL/10-Wildtyptieren im Verlauf einer Darm-GvHD zu verzeichnen. Vom gesunden Zustand ausgehend, konnte ein signifikanter Anstieg aerober grampositiver Kokken um ungefähr eine logarithmische Stufe (von $1,32 \times 10^7 \pm 1,77 \times 10^7$ KBE/g auf $2,29 \times 10^8 \pm 2,08 \times 10^9$ KBE/g; $p < 0,005$; Abb. 24A), *Enterobacteriaceae* um vier logarithmische Stufen (von $3,8 \times 10^4 \pm 1,06 \times 10^6$ KBE/g auf $2,81 \times 10^8 \pm 8,42 \times 10^9$ KBE/g; $p < 0,005$; Abb. 24B) und anaerober gramnegativer Stäbchen (von

$2,65 \times 10^8 \pm 8,99 \times 10^8$ KBE/g auf $2,84 \times 10^9 \pm 9,96 \times 10^9$ KBE/g; $p < 0,005$; Abb. 24D) im Colon bis zum Tag neun nach Transplantation beobachtet werden. Die Gesamtbakterienlast im Colon nahm in diesem Zeitrahmen signifikant zu (von $2,35 \times 10^9 \pm 2,01 \times 10^9$ KBE/g auf $5,79 \times 10^9 \pm 2,91 \times 10^{10}$ KBE/g; $p < 0,005$; Abb. 24E).

Die Analyse von möglichen Florenveränderungen im zeitlichen Verlauf einer Darm-GvHD zeigte für aerobe grampositive Kokken am Tag neun nach Transplantation einen signifikant höheren Nachweis als für die anderen untersuchten Zeitpunkte vor Konditionierung (d-4), nach Konditionierung / vor Transplantation (d0) und am Tag sechs nach Transplantation (Abb. 24A).

Am Tag neun nach Transplantation konnten signifikant mehr *Enterobacteriaceae* als bei naiven Tieren und an d0 nachgewiesen werden (Abb. 24B).

Bei den aeroben grampositiven Stäbchen konnte nach Konditionierung (d0) ein signifikanter Abfall im Vergleich zu dem Vorkommen dieser Bakterienpopulation bei gesunden Tieren dokumentiert werden. Nach der Transplantation war ein Anstieg der aeroben grampositiven Stäbchen ungefähr auf das Ausgangsniveau aufzuzeigen (Abb. 24C).

Nach Konditionierung (d0) konnte ein signifikanter Anstieg der anaeroben gramnegativen Stäbchen beobachtet werden, nach der Transplantation war diese Bakterienpopulation auf gleichbleibendem Niveau nachweisbar (Abb. 24D).

Die höchste Gesamtbakterienlast war am Tag neun nach Transplantation zu finden (Abb. 24E).

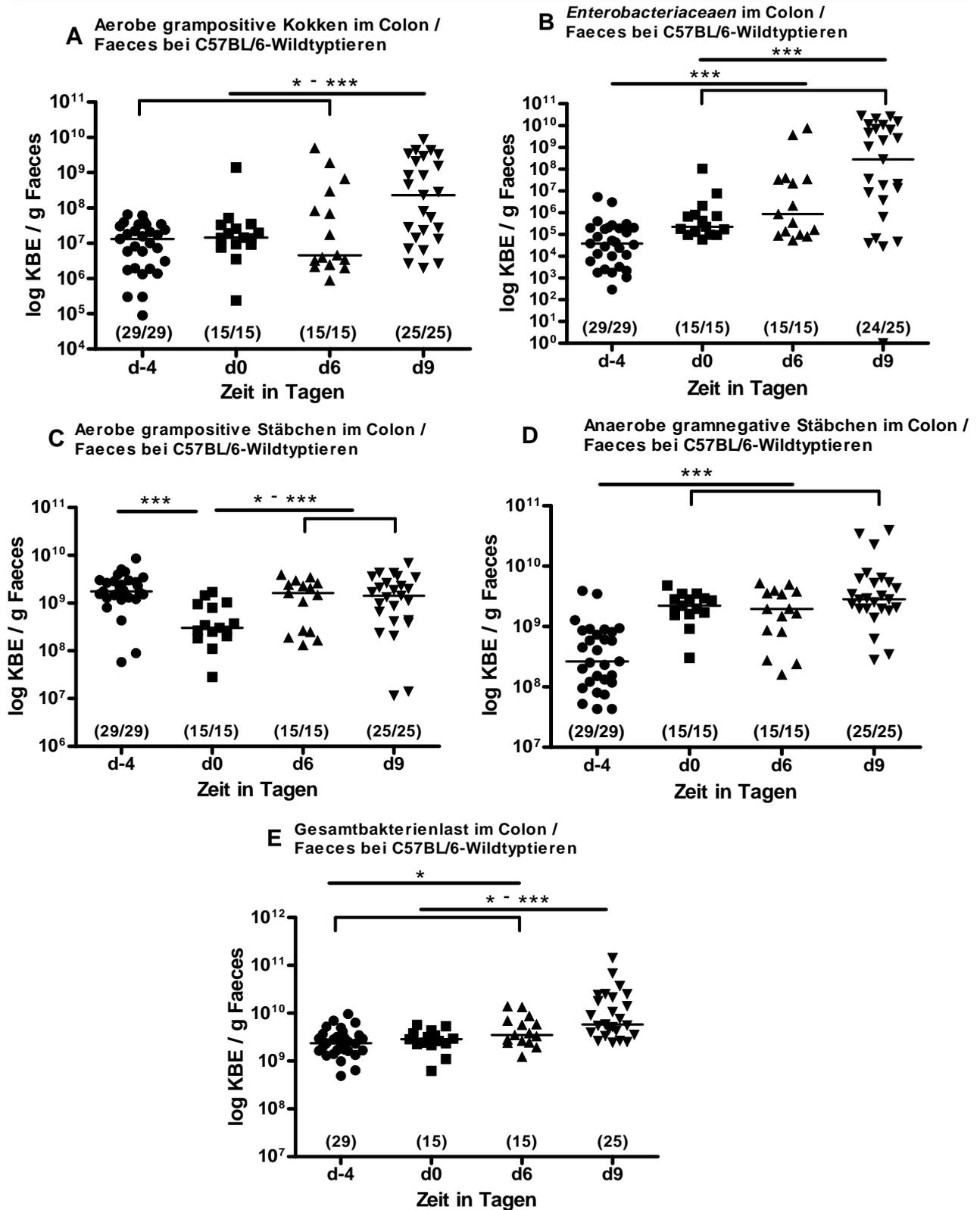


Abb. 24: Die Entwicklung der Florenveränderung im Colon / Faeces transplantiertter C57BL/6-Wildtypiere. Analysiert wurde die Faecesflora naiver (d-4), konditionierter (d0) und transplantiertter Tiere (d6 und d9). Dargestellt sind gepoolte Ergebnisse von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. In Klammern ist die jeweilige Anzahl der analysierten Tiere und der positive Nachweis angegeben. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,005).

Signifikante Zunahmen der aeroben grampositiven Kokken (von $1,47 \times 10^6 \pm 1,87 \times 10^7$ KBE/g auf $1,95 \times 10^8 \pm 5,38 \times 10^9$ KBE/g; $p < 0,005$), der *Enterobacteriaceae* (von $1,00 \times 10^0 \pm 3,87 \times 10^3$ KBE/g auf $6,29 \times 10^8 \pm 7,54 \times 10^{10}$ KBE/g; $p < 0,005$) und der anaeroben gramnegativen Stäbchen (von $5,47 \times 10^3 \pm 4,86 \times 10^6$ KBE/g auf $2,49 \times 10^5 \pm 6,98 \times 10^8$ KBE/g; $p < 0,05$) konnte im Ileum bei akuter GvHD bei C57BL/6-Tiere gefunden werden. Keine Veränderung der Gesamtbakterienlast war im Ileum zu beobachten (Abb. 25). Im Jejunum war eine signifikante Zunahme der aeroben grampositiven Kokken (von $1,19 \times 10^6 \pm 1,04 \times 10^7$ KBE/g auf $7,43 \times 10^6 \pm 5,27 \times 10^8$ KBE/g; $p < 0,05$), der *Enterobacteriaceae* (von $1,0 \times 10^0 \pm 1,35 \times 10^3$ KBE/g auf $4,95 \times 10^5 \pm 1,52 \times 10^9$ KBE/g; $p < 0,005$), der anaeroben gramnegativen Stäbchen (von $1,0 \times 10^0 \pm 2,57 \times 10^5$ KBE/g auf $1,07 \times 10^4 \pm 5,38 \times 10^6$ KBE/g; $p < 0,005$) und zusätzlich eine signifikante Abnahme der aeroben grampositiven Stäbchen (von $4,25 \times 10^8 \pm 7,29 \times 10^8$ KBE/g auf $1,16 \times 10^8 \pm 4,11 \times 10^8$ KBE/g; $p < 0,05$) nachzuweisen (Abb. 26A). Die Gesamtbakterienlast im Ileum und Jejunum zeigte einen Trend zum Anstieg, der Unterschied war aber am ehesten aufgrund der großen Standardabweichung nicht signifikant (Abb. 25, 26A). Im Magen war keine Veränderung der Flora festzustellen (Abb. 26B).

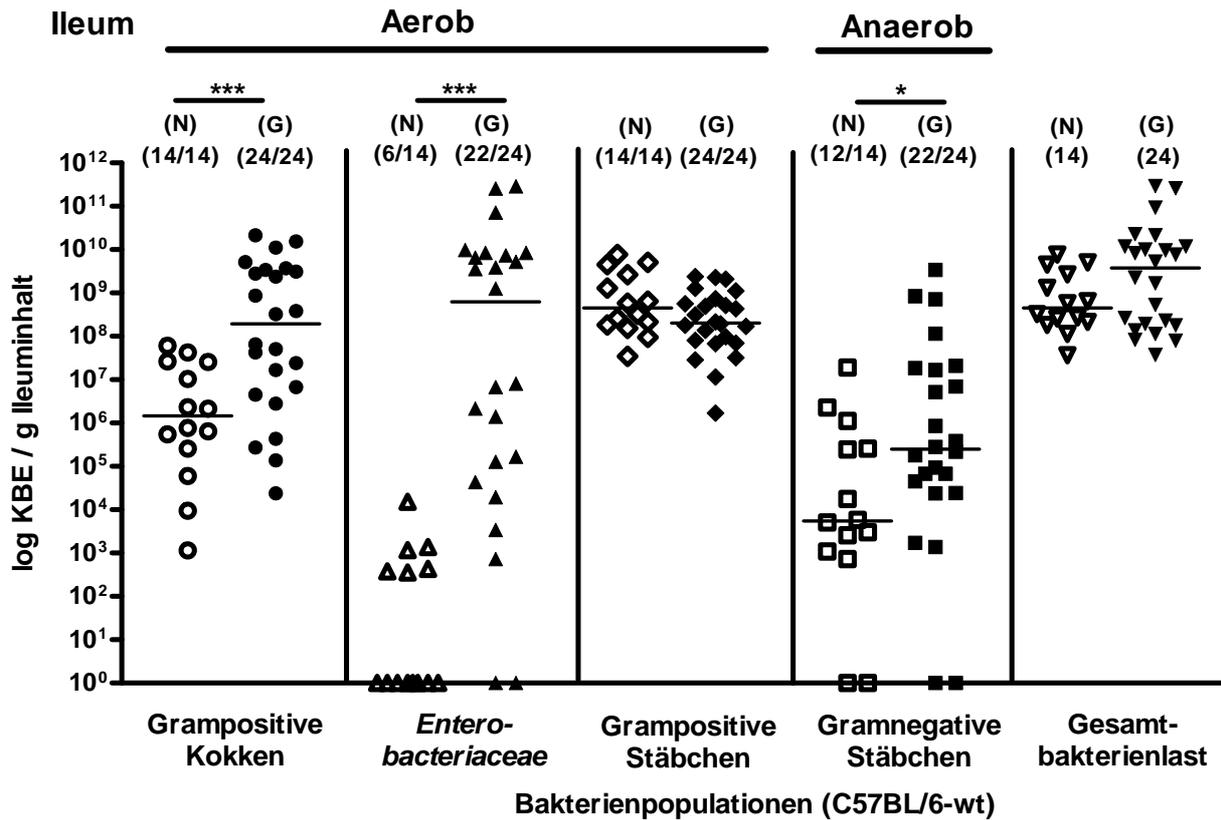


Abb. 25: Die Veränderung der Ileumflora bei C57BL/6-Tieren mit akuter iGvHD. Die Analysen wurden von gesunden Tieren und von transplantierten Tieren am Tag neun nach Transplantation vorgenommen. Die offenen Zeichen symbolisieren die gesunden Tiere, die geschlossenen Zeichen die transplantierten Tiere, in Klammern ist die Anzahl der analysierten Tiere und der positive Nachweis gezeigt. Dargestellt sind gepoolte Daten aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$).

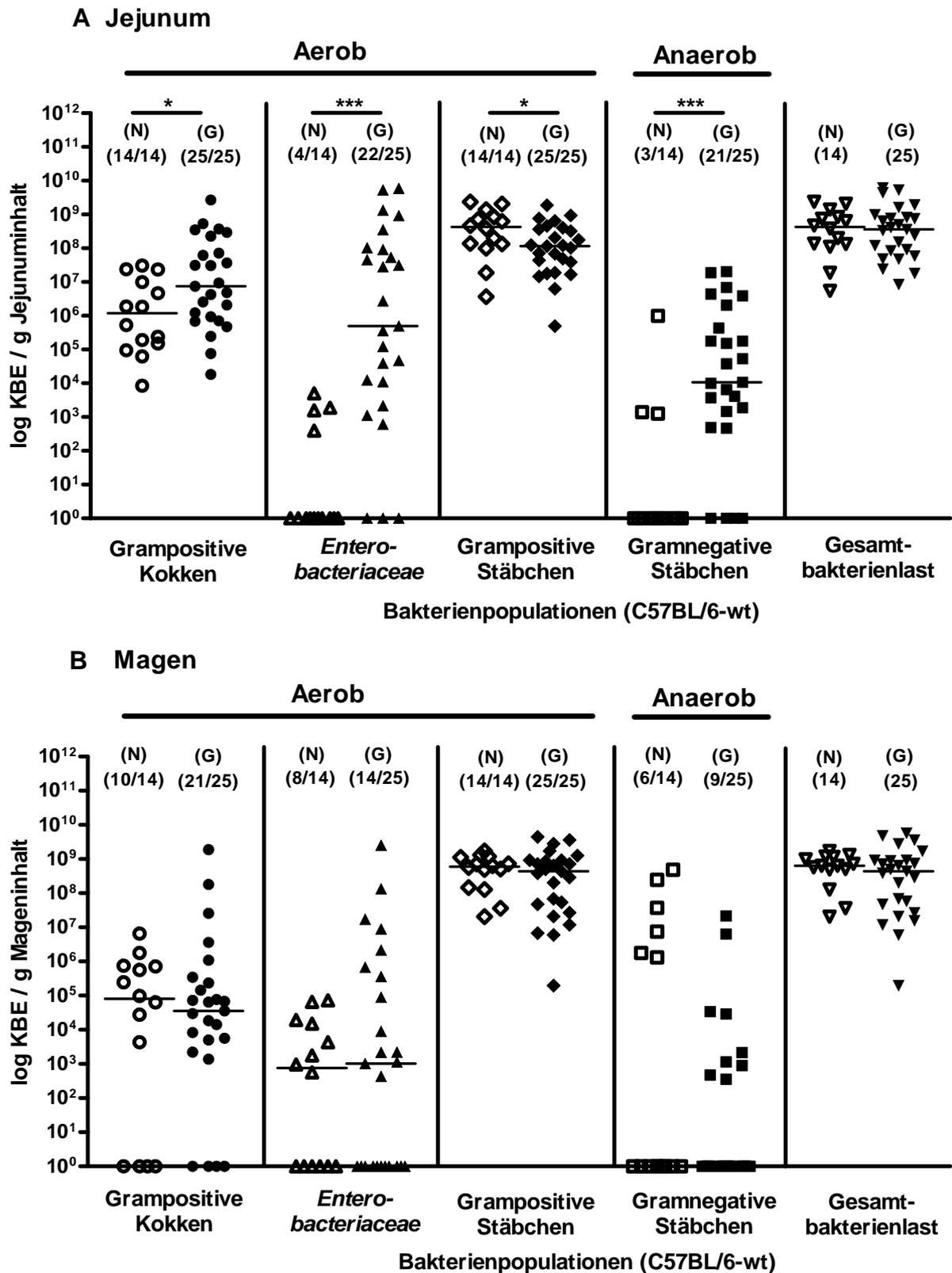


Abb. 26: Die Veränderung der Jejunum- (A) und Magenflora (B) bei transplantierten C57BL/6-Wildtyp-Tieren. Verglichen sind gesunde Tiere (offene Symbole) mit konditionierten und transplantierten Tieren (geschlossene Symbole) am Tag neun nach Transplantation. Dargestellt sind gepoolte Daten aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. In Klammern ist die Anzahl der analysierten Tiere und der positive Nachweis angegeben. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$).

Zusammenfassend zeigen die dargestellten Daten, dass die Krankheitsprozesse einer akuten iGvHD bis zum Höhepunkt der Entzündung in unserem Mausmodell zu charakteristischen Verschiebungen der luminalen Flora im Gastrointestinaltrakt führten. Besonders hervorzuheben ist dabei die Akkumulation der *Enterobacteriaceae* in beiden genetischen Hintergründen und zusätzlich der Anstieg aerober grampositiver Kokken und anaerober gramnegativer Stäbchen bei C57BL/6-Wildtypieren in sämtlichen analysierten Darmabschnitten, nicht hingegen im Magen. Die Veränderung der mikrobiellen intestinalen Besiedlung stand im engen zeitlichen Zusammenhang mit der Entwicklung der gastrointestinalen Entzündungszeichen. Weiterhin war bereits nach Konditionierung im Colon / Faeces bei C57BL/6-Tieren ein signifikanter Anstieg der *Enterobacteriaceae* und anaeroben gramnegativen Stäbchen zu beobachten, für die aeroben grampositiven Stäbchen hingegen waren nach Konditionierung eine signifikante Abnahme nachweisbar.

3.1.5 Molekulare Analyse der Darmflora durch DGGE bei GvHD

Zur Ergänzung der kulturellen Analyse wurde als molekulargenetisches Verfahren die DGGE verwendet. Ziel dabei war es, die nicht kultivierbaren Spezies der Darmflora zu erfassen, eine Veränderung der Florendiversität bei Entwicklung der GvHD zu analysieren und zugleich die Ergebnisse der kulturellen Analyse abzugleichen. Die molekulare Analyse wurde auf das Colon als repräsentatives Organ beschränkt, da in diesem Darmabschnitt nicht nur die histopathologischen Veränderungen, sondern auch die Veränderungen der Flora in beiden genetischen Hintergründen maximal ausgeprägt waren.

Die Ergebnisse der kulturellen Analysen wurden durch die DGGE bestätigt. Im gesunden Zustand war die Colonflora von C57BL/10- und C57BL/6-Wildtypieren gekennzeichnet durch das Vorhandensein einer diversen Flora, was durch eine Vielzahl von sich darstellenden Banden gezeigt werden konnte (Abb. 27 und nicht dargestellt). Für die C57BL/10-Wildtypiere konnte bis zum Tag 11 nach Transplantation eine Abnahme der Florendiversität nachgewiesen werden, während bestimmte Banden im Verlauf der Krankheitsentwicklung in ihrer Ausprägung an Intensität zunahm (Abb. 27).

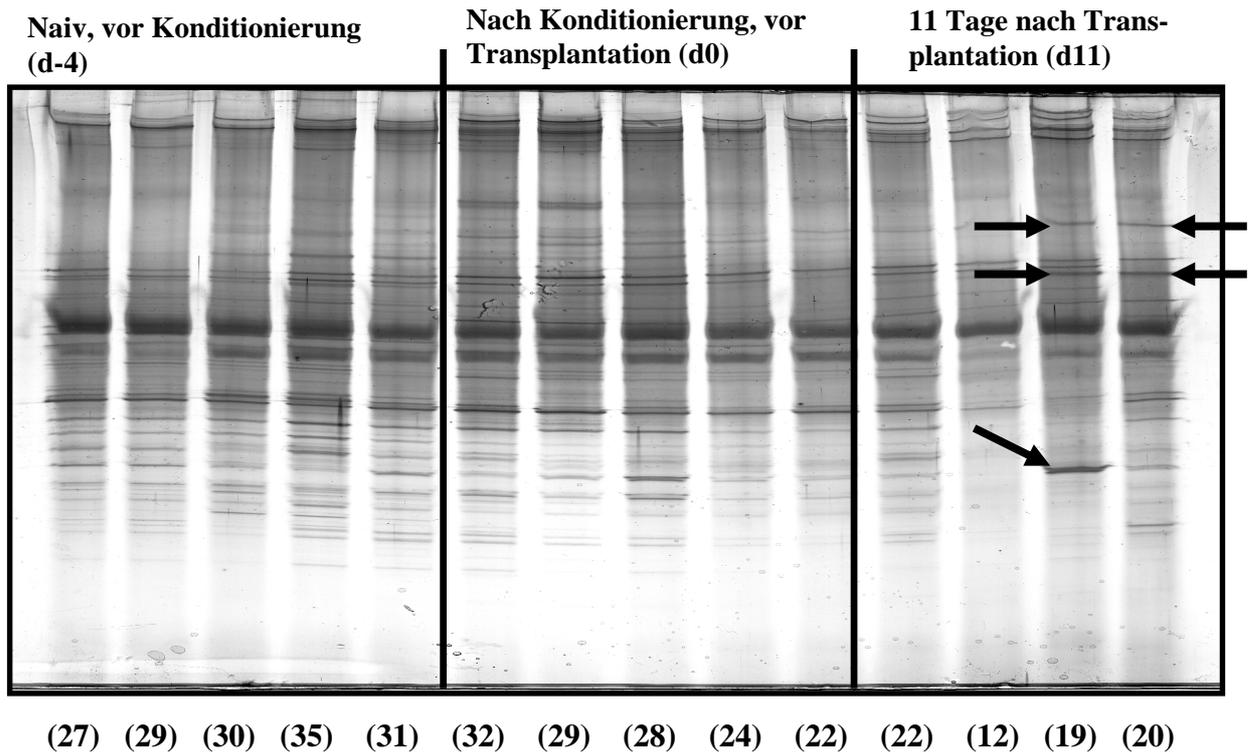


Abb. 27: HDA DGGE-Analysen der Faecesflora von C57BL/10-Wildtyp-Tieren. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Analyse des Coloninhalts von vier bis fünf repräsentativen Tieren. Die Entnahme der Faeces erfolgte jeweils von nicht konditionierten (naiven) Tieren (d-4), nach Abschluss der Konditionierung am Tag der Transplantation (d0) und 11 Tage nach Transplantation (d11). Vor der Transplantation war eine diverse Flora nachzuweisen, verdeutlicht durch eine Vielzahl sich darstellender Banden, die bis zum Tag 11 nach Transplantation in ihrer Diversität abnahm. Dies wird durch eine Reduktion der Banden, in Klammern angegeben, deutlich. Andererseits zeigten andere Banden 11 Tage nach Transplantation eine besonders intensive Ausprägung (durch die Pfeile angezeigt).

