

Rolle des angeborenen Immunsystems und des endogenen Mikrobioms des Darmes bei der Entwicklung einer Nahrungsmittelallergie

Theresa Antonia Storz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung einer Doktorin der Medizin (Dr. med.) genehmigten Dissertation.

Vorsitz: apl. Prof. Dr. Ute Reuning

Prüfer*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Tilo Biedermann
2. Prof. Dr. Frauke Förger

Die Dissertation wurde am 09.01.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.07.2023 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
A EINLEITUNG	6
1. PROBLEMSTELLUNG	6
2. NAHRUNGSMITTELALLERGIEN: GENERELLE ASPEKTE UND FAKTEN	7
3. PATHOPHYSIOLOGIE DER IGE-VERMITTELTEN NAHRUNGSMITTELALLERGIE.....	9
4. DER EINFLUSS DES DARMMIKROBIOMS AUF NAHRUNGSMITTELALLERGIEENTSTEHUNG	12
5. FUNKTION DES NOD2-REZEPTORS UND SEINER MAMPS FÜR ZELLULÄRE HOMÖOSTASE	15
6. GENETISCHE UND FUNKTIONELLE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN C57BL/6J UND N.....	19
7. ZIELSETZUNG.....	21
B MATERIAL UND METHODEN	23
1. MATERIAL	23
1.1 LABOR AUSSTATTUNG	23
1.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	24
1.3 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	24
1.4 LÖSUNGEN UND PUFFER.....	25
1.5 ZELLKULTUR-REAGENZIEN UND MEDIEN	25
1.6 KOMMERZIELLE KITS.....	25
1.7 ANTIKÖRPER	26
1.8 VERSUCHSTIERE	26
2. METHODEN.....	27
2.1 MAUSMODELL	27
2.2 CO- UND SINGLE-HOUSING.....	28
2.3 AUFARBEITUNG VON LYMPHKNOTEN UND MILZ.....	29
2.4 CD3/CD28 RESTIMULATION DER T-ZELLEN AUS LYMPHKNOTEN UND MILZ.....	30
2.5 ELISA (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN γ , IGE)	30
2.6 MIKROBIOMANALYSE.....	31
2.7 STATISTISCHE ANALYSE.....	32
C ERGEBNISSE	33
1. VERGLEICH C57BL/6J UND C57BL/6N	33
1.1 TEMPERATURABFALL NACH CHALLENGE.....	33
1.2 SERUM IGE DER SENSIBILISIERTEN MÄUSE	34
1.3 INTERLEUKINSPIEGEL IM ÜBERSTAND DER KULTIVierten T-ZELLEN.....	35
1.3.1 Milz	35
1.3.2 Mesenteriale Lymphknoten.....	36
1.4 MIKROBIOMANALYSE.....	37
1.4.1 alpha-Diversität.....	37
1.4.2 Beta-Diversität.....	38
1.4.3 Phylum Ebene	40

1.4.4 Familien Ebene	42
1.4.5 Genus und Art Ebene	44
1.5 ZUSAMMENFASSUNG C57BL/6J GEGEN C57BL/6N	46
2. VERGLEICH C57BL/6J UND NOD2^{-/-}	48
2.1 TEMPERATURABFALL NACH CHALLENGE	48
2.3 INTERLEUKINSPIEGEL IM ÜBERSTAND DER RESTIMULIERTEN T-ZELLEN	49
2.3.1 Milz	49
2.3.2 mesenteriale Lymphknoten	50
3. VERGLEICH C57BL/6J UND NOD2 ^{-/-} NACH CO-HOUSING	51
3.1 Temperaturabfall nach Challenge	51
3.5 MIKROBIOMANALYSE	53
3.5.1 Alpha-Diversität	53
3.5.2 Beta-Diversität	54
3.5.4 Familien Ebene	58
.....	59
3.5.5 Genus Ebene	60
3.6 ZUSAMMENFASSUNG C57BL/6J GEGEN NOD2 ^{-/-}	61
D DISKUSSION	62
1. VERGLEICH C57BL/6J UND N	63
1.1 Unterschiede des intestinalen Mikrobioms von C57BL/6J und N	65
1.2 Auswirkung der genetischen und mikrobiellen Unterschiede auf Versuchsdesign und-interpretation	67
2. NOD2 ALS KRITISCHER INTESTINALER PRR	68
2.1 Differentielle Rolle von NOD2 in der Orchestrierung der adaptiven Immunantwort	70
2.2 Mikrobiota-Transfer zwischen NOD2 ^{-/-} und C57BL/6J reduziert die Stärke der Anaphylaxie bei NOD2-Knockoutmäusen	73
2.3 Charakterisierung der intestinalen Mikrobiota	75
3. ZUSAMMENFASSUNG	79
LITERATURVERZEICHNIS	82
DANKSAGUNG	92

Abkürzungsverzeichnis

BLG	β-Lactoglobulin
CARD	Caspase activation and recruitment domain
CD	Cluster of differentiation
DC	Dendritic cells
DNFB	Dinitrofluorobenzene
ELISA	Enzyme-linked Immunoabsorbant Assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FAO	Food and Agriculture Organization
FCS	Fetal calf serum
i.p.	intraperitoneal
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKMC	International Knockout Mouse Consortium
IL	Interleukin
ILC	Innate lymphoid cells
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucine-rich repeat
MAMP	Microbial associated molecular patterns
MAPK	Mitogen-activated protein Kinase
MDP	Muramyl Dipeptid
MHC	Major histocompatibility complex
NALP	Pyrin domain containing NLRs
NBD	Nucleotide-binding domain
NF-κB	nuclear factor “kappa-light-chain-enhancer” of activated B-cells
NLR	NOD-like Receptor
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2
OD	Optische Dichte
OTU	Operational taxonomic unit
PAMP	Pathogen-assozierte molekulare Muster
PBS	Phosphate buffered saline
PGN	Peptidoglykan

PRR	Pathogen Recognition Receptors
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene-I-like receptors
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute
SNP	Single nucleotide Polymorphism
SPF	Specific-Pathogen-Free
SV	Structural variants
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TLR	Toll-like-Rezeptor
TMB	3,3',5-tetramethylbenzidine
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin
CXCR1	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 1
FoxP3	Forkhead-Box-Protein 3

A Einleitung

1. Problemstellung

Nahrungsmittelallergien werden immer häufiger und betreffen mittlerweile bis zu 10% der Vorschulkinder in Industrieländern (De Martinis et al., 2020). Die Maximalform der allergischen Reaktion gegen Nahrungsmittel, die Anaphylaxie, endet in 0,65-2% sogar letal (Pouessel et al., 2018).

Aktuell ist ein wichtiger Bestandteil des Krankheitsmanagements die Vermeidung des Allergens, da eine kurative Therapie bislang nicht etabliert ist. Die Allergenkarenz führt zu sozialen Problemen und Einschränkungen der Lebensqualität der betroffenen Kinder und Jugendlichen sowie von deren Eltern (Lebovidge et al., 2009).

Die hohe Prävalenz der Nahrungsmittelallergien im Kindes- und Kleinkindesalter wird durch eine nicht voll ausgebildete Schleimhautbarriere des Darms erklärt, die somit eine erhöhte Durchlässigkeit für Proteinantigene aufweist (Chahine & Bahna, 2010). Dadurch können Antigene leichter bis zu den in der Mukosa liegenden Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen vordringen und eine Immunantwort auslösen (Ruiter & Shreffler, 2012). Dieser Mechanismus alleine erklärt allerdings nicht die Pathophysiologie der Allergieentstehung, da der Kontakt des Immunsystems mit einem Nahrungsmittelantigen physiologischerweise zur Entwicklung von Toleranz gegenüber dem Antigen führt (Weiner et al., 2011).

Es sind höchstwahrscheinlich zusätzliche Signale nötig, um anstatt einer tolerogenen eine inflammatorische Immunantwort zu induzieren. Neben Proteinantigenen überwinden auch mikrobielle Bestandteile (MAMPs) der intestinalen bakteriellen Mikrobiota die unreife Schleimhautbarriere. Die Konsequenzen der Erkennung von MAMPs durch Rezeptoren des angeborenen (innaten) Immunsystems und die dadurch determinierte Qualität der nachfolgenden adaptiven Immunantwort sind im Hinblick auf die Allergieentstehung bislang nur unzureichend verstanden (Ruiter & Shreffler, 2012; Tordesillas et al., 2017).

2. Nahrungsmittelallergien: Generelle Aspekte und Fakten

In den letzten Jahren stieg die globale Prävalenz der Nahrungsmittelallergien stark an. In den Vereinigten Staaten von Amerika beträgt die Prävalenz unter Kindern 6,7% laut einer retrospektiven Kohortenstudie mit 333.200 Kindern (Hill et al., 2016). Die jährlichen Kosten für das US-amerikanische Gesundheitssystem belaufen sich auf ungefähr 24,8 Milliarden US-Dollar (Gupta et al., 2013). Lange Zeit wurde angenommen, dass es sich dabei primär um ein Problem der westlichen Länder handelt, jedoch steigt die Prävalenz global an (Koplin et al., 2015).

Unter dem Begriff Nahrungsmittelallergie versteht man immunvermittelte Überempfindlichkeiten gegen Nahrungsmittelallergene. Diese Definition enthält IgE-vermittelte Sofortreaktionen sowie nicht-IgE-vermittelte Spättypreaktionen (Tordesillas et al., 2017). In der vorliegenden Arbeit werden IgE-vermittelte Nahrungsmittelallergien genauer betrachtet. Coombs und Gell teilten allergische Reaktionen nach Reaktionsmuster und beteiligten Zelltypen ein. IgE-vermittelte Nahrungsmittelallergien entsprechen Typ I dieser Einteilung (Rajan, 2003). Sie bieten ein breites Spektrum von Symptomen, die verschiedene Organsysteme betreffen und von leicht bis lebensgefährlich verlaufen können. Am häufigsten sind kutane oder abdominelle Manifestationen wie Urtikaria, Übelkeit, Erbrechen und Diarrhö (Wang & Sampson, 2011). Die Schwere der allergischen Reaktion vom Typ I wird anhand der klinischen Symptome in Grad I (Hautsymptome und/oder Fieber) bis IV (kardiales und/oder respiratorisches Versagen) eingeteilt (Ring & Messmer, 1977). Die schwerste Verlaufsform einer allergischen Reaktion stellt die Anaphylaxie dar. Diese systemische Reaktion betrifft auch das kardiovaskuläre System und kann bis zum Kreislaufstillstand führen (Simons et al., 2014). Allergien gegen Erdnüsse, Nüsse, Fisch, Krustentiere, Ei, Milch, Weizen, Soja und Samen machen aktuell den Großteil der schweren Nahrungsmittelinduzierten Anaphylaxien aus (Sicherer & Sampson, 2018).

Da es bislang keine kausale Therapie der Nahrungsmittelallergie gibt, stehen Allergenkarrenz sowie symptomatische Therapie der Reaktionen im Vordergrund. Die Vermeidung des Allergens kann im Alltag eine große Herausforderung für die Betroffenen darstellen. Zur symptomatischen Behandlung werden je nach Schweregrad der Reaktion Antihistaminika, Steroide oder Adrenalin eingesetzt (Muraro et al., 2014).

In Anbetracht der steigenden Prävalenz und Kosten durch Nahrungsmittelallergien wären effektive Maßnahmen zu Therapie und Prävention von großem klinischem Wert. Um diese zu

entwickeln, muss ein tieferes Verständnis des zugrundeliegenden Pathomechanismus gewonnen werden.

3. Pathophysiologie der IgE-vermittelten Nahrungsmittelallergie

Die Sensibilisierung gegen Nahrungsmittelallergene kann im Gastrointestinaltrakt, der Mundhöhle, über die Haut und gelegentlich im Respirationstrakt stattfinden (Sampson et al., 2018). Folgend wird die Sensibilisierung im Darm genauer betrachtet. Nach Aufnahme wird der Großteil der Nahrungsmittelproteine durch Verdauungsenzyme in Magen und Darm gespalten. Die verbleibenden Nahrungsmittelproteine und -peptide werden durch Epithelzellen und M-Zellen aus dem Darmlumen in die Mukosa transportiert (Sampson et al., 2018). Sie werden von Dendritischen Zellen (DCs) aufgenommen und prozessiert. Anschließend wandern die DCs zu den T-Zell-Arealen der drainierenden Lymphknoten und interagieren mit naiven T-Zellen durch Präsentation des Antigens auf MHC Klasse II Molekülen (Reboldi et al., 2016). Die Qualität der darauffolgenden adaptiven Immunantwort wird durch Aktivierung verschiedener DC-Subklassen, der Expression kostimulatorischer Moleküle und der Sekretion von Zytokinen bestimmt (Schiavi et al., 2015).

Wenn das Immunsystem mit einem Nahrungsmittelantigen in Kontakt kommt, führt das normalerweise zur Entwicklung einer aktiven immunologischen Toleranz gegenüber dem Antigen. Nach dem aktuellen wissenschaftlichen Stand erfolgt die Toleranzentwicklung in mehreren Schritten. Zunächst wird das Antigen von CD103⁺ DCs der Lamina propria aufgenommen, die nachfolgend in die mesenterialen Lymphknoten migrieren (Schulz et al., 2009). Dort induziert diese DC Subklasse unter Einfluss von Retinsäure und TGF- β die Differenzierung FoxP3⁺ regulatorischer T-Zellen (iT_{reg}). Diese gebildeten FoxP3⁺ iT_{reg}-Zellen wandern zurück in die Lamina propria und expandieren abhängig von der IL-10-Produktion durch CXCR1⁺ Makrophagen (Hadis et al., 2011).

Wenn Toleranz überwunden wird, zeigt sich die Bildung regulatorischer T-Zellen kompromittiert und es werden stattdessen vermehrt Effektor-Zellen gebildet (Schiavi et al., 2015). Abb. 1 zeigt einen Überblick über die zellulären Mechanismen während der Sensibilisierungsphase sowie der Effektorphase einer Nahrungsmittelallergie

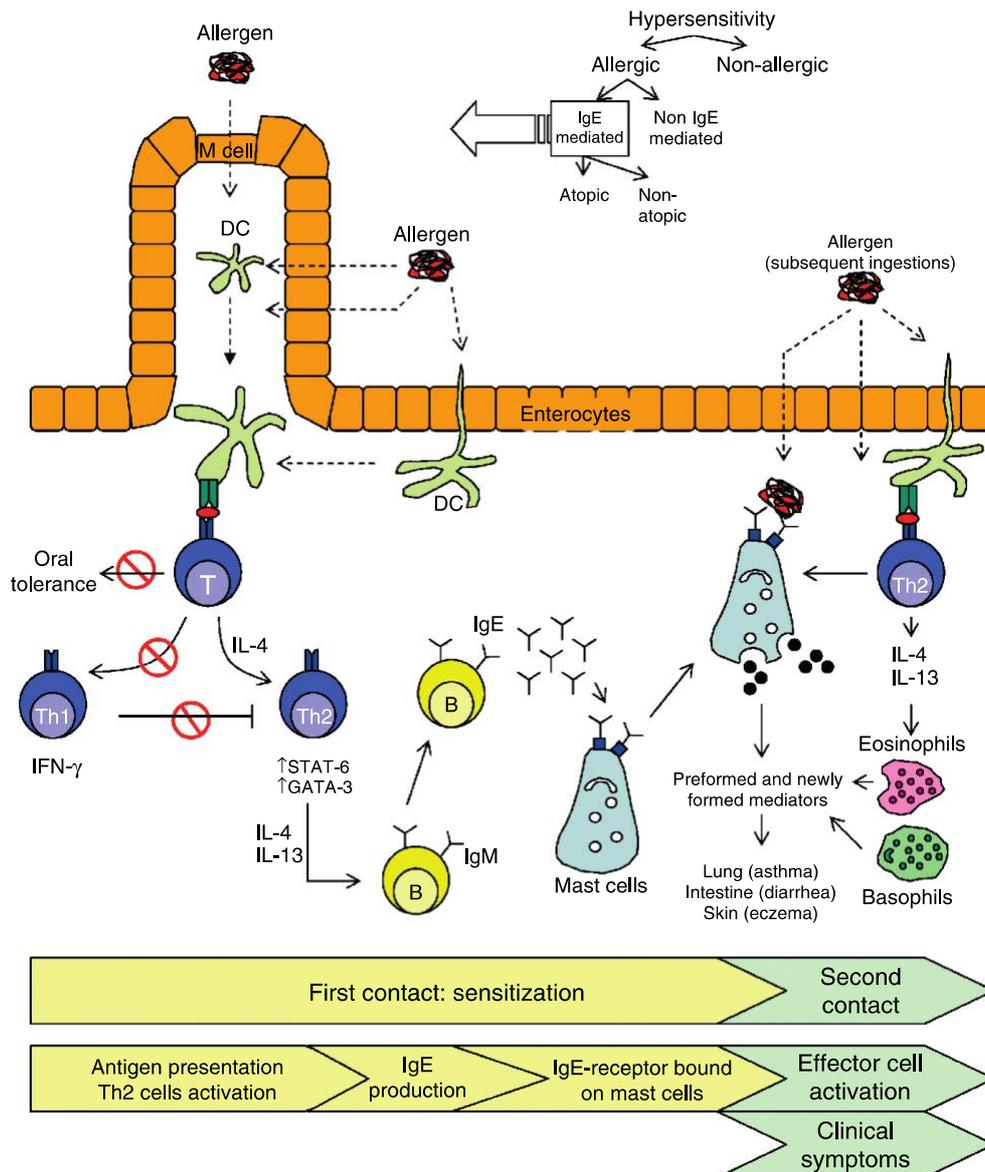


Abb. 1 Zelluläre Mechanismen der Nahrungsmittelallergie. Physiologischerweise führt der Kontakt des Immunsystems mit Nahrungsmittelantigenen zu Toleranz. Im Falle der Sensibilisierung werden durch das Zytokinmilieu in der Mukosa Antigen-spezifische T_H2 -Zellen gebildet, wenn das Antigen den naiven T-Zellen durch DCs präsentiert wird. Diese T_H2 -Zellen produzieren nach Aktivierung T_H2 Zytokine, insbesondere IL-4, die in B-Zellen die IgE-Produktion induzieren. IgE bindet an den FcεR I auf den Effektorzellen der allergischen Reaktion (v.a. Mastzellen). Bei Aufnahme des Antigens kommt es zur Bindung des Antigens an IgE auf Mastzellen und zur Quervernetzung des IgE-FcεR I. Durch dieses Signal werden Mastzellen aktiviert und es kommt zur Degranulation präformierter Mediatoren (v.a. Histamin), die zu klinischen Symptomen führen. Durch wiederholten Allergenkontakt expandiert der Pool der T_H2 mit konsekutiver Veränderung des Zytokinmilieus (Prioult & Nagler-Anderson, 2005).

Gesichert ist, dass IL-4 bei der Entwicklung von T_H2 Zellen aus naiven T-Zellen eine Schlüsselrolle spielt. Es fördert die Expression des Transkriptionsfaktors GATA3, der die Gene von T_H2 Zytokinen (unter anderem IL-4 und IL-13) aktiviert. Welche Zellen zu Beginn der Sensibilisierung IL-4 produzieren, ist noch nicht hinreichend geklärt. Die von T_H2 Zellen ausgeschütteten Zytokine wie IL-4, -5, -13 führen zur Amplifikation der T_H2 Antwort und beeinflussen zudem auch andere Zelltypen. Durch IL-4, IL-9, IL-13 aus T_H2 Zellen werden

beispielweise Mastzellen rekrutiert, und Basophile reifen in Anwesenheit von IL-3 und IL-4 (Holgate & Polosa, 2008).

Ein Schlüsselschritt bei der Entstehung einer allergischen Reaktion ist die Bildung von Allergen-spezifischem IgE. In B-Zellen wird durch zwei Signale der Klassenwechsel zu IgE aktiviert. IL-4 und IL-13 aktivieren die Janus Tyrosinkinasen JAK1 und JAK3. Das führt zur Phosphorylierung des Transkriptionsregulators STAT6. Das zweite Signal ist die co-stimulatorische Interaktion von CD40 Ligand der T-Zelle mit CD40 auf der Oberfläche der B-Zelle. Die B-Zelle wird daraufhin zur Plasmazelle und bildet das Allergen-spezifische-IgE, welches mit dem Fc Fragment an den Fc Epsilon Rezeptor I (FcεRI) auf Mastzellen bindet. Damit ist die Sensibilisierungsphase abgeschlossen (Oettgen & Burton, 2015).

Bei erneutem Kontakt bindet das Allergen direkt an das Allergen-spezifische-IgE auf Mastzellen und führt zu Quervernetzung der IgE-Antikörper. Es kommt dadurch zur Freisetzung verschiedener Mediatoren (vor allem Histamin) aus den aktivierten Mastzellen (Galli et al., 2005). Darauf folgt ein breites Symptomspektrum, das von milderen Symptomen wie Urtikaria oder Diarrhöe bis hin zu schweren Symptomen wie Luftnot reicht. Zu Anaphylaxie kommt es, wenn besonders große Mengen von Mediatoren freigesetzt werden (Sicherer & Sampson, 2009).

Die Mediatoren der Mastzellen erhöhen zudem die Bioverfügbarkeit von Nahrungsmittelproteinen im Darm. Der vermehrte Eintritt von Proteinen führt zu verstärkter Ausschüttung von IL-33, IL-25 und TSLP aus Enterozyten (Sampson et al., 2018). Dieser Mechanismus trägt zur Aufrechterhaltung des T_H2 Ungleichgewichts bei. Nach aktuellem wissenschaftlichem Stand können die Zytokine IL-33, -25 und TSLP zur Induktion einer T_H2 Immunantwort beitragen. Neutralisation von IL-33, -25 oder TSLP während der Sensibilisierungsphase führt bei Mäusen zu Toleranzentwicklung anstelle von Allergieentwicklung. Die Erkenntnisse über IL-33, -25 und TSLP stammen jedoch zum Großteil aus Mausmodellen, und es ist nicht geklärt, wie weit sie auf den Menschen übertragbar sind (Khodoun et al., 2018).

4. Der Einfluss des Darmmikrobioms auf Nahrungsmittelallergieentstehung

Vor dreißig Jahren postulierte die Hygienehypothese einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten allergischer Erkrankungen und der verminderten Exposition mit Mikroorganismen (Strachan, 1989). Die Grundannahme, dass Menschen und ihre kommensale Mikrobiota mit der zunehmend modernisierten Welt interagieren, hat bis heute Bestand (Pfefferle et al., 2021).

Alle Grenzflächenorgane des menschlichen Körpers sind mit komplexen Gemeinschaften von Mikroorganismen besiedelt. Die höchste Dichte findet sich dabei im unteren Gastrointestinaltrakt (Hooper et al., 2012). Im Verlauf des Lebens ist das Darmmikrobiom großen Veränderungen unterworfen. Im Säuglingsalter wird es von Geburtsmodus, Ernährung und Faktoren in der Muttermilch beeinflusst. Die Umstellung auf feste Nahrung führt ebenfalls zu Veränderungen in der Zusammensetzung. Bis zum Alter von drei Jahren stellt sich kein stabiler Zustand ein. Bei Erwachsenen wird das Mikrobiom zwar durch die Ernährung beeinflusst, ist jedoch langfristig stabiler (Kemter & Nagler, 2019).

Das Immunsystem des Darms ist lediglich durch eine Zellschicht von der intestinalen Mikrobiota getrennt und interagiert ständig mit ihr. Dabei muss es für ein mikrobielles Gleichgewicht sorgen und Pathogene abwehren. Beim Gesunden machen symbiotische Bakterien einen großen Anteil der Mikrobiota aus. Sie schützen den Wirt vor Besiedelung mit Pathogenen. Zudem sind sie wichtig für die Integrität der intestinalen Barriere und die Entwicklung, Ausbildung und Regulation des Immunsystems (Lathrop et al., 2011).

Seit der Postulierung der Hygienehypothese spielt das Mikrobiom in der Forschung über die Entstehung von Nahrungsmittelallergien eine wichtige Rolle, insbesondere in jüngerer Zeit. Für die Allergieentstehung sind vor allem die frühen Lebensjahre von Interesse. Die Besiedelung mit Mikroorganismen zu Beginn des Lebens verläuft zeitgleich mit der Entwicklung des intestinalen Immunsystems. Durch dieses enge Zusammenspiel können Veränderungen des Mikrobioms die Entwicklung einer tolerogenen Immunantwort stören (Maynard et al., 2012). Mehrere Studien konnten zeigen, dass eine fäkale Dysbiose bei menschlichen Säuglingen mit Nahrungsmittelallergie assoziiert ist (Rutten et al., 2015). Die Zusammensetzung der fäkalen Mikrobiota von 4-5 Monate alten Kindern mit Kuhmilchallergie unterscheidet sich signifikant von der gesunder Kinder im gleichen Alter (Berni Canani et al., 2016). Im Mausmodell wurden keimfreien Mäusen die fäkalen Bakterien von Kindern mit und ohne Kuhmilchallergie übertragen. Die keimfreien Mäuse entwickeln normalerweise durch

Sensibilisierung eine anaphylaktische Reaktion gegen das Milchprotein β -Lactoglobulin (BLG). Die Kolonisation mit Fäzes gesunder Kinder schützte die Mäuse vor der Entwicklung einer allergischen Reaktion gegen BLG. Im Gegensatz dazu entwickelten die Mäuse, die die Fäzes allergischer Kinder erhielten, eine anaphylaktische Reaktion gegen BLG. Der Effekt ließ sich auf das Butyrat-produzierende Bakterium *Anaerostipes caccae* aus der Familie der *Clostridien* zurückführen. Die Besiedelung keimfreier Mäuse mit *Anaerostipes caccae* erzielte den gleichen Effekt wie die Besiedelung mit Fäzes gesunder Kinder (Feehley et al., 2019).

Neben *Anaerostipes caccae* wurden weitere Bakterien(-familien) identifiziert, die allergieprotektive Eigenschaften besitzen. Es konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass Kolonisation mit einer Mischung verschiedener Vertreter der *Clostridien* zu erhöhtem TGF β Spiegeln und mehr Foxp3(+) T(reg) Zellen mit besserer Funktionalität im Colon führte (Atarashi et al., 2011). Aus humanen Fäzes konnten 17 *Clostridien* identifiziert werden, die die beschriebenen Effekte in Mäusen vermitteln. Orale Aufnahme der 17 *Clostridien* führte in keimfreien Mäusen zu abgeschwächten Verläufen von allergischer Diarrhö und Kolitis im Krankheitsmodell (Atarashi et al., 2013). In murinen Modellen wurde zudem beobachtet, dass Besiedelung mit manchen Vertretern aus der Familie der *Clostridien* durch gesteigerte IL-22 Produktion zu verbesserter intestinaler Barrierefunktion führt (Stefka et al., 2014). Die intestinale Barriere ist ein entscheidender und klinisch relevanter Faktor. Eine Untersuchung an menschlichen Probanden zeigte, dass bei Patienten mit Nahrungsmittelallergie die Barrierefunktion des Darms eingeschränkt ist (Ventura et al., 2006). Bei intakter Barriere kommt es durch Präsentation von DCs zur Entwicklung von Toleranz. Bei defekter Barriere kann das Antigen als intaktes Protein in die systemische Zirkulation eintreten und so eine IgE-Antwort auslösen (Stefka et al., 2014).

Einige Studien weisen zudem auf einen direkten Effekt der Mikrobiota auf das angeborene Immunsystem hin. In einer Studie wurde die Mikrobiota von Kindern aus Finnland (mit hoher Allergieprävalenz) und Russland (niedrige Allergieprävalenz) verglichen. Dabei wurden Unterschiede in der LPS-Expression der vorkommenden Bakterien detektiert. Die Unterschiede in der Aktivierung des angeborenen Immunsystems können für die unterschiedliche Prävalenz der Nahrungsmittelallergie eine Rolle spielen (Vatanen et al., 2016). Der direkte Einfluss von mikrobiellen Bestandteilen auf das angeborene Immunsystem ist jedoch lange noch nicht ausreichend verstanden und bedarf weiterer Forschung.

Zum aktuellen Zeitpunkt ist bekannt, dass Dysbiose im Darm ein wichtiger Faktor bei der Entstehung von Nahrungsmittelallergien ist. Im Gegensatz dazu kann eine eubiotische intestinale Mikrobiota vor Allergieentstehung schützen. Welche Faktoren eine Dysbiose oder Eubiose definieren ist jedoch noch nicht abschließend geklärt. Bisher wird Dysbiose als Veränderung in der Funktion und Zusammensetzung der Mikrobiota von erkrankten Individuen im Vergleich zu Gesunden beschrieben (Levy et al., 2017). In Zukunft muss ein besseres Verständnis darüber gewonnen werden, welche Faktoren die Allergieentstehung fördern und welche sie verhindern. Im nächsten Schritt könnte das Mikrobiom dann ein Therapieziel zur Prävention und Behandlung allergischer Erkrankungen darstellen.