Bei den C57BL/6-Wildtyp-Tieren konnte ebenfalls durch die DGGE eine Veränderung der Flora am Tag neun nach Transplantation verglichen mit gesunden Tieren nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

Die Sequenzanalysen einzelner ausgeschnittener Banden bei C57BL/10-Wildtyp-Tieren zeigte nach Reamplifikation, dass bestimmte Banden, welche der Spezies der Laktobazillen zugeordnet werden konnten, am Tag 11 nach der Transplantation nicht mehr nachweisbar waren, während bestimmte am Tag 11 besonders dominante Banden der Gruppe der *Enterobacteriaceae*n zugeordnet werden konnten (nicht dargestellt).

3.2 Einfluss der TLRs und des NOD2-Rezeptors auf die Ausbildung einer akuten GvHD

3.2.1 Einfluss der TLRs und des NOD2-Rezeptors auf das Überleben bei GvHD

Die Analyse der Überlebensraten transplantierter Tiere mit Mutationen des TLR9-, des NOD2-Rezeptors oder des Adapterprotein TRIF ergab im C57BL/6-Hintergrund ein signifikant besseres Überleben der TLR9^{-/-} und NOD2^{-/-}-Tiere im Vergleich zu den C57BL/6-Wildtypieren (TLR9^{-/-}-p<0,01; NOD2^{-/-}- p<0,005; Abb. 28) bis zum Tag 29 nach Transplantation.

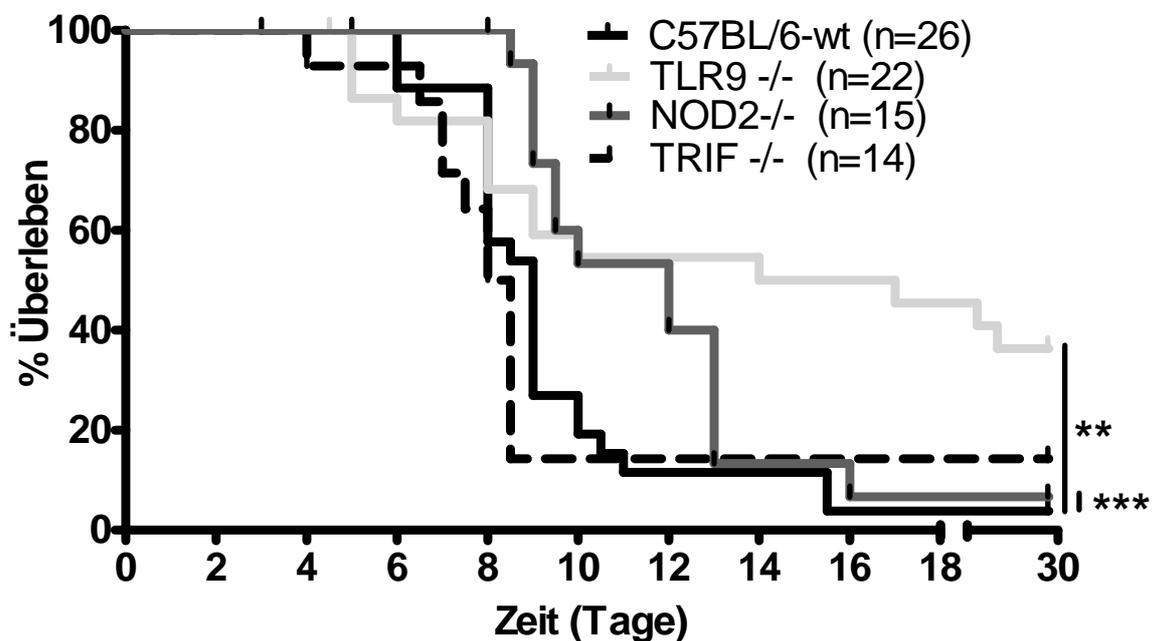


Abb. 28: Überlebensraten von TLR9^{-/-}-, NOD2^{-/-}- und TRIF^{-/-}-Tieren im Vergleich zu C57BL/6-Wildtypieren nach allogener Stammzelltransplantation. Dargestellt sind die gepoolten Analysen aus zwei unabhängigen Experimenten. „0“ gibt den Zeitpunkt der Transplantation an, „n“ die Anzahl der Tiere. Beobachtet wurde bis zum Tag 29 nach Transplantation. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,005).

Im genetischen C57BL/10-Hintergrund war kein signifikant besseres Überleben von TLR2^{-/-}-, TLR4^{-/-}- und TLR2/4^{-/-}-Tieren im Vergleich zu den Wildtypieren zu beobachten (Abb. 29).

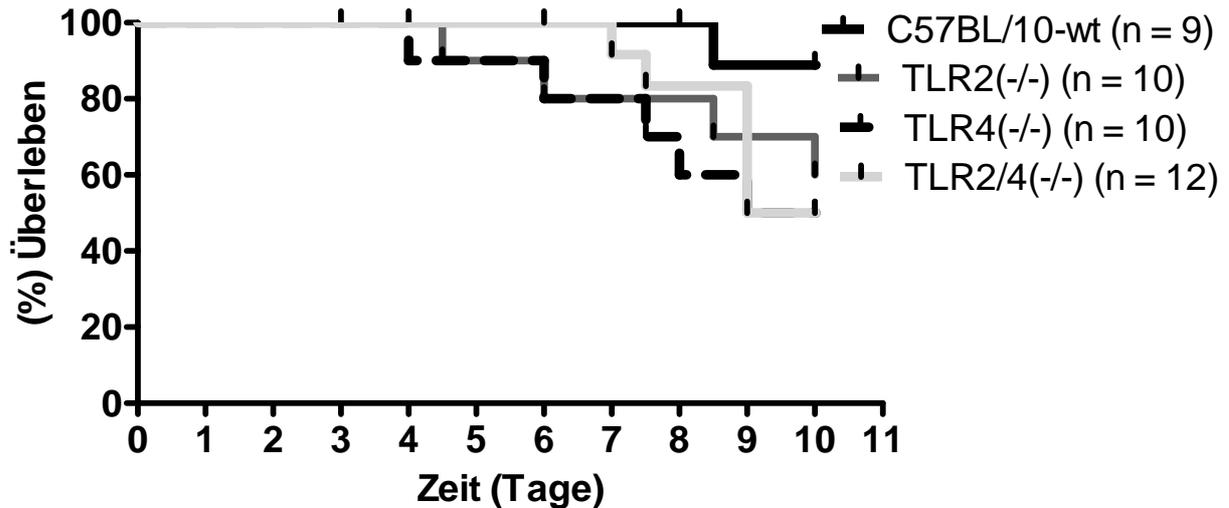


Abb. 29: Überleben TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} und TLR2/4^{-/-}-Tieren im Vergleich zu C57BL/10-Wildtypieren. „0“ gibt den Zeitpunkt der Transplantation an, „n“ die Anzahl der Tiere. Es waren keine Unterschiede der Überlebensraten in diesem genetischen Hintergrund bis zur planmäßigen Tötung der Tiere am Tag zehn nach Transplantation festzustellen.

3.2.2 Einfluss der TLRs und des NOD2-Rezeptores auf die gastrointestinale Entzündungsreaktion bei GvHD

Die verbesserten Überlebensraten der TLR9^{-/-}- und NOD2^{-/-}-Tiere und die Hypothese, dass die Ausbildung histopathologischer Veränderungen im Gastrointestinaltrakt auch bei der Vorlage von anderen Mutationen / Deletion verändert ist, gab Anlass für die vergleichende histopathologische Analyse des Gastrointestinaltraktes von C57BL/6-, C57BL/10-, TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, TLR2/4^{-/-}, TLR9^{-/-}, NOD2^{-/-}, TRIF^{-/-} und MyD88^{-/-}-Tieren. Die Entnahme der Darmabschnitte erfolgte dabei analog zu den Analysen der Überlebensraten der C57BL/6- und C57BL/10-Tiere: Für den genetischen C57BL/6-Hintergrund am Tag neun nach Transplantation und für den genetischen C57BL/10-Hintergrund am Tag zehn nach Transplantation.

3.2.2.1 Entzündung bei TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, TLR2/4^{-/-}-Tieren mit iGvHD

Unabhängig von den vorliegenden Mutationen bzw. Deletion der Rezeptoren des angeborenen Immunsystems konnten bei den jeweiligen Mäusen nach allogener Transplantation Entzündungszeichen im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden. Im Vergleich zwischen C57BL/10-Wildtypieren und Tieren mit TLR2-, TLR4- und TLR2/4-Defizienz konnte gezeigt werden, dass Tiere mit einer Doppeldefizienz für TLR2 und TLR4 signifikant weniger Entzündung im Magen / Jejunum und Colon als die Wildtypiere aufwiesen (beides $p < 0,05$; Abb.

30A, C). Dies konnte durch Verwendung eines „kumulativen GvHD-Scores“, bei dem die Werte für den histopathologischen Schweregrad der GvHD im jeweiligen Abschnitt des Gastrointestinaltraktes addiert wurden, bestätigt werden ($p < 0,05$; Abb. 30D). Im Ileum konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen TLR2/4^{-/-}-Tieren und C57BL/10-Tieren gezeigt werden (Abb. 30B). Ebenso gab es keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Schweregrades der Darm-GvHD zwischen C57BL/10-, TLR2^{-/-}- oder TLR4^{-/-}-Tieren (Abb. 30).

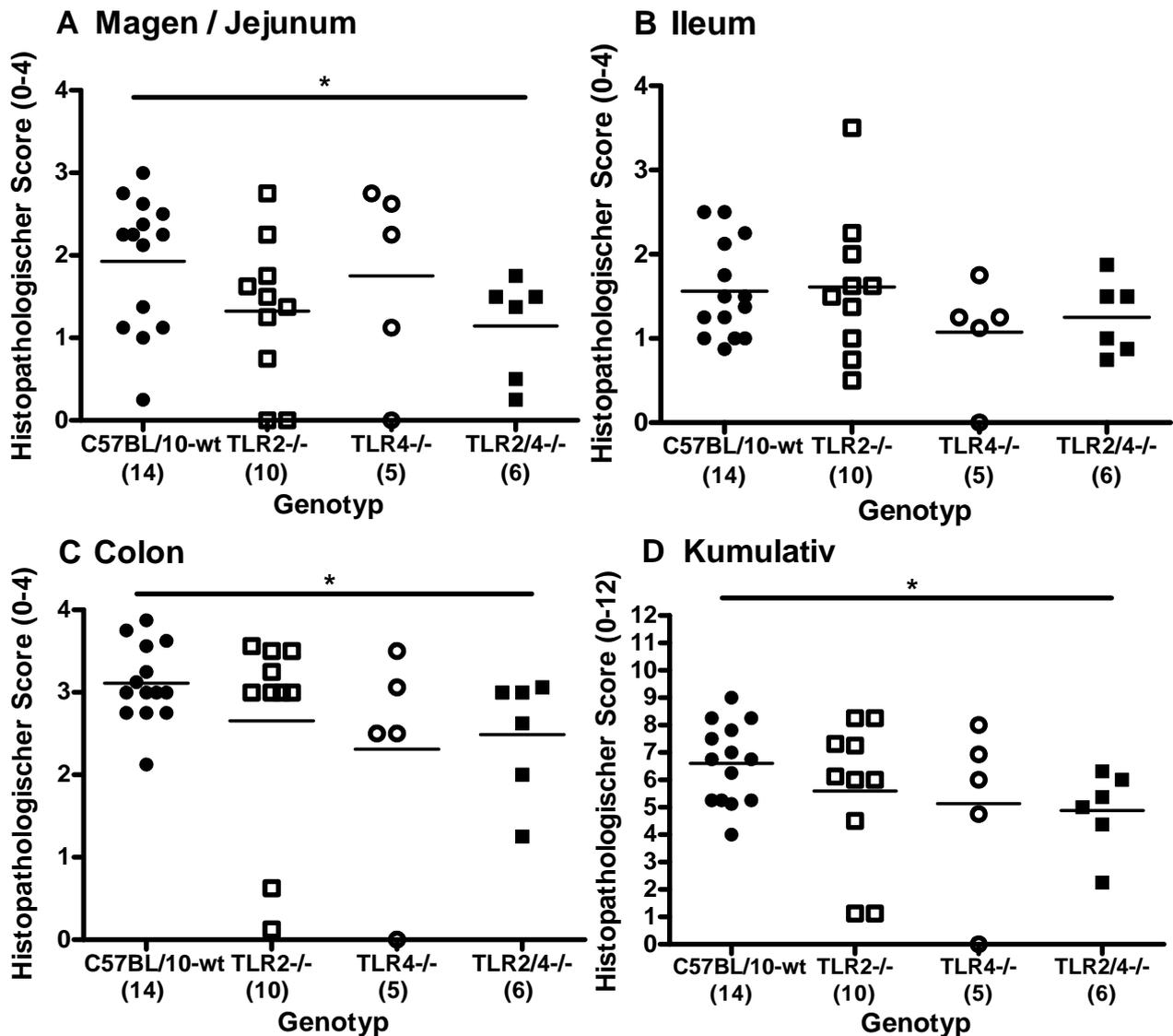


Abb. 30: Der Schweregrad histopathologischer Veränderungen im Gastrointestinaltrakt von TLR2^{-/-}-, TLR4^{-/-}- und TLR2/4^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu C57BL/10-Wildtyptieren mit akuter Darm-GvHD im Magen / Jejunum (A), Ileum (B), Colon (C) und für den gesamten Gastrointestinaltrakt aufaddiert (kumulativ – D) am Tag zehn nach Transplantation. Die Analysen erfolgten in mindestens zwei unabhängigen Experimenten, in Klammern ist die Anzahl der analysierten Tiere angegeben. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$).

3.2.2.2 Entzündung bei TLR9^{-/-}-, TRIF^{-/-}-, NOD2^{-/-}- und MyD88^{-/-}-Tieren mit iGvHD

Neben der Analyse des Schweregrades histopathologischer Veränderungen im Gastrointestinaltrakt bei akuter GvHD von TLR9^{-/-}- und NOD2^{-/-}-Tieren wurde weiterhin die Ausprägung der Darm-GvHD bei Mäusen mit einer Defizienz für das Adapterprotein MyD88, welches für die Signalkaskade sämtlicher TLRs außer TLR3 nötig ist, untersucht. Zusätzlich wurde ein zweites Adapterprotein, TRIF, das für die Signalkaskade des TLR3 und TLR4 wichtig ist, durch die Analyse TRIF-defizienter Tiere im Darm-GvHD-Modell vergleichend untersucht. Der „GvHD-Score“ zeigte zunächst für die TLR9^{-/-}-Tiere, dass diese im Vergleich zu den C57BL/6-Wildtyp-Tieren eine geringere Entzündungsausprägung im Magen / Jejunum ($p < 0,05$; Abb. 31A) und Colon ($p < 0,05$; Abb. 31C) hatten. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass NOD2^{-/-}-Tiere im Magen / Jejunum eine geringere Entzündungsausprägung hatten als transplantierte C57BL/6-Wildtyp-Tiere ($p < 0,05$; Abb. 31A).

Für die MyD88^{-/-}-Tiere konnte zunächst auf den Höhepunkt der Entzündung ein signifikant geringerer kumulativer „GvHD-Score“ der Darm-GvHD verglichen mit den C57BL/6-Wildtyp-Tieren ($p < 0,0005$; Abb. 31D) festgestellt werden. Bei der Analyse der einzelnen Abschnitte des Gastrointestinaltraktes konnte weiterhin beobachtet werden, dass die MyD88^{-/-}-Tiere eine signifikant geringere Ausbildung der Entzündung im Magen / Jejunum ($p < 0,0005$; Abb. 31A) aber auch im Colon ($p < 0,005$; Abb. 31C) als die Wildtyp-Tiere aufwiesen. Für das Ileum hingegen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen MyD88^{-/-}- und C57BL/6-Tieren dokumentiert (Abb. 31B).

Für das Ileum konnte festgestellt werden, dass die TRIF^{-/-}-Tiere eine signifikant stärkere Entzündungsausprägung als C57BL/6-Tiere hatten ($p < 0,05$; Abb. 31B).

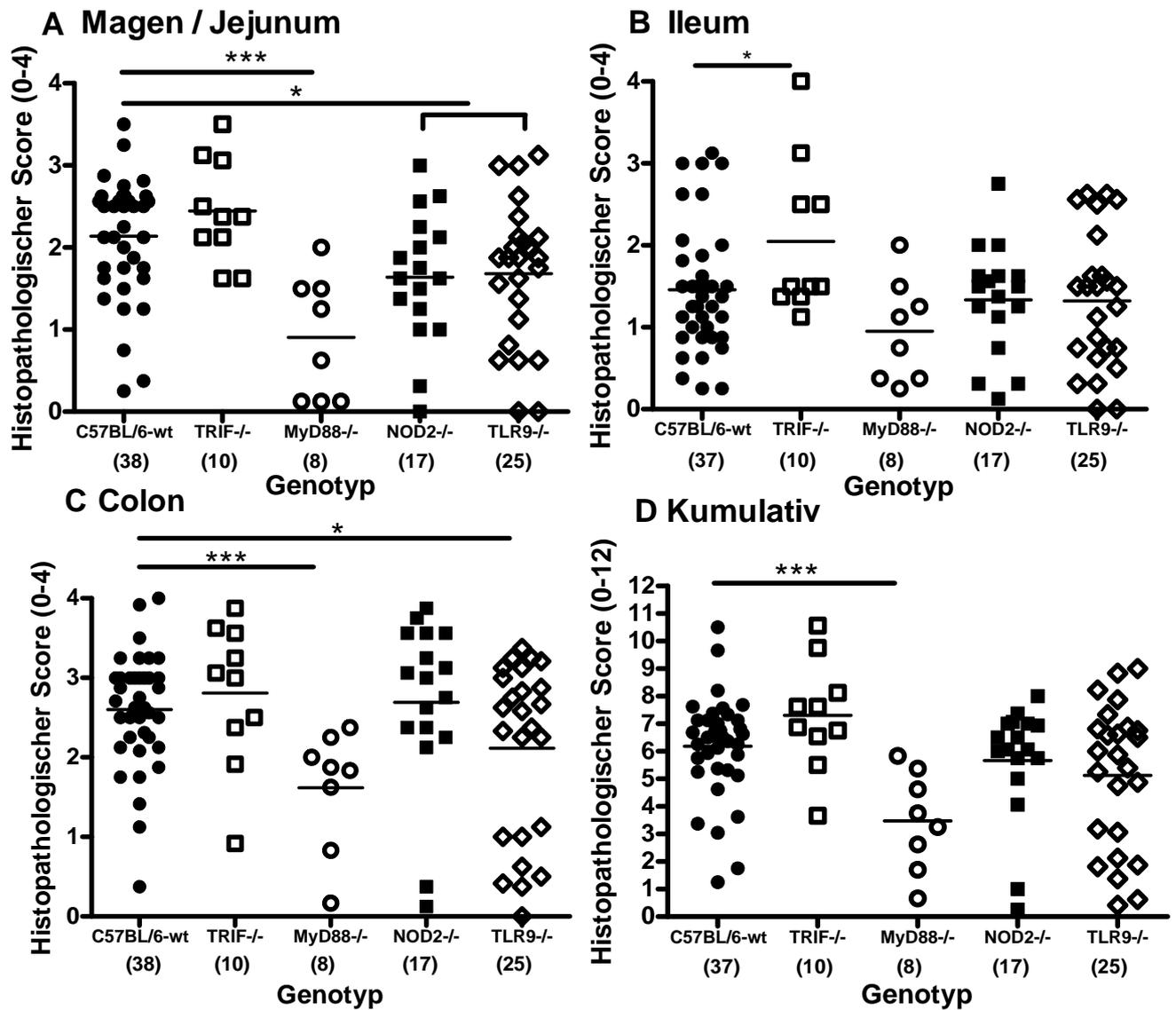


Abb. 31: Die Ausbildung gastrointestinaler Entzündungszeichen von TRIF^{-/-}, MyD88^{-/-}, NOD2^{-/-} und TLR9^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu C57BL/6-Wildtyptieren. Dargestellt sind die Ergebnisse histopathologischer Analysen am Tag neun nach Transplantation von Magen / Jejunum (A), Ileum (B), Colon (C) und im gesamten Gastrointestinaltrakt aufaddiert („kumulativ“ – D). Die histopathologische Analyse erfolgte in vier unabhängig durchgeführten Experimenten. In Klammern ist die Anzahl der analysierten Tiere angegeben. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen dargestellt (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,005).

3.2.3 Einfluss der TLRs und des NOD2-Rezeptors auf die Immunreaktion bei iGvHD

Es wurde gezeigt, dass Mutationen bzw. Deletion der Rezeptoren des angeborenen Immunsystems die Ausbildung der Entzündungsreaktion im Gastrointestinaltrakt beeinflussen. Um die Immunreaktion zu untersuchen, wurden *in situ* immunhistochemische Untersuchungen im

Colon durchgeführt, dem Organabschnitt, in dem der Entzündungsgrad der Darm-GvHD am ausgeprägtesten war (Abb. 11, 30, 31). Die immunhistochemischen Analysen erfolgten zum gleichen Zeitpunkt wie die pathohistologischen Analysen.

3.2.3.1 Apoptose und Proliferation bei TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, TLR2/4^{-/-}-Tieren im Colon mit GvHD

Zunächst konnte bei den *in situ* Analysen gezeigt werden, dass apoptotische (Abb. 32A) und proliferierende Zellen (Abb. 32B) im Colon transplantierte Tiere mit Mutation des TLR2 (für beide zellulären Marker $p < 0,0005$), Deletion des TLR4 (für beide zellulären Marker $p < 0,005$) und des TLR2/4 (Caspase3 $p < 0,001$ und Ki67 $p < 0,0005$) im Vergleich zu gesunden Tieren des gleichen Genotypes signifikant vermehrt nachzuweisen waren.

Dabei konnte weiterhin festgestellt werden, dass TLR2^{-/-}-Tiere zehn Tage nach der Transplantation signifikant weniger apoptotische Zellen im Colon als die C57BL/10-Tiere zum gleichen Zeitpunkt hatten ($p < 0,05$; Abb. 32A).

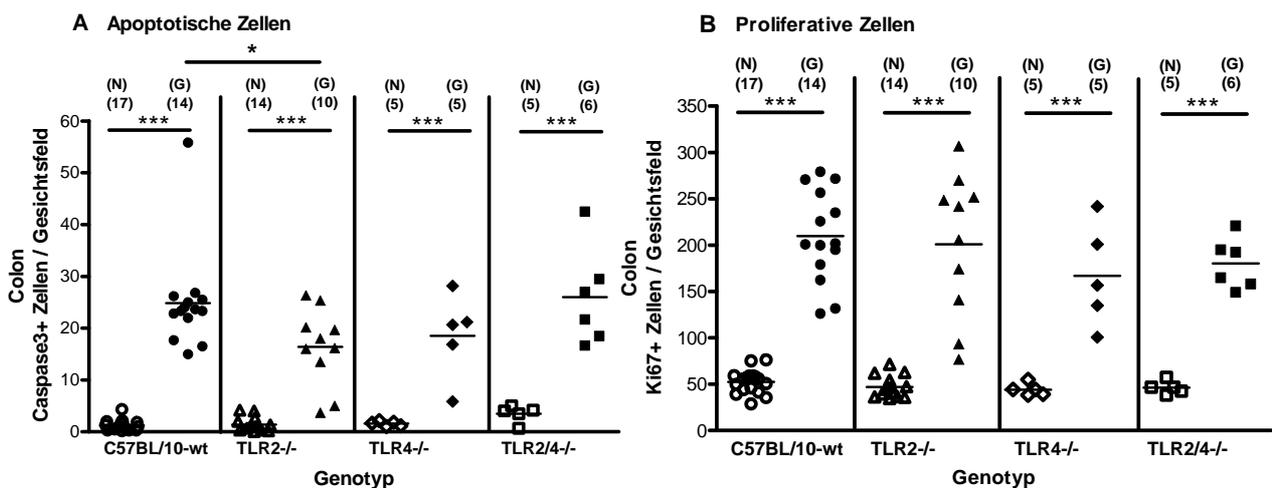


Abb. 32: Apoptotische (A) und proliferierende Zellen (B) im Colon von TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, TLR2/4^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu C57BL/10-Wildtyp-Tieren bei akuter iGvHD. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente, in Klammern ist die Anzahl der Tiere angegeben. Offene Zeichen symbolisieren gesunde Tiere, geschlossene transplantierte Tiere zehn Tage nach Transplantation. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$).

3.2.3.2 T-Zellen, regulatorische T-Zellen und Neutrophile im Colon bei TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-}, TLR2/4^{-/-}-Mäusen mit GvHD

CD3, der zelluläre Marker der T-Zellen, war nach Transplantation im Vergleich zu gesunden Tieren des gleichen Genotypes vermehrt bei TLR2^{-/-} ($p < 0,0005$; Abb. 33A), TLR4^{-/-} ($p < 0,0005$; Abb. 33A) und TLR2/4^{-/-} ($p < 0,0005$; Abb. 33A) Tieren nachzuweisen. Im Vergleich zwischen gesunden und transplantierten Tieren auf dem Höhepunkt der Darm-GvHD konnte bei keinem der untersuchten Genotypen im C57BL/10-Hintergrund ein signifikanter Anstieg der regulatorischen T-Zellen festgestellt werden (Abb. 33B). Neutrophile waren zwar bei C57BL/10-Tieren nach Transplantation signifikant vermehrt nachzuweisen (Abb. 33C), allerdings war diese Zellpopulation nur in geringer Anzahl im Colon vorhanden, so dass allenfalls von einem diskreten Anstieg ausgegangen werden kann. Bei TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} und TLR2/4^{-/-}-Tieren konnten keine signifikanten Unterschiede bei dem Vorkommen der Neutrophilen im Vergleich zwischen gesunden und transplantierten Tieren des gleichen Genotypes auf dem Höhepunkt der Darm-GvHD festgestellt werden (Abb. 33C).

Im Vergleich zu C57BL/10-Tieren waren nach Transplantation weniger T-Zellen bei TLR2^{-/-} ($p < 0,05$), TLR4^{-/-} ($p < 0,05$) und TLR2/4^{-/-}-Tieren ($p < 0,005$) zu finden (Abb. 33A).

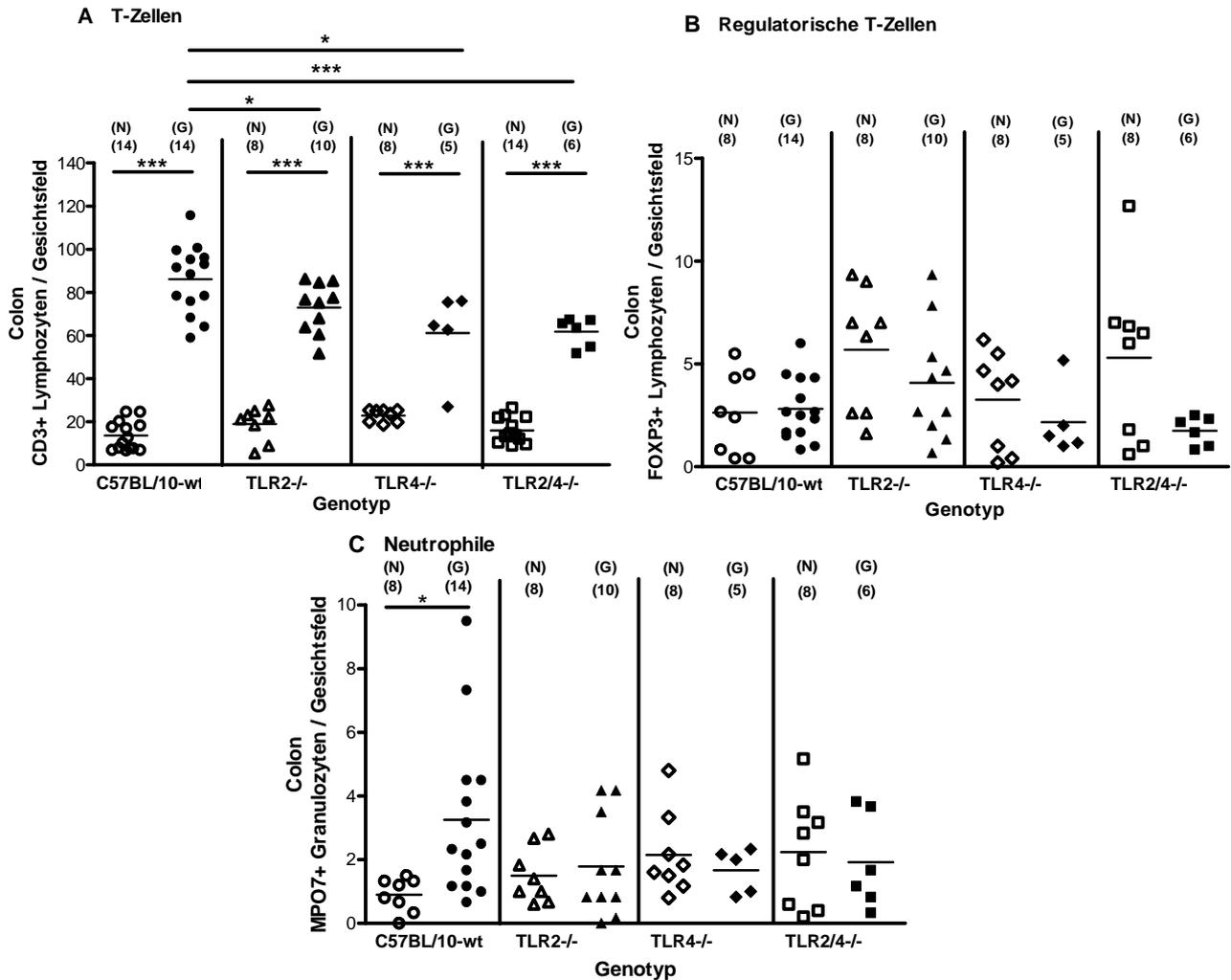


Abb. 33: T-Zellen (A), regulatorische T-Zellen (B) und Neutrophile (C) im Colon von TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} und TLR2/4^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu C57BL/10-Wildtyptieren bei akuter iGvHD. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente, in Klammern ist die Anzahl der Tiere angegeben. Offene Zeichen symbolisieren gesunde Tiere, geschlossene Zeichen transplantierte Tiere auf dem Höhepunkt der Darm-GvHD (Tag zehn nach Transplantation). Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,005).

3.2.3.3 Apoptose und Proliferation bei TLR9^{-/-}, TRIF^{-/-}, NOD2^{-/-} und MyD88^{-/-}-Tieren im Colon mit GvHD

Im genetischen C57BL/6-Hintergrund konnte zunächst gezeigt werden, dass apoptotische und proliferierende Zellen im Vergleich zwischen gesunden und transplantierten Tieren des gleichen Genotypes auf dem Höhepunkt der Darm-GvHD bei TRIF^{-/-} (für beide zellulären Marker p<0,0005; Abb. 34), MyD88^{-/-} (für beide zellulären Marker p<0,0005; Abb. 34), NOD2^{-/-} (für

beide zellulären Marker $p < 0,0005$; Abb. 34) und $\text{TLR9}^{-/-}$ (beide zellulären Marker $p < 0,0005$; Abb. 34) Tieren signifikant vermehrt nachzuweisen waren.

Im Vergleich zu transplantierten C57BL/6-Wildtyp-Tieren hatten transplantierte $\text{MyD88}^{-/-}$ ($p < 0,0005$), $\text{NOD2}^{-/-}$ ($p < 0,05$) und $\text{TLR9}^{-/-}$ ($p < 0,0005$) Tiere weniger apoptotische Zellen im Colon (Abb. 34A).

Bei den proliferierenden Zellen wurde hingegen festgestellt, dass $\text{TLR9}^{-/-}$ ($p < 0,005$) und $\text{NOD2}^{-/-}$ ($p < 0,05$) Tiere signifikant mehr Ki67-positive Zellen im Colon als die C57BL/6-Tiere auf dem Höhepunkt der Darm-GvHD aufzeigten (Abb. 34B).

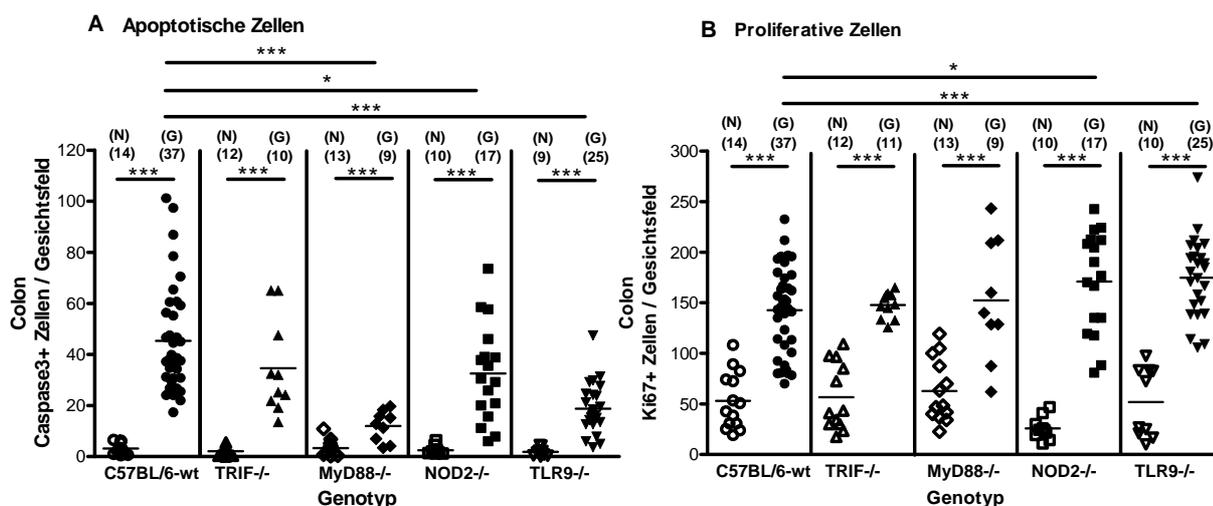


Abb. 34: Apoptotische (A) und proliferierende Zellen (B) im Colon von $\text{TRIF}^{-/-}$, $\text{MyD88}^{-/-}$, $\text{NOD2}^{-/-}$ und $\text{TLR9}^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu C57BL/6-Wildtyp-Tieren bei akuter iGvHD. Dargestellt sind die Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten. In Klammern ist die Anzahl der Tiere angegeben. Dargestellt in offenen Zeichen sind gesunde Tiere, in geschlossenen Zeichen transplantierte Tiere neun Tage nach Transplantation. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$).

3.2.3.4 T-Zellen, regulatorische T-Zellen und Neutrophile im Colon bei $\text{TLR9}^{-/-}$, $\text{TRIF}^{-/-}$, $\text{NOD2}^{-/-}$ und $\text{MyD88}^{-/-}$ -Tieren mit GvHD

Ähnlich wie bei den *in situ* Analysen im genetischen C57BL/10-Hintergrund wurden für sämtliche untersuchten Genotypen im C57BL/6-Hintergrund beim Vergleich zwischen gesunden und transplantierten Tieren desselben Genotypes ein signifikanter Anstieg der T-Zellen gezeigt (bei $\text{TRIF}^{-/-}$ $p < 0,0005$; bei $\text{Myd88}^{-/-}$ $p < 0,01$; bei $\text{NOD2}^{-/-}$ $p < 0,0005$; bei $\text{TLR9}^{-/-}$ $p < 0,0005$; Abb. 35A). Weiterhin konnte bei den untersuchten Tieren mit Mutationen der Rezeptoren des angeborenen Immunsystems bzw. deren Adapterproteine im genetischen C57BL/6-Hintergrund kein Anstieg der regulatorischen T-Zellen (Abb. 35B) oder aber der Neutrophilen (Abb. 35C)

3.2.4 Einfluss der TLRs und des NOD2-Rezeptors auf die Veränderung der Darmflora bei GvHD

Da eine Beteiligung der mikrobiellen Flora in Interaktion mit den Rezeptoren des angeborenen Immunsystems bei der Pathogenese von GvHD vermutet wird, wurde eine umfassende Analyse der Intestinalflora bei Tieren mit Mutationen bzw. Deletion im angeborenem Immunsystem vor und nach allogener Stammzelltransplantation durchgeführt.

Analog zu den histologischen Analysen erfolgten die kulturellen Analysen auf dem Höhepunkt der Entzündung nach Transplantation. Zu diesem Zeitpunkt wurde nicht nur die Colonflora, sondern auch die Ileum-, Jejunum- und Magenflora der transplantierten Tiere analysiert und mit der bakteriellen Besiedlung des Gastrointestinaltraktes nicht transplantierte Tiere verglichen. Um die Kinetik der Florenveränderung zu analysieren, wurden außerdem von nicht transplantierten Tieren am Tag der Transplantation, sechs und neun Tage nach Transplantation Faecesproben von C57BL/6-, TRIF^{-/-}-, MyD88^{-/-}- und NOD2^{-/-}-Tieren gewonnen und analysiert.

3.2.4.1 Veränderung der Darmflora bei TLR2^{-/-}-, TLR4^{-/-}-, TLR2/4^{-/-}-Tieren mit GvHD

Die C57BL/10-Wildtypiere zeigten am Tag zehn nach Transplantation im Vergleich zu naiven Tieren einen signifikanten Anstieg aerober grampositiver Kokken und *Enterobacteriaceae* im Colon (Abb. 21), des Weiteren einen signifikanten Anstieg der *Enterobacteriaceae* im Ileum (Abb. 22A) und Jejunum (Abb. 22B), sowie eine Abnahme aerober grampositiver Stäbchen in Colon und Magen (Abb. 21, 23). Die Gesamtbakterienlast war bei diesen Tieren mit GvHD im Colon höher als bei gesunden Tieren (Abb. 21).

Im Colon transplantierte TLR2-defiziente Tiere konnte im Vergleich zu gesunden TLR2^{-/-}-Tieren ein Anstieg der *Enterobacteriaceae* um ca. drei Log-Stufen und der aeroben grampositiven Kokken um ca. eine Log-Stufe festgestellt werden, allerdings konnten keine signifikanten Veränderungen der Gesamtbakterienlast und der aeroben grampositiven Stäbchen (Abb. 36) beobachtet werden. Im Ileum und Jejunum von transplantierten TLR2^{-/-}-Mäusen wurde im Vergleich zu naiven TLR2^{-/-}-Tieren neben einer Akkumulation der *Enterobacteriaceae* (im Ileum um ca. fünf Log-Stufen; im Jejunum um ca. sechs Log-Stufen), welche auch bei den Wildtypieren zu beobachten war, ein signifikanter Anstieg aerober grampositiver Kokken (im Ileum und Jejunum um ca. vier Log-Stufen) aufgezeigt (Abb. 37A, 37B, 38A, 38B). Im Magen hingegen unterschied sich die Flora der TLR2^{-/-}-Tiere zehn Tage nach Transplantation nicht von gesunden TLR2^{-/-}-Tieren (Abb. 39).

Bei TLR4^{-/-}-Tieren konnte lediglich ein Anstieg von *Enterobacteriaceae* um ca. drei Log-Stufen im Colon (Abb. 36B) und um ca. fünf Log-Stufen im Ileum (Abb. 37B) der transplantierten Tiere im Vergleich zu gesunden TLR4^{-/-}-Tieren gezeigt werden.

Hatten die transplantierten Tiere sowohl eine Mutation für den TLR2 als auch eine Deletion des TLR4, konnte zehn Tage nach Transplantation im Colon ein Anstieg aerober grampositiver Kokken um ca. zwei Log-Stufen (Abb. 36A), eine Erhöhung der Gesamtbakterienlast (Abb. 36E) und, anders als bei C57BL/10-Wildtyp-Tieren, ein Anstieg anaerober gramnegativer Stäbchen um ca. eine Log-Stufe im Vergleich zu gesunden TLR2/4^{-/-}-Tieren gezeigt werden (Abb. 36D). Es fehlte im Colon transplantierten TLR2/4^{-/-}-Tieren im Vergleich zu gesunden TLR2/4^{-/-}-Tieren der Anstieg der *Enterobacteriaceae*, welcher bei dem Vergleich gesunder mit transplantierten C57BL/10-Wildtyp-Tieren zu beobachten gewesen war (Abb. 36B). Im Ileum und Jejunum hatten TLR2/4^{-/-}-Tiere einen signifikanten Anstieg aerober grampositiver Kokken (im Ileum um ca. vier Log-Stufen, im Jejunum um ca. drei Log-Stufen), welcher bei C57BL/10-Wildtyp-Tieren nicht zu finden war (Abb. 37A, 38A). Allerdings konnte bei Tieren mit einer TLR2/4-Doppeldefizienz im Jejunum außerdem eine signifikante Abnahme aerober grampositiver Stäbchen um ca. eine Log-Stufe beobachtet werden, welche nicht bei C57BL/10-Wildtyp-Tieren gefunden wurde (Abb. 38C). Im Magen dieser Tiere wurde weiterhin eine signifikante Abnahme anaerober gramnegativer Stäbchen um ca. fünf Log-Stufen gezeigt (Abb. 39D).

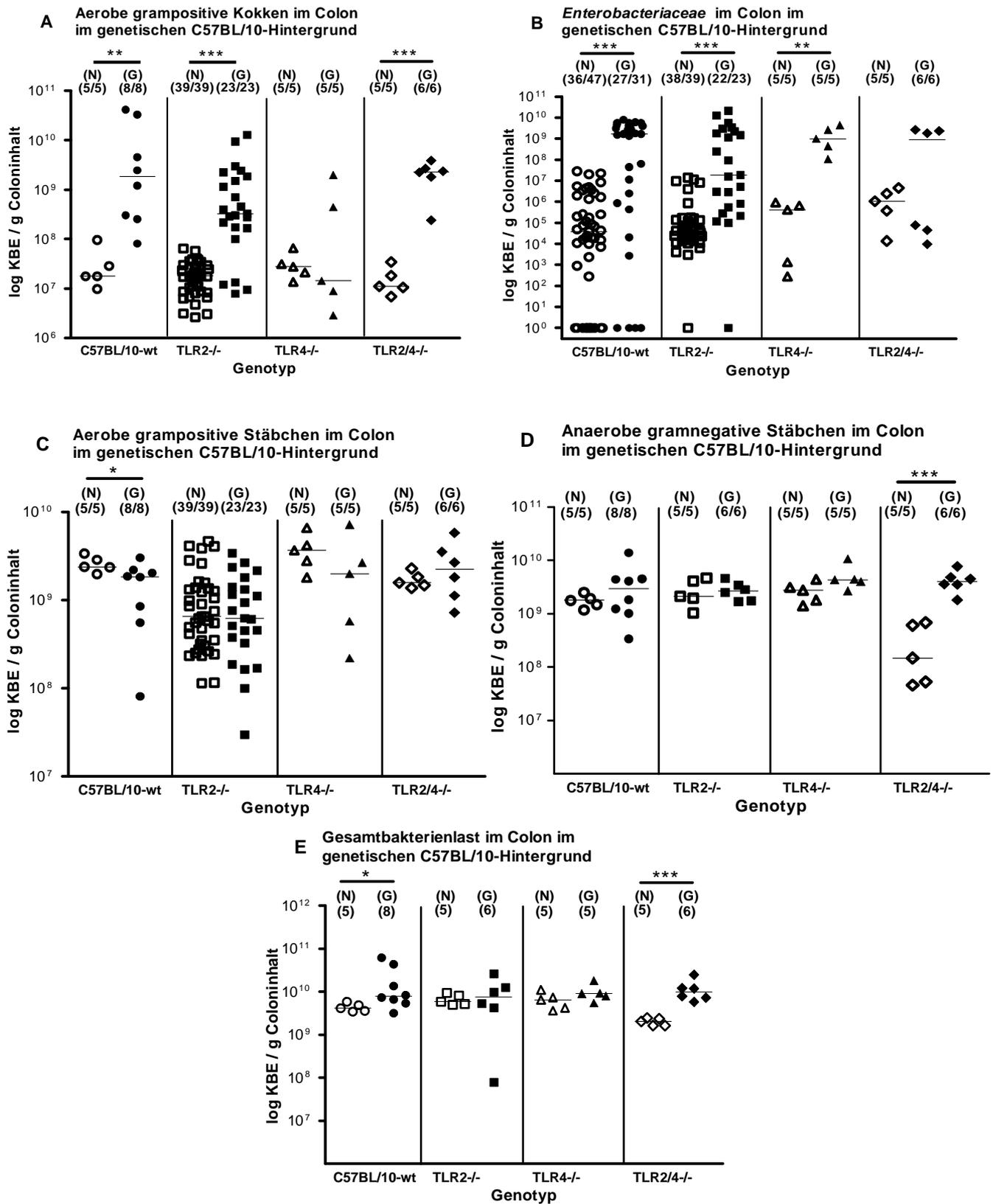


Abb. 36: Die Veränderung der Colonflora bei TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} und TLR2/4^{-/-}-Tieren bei GvHD im Vergleich zu C57/BL10-Wildtyptieren. Dargestellt sind gepoolte Daten aus zwei Versuchen. Analysiert wurde die Colonflora gesunder, nicht transplantierter Tiere (naiv, dargestellt in offenen Symbolen) und transplantierter Tiere zehn Tage nach Transplantation (dargestellt durch geschlossene Symbole) In Klammern steht die Anzahl der analysierten Tiere, sowie der positive Nachweis. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,005).