5. Funktion des NOD2-Rezeptors und seiner MAMPs für zelluläre Homöostase

Das angeborene Immunsystem stellt den evolutionsbiologisch ältesten Teil des humanen Immunsystems dar und ermöglicht eine schnell einsetzende Auslösung einer ersten Immunantwort gegenüber Mikroorganismen. Ein zentraler Mechanismus ist dabei die Erkennung von Mikroorganismen durch keimbahnkodierte pattern recognition receptors (dt. Mustererkennungsrezeptoren, PRRs) (Caruso et al., 2014). Es gibt fünf verschiedene Klassen von PRRs, die jeweils spezifische Liganden binden (Kumagai & Akira, 2010). Der Großteil des Wissens über PRRs stammt aus Studien über Toll-like-Rezeptoren (TLRs), die sich entweder auf der Zelloberfläche oder in Endosomen befinden (Uematsu & Akira, 2007). Im Gegensatz dazu sind NOD-like-Rezeptoren (NLRs), die eine weitere Klasse an PRRs darstellen, intrazellulär lokalisiert. Zum aktuellen Zeitpunkt sind 22 humane und 34 murine NLRs beschrieben (Motta et al., 2015).

Das zytosolische Protein NOD2 ist ein gut charakterisierter PRR der NOD-like-Rezeptor (NLR) - Familie und entscheidend für die angeborene Immunantwort gegen bestimmte bakterielle Infektionen (Philpott et al., 2014). Seit der Identifikation 2001 (Ogura, Inohara, et al., 2001) und der Assoziation von bestimmten Mutationen im codierenden Gen mit Morbus Crohn (Hugot et al., 2001; Ogura, Bonen, et al., 2001) wuchs das Interesse an der Rolle von NOD2 in der angeborenen und erworbenen Immunantwort. NOD2-Mutationen sind zudem assoziiert mit signifikant erhöhtem Risiko für Graft-versus-host Disease (Holler et al., 2004) und Blau-Syndrom (Miceli-Richard et al., 2001).

Im Darm wird NOD2 sowohl von hämatopoetischen Zellen (T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, Dendritischen Zellen und Mastzellen) als auch von nicht-hämatopoetischen Zellen (Paneth-Zellen, Stammzellen, Becherzellen und Enterozyten) exprimiert (Al Nabhani et al., 2017).

Das NOD2-Protein weist eine dreigliedrige Struktur auf. Bestehend aus zwei CARDs (caspase activation and recruitment domain), NBD (nucleotide-binding domain), und LRR (leucine-rich repeat), wie in Abb. 2 dargestellt (Lechtenberg et al., 2014).

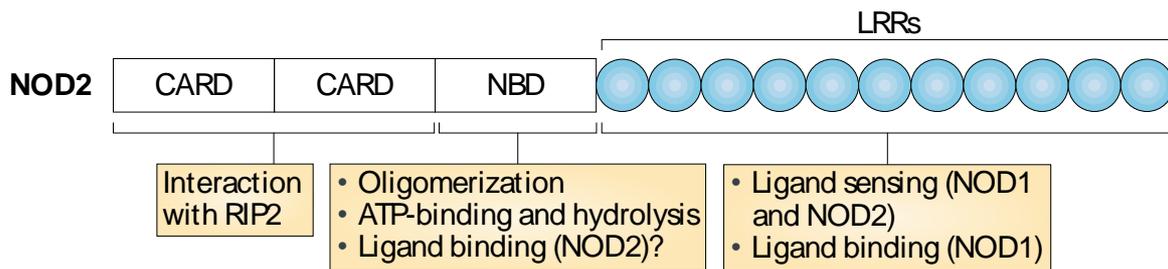


Abb. 2 Dreigliedrige Struktur des NOD2 Rezeptors (Philpott et al., 2014). NOD2 besteht aus einer Tandem CARD Domäne, die mit dem Adapterprotein RIP2 interagiert. Die Tandem CARDS sind gefolgt von der NBD, die eine Schlüsselrolle spielt bei der Oligomerisation des Moleküls und möglicherweise bei der Ligandenbindung spielt. Die Carboxy-terminalen LRRs erkennen den Liganden MDP.

NOD2 erkennt Muramyl Dipeptid (MDP), ein Spaltprodukt aus Peptidoglykan (PGN) der Zellwände Gram-positiver und -negativer Bakterien (Girardin et al., 2003). Die Mechanismen, wie PGN in die Zelle eintritt und NOD2 aktiviert, sind vielfältig und noch nicht abschließend untersucht. Unter anderem wurden Phagozytose des ganzen Bakteriums, Endozytose sowie Aufnahme der PGN Fragmente durch Vesikel der äußeren Membran beschrieben (Chu et al., 2016; Thay et al., 2014). Peptidoglykanfragmente werden zudem durch die Transporter PEPT1 und SLC15A4 in das Zytosol transportiert (Lee et al., 2009; Vavricka et al., 2004). Durch Oligomerisation von NOD2 kommt es zur Aktivierung eines Signalkomplexes genannt Nodosom (Tattoli et al., 2007). Durch Interaktion von NOD2 mit RIP2 und TAK1 wird die Aktivierung des MAPKs- und NF- κ B Signalwegs ausgelöst (Zhong et al., 2013). Über Interaktion mit anderen Partnern wie Caspase-1 und ATG16L1 kommt es zu Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Autophagie (Al Nabhani et al., 2017).

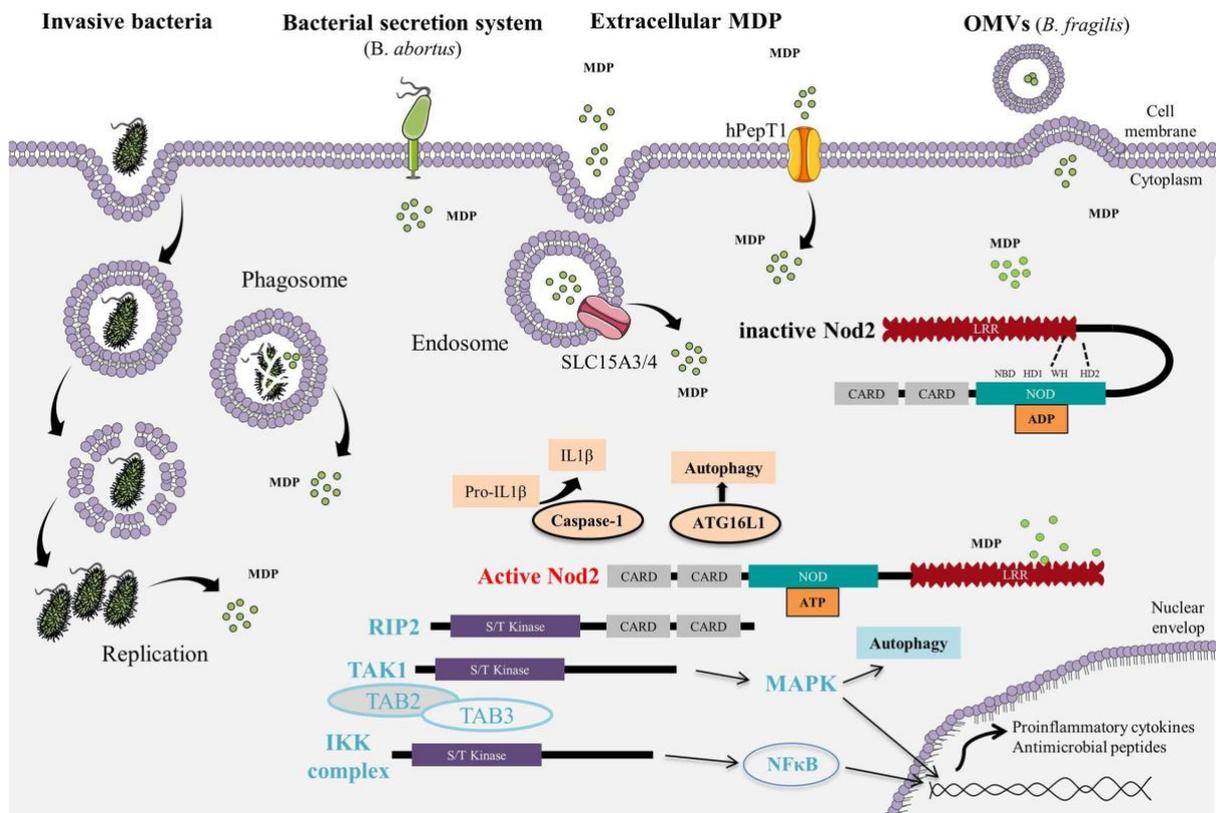


Abb. 3 MDP-Eintritt in die Zelle und NOD2 Aktivierung (Al Nabhani et al., 2017)

In Mausmodellen wurde gezeigt, dass NOD2 eine Schlüsselrolle in der Homöostase der intestinalen Mikrobiota zukommt. Verglichen mit Wildtyp-Mäusen zeigten NOD2-defiziente Mäuse unter anderem ein erhöhtes Vorkommen von *Bacteroidetes* und weniger *Firmicutes* (Ramanan et al., 2014). Veränderungen der Mikrobiota sind stark abhängig von den Haltungsbedingungen und daher ist es schwierig, ein stabiles und vergleichbares Modell zu etablieren. Um den Einfluss der Aufzucht- und Haltungsbedingungen auszuschließen, wurden Experimente mit Embryotransfer von NOD2 defizienten Embryos in Wildtyp Mäuse durchgeführt. NOD2^{-/-} Nachkommen zeigten hier eine intestinale Mikrobiota, die sich signifikant von der ihrer Mütter unterschied, aber gleich waren wie die von NOD2^{-/-} ohne Embryotransfer. Das deutet auf ein stabiles, durch die Mutation verändertes Mikrobiom hin (Al Nabhani et al., 2016). Die genauen Mechanismen, wie NOD2 die Mikrobiota im Darm beeinflusst, sind noch nicht bekannt. Gezeigt werden konnte jedoch, dass das Fehlen von NOD2 zu verminderter Anzahl von Becherzellen führt, die zudem weniger Muzine produzieren. Das führt zu Überproduktion von IFN γ durch intraepitheliale Lymphozyten und Expansion von *Bacteroides vulgatus* (Ramanan et al., 2014). Des Weiteren führt NOD2-Defizienz zu vermehrter Translokation von Gram-positiven und -negativen Bakterien, vor allem in die Peyer Plaques des Ileums (Barreau et al., 2007).

Dass der NOD2 Rezeptor eine Schlüsselrolle bei der Interaktion des Immunsystems mit dem intestinalen Mikrobiom spielt, ist unbestritten. Die genauen Auswirkungen der Dysbiose sind jedoch noch nicht vollständig verstanden und Gegenstand aktueller Forschung.

6. Genetische und funktionelle Unterschiede zwischen C57BL/6J und N

Mausmodelle spielen nach wie vor eine große Rolle in der biomedizinischen Forschung. Die Inzuchtlinie C57BL/6 wird weltweit eingesetzt als Wildtyp-Kontrolle oder genetischer Hintergrund von Knockout-Linien. Die Linie C57BL/6 wurde 1948 im Jackson Laboratory aus der F24 Generation des Elternstamm C57BL etabliert. 1951 wurde ein Teil der Linie als C57BL/6N an das National Institutes of Health (NIH) übertragen. Der verbleibende Teil wurde als C57BL/6J im Jackson Laboratory weitergeführt (ES, 1978; Mekada et al., 2009).

Bei den aktuellen Bemühungen des International Knockout Mouse Consortium (IKMC) und International Mouse Phenotyping Consortium, ein funktionelles Verständnis des Mausgenoms zu erlangen, wird C57BL/6N als Referenz verwendet (Brown & Moore, 2012).

Durch die Verwendung von C57BL/6N als Grundlage der Erforschung des Mausgenoms stellt sich die Frage, welche Unterschiede zu anderen Inzuchtstämmen bestehen, die in der Vergangenheit genetisch untersucht wurden. Vor allem der Vergleich mit C57BL/6J ist dabei von Interesse. Wie C57BL/6N wurde C57BL/6J in der Vergangenheit als genetischer Hintergrund von verschiedensten Referenzpopulationen verwendet (Simon et al., 2013). Auch bei der Erstellung des ersten Mausgenoms wurde C57BL/6J verwendet (Mouse Genome Sequencing et al., 2002). Umfassende Analysen von deep sequencing Daten zeigten 51 codierende Varianten, 34 codierende SNPs (single nucleotide polymorphism), 2 Indels und 15 SVs (structural variants) durch die sich die Linien C57BL/6J und C57BL/6N unterscheiden (Simon et al., 2013). Auch im Phänotyp wurden bereits einige Unterschiede zwischen Mäusen der Linien C57BL/6J und C57BL/6N beschrieben. Dabei sind verschiedenste Bereiche wie beispielsweise das kardiovaskuläre System, der Metabolismus sowie die Sehkraft, betroffen. Auch in der Immunantwort wurden bereits Unterschiede beschrieben. Bei der durch Dinitrofluorobenzene (DNFB) induzierten Kontakthypersensitivität wiesen C57BL/6J Mäuse eine signifikant stärkere Reaktion (Ohrenschwellung) auf als Tiere der Linie C57BL/6N. Dies zeigte sich auch auf der zellulären Ebene mit höheren Spiegeln IFN γ -positiver NK-Zellen der Milz bei C57BL/6J im Vergleich zu C57BL/6N (Simon et al., 2013). 1959 setzten Russell und Burch mit ihrer 3 R (reduction, replacement, refinement) einen ethischen Standard für Tierversuche. Forscher müssen die Anzahl verwendeter Versuchstiere minimieren und daher unnötige Duplizierung eines Experiments vermeiden. Das impliziert die Notwendigkeit kontrollierter und standardisierter Bedingungen, um die Reproduzierbarkeit von Experimenten aus verschiedenen Maushaltungen zu gewährleisten. Der wissenschaftliche

Wert experimenteller Ergebnisse, die nicht reproduzierbar sind, ist fragwürdig (Laukens et al., 2016).

Trotz der bekannten Unterschiede wird in einigen Publikationen nach wie vor nicht genau differenziert und die Linie lediglich als C57BL/6 beschrieben (Fontaine & Davis, 2016). Dabei ist die Auswahl der Wildtyp-Kontrollgruppe anhand des genetischen Hintergrunds der genveränderten Linie essenziell, um eine maximale Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Neben den genetischen Unterschieden wurde gezeigt, dass die Darmmikrobiota je nach Herkunft der verwendeten Tiere variieren kann. C57BL/6 von verschiedenen Händlern zeigen signifikante Unterschiede in der Diversität und dem Vorkommen von spezifischen Bakterienfamilien im Darm. Daraus resultieren Unterschiede in der adaptiven Immunantwort (Sadler et al., 2017).

Die Verwendung der beiden Substämme C57BL/6J und C57BL/6N in vielen Forschungsfeldern unterstreicht die Notwendigkeit, das genetische und phänotypische Verhältnis der beiden Substämme besser zu verstehen. Zudem muss beim Verwenden von genetisch veränderten Linien die Auswahl der Wildtyp-Kontrollgruppen entsprechend dem genetischen Hintergrund der Linie erfolgen. Aufgrund der potenziellen funktionellen Unterschiede ist die Vergleichbarkeit ansonsten nicht gegeben und kann zu Fehlinterpretation führen. Bei Studien des Mikrobioms ist zudem besondere Sorgfalt geboten, da die Herkunft der Versuchstiere und die Haltungsbedingungen das Mikrobiom beeinflusst.

7. Zielsetzung

Wie in der Einleitung beschrieben, ist die physiologische Reaktion des Immunsystems nach Kontakt mit einem Nahrungsmittelantigen die Entwicklung von Toleranz. Für die Entwicklung einer allergischen Reaktion sind zusätzliche Signale nötig, die in ihrer Gesamtheit noch nicht ausreichend verstanden wurden und deswegen Gegenstand aktueller Forschung sind.

In dieser Arbeit wird der Einfluss des intestinalen Mikrobioms auf die intestinale Immunantwort und die Stärke der systemischen anaphylaktischen Reaktion in einem Nahrungsmittelallergiemodell untersucht. Es wurde die klinische Reaktion sowie T-Zell-Antwort untersucht, um ein umfangreiches Bild von der induzierten Immunantwort zu erhalten. Zudem wurde das intestinale Mikrobiom mittels 16s rRNA Sequencing analysiert.

In den durchgeführten Versuchen wurden zunächst die Substämme C57BL/6J und C57BL/6N miteinander verglichen. Sie werden in weiten Teilen der Forschung verwendet und dabei häufig gleichgesetzt, obwohl genetische und funktionelle Unterschiede beschrieben wurden. Zudem ist bekannt, dass es zwischen Tieren von verschiedenen Händlern signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung der Darmmikrobiota gibt. Ziel war es deshalb herauszufinden, ob nach Vereinheitlichung von extrinsischen Faktoren (Händler, Haltungsort- und bedingungen, Futter etc.) weiterhin Unterschiede im intestinalen Mikrobiom von C57BL/6J und N bestehen, die dann am ehesten auf intrinsische (d.h. genetische) Faktoren zurückzuführen sind. Um eventuell resultierende Unterschiede in der T_H2 -Immunität zu untersuchen, wurden C57BL/6J und N im beschriebenen Nahrungsmittelallergiemodell untersucht. Darüber hinaus sollten so weitere Erkenntnisse über funktionelle Unterschiede zwischen C57BL/6J und N gewonnen werden, die für deren Verwendung in der Allergieforschung wichtig sein könnten.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden wie oben beschrieben C57BL/6J mit $NOD2^{-/-}$ Mäusen verglichen. Es ist bekannt, dass $NOD2^{-/-}$ Mäuse eine intestinale Dysbiose aufweisen und zudem veränderte Immunantworten zeigen. Der Einfluss einer intestinalen Dysbiose und Veränderungen im $NOD2$ -Signalling ist für Morbus Crohn detailliert herausgearbeitet worden. Analoge Analysen des Zusammenspiels dieser Faktoren im Kontext von Nahrungsmittelallergien wurden bislang nicht durchgeführt.

Anschließend wurde ein Co-Housing von $NOD2^{-/-}$ und C57BL/6J durchgeführt, um die dysbiotische Mikrobiota in $NOD2^{-/-}$ zu modulieren. Anschließend wurde der Einfluss des veränderten Mikrobioms auf die Stärke der Anaphylaxie gemessen. Damit sollte der Einfluss

der mikrobiellen Dysbiose auf die allergische Reaktion bestimmt werden. Um die Funktionalität der eu- bzw. dysbiotischen Mikrobiota weiter herauszuarbeiten, wurden NOD2^{-/-} und C57BL/6J Mäuse zusammen gehalten (sog. „Co-Housing“). Die durch die Ingestion von Fäzes (Koprophagie) des jeweils anderen Mausstammes resultierenden Veränderungen der intestinalen Mikrobiota wurden mittels 16 rRNA Sequencing analysiert. Die funktionelle Relevanz im Hinblick auf die Anaphylaxiestärke wurde wie zuvor im beschriebenen Nahrungsmittelallergiemodell analysiert.

B Material und Methoden

1. Material

1.1 Laborausstattung

Gerät	Hersteller
Epoch Elisa Reader	BioTek
Pipetten	Eppendorf
Tischzentrifuge	Thermo Scientific
Kühlschrank 4°C	Siemens
Vortexer	Heidolph
Eismaschine	Ziegra
Sterilbank	Thermo Scientific
Zählkammer	Neubauer
Inkubator	Thermo Scientific
Mikroskop	Zeiss
Zentrifuge	Thermo Scientific
Gefrierschrank -20°C	Thermo Scientific
Gefrierschrank -80°C	Thermo Scientific
Durchflusszytometer FACSCanto	BD
Pipettierhilfe	Integra Bioscience, Brand
Gavagiernadel, gebogen, 22 Gauge	Kent Scientific
Multipette	Eppendorf

1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Reaktionsgefäß 2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäß 15ml, 50ml	Falcon
Pipettenspitzen	Biozym
Parafilm	Bemis
Zellkultur Platten 96 Well, U-shaped	Nunc
Elisa Platten 96 Well	Thermo Scientific
FACS-Röhrchen	Sarstedt
Handschuhe	Ansell
Filter 40 µm	Greiner bio-one
Pipetten, serologisch 2 ml, 10 ml, 25ml	Greiner bio-one
Spritzen 1 ml	Braun
Einmal-Injektions-Kanülen Gr. 14, 3	Braun
Multipette Aufsatz	Eppendorf

1.3 Chemikalien und Reagenzien

PBS 10x	Sigma
PBS 1x	Biochrom
FCS	Thermo Scientific
Schwefelsäure	Merck
Natriumcarbonatpuffer	
Natriumphosphatpuffer	
Tween 20	Sigma-Aldrich
Aqua	Braun
Trypanblau	Thermo Scientific

1.4 Lösungen und Puffer

ACK-Lyse-Puffer	ThermoFischer
TMB	BD Bioscience
OVA Albumin	endofit
Cholera Toxin	Merck

1.5 Zellkultur-Reagenzien und Medien

DMEM	Biochrom
Sodium Pyruvat	Biochrom
HEPES-Puffer	Biochrom
MEM-Aminosäuren	Gibco
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
Glutamin	Biochrom

1.6 Kommerzielle Kits

Kit	Lot Nr.	Hersteller
IL-4 Elisa murin	7241647EU	BD Bioscience
IL-5 Elisa murin	2345636	BD Bioscience
IL-10 Elisa murin	9164829	BD Bioscience
IL-13 Elisa murin		Thermo Fischer
IFN γ Elisa murin	74192711EU	BD Bioscience
IgE Elisa murin	8108635EU, 7251534EU	BD Bioscience
Fix/Perm		eBioscience
Zymo Biomics		Zymo Research Corp.
Maus T-Zell-Aktivator-Beads CD3/CD28	00741361	Thermo Scientific

1.7 Antikörper

Antikörper	Fluorochrom	Klon	Verdünnung	Hersteller
Anti-CD-3	-	145-2C11	1:200	Biolegend
Anti-CD-28	-	37.51	1:25	Biolegend
Anti-IL-4	APC	11B11	1:100	BD Bioscience
Anti-IL-13	PE	eBio 13 A	1:100	eBioscience
Anti-CD-3	BV 421	145-2C11	1:250	Biolegend
Anti-CD-4	PE Cy7	GK1.5	1:250	BD Bioscience
Anti- IFN γ	FITC	XMG1.2	1:100	BD Bioscience

1.8 Versuchstiere

Mauslinie

Händler

C57BL/6J

Jackson Laboratory

Die Mauslinie C57BL/6 wurde 1921 von Dr. CC Little durch Kreuzung von 57 weiblichen und 52 männlichen Tieren aus der Zucht von Abbie Lathrop geschaffen. Der Substamm J verblieb bei Jackson Laboratory.

C57BL/6N

Jackson Laboratory

Der N- Substamm wurde 1951 von C57BL/6J getrennt und an das NIH übergeben. Umfassende Analysen von deep sequencing Daten zeigten 51 codierende Varianten, 34 codierende SNPs (single nucleotide polymorphism), 2 Indels und 15 SVs (structural variants) durch die sich J und N unterscheiden.

NOD2^{-/-}

Jackson Laboratory

Die NOD2-Knockout-Linie wurde von Richard A. Flavell entwickelt. Dabei wurde Exon 3 des NOD2-codierenden Gens durch einen Zielvektor ersetzt und das Konstrukt in Stammzellen elektroporiert. Die modifizierten Stammzellen wurden in C57BL/6 Blastozysten eingebracht und von C57BL/6 Weibchen ausgetragen. Die resultierenden Heterozygoten wurden laut Entwickler für 6 Generationen auf C57BL/6 zurückgekreuzt.

Eine von Jackson Laboratory durchgeführte Analyse von 32 SNPs zur Evaluation des genetischen Hintergrundes ergab einen gemischten genetischen Hintergrund aus C57BL/6J und N.

2. Methoden

2.1 Mausmodell

Zur Untersuchung des Einflusses des Darmmikrobioms auf den Schweregrad einer anaphylaktischen Reaktion im Rahmen einer Nahrungsmittelallergie wurde ein in der Arbeitsgruppe etabliertes Mausmodell verwendet. Die Mäuse waren zu Versuchsbeginn 6-10 Wochen alt, und es wurden ausschließlich weibliche Tiere verwendet. Sie wurden in einer SPF-Tierhaltung mit Tag-Nacht-Rhythmus gehalten und hatten ständigen Zugang zu Futter und Wasser. Alle Käfige befanden sich stets im selben Isolator, um den Einfluss potenzieller Mikrobiomunterschiede zwischen den Isolatoren auszuschließen. Alle Experimente erfolgten nach Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern.

Die Mäuse wurden durch orale Gavage mit dem Modellallergen Ovalbumin (OVA) sowie Cholera Toxin sensibilisiert, um eine möglichst konstante gastrointestinale Exposition zu gewährleisten. Cholera Toxin wirkt als T_H2 -Adjuvans und induziert zudem eine intestinale Barrierestörung.

Die Mäuse wurden über drei Wochen zweimal wöchentlich an aufeinanderfolgenden Tagen mit 50 μ g OVA und 10 μ g Cholera Toxin (CT) in 200 μ l PBS sensibilisiert (Abb. 4).

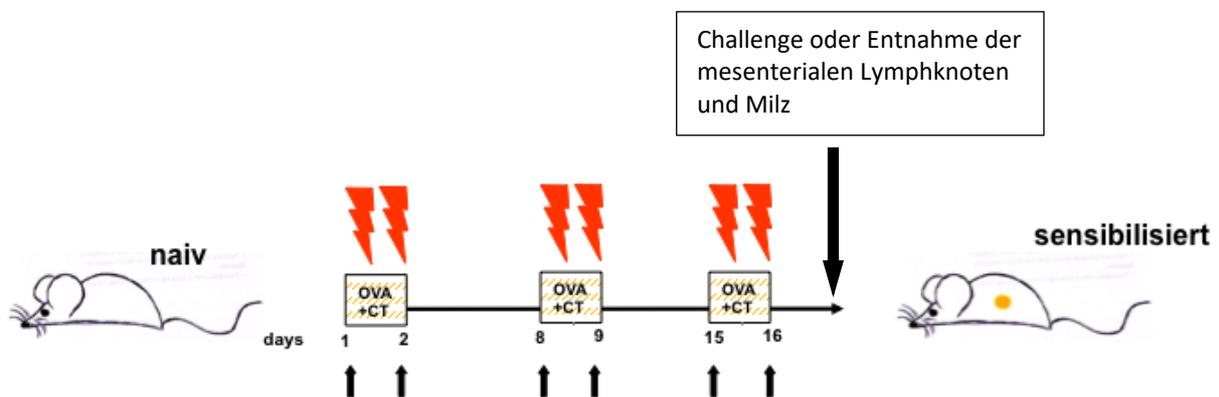


Abb. 4 Sensibilisierungsschema

Sieben Tage nach der letzten Sensibilisierung wurden zur Auslösung der Anaphylaxie 250 μ g OVA in 200 μ l PBS gelöst und intraperitoneal appliziert und der Abfall der Körpertemperatur alle sieben Minuten für 90 bis 120 min rektal gemessen.

Je nach Fragestellung wurden die Mäuse entweder direkt nach der anaphylaktischen Reaktion oder fünf Tage nach der letzten Sensibilisierung nach den Vorgaben der geltenden Tierschutzbestimmungen getötet und Blut, Lymphknoten, Milz sowie Kot (getrennt nach Ileum und Kolon) entnommen.

2.2 Co- und Single-Housing

Vergleich C57BL/6J und C57BL/6N

Zunächst wurden jeweils 12 Tiere der Linien C57BL/6J und C57BL/6N verglichen. Es wurden zwei Gruppen mit jeweils 6 Mäusen gebildet, um zwei primäre Endpunkte zu untersuchen (s. Abb. 5) und so ein umfassendes Bild der adaptiven Immunantwort zu gewinnen. Ein primärer Endpunkt war der Temperaturabfall nach Auslösen der anaphylaktischen Reaktion wie unter 2.1.3 beschrieben. Der zweite primäre Endpunkt war die Messung der Zytokine im Überstand der restimulierten T-Zellen. Nach abgelaufener anaphylaktischer Reaktion können die T-Zellen durch selbst-induzierten Zelltod nicht mehr verwertet werden. Aus diesem Grund wurden sechs Mäuse beider Gruppen nach Durchlaufen der Sensibilisierungsphase ohne Auslösen der Anaphylaxie getötet und die lymphatischen Organe wie unter 2.2 beschrieben entnommen und aufgearbeitet. Bei allen sensibilisierten Tieren wurden Serum- und Kotproben konserviert.