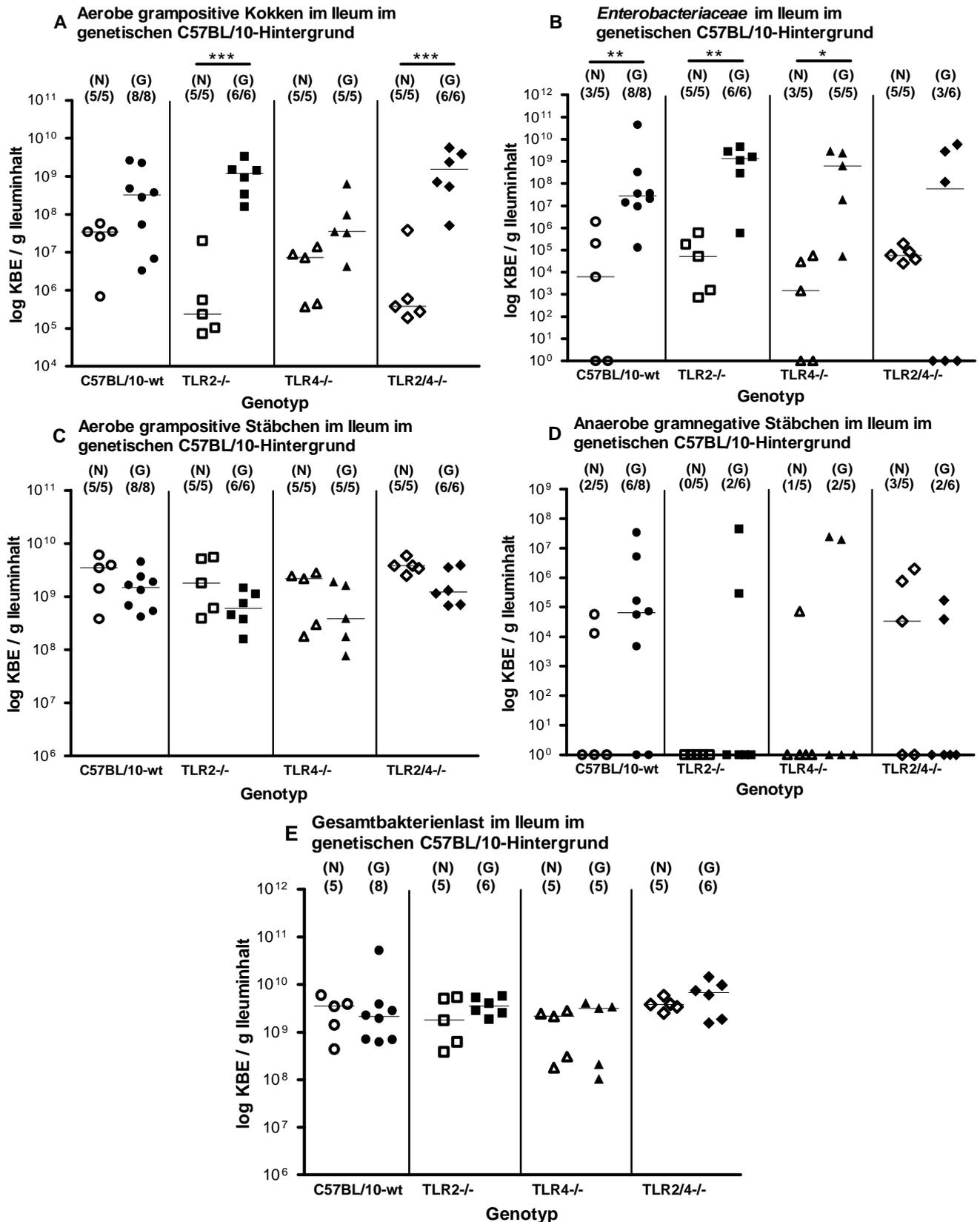


Abb. 37: Die Veränderung der Ileumflora bei TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} und TLR2/4^{-/-}-Tieren bei GvHD im Vergleich zu C57/BL10-Wildtyptieren. Offene Zeichen symbolisieren gesunde Tiere, geschlossene Zeichen transplantierte Tiere am Tag zehn nach Transplantation. In Klammern ist die Anzahl der analysierten Tiere und der positive Nachweis gezeigt. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,005).

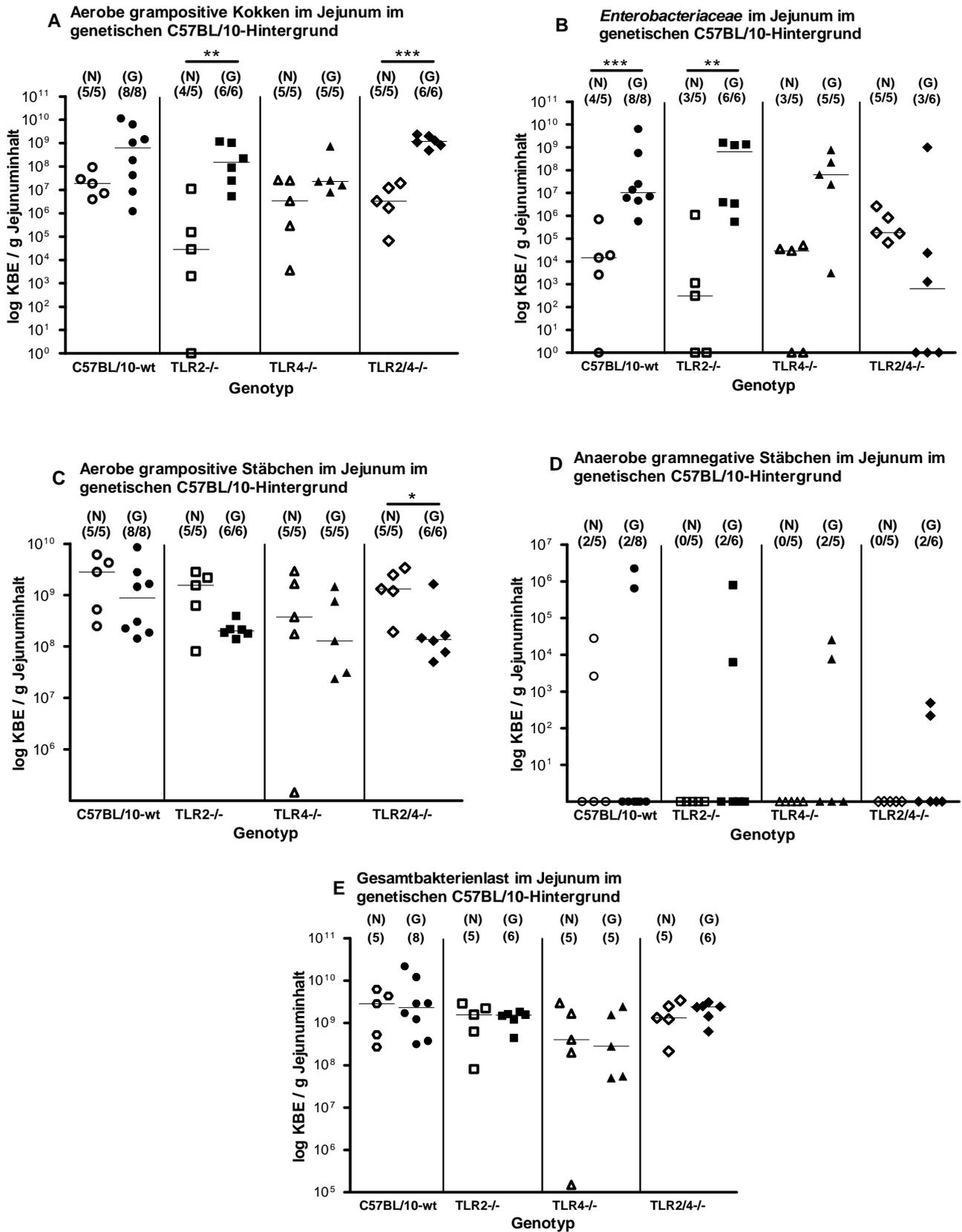


Abb. 38: Die Veränderung der Jejunumflora bei TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} und TLR2/4^{-/-}-Tieren bei akuter GvHD im Vergleich zu C57BL/10-Wildtypmäußen. Offene Symbole zeigen gesunde Tiere, geschlossene Symbole transplantierte Tiere am Tag zehn nach Transplantation, in Klammern steht die Anzahl der analysierten Tiere, sowie der positive Nachweis. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,005).

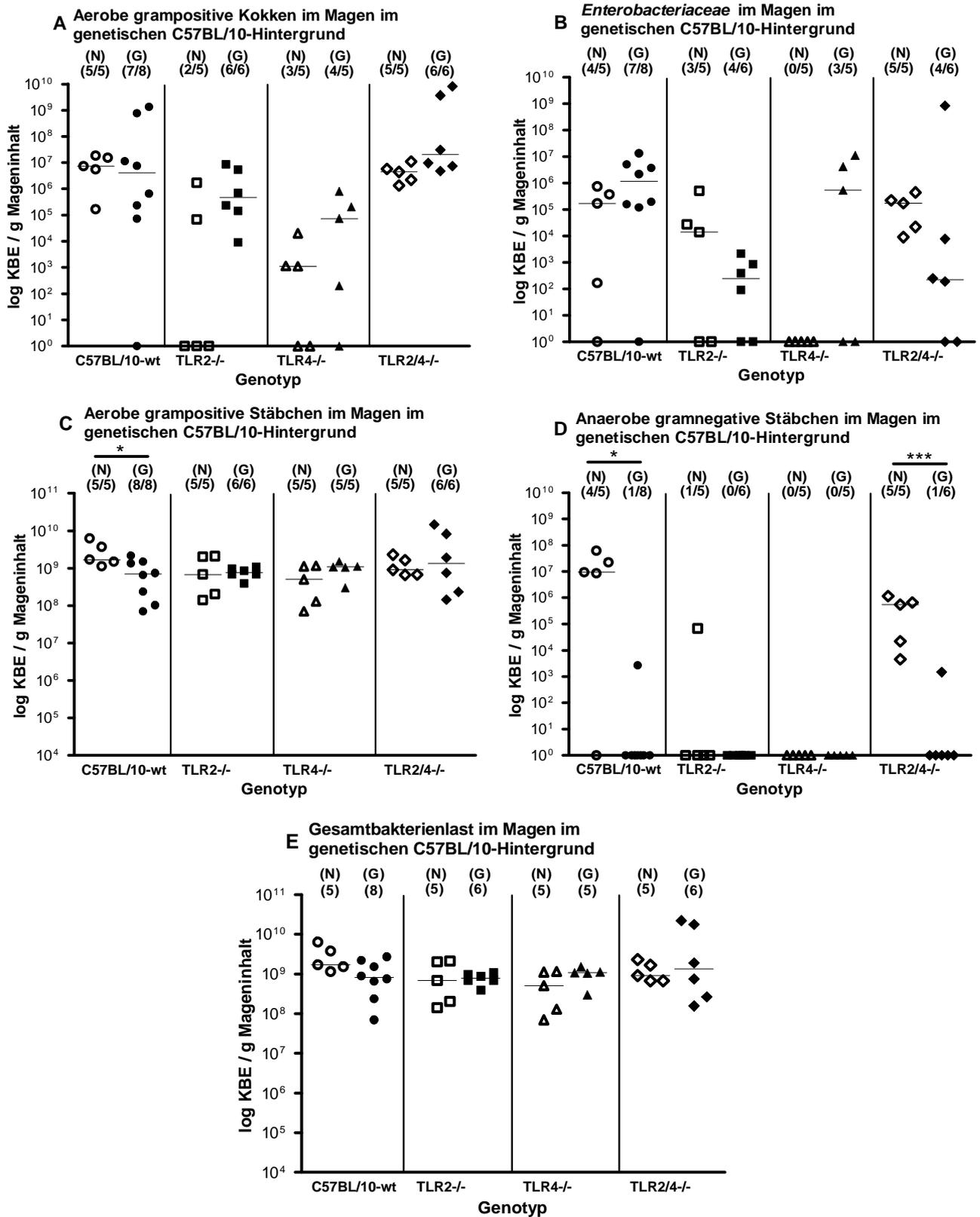


Abb. 39: Die Veränderung der Magenflora bei TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} und TLR2/4^{-/-}-Tieren im Vergleich zu C57BL/10-Wildtypmieren bei akuter GvHD. Offene Symbole stehen für gesunde Tiere, geschlossene Symbole für transplantierte Tiere zehn Tage nach Transplantation, in Klammern steht die jeweilige Anzahl der analysierten Tiere und der positive Nachweis. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,005).

3.2.4.2 Veränderung der Darmflora bei TLR9^{-/-}-, TRIF^{-/-}-, NOD2^{-/-}- und MyD88^{-/-}- Tieren mit GvHD

Bei den C57BL/6-Wildtyptieren war am Tag neun nach Transplantation im Colon, Ileum und Jejunum der transplantierten Tiere folgende Veränderung der Flora zu erkennen: Ein Anstieg der aeroben grampositiven Kokken, der *Enterobacteriaceae* und der anaeroben gramnegativen Stäbchen (Abb. 24, 25, 26A). Die Gesamtbakterienlast nahm im Colon transplantierte Tiere signifikant zu (Abb. 24). Im Magen der transplantierten C57BL/6-Wildtypiere war keine Veränderung der Flora zu dokumentieren (Abb. 26B).

Im Colon NOD2-defizienter Tiere waren zunächst die gleichen Veränderungen der Flora wie bei den C57BL/6-Wildtypieren zu beobachten (Abb. 40). Ein Anstieg der aeroben grampositiven Kokken und *Enterobacteriaceae* (aerobe grampositive Kokken um ungefähr zwei Log-Stufen; Abb. 40A; *Enterobacteriaceae* um ca. vier Log-Stufen; Abb. 40B) konnte bei transplantierten Tieren am Tag neun nach Transplantation im Vergleich zu gesunden NOD2^{-/-}-Tieren genauso dokumentiert werden, wie ein Anstieg der anaeroben gramnegativen Stäbchen um ca. eine Log-Stufe (Abb. 40D) und eine Erhöhung der Gesamtbakterienlast (Abb. 40E). Die Veränderung der Flora im Ileum war mit einem Anstieg der *Enterobacteriaceae* (um acht Log-Stufen; Abb. 41B), der anaeroben gramnegativen Stäbchen (um ungefähr vier Log-Stufen; Abb. 41D) und einer Zunahme der Gesamtbakterienlast (um ungefähr eine Log-Stufe; Abb. 41E) bei transplantierten gegenüber naiven NOD2^{-/-}-Tieren insgesamt ähnlich ausgeprägt wie bei den C57BL/6-Tieren, in diesem Darmabschnitt fehlte allerdings die Zunahme aerober grampositiver Kokken (Abb. 41A). Im Jejunum konnte, wie bei den C57BL/6-Tiere, ein Anstieg der *Enterobacteriaceae* (um ungefähr sechs Log-Stufen; Abb. 42B) beobachtet werden, allerdings blieb hier neben der Zunahme aerober grampositiver Kokken (Abb. 42A) auch der Anstieg anaerober gramnegativer Stäbchen aus (Abb. 42D). Bei NOD2^{-/-}-Tieren war im Magen eine andere Veränderung der Flora als bei C57BL/6-Wildtypieren festzustellen. Neben einer signifikanten Abnahme aerober grampositiver Kokken um ca. drei Log-Stufen (Abb. 43A) konnte ein Anstieg aerober grampositiver Stäbchen (Abb. 43C) und der Gesamtbakterienlast (Abb. 43E) in diesem Organ beobachtet werden. Auffällig war weiterhin bei diesen Tieren, dass eine Zunahme der aeroben grampositiven Stäbchen nicht nur im Magen transplantierte Tiere, sondern auch im Ileum und Colon (Abb. 40C, 41C) zu beobachten war.

Im luminalen Coloninhalt der TRIF^{-/-}-Mäuse war die gleiche Veränderung der Flora wie bei den C57BL/6-Wildtypieren zu dokumentieren (Abb. 40). Der Anstieg bei TRIF^{-/-}-Tieren am Tag

neun nach Transplantation im Vergleich zu naiven TRIF^{-/-}-Tieren betrug im Colon für die aeroben grampositiven Kokken ungefähr drei Log-Stufen (Abb. 40A), für *Enterobacteriaceae* ca. fünf Log-Stufen (Abb. 40B) und für anaerobe gramnegative Stäbchen ungefähr eine Log-Stufe (Abb. 40D). Die Gesamtbakterienlast bei den TRIF^{-/-}-Tieren war im Colon am Tag neun um ca. eine Log-Stufe im Vergleich zu naiven TRIF^{-/-}-Tieren erhöht (Abb. 40E).

Im Ileum und Jejunum war bei akuter GvHD der TRIF^{-/-}-Tiere ein Anstieg aerober grampositiver Kokken (im Ileum und Jejunum um ca. vier Log-Stufen; Abb. 41A, 42A) und *Enterobacteriaceae* (im Ileum ungefähr acht Log-Stufen; Abb. 41B; im Jejunum ungefähr sechs Log-Stufen; Abb. 42B) zu beobachten, allerdings waren keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Vorkommens anaerober gramnegativer Stäbchen bei den TRIF^{-/-}-Tieren mit akuter GvHD in diesen beiden Organabschnitten zu finden (Abb. 41D, 42D). Am Tag neun nach Transplantation war eine signifikante Erhöhung der Gesamtbakterienlast bei TRIF^{-/-}-Tieren im Ileum (um ungefähr eine Log-Stufe; Abb. 41E) nicht aber im Jejunum (Abb. 42E) und Magen (Abb. 43E) festzustellen.

Im Gegensatz zu C57BL/6-Wildtypmäußen, bei denen im Magen keinerlei Veränderung der Flora bei akuter GvHD festgestellt werden konnte (Abb. 43), waren im Magen transplantierte TRIF^{-/-}-Mäuse, im Vergleich zu naiven TRIF^{-/-}-Mäusen, ein Anstieg aerober grampositiver Kokken um ungefähr drei Log-Stufen (Abb. 43A) und *Enterobacteriaceae* um ungefähr sechs Log-Stufen (Abb. 43B) zu zeigen.

Bei den MyD88^{-/-}-Mäusen konnte im Vergleich zu den anderen Genotypen im C57BL/6-Hintergrund bereits bei naiven Tieren eine andere Zusammensetzung der Intestinalflora nachgewiesen werden. Im Colon war bei den gesunden Tieren signifikant mehr aerobe grampositive Kokken (Abb. 40A) und *Enterobacteriaceae* (Abb. 40B) als bei gesunden C57BL/6-, TRIF^{-/-}- und NOD2^{-/-}-Mäusen nachzuweisen. Ähnliche Beobachtungen konnten in den anderen Darmabschnitten und im Magen von naiven MyD88^{-/-}-Mäusen festgestellt werden, mit einem signifikant höheren Nachweis der *Enterobacteriaceae* in allen untersuchten Abschnitten des Gastrointestinaltraktes, verglichen mit nicht transplantierten C57BL/6-Wildtypmäußen, TRIF^{-/-}- und NOD2^{-/-}-Mäusen (Abb. 41B, 42B, 43B). Bei gesunden MyD88^{-/-}-Mäusen konnte weiterhin im Magen mehr aerobe grampositive Kokken und weniger aerobe grampositive Stäbchen und im Jejunum weniger aerobe grampositive Stäbchen im Vergleich zu gesunden Mäusen anderer Genotypen im C57BL/6-Hintergrund nachgewiesen werden (Abb. 42C, 43A, 43C).

Die Veränderung der Flora bei den MyD88^{-/-}-Tieren war auf dem Höhepunkt der Darmentzündung im Vergleich zu den Mäusen anderer Genotypen des C57BL/6-Hintergrundes anders ausgeprägt. Im Colon war bei transplantierten MyD88^{-/-}-Mäusen ein signifikanter Anstieg der *Enterobacteriaceae* um ungefähr vier Log-Stufen (Abb. 40B), anaerober gramnegativer Stäbchen um ca. eine Log-Stufe (Abb. 40D) und eine Erhöhung der Gesamtbakterienlast im Vergleich zu naiven MyD88^{-/-}-Tieren zu verzeichnen (Abb. 40E), während in den übrigen Darmabschnitten lediglich eine signifikante Erhöhung der aeroben grampositiven Stäbchen (Abb. 41C; im Jejunum um ca. eine Log-Stufe; Abb. 42C; im Magen um ca. zwei Log-Stufen; Abb. 43C) und der Gesamtbakterienlast (im Ileum um ungefähr eine Log-Stufe; Abb. 41E; im Jejunum und Magen um ca. zwei Log-Stufen; Abb. 42E, 43E) zu beobachten war.

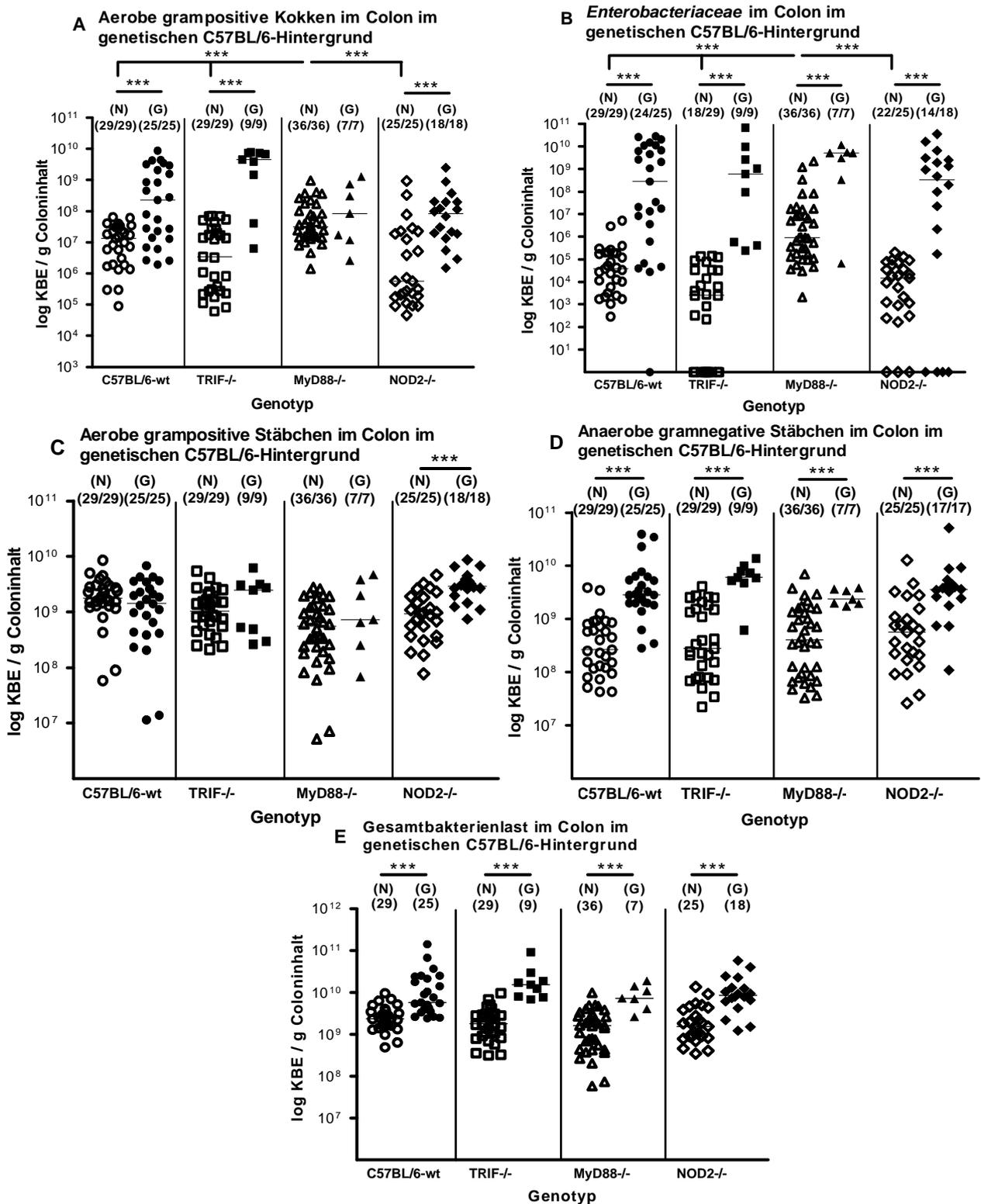


Abb. 40: Veränderung der Colonflora bei akuter GvHD bei TRIF^{-/-}, MyD88^{-/-}, NOD2^{-/-}-Tieren im Vergleich zu C57BL/6-Wildtyptieren. Gezeigt sind die gepoolten Ergebnisse von mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Analysiert wurde die Colonflora von gesunden, nicht transplantierten Tieren (naive, dargestellt in offenen Symbolen) und von transplantierten Tieren neun Tage nach Transplantation (geschlossene Symbole). In Klammern ist die Anzahl der analysierten Tiere, sowie der positive Nachweis angegeben. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,005).

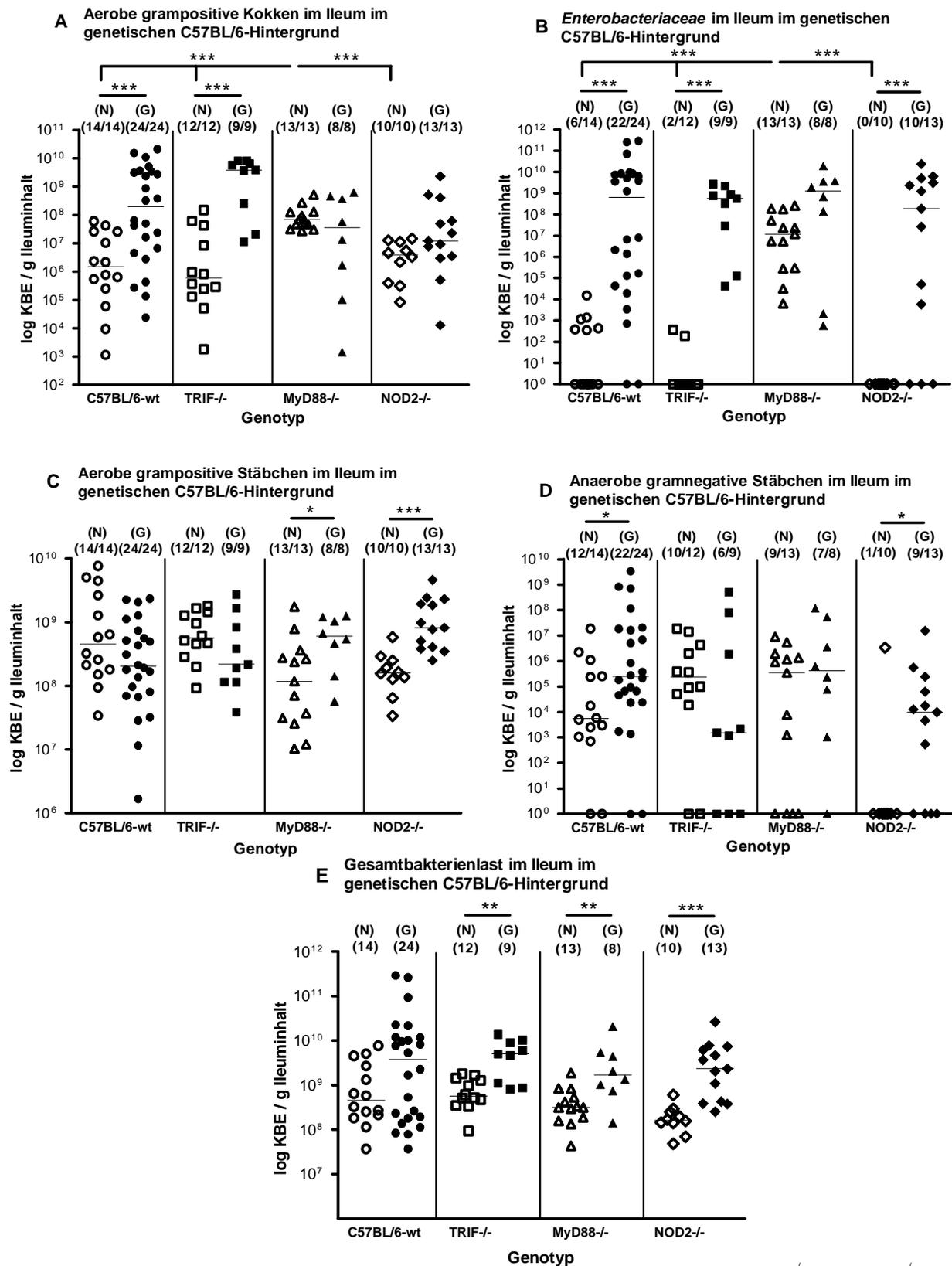


Abb. 41: Die Veränderung der Ileumflora bei akuter GvHD bei TRIF^{-/-}, MyD88^{-/-}, NOD2^{-/-}-Tieren im Vergleich zu C57BL/6-Wildtyp-Tieren. Gezeigt sind die gepoolten Ergebnisse von mindestens zwei Experimenten. Offene Zeichen stehen für gesunde Tiere, geschlossene für transplantierte Tiere am Tag neun nach Transplantation. Die Zahlen in den Klammern geben die Anzahl der analysierten Tiere und den positiven Nachweis an. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen dargestellt (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,005).

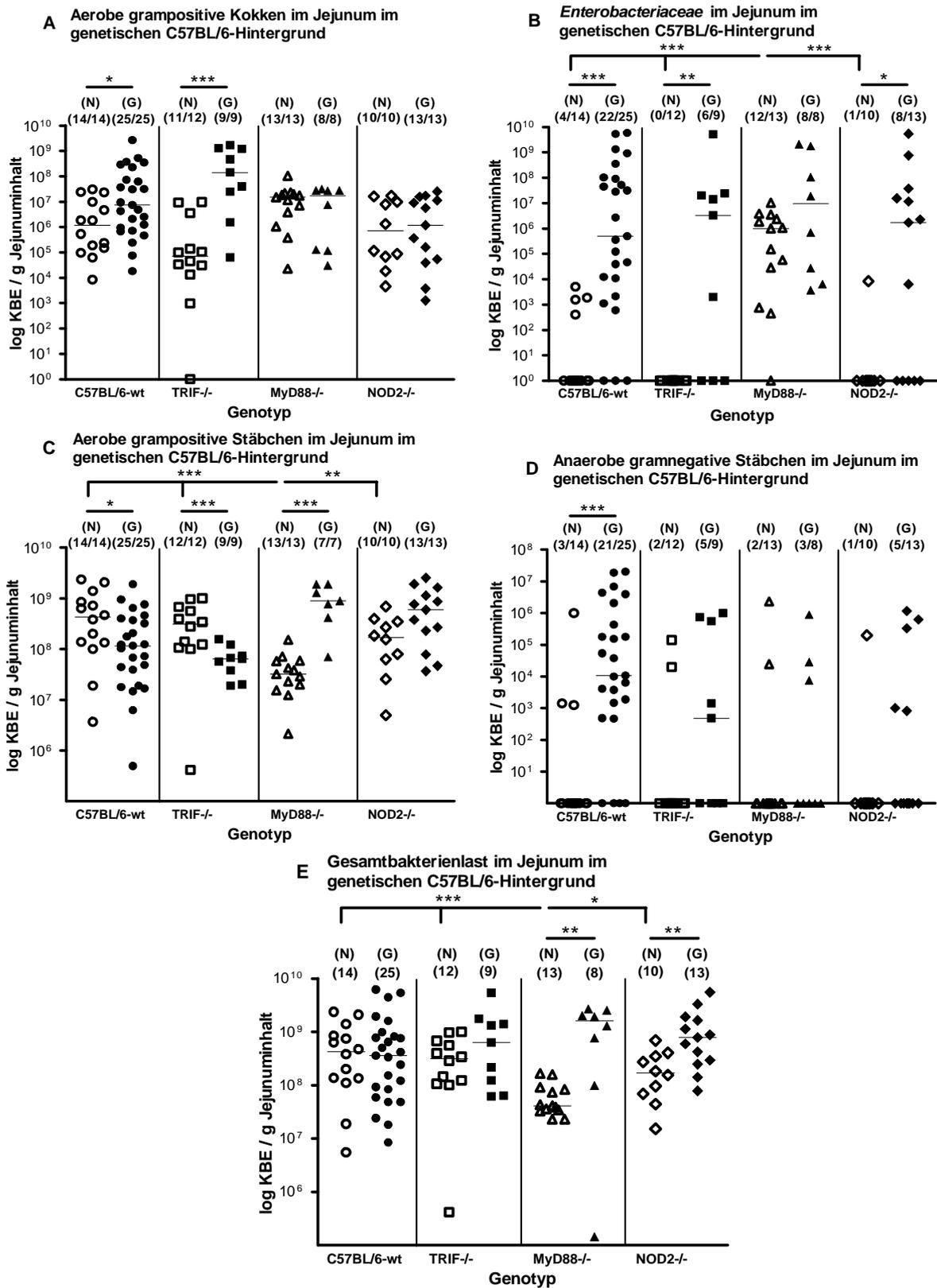


Abb. 42: Die Veränderung der Jejunumflora bei akuter GvHD bei $TRIF^{-/-}$, $MyD88^{-/-}$, $NOD2^{-/-}$ -Tieren im Vergleich zu C57BL/6-Wildtyptieren. Gezeigt sind die gepoolten Ergebnisse von mindestens zwei Experimenten. Offene Zeichen stehen für gesunde Tiere, geschlossene für transplantierte Tiere am Tag neun nach Transplantation. Die Zahlen in den Klammern geben die Anzahl der analysierten Tiere und den positiven Nachweis an. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$).

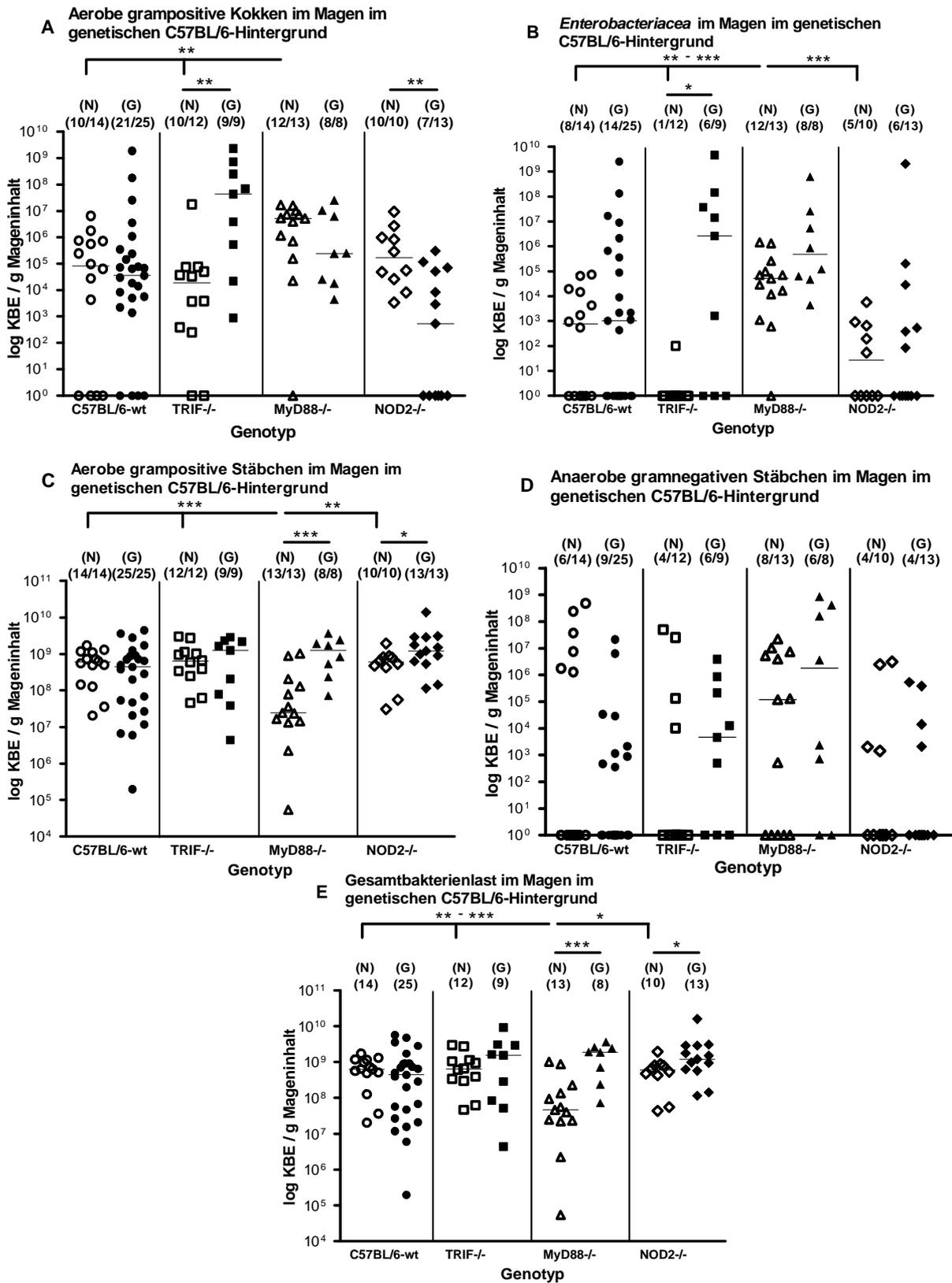


Abb. 43: Die Veränderung der Magenflora bei akuter GvHD bei TRIF^{-/-}, MyD88^{-/-}, NOD2^{-/-}-Tieren im Vergleich zu C57BL/6-Wildtyp-Tieren. Offene Zeichen symbolisieren gesunde Tiere, geschlossene transplantierte Tiere neun Tage nach Transplantation. In Klammern ist die Anzahl der analysierten Tiere, sowie der positive Nachweis angegeben. Dargestellt sind Ergebnisse von mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,005).

Bei allen untersuchten Genotypen war schlussfolgernd eine Verschiebung der bakteriellen Flora des Gastrointestinaltraktes auf dem Höhepunkt der Darm-GvHD aufzuzeigen. Dabei fiel insbesondere eine Akkumulation der *Enterobacteriaceae* und / oder der aeroben grampositiven Kokken und / oder der anaeroben gramnegativen Stäbchen bei transplantierten Tieren im Colon, dem von der iGvHD am stärksten betroffenen Abschnitt des Gastrointestinaltraktes, bei sämtlichen untersuchten Genotypen (Abb. 36, 40) auf. Bei der Kinetikanalyse der Veränderung der Faecesflora fiel auf, dass die Veränderung der Darmflora nach Abschluss der Konditionierung nicht nur bei den C57BL/6-Wildtyptieren, sondern auch in ähnlicher Form bei TLR2^{-/-}, TRIF^{-/-}, NOD2^{-/-} und MyD88^{-/-}-Tieren zu beobachten war. Demnach war am Tag null auch bei diesen Tieren ein Anstieg der *Enterobacteriaceae* und / oder der anaeroben gramnegativen Stäbchen und / oder eine Abnahme der aeroben grampositiven Stäbchen nachzuweisen (nicht dargestellt).

Für Ileum, Jejunum und Magen ergab sich bei den unterschiedlichen Genotypen ein uneinheitliches Bild. Dabei fielen insbesondere die MyD88^{-/-}-Tiere auf, die keine charakteristischen Veränderung der Flora aufzeigten, welche bei anderen Genotypen im Ileum (Abb. 41), Jejunum (Abb. 42) aufzuzeigen waren. Dabei ist zu beachten, dass bei diesen Tieren eine veränderte Immunantwort (Abb. 34, 35) und eine geringere Ausprägung der Pathologie im Gastrointestinaltrakt (Abb. 31) zu erkennen gewesen war.

3.3 Akute iGvHD nach Behandlung der Tiere mit MDP und TLR9-Antagonist

Welche Auswirkung die Stimulation des NOD2-Rezeptors auf akute GvHD hat, wurde in einem Pilotexperiment untersucht, bei dem C57BL/6-Wildtyptiere an den drei Tagen der Konditionierung mit MDP behandelt wurden.

Um weiterhin festzustellen, ob eine Abmilderung der akuten GvHD durch die Verabreichung eines TLR9-Antagonisten bei C57BL/6-Wildtyptieren zu erreichen war, wurden diese Tiere nach Transplantation einmalig mit dem TLR9-Antagonisten iODN 2088 behandelt.

Durch die Untersuchung *in situ* histochemischer Merkmale des Colons, dem Ort der stärksten Entzündungsausprägung im Gastrointestinaltrakt, konnten differenzierte Aussagen über die Auswirkung der Behandlung auf das Darmimmunsystem getroffen werden.

3.3.1 Apoptose, Proliferation, T-Zellen und Neutrophile im Colon bei GvHD nach Gabe von MDP

Die mit MDP behandelten C57BL/6-Wildtyptiere hatten neun Tage nach Transplantation weniger apoptotische Zellen im Colon verglichen mit transplantierten C57BL/6-Wildtyptieren,

die mit Placebo behandelt wurden ($p < 0,005$; Abb. 44A). Es wurden keine Auswirkungen dieser Behandlung auf das Vorkommen proliferierender Zellen im Colon festgestellt (Abb. 44B). Für die immunologischen Merkmale konnte beobachtet werden, dass die Behandlung zu einem geringeren Anstieg der T-Zellen ($p < 0,005$; Abb. 44C) und der Neutrophilen ($p < 0,01$; Abb. 44D) führte, während keine Auswirkung auf das Vorkommen regulatorischer T-Zellen im Colon festgestellt werden konnte (nicht dargestellt).

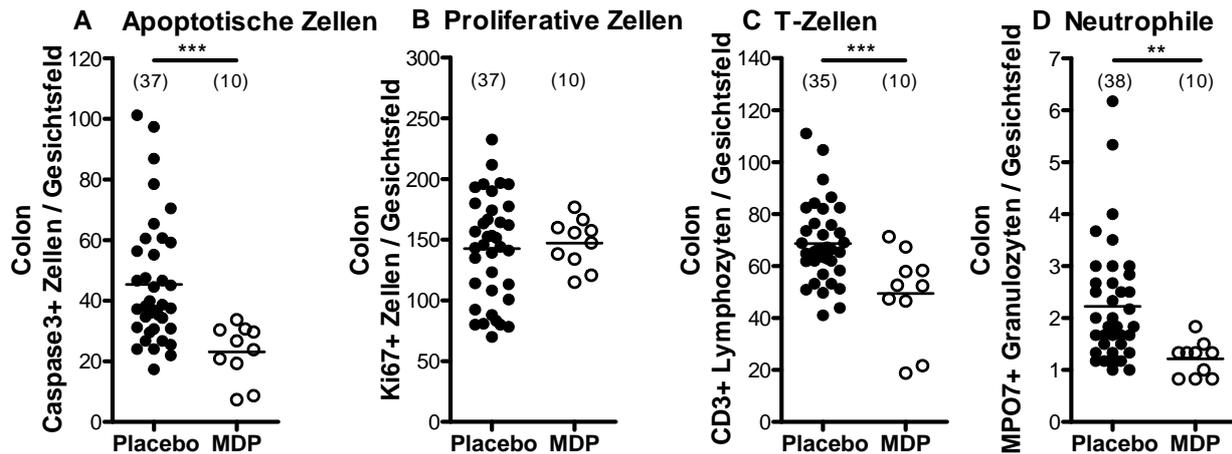


Abb. 44: Apoptotische- (A), proliferierende Zellen (B), T-Zellen (C) und Neutrophile (D) bei akuter muriner GvHD im Colon am Tag neun nach Transplantation mit (offene Symbole) und ohne (geschlossene Symbole) MDP Behandlung. In Klammern ist die Anzahl der analysierten Tiere dargestellt. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$).