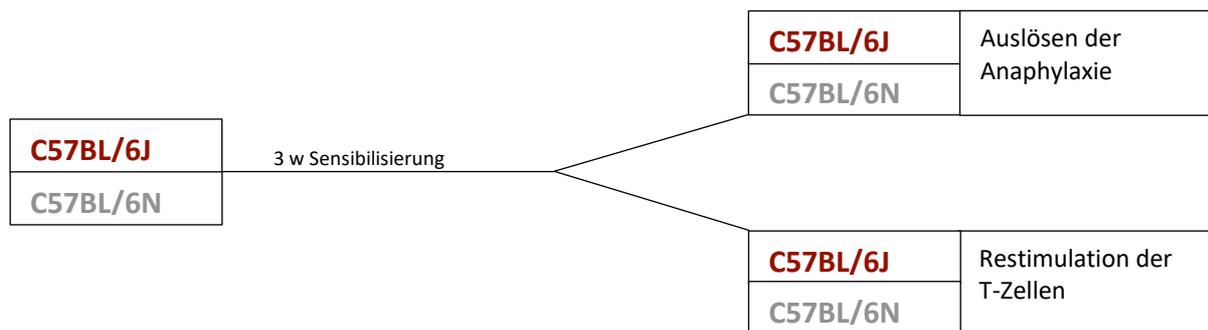


Abb. 5 Versuchsaufbau Vergleich C57BL/6J und C57BL/6N

Vergleich C57BL/6J und NOD2^{-/-}

Um die Unterschiede zwischen Knockout- und Wildtypmäusen zu untersuchen, wurde der gleiche Versuchsaufbau angewendet wie beim Vergleich von C57BL/6J und C57BL/6N. Zudem wurden T-Zellen nach Restimulation mittels FACS untersucht (s. 2.4).

Co-Housing Experiment

Im letzten Schritt wurde die Auswirkung von Co-Housing auf die Stärke der Anaphylaxie untersucht. Vier Wochen vor Beginn der Sensibilisierung wurden jeweils 3 Tiere der Linie C57BL/6J und NOD2^{-/-} zusammen in einem Käfig gehalten. Es wurden mit insgesamt 6 Mäusen der Gruppe C57BL/6J und 6 Mäusen der Gruppe NOD2^{-/-} Co-Housing durchgeführt. Durch Koprophagie gleichen sich die Mikrobiota der Tiere in einem Käfig an. Während der Sensibilisierungsphase wurde das Co-Housing aufrechterhalten. Sieben Tage nach der letzten Sensibilisierung wurde die Anaphylaxie wie unter 2.1.3 beschrieben ausgelöst. Als Vergleichsgruppen wurden jeweils 6 C57BL/6J und NOD2^{-/-} nach Linie getrennt, im gleichen Zeitraum im selben Isolator gehalten.

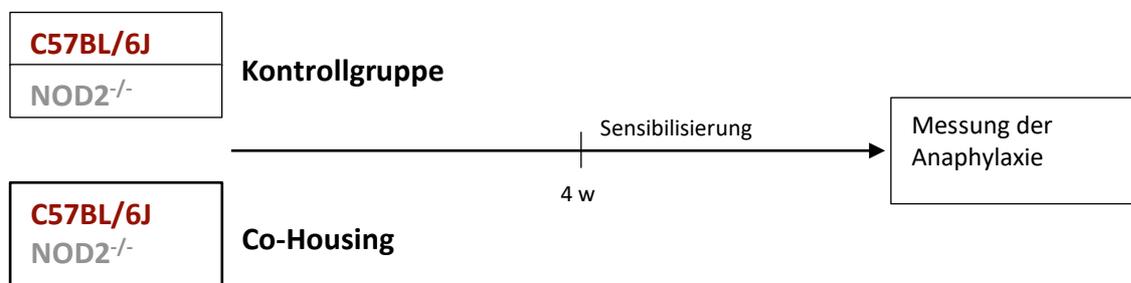


Abb. 6 Aufbau des Co-Housing Experiments

2.3 Aufarbeitung von Lymphknoten und Milz

Die sensibilisierten Mäuse wurden fünf Tage nach der letzten Sensibilisierung ohne Auslösen einer anaphylaktischen Reaktion getötet. Das Blut wurde entnommen, 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert und das Serum eingefroren. Unter der Sterilbank wurden mesenteriale Lymphknoten und Milz entnommen und bis zur Weiterverarbeitung in PBS auf Eis gelagert. Des Weiteren wurde Colon- und Ileuminhalt in flüssigem Stickstoff konserviert. Die entnommenen Lymphknoten und Milzen wurden mit einem Spritzenstempel und einem Filter unter der Zugabe von T-Zell-Medium homogenisiert. Anschließend wurden die Zellsuspension 5 min bei 1500 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert und die Zellen in T-Zell-Medium aufgenommen. Zur Lyse der Erythrozyten wurden die Milzzellen mit 1 ml ACK-Lysepuffer pro Milz versetzt und gevortext. Nach 2-5 min bei Raumtemperatur wurde die Zellsuspension 5 min bei 1500 rpm und 4° C zentrifugiert. Falls das Zellpellet noch rot gefärbt war, wurde der Lysevorgang wiederholt. Ansonsten wurde das Pellet zweimal mit Medium gewaschen. Milz- und Lymphknotenzellen wurden gezählt und auf $2,5 \times 10^6$ Zellen pro Milliliter eingestellt.

2.4 CD3/CD28 Restimulation der T-Zellen aus Lymphknoten und Milz

Anti-CD3-Antikörper der Konzentration 1 mg/ml wurde 1:200 mit sterilem PBS verdünnt. Von dieser Antikörperlösung wurden 50 µl pro Well auf zwei 96 Well Platten ausgelegt und zwei Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Platten steril ausgeklopft und unter der Sterilbank mit PBS gewaschen. Zu den ausgelegten T-Zellen (5×10^5 Zellen pro Well) wurden 10 µl einer Anti-CD-28-Lösung gegeben. Hierfür wurde Anti-CD28-Antikörper der Konzentration 1 mg/ml 1:25 mit T-Zell-Medium verdünnt. Die Platten wurden 72 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und danach 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und eingefroren.

2.5 ELISA (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN γ , IgE)

Die Zytokine wurden mittels kommerziell erhältlichen ELISA Kits für IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN γ und IgE quantifiziert. Nachfolgend wird das Prinzip des Sandwich-ELISA kurz erklärt.

Ein capture antibody wird an eine Mikrotitrationsplatte gebunden. Nach Zugabe der Probe bindet das zu messende Zytokin an diesen Antikörper. Dann wird der detection antibody hinzugegeben, der ebenfalls das Zytokin bindet und einen Farbnachweis ermöglicht. Anhand der Farbreaktion kann die Konzentration des untersuchten Zytokins durch Absorptionsmessung berechnet werden.

Bei der Durchführung der Experimente wurden die Protokolle der Hersteller befolgt. Die Antikörper wurden in Natriumphosphatpuffer gelöst und als Stopppuffer wurde Essigsäure verwendet. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Software „Gene 5“ und „Microsoft Excel“.

2.6 Mikrobiomanalyse

Es wurde Ileum- und Coloninhalt durch flüssigen Stickstoff schockgefroren und die Proben bei -20°C gelagert. Die Extraktion der mikrobiellen DNA und die Präparation der Sequenzierbibliotheken, sowie die bioinformatische Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Y. Amar durchgeführt. Für die DNA-Präparation wurde das ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit (Zymo Research, Freiburg, Germany) wie vom Hersteller empfohlen verwendet.

Herstellung der 16S Sequenzierbibliothek

Aus der gewonnenen DNA wurde die V3-V4 Region des 16S rRNA Gens amplifiziert. Dabei wurden folgende Primer verwendet: S-D-Bact-0341-b-S-17 TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG (Vorwärtsprimer) und S-D-Bact-0785-a-A-21 GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C (Rückwärtsprimer) (Klindworth et al., 2013). Zu je 5 μl extrahierter Proben-DNA wurden 12,5 μl NEB Next High Fidelity Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, MA), je 0,5 μl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (10 pmol/ μl) und 6,5 μl DEPC-Wasser hinzugefügt. Das PCR Programm für die Vervielfältigung der V3-V4 Region war: 5 min bei 98°C , gefolgt von 25 Amplifikationszyklen (10 s bei 98°C , 30 s bei 60°C , 30 s bei 72°C) und schließlich 5 min bei 72°C . Eine zweite PCR wurde zur Indizierung mit den Illumina-Adaptoren des Nextera XT Index Kits v2 Set B (Illumina, San Diego, CA) durchgeführt. 1 μl der aufgereinigten V3-V4 Amplikons (ca. 10 ng) wurde mit je 2,5 μl der beiden Illumina-Index Primer, 12,5 μl des Next High Fidelity Master Mix und 6,5 μl DEPC-Wasser gemischt. Die PCR-Einstellungen waren: 30 s bei 98°C , gefolgt von 8 Amplifikationszyklen (10 s bei 98°C , 30 s bei 55°C , 30 s bei 72°C) und einer finalen Elongation bei 72°C für 5 min. Die indizierten PCR-Produkte wurden mit Ampure XP Beads (Beckman Coulter, Kalifornien, USA) gereinigt und die DNA-Konzentration wurde mit dem QuantiFluor dsDNA System unter Verwendung eines Quantus Fluorometers (Promega Fitchburg, WI) gemessen. Die Sequenzierbibliothek wurde aus 4 nmol jeder gereinigten Probe hergestellt.

Die Sequenzierung erfolgte durch die Research Unit Comparative Microbiome Analysis am Helmholtz Zentrum München. auf einer Illumina MiSeq-Plattform mit einer PE300 v3-Kartusche.

Auswertung der Sequenzierdaten

Die Rohdaten (16S rRNA-Gen-Amplikon-Reads) wurden nach der UPARSE-Methode (Edgar, 2013) verarbeitet, die in der Online-Plattform IMNGS (Lagkourdos et al., 2016) implementiert ist. Dabei werden Sequenzen der bei der Erstellung der Sequenzierbibliotheken verwendeten Primer entfernt und Sequenzen, die kürzer als 200 bp sind, verworfen. Cluster wurden *de-novo* bei einer Sequenzübereinstimmung von mindestens 97 % gebildet und die resultierenden OTUs wurden mit dem RDB-Klassifikator (Wang et al., 2007) taxonomisch eingeordnet. Die nachgeschaltete Analyse der OTU-Tabellen wurde mit den in der Rhea-Pipeline verfügbaren R-Skripten durchgeführt (Lagkourdos et al., 2017). Statistische Vergleiche wurden mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test durchgeführt, gefolgt von der Benjamini-Hochberg-Post-hoc-Prozedur für multiples Testen.

2.7 statistische Analyse

Zur statistischen Analyse die nicht die Mikrobiomanalyse betrafen wurde „Graph Pad Prism“ und „Microsoft Excel“ verwendet. Zum Vergleich von zwei Gruppen wurde der P-Wert durch einen zweiseitigen t-Test berechnet mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

C Ergebnisse

1. Vergleich C57BL/6J und C57BL/6N

1.1 Temperaturabfall nach Challenge

Zur klinischen Messung der Stärke der allergischen Reaktion wurde eine anaphylaktische Reaktion ausgelöst und der Temperaturabfall gemessen.

Der Vergleich des Temperaturabfalls nach Challenge zeigte über den gesamten gemessenen Zeitraum keine signifikanten Unterschiede zwischen C57BL/6J und C57BL/6N. Dieses Ergebnis zeigte sich in drei unabhängigen Experimenten.

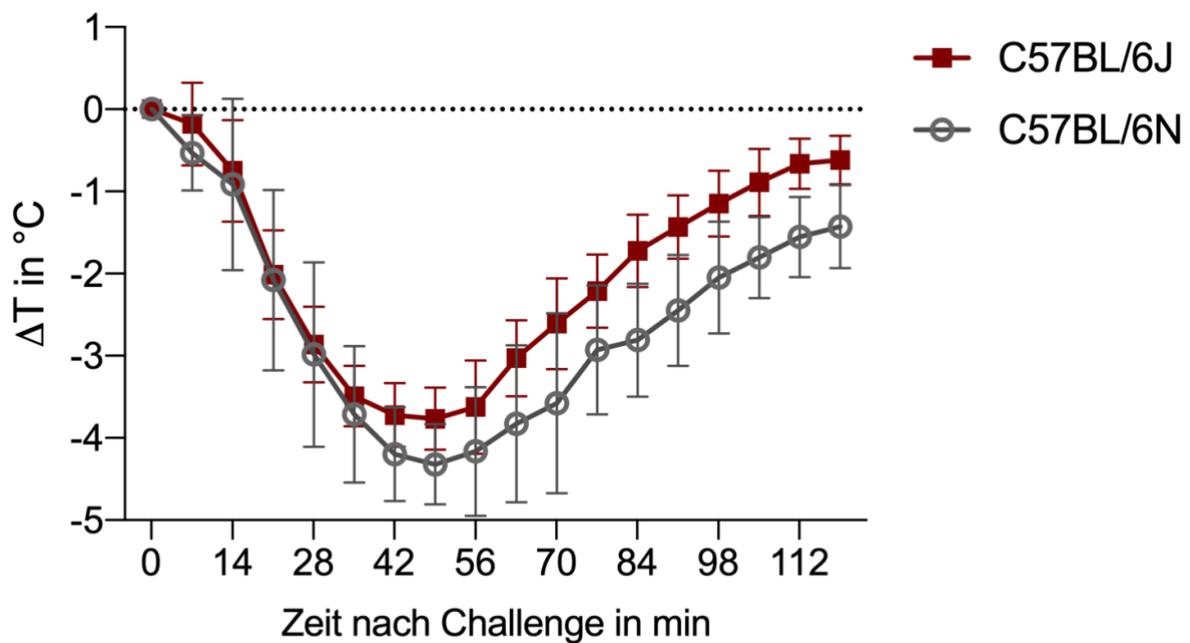


Abb. 7 rektal gemessener Temperaturabfall nach Challenge
Kein signifikanter Unterschied zwischen C57BL/6J und N
n=6 pro Gruppe
1 von 3 unabhängigen Experimenten

1.2 Serum IgE der sensibilisierten Mäuse

Als weiteres Maß für die Stärke der Sensibilisierung wurde der Gesamt-IgE-Spiegel mittels ELISA bestimmt. Die IgE-Spiegel von C57BL/6J und C57BL/6N nach Sensibilisierung waren nicht signifikant unterschiedlich.

Auch bei unbehandelten Mäusen unterschieden sich die IgE-Spiegel nicht zwischen C57BL/6J und C57BL/6N. Nach Sensibilisierung waren die IgE-Spiegel auf einem sehr viel höheren Niveau als bei unbehandelten Tieren.

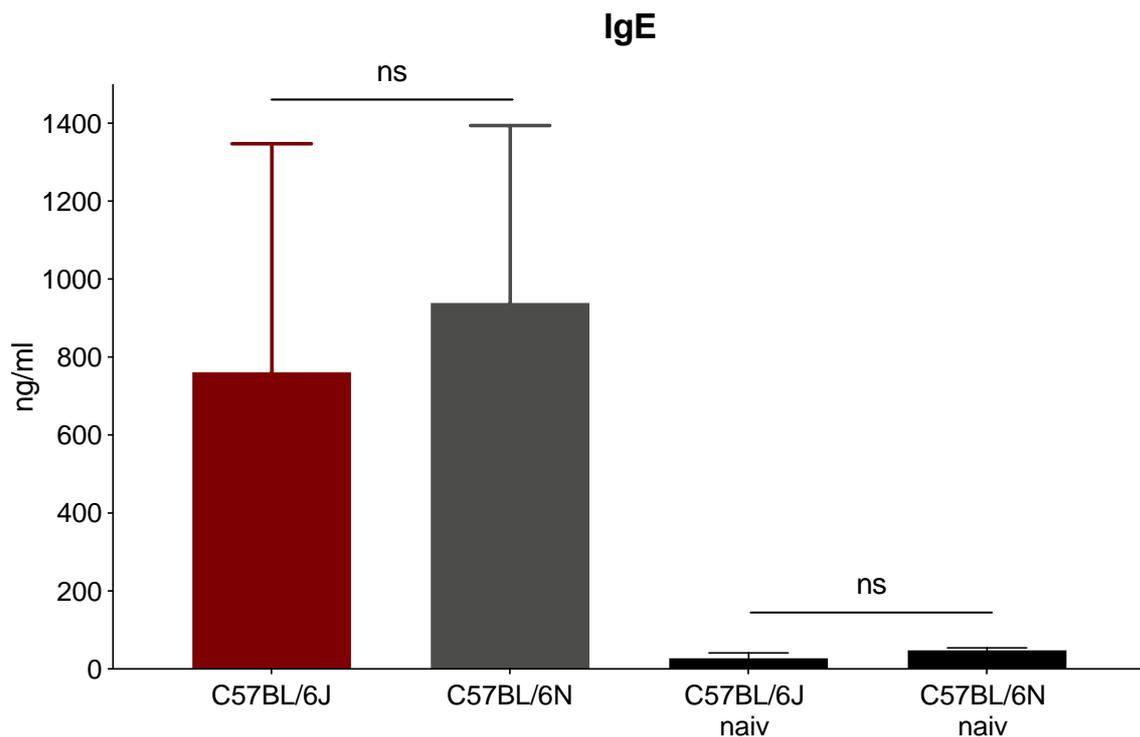


Abb. 8 Vergleich der IgE-Spiegel im Serum sensibilisierter Mäuse, Kontrollgruppen mit nicht sensibilisierten Tieren (naiv)

n=6 in Gruppe J, n=4 in Gruppe N, n=3 jeweils in beiden Kontrollgruppen

ns: nicht signifikant, p-Wert 0,62 nach Sensibilisierung, p-Wert 0,075 bei den naiven Kontrollgruppen

1 von 3 unabhängigen Experimenten

1.3 Interleukinspiegel im Überstand der kultivierten T-Zellen

1.3.1 Milz

Zur Analyse der systemischen Immunantwort wurde das Zytokinprofil der restimulierten T-Zellen der Milz untersucht. Um ein möglichst umfassendes Bild zu erhalten, wurden sowohl Th₁- als auch Th₂-Zytokine untersucht. Dafür wurden im Überstand der restimulierten T-Zellen aus der Milz die Konzentration von Interleukin -4, -5, -10, -13 und IFN γ mittels ELISA gemessen.

Es zeigten sich, bis auf IL-13, keine signifikanten Unterschiede in den untersuchten Zytokinspiegeln zwischen C57BL/6J und C57BL/6N

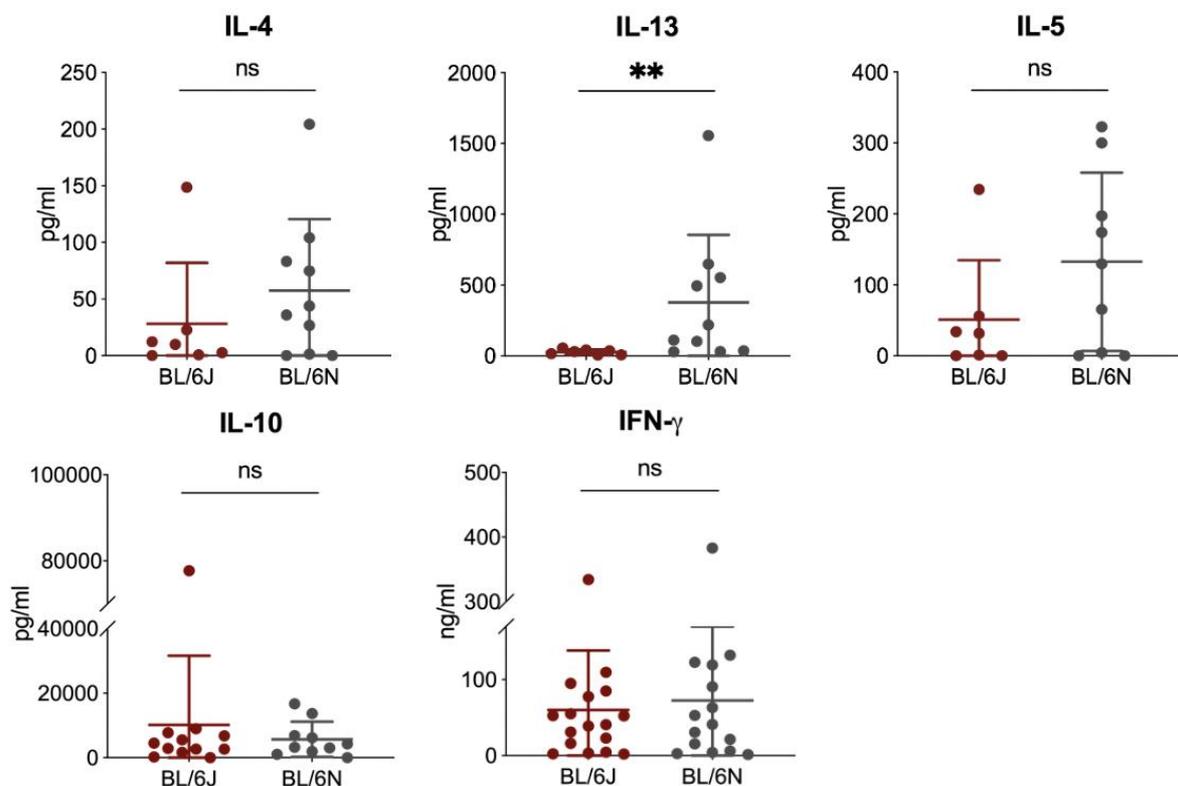


Abb. 9 Zytokinspiegel im Überstand restimulierter T-Zellen aus der Milz
Daten aus drei unabhängigen Experimenten
n.s.: nicht signifikant, J: n=11, N: n=10, **p<0,01,

1.3.2 Mesenteriale Lymphknoten

Neben der systemischen Immunantwort in der Milz wurde auch das Zytokinprofil der lokoregionären Lymphknoten untersucht. Es wurde analog zu den Zellen aus der Milz die Konzentration von Interleukin -4,-5,-10,-13 und IFN γ im Überstand der restimulierten T-Zellen mittels ELISA gemessen.

Der Spiegel des Th₂-Zytokins IL-13 sowie von IL-10 waren bei C57BL/6N signifikant höher als bei C57BL/6J. Keine signifikanten Unterschiede zeigten sich dagegen bei den Th₂-Zytokinen IL-4 und IL-5 sowie beim Th₁-Zytokin IFN γ .

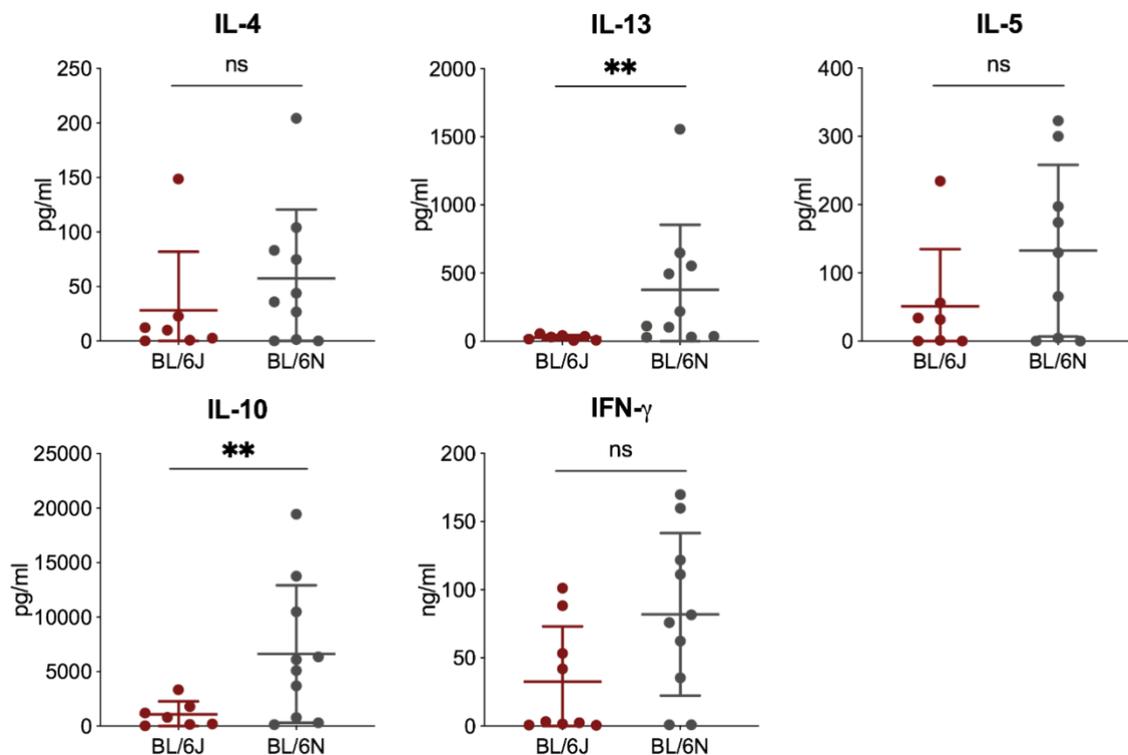


Abb. 10 Zytokinspiegel im Überstand restimulierter T-Zellen aus mesenterialen Lymphknoten
Daten aus drei unabhängigen Experimenten
n.s.: nicht signifikant, J: n=7, N: n=10, ** p<0,01

1.4 Mikrobiomanalyse

Es wurden Stuhlproben aus Colon und Dünndarm von jeweils sechs Tieren pro Gruppe untersucht. Eine Probe aus dem Dünndarm einer C57BL/6J Maus war mit Coloninhalt kontaminiert und wurde ausgeschlossen.

1.4.1 alpha-Diversität

Unter alpha-Diversität werden verschiedene Methoden zusammengefasst, mit denen die Artenvielfalt eines Ökosystems untersucht wird. Der mikrobielle Artenreichtum (Richness) gibt die absolute Anzahl der Spezies - quantifiziert als OTUs (Operational taxonomic units) - in den untersuchten Proben an. Die Richness unterschied sich signifikant im Colon von C57BL/6J und C57BL/6N Mäusen. Im Ileum hingegen waren keine signifikanten Unterschiede in der Richness zwischen den untersuchten Gruppen nachweisbar (Abb. 11A).

Nach der Gewichtung nach der relativen Häufigkeit der Bakterienarten (Shannon Index, Abb. 11B), zeigte sich in Colon und Ileum nur noch ein Trend zu einer höheren alpha-Diversität bei C57BL/6N Mäusen im Vergleich zu C57BL/6J.

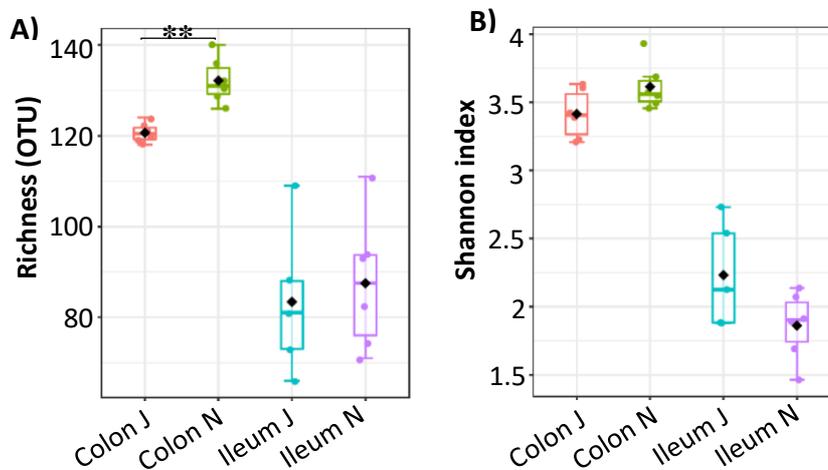


Abb. 11 Alpha Diversität in Colon und Ileum von C57BL/6J und N. **A)** Mikrobieller Artenreichtum ausgedrückt als OTUs (Operational taxonomic units). ******p<0,01 **B)** Shannon Index.

1.4.2 Beta-Diversität

Mittels der Beta-Diversität kann die Artenvielfalt in verschiedenen, ähnlichen Ökosystemen verglichen werden. Die geschieht oft mittels einer Principal Coordinates Analysis (PCoA), bei der die unterschiedlichen Artenzusammensetzungen der einzelnen Ökosysteme durch eine multidimensionale Distanzmatrix erfasst wird, von der dann eine 2- oder 3-dimensionale Projektion graphisch dargestellt werden kann. Je größer der Abstand zwischen den Datenpunkten, die jeweils ein Ökosystem repräsentieren, ist, desto größer ist der Unterschied in deren Artenvielfalt.

Es zeigte sich ein zu erwartender Unterschied zwischen Colon und Ileum innerhalb der untersuchten Gruppen wie in

Abb. 12 dargestellt. Im direkten Vergleich von C57BL/6J und C57BL/6N in Colon (

Abb. 12B) und Ileum (

Abb. 12C) zeigen sich interessanterweise signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Sowohl im Ileum als auch im Colon liegt eine signifikant unterschiedliche Beta-Diversität vor.