3.3.2 Apoptose, Proliferation, T-Zellen und Neutrophile im Colon bei GvHD nach Gabe des TLR9-Antagonisten iODN 2088

Die Verabreichung des TLR9-Antagonisten iODN 2088 resultierte bei C57BL/6-Wildtypen in einem signifikant geringeren Auftreten apoptotischer Zellen im Colon neun Tage nach Transplantation, verglichen mit Placebo-behandelten C57BL/6-Wildtypen ($p < 0,005$; Abb. 45A). Es konnten keine Auswirkungen der Behandlung auf das Vorkommen proliferierender Zellen im Colon festgestellt werden (Abb. 45B).

Bezüglich der Immunreaktion im Colon führte die Verabreichung von iODN 2088 zu einem geringeren Anstieg der T-Zellen ($p < 0,05$; Abb. 45C) und der Neutrophilen ($p < 0,005$; Abb. 45D), während keine Auswirkung auf das Vorkommen regulatorischer T-Zellen beobachtet wurde (nicht dargestellt).

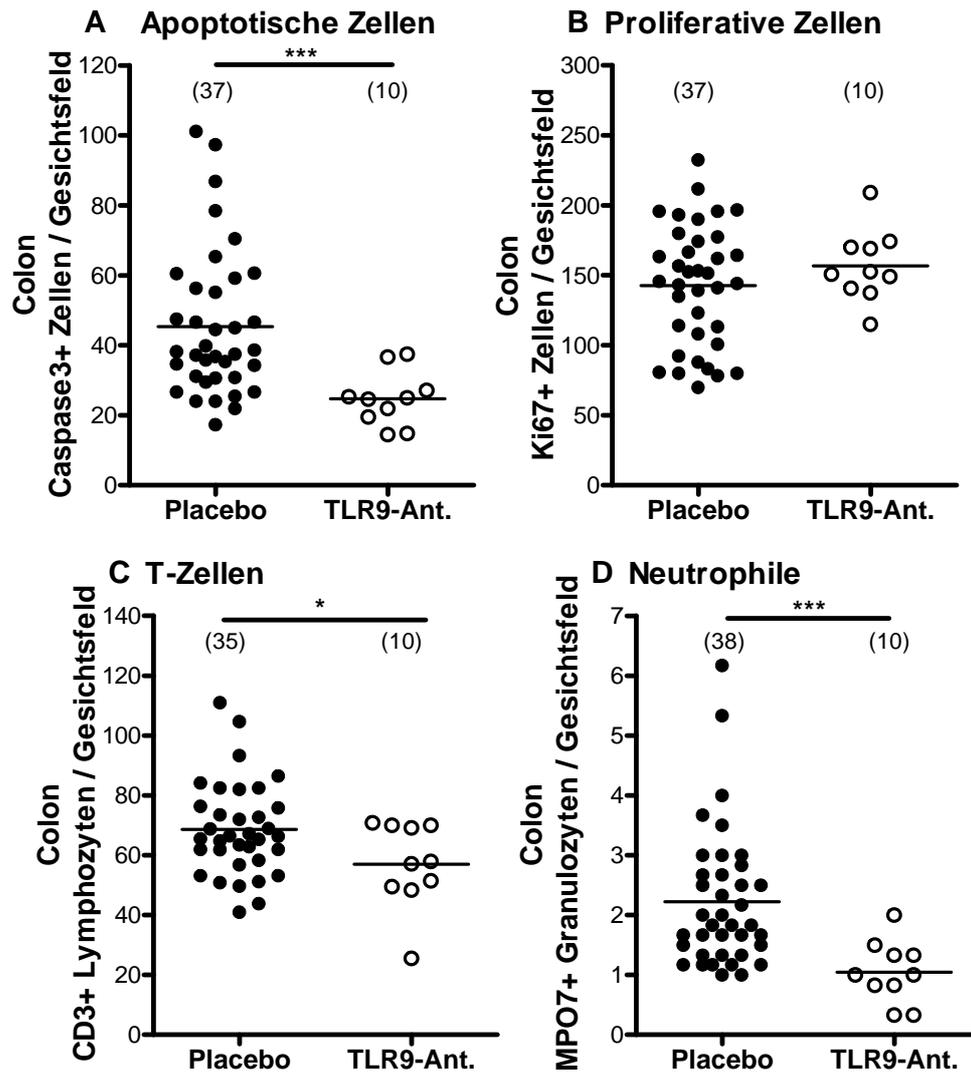


Abb. 45: Apoptotische Zellen (A), proliferierende Zellen (B), T-Zellen (C) und neutrophile Zellen (D) bei akuter muriner GvHD im Colon am Tag neun nach Transplantation mit (offene Symbole) und ohne (geschlossene Symbole) Gabe des TLR9-Antagonisten iODN 2088. In Klammern ist die Anzahl der analysierten Tiere angegeben. Signifikanzniveaus sind mit Sternchen angegeben (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$).

4. Diskussion

4.1 Eigenschaften des murinen iGvHD-Modells

4.1.1 Konditionierung und Transplantation

Die akute Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD) ist eine der wichtigsten Komplikationen nach allogener Stammzelltransplantation. Das sogenannte „Reduced-Intensity-Conditioning“ (RIC)-Regime hat die Therapieoption der allogenen Stammzelltransplantation bei Menschen bedeutend erweitert und wird daher zunehmend als Konditionierung in der klinischen Praxis vor allem bei älteren Patienten und Patienten mit hohem Transplantationsrisiko verwendet (Aoudjhane *et al.* 2005).

Die Theorien zur Pathogenese der Transplantatabstoßungserkrankung heben vor allem die Bedeutung der Konditionierung zur Induktion der akuten iGvHD hervor (Goker 2001; Hill & Ferrara 2000; Sun 2007). Bislang ist jedoch der Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer akuten GvHD und RIC nur unzureichend erforscht. Der Einsatz der RIC in unserem murinen Transplantationsmodell ermöglichte die systematische Untersuchung der akuten iGvHD. Dabei ist der intestinale Barrierschaden, der durch die Konditionierung mittels RIC verursacht wird, milder ausgeprägt als bei der Ganzkörperbestrahlung (Johansson *et al.* 2001). Präklinische murine Modelle zur Erforschung des Auftretens der akuten GvHD nach RIC beruhen auf einer Konditionierung mittels Treosulfan, Busulfan, Cyclophosphamid, Fludarabine, T-Zell-depletierenden-Antikörpern und / oder thymischer Bestrahlung (Ploemacher *et al.* 2004; Sjöo *et al.* 2006; Sadeghi *et al.* 2008). In diesen Studien konnte eine effektive myeloablative Wirkung von Treosulfan nachgewiesen werden. In murinen Studien wurde von Ploemacher und Mitarbeitern ein Ausbleiben der GvHD trotz MHC-Inkompatibilität dokumentiert. Dieser Befund war vermutlich auf den Mangel alloreaktiver T-Zellen im Transplantat (als Resultat der Anwendung von T-Zell-depletierender-Antikörper bei der Konditionierung) zurückzuführen (Ploemacher *et al.* 2004). In dem von uns verwendeten Modell wurde Treosulfan mit Cyclophosphamid kombiniert, auf eine Applikation T-Zell-depletierender-Antikörper aber verzichtet. Ziel dieses Konditionierungsregimes war es, optimale Myeloablation und Engraftment bei minimalem Infektionsrisiko zu erreichen. Die Engraftmentrate von 92% (Heimesaat *et al.* 2009; Manuskript eingereicht) bestätigte zudem die Wirksamkeit der Konditionierung. Die Verträglichkeit der Konditionierung wurde dadurch bestätigt, dass kein Tier bis vor Tag sechs nach Transplantation verstarb (Abb. 8, 9).

4.1.2 Das Auftreten akuter intestinaler Entzündung im murinen iGvHD-Modell

Um zu untersuchen, ob RIC-Konditionierung und Stammzelltransplantation in unserem Modell das Auftreten gastrointestinaler GvHD zur Folge hatte, führten wir histologische Analysen von Gewebeproben aus dem Gastrointestinaltrakt durch. Dabei konnten Zeichen akuter GvHD, wie beispielsweise Apoptose, „Kryptendropouts“ und Abflachung der Mukosa im gesamten Gastrointestinaltrakt (Magen / Jejunum, Ileum und Colon) transplanteder Tiere nachgewiesen werden (Abb. 10, 11). Diese histopathologischen Veränderungen entsprachen wichtigen Merkmalen der iGvHD sowohl beim Menschen als auch bei der Maus (Sale *et al.* 1979; Ross & Couriel 2005; Ross *et al.* 2008; Nguyen *et al.* 2008a; Holmberg *et al.* 2006; Hill *et al.* 1997; Cooke *et al.* 1998; Sadeghi *et al.* 2008). In einem weiteren bestrahlungsunabhängigen murinen Transplantationsmodell wurde gezeigt, dass die allogene Transplantation ebenfalls zu einer Colitis mit den klassischen histopathologischen Merkmalen einer akuten GvHD führt (Sadeghi *et al.* 2008), wodurch unsere Ergebnisse bestätigt wurden.

Die Analyse des zeitlichen Verlaufs der histopathologischen Veränderungen im Rahmen der GvHD-Manifestation im Gastrointestinaltrakt verdeutlichte, dass die Inflammation am Tag zehn nach Transplantation maximal ausgeprägt war (Abb. 11). Die primäre Lokalisation gastrointestinaler GvHD beim Menschen ist Gegenstand intensiver wissenschaftlicher und klinischer Diskussionen. Einerseits wird die iGvHD als panintestinaler Prozess betrachtet (Vogelsang *et al.* 2003; Ross & Couriel 2005), andererseits haben kürzlich sowohl murine Studien als auch Studien am Menschen zur Diagnose einer iGvHD die Bedeutung der Entzündung im Colon besonders betont (Ross *et al.* 2008; Stelljes *et al.* 2008). In unserem Modell fanden sich Zeichen akuter iGvHD in der Tat in Magen / Jejunum, Ileum und Colon. Die ausgeprägtesten Läsionen waren im Colon zu beobachten (Abb. 11).

4.1.3 Immunreaktionen, Apoptose und Proliferation im Colon im murinen iGvHD-Modell

Die Immunbiologie akuter GvHD nach Konditionierung *durch RIC* unterscheidet sich von der nach *klassischer Konditionierung* (Mielcarek *et al.* 2003). Da GvHD eine T-Zell vermittelte Erkrankung ist (Shlomchik 2007; Reddy 2003; Goker *et al.* 2001), bestätigte die Infiltration des Colons mit T-Zellen die immunologische Auswirkung der Transplantation auf dieses Gewebe. In einem weiteren bestrahlungsunabhängigen murinen Transplantationsmodell konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die akute GvHD des Colons durch einen Anstieg von CD3- und Caspase3-positiven Zellen gekennzeichnet war (Sadeghi *et al.* 2008). Die Ausbildung der Pathologie im Colon in diesen Modellen ist somit höchstwahrscheinlich Resultat einer Immunreaktion.

Bekräftigt wurde dies in unserem iGvHD-Modell durch die Kinetik der T-Zellinfiltration, die parallel zur Ausbildung histopathologischer Schäden und einem Anstieg apoptotischer sowie proliferativer Zellen verlief (Abb. 11C, 14A, 14B, 19A). Der Anstieg der T-Zellen war im zeitlichen Verlauf gefolgt von einem erhöhten Nachweis neutrophiler Granulozyten (Abb. 19C). Dies stimmt mit Überlegungen zur Pathogenese von akuter GvHD überein, in der T-Zellen nach Aktivierung und Proliferation Effektorzellen rekrutieren (Reddy 2003), die für den folgenden Gewebeschaden verantwortlich gemacht werden können.

Die protektiven Eigenschaften regulatorischer T-Zellen bei akuter GvHD wurden in zahlreichen murinen Experimenten dargestellt (Nguyen *et al.* 2008b; Trenado *et al.* 2003; Edinger *et al.* 2003). In einer Studie an Patienten wurde gezeigt, dass akute sowie chronische GvHD durch einen fehlenden Anstieg regulatorischer T-Zellen im Gastrointestinaltrakt gekennzeichnet ist (Rieger *et al.* 2006). Auch in unserem Modell konnten im Vergleich zwischen naiven mit transplantierten Tieren auf dem Höhepunkt der intestinalen Entzündung keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Vorkommens regulatorischer T-Zellen im Gastrointestinaltrakt *in situ* beobachtet werden (Abb. 19B, 20B).

Da die Bewertung von Apoptosen ein wichtiges Kriterium bei der Einschätzung des Schweregrades histopathologischer Veränderungen bei iGvHD darstellt, bestätigte das vermehrte Vorkommen von Caspase3-positiven Zellen nach Transplantation *in situ* die histopathologischen Analysen aus HE-gefärbten Paraffinschnitten und damit die Manifestation der iGvHD im Colon (Abb. 14A, 15A).

4.1.4 Veränderung der Darmflora bei akuter GvHD

Die Veränderung der bakteriellen Darmflora bei Entwicklung intestinaler Inflammation kann zu einer Verstärkung der Immunpathologie führen. Ursache hierfür ist eine Translokation von Darmbakterien in die geschädigte Mukosa und eine daraus resultierende Entzündungsreaktion, die durch Produktion von proinflammatorischen Zytokinen gekennzeichnet ist. Für diese Reaktionen sind insbesondere Bakterienarten der Familien und Gattungen der *Enterobacteriaceae*, *Bacteroides* / *Prevotella* (Heimesaat *et al.* 2006; Swidsinski *et al.* 2005; Sartor *et al.* 2008) und *Enterococcus* (Heimesaat *et al.* 2009; persönliche Kommunikation) verantwortlich, deren Konzentrationen im Darm bei Entzündungsprozessen ansteigen. Die Bedeutung der *Enterobacteriaceae* bei den unterschiedlichen Formen von Darmentzündungen wird durch Studien bei Patienten mit CED deutlich, die einen Anstieg der *Enterobacteriaceae* zeigen (Seksik *et al.* 2003; Martinez-Medina *et al.* 2006). Klinische Studien bei GvHD, beruhend auf der Anwendung von Antibiotikainterventionen nach allogener Stammzelltransplantation,

bekräftigen nicht nur die Bedeutung der *Enterobacteriaceae*, sondern zeigten weiterhin eine Bedeutung obligat anaerober gramnegativer Stäbchenbakterien bei der Entwicklung einer akuter GvHD auf (Beelen *et al.* 1999). Die Analyse der Gastrointestinalflora im murinen iGvHD-Modell ergab eine Veränderung der intestinalen Besiedlung im Colon, Ileum und Jejunum transplanteder Tiere (Abb. 21, 22, 24 bis 26). Diese Veränderung der Flora stand im engen zeitlichen Zusammenhang mit dem Auftreten histopathologischer Läsionen, der dokumentierten Immunreaktion und der erhöhten Sterberate der transplantierten Tiere (Abb. 8, 9, 11, 14, 15, 19, 20, 21, 22, 24 bis 26). Eine Kinetik-Analyse der Florenveränderung im Colon zeigte, dass diese am ausgeprägtesten auf dem Höhepunkt der Inflammation war (Abb. 24). Im Colon umfasste diese Veränderung der Flora einen Anstieg aerober grampositiver Kokken (vor allem Enterokokken), *Enterobacteriaceae* (vor allem *E. coli*), eine Erhöhung der Gesamtbakterienlast und bei C57BL/6-Tieren außerdem einen Anstieg obligat anaerober gramnegativer Stäbchen (*Bacteroides* / *Prevotella* spp.; Abb. 21, 24). Die in unserem GvHD-Modell beobachtete Akkumulation von *Enterobacteriaceae* im Cololumen steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer experimenteller Colitismodelle (Heimesaat *et al.* 2007b; Lupp *et al.* 2007). Im Ileum und Jejunum von C57BL/10-Mäusen waren Darmfloraveränderung nach Transplantation von einer Zunahme von *Enterobacteriaceae* gekennzeichnet, während *Enterobacteriaceae*, grampositive aerobe Kokken und anaerobe gramnegative Stäbchen bei C57BL/6-Tiere dominierten (Abb. 22, 25, 26). Im akuten Ileitismodell nach peroraler Infektion mit 100 Zysten *Toxoplasma gondii* konnte ebenfalls eine drastische Veränderung der intestinalen Besiedlung, gekennzeichnet durch eine Überwucherung des Ileumlumens mit *E. coli* und *Bacteroides* / *Prevotella* spp., beobachtet werden (Heimesaat *et al.* 2006). Der Befund, dass TLR4^{-/-}, nicht aber TLR2^{-/-}-Tiere vor Ileitis geschützt waren, legt die pathogenetische Funktion des LPS von *E. coli* bei der Induktion der Ileitis nahe (Heimesaat *et al.* 2007a).

Als Mechanismus für den Anstieg der *Enterobacteriaceae* bei intestinalen Entzündungszuständen wird eine erhöhte Verfügbarkeit von Sauerstoff, welche das Wachstum aerober Bakterienpopulationen begünstigt, diskutiert (Lupp *et al.* 2007). Im Stoffwechsel der Kommensalen im Darm kann es weiterhin zur Produktion von beispielsweise Milchsäure durch *Lactobacillus* spp. kommen, die eine inhibitorische Wirkung auf gramnegative Spezies ausüben (Alakomi *et al.* 2000; Silva *et al.* 2001). Weiterhin konnte eine Modulation der intestinalen Immunantwort durch Laktobazillen nachgewiesen werden (Christensen *et al.* 2002). Im iGvHD-Modell führte die Konditionierung bereits vor Transplantation zu einem Abfall von *Lactobacillus* spp. (Abb. 24). Möglicherweise induziert die Konditionierung bereits vor

Transplantation eine Störung der intestinalen Homöostase, die eine Veränderung der Zusammensetzung der Darmflora zur Folge hat. Durch die T-Zell vermittelte Immunantwort *nach Transplantation* wird dieser Prozess verstärkt, in Folge kommt es zu den beobachteten umfassenden Veränderungen der intestinalen Besiedlung. Zusammenfassend ist jedoch festzustellen, dass die zugrunde liegenden Mechanismen der Veränderung der intestinalen Besiedlung bei akuter iGvHD vermutlich multifaktoriell und im Einzelnen nicht genau bekannt sind.

Die molekularen Analysen der Colonflora bei gesunden und transplantierten Tiere bestätigte nicht nur die Ergebnisse der kulturellen Analyse (Akkumulation von *Enterobacteriaceae*), sondern zeigten darüberhinaus einen Verlust der bakteriellen Diversität auf dem Höhepunkt der Inflammation auf (Abb. 27). Dies konnte auch in anderen experimentellen intestinalen Inflamationsmodellen gezeigt werden. So war sowohl die akute DSS-Colitis als auch die durch *Toxoplasma gondii* induzierte akute Ileitis durch einen Verlust der bakteriellen Diversität bei gleichzeitiger Akkumulation der *Enterobacteriaceae* gekennzeichnet (Heimesaat *et al.* 2006, 2007b). Der Verlust der bakteriellen Diversität bei Darmerkrankungen wurde durch molekulare Analysen beim Menschen bestätigt (Manichanh *et al.* 2006).

4.1.5 Besondere Auswirkungen der Konditionierung

Neben einer frühen Veränderung der Colonflora wurde bereits am Tag zwei nach Transplantation eine milde Entzündungsreaktion im Gastrointestinaltrakt festgestellt. Im zeitlichen Verlauf fiel zudem auf, dass die Entzündungsreaktion in einigen Teilen des Gastrointestinaltraktes am Tag zwei stärker als am Tag vier ausgebildet war (Abb. 11A, B).

Zu einem relativ frühen Zeitpunkt nach Stammzelltransplantation beim Menschen können auftretende histopathologische Veränderungen im Darm (Mucositis) unter anderem auf die Chemotherapie zurückgeführt werden (Epstein *et al.* 1980; Snover 1990). Die in unserem Modell beobachteten Auswirkungen am Tag zwei nach Transplantation waren daher am ehesten auf Chemotherapie-Effekte der Konditionierung zurückzuführen, zumal zu diesem Zeitpunkt keine signifikante T-Zellinvasion zu beobachten war (Abb. 19A).

Zusammenfassend betrachtet, war das von uns verwendete RIC-iGvHD-Modell gekennzeichnet von wirksamer Myeloablation, guter Verträglichkeit, akut auftretender Darm-GvHD, proinflammatorischer Florenverschiebung und einem Verlust bakterieller Diversität, verbunden mit einer zeitgleich ablaufenden Immunreaktion.

4.2 Einfluss von TLRs und NOD2 auf die akute iGvHD

Man nimmt an, dass die Detektion von Molekülen der Darmbakterien durch Rezeptoren des angeborenen Immunsystems an der Pathogenese der akuten GvHD ursächlich beteiligt ist (Hill & Ferrara 2000; Sun *et al.* 2007; Reddy 2003). Durch Ergebnisse von Studien am Menschen wird dies teilweise bestätigt (Elmaagacli *et al.* 2006; Holler *et al.* 2004, 2006; Granell *et al.* 2006; Lorenz *et al.* 2001), dennoch ist die systematische Erfassung des Einflusses von TL-, NL-Rezeptoren und deren Adapterproteine auf die Pathogenese der akuten GvHD bislang eher lückenhaft.

4.2.1 Bedeutung der TLRs bei der akuten iGvHD

In unterschiedlichen Darmentzündungsmodellen konnte gezeigt werden, dass TLR9 bei der Vermittlung der Entzündung von besonderer Bedeutung ist (Calcaterra *et al.* 2008; Taylor *et al.* 2008; Obermeier *et al.* 2005). Aufgrund dieser Erkenntnisse untersuchten wir TLR9-defiziente Tiere in unserem iGvHD-Modell. Die Ergebnisse zeigen, dass TLR9^{-/-}-Tiere bei akuter GvHD im Vergleich zu transplantierten Wildtyptieren signifikant besser überlebten (Abb. 28) und eine milder ausgeprägte Entzündungsreaktion im Magen / Jejunum und Colon hatten (Abb. 31). Weiterhin konnte im Colon der TLR9^{-/-}-Tiere neun Tage nach Transplantation, also auf dem Höhepunkt der iGvHD, weniger T-Zellen (Abb. 35A), apoptotischen Zellen (Abb. 34A), neutrophile Granulozyten (Abb. 35C) und mehr proliferierende Zellen (Abb. 34B) als bei Wildtyptieren nachgewiesen werden.

Bezüglich des besseren Überlebens, aber auch hinsichtlich der mildereren Entzündungsreaktion im Darm, stimmen unsere Erkenntnisse mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein. Sowohl in den Studien von Calcaterra und Mitarbeitern, die das Auftreten akuter GvHD bei TLR9-defizienten Tiere untersuchten (Calcaterra *et al.* 2008), als auch in den Studien von Taylor *et al.*, welche eine Modulation der akuten GvHD durch TLR9-Agonisten herausarbeiteten (Taylor *et al.* 2008), konnte die Bedeutung des TLR9 bei der Vermittlung der Darm-GvHD nachgewiesen werden.

Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen konnte Calcaterra und Mitarbeiter zeigen, dass TLR9^{-/-}-Tiere bei akuter GvHD signifikant besser überleben und die intestinale Entzündung bei TLR9^{-/-}-Tieren zudem milder ausfällt. Während in unserem Modell eine Konditionierung mit Chemotherapeutika verwendet wurde (RIC), erfolgte die Konditionierung der Tiere in den Studien von Calcaterra und Mitarbeitern ausschließlich durch Bestrahlung (Calcaterra *et al.* 2008). Dass die Ergebnisse unabhängig von der angewendeten Konditionierung übereinstimmen, unterstreicht die Bedeutung von TLR9 bei Vermittlung der akuten GvHD.

In den Studien von Taylor et al. war eine Verstärkung der GvHD durch die Anwendung von TLR9-Liganden sowohl nach einer Konditionierung durch Bestrahlung als auch bei Anwendung einer bestrahlungsunabhängigen Konditionierung nachzuweisen und blieb bei TLR9^{-/-}- und MyD88^{-/-}-Tieren nach klassischer Konditionierung aus.

Als Ursache für die Wirkung der TLR9-Liganden wird vermutet, dass der für die Pathogenese charakteristische „Zytokinsturm“ der akuten GvHD von einem zweiten „Zytokinsturm“, induziert durch die Verabreichung der TLR9-Liganden, gefolgt wird (Taylor *et al.* 2008). Dieser zweite „Zytokinsturm“ führt zu einer Expansion von T-Zellen und damit zu einer Verstärkung der GvHD (Taylor *et al.* 2008). Calcaterra et al. konnten weiterhin zeigen, dass Milzzellen von TLR9-defizienten Tieren ein geringeres allogenes Potential aufwiesen und weniger kostimulatorischer Moleküle nach Myeloablation exprimieren (Calcaterra *et al.* 2008).

In einem weiteren Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung von TLR9-Liganden durch die Aktivierung dendritischer Zellen und Rekrutierung von T-Zellen zu einer Verstärkung der GvH-Reaktion führt (Durakovic *et al.* 2007). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass TLR9-defiziente Tiere nach allogener Transplantation weniger T-Zellen im Colon hatten (Abb. 35A). Die Beobachtung, dass TLR9-defiziente Tiere im Colon weiterhin weniger apoptotische Zellen (Abb. 34A) und Neutrophile (Abb. 35C) aufwiesen, lässt sich möglicherweise am ehesten als Folge der mildereren T-Zellinvasion bei diesen Tieren erklären, da sowohl die Apoptosen als auch der Anstieg der Neutrophilen T-Zell vermittelte Effektormechanismen der akuten GvHD darstellen. Es bleibt jedoch offen, warum eine höhere Anzahl proliferierender Zellen im Colon der TLR9^{-/-}-Tiere nach Transplantation zu finden war (Abb. 34B).

In der vorliegenden Arbeit konnte kein Einfluss von TLR4 auf das Überleben der Tiere festgestellt werden (Abb. 29). Dies widerspricht teilweise den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Beim Menschen konnte zwar ein Einfluss von Mutationen des TLR4 auf das Vorkommen akuter und schwerer akuter GvHD nachgewiesen werden; diese Studien widersprechen sich jedoch bezüglich der Auswirkung der TLR4-Mutation (Lorenz *et al.* 2001; Elmaagacli *et al.* 2006). Murine Studien sind in ihren Ergebnissen bezüglich der Funktion des TLR4 bei akuter GvHD ebenfalls widersprüchlich. Nach allogener Transplantation von TLR4-defizienten Tieren konnte kein besseres Überleben dieser Tiere gezeigt werden (Calcaterra *et al.* 2008). Andererseits konnte bei der Transplantation von Knochenmark LPS-resistenter Mäuse und bei LPS-Antagonisierung ein besseres Überleben der Tiere und eine mildere

Entzündungsbildung im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden (Cooke *et al.* 1998, 2001).

Ursache für diese widersprüchlichen Ergebnisse sind möglicherweise am ehesten methodische Unterschiede der verschiedenen Studien. Es wurden beispielsweise unterschiedliche Mausstämme, unterschiedliche Konditionierungen und unterschiedliche Verfahren zur Modulation des TLR4 (LPS-Antagonismus, Transplantation von Knochenmark LPS-resistenter Mäuse, Verwendung von TLR4-defizienten-Mausstämme) verwendet. Beim Vergleich der Methoden lassen sich die geringsten Differenzen zwischen unseren Studien und den von Calcaterra und Mitarbeitern (Calcaterra *et al.* 2008) feststellen, welche bezüglich der akuten GvHD bei TLR4-defizienten Tieren zu vergleichbaren Ergebnissen kommen (kein Einfluss des TLR4 auf akute GvHD).

TLR2/4^{-/-}-Tiere zeigten im Vergleich zu den C57BL/10-Wildtyptieren nach Transplantation eine mildere Entzündungsbildung im Magen / Jejunum und Colon (Abb. 30). Weiterhin hatten diese Tiere weniger T-Zellen im Colon, was an eine besondere Funktion des TLR2 und TLR4 bei der T-Zellrekrutierung denken lässt (Abb. 33A). Die Frage nach einer wesentlichen Funktion des TLR2 und TLR4 bei der Entzündungsvermittlung der akuten GvHD kann jedoch nicht beantwortet werden.

4.2.2 Bedeutung von NOD2 bei der akuten iGvHD

Bislang wurden NOD2-defiziente Tiere in keinem Transplantationsmodell untersucht. In Studien am Menschen konnte ein gehäuftes Vorkommen von schwerer akuter GvHD bei Vorlage von spezifischen Mutationen des NOD2 (Single-Nucleotide-Polymorphisms – SNP's) bei Empfänger und Spender und zum Teil ein Einfluss dieser Mutationen auf die therapieassoziierte Mortalität festgestellt werden (Holler *et al.* 2004, 2006; Elmaagacli *et al.* 2006). Im murinen Colitismodell konnte hingegen gezeigt werden, dass die Stimulation des NOD2-Rezeptors eine Abmilderung der Entzündung zur Folge hat. Als Ursache wird eine inhibitorische Wirkung des NOD2-Rezeptor auf unterschiedliche TLRs genannt (Watanabe *et al.* 2008; Yang *et al.* 2007).

In unserem Modell wurde ein besseres Überleben der NOD2^{-/-}-Tiere und eine mildere Entzündungsbildung im Magen / Jejunum dieser Tiere im Vergleich zu C57BL/6-Wildtyptieren nachgewiesen (Abb. 28, 31). Die *in situ* Analysen im Colon zeigten, dass NOD2^{-/-}-Tiere auf dem Höhepunkt der iGvHD im Colon weniger T-Zellen, weniger apoptotische Zellen und eine verstärkte Proliferation verglichen mit den Wildtyptieren zum gleichen Zeitpunkt hatten (Abb. 34A, 34B, 35A), allerdings bei gleicher Ausprägung der histopathologischen

Veränderungen (Abb. 31C). Andererseits konnte auch in unserem Inflammationsmodell festgestellt werden, dass die Verabreichung des NOD2-Agonisten MDP bei akuter GvHD zu einer veränderten Immunreaktion mit einer reduzierten Anzahl neutrophiler Zellen und T-Zellen führte und einen geringeren Nachweis apoptotischer Zellen zur Folge hatte (Abb. 44). Dies steht im Widerspruch zu unseren Beobachtungen bei den NOD2-defizienten Tieren nach Transplantation. Aufgrund der dargestellten rein deskriptiven Befunde ist dieser Widerspruch nicht hinreichend zu erklären. Es können weiterhin keine Aussagen bezüglich der Ursache des verbesserten Überlebens und der geringeren Entzündungsbildung im Magen / Jejunum der NOD2^{-/-}-Tiere getroffen werden.

Das Vorliegen spezifischer Mutationen des NOD2-Rezeptors des Menschen ist mit der Defizienz des NOD2-Rezeptors (Knock-Out-Tiere) in unserem Tiermodell und deren Konsequenz für die Entzündungsreaktion nicht zu vergleichen.

4.2.3 Bedeutung der Adapterproteine MyD88 und TRIF bei der akuten iGvHD

Eine Analyse des Überlebens von MyD88^{-/-}-Tieren gestaltete sich schwierig, da aufgrund von Zuchtproblemen zu wenig Tiere vorhanden waren, um die entsprechend hinreichende Stichprobenanzahl zu erhalten.

Die Analysen histopathologischer Schnitte des Gastrointestinaltraktes der transplantierten MyD88^{-/-}-Tiere zeigte den Einfluss der MyD88-abhängigen TLRs bei der Ausbildung gastrointestinaler Entzündung bei akuter GvHD in unserem Modell. Dabei wiesen die MyD88^{-/-}-Tiere sowohl im Magen / Jejunum als auch im Colon einen signifikant geringeren histopathologischen Schweregrad akuter GvHD auf (Abb. 31). Da der TLR9 im Signalweg von MyD88 abhängig ist, bekräftigte dies die erhobene Befunde bei den TLR9^{-/-}-Tieren.

Die *in situ* Analysen der Immunzellpopulationen im Colon von transplantierten MyD88-defizienten Tieren zeigten, dass diese Tiere weniger T-Zellen (Abb. 35A), Neutrophile (Abb. 35C) und apoptotische Zellen (Abb. 34A) im Colon im Vergleich zu den C57BL/6-Wildtypen auf dem Höhepunkt der Darm-GvHD hatten. Dies bestätigte ebenfalls die bei den anderen TLR-defizienten Genotypen erhobenen Befunde.

4.2.4 Einfluss der TLRs und von NOD2 auf die Veränderung der Darmflora bei GvHD

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl im Colon von Wildtypen als auch von TLR2^{-/-}-, TLR4^{-/-}-, TLR2/4^{-/-}-, NOD2^{-/-}-, TRIF^{-/-}- und MyD88^{-/-}-Tieren eine Verschiebung der Darmflora festgestellt (Abb. 36, 40). Zunächst konnte im Colon der meisten transplantierten Genotypen

eine Erhöhung der Gesamtbakterienlast festgestellt werden (Abb. 36, 40). Die Erhöhung der Gesamtbakterienlast führt zu einem vermehrten Vorkommen bakterieller DNA, was eine verstärkte Aktivierung des TLR9 zur Folge hat. Möglicherweise stellt dies eine wesentliche Ursache für die Bedeutung des TLR9 bei der Entzündungsvermittlung der akuten iGvHD dar. Auch die Ergebnisse klinischer Studien zur Antibiotikaintervention bei akuter GvHD (Beelen *et al.* 1999) können somit begründet werden, da eine möglichst umfangreiche Antibiotikaintervention das Vorkommen bakterieller DNA und damit das Vorhandensein der TLR9-Liganden im Darm reduziert.

Zusätzlich war bei sämtlichen untersuchten Genotypen im Colon ein Anstieg der *Enterobacteriaceae* bzw. der aeroben grampositiven Kokken und / oder der anaeroben gramnegativen Stäbchen festzustellen (Abb. 36, 40)

Die frühen Auswirkungen der Konditionierung vor Transplantation auf die Colonflora konnten zudem nicht nur bei den C57BL/6- (Abb. 24), sondern in ähnlicher Form auch bei TLR2^{-/-}-, NOD2^{-/-}-, MyD88^{-/-}- und TRIF^{-/-}-Mäusen beobachtet werden (nicht dargestellt).

Welche Bakterienspezies in welchem Ausmaß an der Vermittlung der Entzündung beteiligt sind, könnte durch die Verwendung gnotobiotisch gehaltener Mäuse, die mit bestimmten bakteriellen Spezies kolonisiert werden, im iGvHD-Modell geklärt werden. Bei diesen Tieren werden zunächst durch die Verabreichung einer fünffachen Antibiotikakombination sämtliche kultivierbaren Bakterienspezies im Darm entfernt und dadurch in Folge eine definierte Rekolonisierung ermöglicht.

Gnotobiotisch gehaltene Mäuse wurden in dem dargestellten iGvHD-Modell verwendet, bei diesen Tieren kam es jedoch zu technischen Problemen bei der Konditionierung. Bei antibiotisch behandelten und keimfrei gehaltenen Mäusen kann eine massive Größenzunahme des Caecums beobachtet werden, möglicherweise bedingt durch die Reduktion mukolytischer Bakterienspezies der Intestinalflora (Tlaskalová-Hogenová *et al.* 2004). In dem verwendeten iGvHD-Modell wurden die Chemotherapeutika intraperitoneal verabreicht, dabei wurde höchstwahrscheinlich das stark vergrößerte Caecum zwangsläufig punktiert und die Chemotherapeutika in den Darm injiziert. Dies führte zu einem intestinalen Schaden, der das Versterben der Tiere ab Tag zwei nach Transplantation bedingte (nicht dargestellt). Bei der histopathologischen Analyse der Darmabschnitte fiel eine massive Schädigung des Caecums und Colons auf (nicht dargestellt). Es ist nicht davon auszugehen, dass diese Schäden durch eine transplantationsinduzierte T-Zellaktivität verursacht wurden, da diese zu früh nach Transplantation auftraten.

Für das dargestellte bestrahlungsunabhängige iGvHD-Modell muss somit festgestellt werden, dass in der bisherigen Anwendung Versuche mit gnotobiotisch und keimfrei gehaltenen Mäusen technisch nicht durchführbar sind. Aussagen bezüglich der Bedeutung der intestinalen Besiedlung bei Vermittlung der Entzündung nach Transplantation können schlussfolgernd aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nur im begrenzten Ausmaß getroffen werden.

4.3 Modulation akuter GvHD durch Verabreichung von MDP und TLR9-Antagonist

Für die klinische Anwendung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit muss zunächst festgestellt werden, ob die selektive Stimulation / Antagonisierung einzelner Rezeptoren des angeborenen Immunsystems bei akuter GvHD im Mausmodell prinzipiell möglich ist.

Für den NOD2-Rezeptor liegen Erkenntnisse aus murinen Colitismodellen vor, die zeigen, dass die Stimulation des NOD2-Rezeptors durch MDP eine Abschwächung der Colitis zur Folge hat (Watanabe *et al.* 2008; Yang *et al.* 2007).

Um festzustellen, ob eine ähnliche protektive Wirkung durch die Verabreichung von MDP bei akuter GvHD zu erreichen ist, behandelten wir in einem Pilotexperiment C57BL/6-Wildtypiere im iGvHD-Modell mit MDP analog zu dem Protokoll von Watanabe und Mitarbeitern (Watanabe *et al.* 2008).

Am Tag neun nach Transplantation hatten mit MDP behandelte Mäuse signifikant weniger T-Zellen, Neutrophile und apoptotische Zellen im Colon im Vergleich zu den C57BL/6-Wildtypieren, die nicht mit MDP behandelt wurden (Abb. 44).

Aufgrund unserer Ergebnisse bei den TLR9^{-/-}-Tieren im iGvHD-Modell (Abb. 28, 31, 34, 35) untersuchten wir, ob durch die Verabreichung des TLR9-Antagonisten iODN 2088 am Tag zwei nach Transplantation eine vergleichbare Abmilderung der iGvHD wie bei den TLR9^{-/-}-Tieren zu erzielen war.

Die Tiere, die den TLR9-Antagonisten erhalten hatten, zeigten auf dem Höhepunkt der iGvHD eine geringere T-Zellinvasion, hatten weniger Neutrophile und apoptotische Zellen im Colon verglichen mit den Placebo-behandelten-Tieren (Abb. 45).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine Modulation der GvHD durch die selektive Stimulation bzw. Antagonisierung von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems auch bei alternativer (RIC) Konditionierung möglich ist. Es sind weitere Experimente nötig, um die optimale Dosierung, den richtigen Zeitpunkt der Verabreichung und Einblicke bezüglich der

Wirkungsursache zu gewinnen. Dennoch bilden diese Ergebnisse die Basis für die praktische Anwendung unserer Erkenntnisse, die gegebenenfalls zukünftig auch beim Menschen eine Erweiterung der therapeutischen und prophylaktischen Möglichkeiten bei akuter GvHD ermöglichen könnten.

Zusammenfassung

Akute Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD) ist eine Hauptursache für Morbidität und Mortalität nach allogener Stammzelltransplantation. TLR- und NOD-Rezeptoren sind Komponenten des angeborenen Immunsystems, welche unvariable Merkmale mikrobieller Organismen erkennen. Der Detektion der Intestinalflora durch TLR- und NOD-Rezeptoren wird eine bedeutende Rolle bei der Induktion akuter GvHD beigemessen. Die Anwendung alternativer Konditionierungsansätze mit geringerer Wirkungsintensität (RIC – Reduced-Intensity-Conditioning) vor allogener Stammzelltransplantation konnte positive Auswirkungen auf das Auftreten und die Ausprägung akuter GvHD aufzeigen, dennoch sind die Hintergründe dieser veränderten Immunbiologie größtenteils unbekannt. In einem neu etablierten murinen „Reduced-Intensity“ Konditionierungsmodell haben wir die Intestinalflora durch kulturelle und molekulare Methoden untersucht und weiterhin histologische und *in situ* histochemische Analysen angefertigt. Die Transplantation im allogenen „Mismatch“ führte zum Versterben der Tiere ab Tag sechs nach Transplantation, zu einer intestinalen Immunreaktion und zum Auftreten pathohistologischer Läsionen im Gastrointestinaltrakt. Im Colon waren mehr Apoptosen, T-Zellen, proliferierenden Zellen und Neutrophile nachzuweisen. Gleichzeitig kam es durch die Akkumulation *Enterobacteriaceae*, gramnegativer anaerober Stäbchen, grampositiver aerober Kokken und einem Verlust bakterieller Diversität zu einer proinflammatorischen Veränderung der Colonflora. Entsprechende Florenverschiebungen konnten auch im Ileum und Jejunum von Wildtyptieren beobachtet werden. Die Analyse der TLR- und NOD2-defizienten Tiere erbrachte ein signifikant besseres Überleben der TLR9- und NOD2-defizienten Tiere. Diese Tiere hatten im Vergleich zu Wildtyptieren eine mildere Entzündungsreaktion im Magen und Colon, gekennzeichnet durch den geringeren Anstieg von T-Zellen und apoptotischen Zellen bei gleichzeitig verstärkter Regeneration im Colon. Die Analysen bei MyD88^{-/-}-Tieren bestätigten weitestgehend unserer Befunde bei TLR9-defizienten Tieren. Eine veränderte Immunreaktion auf die Transplantation war ebenfalls im Colon TLR2-, TLR4-, TLR2/4-, und TRIF-defizienter Tieren zu beobachten, führte aber nicht zu verbesserten Überlebensraten dieser Tiere. Die Verabreichung von MDP und einem TLR9-Antagonisten bei akuter GvHD resultierte im Colon in einem geringeren Anstieg von T-Zellen, neutrophilen und apoptotischen Zellen.

Schlussfolgernd erlauben die vorliegenden Ergebnisse wertvolle Einblicke in die Immunbiologie akuter GvHD nach „Reduced-Intensity“ Konditionierung und bilden möglicherweise Grundlage für eine Erweiterung der therapeutischen und prophylaktischen Interventionsstrategien bei Patienten mit akuter GvHD.