Visualisiert durch die Kumulation in unterschiedlichen Bereichen des Plots

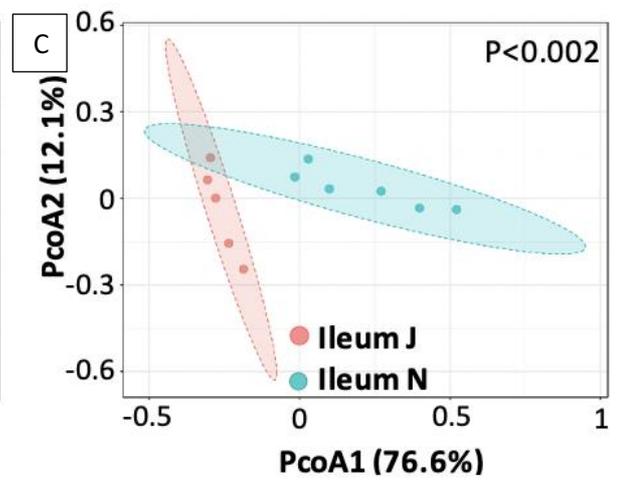
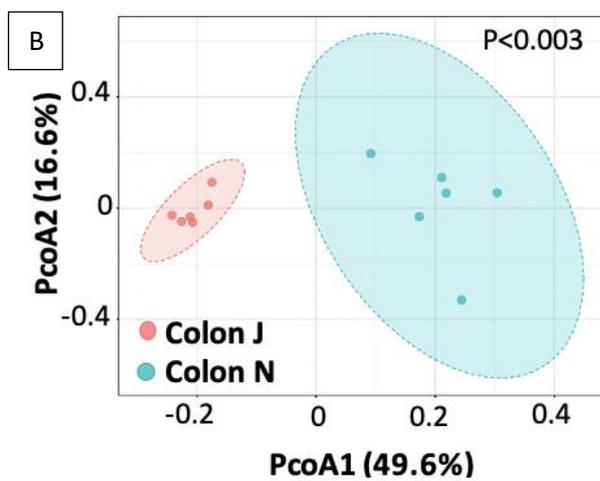
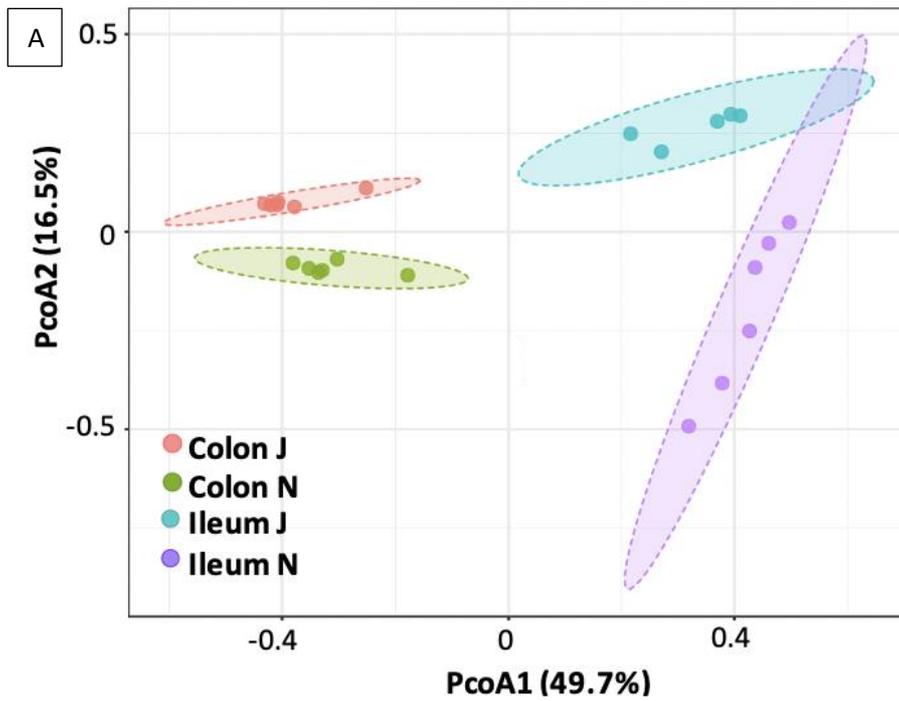


Abb. 12 Analyse der Beta Diversität im Colon und Ileum von sensibilisierten C57BL/6J und C57BL/6N Mäusen. **A)** PcoA Plot für Beta Diversität Analyse von allen Proben. **B)** Pairwise Diversität Plot Vergleich des Colons **C)** Pairwise Diversität Plot Vergleich des Ileus.

1.4.3 Phylum Ebene

Neben der Diversität wurde auch die genaue Zusammensetzung der Mikrobiomproben auf verschiedenen Ebenen der Taxonomie analysiert. Unterschiede zwischen Colon und Ileum in der intestinalen Mikrobiota sind zu erwarten und bleiben daher unerwähnt.

In Abb. 13 und Abb. 14 ist die Zusammensetzung des Mikrobioms in Colon und Ileum auf Phylum Ebene dargestellt.

Sowohl im Colon als auch im Ileum waren *Verrucomicrobia* bei C57BL/6J signifikant häufiger vertreten als bei C57BL/6N. Dieser Unterschied auf Phylum Ebene lässt sich im Weiteren auch auf den nachgeordneten taxonomischen Ebenen weiterverfolgen.

In der Analyse der Colonproben zeigten sich bei beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit der Phyla Bacteroides, Firmicutes und Proteobacteria. Im Ileum fand sich, neben dem o.g. Unterschied im Phylum *Verrucomicrobia*, weitere allerdings nicht Signifikanz erreichende Abweichungen im Mikrobiom der analysierten Mausstämme. Das Phylum *Bacteroidetes* war bei C57BL/6J und das Phylum *Firmicutes* bei C57BL/6N deutlich stärker vertreten.

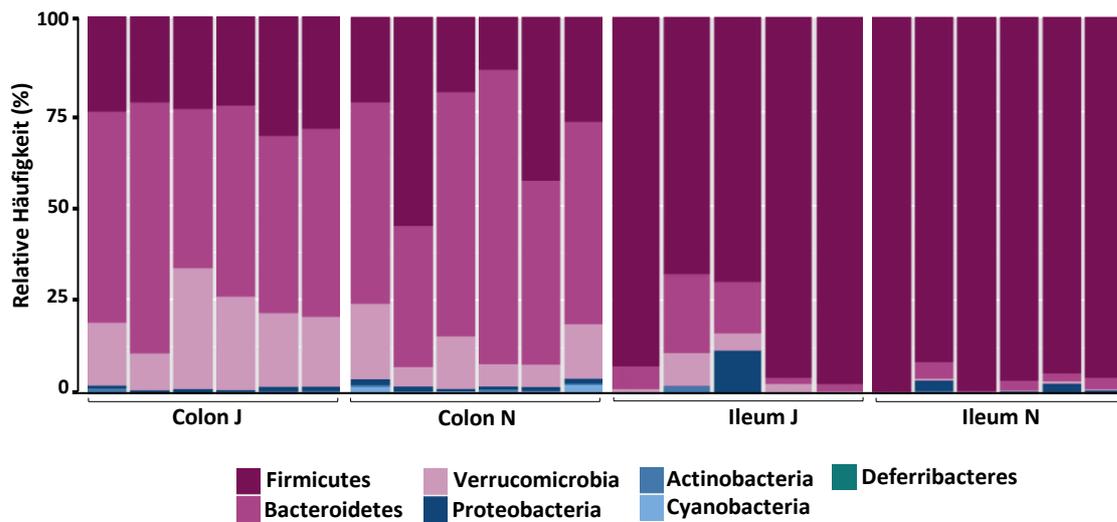


Abb. 13 Taxonomische Klasseneinteilung des Mikrobioms auf Ebene der Phyla. C57BL/6J: n=6, C57BL/6N: n=6.

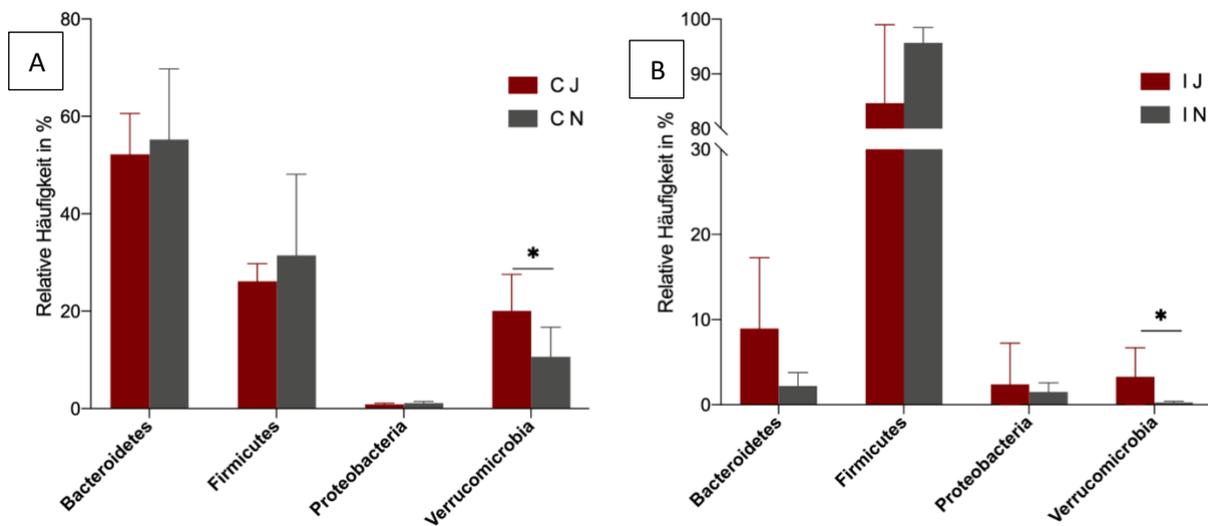


Abb. 14 relative Häufigkeit der häufigsten Phyla in %. A. Colon C57BL/6J und C57BL/6N B. Ileum C57BL/6J und C57BL/6N *p<0,05

1.4.4 Familien Ebene

Der bereits auf Phylum Ebene beobachtete Unterschied in der Häufigkeit der *Verrucomicrobia* lässt sich auf Familien Ebene weiterverfolgen. In Colon und Ileum zeigte sich bei C57BL/6J eine signifikant höhere relative Häufigkeit von *Verrucomicrobiaceae* aus dem Phylum der *Verrucomicrobia* als bei C57BL/6N.

Zusätzlich konnten weitere Unterschiede in der Zusammensetzung des Mikrobioms, analog zur Phylum Ebene, vor allem in den Proben aus dem Ileum, nachgewiesen werden. *Lactobacillaceae* waren im Ileum von C57BL/6N stärker vertreten und *Ruminococcaceae* machten bei C57BL/6J einen größeren Anteil aus als bei C57BL/6N. Beide Familien gehören zum Phylum der *Firmicutes*, das bei C57BL/6N stärker vertreten ist. Da *Lactobacillaceae* den dominierenden Anteil der *Firmicutes* darstellen, ermöglicht erst die Analyse auf Familien Ebene ein differenziertes Bild mit Herausarbeiten der gegensätzlichen Verteilung von *Lactobacillaceae* und *Ruminococcaceae* im Ileum von C57BL/6J und C57BL/6N.

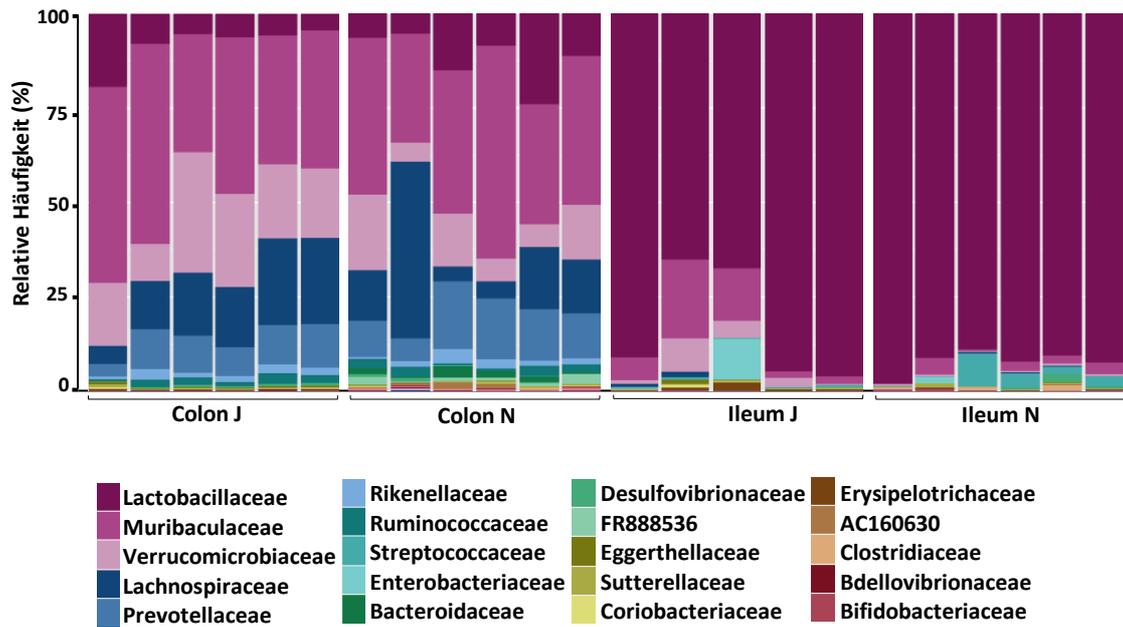


Abb. 15 Mikrobiom Taxonomy Binning auf Ebene der Familien.

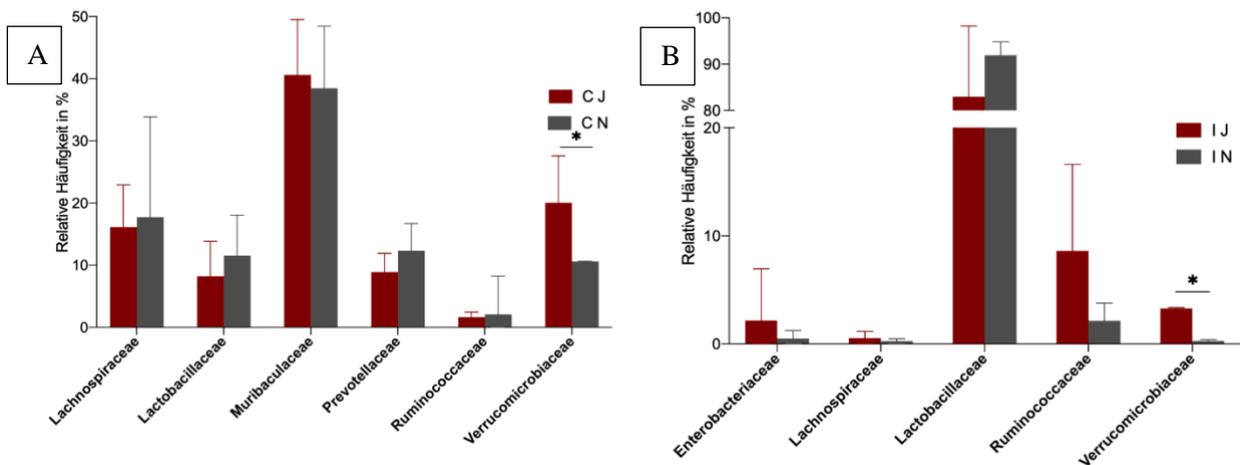


Abb. 16 Relative Häufigkeit der häufigsten Bakterien-Familien in %. A. Colon C57BL/6J und C57BL/6N B. Ileum C57BL/6J und C57BL/6N, *p<0,05

1.4.5 Genus und Art Ebene

Im Ileum ließen sich auf Genus Level signifikante Veränderungen zwischen C57BL/6J und C57BL/6N feststellen. In Abb. 17 sind die relevantesten Unterschiede im Ileum dargestellt.

Akkermansia muciniphila, *Lactobacillus gasseri* und *Muribaculum* waren im Dünndarm von C57BL/6J signifikant mehr vertreten als bei C57BL/6N. *Lactobacillus animalis* und *Streptococcus* hingegen fanden sich im Ileum von C57BL/6N signifikant häufiger als bei C57BL/6J.

Akkermansia muciniphila gehört der Familie der *Verrucomicrobiaceae* und dem Phylum *Verrucomicrobia*. Der signifikante Unterschied in der Häufigkeitsverteilung zeigt sich interessanterweise bereits auf Phylum Ebene und lässt sich über die Ebene der Familien bis zu *Akkermansia muciniphila* auf der Genus Ebene verfolgen.

Zudem ließ sich eine Häufigkeitsverschiebung der *Lactobacillus*-Arten feststellen. *Lactobacillus animalis* war bei C57BL/6N signifikant häufiger, während *Lactobacillus gasseri* und *reuteri* bei C57BL/6J einen größeren Anteil ausmachten. Anders als bei *Akkermansia muciniphila* bilden sich die Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung der *Lactobacillus*-Arten nicht auf Familien oder Phylum Ebene ab, sondern gleichen sich untereinander aus.

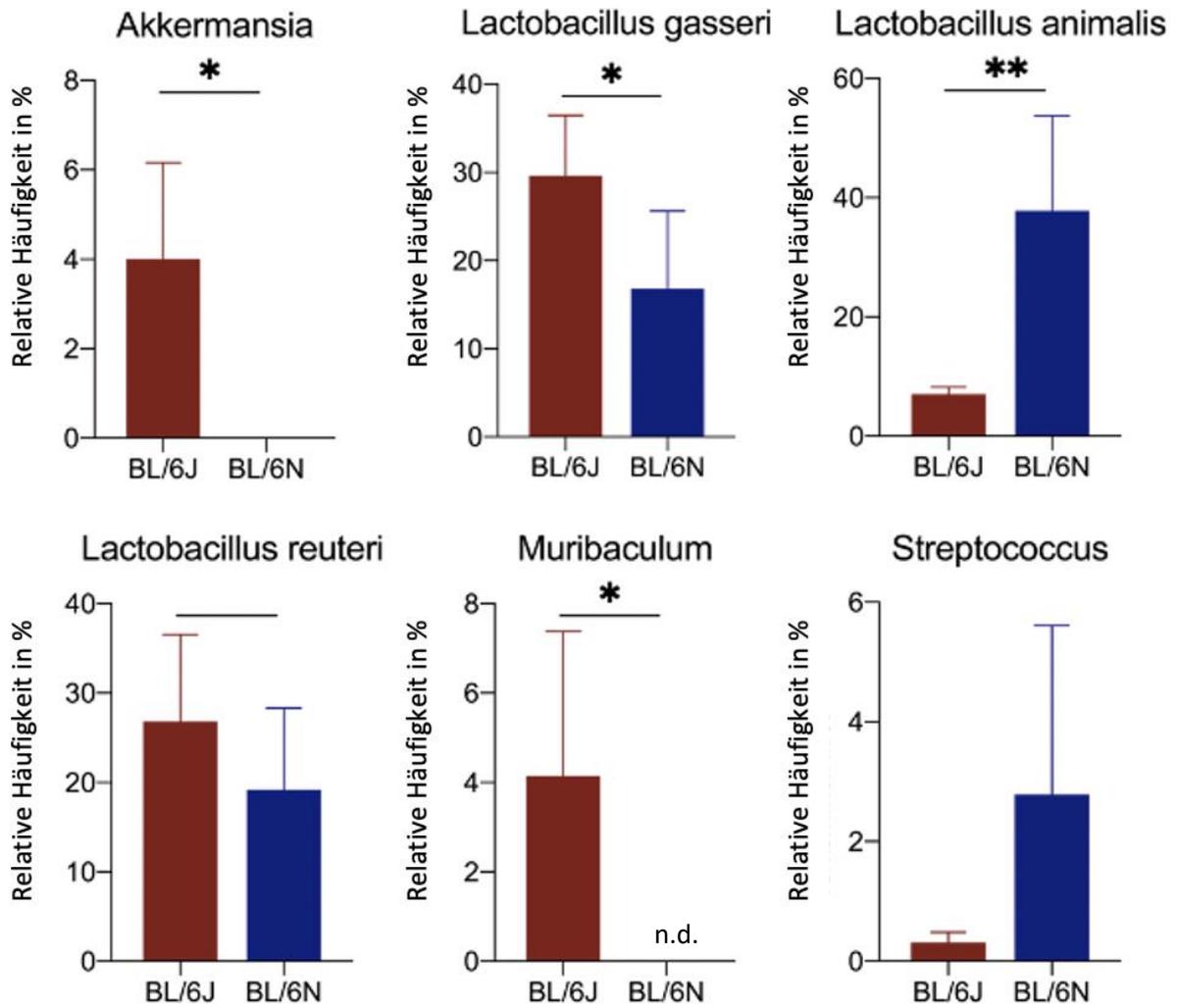


Abb. 17 Unterschiede im Ileum zwischen C57BL/6J und C57BL/6N auf Genus Ebene
n.d. nicht detektierbar, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

1.5 Zusammenfassung C57BL/6J gegen C57BL/6N

Die Substämme C57BL/6J und C57BL/6N finden in weiten Teilen der Forschung Verwendung und werden dabei häufig synonym verwendet trotz beschriebener genetischer, phänotypischer und immunologischer Unterschiede (Fontaine & Davis, 2016).

Auch wurde in der Literatur eine distinkte intestinale Mikrobiota von C57BL/6J und C57BL/6N nachgewiesen, die jedoch von den Autoren auf die unterschiedliche Herkunft zurückgeführt wurden, da die untersuchten Tiere bei verschiedenen Händlern gekauft wurden (Sadler et al., 2017). Aufgrund der beschriebenen heterogenen Datenlage im Hinblick auf Entwicklung der T-Zell Polarisation und des intestinalen Mikrobioms wurden in den durchgeführten Versuchen diese beiden Parameter in einem etablierten Nahrungsmittelallergiemodell auf funktioneller Basis untersucht. Dies ermöglichte potenzielle Unterschiede in der Entwicklung einer T_H2 -Immunität, zwischen den beiden Substämmen C57BL/6J und C57BL/6N zu detektieren. Alle Versuchstiere wurden beim gleichen Händler erworben und unter standardisierten identischen Bedingungen gehalten, um den Einfluss von Umweltfaktoren (Herkunft, Tierhaltung, Futter etc.) auf das Mikrobiom soweit es möglich ist zu minimieren. Nur unter diesen Bedingungen kann eine valide Aussage über die genetisch bedingten Unterschiede getroffen werden, da das intestinale Mikrobiom eine entscheidende Determinante der Immunantwort im Darm ist.

Interessanterweise zeigte die Analyse des Darmmikrobioms, trotz identischer Herkunft und Haltung, signifikante Unterschiede zwischen C57BL/6J und C57BL/6N auf allen analysierten Ebenen sowohl im Colon als auch im Dünndarm.

In der klinischen Messung der Stärke der anaphylaktischen Reaktion zeigten sich im Gegensatz dazu beim Vergleich von C57BL/6J und C57BL/6N keine signifikanten Unterschiede. Die Analyse der Interleukine, als Parameter der Th-Polarisation, aus dem Überstand der T-Zellen aus Milz und mesenterialen Lymphknoten war zum überwiegenden Teil ebenfalls nicht signifikant. Lediglich die Konzentration von IL-10 und IL-13 war im Überstand der T-Zellen aus den mesenterialen Lymphknoten signifikant höher als bei C57BL/6N. Die Konzentration der wichtigsten T_H2 -Zytokine IL-4 und -5 im Überstand der restimulierten T-Zellen aus Milz und mesenterialen Lymphknoten unterschied sich jedoch nicht zwischen den beiden Gruppen.

Es konnte somit gezeigt werden, dass die intestinalen Mikrobiota von C57BL/6J und C57BL/6N signifikante Unterschiede aufweist. Diese unterschiedlichen Mikrobiome führen zur

Ausbildung einem vergleichbaren T-Helferzellprofil und resultieren im gleichen klinischen Phänotyp, gemessen an der Stärke der anaphylaktischen Reaktion.

2. Vergleich C57BL/6J und NOD2^{-/-}

2.1 Temperaturabfall nach Challenge

Sieben Tage nach der letzten Sensibilisierung wurde durch i.p.-Injektion von OVA eine Anaphylaxie ausgelöst. Der rektal gemessene Temperaturabfall als Maß der Schwere der anaphylaktischen Reaktion wies, wie in Abb. 18 gezeigt, signifikante Unterschiede zwischen C57BL/6J und NOD2^{-/-} auf. NOD2^{-/-}-Mäuse zeigten im Vergleich einen stärkeren und prolongierten Abfall der rektal gemessenen Temperatur nach Auslösen der Anaphylaxie. Dabei verlaufen die Temperaturkurven zunächst parallel; nach 42 Minuten flacht sich der Temperaturabfall bei Wildtyp Mäusen ab, wohingegen NOD2^{-/-} Tiere einen weiteren Rückgang der Körpertemperatur zeigen, der erst nach 70 Minuten sein Maximum zeigt. Zu diesem Zeitpunkt erholen sich die Wildtyp-Mäuse bereits wieder detektierbar am Anstieg der Körpertemperatur. Dieser kann bei NOD2^{-/-} Tieren erst ab 96 Minuten nach Anaphylaxieauslösung beobachtet werden. Dies konnte in drei unabhängigen Experimenten beobachtet werden.

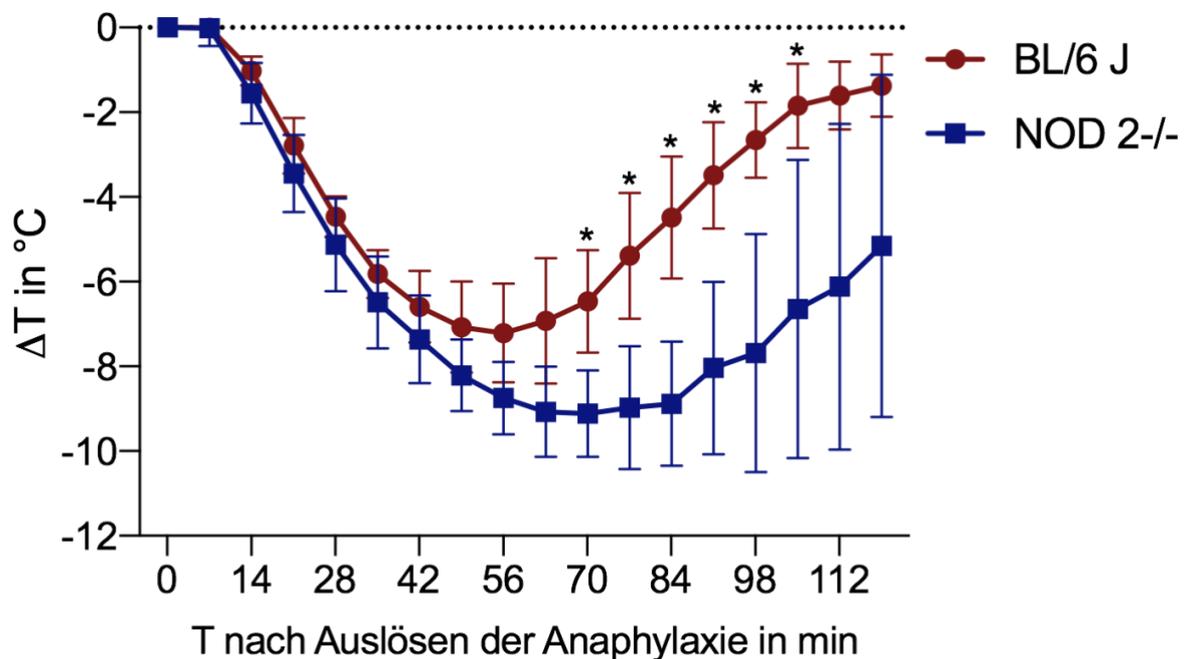


Abb. 18 Temperaturabfall nach Auslösen der Anaphylaxie
1 von 3 repräsentativen Experimenten, n=6 pro Gruppe * $p < 0,05$

2.3 Interleukinspiegel im Überstand der restimulierten T-Zellen

2.3.1 Milz

Analog zu 1.3 wurde auch zum Vergleich von C57BL/6J und NOD2^{-/-} die systemische und regionäre T-Helferzell-Polarisierung in die T_H1/T_H2-Phänotypen untersucht. Es wurden mittels ELISA die Konzentration von IL-4,-5,-10,-13 und IFN γ im Überstand der restimulierten T-Zellen aus Milz und mesenterialen Lymphknoten gemessen.

Die mittleren Spiegel von IL-4, -5, -13 und IFN γ waren in der Milz nicht signifikant unterschiedlich. Die Konzentration von Interleukin-10 war bei NOD2^{-/-} signifikant höher als bei C57BL/6J.

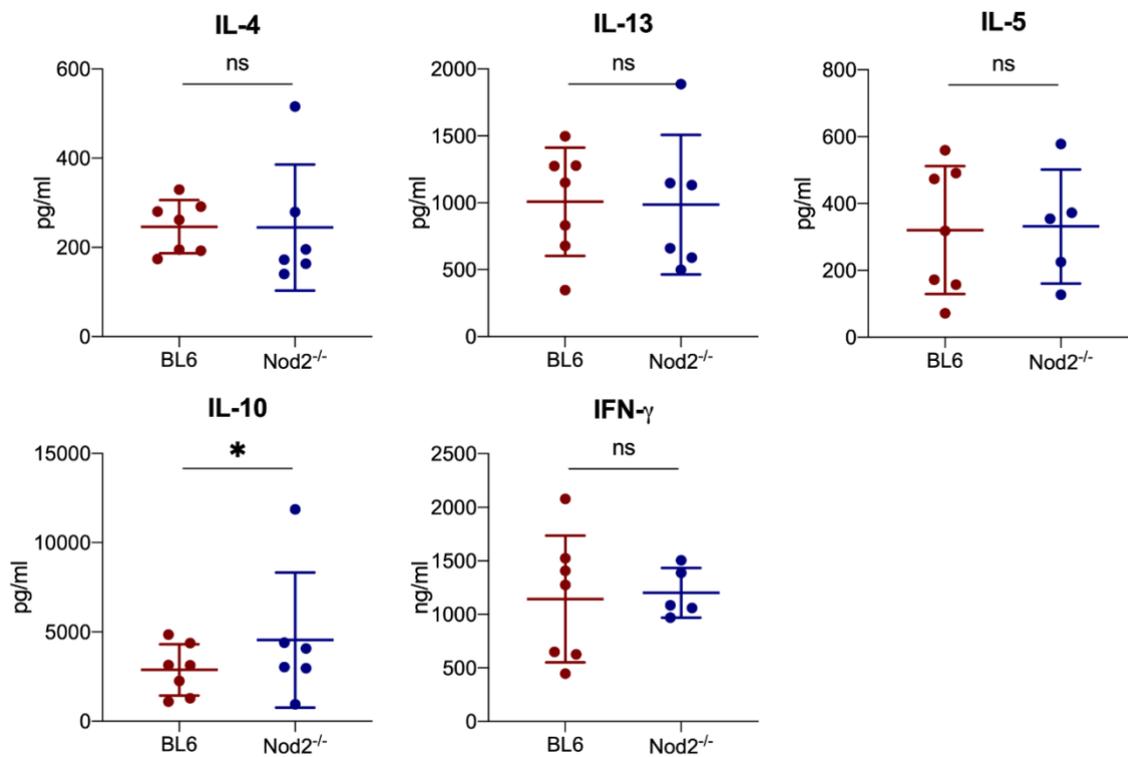


Abb. 19 Zytokinspiegel im Überstand restimulierter T-Zellen aus der Milz C57BL/6J n=7, NOD2^{-/-} n=6 ns: nicht signifikant *p<0,05

2.3.2 mesenteriale Lymphknoten

Im Überstand der restimulierten T-Zellen aus mesenterialen Lymphknoten lag die Konzentration von IL-4 und -13 bei NOD2^{-/-} signifikant höher als bei C57BL/6J. Die Spiegel von IL-10, IL-5, IFN γ waren ebenfalls bei NOD2^{-/-} höher als bei C57BL/6J, jedoch war der Unterschied nicht signifikant.

Diese Daten zeigten eine präferentielle T_H2-Polarisierung in den lokoregionären Lymphknoten bei NOD2^{-/-} im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen auf.

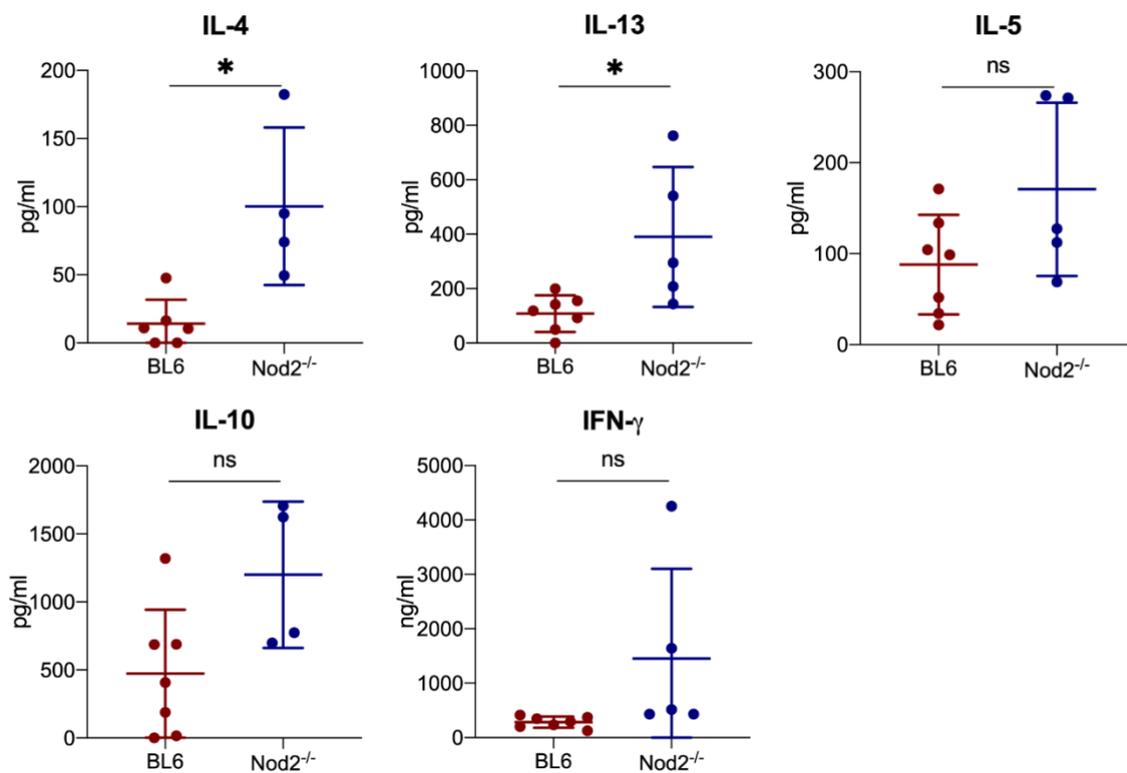


Abb. 20 Zytokinspiegel im Überstand restimulierter T-Zellen aus mesenterialen Lymphknoten C57BL/6J n=7, NOD2^{-/-} n=6 *p<0,05

3. Vergleich C57BL/6J und NOD2^{-/-} nach Co-Housing

Zur Untersuchung des Einflusses des Mikrobioms auf die intestinale Immunantwort sowie T-Helferzell-Polarisierung wurden C57BL/6J und NOD2^{-/-} zusammen in einem Käfig gehalten (ch-C57BL/6J und ch-NOD2^{-/-}). Durch Koprophagie kommt es bei allen Tieren zur Aufnahme von Fäzes und somit der intestinalen Mikrobiota beider Mausstämme. Dies ermöglicht das Herausarbeiten der funktionellen Relevanz des Mikrobioms. Das Co-Housing wurde vier Wochen vor Beginn der Sensibilisierung begonnen und während der Sensibilisierung fortgeführt.

3.1 Temperaturabfall nach Challenge

Zur Bestimmung der funktionellen Relevanz des Co-Housing wurde eine anaphylaktische Reaktion ausgelöst und der Temperaturabfall gemessen. Die Stärke der Anaphylaxie von ch-NOD2^{-/-} und ch-C57BL/6J wurde miteinander verglichen. Im Gegensatz zu den unter 2.1 beschriebenen Ergebnissen zeigte sich nach Co-Housing zu allen Messzeitpunkten kein Unterschied zwischen NOD2^{-/-} und C57BL/6J in der Stärke des Temperaturabfalls. Die Temperaturkurven verliefen nahezu deckungsgleich (Abb. 21).

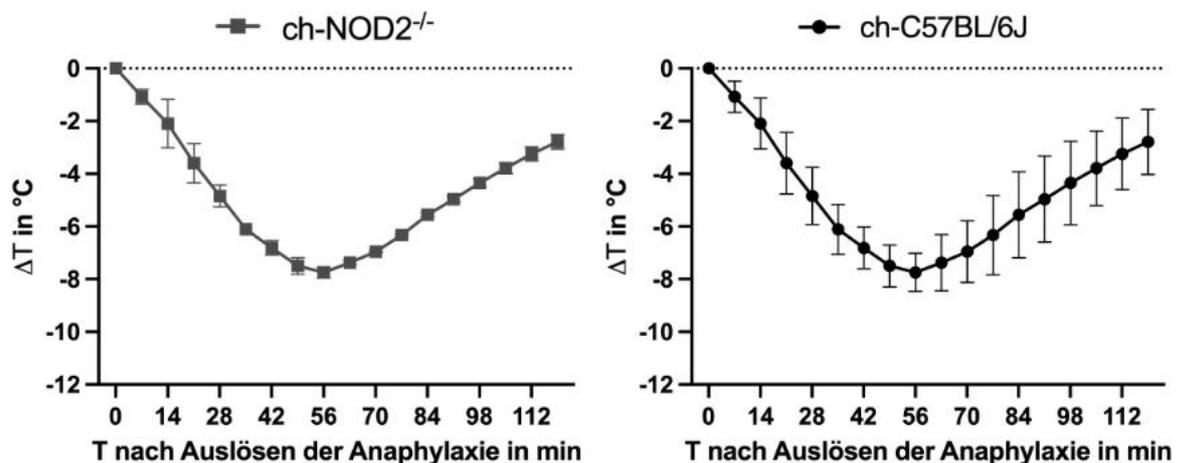


Abb. 21 Vergleich des Temperaturabfalls von ch-NOD2^{-/-} und ch-C57BL/6J, Links ist der Temperaturverlauf von NOD2^{-/-} und rechts von ch-C57BL/6J
ch=Co-Housing, n=5 pro Gruppe

Als Kontrollgruppe wurden jeweils fünf NOD2^{-/-} und C57BL/6J in getrennten Käfigen gehalten und sensibilisiert (sh-NOD2^{-/-} und sh- C57BL/6J). Der Vergleich von sh-NOD2^{-/-} mit ch-NOD2^{-/-} zeigte eine signifikant schwächere anaphylaktische Reaktion bei ch-NOD2^{-/-}. Der Unterschied ist besonders deutlich ab 63 min nach Auslösen der Anaphylaxie. Die sh-NOD2^{-/-} Mäuse der Kontrollgruppe zeigten im Vergleich zu ch-NOD2^{-/-} einen stärkeren und prolongierten Abfall der Körpertemperatur.

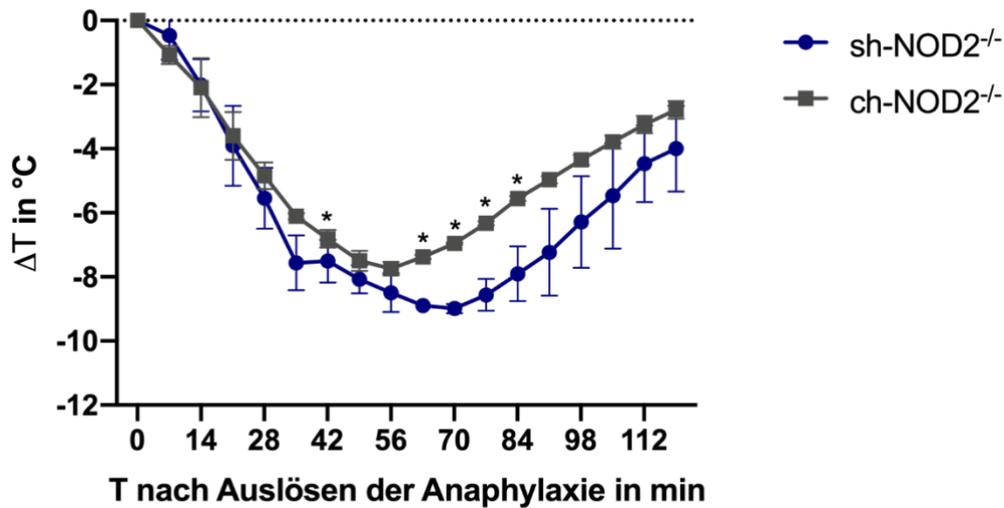


Abb. 22 Vergleich des Temperaturabfalls von sh-NOD2^{-/-} mit ch-NOD2^{-/-}
 ch=Co-Housing, n=5 pro Gruppe, *p<0,05 einseitiger t-Test

3.5 Mikrobiomanalyse

Es wurden Stuhlproben aus dem Ileum von jeweils fünf sensibilisierten Mäusen aller vier Gruppen (ch-NOD2^{-/-} und ch-C57BL/6J sowie die Vergleichsgruppen sh-NOD2^{-/-} und sh-C57BL/6J) analysiert und verglichen.

3.5.1 Alpha-Diversität

Die Alpha Diversität wurde wie unter 1.4.1 beschrieben analysiert. In Abb. 23 sind der Artenreichtum (A) und der Shannon-Diversitätsindex dargestellt (B). Der mikrobielle Artenreichtum (Richness) ausgedrückt in OTU war bei allen analysierten Gruppen auf ähnlichem Niveau. Der Shannon Index hingegen zeigte sich bei sh-NOD2^{-/-} signifikant höher als bei sh-C57BL/6J. Bei ch-NOD2^{-/-} und ch-C57BL/6J hingegen bestand kein signifikanter Unterschied mehr.

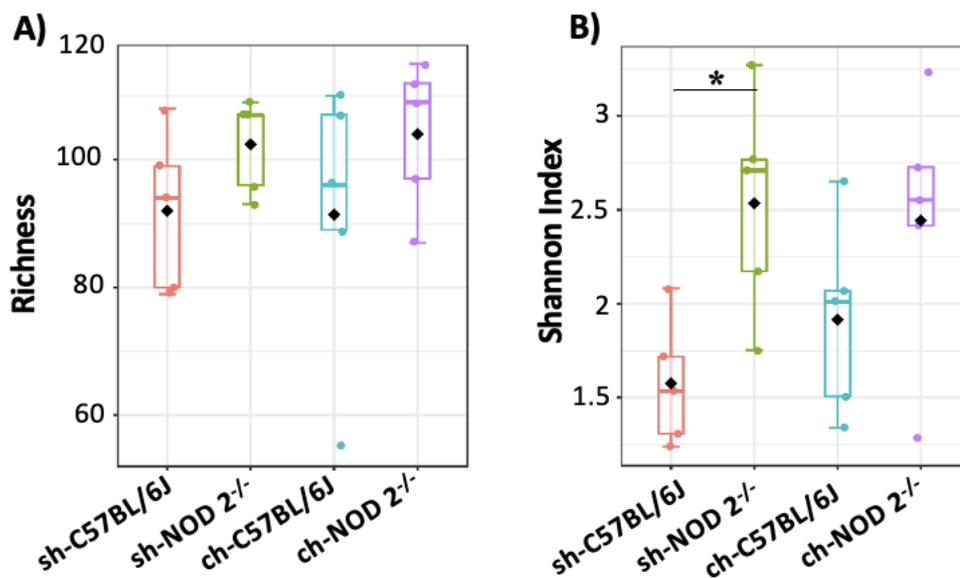


Abb. 23 Alpha-Diversität des Ileums von Wildtyp (C57BL/6J), NOD2^{-/-} mit und ohne Co-Housing. **A)** Mikrobieller Artenreichtum ausgedrückt als OTU-Zahlen (Operational taxonomic units). **B)** Shannon Index. *p<0,05

3.5.2 Beta-Diversität

Die Hintergründe der Analyse der Beta-Diversität sind unter 1.4.2 beschrieben. In Abb. 24 ist die Beta-Diversität in dreidimensionalen PCoA Plots aufgetragen. Im Vergleich von sh-C57BL/6J mit sh-NOD2^{-/-} zeigte sich wie in B) dargestellt eine signifikant unterschiedliche Beta-Diversität. Bei den Co-Housing-Gruppen bestand hingegen wie in C) abgebildet kein signifikanter Unterschied zwischen C57BL/6J mit NOD2^{-/-}. Die NOD2^{-/-} Mäuse aus der Co-Housing Gruppe wiesen im Vergleich zu sh-C57BL/6J eine signifikant unterschiedliche Beta-Diversität im Ileum auf.

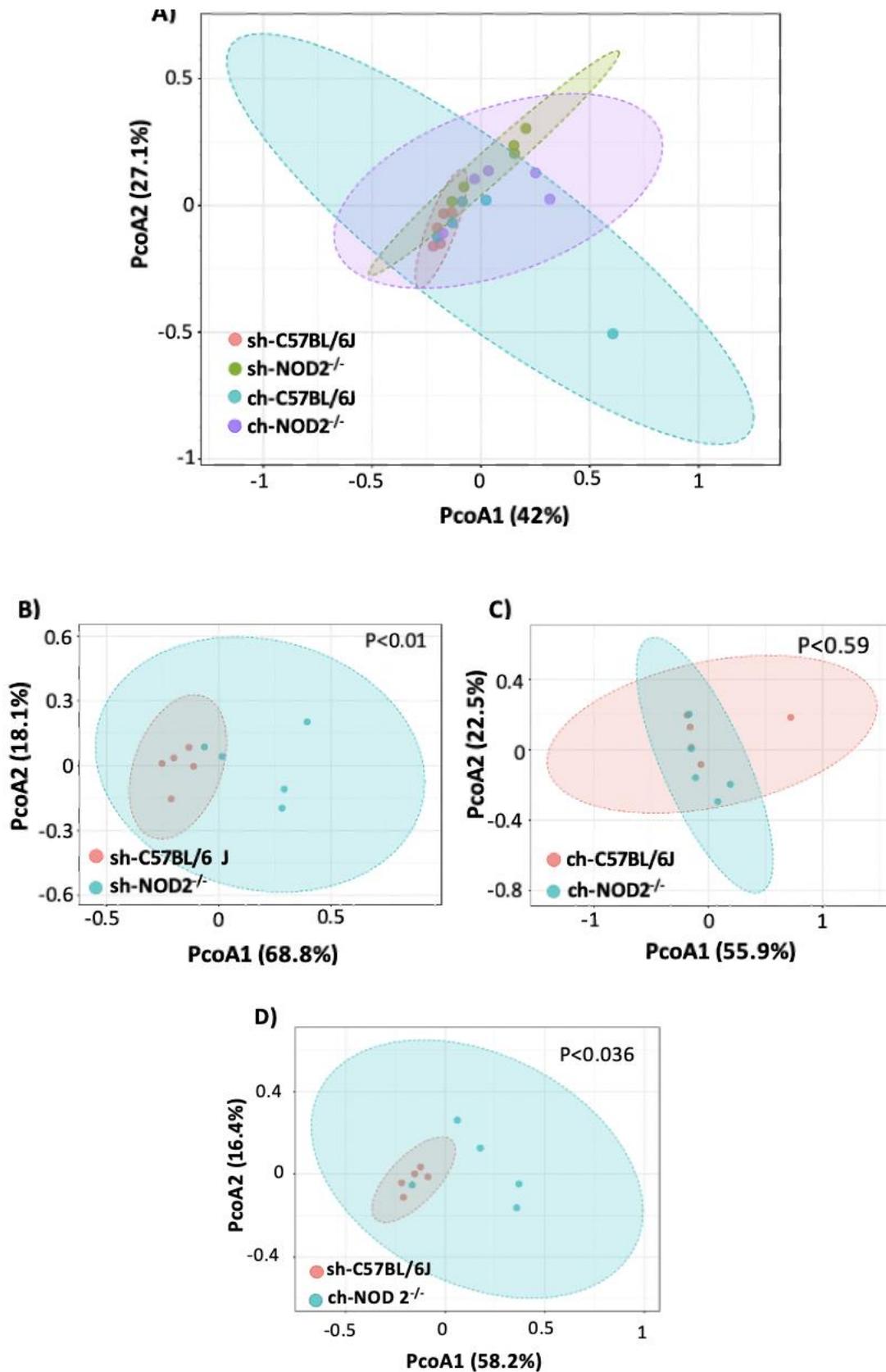


Abb. 24 Beta-Diversitäts Analyse des Ileum-Mikrobiomes von ch-C57BL/6J (Wildtyp) und ch-NOD2^{-/-} Mäusen und der Kontrollgruppen ohne Co-Housing. A) PCoA Plot der Beta Diversitäts Analyse aller Proben. B) Vergleich von sh-C57BL/6J und sh-NOD2^{-/-} der Kontrollgruppe. C) Vergleich von ch-C57BL/6J und ch-NOD2^{-/-} D) Vergleich von sh-C57BL/6J und ch-NOD2^{-/-}

3.5.3 Phylum Ebene

Die Zusammensetzung des Mikrobioms auf taxonomischer Ebene der Stämme (Phyla) in den einzelnen Proben aus dem Ileum ist in Abb. 25 dargestellt. Den mit Abstand größten Anteil machen bei allen untersuchten Gruppen die *Firmicutes* aus.

Abb. 26 zeigt die relative Häufigkeit der einzelnen Phyla in den untersuchten Gruppen. Bereits auf Phylum Ebene zeigen sich Unterschiede zwischen sh- C57BL/6J und sh-NOD2^{-/-}.

Die stark vertretenen *Firmicutes* machten bei sh-C57BL/6J einen signifikant größeren Anteil aus als bei sh-NOD2^{-/-}. Zudem kamen *Bacteroidetes* und *Verrucomicrobia* bei sh-NOD2^{-/-} signifikant häufiger vor als bei sh-C57BL/6J.

Im Gegensatz dazu ließen sich beim Vergleich von ch-NOD2^{-/-} und ch-C57BL/6J interessanterweise keine signifikanten Unterschiede mehr feststellen. Beim Vergleich von sh-NOD2^{-/-} der Kontrollgruppe mit ch-NOD2^{-/-} fällt auf, dass nach Co-Housing *Actinobacteria* und *Verrucomicrobia* einen größeren Anteil ausmachen, die *Bacteroidetes* hingegen weniger stark vertreten sind. Nach Co-Housing bestehen die signifikanten Unterschiede, die beim Vergleich von sh-NOD2^{-/-} und sh-C57BL/6J zu beobachten sind, nicht mehr, obwohl das Mikrobiom der Wildtyp-Mäuse trotz des Co-Housing stabil bleibt. Es kommt dementsprechend zu einer teilweisen Anpassung des Mikrobioms der Knockout-Mäuse an die Wildtyp-Mäuse.

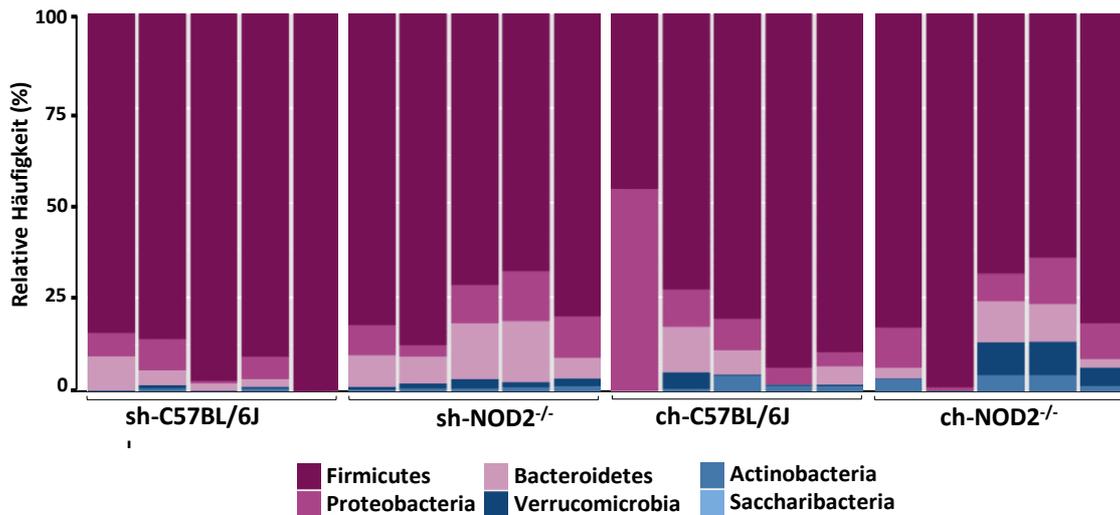


Abb. 25 Relative Häufigkeiten bakterieller Phyla, Darstellung der einzelnen Tiere. ch=co-housing, sh= single-housing

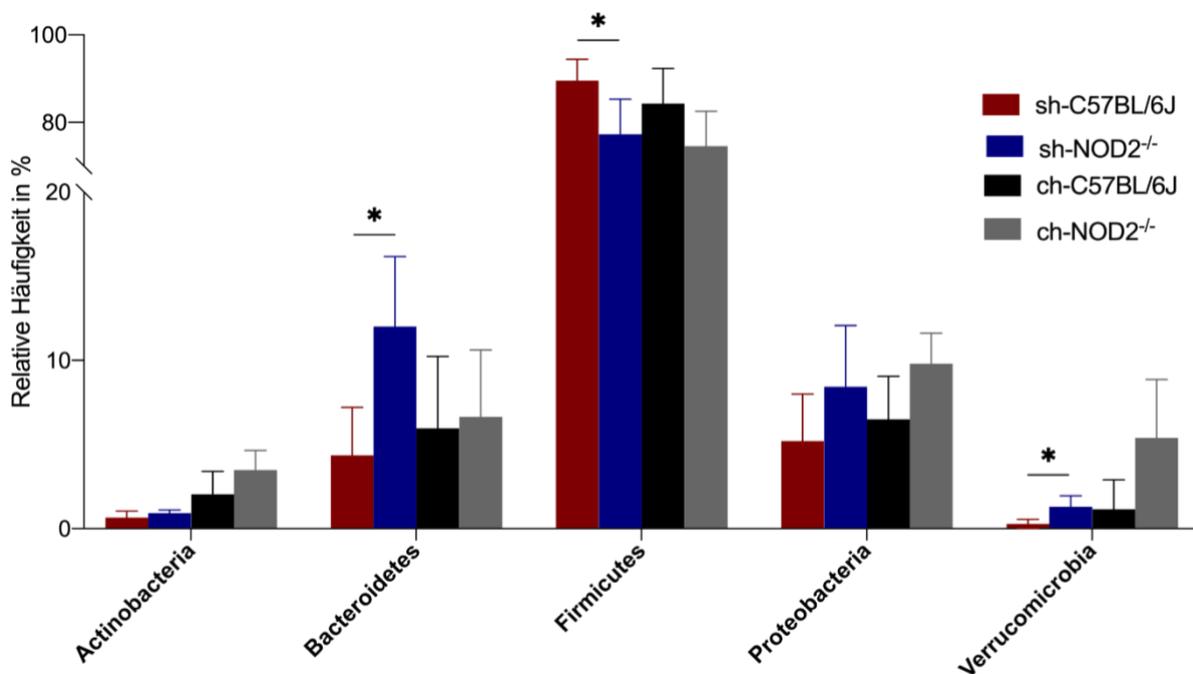


Abb. 26 Relative Häufigkeiten bakterieller Phyla, Darstellung der Mittelwerte. ch=co-housing, sh= single-housing, n=5 pro Gruppe, *p<0,05

3.5.4 Familien Ebene

Die Zusammensetzung auf Familienebene wird in Abb. 27 für die einzelnen Proben und in Abb. 28 für die Mittelwerte der Gruppen dargestellt. Dabei macht die Familie der Lactobacillaceae bei allen Tieren den größten Anteil aus. Im Vergleich von sh-C57BL/6J und sh-NOD2^{-/-} sind Lactobacillaceae sowie Erysipelotrichaceae bei sh-C57BL/6J signifikant häufiger als bei sh-NOD2^{-/-}. Lachnospiraceae, Muribaculaceae sowie Verrucomicrobiaceae sind bei sh-NOD2^{-/-} signifikant stärker vertreten als bei sh-C57BL/6J.

Nach dem Co-Housing zeigen sich deutlich weniger Unterschiede zwischen C57BL/6J und NOD2^{-/-}. Bei ch-NOD2^{-/-} machen lediglich die *Lachnospiraceae* weiterhin einen signifikant größeren und die Familie der *Lactobacillaceae* einen signifikant kleineren Anteil aus als bei ch-C57BL/6J. Die weiteren signifikanten Unterschiede, die beim Vergleich der Kontrollgruppen auffallen, sind nach Co-Housing nicht mehr zu beobachten. Wie bereits auf der Ebene der Phyla bleibt das Mikrobiom der ch-C57BL/6J Mäuse trotz Co-Housing sehr stabil, während es bei ch-NOD2^{-/-} Mäusen zu deutlichen Verschiebungen in Richtung des Wildtyp-Mikrobioms kommt.

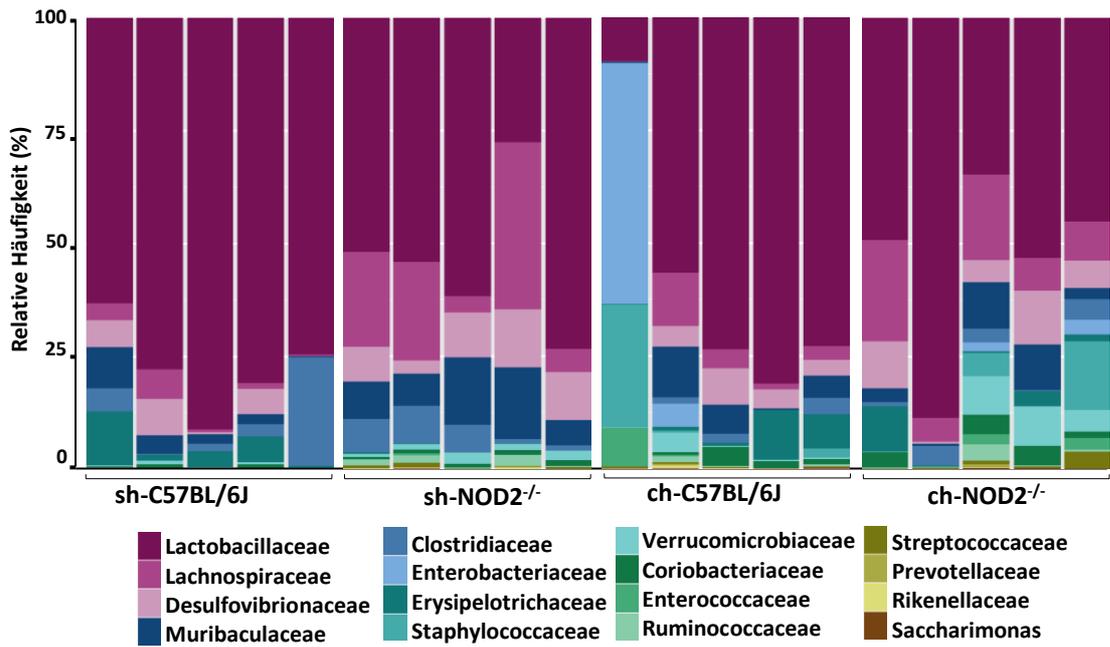


Abb. 27 Einteilung in Familien, WT (C57BL/6J), NOD (NOD2^{-/-}), co=Co-Housing

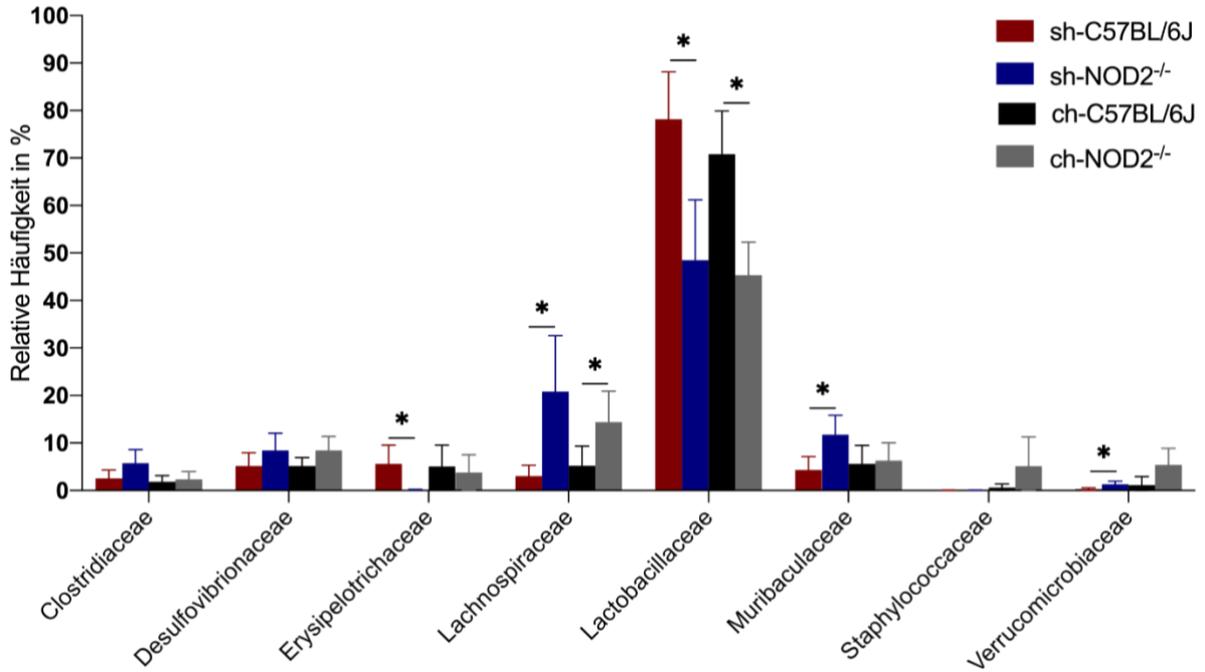


Abb. 28 Vorkommen der häufigsten Familien in %
ch=Co-Housing, n=5, *p<0,05

3.5.5 Genus Ebene

In Abb. 29 ist das Vorkommen der häufigsten Genus für die einzelnen Gruppen dargestellt. Der Vergleich von sh-C57BL/6J und sh-NOD2^{-/-} zeigt einen signifikant höheren Anteil von *Akkermansia muciniphila*, *Clostridium* sowie *Muribaculum* bei sh-NOD2^{-/-}. *Lactobacillus* und *Allobaculum* sind hingegen bei sh-C57BL/6J signifikant stärker vertreten.

Ch-C57BL/6J und ch-NOD2^{-/-} weisen, wie bereits auf Ebene der Genus und Familien, deutlich weniger Unterschiede auf. Die relative Häufigkeit von *Lactobacillus* ist bei ch-C57BL/6J signifikant höher und bei ch-NOD2^{-/-} macht *Clostridium* einen signifikant größeren Anteil aus. Beim Vergleich von sh-NOD2^{-/-} mit ch-NOD2^{-/-} zeigte sich, dass bei NOD2^{-/-} durch das Co-Housing die relative Häufigkeit von *A. muciniphila* stark steigt, während die von *Muribaculum* und *Arthromitus* deutlich sinkt. *Allobaculum* ist hingegen bei sh-NOD2^{-/-} der Kontrollgruppe nicht nachweisbar und steigt in seinem Vorkommen durch Co-Housing auf das Niveau von C57BL/6J an.

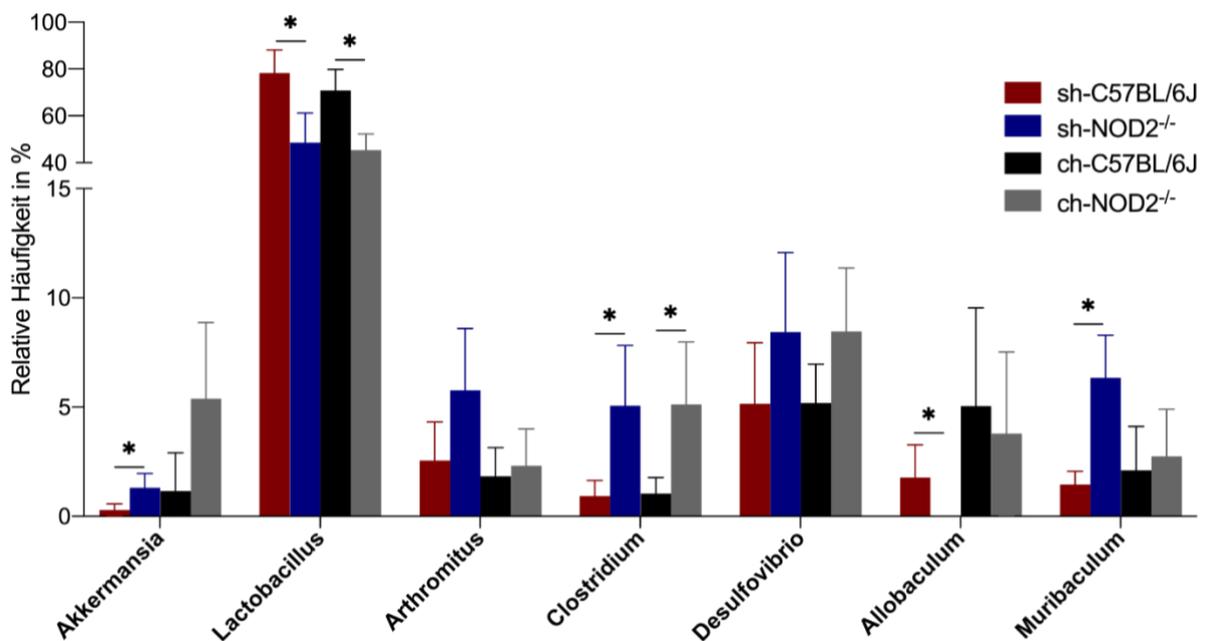


Abb. 29 Relative Häufigkeit der häufigsten Genus in %
ch=Co-Housing, n=5, *p<0,05

3.6 Zusammenfassung C57BL/6J gegen NOD2^{-/-}

Der intrazelluläre Peptidoglykanrezeptor NOD2 stellt eine wichtige Schnittstelle zwischen dem intestinalen Mikrobiom und dem Immunsystem (einschließlich der angeborenen, T_H1, T_H2, sowie T_H17 Immunantwort) dar (Girardin et al., 2003). Der Rezeptor ist an der Regulation der Menge und Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota sowie der bakteriellen Translokation beteiligt (Caruso et al., 2014; Geddes et al., 2011; Su et al., 2009).

Die NOD2-defizienten Mäuse wiesen im Vergleich mit C57BL/6J nach i.p. Injektion von OVA einen signifikant stärkeren und prolongierten Temperaturabfall auf. Neben der stärkeren anaphylaktischen Reaktion zeigte sich im Überstand der T-Zellen der mesenterialen Lymphknoten nach Restimulation bei NOD2^{-/-} eine signifikant höhere Konzentration von IL-4 und IL-13 und somit eine präferentielle T_H2-Polarisierung der lokoregionären Immunantwort im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe. In der Analyse der Zytokine aus dem Überstand der restimulierten T-Zellen der Milz war lediglich IL-10 bei NOD2^{-/-} signifikant höher, sodass von einer lokalen Veränderung des Immunsystems auszugehen ist.

Um den Einfluss des intestinalen Mikrobioms in der Sensibilisierungsphase zu untersuchen, wurde vier Wochen vor Beginn der Sensibilisierung ein Co-Housing etabliert und über den gesamten Zeitraum des Experiments aufrechterhalten.

Die NOD2^{-/-}-Mäuse zeigten nach Co-Housing keinen stärkeren oder prolongierten Temperaturabfall mehr. Die Temperaturkurven nach Challenge von ch-NOD2^{-/-} und ch-C57BL/6J verliefen nahezu identisch und wiesen zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede auf.

In der Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen sh-NOD2^{-/-} und sh-C57BL/6J auf allen analysierten Ebenen der Taxonomie. Nach dem Co-Housing blieben nur noch vereinzelte signifikante Unterschiede auf der Ebene der Familien und Genus. Dabei blieb das Mikrobiom der Wildtyp-Mäuse weitgehend konstant und das Mikrobiom der ch-NOD2^{-/-} Mäuse näherte sich daran an.

D Diskussion

Der menschliche Verdauungstrakt ist von Mikroorganismen besiedelt, die bei der Verdauung, Nährstoffaufnahme und Stoffwechsel von essenzieller Bedeutung sind. Darüber hinaus trägt das Darmmikrobiom zum Aufbau und Erhalt der intestinalen epithelialen Barriere bei und verhindert die Expansion pathogener Mikroorganismen (Honda & Littman, 2012). Studien an keimfreien Mäusen haben gezeigt, dass das Mikrobiom für die Entwicklung des Immunsystems von zentraler Bedeutung ist. Das mukosale Immunsystem ist bei keimfreien Mäusen mit einer reduzierten Anzahl von Peyer Plaques, die zudem weniger Keimzentren enthalten, unterentwickelt. Die Anzahl der IgA-produzierenden Plasmazellen und CD4⁺ T-Zellen der Lamina Propria sind ebenfalls stark reduziert (Macpherson et al., 2001). Die Veränderungen durch das Fehlen des Mikrobioms sind jedoch nicht auf die lokale Immunantwort beschränkt, sondern betreffen auch Milz und Lymphknoten mit unterentwickelten B- und T-Zell-Zonen sowie abnormaler Morphologie der Venolen (Bauer et al., 1963). Die beschriebenen Veränderungen sind reversibel innerhalb einiger Wochen durch Kolonialisierung mit kommensalen Bakterien (Honda & Littman, 2012).

Bislang ist es noch nicht gelungen herauszufinden, wie genau ein eubiotisches Mikrobiom charakterisiert ist. Daher ist es schwierig klar zu definieren was eine Dysbalance bzw. Dysbiose ausmacht (Tiffany & Baumler, 2019). Dysbiose kann als eine Veränderung in der Funktion und Zusammensetzung der Mikrobiota von erkrankten Individuen im Vergleich zu Gesunden beschrieben werden (Levy et al., 2017). Es kann sich dabei um den Verlust von nützlichen Mikroorganismen, um die Expansion potentiell schädlicher Mikroben oder um den Verlust der mikrobiellen Vielfalt handeln (Petersen & Round, 2014).

Inzwischen wird bei einer wachsenden Zahl von Erkrankungen eine Assoziation mit dysbiotischer Mikrobiota vermutet. Bei der Pathophysiologie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wird einem dysbiotischen Mikrobiom sogar eine zentrale Rolle zugeschrieben (Ni et al., 2017). Auch Nahrungsmittelallergien werden zunehmend als Dysbiose-assoziierte Erkrankungen gewertet. Dabei scheint vor allem die Besiedelung in frühen Lebensjahren von entscheidender Bedeutung zu sein. Die entscheidenden mikrobiellen Veränderungen wurden jedoch bislang noch nicht genau identifiziert (Zimmermann et al., 2019).

1. Vergleich C57BL/6J und N

Die Substämme C57BL/6J und N finden in weiten Teilen der immunologischen Forschung Verwendung. Sie gehen auf einen gemeinsamen Ursprung (C57BL/6) zurück, jedoch bestehen genetische Unterschiede zwischen C57BL/6J und C57BL/6N, welche funktionell relevant sind und unter anderem die Immunreaktion betreffen (Sadler et al., 2017). So zeigte C57BL/6J bei Dinitrofluorobenzene (DNFB)-induzierter Kontaktdermatitis, als Modell für T_H1/T_H17 -Immunantwort, eine signifikant stärkere Reaktion im Vergleich zur N Linie (Simon et al., 2013). Des Weiteren wurde beschrieben, dass C57BL/6J und C57BL/6N, die von verschiedenen Händlern bezogen wurden, deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms aufweisen. Zudem zeigten sich funktionelle Veränderungen in der T-Helfer-Zell-Polarisation, die nach Rekolonisierung durch Co-Housing nicht mehr bestanden. Die Herkunft der Versuchstiere beeinflusst damit über das Mikrobiom deren Immunantwort (Sadler et al., 2017; Simon et al., 2013). Funktionell relevante Unterschiede bestehen nicht nur zwischen C57BL/6J und C57BL/6N, sondern betreffen auch andere Substämme. Ge et al. zeigten, dass Black six aus Jackson (J) und Taconic (Tac) distinkte Mikrobiota aufweisen. Dies führte zu einer unterschiedlichen pathologischen, immunologischen und mikrobiellen Antwort auf eine Infektion mit *Helicobacter pylori* (Ge et al., 2018).

Trotz dieser Erkenntnisse werden in der Praxis der Substamm sowie die Herkunft der Tiere nicht standardisiert (Fontaine & Davis, 2016). Dabei könnten sowohl die genetischen, als auch die mikrobiellen Veränderungen die Funktionalität je nach Kontext signifikant beeinflussen (Ge et al., 2018; Sadler et al., 2017; Simon et al., 2013).

Ziel der Arbeit war es Einflüsse der genetischen Unterschiede zwischen C57BL/6J und N auf die T_H2 Immunantwort in einem etablierten Nahrungsmittelallergiemodell zu detektieren. Dabei sollte es nicht zu einer Vermischung der Einflüsse Genetik und Mikrobiom kommen. Daher wurden die die Herkunft und Haltungsbedingungen für alle Tiere maximal standardisiert. Die Mäuse wurden beim selben Händler gekauft, um den Einfluss der Herkunft auszuschließen. Alle Tiere wurden im selben Isolator gehalten und erhielten das gleiche Futter und Wasser. Da das intestinale Mikrobiom eine zentrale Rolle bei der Entstehung allergischer Reaktionen spielt kann nur so eine valide Aussage über die Auswirkungen der genetischen Unterschiede getroffen werden.

Interessanterweise zeigte die Analyse der Mikrobiomproben trotz der standardisierten Herkunfts- und Haltungsbedingungen erhebliche Unterschiede zwischen C57BL/6J und N auf.

C57BL/6N wies in Colon und Ileum eine höhere beta-Diversität auf und es zeigten sich vor allem im Ileum Unterschiede in der Zusammensetzung des Mikrobioms auf Phylum, Familien und Genus Ebene.

Im Gegensatz zu den signifikanten Abweichungen in der Analyse der Mikrobiomproben zeigten sich in der Stärke der Anaphylaxie keine Unterschiede zwischen C57BL/6J und N. Der Temperaturabfall nach Challenge wies zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede auf und auch die Analyse der Zytokine ergab lediglich bei IL-10 und IL-13 in den mesenterialen Lymphknoten signifikante Unterschiede. Die wichtigsten T_H2 Zytokine IL-4 und IL-5 wiesen keine Unterschiede auf.

Trotz der genetischen Differenzen und der distinkten Mikrobiota ergaben sich keine funktionellen Unterschiede zwischen C57BL/6J und N in dem untersuchten Nahrungsmittelallergiemodell.

1.1 Unterschiede des intestinalen Mikrobioms von C57BL/6J und N

Für die Interaktion von Mikrobiom und Immunsystem ist das Colon von geringer Bedeutung, da dort die Enterozyten durch zwei Muzinschichten von der Mikrobiota getrennt sind, wobei die innere der beiden Schichten für Bakterien impermeabel ist. Im Gegensatz dazu ist die einfache Muzinschicht des Dünndarms für Bakterien überwindbar, sodass diese mit Enterozyten und Immunzellen interagieren können (Johansson et al., 2011). Darüber hinaus ist der Dünndarm der entscheidende Ort der Sensibilisierung im Darm, da hier die Aufnahme der Antigene stattfindet (Mowat & Agace, 2014). Aus diesen Gründen bezieht sich die Interpretation der Mikrobiomanalyse im Folgenden auf die Ileum-Proben.

Es wurde gezeigt, dass eine veränderte intestinale Mikrobiota bei der Entstehung von Nahrungsmittelallergien eine wichtige Rolle spielt (Noval Rivas et al., 2013). Bereits 1997 konnte nachgewiesen werden, dass eine intestinale Besiedelung mit Bakterien für die Toleranzentwicklung nötig ist (Sudo et al., 1997). Keimfreie Mäuse weisen eine sehr starke allergische Disposition auf, die nach Rekolonisation nicht mehr besteht (Stefka et al., 2014). Mithilfe von Studien an keimfreien Mäusen wurden einzelne entscheidende Bestandteile des Mikrobioms identifiziert, die vor der Allergieentstehung schützen. Dabei erwiesen sich sporenbildende *Clostridien* aus der Klasse der *Firmicutes* als entscheidende protektive Faktoren (Stefka et al., 2014). Die Besiedelung mit *Clostridien* induziert die Produktion von IL-22 in ILC3 Zellen. IL-22 stärkt die epitheliale Barriere durch Regulation der Mukussekretion und Produktion antimikrobieller Peptide in Paneth Zellen. Als Vertreter der *Clostridien* wurden *Lachnospiraceae* und *Ruminococcaceae* eingesetzt (Sabat et al., 2014; Stefka et al., 2014). Die *Firmicutes* machten sowohl bei C57BL/6J als auch C57BL/6N den mit Abstand größten Anteil aus und unterschieden sich nicht zwischen den beiden Gruppen. *Lachnospiraceae* und *Ruminococcaceae* waren ebenfalls bei beiden Gruppen ähnlich stark vertreten.

Ein interessanter Aspekt der Ergebnisse der Mikrobiomanalyse ist die Häufigkeitsverschiebung der *Lactobacillus*-Stämme, denn die *Lactobacillaceae* spielen in der biomedizinischen Forschung an Probiotika eine zentrale Rolle (Azad et al., 2018). Probiotika werden von der WHO und FAO definiert als lebende Mikroorganismen, die, in adäquaten Mengen aufgenommen, dem Wirt einen gesundheitlichen Nutzen bieten. Der Nutzen von Probiotika wird für diverse Krankheiten erforscht, unter anderem für allergische Erkrankungen. Dabei ist es bislang noch nicht gelungen, wirkungsvolle Bakterienstämme oder deren Kombinationen zu identifizieren (Cuello-Garcia et al., 2015). Daran wird deutlich, wie schwierig es ist genau

herauszuarbeiten welche Bestandteile des Mikrobioms einen gesundheitlichen Nutzen für den Wirt vermitteln.

Die hier beobachtete Veränderung der Häufigkeit der einzelnen *Lactobacillus*-Stämme führten nicht zu einer Veränderung der Stärke der Anaphylaxie. Es kann daher postuliert werden, dass die funktionell relevanten Effekte eher von mehreren Mitgliedern der *Lactobacillaceae* vermittelt werden. Eine Häufigkeitsverschiebung dieser *Lactobacillaceae* führt dann nicht zu funktionellen Veränderungen. Daran lässt sich eine zentrale Herausforderung der Mikrobiomforschung darstellen. In dem komplexen Netzwerk des Mikrobioms ist es sehr schwierig positive Effekte auf einzelne Bakterienstämme zurückzuführen. Im Tierexperiment werden deswegen keimfreie Mäuse eingesetzt, an denen einzelne Bakterienstämme isoliert getestet werden können. Das kann ein erster Schritt zur Identifikation einzelner Stämme sein, jedoch ist nicht garantiert, dass die Effekte an keimfreien Mäusen in dem komplexen System der physiologischen Mikrobiota in gleicher Weise bestehen.

Eine weitere interessante Veränderung zeigte sich bei *A. muciniphila*, das bei C57BL/6J signifikant häufiger vorkam als bei C57BL/6N. *A. muciniphila* ist ein Gram-negatives, anaerobes Bakterium, das unter anderem die intestinale Barriere durch direkte Interaktion mit Enterozyten und Beeinflussung der Muzinproduktion verstärkt (Reunanen et al., 2015). In 2.4 wird genauer auf die Eigenschaften von *A. muciniphila* eingegangen. Die Unterschiede im Vorkommen von *A. muciniphila* zwischen C57BL/6J und N haben im untersuchten Nahrungsmittelallergiemodell interessanterweise keinen messbaren Einfluss. Wie im Kapitel 2.3 diskutiert, scheint *A. muciniphila* bei NOD2^{-/-}-Mäusen jedoch durchaus einen relevanten Effekt zu haben. Das macht deutlich, dass die Interpretation eines Mikrobioms den zugehörigen Wirt mit einbeziehen muss. Dessen Genetik beeinflusst die Interaktion von Wirt und Mikrobiom wesentlich.

Die Ergebnisse zeigen, dass Mikrobiomanalysen im Zusammenhang mit funktionellen, klinischen Daten betrachtet werden müssen. Die Definition von Dysbiose, als Veränderung bei erkrankten Individuen im Vergleich zu gesunden, macht die Relevanz der Klinik deutlich. Durch rein deskriptive Interpretation der Mikrobiota können deren funktionelle Auswirkungen nicht vollumfänglich abgeschätzt werden. Hier wurde gezeigt, dass in der deskriptiven Mikrobiomanalyse signifikante Unterschiede bestehen können, die funktionell von untergeordneter Rolle sind.

1.2 Auswirkung der genetischen und mikrobiellen Unterschiede auf Versuchsdesign und-interpretation

Es ist mittlerweile akzeptiert, dass das intestinale Mikrobiom eine zentrale Determinante der Immunantwort im Darm ist (Nishida et al., 2018). Auch bei Krankheitsmodellen, welche nicht dezidiert das Mikrobiom untersuchen, kann der Einfluss des Mikrobioms im Tiermodell eine entscheidende Rolle spielen (Laukens et al., 2016). Aufgrund dieser Erkenntnisse ist es von großer Bedeutung, das Mikrobiom als relevanten Faktor miteinzubeziehen, um Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit in Tierversuchen gewährleisten zu können (Bleich & Hansen, 2012).

Dabei gibt es mehrere Konstellationen, die in Betracht gezogen werden müssen. Das Mikrobiom von zwei zu vergleichenden Gruppen kann funktionell ähnlich aber morphologisch unterschiedlich sein. Es kann jedoch auch funktionell unterschiedlich und morphologisch unterschiedlich sein. Diese Überlegungen sollten sowohl bei dem Versuchsdesign, der Auswahl der Tiere sowie Kontrollgruppen, als auch bei der Interpretation bedacht werden.

Falls 'Knockout-Mäuse' verwendet werden, muss der genetische Background bei der Auswahl geeigneter Kontrollgruppen beachtet werden, da zwischen den Substämmen mikrobielle und genetische Unterschiede bestehen können. Wenn der genetische Hintergrund nicht beachtet wird, ist die Vergleichbarkeit nicht sicher gewährleistet.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass nur unter sorgfältiger Auswahl der Versuchstiere und durch eine Versuchsplanung unter den Gesichtspunkten Genetik und Mikrobiom Vergleichbarkeit gewährleistet ist.

2. NOD2 als kritischer intestinaler PRR

NOD2 ist ein intrazellulärer Rezeptor für Muramyldipeptide, ein Abbauprodukt von Peptidoglykanen, die in den Zellwänden von sowohl Gram-positiven als auch -negativen Bakterien vorkommen (Girardin et al., 2003; Inohara et al., 2003). Der Rezeptor ist an der Regulation der angeborenen sowie erworbenen Immunität beteiligt (Kobayashi et al., 2005; Ogura, Bonen, et al., 2001). Aus einer Vielzahl von Studien an Mäusen sowie Menschen ist bekannt, dass NOD2 eine Schlüsselrolle für die Homöostase des intestinalen Mikrobioms und des intestinalen Immunsystems spielt. Die genauen Mechanismen dahinter sind noch nicht vollständig verstanden.

NOD2 nimmt in der Regulation der adaptiven Immunantwort eine differenzierte Funktion ein. Die Dosis des aktivierenden Liganden, der Zeitpunkt der Aktivierung und das experimentelle Setting beeinflussen die Qualität der durch NOD2-Aktivierung ausgelösten adaptiven Immunantwort in vivo (Prescott et al., 2020). Außerdem ist die Co-Aktivierung anderer Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, vor allem TLR, durch MAMPs und PAMPs eine weitere entscheidende Determinante für die folgende Immunantwort (Volz et al., 2012).

Aufgrund der Schlüsselrolle von NOD2 für die Homöostase der intestinalen Mikrobiota sowie für die differenzierte Regulation der Immunantwort führt NOD2-Defizienz zu weitreichenden Veränderungen. Verglichen mit Wildtyp-Mäusen zeigen NOD2-defiziente Mäuse eine dysbiotische Mikrobiota (Ramanan et al., 2014), die auch nach Embryotransfer von NOD2^{-/-} in Wildtyp Mäuse weiter besteht (Al Nabhani et al., 2016). Im Falle von NOD2-Defizienz interagiert eine dysbiotische intestinale Mikrobiota mit einem veränderten Immunsystem. Dieser Zusammenhang spielt in der Pathophysiologie von Morbus Crohn eine zentrale Rolle (Glassner et al., 2020). Genetische Veränderungen des NOD2-Rezeptors sind beim Menschen jedoch nicht nur mit M. Crohn, sondern auch mit allergischen Erkrankungen assoziiert (Kabesch et al., 2003). Und analog zu M. Crohn ist auch bei der Entstehung von Nahrungsmittelallergien die intestinale Dysbiose ebenfalls ein zentraler Faktor. Mehrere Studien konnten zeigen, dass fäkale Dysbiose bei menschlichen Säuglingen mit Nahrungsmittelallergien assoziiert ist (Rutten et al., 2015). Eubiotische Mikrobiota ist hingegen essenziell für die Entwicklung immunologischer Toleranz gegenüber Nahrungsmittelantigenen (Lathrop et al., 2011). Die funktionelle Relevanz der Dysbiose und der veränderten Immunantwort durch NOD2-Defizienz wurde bislang für Nahrungsmittelallergien noch nicht untersucht.

NOD2^{-/-} Mäuse wurden hier als Modell für Dysbiose während der Sensibilisierungsphase allergischer Reaktionen verwendet. Untersuchungen an diesem Modell sollen zu einem besseren Verständnis des Einflusses des intestinalen Mikrobioms auf die Allergieentstehung beitragen. Dahinter steht die Suche nach wirkungsvollen Methoden zur Therapie und Prävention der Nahrungsmittelallergie, die bislang nicht existiert. Dabei stellt die Modulation des intestinalen Mikrobioms einen vielversprechenden Ansatz dar.

2.1 Differentielle Rolle von NOD2 in der Orchestrierung der adaptiven

Immunantwort

Als Grundlage für folgende Experimente sollten zunächst die NOD2^{-/-} Mäuse in einem gängigen Nahrungsmittelallergiemodell bezüglich ihrer anaphylaktischen Reaktion und T_H2 Polarisierung mit Wildtyp-Mäusen verglichen werden. Als Vergleichsgruppe wurden C57BL/6J Mäuse verwendet, entsprechend dem genetischen Hintergrund der NOD2-Knockoutlinie. Um die Stärke der anaphylaktischen Reaktion zu vergleichen, wurde die Körpertemperatur alle sieben Minuten gemessen. Der Abfall der Körpertemperatur korreliert mit der Stärke der anaphylaktischen Reaktion.

Der Temperaturabfall nach Auslösen der Anaphylaxie war bei den NOD2^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen signifikant verstärkt und prolongiert. Passend dazu ergab die Zytokinanalyse in den mesenterialen Lymphknoten eine signifikant stärkere T_H2-Polarisierung nach oraler Sensibilisierung. In den lokoregionären Lymphknoten findet der Kontakt der naiven T-Zellen mit dem Antigen statt (Reboldi et al., 2016). Welche T-Helferzell-Phänotypen daraufhin gebildet werden, determiniert ob eine tolerogene oder allergische Reaktion entsteht (Schiavi et al., 2015). Damit sind die mesenterialen Lymphknoten ein entscheidender Ort der Sensibilisierung.

Die Rolle von NOD2 in der adaptiven Immunantwort ist im Gegensatz zur angeborenen Immunantwort noch nicht ausreichend erforscht. In mehreren murinen Infektionsmodellen wurde nachgewiesen, dass NOD1 und NOD2 eine Schlüsselrolle für eine adäquate Expression pro-inflammatorischer Zytokine und für die T_H1 Antwort spielen (Mukherjee et al., 2019).

Magalhaes et al. untersuchten die Rolle von NOD2 für die T-Zell-Antwort auf Antigene. Dabei wurden die Tiere durch Injektion mit OVA sensibilisiert, also ohne ein besiedeltes Oberflächenorgan zu involvieren. NOD2-defiziente Mäuse entwickelten in diesem Modell eine schwächere T_H2 Reaktion (Magalhaes et al., 2008). Zudem wurde die Rolle von NOD2 auf die Toleranzentwicklung in den Atemwegen (besiedelte Oberfläche) in einem Tiermodell untersucht. Den Mäusen wurde intranasal ein NOD2-Ligand sowie OVA als Modellantigen verabreicht. Die NOD2-Aktivierung blockierte über die Induktion von TSLP, IL-25 und OX40 in der Lunge die Toleranzentwicklung gegen das Antigen und führte zur Ausbildung einer Th2-Immunantwort (Duan et al., 2010).

Im Gegensatz zu unserem verwendeten Nahrungsmittelallergiemodell fand in allen Versuchsansätzen der beiden letztgenannten Publikationen zu keinem Zeitpunkt eine

intestinale Exposition gegenüber dem Antigen statt. Bei der Sensibilisierung gegen Nahrungsmittelantigene ist der Kontakt des Antigens mit dem intestinalen Immunsystem jedoch von großer Relevanz. Wesemann und Nagler postulierten mit ihrer Barrierehypothese, dass für die Entwicklung und den Erhalt der Toleranz gegenüber Nahrungsmittelantigenen eine durch kommensale Bakterien gestärkte intestinale epitheliale Barriere notwendig ist. Diese minimiert den Eintritt des Antigens in die systemische Zirkulation und gewährleistet so eine tolerogene Immunantwort (Wesemann & Nagler, 2016).

Die Darmbarriere besteht aus mehreren Komponenten, die eine funktionelle Einheit bilden. Sie wird gebildet von der epithelialen Barriere, der Darmmikrobiota, der Mukusschicht, dem angeborenen und adaptiven Immunsystem, dem intestinalen vaskulären und lymphatischen System und dem intestinalen endokrinen System (Graziani et al., 2019).

NOD2-Defizienz beeinflusst gleich mehrere Komponenten der Barriere. Zunächst führt das Fehlen von NOD2 zu einer Schwächung der chemischen Barriere durch verminderter Sekretion antimikrobieller Peptide in Paneth Zellen (Al Nabhani et al., 2017). Außerdem ist die Mucinproduktion in den intestinalen Becherzellen bei NOD2-Defizienz eingeschränkt (Ramanan et al., 2014). In Peyer Plaques sowie Follikel-assoziiertem Epithel führt NOD2-Defizienz zu mehr CD4+ T-Zellen und erhöhten Spiegeln von T_H1 - und T_H2 -Zytokinen. Diese Veränderungen führen wiederum zu verstärkter parazellulärer Permeabilität und Translokation von Bakterien (Graziani et al., 2019; Jung et al., 2010). Wesemann und Nagler betonen zudem die zentrale Wichtigkeit der eubiotischen kommensalen Mikrobiota für eine intakte intestinale Barriere (Wesemann & Nagler, 2016) und die Zusammensetzung des intestinalen Mikrobioms ist durch das Fehlen des NOD2-Rezeptors ebenfalls verändert (Ramanan et al., 2014). Das Fehlen des NOD2-Rezeptors schwächt über mehrere Mechanismen die intestinale Barriere und führt damit zu vermehrtem Eintritt von Antigenen in die systemische Zirkulation.

Wenn Antigene die intestinale Barriere durchdringen, führt das zu gesteigertem epitheliale Stress, der wiederum eine T_H2 -polarisierte Immunantwort begünstigt (Pulendran & Artis, 2012; Strid et al., 2011), denn die T_H2 -Immunantwort aktiviert auch Signalwege zur Wiederherstellung der epithelialen Integrität (Pulendran & Artis, 2012). Welche Veränderungen der Barriere genau ausschlaggebend für die Allergieentstehung sind, ist bislang noch nicht geklärt (Wesemann & Nagler, 2016).

In den von Magalhaes et al. sowie Duan et al. verwendeten Modellen zur Untersuchung des Einflusses von NOD2 auf die T_H2 Immunität wurden die Auswirkungen der genannten Veränderungen der intestinalen Barriere nicht erfasst. Zudem spielt bei intestinalem Kontakt mit dem Antigen, im Gegensatz zu intranasaler sowie intraperitonealer Sensibilisierung, die Aktivierung weiterer Rezeptoren des innate Immunsystem durch das intestinale Mikrobiom eine entscheidende Rolle. Es ist bekannt, dass die Co-Aktivierung verschiedener innater Rezeptoren durch mikrobielle Bestandteile die folgende Immunantwort maßgeblich beeinflusst (Volz et al., 2012). Des Weiteren spielt die Dauer der Aktivierung eine entscheidende Rolle. Chronische NOD2-Stimulation führt über den mTOR Signalweg zu Hemmung der inflammatorischen Zytokinantwort und somit zu Toleranzentwicklung (Hedl & Abraham, 2011). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass NOD2 in der adaptiven intestinalen Immunantwort eine sehr differenzierte, orchestrierende Funktion einnimmt und dass NOD2-Defizienz weitreichende Veränderungen mit sich bringt.

In dem hier verwendeten Nahrungsmittelallergiemodell führte NOD2-Defizienz zu stärkerer anaphylaktischer Reaktion sowie präferenzialer T_H2-Polarisierung in den lokoregionären Lymphknoten im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe. Ein maßgeblicher ursächlicher Faktor könnte dabei die Schwäche der intestinalen Barriere darstellen.

2.2 Mikrobiota-Transfer zwischen NOD2^{-/-} und C57BL/6J reduziert die Stärke der Anaphylaxie bei NOD2-Knockoutmäusen

Die NOD2-defizienten Mäuse zeigten im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle stärkere anaphylaktischen Reaktionen. Im nächsten Schritt wurden NOD2^{-/-}-Mäuse vor Beginn der Sensibilisierung durch Co-Housing gegenüber einem Wildtypmikrobiom exponiert, um die intestinale Dysbiose zu modulieren. Zudem wurden parallel die Vergleichsgruppen sh-C57BL/6J und sh-NOD2^{-/-} im selben Isolator wie die Co-Housing-Mäuse, jedoch in getrennten Käfigen, gehalten.

Nach Co-Housing zeigten NOD2^{-/-}-Mäuse anaphylaktische Reaktionen, die gleich stark waren wie die ihrer Wildtyp-Käfiggenossen und signifikant schwächer als die von NOD2^{-/-} ohne Co-Housing.

Die in den Vorexperimenten gemessenen stärkeren und prolongierten anaphylaktischen Reaktionen der sh-NOD2^{-/-}-Mäuse waren nach Co-Housing nicht mehr zu beobachten. Ch-NOD2^{-/-}-Mäuse zeigten einen deutlich geringeren Temperaturabfall als sh-NOD2^{-/-}. Eine nicht-invasive Modulation der Dysbiose durch Exposition gegenüber einem Wildtyp-Mikrobiom schützt, trotz bestehender genetischer Veränderung, in unserem Modell vor der verstärkten Allergieentwicklung. Unsere Ergebnisse zeigten, dass Co-Housing von NOD2^{-/-}-Mäusen mit Wildtyp-Mäusen zu einer effektiven Modulation der intestinalen Mikrobiota führt. Damit übereinstimmend finden sich in der Literatur einige Beispiele (Robertson et al., 2013; Shanahan et al., 2014). Besonders hervorzuheben ist an den von uns hier gezeigten Daten, dass nicht nur die Mikrobiota, sondern auch die klinische Reaktion untersucht wurden. Nachdem noch nicht geklärt ist, was genau eine Eubiose bzw. Dysbiose ausmacht, kann nur durch die Klinik die Relevanz der mikrobiellen Veränderung durch Co-Housing beurteilt werden.

Das Zusammenspiel der dysbiotischen Mikrobiota mit den immunologischen Veränderungen bei NOD2-Defizienz ist noch nicht genau entschlüsselt. Shanahan et al. untersuchten die Auswirkungen von NOD2-Defizienz auf die Sekretion antimikrobieller Peptide bei NOD2^{-/-} Mäusen nach Co-Housing mit Wildtypmäusen. Die Knockoutmäuse zeigten bei dieser Haltungform lediglich minimale mikrobielle Unterschiede im Vergleich zu ihren Käfiggenossen. NOD2^{-/-} und C57BL/6 unterschieden sich zudem nicht in der Sekretion antimikrobieller Peptide in Paneth Zellen (Shanahan et al., 2014). Bei getrennter Haltung weisen NOD2^{-/-} Mäuse hingegen eine deutliche Einschränkung der Expression antimikrobiellen

Peptide auf (Kobayashi et al., 2005). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die intestinale Mikrobiota einen entscheidenden Einfluss vermittelt auf die intestinale Immunantwort.

Es gibt jedoch auch Daten, die zeigen, dass das Fehlen des NOD2-Rezeptors auch ohne mikrobielle Veränderungen funktionell relevant ist. NOD2-Knockoutmäusen wurde Knochenmark von Wildtyp-Mäusen transplantiert- und vice versa. Das Fehlen von NOD2 in hämatopoetischen Zellen erwies sich dabei als der entscheidende Faktor für die epitheliale Barrierefunktion und GALT-Homöostase (Alnabhani et al., 2016). Die genannte Studie untersuchte jedoch nicht die regulatorischen T-Zellen oder die Expression ihrer Zytokine und zeigt damit kein vollständiges Bild.

Das Zusammenspiel von Mikrobiom und den genetischen Veränderungen bei NOD2-Defizienz ist, gerade im Kontext der allergischen Erkrankungen, noch nicht ausreichend verstanden. Wir konnten zeigen, dass eine Modulation der Dysbiose einen relevanten Effekt auf die Stärke der Anaphylaxie hatte.

2.3 Charakterisierung der intestinalen Mikrobiota

Es wurden Proben aus dem Ileum von sh- und ch-NOD2^{-/-} sowie sh- und ch-C57BL/6J analysiert. Die sh-Gruppen dienten dabei als Kontrollgruppen.

In der Analyse des intestinalen Mikrobioms wiesen die sh-NOD2^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu sh-C57BL/6J Mäusen signifikant distinkte Mikrobiota auf. Die Interventionsgruppen ch-NOD2^{-/-} und ch-C57BL/6J hingegen zeigten nur noch geringfügige Unterschiede.

Die alpha-Diversität, die die Artenvielfalt abbildet, wies keine Unterschiede zwischen NOD2^{-/-} und C57BL/6J Mäusen aller Gruppen auf. Bei der Beta-Diversität zeigten sich bei den Vergleichsgruppen ohne Co-Housing signifikante Unterschiede, die nach Co-Housing nicht zu beobachten waren.

In der Literatur finden sich zur Diversität der intestinalen Mikrobiota von NOD2-Knockoutmäusen unterschiedliche Angaben. Die Vergleichbarkeit der Daten ist durch unterschiedliche Probenentnahme (Colon, Ileum, Fäzes) und Analysemethoden nur eingeschränkt gegeben. Des Weiteren werden als Referenz manchmal Wildtyp-Tiere aber auch F2 Käfiggenossen und andere Mauslinien verwendet (Philpott et al., 2014). Zudem beeinflusst das Alter der Tiere die mikrobielle Diversität, was die Vergleichbarkeit noch zusätzlich erschwert (Rehman et al., 2011).

Trotz der beschriebenen erschwerten Vergleichbarkeit zeigte sich in unseren Analysen des Mikrobioms von NOD2^{-/-} ein ähnliches Bild wie in der Literatur beschrieben. Im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen wiesen die NOD2^{-/-} Mäuse auf Phylum Ebene ein erhöhtes Vorkommen von *Bacteroidetes* und einen geringeren Anteil von *Firmicutes* auf. Trotz der unterschiedlichen Bedingungen erwiesen sich die Veränderungen bei NOD2^{-/-} als robust (Petnicki-Ocwieja et al., 2009; Ramanan et al., 2014; Rehman et al., 2011). Diese Veränderungen waren nach dem Co-Housing bei NOD2^{-/-} nicht mehr zu beobachten. Mit dem Nachweis des Fehlens signifikanter Unterschiede zwischen NOD2^{-/-} und Wildtyp-Mäusen nach dem Co-Housing bestätigen wir bereits beschriebene Daten (Robertson et al., 2013; Shanahan et al., 2014).

Auf Familien Ebene zeigte sich ebenfalls eine Verschiebung der Zusammensetzung des Mikrobioms der NOD2^{-/-} Mäuse in Richtung der Wildtyp-Kontrollgruppe.

Durch unterschiedliche Haltungsbedingungen, Herkunft der Versuchstiere, Analysemethoden sowie dem Darmabschnitt, aus dem die Probe entnommen wurde, ist die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Mikrobiomanalysen an NOD2^{-/-} Mäusen mit bestehenden Daten nur sehr eingeschränkt gewährleistet. Trotz der vielen unterschiedlichen beeinflussenden

Umweltfaktoren wurde bei Co-Housing-Experimenten ein reproduzierbarer und robuster Effekt beobachtet. Durch Co-Housing von NOD2^{-/-} und C57BL/6J Mäusen glich das Mikrobiom der Knockoutmäuse sich an das der Wildtypmäuse an. Dabei erwies sich das Mikrobiom der Wildtypmäuse als stabil und die Dysbiose der NOD2-Knockoutmäuse als instabil (Robertson et al., 2013; Shanahan et al., 2014).

Im Gegensatz zur Phylum Ebene ist es auf Genus Ebene aufgrund der Umwelteinflüsse in der Versuchstierhaltung noch nicht gelungen nachzuweisen, welche Bakterien durch NOD2-Defizienz beeinflusst werden (Al Nabhani et al., 2017). Im Folgenden wurden die Veränderungen des Co-Housing auf Genus Ebene genauer analysiert. Dabei sollten die Bakterien identifiziert werden, die für die funktionelle Veränderung durch Co-Housing verantwortlich sein könnten und eine „protektive“ Wirkung vermitteln.

Über einige der Genus ist allerdings bislang sehr wenig bekannt. Die Genus *Allobaculum* und *Muribaculum* sind bei ch-NOD2^{-/-} deutlich mehr vorhanden als bei sh-NOD2^{-/-}. *Allobaculum* ist ein Gram-negatives, strikt anaerobes Bakterium aus der Familie der Erysipelotrichaceae, das bislang noch nicht näher charakterisiert wurde. *Muribaculum* gehört zur Familie der *Porphyromonadaceae* und ist ebenfalls bislang nicht genauer untersucht worden.

Im Gegensatz dazu ist das Gram-negative Bakterium *A. muciniphila* in der Forschung an metabolischen Erkrankungen, aber auch in anderen Bereichen, von großem Interesse und wird als vielversprechendes Probiotikum angesehen. Interessanterweise verdoppelt sich die relative Häufigkeit von *A. muciniphila* bei ch-NOD2^{-/-} im Vergleich zu sh-NOD2^{-/-}. Es erhöht bei Mäusen die Integrität der intestinalen Barriere wahrscheinlich durch direkte Interaktion mit Enterozyten (Everard et al., 2013; Reunanen et al., 2015). Dieser Effekt wurde nicht nur in Mäusen, sondern bereits auch in Studien an Menschen beobachtet. Die Verabreichung von pasteurisierten *A. muciniphila* führte zu geringeren LPS-Spiegeln im Serum der Probanden als Marker für eine stabilere intestinale Barriere (Depommier et al., 2019). Zudem wirkt *A. muciniphila* durch die Fähigkeit zur Regulation der Muzinschicht fördernd auf die intestinale Barriere. *A. muciniphila* besitzt einerseits die katalytischen Eigenschaften, um Muzine abzubauen, kann jedoch auch die Muzinproduktion anregen und erhält so die Muzinschicht (Shanahan et al., 2014). Diese Effekte könnten bei NOD2^{-/-} von besonderer Relevanz sein, da durch das Fehlen von NOD2 das Vorkommen und die Funktion der Becherzellen eingeschränkt ist (Ramanan et al., 2014). Die dadurch herabgesetzte Barrierefunktion könnte durch den Einfluss von *A. muciniphila* kompensiert werden.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass orale Gavage mit *A. muciniphila* in Mäusen die Ausschüttung des antimikrobiellen Peptids Reg3 γ erhöht (Hanninen et al., 2018). Die Sekretion antimikrobieller Peptide ist für die Homöostase der intestinalen Mikrobiota von zentraler Bedeutung und ist bei NOD2-Defizienz herabgesetzt (Al Nabhani et al., 2017).

Neben den positiven Effekten für die intestinale Barriere ist bekannt, dass *A. muciniphila* auch direkt das Immunsystem des Wirts beeinflussen kann. Derrien et al. zeigten, dass die Besiedelung mit *A. muciniphila* durch Modifikation intestinaler Genexpression zu Immuntoleranz gegenüber der kommensalen Mikrobiota führt und damit immunmodulatorisch wirkt (Derrien et al., 2011).

Die Besiedelung der NOD2^{-/-} Mäuse mit *A. muciniphila* könnte sowohl durch die Stärkung der intestinalen Barriere als auch über direkte immunmodulatorische Effekte dazu beitragen, dass eine schwächere allergische Reaktion entwickelt wird. Die beschriebenen Daten deuten auf einen vielversprechenden protektiven Einfluss von *A. muciniphila* auf die Allergieentstehung hin, welcher in weiteren Experimenten untersucht werden sollte.

In der Analyse auf Ebene der Genus fällt auf, dass im Ileum von NOD2^{-/-} Clostridien signifikant häufiger vorkommen als bei C57BL/6J. Dies wurde sowohl bei sh-NOD2^{-/-} als auch bei ch-NOD2^{-/-} beobachtet. Dieses Ergebnis scheint zunächst konträr zu den bisherigen Erkenntnissen über Clostridien. Mehrere Studien zeigten, dass Besiedelung mit Clostridien durch vermehrte Bildung regulatorischer T-Zellen im Darm der Entstehung einer Nahrungsmittelallergie entgegenwirkt (Atarashi et al., 2011). Zudem wurde gezeigt, dass Besiedelung mit Clostridien die IL-22 Produktion durch ROR γ t⁺ ILCs und T-Zellen steigert. IL-22 stärkt die intestinale Barriere durch Regulation der Mukussekretion von Becherzellen und Sekretion antimikrobieller Peptide durch Paneth Zellen. Die IL-22 assoziierten Effekte führen zu vermindertem Übertreten von Antigen in den Blutstrom und schützen so vor allergischer Sensibilisierung (Stefka et al., 2014). Interessanterweise war auf Genus Ebene *Clostridium* bei sh-NOD2^{-/-} deutlich häufiger als bei C57BL/6J und dennoch zeigten sh-NOD2^{-/-}-Mäuse stärkere allergische Reaktionen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass bei NOD2^{-/-} nicht die für die Immunmodulation entscheidenden Arten von Clostridien vertreten sind. Atarashi et al. beschrieben zunächst, dass lediglich bei Besiedelung mit allen 46 Stämme der maximale protektive Effekt erreicht wird (Atarashi et al., 2011). 2013 gelang es der gleichen Arbeitsgruppe 17 Stämme herauszuarbeiten, die die Expansion regulatorischer T-Zellen sowie die Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine induzierten (Atarashi et al., 2013).

Um zu klären, ob in unseren Proben die relevanten protektiven Stämme vertreten sind, wäre eine weiterführende Analyse des Mikrobioms nach den vertretenen Clostridien Stämmen nötig.

Das Co-Housing Experiment zeigt, dass bei NOD2^{-/-} die Modulation der Dysbiose zur Abschwächung der allergischen Reaktion führt. Wir postulierten, dass eine komplexe Veränderung der intestinalen Barriere durch NOD2-Defizienz in Kombination mit immunologischen Veränderungen durch das Fehlen des Rezeptors für die verstärkte T_H2-Antwort verantwortlich ist. Durch nicht-invasive Modulation einer Komponente, dem intestinalen Mikrobiom, konnten wir die verstärkte Sensibilisierung verhindern, trotz der weiterhin bestehenden genetischen Prädisposition. Diese Erkenntnis bieten vielversprechende Ansatzpunkte für Therapie und Prävention allergischer Erkrankungen. Zunächst muss jedoch ein genaueres Verständnis gewonnen werden welche mikrobiellen Veränderungen entscheidend sind. Aus unseren Ergebnissen ergeben sich aussichtsreiche Kandidaten für diese weiterführenden Untersuchungen. Dabei müssen mehrere Konstellationen bedacht werden. Möglicherweise sind einzelne Bakterien für die protektiven Effekte verantwortlich, es kann jedoch auch das Zusammenspiel mehrerer Faktoren entscheidend sein wie beispielsweise bei Atarashi et al. gezeigt (Atarashi et al., 2013). Um das herauszuarbeiten und die wesentlichen mikrobiellen Faktoren zu identifizieren sind weitere Experimente nötig.

3. Zusammenfassung

Damit bei Kontakt des Immunsystems mit einem Nahrungsmittelantigen anstelle von Toleranz eine Allergie entsteht, bedarf es zusätzlicher Einflussfaktoren, die noch nicht abschließend bekannt sind oder in ihrer Wirkung verstanden werden. Schon zur Zeit der Postulierung der Hygienehypothese aber vor allem in den letzten Jahren ist das Mikrobiom in den Fokus der Allergieforschung gerückt. Denn nicht nur Proteinantigene können eine unreife Schleimhautbarriere überwinden, sondern auch mikrobielle Bestandteile (MAMPs) beispielsweise aus der gastrointestinalen Mikrobiota. Die Konsequenzen, die sich daraus für die adaptive Immunantwort und die Allergieentstehung ergeben, sind bislang nur unzureichend erforscht (Ruiter & Shreffler, 2012). Um den Einfluss des Darmmikrobioms bei der Entstehung von Nahrungsmittelallergien zu untersuchen, wurde ein murines Allergiemodell mit dem Modellantigen OVA und Cholera Toxin als Adjuvans verwendet.

Zunächst wurden die C57BL/6 Substämme J und N untersucht und hinsichtlich des Darmmikrobioms und der Stärke der allergischen Reaktion verglichen. Außerdem wurde das Mikrobiom in Colon und Dünndarm untersucht. Es zeigten sich erhebliche Unterschiede zwischen den Substämmen bei der Analyse des Mikrobioms. Interessanterweise wiesen die Stärke der anaphylaktischen Reaktion und die Analyse der T-Zell-Zytokine trotz der distinkten Mikrobiota keine Unterschiede zwischen C57BL/6J und N auf. Sowohl die Veränderungen des Darmmikrobioms als auch die genetischen Unterschiede zwischen C57BL/6J und N scheinen demnach keinen Einfluss auf die Stärke der entwickelten Nahrungsmittelallergien zu haben. Anschließend wurden NOD2^{-/-} mit Wildtyp (C57BL/6J) Mäusen verglichen. NOD2^{-/-} zeigen durch die Mutationen bedingt eine dysbiotische Darmmikrobiota (Al Nabhani et al., 2016). Im Vergleich von NOD2^{-/-} mit C57BL/6J zeigte NOD2^{-/-} stärkere anaphylaktische Reaktionen und in der lokalen Immunantwort verstärkte T_H2 Polarisierung.

Um den Einfluss eubiotischer Mikrobiota bei der Sensibilisierung zu untersuchen, wurde ein Co-Housing von C57BL/6J und NOD2^{-/-} durchgeführt. Ch-NOD2^{-/-} zeigte signifikant schwächere anaphylaktische Reaktionen als die Kontrollmäuse der Gruppe sh-NOD2^{-/-}. Die Analyse der Mikrobiota des Ileums zeigte, dass Co-Housing zu einer Verschiebung des NOD2^{-/-} Mikrobioms hin zu einem Wildtypmikrobiom führt. Die intestinale Mikrobiota spielt demzufolge eine entscheidende Rolle für die Stärke der Sensibilisierung und kann trotz bestehender genetischer Prädisposition eine verstärkte Allergieentwicklung verhindern. Damit stellt die

Modulation der intestinalen Mikrobiota einen vielversprechenden Ansatz für Therapie und Prävention dar.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Zelluläre Mechanismen der Nahrungsmittelallergie	10
Abb. 2 Dreigliedrige Struktur des NOD2 Rezeptors (Philpott et al., 2014)	16
Abb. 3 MDP-Eintritt in die Zelle und NOD2 Aktivierung (Al Nabhani et al., 2017)	17
Abb. 4 Sensibilisierungsschema	27
Abb. 5 Versuchsaufbau Vergleich C57BL/6J und C57BL/6N	28
Abb. 6 Aufbau des Co-Housing Experiments	29
Abb. 7 rektal gemessener Temperaturabfall nach Challenge	33
Abb. 8 Vergleich der IgE-Spiegel im Serum sensibilisierter Mäuse	34
Abb. 9 Zytokinspiegel im Überstand restimulierter T-Zellen aus der Milz	35
Abb. 10 Zytokinspiegel im Überstand restimulierter T-Zellen aus mesenterialen Lymphknoten	36
Abb. 11 Alpha Diversität in Colon und Ileum von C57BL/6J und N	37
Abb. 12 Analyse der Beta Diversität im Colon und Ileum von sensibilisierten C57BL/6J und C57BL/6N Mäusen.	39
Abb. 13 Taxonomische Klasseneinteilung des Mikrobioms auf Ebene der Phyla	41
Abb. 14 relative Häufigkeit der häufigsten Phyla in %	41
Abb. 15 Mikrobiom Taxonomy Binning auf Ebene der Familien.	43
Abb. 16 Relative Häufigkeit der häufigsten Bakterien-Familien in %	43
Abb. 17 Unterschiede im Ileum zwischen C57BL/6J und C57BL/6N auf Genus Ebene	45
Abb. 18 Temperaturabfall nach Auslösen der Anaphylaxie	48
Abb. 19 Zytokinspiegel im Überstand restimulierter T-Zellen aus der Milz	49
Abb. 20 Zytokinspiegel im Überstand restimulierter T-Zellen aus mesenterialen Lymphknoten	50
Abb. 21 Vergleich des Temperaturabfalls von ch-NOD2 ^{-/-} und ch-C57BL/6J	51
Abb. 22 Vergleich des Temperaturabfalls von sh-NOD2 ^{-/-} mit ch-NOD2 ^{-/-}	52
Abb. 23 Alpha-Diversität des Ileums von Wildtyp (C57BL/6J), NOD2 ^{-/-} mit und ohne Co-Housing	53
Abb. 24 Beta-Diversitäts Analyse des Ileum-Mikrobiomes von ch-C57BL/6J (Wildtyp) und ch-NOD2 ^{-/-} Mäusen und der Kontrollgruppen ohne Co-Housing.	55
Abb. 25 Relative Häufigkeiten bakterieller Phyla	57
Abb. 26 Relative Häufigkeiten bakterieller Phyla	57
Abb. 27 Einteilung in Familien	59
Abb. 28 Vorkommen der häufigsten Familien in %	59
Abb. 29 Relative Häufigkeit der häufigsten Genus in %	60

Literaturverzeichnis

Al Nabhani, Z., Dietrich, G., Hugot, J. P., & Barreau, F. (2017). Nod2: The intestinal gate keeper. *PLoS Pathog*, *13*(3), e1006177.

Al Nabhani, Z., Lepage, P., Mauny, P., Montcuquet, N., Roy, M., Le Roux, K., Dussillant, M., Berrebi, D., Hugot, J. P., & Barreau, F. (2016). Nod2 Deficiency Leads to a Specific and Transmissible Mucosa-associated Microbial Dysbiosis Which Is Independent of the Mucosal Barrier Defect. *J Crohns Colitis*, *10*(12), 1428-1436.

Alnabhani, Z., Hugot, J. P., Montcuquet, N., Le Roux, K., Dussillant, M., Roy, M., Leclerc, M., Cerf-Bensussan, N., Lepage, P., & Barreau, F. (2016). Respective Roles of Hematopoietic and Nonhematopoietic Nod2 on the Gut Microbiota and Mucosal Homeostasis. *Inflamm Bowel Dis*, *22*(4), 763-773.

Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., Kim, S., Fritz, J. V., Wilmes, P., Ueha, S., Matsushima, K., Ohno, H., Olle, B., Sakaguchi, S., Taniguchi, T., . . . Honda, K. (2013). Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*, *500*(7461), 232-236.

Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., Taniguchi, T., Takeda, K., Hori, S., Ivanov, I., Umesaki, Y., Itoh, K., & Honda, K. (2011). Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science*, *331*(6015), 337-341.

Azad, M. A. K., Sarker, M., Li, T., & Yin, J. (2018). Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. *Biomed Res Int*, *2018*, 9478630.

Barreau, F., Meinzer, U., Chareyre, F., Berrebi, D., Niwa-Kawakita, M., Dussillant, M., Foligne, B., Ollendorff, V., Heyman, M., Bonacorsi, S., Lesuffleur, T., Sterkers, G., Giovannini, M., & Hugot, J. P. (2007). CARD15/NOD2 is required for Peyer's patches homeostasis in mice. *PLoS One*, *2*(6), e523.

Bauer, H., Horowitz, R. E., Levenson, S. M., & Popper, H. (1963). The response of the lymphatic tissue to the microbial flora. Studies on germfree mice. *Am J Pathol*, *42*, 471-483.

Berni Canani, R., Sangwan, N., Stefka, A. T., Nocerino, R., Paparo, L., Aitoro, R., Calignano, A., Khan, A. A., Gilbert, J. A., & Nagler, C. R. (2016). Lactobacillus rhamnosus GG-supplemented formula expands butyrate-producing bacterial strains in food allergic infants. *ISME J*, *10*(3), 742-750.

Bleich, A., & Hansen, A. K. (2012). Time to include the gut microbiota in the hygienic standardisation of laboratory rodents. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, *35*(2), 81-92.

Brown, S. D., & Moore, M. W. (2012). Towards an encyclopaedia of mammalian gene function: the International Mouse Phenotyping Consortium. *Dis Model Mech*, *5*(3), 289-292.

Caruso, R., Warner, N., Inohara, N., & Nunez, G. (2014). NOD1 and NOD2: signaling, host defense, and inflammatory disease. *Immunity*, *41*(6), 898-908.

- Chahine, B. G., & Bahna, S. L. (2010). The role of the gut mucosal immunity in the development of tolerance versus development of allergy to food. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, *10*(4), 394-399.
- Chu, H., Khosravi, A., Kusumawardhani, I. P., Kwon, A. H., Vasconcelos, A. C., Cunha, L. D., Mayer, A. E., Shen, Y., Wu, W. L., Kambal, A., Targan, S. R., Xavier, R. J., Ernst, P. B., Green, D. R., McGovern, D. P., Virgin, H. W., & Mazmanian, S. K. (2016). Gene-microbiota interactions contribute to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Science*, *352*(6289), 1116-1120.
- Cuello-Garcia, C. A., Brozek, J. L., Fiocchi, A., Pawankar, R., Yepes-Nunez, J. J., Terracciano, L., Gandhi, S., Agarwal, A., Zhang, Y., & Schunemann, H. J. (2015). Probiotics for the prevention of allergy: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Allergy Clin Immunol*, *136*(4), 952-961.
- De Martinis, M., Sirufo, M. M., Suppa, M., & Ginaldi, L. (2020). New Perspectives in Food Allergy. *Int J Mol Sci*, *21*(4).
- Depommier, C., Everard, A., Druart, C., Plovier, H., Van Hul, M., Vieira-Silva, S., Falony, G., Raes, J., Maiter, D., Delzenne, N. M., de Barse, M., Loumaye, A., Hermans, M. P., Thissen, J. P., de Vos, W. M., & Cani, P. D. (2019). Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. *Nat Med*, *25*(7), 1096-1103.
- Derrien, M., Van Baarlen, P., Hooiveld, G., Norin, E., Muller, M., & de Vos, W. M. (2011). Modulation of Mucosal Immune Response, Tolerance, and Proliferation in Mice Colonized by the Mucin-Degrader *Akkermansia muciniphila*. *Front Microbiol*, *2*, 166.
- Duan, W., Mehta, A. K., Magalhaes, J. G., Ziegler, S. F., Dong, C., Philpott, D. J., & Croft, M. (2010). Innate signals from Nod2 block respiratory tolerance and program T(H)2-driven allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, *126*(6), 1284-1293 e1210.
- Edgar, R. C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat Methods*, *10*(10), 996-998.
- ES, R. (1978). Development of the rodent as a model system of aging. In A. R. Gibson DC, Finch C (Ed.), *Development of the rodent as a model system of aging* (pp. 37-44). DHEW.
- Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J. P., Druart, C., Bindels, L. B., Guiot, Y., Derrien, M., Muccioli, G. G., Delzenne, N. M., de Vos, W. M., & Cani, P. D. (2013). Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(22), 9066-9071.
- Feehley, T., Plunkett, C. H., Bao, R., Choi Hong, S. M., Culleen, E., Belda-Ferre, P., Campbell, E., Aitoro, R., Nocerino, R., Paparo, L., Andrade, J., Antonopoulos, D. A., Berni Canani, R., & Nagler, C. R. (2019). Healthy infants harbor intestinal bacteria that protect against food allergy. *Nat Med*, *25*(3), 448-453.

Fontaine, D. A., & Davis, D. B. (2016). Attention to Background Strain Is Essential for Metabolic Research: C57BL/6 and the International Knockout Mouse Consortium. *Diabetes*, *65*(1), 25-33.

Galli, S. J., Nakae, S., & Tsai, M. (2005). Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol*, *6*(2), 135-142.

Ge, Z., Sheh, A., Feng, Y., Muthupalani, S., Ge, L., Wang, C., Kurnick, S., Mannion, A., Whary, M. T., & Fox, J. G. (2018). Helicobacter pylori-infected C57BL/6 mice with different gastrointestinal microbiota have contrasting gastric pathology, microbial and host immune responses. *Scientific Reports*, *8*(1), 8014.

Geddes, K., Rubino, S. J., Magalhaes, J. G., Streutker, C., Le Bourhis, L., Cho, J. H., Robertson, S. J., Kim, C. J., Kaul, R., Philpott, D. J., & Girardin, S. E. (2011). Identification of an innate T helper type 17 response to intestinal bacterial pathogens. *Nat Med*, *17*(7), 837-844.

Girardin, S. E., Boneca, I. G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D. J., & Sansonetti, P. J. (2003). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem*, *278*(11), 8869-8872.

Glassner, K. L., Abraham, B. P., & Quigley, E. M. M. (2020). The microbiome and inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol*, *145*(1), 16-27.

Graziani, C., Talocco, C., De Sire, R., Petito, V., Lopetuso, L. R., Gervasoni, J., Persichilli, S., Franceschi, F., Ojetti, V., Gasbarrini, A., & Scaldaferrri, F. (2019). Intestinal permeability in physiological and pathological conditions: major determinants and assessment modalities. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, *23*(2), 795-810.

Gupta, R., Holdford, D., Bilaver, L., Dyer, A., Holl, J. L., & Meltzer, D. (2013). The economic impact of childhood food allergy in the United States. *JAMA Pediatr*, *167*(11), 1026-1031.

Hadis, U., Wahl, B., Schulz, O., Hardtke-Wolenski, M., Schippers, A., Wagner, N., Muller, W., Sparwasser, T., Forster, R., & Pabst, O. (2011). Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity*, *34*(2), 237-246.

Hanninen, A., Toivonen, R., Poysti, S., Belzer, C., Plovier, H., Ouwerkerk, J. P., Emani, R., Cani, P. D., & De Vos, W. M. (2018). Akkermansia muciniphila induces gut microbiota remodelling and controls islet autoimmunity in NOD mice. *Gut*, *67*(8), 1445-1453.

Hedl, M., & Abraham, C. (2011). Secretory mediators regulate Nod2-induced tolerance in human macrophages. *Gastroenterology*, *140*(1), 231-241.

Hill, D. A., Grundmeier, R. W., Ram, G., & Spergel, J. M. (2016). The epidemiologic characteristics of healthcare provider-diagnosed eczema, asthma, allergic rhinitis, and food allergy in children: a retrospective cohort study. *BMC Pediatr*, *16*, 133.

Holgate, S. T., & Polosa, R. (2008). Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol*, *8*(3), 218-230.

Holler, E., Rogler, G., Herfarth, H., Brenmoehl, J., Wild, P. J., Hahn, J., Eissner, G., Scholmerich, J., & Andreesen, R. (2004). Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations

associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, *104*(3), 889-894.

Honda, K., & Littman, D. R. (2012). The microbiome in infectious disease and inflammation. *Annu Rev Immunol*, *30*, 759-795.

Hooper, L. V., Littman, D. R., & Macpherson, A. J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, *336*(6086), 1268-1273.

Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J. P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C. A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J. F., Sahbatou, M., & Thomas, G. (2001). Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, *411*(6837), 599-603.

Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Hashimoto, M., Foster, S. J., Moran, A. P., Fernandez-Luna, J. L., & Nunez, G. (2003). Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem*, *278*(8), 5509-5512.

Johansson, M. E., Ambort, D., Pelaseyed, T., Schutte, A., Gustafsson, J. K., Ermund, A., Subramani, D. B., Holmen-Larsson, J. M., Thomsson, K. A., Bergstrom, J. H., van der Post, S., Rodriguez-Pineiro, A. M., Sjoval, H., Backstrom, M., & Hansson, G. C. (2011). Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cell Mol Life Sci*, *68*(22), 3635-3641.

Jung, C., Hugot, J. P., & Barreau, F. (2010). Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine. *Int J Inflam*, *2010*, 823710.

Kabesch, M., Peters, W., Carr, D., Leupold, W., Weiland, S. K., & von Mutius, E. (2003). Association between polymorphisms in caspase recruitment domain containing protein 15 and allergy in two German populations. *J Allergy Clin Immunol*, *111*(4), 813-817.

Kemter, A. M., & Nagler, C. R. (2019). Influences on allergic mechanisms through gut, lung, and skin microbiome exposures. *J Clin Invest*, *130*, 1483-1492.

Khodoun, M. V., Tomar, S., Tocker, J. E., Wang, Y. H., & Finkelman, F. D. (2018). Prevention of food allergy development and suppression of established food allergy by neutralization of thymic stromal lymphopoietin, IL-25, and IL-33. *J Allergy Clin Immunol*, *141*(1), 171-179 e171.

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glockner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res*, *41*(1), e1.

Kobayashi, K. S., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nunez, G., & Flavell, R. A. (2005). Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*, *307*(5710), 731-734.

Koplin, J. J., Mills, E. N., & Allen, K. J. (2015). Epidemiology of food allergy and food-induced anaphylaxis: is there really a Western world epidemic? *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, *15*(5), 409-416.

- Kumagai, Y., & Akira, S. (2010). Identification and functions of pattern-recognition receptors. *J Allergy Clin Immunol*, *125*(5), 985-992.
- Lagkouvardos, I., Fischer, S., Kumar, N., & Clavel, T. (2017). Rhea: a transparent and modular R pipeline for microbial profiling based on 16S rRNA gene amplicons. *PeerJ*, *5*, e2836.
- Lagkouvardos, I., Joseph, D., Kapfhammer, M., Giritli, S., Horn, M., Haller, D., & Clavel, T. (2016). IMNGS: A comprehensive open resource of processed 16S rRNA microbial profiles for ecology and diversity studies. *Sci Rep*, *6*, 33721.
- Lathrop, S. K., Bloom, S. M., Rao, S. M., Nutsch, K., Lio, C. W., Santacruz, N., Peterson, D. A., Stappenbeck, T. S., & Hsieh, C. S. (2011). Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature*, *478*(7368), 250-254.
- Laukens, D., Brinkman, B. M., Raes, J., De Vos, M., & Vandenabeele, P. (2016). Heterogeneity of the gut microbiome in mice: guidelines for optimizing experimental design. *FEMS Microbiol Rev*, *40*(1), 117-132.
- Lebovidge, J. S., Strauch, H., Kalish, L. A., & Schneider, L. C. (2009). Assessment of psychological distress among children and adolescents with food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, *124*(6), 1282-1288.
- Lechtenberg, B. C., Mace, P. D., & Riedl, S. J. (2014). Structural mechanisms in NLR inflammasome signaling. *Curr Opin Struct Biol*, *29*, 17-25.
- Lee, J., Tattoli, I., Wojtal, K. A., Vavricka, S. R., Philpott, D. J., & Girardin, S. E. (2009). pH-dependent internalization of muramyl peptides from early endosomes enables Nod1 and Nod2 signaling. *J Biol Chem*, *284*(35), 23818-23829.
- Levy, M., Kolodziejczyk, A. A., Thaïss, C. A., & Elinav, E. (2017). Dysbiosis and the immune system. *Nat Rev Immunol*, *17*(4), 219-232.
- Macpherson, A. J., Hunziker, L., McCoy, K., & Lamarre, A. (2001). IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes Infect*, *3*(12), 1021-1035.
- Magalhaes, J. G., Fritz, J. H., Le Bourhis, L., Sellge, G., Travassos, L. H., Selvanantham, T., Girardin, S. E., Gommerman, J. L., & Philpott, D. J. (2008). Nod2-dependent Th2 polarization of antigen-specific immunity. *J Immunol*, *181*(11), 7925-7935.
- Maynard, C. L., Elson, C. O., Hatton, R. D., & Weaver, C. T. (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, *489*(7415), 231-241.
- Mekada, K., Abe, K., Murakami, A., Nakamura, S., Nakata, H., Moriwaki, K., Obata, Y., & Yoshiki, A. (2009). Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Exp Anim*, *58*(2), 141-149.
- Miceli-Richard, C., Lesage, S., Rybojad, M., Prieur, A. M., Manouvrier-Hanu, S., Hafner, R., Chamaillard, M., Zouali, H., Thomas, G., & Hugot, J. P. (2001). CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nat Genet*, *29*(1), 19-20.

Motta, V., Soares, F., Sun, T., & Philpott, D. J. (2015). NOD-like receptors: versatile cytosolic sentinels. *Physiol Rev*, *95*(1), 149-178.

Mouse Genome Sequencing, C., Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S. E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., . . . Lander, E. S. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, *420*(6915), 520-562.

Mowat, A. M., & Agace, W. W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol*, *14*(10), 667-685.

Mukherjee, T., Hovingh, E. S., Foerster, E. G., Abdel-Nour, M., Philpott, D. J., & Girardin, S. E. (2019). NOD1 and NOD2 in inflammation, immunity and disease. *Arch Biochem Biophys*, *670*, 69-81.

Muraro, A., Agache, I., Clark, A., Sheikh, A., Roberts, G., Akdis, C. A., Borrego, L. M., Higgs, J., Hourihane, J. O., Jorgensen, P., Mazon, A., Parmigiani, D., Said, M., Schnadt, S., van Os-Medendorp, H., Vlieg-Boerstra, B. J., Wickman, M., European Academy of, A., & Clinical, I. (2014). EAACI food allergy and anaphylaxis guidelines: managing patients with food allergy in the community. *Allergy*, *69*(8), 1046-1057.

Ni, J., Wu, G. D., Albenberg, L., & Tomov, V. T. (2017). Gut microbiota and IBD: causation or correlation? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, *14*(10), 573-584.

Nishida, A., Inoue, R., Inatomi, O., Bamba, S., Naito, Y., & Andoh, A. (2018). Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Clin J Gastroenterol*, *11*(1), 1-10.

Noval Rivas, M., Burton, O. T., Wise, P., Zhang, Y. Q., Hobson, S. A., Garcia Lloret, M., Chehoud, C., Kuczynski, J., DeSantis, T., Warrington, J., Hyde, E. R., Petrosino, J. F., Gerber, G. K., Bry, L., Oettgen, H. C., Mazmanian, S. K., & Chatila, T. A. (2013). A microbiota signature associated with experimental food allergy promotes allergic sensitization and anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*, *131*(1), 201-212.

Oettgen, H. C., & Burton, O. T. (2015). IgE receptor signaling in food allergy pathogenesis. *Curr Opin Immunol*, *36*, 109-114.

Ogura, Y., Bonen, D. K., Inohara, N., Nicolae, D. L., Chen, F. F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R. H., Achkar, J. P., Brant, S. R., Bayless, T. M., Kirschner, B. S., Hanauer, S. B., Nunez, G., & Cho, J. H. (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, *411*(6837), 603-606.

Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F. F., Yamaoka, S., & Nunez, G. (2001). Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem*, *276*(7), 4812-4818.

Petersen, C., & Round, J. L. (2014). Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell Microbiol*, *16*(7), 1024-1033.

- Petnicki-Ocwieja, T., Hrnčir, T., Liu, Y. J., Biswas, A., Hudcovic, T., Tlaskalova-Hogenova, H., & Kobayashi, K. S. (2009). Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(37), 15813-15818.
- Pfefferle, P. I., Keber, C. U., Cohen, R. M., & Garn, H. (2021). The Hygiene Hypothesis - Learning From but Not Living in the Past. *Front Immunol*, *12*, 635935.
- Philpott, D. J., Sorbara, M. T., Robertson, S. J., Croitoru, K., & Girardin, S. E. (2014). NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat Rev Immunol*, *14*(1), 9-23.
- Pouessel, G., Turner, P. J., Worm, M., Cardona, V., Deschildre, A., Beaudouin, E., Renaudin, J. M., Demoly, P., & Tanno, L. K. (2018). Food-induced fatal anaphylaxis: From epidemiological data to general prevention strategies. *Clin Exp Allergy*, *48*(12), 1584-1593.
- Prescott, D., Maisonneuve, C., Yadav, J., Rubino, S. J., Girardin, S. E., & Philpott, D. J. (2020). NOD2 modulates immune tolerance via the GM-CSF-dependent generation of CD103(+) dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *117*(20), 10946-10957.
- Prioult, G., & Nagler-Anderson, C. (2005). Mucosal immunity and allergic responses: lack of regulation and/or lack of microbial stimulation? *Immunol Rev*, *206*, 204-218.
- Pulendran, B., & Artis, D. (2012). New paradigms in type 2 immunity. *Science*, *337*(6093), 431-435.
- Rajan, T. V. (2003). The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *Trends Immunol*, *24*(7), 376-379.
- Ramanan, D., Tang, M. S., Bowcutt, R., Loke, P., & Cadwell, K. (2014). Bacterial sensor Nod2 prevents inflammation of the small intestine by restricting the expansion of the commensal *Bacteroides vulgatus*. *Immunity*, *41*(2), 311-324.
- Reboldi, A., Arnon, T. I., Rodda, L. B., Atakilit, A., Sheppard, D., & Cyster, J. G. (2016). IgA production requires B cell interaction with subepithelial dendritic cells in Peyer's patches. *Science*, *352*(6287), aaf4822.
- Rehman, A., Sina, C., Gavriloova, O., Hasler, R., Ott, S., Baines, J. F., Schreiber, S., & Rosenstiel, P. (2011). Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities. *Gut*, *60*(10), 1354-1362.
- Reunanen, J., Kainulainen, V., Huuskonen, L., Ottman, N., Belzer, C., Huhtinen, H., de Vos, W. M., & Satokari, R. (2015). *Akkermansia muciniphila* Adheres to Enterocytes and Strengthens the Integrity of the Epithelial Cell Layer. *Appl Environ Microbiol*, *81*(11), 3655-3662.
- Ring, J., & Messmer, K. (1977). Incidence and severity of anaphylactoid reactions to colloid volume substitutes. *Lancet*, *1*(8009), 466-469.
- Robertson, S. J., Zhou, J. Y., Geddes, K., Rubino, S. J., Cho, J. H., Girardin, S. E., & Philpott, D. J. (2013). Nod1 and Nod2 signaling does not alter the composition of intestinal bacterial communities at homeostasis. *Gut Microbes*, *4*(3), 222-231.

- Ruiter, B., & Shreffler, W. G. (2012). The role of dendritic cells in food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, *129*(4), 921-928.
- Rutten, N. B., Rijkers, G. T., Meijssen, C. B., Crijns, C. E., Oudshoorn, J. H., van der Ent, C. K., & Vlioger, A. M. (2015). Intestinal microbiota composition after antibiotic treatment in early life: the INCA study. *BMC Pediatr*, *15*, 204.
- Sabat, R., Ouyang, W., & Wolk, K. (2014). Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system. *Nat Rev Drug Discov*, *13*(1), 21-38.
- Sadler, R., Singh, V., Benakis, C., Garzetti, D., Brea, D., Stecher, B., Anrather, J., & Liesz, A. (2017). Microbiota differences between commercial breeders impacts the post-stroke immune response. *Brain Behav Immun*, *66*, 23-30.
- Sampson, H. A., O'Mahony, L., Burks, A. W., Plaut, M., Lack, G., & Akdis, C. A. (2018). Mechanisms of food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, *141*(1), 11-19.
- Schiavi, E., Smolinska, S., & O'Mahony, L. (2015). Intestinal dendritic cells. *Curr Opin Gastroenterol*, *31*(2), 98-103.
- Schulz, O., Jaensson, E., Persson, E. K., Liu, X., Worbs, T., Agace, W. W., & Pabst, O. (2009). Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *J Exp Med*, *206*(13), 3101-3114.
- Shanahan, M. T., Carroll, I. M., Grossniklaus, E., White, A., von Furstenberg, R. J., Barner, R., Fodor, A. A., Henning, S. J., Sartor, R. B., & Gulati, A. S. (2014). Mouse Paneth cell antimicrobial function is independent of Nod2. *Gut*, *63*(6), 903-910.
- Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. (2009). Food allergy: recent advances in pathophysiology and treatment. *Annu Rev Med*, *60*, 261-277.
- Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. (2018). Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *J Allergy Clin Immunol*, *141*(1), 41-58.
- Simon, M. M., Greenaway, S., White, J. K., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Wells, S., Sorg, T., Wong, K., Bedu, E., Cartwright, E. J., Dacquain, R., Djebali, S., Estabel, J., Graw, J., Ingham, N. J., Jackson, I. J., Lengeling, A., Mandillo, S., Marvel, J., . . . Brown, S. D. (2013). A comparative phenotypic and genomic analysis of C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains. *Genome Biol*, *14*(7), R82.
- Simons, F. E., Arduoso, L. R., Bilo, M. B., Cardona, V., Ebisawa, M., El-Gamal, Y. M., Lieberman, P., Lockey, R. F., Muraro, A., Roberts, G., Sanchez-Borges, M., Sheikh, A., Shek, L. P., Wallace, D. V., & Worm, M. (2014). International consensus on (ICON) anaphylaxis. *World Allergy Organ J*, *7*(1), 9.
- Stefka, A. T., Feehley, T., Tripathi, P., Qiu, J., McCoy, K., Mazmanian, S. K., Tjota, M. Y., Seo, G. Y., Cao, S., Theriault, B. R., Antonopoulos, D. A., Zhou, L., Chang, E. B., Fu, Y. X., & Nagler, C. R. (2014). Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(36), 13145-13150.

- Strachan, D. P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*, 299(6710), 1259-1260.
- Strid, J., Sobolev, O., Zafirova, B., Polic, B., & Hayday, A. (2011). The intraepithelial T cell response to NKG2D-ligands links lymphoid stress surveillance to atopy. *Science*, 334(6060), 1293-1297.
- Su, L., Shen, L., Clayburgh, D. R., Nalle, S. C., Sullivan, E. A., Meddings, J. B., Abraham, C., & Turner, J. R. (2009). Targeted epithelial tight junction dysfunction causes immune activation and contributes to development of experimental colitis. *Gastroenterology*, 136(2), 551-563.
- Sudo, N., Sawamura, S., Tanaka, K., Aiba, Y., Kubo, C., & Koga, Y. (1997). The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J Immunol*, 159(4), 1739-1745.
- Tattoli, I., Travassos, L. H., Carneiro, L. A., Magalhaes, J. G., & Girardin, S. E. (2007). The Nodosome: Nod1 and Nod2 control bacterial infections and inflammation. *Semin Immunopathol*, 29(3), 289-301.
- Thay, B., Damm, A., Kufer, T. A., Wai, S. N., & Oscarsson, J. (2014). Aggregatibacter actinomycetemcomitans outer membrane vesicles are internalized in human host cells and trigger NOD1- and NOD2-dependent NF-kappaB activation. *Infect Immun*, 82(10), 4034-4046.
- Tiffany, C. R., & Baumler, A. J. (2019). Dysbiosis: from fiction to function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 317(5), G602-G608.
- Tordesillas, L., Berin, M. C., & Sampson, H. A. (2017). Immunology of Food Allergy. *Immunity*, 47(1), 32-50.
- Uematsu, S., & Akira, S. (2007). Toll-like receptors and Type I interferons. *J Biol Chem*, 282(21), 15319-15323.
- Vatanen, T., Kostic, A. D., d'Hennezel, E., Siljander, H., Franzosa, E. A., Yassour, M., Kolde, R., Vlamakis, H., Arthur, T. D., Hamalainen, A. M., Peet, A., Tillmann, V., Uibo, R., Mokurov, S., Dorshakova, N., Ilonen, J., Virtanen, S. M., Szabo, S. J., Porter, J. A., . . . Xavier, R. J. (2016). Variation in Microbiome LPS Immunogenicity Contributes to Autoimmunity in Humans. *Cell*, 165(6), 1551.
- Vavricka, S. R., Musch, M. W., Chang, J. E., Nakagawa, Y., Phanvijhitsiri, K., Waypa, T. S., Merlin, D., Schneewind, O., & Chang, E. B. (2004). hPepT1 transports muramyl dipeptide, activating NF-kappaB and stimulating IL-8 secretion in human colonic Caco2/bbe cells. *Gastroenterology*, 127(5), 1401-1409.
- Ventura, M. T., Polimeno, L., Amoroso, A. C., Gatti, F., Annoscia, E., Marinaro, M., Di Leo, E., Matino, M. G., Buquicchio, R., Bonini, S., Tursi, A., & Francavilla, A. (2006). Intestinal permeability in patients with adverse reactions to food. *Dig Liver Dis*, 38(10), 732-736.
- Volz, T., Kaesler, S., & Biedermann, T. (2012). Innate immune sensing 2.0 - from linear activation pathways to fine tuned and regulated innate immune networks. *Exp Dermatol*, 21(1), 61-69.

- Wang, J., & Sampson, H. A. (2011). Food allergy. *J Clin Invest*, *121*(3), 827-835.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol*, *73*(16), 5261-5267.
- Weiner, H. L., da Cunha, A. P., Quintana, F., & Wu, H. (2011). Oral tolerance. *Immunol Rev*, *241*(1), 241-259.
- Wesemann, D. R., & Nagler, C. R. (2016). The Microbiome, Timing, and Barrier Function in the Context of Allergic Disease. *Immunity*, *44*(4), 728-738.
- Zhong, Y., Kinio, A., & Saleh, M. (2013). Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases. *Front Immunol*, *4*, 333.
- Zimmermann, P., Messina, N., Mohn, W. W., Finlay, B. B., & Curtis, N. (2019). Association between the intestinal microbiota and allergic sensitization, eczema, and asthma: A systematic review. *J Allergy Clin Immunol*, *143*(2), 467-485.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt PD Dr. med Thomas Volz für das stets offene Ohr, die Einführung in die Grundlagen wissenschaftlichen Arbeitens und Schreibens sowie die exzellente Betreuung des Doktorspaßes. Zudem Herrn Prof. Dr. Tilo Biedermann für die hervorragende Betreuung und wertvolle Beratung sowie die mühevollen Korrektur der Dissertation.

Außerdem möchte ich Michael Griessmair für die grenzenlose Unterstützung während meines gesamten Studiums und darüber hinaus danken.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern und meinen Schwestern für ihren unermüdlichen Zuspruch danken.