Literaturverzeichnis

- Abreu MT, Fukata M, Arditi M. TLR signalling in the gut in health and disease. *J Immunol* 2005;174:4453-4460.
- Adachi O, Kawai T, Takeda K, et al. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1 and IL-18 – mediated function. *Immunity* 1998;9:143-150.
- Alakomi HL, Skyttä E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala, Helander IM. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:2001-2005.
- Alexopoulou L, Kontoyiannis D. Contribution of microbial-associated molecules in innate mucosal responses. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:1349-1358.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 1995;59:143-169.
- Andersen JM, Al-Khairi D, Ingalls RR. Innate immunity at the mucosal surface: role of toll-like receptor 3 and toll-like receptor 9 in cervical cell responses to microbial pathogens. *Biol Reprod* 2006;74:824-831.
- Aoudjhane M, Labopin M, Gorin NC, et al. Comparative outcome of reduced intensity and myeloablative conditioning regimen in HLA identical sibling allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for patients older than 50 years of age with acute myeloblastic leukaemia: a retrospective survey from the Acute Leukemia Working Party (ALWP) of the European group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Leukemia* 2005;19:2304-2312.
- Barreau F, Meinzer U, Chareyre F, et al. CARD15/NOD2 is required for Peyer's patches homeostasis in mice. *PLoS ONE* 2007;2:e523.
- Beelen DW, Elmaagacli A, Muller KD, Hirche H, Schaefer UW. Influence of intestinal bacterial decontamination using metronidazole and ciprofloxacin or ciprofloxacin alone on the development of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation in patients with hematologic malignancies: final results and long-term follow-up of an open-label prospective randomized trial. *Blood* 1999;93:3267-3275.
- Beelen DW, Trensche R, Casper J, et al. Dose-escalated treosulphan in combination with cyclophosphamide as a new preparative regimen for allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in patients with an increased risk for regimen-related complications. *Bone Marrow Transplant* 2005;35:233-241.
- Beutler B. Inferences questions and possibilities in Toll – like receptor signalling. *Nature* 2004;430:257-263.
- Billingham RE. The biology of Graft versus-host reactions. *Harvey Lect* 1966;62:21-78.
- Blau IW, Schmidt-Hieber M, Leschinger N, et al. Engraftment kinetics and hematopoietic chimerism after reduced-intensity conditioning with fludarabine and treosulfan before allogeneic stem cell transplantation. *Ann Hematol* 2007;86:583-589.
- Blazar BR, Murphy WJ. Bone marrow transplantation and approaches to avoid graft-versus-host disease (GVHD). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2005;360:1747-1767.
- Bourhis LL, Werts C. Role of Nods in bacterial infection. *Microbes Infect* 2007;9:629-636.
- Bull AT, Ward AC, Goodfellow M. Search and discovery for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:573-606.
- Calcaterra C, Sfondrini L, Rossini A, et al. Critical role of TLR9 in acute graft-versus-host disease. *J Immunol* 2008;181:6132-6139.
- Cario E. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut* 2005;54:1182-1193.
- Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 2000;68:7010-7017.
- Casper J, Knauf W, Kiefer T, et al. Treosulfan and fludarabine: a new toxicity – reduced conditioning regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2004;103:725-731.
- Christensen HR, Frokiaer H, Pestka JJ. *Lactobacilli* differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol* 2002;168:171-178.
- Cooke KR, Gerbitz A, Crawford JM, et al. LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 2001;107:1581-1589.
- Cooke KR, Hill GR, Crawford JM, et al. Tumor necrosis factor-alpha production to lipopolysaccharide stimulation by donor cells predicts the severity of experimental acute graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 1998;102:1882-1891.
- Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 1987;28:1221-1227.
- Dahllöf I. Molecular community analysis of microbial diversity. *Curr Opin Biotechnol* 2002;13:213-217.
- Delbridge LM, O'Riordan MX. Innate recognition of intracellular bacteria. *Curr Opin Immunol* 2007;19:10-16.
- Donskey CJ, Hujer AM, Das SM, Pultz NJ, Bonomo RA, Rice LB. Use of denaturing gradient gel electrophoresis for analysis of the stool microbiota of hospitalized patients. *J Microbiol Methods* 2003;54:249-256.
- Durakovic N, Radojic V, Skarica M, et al. Factors governing the activation of adoptively transferred donor T cells infused after allogeneic bone marrow transplantation in the mouse. *Blood* 2007;109:4564-4574.
- Duran-Struock R, Reddy P. Biological advances in acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation* 2008;85:303-308.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005;308:1635-1638.
- Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* 2003;9:1144-1150.
- Elmaagacli AH, Koldehoff M, Beelen DW. Improved outcome of hematopoietic SCT in patients with homozygous gene variant of Toll-like receptor 9. *Bone Marrow Transplant* 2009 (Epub ahead of print).

- Elmaagacli AH, Koldehoff M, Hindahl H, et al. Mutations in innate immune system NOD2/Card 15 and TLR-4 (Thr399Ile) genes influence the risk for severe acute graft-versus-host disease in patients who underwent an allogeneic transplantation. *Transplantation* 2006;81:247-254.
- Epstein RJ, McDonald GB, Sale GE, Shulman HM, Thomas ED. The diagnostic accuracy of the rectal biopsy in acute graft-versus-host disease: a prospective study of thirteen patients. *Gastroenterology* 1980;78:764-771.
- Ferrara JL, Levy R, Chao NJ. Pathophysiologic mechanism of acute graft-vs.-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 1999;5:347-356.
- Fukata M, Abreu MT. Role of Toll – like receptors in gastrointestinal malignancies. *Oncogene* 2008;27:234-243.
- Furrie E. A molecular revolution in the study of intestinal microflora. *Gut* 2006;55:141-143.
- Gerbitz A, Schultz M, Wilke A, et al. Probiotic effects on experimental graft-versus-host disease: let them eat yogurt. *Blood* 2004;103:4365-4367.
- Gioannini TL, Weiss JP. Regulation of interactions of Gram-negative bacterial endotoxins with mammalian cells. *Immunol Res* 2007;39:249-260.
- Goker H, Haznedaroglu IC, Chao NJ. Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management. *Exp Hematol* 2001;29:259-277.
- Goulmy E. Minor histocompatibility antigens: from transplantation problems to therapy of cancer. *Hum Immunol* 2006;67:433-438.
- Granell M, Urbano - Ispizua A, Aróstegui JI, et al. Effect of NOD2/CARD15 variants in T – cell depleted allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2006;91:1372-1376.
- Guarner. Enteric flora in health and disease. *Digestion* 2006;73 Suppl 1:5-12.
- Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003;361:512-519.
- Harousseau JL. The allogeneic dilemma. *Bone Marrow Transplant* 2007;40:1123-1128.
- Harris G, KuoLee R, Chen W. Role of Toll-like receptors in health and disease of gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol* 2006;12:2149-2160.
- Hart AL, Al – Hassi HO, Rigby RJ, et al. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*; 2005;129:50-65.
- Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S, et al. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2002;122:1987-2000.
- Hayashi H, Takahashi R, Nishi T, Sakamoto M, Benno Y. Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *J Med Microbiol* 2005;54:1093-1101.
- Heidt PJ, Vossen JM. Experimental and clinical gnotobiotics: influence of the microflora on graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Med* 1992;23:161-173.
- Heimesaat MM, Bereswill S, Fischer A, et al. Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 2006;177:8785-8795.
- Heimesaat MM, Fischer A, Jahn HK, et al. Exacerbation of murine ileitis by Toll-like receptor 4 mediated sensing of lipopolysaccharide from commensal *Escherichia coli*. *Gut* 2007a;56:941-948.
- Heimesaat MM, Fischer A, Siegmund B, et al. Shift towards pro-inflammatory intestinal bacteria aggravates acute murine colitis via Toll-like receptors 2 and 4. *PLoS ONE* 2007b;2:e662.
- Heimesaat MM, Nogai A, Bereswill S, et al. Gut TLR9 antagonist modulates MyD88/ TLR9 mediated intestinal GvHD. 2009; Manuskript eingereicht (*Gastroenterology*).
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;408:740-745.
- Hill GR, Crawford JM, Cooke KR, Brinson YS, Pan L, Ferrara JL. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood* 1997;90:3204-3213.
- Hill GR, Ferrara JLM. The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2000;95:2754–2759.
- Hoebe K, Du X, Georgel P, et al. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88– independent TIR signalling. *Nature* 2003;424:743-748.
- Holler E. Progress in acute graft versus host disease. *Curr Opin Hematol* 2007;14:625-631.
- Holler E, Rogler G, Brennmoehl J, et al. Prognostic significance of NOD2/CARD15 variants in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation: effect on long-term outcome is confirmed in 2 independent cohorts and may be modulated by the type of gastrointestinal decontamination. *Blood* 2006;107:4189-4193.
- Holler E, Rogler G, Herfarth H, et al. Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2004;104:889-894.
- Holmberg L, Kikuchi K, Gooley TA, et al. Gastrointestinal graft-versus-host disease in recipients of autologous hematopoietic stem cells: incidence, risk factors, and outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12:226-234.
- Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut* 2001;48:198-205.
- Hornef MW, Normark BH, Vanderwalle A, Normark S. Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells. *J Exp Med* 2003;198:1225-1235.
- Johansson JE, Brune M, Ekman T. The gut mucosa is preserved during allogeneic, haemopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant* 2001;28:737-742.
- Johansson JE, Ekman T. Gut toxicity during hemopoietic stem cell transplantation may predict acute graft – versus – host disease severity in patients. *Dig Dis Sci* 2007;52:2340-2345.
- Kalis C, Gumenscheimer M, Freudenberg N, et al. Requirement for TLR9 in the immunomodulatory activity of *Propionibacterium acnes*. *J Immunol* 2005;174:4295-4300.

- Kawai T, Akira S. Pathogen recognition with Toll – like receptors. *Curr Opin Immunol* 2005;17:338-344.
- Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005;307:731-734.
- Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002;20:709-760.
- Le Bourhis L, Benko S, Girardin SE. Nod1 and Nod2 in innate immunity and human inflammatory disorders. *Biochem Soc Trans* 2007;35:1479-1484.
- Lembo A, Kalis C, Kirschning CJ, et al. Differential contribution of Toll-like receptors 4 and 2 to the cytokine response to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Staphylococcus aureus* in mice. *Infect Immun* 2003;71:6058-6062.
- Lepage P, Seksik P, Sutren M, et al. Biodiversity of the mucosa-associated microbiota is stable along the distal digestive tract in healthy individuals and patients with IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:473-480.
- Lew J, Smith JA. Mucosal graft-vs-host disease. *Oral Dis* 2007;13:519-529.
- Lorenz E, Schwatz DA, Martin PJ, et al. Association of TLR4 mutations and the risk for acute GVHD after HLA-matched-sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001;7:384-387.
- Lupp M, Robertson M, Wickham I, et al. Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of *Enterobacteriaceae*. *Cell Host Microbe* 2007;2:204.
- Magalhaes JG, Tattoli I, Girardin SE. The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin Immunol* 2007;19:106-115.
- Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 2006;55:205-211.
- Marteau P, Pochart P, Doré J, Béra-Maillet C, Bernalier A, Corthier G. Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:4939-4942.
- Martinez-Medina M, Aldeguer X, Gonzalez-Huix F, Acero D, Garcia-Gil LJ. Abnormal microbiota composition in the ileocolonic mucosa of Crohn's disease patients as revealed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:1136-1145.
- Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007;449:819-826.
- Melmed G, Thomas LS, Lee N, et al. Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut. *J Immunol* 2003;170:1406-1415.
- Merlin T, Sing A, Nielsen PJ, Galanos C, Freudenberg MA. Inherited IL-12 unresponsiveness contributes to the high LPS resistance of the Lps(d) C57BL/10ScCr mouse. *J Immunol* 2001;166:566-573.
- Mielcarek M, Martin PJ, Leisenring W, et al. Graft-versus-host disease after nonmyeloablative versus conventional hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2003;102:756-762.
- Morris ES, Hill GR. Advances in the understanding of acute graft – versus – host disease. *Br J Haematol* 2007;137:3-19.
- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:695-700.
- Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1998;73:127-141.
- Nachbaur D, Kircher B, Eisendle K, Lätzer K, Haun M, Gastl G. Phenotype, function and chimaerism of monocyte-derived blood dendritic cells after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *British J Haematol* 2003;123:119-126.
- Neish AS. The gut microflora and intestinal epithelial cells: a continuing dialogue. *Microbes Infect* 2002;4:309-317.
- Nguyen CV, Kastenberg DM, Choudhary C, Katz LC, DiMarino A, Palazzo JP. Is single cell apoptosis sufficient for the diagnosis of graft-versus-host disease in the colon? *Dig Dis Sci* 2008a;53:747-756.
- Nguyen VH, Shashidhar S, Chang DS, et al. The impact of regulatory T cells on T-cell immunity following hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2008b;111:945-953.
- Nübel U, Engelen B, Felske A, et al. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol* 1996;178:5636-5643.
- Obermeier F, Dunger N, Strauch UG, et al. CpG motifs of bacterial DNA essentially contribute to the perpetuation of chronic intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2005;129:913-927.
- O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 2006;7:688-693.
- Ortega-Cava CF, Ishihara S, Rumi MA, et al. Strategic compartmentalization of Toll – like receptor 4 in the mouse gut. *J Immunol* 2003;170:3977-3985.
- Othman M, Agüero R, Lin HC. Alterations in intestinal microbial flora and human disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2008;24:11-16.
- Parker LC, Prince LR, Sabroe I. Translational mini – reviews series on Toll – like receptors: networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity. *Clin Exp Immunol* 2007;147:199-207.
- Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes Infect* 2004;6:1382-1387.
- Ploemacher RE, Johnson KW, Rombouts EJ, et al. Addition of treosulfan to a nonmyeloablative conditioning regimen results in enhanced chimerism and immunologic tolerance in an experimental allogeneic bone marrow transplant model. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004;10:236-245.
- Rakoff-Nahoum S, Hao L, Medzhitov R. Role of toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis. *Immunity* 2006;25:319-329.
- Reddy P. Pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Hematol Oncol* 2003;21:149-161.
- Rieger K, Loddenkemper C, Maul J, et al. Mucosal FOXP3+ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD. *Blood* 2006;107:1717-1723.
- Rosenstiel P, Till A, Schreiber S. NOD-like receptors and human diseases. *Microbes Infect* 2007;9:648-657.
- Ross WA, Couriel D. Colonic graft-versus-host disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21:64-69.

- Ross WA, Gosh S, Dekovich AA, et al. Endoscopic biopsy diagnosis of acute gastrointestinal graft-versus-host disease: rectosigmoid biopsies are more sensitive than upper gastrointestinal biopsies. *Am J Gastroenterol* 2008;103:982-989.
- Sabroe I, Parker LC, Dower SK, Whyte MK. The role of TLR activation in inflammation. *J Pathol* 2008;214:126-135.
- Sackstein R. A revision of Billingham's tenets: the central role of lymphocyte migration in acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12(1 Suppl 1):2-8.
- Sadeghi B, Aghdami N, Hassan Z, et al. GVHD after chemotherapy conditioning in allogeneic transplanted mice. *Bone Marrow Transplant* 2008;42:807-818.
- Sale GE, Shulman HM, McDonald GB, Thomas ED. Gastrointestinal graft-versus-host disease in man. A clinicopathologic study of the rectal biopsy. *Am J Surg Pathol* 1979;3:291-299.
- Sartor TB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2008;134:577-594.
- Scheulen ME, Hilger RA, Oberhoff C, et al. Clinical phase I dose escalation and pharmacokinetic study of high-dose chemotherapy with treosulfan and autologous peripheral blood stem cell transplantation in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 2000;6:4209-4216.
- Schmidt-Hieber M, Blau IW, Trenscher R, et al. Reduced-toxicity conditioning with fludarabine and treosulfan prior to allogeneic stem cell transplantation in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 2007;39:389-396.
- Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, et al. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 2003;52:237-242.
- Sghir A, Gramet G, Suau A, Rochet V, Pochart P, Dore J. Quantification of bacterial groups within fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:2263-2266.
- She K, Gilman AL, Aslanian S, et al. Altered Toll-like receptor 9 responses in circulating B cells at the onset of extensive chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13:386-397.
- Shimoni A, Hardan I, Shem-Tov N, Rand A, Yerushalmi R, Nagler A. Fludarabine and treosulfan: a novel modified myeloablative regimen for allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation with effective antileukemia activity in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma* 2007;48:2352-2359.
- Shlomchik WD. Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol* 2007;7:340-352.
- Silva SH, Vieira EC, Dias RS, Nicoli JR. Antagonism against *Vibrio cholerae* by diffusible substances produced by bacterial components of the human faecal microbiota. *J Med Microbiol* 2001;50:161-164.
- Sirard JC, Vignal C, Dessein R, Chamaillard M. Nod-like receptors: cytosolic watchdogs for immunity against pathogens. *PLoS Pathog* 2007;3:e152.
- Sjö F, Hassan Z, Abedi-Valugerdi M, et al. Myeloablative and immunosuppressive properties of treosulfan in mice. *Exp Hematol* 2006;34:115-121.
- Snover DC. Graft-versus-host disease of the gastrointestinal tract. *Am J Surg Pathol* 1990;14 Suppl 1:101-108.
- Sorrer ML, Maris MB, Storer B, et al. Comparing morbidity and mortality of HLA-matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning: influence of pretransplantation comorbidities. *Blood* 2004;104:961-968.
- Stelljes M, Hermann S, Albring J, et al. Clinical molecular imaging in intestinal graft-versus-host disease: mapping of disease activity, prediction, and monitoring of treatment efficiency by positron emission tomography. *Blood* 2008;111:2909-2918.
- Sun Y, Tawara I, Toubai T, Reddy P. Pathophysiology of acute graft-versus-host disease: recent advances. *Transl Res* 2007;150:197-214.
- Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol* 2005;43:3380-3389.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21:335-376.
- Tannock GW. Analysis of the intestinal microflora: a renaissance. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1999;76:265-278.
- Tannock GW. Molecular assessment of intestinal microflora. *Am J Clin Nutr* 2001;73(2 Suppl):410S-414S.
- Tannock GW. Molecular methods for exploring the intestinal ecosystem. *Br J Nutr* 2002;87 Suppl 2:S199-201.
- Taylor PA, Ehrhardt MJ, Lees CJ, et al. TLR agonists regulate alloresponses and uncover a critical role for donor APCs in allogeneic bone marrow rejection. *Blood* 2008;112:3508-3516.
- Tlaskalová-Hogenová H, Stepánková R, Hudcovic T, et al. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett* 2004;93:97-108.
- Torsvik V, Goksøyr J, Daae FL. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1990;56:782-787.
- Travassos LH, Girardin SE, Philpott DJ, et al. Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep* 2004;5:1000-1006.
- Trenado A, Charlotte F, Fisson S, et al. Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favour immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *J Clin Invest* 2003;112:1688-1696.
- Van Bekkum DW, Roodenburg J, Heidt PJ, van der Waaij D. Mitigation of secondary disease of allogeneic mouse radiation chimeras by modification of the intestinal microflora. *J Natl Cancer Inst* 1974;52:401-404.
- Van Limbergen J, Russell RK, Nimmo ER, et al. Genetics of the innate immune response in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:338-355.
- Vogelsang GB, Lee L, Bensen-Kennedy DM. Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annu Rev Med* 2003;54:29-52.
- von Wintzingerode F, Göbel UB, Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* 1997;21:213-229.
- Vossen JM, Heidt PJ, van den Berg H, et al. Prevention of infection and graft-versus-host disease by suppression of intestinal microflora in children treated with allogeneic bone marrow transplantation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990;9:14-23.

- Walter J, Hertel C, Tannock GW, Lis CM, Munro K, Hammes WP. Detection of *Lactobacillus*, *Pedococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group – specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67:2578-2585.
- Walter J, Tannock GW, Tilsala – Timisjarvi A, et al. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species – specific PCR primers. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:297-303.
- Ward DM, Weller R, Bateson MM. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganism in a natural community. *Nature* 1990;345:63-65.
- Watanabe T, Asano N, Murray PJ, et al. Muramyl dipeptide activation of nucleotide-binding oligomerization domain 2 protects mice from experimental colitis. *J Clin Invest* 2008;118:545-559.
- Watters TM, Kenny EF, O’Neill LA. Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins. *Immunol Cell Biol* 2007;85:411-419.
- Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu Rev Immunol* 2007;25:139-170.
- Wershil BK, Furuta GT. Gastrointestinal mucosal immunity. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121(2 Suppl):S380-383.
- Werts C, Tapping RI, Mathison JC et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* 2001;2:346-352.
- Wysocki CA, Panoskaltis-Mortari A, Blazar RR, Serody JS. Leukozyte migration and graft-versus-host disease. *Blood* 2005;105:4191-4199.
- Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007;448:427-434.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signalling pathway. *Science* 2003;301:640-643.
- Yang Z, Fuss IJ, Watanabe T, et al. NOD2 transgenic mice exhibit enhanced MDP-mediated down-regulation of TLR2 responses and resistance to colitis induction. *Gastroenterology* 2007;133:1510-1521.
- Youn HS, Lee JY, Fitzgerald KA, Young HA, Akira S, Hwang DH. Specific inhibition of MyD88-independent signaling pathways of TLR3 and TLR4 by resveratrol: molecular targets are TBK1 and RIP1 in TRIF complex. *J Immunol* 2005;175:3339-3346.
- Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins HR. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J Nutr* 2004;134:465-472.
- Zoetendal EG, von Wright A, Vilpponen-Salmela T, Ben-Amor K, Akkermans AD, de Vos WM. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:3401-3407.

Lebenslauf Rita Plickert

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagungen

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Dr. Ulf Göbel für die Möglichkeit, in seinem Institut diese Doktorarbeit anfertigen zu können und für die Unterstützung in dieser Zeit danken.

Prof. Dr. Stefan Bereswill und Dr. Markus Heimesaat bin ich zur größten Dankbarkeit für die freundliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe, für die praktische und theoretische Anleitung, Hilfe beim Verfassen der Arbeit und für die intensive Förderung zum wissenschaftlichen Denken und Arbeiten verpflichtet. Insbesondere Dr. Markus Heimesaat möchte ich an dieser Stelle für seine engagierte und geduldige Ausbildung und Unterstützung über den gesamten Zeitraum der Erstellung der Arbeit danken.

Dr. André Fischer danke ich für die Zusammenarbeit und den konstanten freundschaftlichen Rückhalt.

Dr. Axel Nogai möchte ich für die Anleitung bei der Transplantation, bei den histologischen Analysen und die stets anregenden Diskussionen danken.

Meinen Dank möchte ich auch Prof. Dr. Christoph Loddenkemper für die Anleitung bei den histologischen Analysen aussprechen.

Michaela Wattrodt und Gernot Reifenberger danke ich vom ganzen Herzen für die Anleitung, die praktische Unterstützung und die aufbauenden Worte zu schwierigen Zeitpunkten.

Simone Spieckermann möchte ich für die praktische Arbeit bei Herstellung der histologischen Präparate danken.

Auch den Tierpflegekräften des FEM, vor allem Thomas Strandt und Dominique Heine, danke ich herzlich für die intensive Zusammenarbeit, die praktische Anleitung und den freundschaftlichen Rückhalt.

Prof. Dr. Oliver Liesenfeld und seiner Arbeitsgruppe danke ich herzlich für die Unterstützung und Zusammenarbeit bei gemeinsamen Projekten.

Meiner Familie, allen voran meinen Eltern, gilt mein größter Dank dafür, dass sie mir mein Studium ermöglicht haben und mich dabei und bei der Fertigstellung der Promotion so intensiv unterstützt haben. Ohne Eure Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen! Vor allem möchte ich Euch danken, dass Ihr immer ohne Zweifel hinter mir gestanden habt und auch in schweren Zeiten immer Geduld mit mir hattet!

Erklärung

„Ich, Rita Plickert, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Die Rolle der kommensalen Gastrointestinalflora und der Rezeptoren des angeborenen Immunsystems bei der akuten Graft-versus-Host-Erkrankung nach bestrahlungsunabhängiger Konditionierung im murinen Transplantationsmodell selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift