

Aus dem Lehrstuhl für Pathologie
Prof. Dr. Matthias Evert
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Immunhistochemische Analyse der GPR43 Expression in intestinalen Biopsien nach
allogener Stammzelltransplantation und deren Bedeutung für die
Graft-versus-Host-Erkrankung**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Marina Stempfhuber

Aus dem Lehrstuhl für Pathologie
Prof. Dr. Matthias Evert
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Immunhistochemische Analyse der GPR43 Expression in intestinalen Biopsien nach
allogener Stammzelltransplantation und deren Bedeutung für die
Graft-versus-Host-Erkrankung**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Marina Stempfhuber

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ernst Holler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Matthias Evert

Tag der mündlichen Prüfung: 07.04.2025

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Allogene Stammzelltransplantation.....	1
1.2 Graft-versus-Host-Erkrankung	2
1.2.1 Pathogenese und Risikofaktoren für die GvHD	3
1.2.2 Klinik und Diagnostik der GvHD	6
1.2.3 Prophylaxe und Therapie der GvHD.....	8
1.2.4 Bedeutung von Biomarkern für Diagnose, Prognose und Therapie.....	10
1.3 Bedeutung des Mikrobioms für die GvHD.....	10
1.4 GPR43 Rezeptor im Zusammenhang mit der GvHD	11
1.4.1 Kurzkettige Fettsäuren	11
1.4.2 Physiologie und Vorkommen des GPR43 Rezeptors.....	12
1.4.3 Zusammenhang zwischen dem GPR43 Rezeptor und der Pathogenese der GvHD	13
1.5 Zielsetzung der Arbeit	15
2 Material und Methoden.....	16
2.1 Material.....	16
2.2 Patientenkollektiv und Biopsieauswahl.....	18
2.3 Eingang der Proben und Fixierung.....	21
2.4 Immunhistochemie	21
2.4.1 Grundlagen	21
2.4.2 Austestung der Primärantikörper	23
2.4.3 Vorbereiten der Proben für die immunhistochemische Färbung	24
2.4.4 Färbeprotokoll für LS-A6599.....	24
2.4.5 Färbeprotokoll für LS-A1578.....	25
2.5 Auswertungskriterien GPR43.....	28
2.6 Färbeprotokoll und Auswertungskriterien FoxP3	29
2.7 Statistische Methoden.....	31

2.8	Vorbereitende Methodik.....	33
2.8.1	Verteilung der Daten zur Expression von GPR43	33
2.8.2	Darstellung GPR43 positiver Stromazellen	34
2.8.3	Färbeverhalten der beiden Antikörper.....	34
3	Ergebnisse	38
3.1	Expression von GPR43 in den verschiedenen Darmabschnitten.....	38
3.1.1	Expression der GPR positiven Stromazellen in den verschiedenen Darmabschnitten	38
3.1.2	Expression der GPR43 positiven Epithelzellen in Krypten und Zotten der verschiedenen Darmabschnitte	40
3.2	Einfluss des Schweregrades der GvHD auf die GPR43 Expression	43
3.2.1	Einfluss des Schweregrades der GvHD auf die GPR43 Expression im Stroma	43
3.2.2	Einfluss des Schweregrades der GvHD auf die GPR43 Expression im Epithel der Krypten und Zotten	47
3.3	Einfluss des Biopsiezeitpunktes auf die GPR43 Expression.....	55
3.3.1	Einfluss des Biopsiezeitpunktes auf die GPR43 Expression im Stroma.....	56
3.3.2	Einfluss des Biopsiezeitpunktes auf die GPR43 Expression im Epithel der Krypten und Zotten	58
3.4	Einfluss der Steroiddosis auf die Expression von GPR43.....	62
3.4.1	Einfluss der Steroiddosis auf die Expression von GPR43 im Stroma.....	62
3.4.2	Einfluss der Steroiddosis auf die Expression von GPR43 im Epithel der Krypten und Zotten	63
3.5	Einfluss der Gabe von Antibiotika auf die Expression von GPR43 im Stroma und Epithel der Krypten und Zotten	64
3.6	Zusammenhang der GPR43 Expression im Stroma mit der Anzahl FoxP3 positiver regulatorischer T-Zellen	66
3.7	Zusammenhang der GPR43 Expression im Stroma und Epithel mit 3-IS Werten im Urin	69
3.8	Korrelation der immunhistochemisch ermittelten Ergebnisse zur GPR43 Expression mit Daten aus der PCR-Analyse	70
3.8.1	Korrelation der immunhistochemisch ermittelten Ergebnisse mit Daten aus der PCR-Analyse im Stroma.....	70
3.8.2	Korrelation der immunhistochemisch ermittelten Ergebnisse mit Daten aus der PCR-Analyse im Epithel der Krypten und Zotten	72
3.9	Überlebenszeitanalyse mit Kaplan-Meier	73

3.9.1	Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von der medianen Expression GPR43 positiver Stromazellen	73
3.9.2	Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von der medianen Expression GPR43 positiver Epithelzellen in Krypten und Zotten.....	76
4	Diskussion.....	77
4.1	Unterschiedliche Expression des GPR43 Rezeptors in den einzelnen Darmabschnitten	78
4.2	Veränderung der GPR43 Expression durch den Schweregrad der GvHD	81
4.3	Anstieg der GPR43 Expression im zeitlichen Verlauf nach ASCT im Stroma.....	83
4.4	Veränderung der GPR43 Expression durch den Einsatz von Steroiden.....	85
4.5	Veränderung der GPR43 Expression durch Antibiotika	87
4.6	Positiver Zusammenhang der GPR43 Expression mit FoxP3 positiven Zellen und fehlender Zusammenhang mit 3-IS Werten im Urin	89
4.7	Fehlender Zusammenhang der immunhistochemischen Daten mit der PCR-Analyse..	91
4.8	Eignung des GPR43 Rezeptors als prognosebestimmender Parameter.....	94
5	Zusammenfassung.....	96
6	Literaturverzeichnis	99
7	Danksagung	
8	Eidesstaatliche Erklärung	

Abkürzungsverzeichnis

3-IS	3-Indoxylsulfat
Abb.	Abbildung
aGvHD	akute Graft-versus-Host-Erkrankung
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APC	antigenpräsentierende Zelle
ASCT	allogene Stammzelltransplantation
ATG	Antithymozytenglobulin
BCoAT	Butyryl-Coenzym A:Acetat Coenzym A-Transferase
CEUS	kontrastmittelverstärkter Ultraschall
cGvHD	chronische Graft-versus-Host-Erkrankung
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DRST	Deutsches Register für Stammzelltransplantation
EBMT	European Society for Blood and Marrow Transplantation
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FFAR2	Free fatty acid receptor 2
FoxP3	Forkhead box Protein P3
GALT	darmassoziierte lymphatisches Gewebe
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GIT	Gastrointestinaltrakt
GvHD	Graft-versus-Host-Erkrankung
GvL	Graft-versus-Leukämie-Effekt
HDAC	Histon-Deacetylase
HE	Hämatoxylin und Eosin
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HLA	humanes Leukozytenantigen
HPF	High-power field
HRP	Meerrettichperoxidase
IL	Interleukin
IFN γ	Interferon γ

LGR5	leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MMF	Mycophenolatmofetil
MTX	Methotrexat
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NIH	National Institutes of Health
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NLR	NOD-like Rezeptoren
NRM	Non-Relapse Mortality
OT	Objektträger
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PBSC	periphere Blutstammzellen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
postTx	nach der allogenen Stammzelltransplantation
präTx	vor der allogenen Stammzelltransplantation
PRR	Pathogen-Recognition Rezeptoren
Reg3 α	Regenerating islet-derived protein 3 alpha
RIC	dosisreduzierte Konditionierung
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RRM	rezidivassoziierte Mortalität
RT	Raumtemperatur
SCFA	kurzkettige Fettsäuren
ST2	Suppressor of tumorigenicity-2
Tab.	Tabelle
TLR	Toll-like Rezeptoren
TNF α	Tumornekrosefaktor α
T-reg	regulatorische T-Zelle
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TRM	transplantationsassoziierte Mortalität
VE	vollentsalzt

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Schweregradeinteilung der am häufigsten betroffenen Organe	6
Tab. 2: Gesamtschweregrad der aGvHD	7
Tab. 3: Geräte und Software	16
Tab. 4: Reagenzien	17
Tab. 5: Verbrauchsmaterial	18
Tab. 6: Patientencharakteristika	20
Tab. 7: Zuordnung von Ziffern zur semiquantitativen Auswertung des Epithels	31
Tab. 8: Daten zur Auswertbarkeit der Biopsien	33
Tab. 9: Deskriptive Statistik zu der unterschiedlichen Expression von GPR43 in den einzelnen Epithelabschnitten	41
Tab. 10: Deskriptive Statistik der erhobenen Daten zur Expression von GPR43 im Stroma vor und nach ASCT, unterteilt in Subgruppen	46
Tab. 11: Deskriptive Statistik der erhobenen Daten zur Expression von GPR43 im Epithel der basalen Krypten vor und nach ASCT, unterteilt in Subgruppen	50
Tab. 12: Deskriptive Statistik der erhobenen Daten zur Expression von GPR43 im Epithel der oberflächlichen Krypten vor und nach ASCT, unterteilt in Subgruppen	52
Tab. 13: Deskriptive Statistik der erhobenen Daten zur Expression von GPR43 im Epithel der Zotten vor und nach ASCT, unterteilt in Subgruppen	54
Tab. 14: Statistik der erhobenen Daten zur Expression von GPR43 im Stroma in Abhängigkeit vom Biopsiezeitpunkt	57
Tab. 15: Statistik der erhobenen Daten zur Expression von GPR43 im Epithel der basalen und oberflächlichen Krypten in Abhängigkeit vom Biopsiezeitpunkt	59
Tab. 16: Statistik der erhobenen Daten zur Expression von GPR43 im Epithel der Zotten in Abhängigkeit vom Biopsiezeitpunkt	61
Tab. 17: Deskriptive Statistik zu den erhobenen Daten aus der immunhistochemischen Untersuchung und der PCR-Analyse zur GPR43 Expression im Stroma	71
Tab. 18: Deskriptive Statistik zu den erhobenen Daten aus der immunhistochemischen Untersuchung und der PCR-Analyse zur GPR43 Expression im Epithel der Krypten und Zotten	72
Tab. 19: Daten zur Überlebenszeitanalyse hinsichtlich der TRM und RRM nach ASCT in Abhängigkeit von der GPR43 Expression im Stroma	74

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Pathophysiologie der aGvHD.....	5
Abb. 2: Histologie der GvHD im Colon	8
Abb. 3: Detektionsmethode für Antikörper LS-A6599.....	22
Abb. 4: Detektionsmethode für Antikörper LS-A1578.....	22
Abb. 5: Immunhistochemischer Nachweis GPR43 positiver Zellen im Stroma und Epithel des Colons.....	27
Abb. 6: Unterteilung des Epithels in tiefliegende, oberflächliche Kryptenabschnitte und Zottenepithel.....	29
Abb. 7: Immunhistochemischer Nachweis von FoxP3 positiven Zellen im Ileum.....	30
Abb. 8: Gegenüberstellung des immunhistochemischen Nachweises von GPR43 mit LS-A1578 und LS-A6599 im Colon	35
Abb. 9: Boxplot zur deskriptiven Statistik zum Färbeverhalten der beiden Antikörper im Stroma	36
Abb. 10: Boxplot zur deskriptiven Statistik zum Färbeverhalten der beiden Antikörper im Epithel der basalen Krypten	37
Abb. 11: Boxplot zur Expression von GPR43 im Stroma der verschiedenen Darmabschnitte und beispielhafte Biopsien	39
Abb. 12: Boxplot zur Expression von GPR43 im Epithel der Zotten und Krypten des Duodenums und histologischer Ausschnitt aus dem Duodenum; LS-A1578.....	41
Abb. 13: Boxplot zur Expression von GPR43 im Epithel der Zotten von Ileum und Duodenum; LS-A1578.....	42
Abb. 14: Boxplot zur Expression von GPR43 im Stroma vor und nach ASCT	44
Abb. 15: Boxplot zur Expression von GPR43 im Stroma postTx nach einzelnen Schweregraden	45
Abb. 16: Boxplot zur Expression von GPR43 im Stroma vor und nach ASCT, unterteilt in Subgruppen.....	47
Abb. 17: Boxplot zur Expression von GPR43 im Epithel der basalen und oberflächlichen Krypten vor und nach ASCT.....	48
Abb. 18: Boxplot zur Expression von GPR43 im Epithel der basalen Krypten postTx nach einzelnen Schweregraden.....	49
Abb. 19: Boxplot zur Expression von GPR43 im Epithel der basalen Krypten vor und nach ASCT, unterteilt in Subgruppen.....	51
Abb. 20: Boxplot zur Expression von GPR43 im Epithel der Zotten vor und nach ASCT	53
Abb. 21: Boxplot zur Expression von GPR43 im Epithel der Zotten vor und nach ASCT, unterteilt in Subgruppen.....	55
Abb. 22: Boxplot zur Expression von GPR43 im Stroma in Abhängigkeit vom Biopsiezeitpunkt	58
Abb. 23: Boxplot zur Expression von GPR43 im Epithel der basalen Krypten in Abhängigkeit vom Biopsiezeitpunkt.....	60

Abb. 24: Boxplot zur Expression von GPR43 im Epithel der Zotten in Abhängigkeit vom Biopsiezeitpunkt.....	62
Abb. 25: Boxplot zur Expression von GPR43 im Stroma in Abhängigkeit von der Steroiddosis zum Biopsiezeitpunkt.....	63
Abb. 26: Boxplot zur Expression von GPR43 im Zottenepithel in Abhängigkeit von der Steroiddosis	64
Abb. 27: Boxplot zur Expression von GPR43 im Epithel der basalen Krypten in Abhängigkeit von der Antibiotikagabe	66
Abb. 28: Streudiagramm zur Korrelation der Expression von FoxP3 und GPR43 im Stroma	67
Abb. 29: Streudiagramm zur Korrelation der Expression von FoxP3 und GPR43 im Stroma in Abhängigkeit von der Antibiotikagabe	68
Abb. 30: Streudiagramm zur Korrelation der Expression von FoxP3 und GPR43 im Stroma in Abhängigkeit von der Steroiddosis	69
Abb. 31: Streudiagramm zur Korrelation der Daten aus der immunhistochemischen Untersuchung und der PCR-Analyse im Stroma.....	71
Abb. 32: Kaplan-Meier-Kurve zur TRM nach ASCT in Abhängigkeit von der GPR43 Expression im Stroma	75
Abb. 33: Kaplan-Meier-Kurve zur RRM nach ASCT in Abhängigkeit von der GPR43 Expression im Stroma	75

1 Einleitung

1.1 Allogene Stammzelltransplantation

Der erste Bericht über die Übertragung von Knochenmark im Mausmodell zur Behandlung von Leukämien stammt aus dem Jahr 1956 (1). Weitere Erkenntnisse aus Tierversuchen und die Beschreibung der humanen Leukozytenantigene (HLA) durch Dausset (2) und van Rood et al. (3) ermöglichten die erste erfolgreiche Stammzelltransplantation bei einem Kleinkind mit Wiskott-Aldrich-Syndrom (4).

Mittlerweile ist die Stammzelltransplantation mit mehr als 48.000 durchgeführten Transplantationen pro Jahr ein weltweit etabliertes Verfahren zur Behandlung verschiedener maligner, aber auch benigner hämatologischer Erkrankungen (5). Man unterscheidet die autologe Stammzelltransplantation, bei der dem Patienten eigene Stammzellen entnommen werden und zu einem späteren Zeitpunkt reinfundiert werden, von der allogenen Stammzelltransplantation (ASCT). Hierbei erhält der Patient nicht die eigenen Stammzellen, sondern die einer anderen Person (6). Hauptindikationen für eine ASCT sind myeloische und lymphatische Malignome wie die akute myeloische Leukämie (AML), die akute lymphatische Leukämie (ALL), sowie Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL). Neben den malignen Neoplasien werden mit einer ASCT auch benigne Erkrankungen wie die aplastische Anämie und Hämoglobinopathien wie die Sichelzellanämie und Thalassämie behandelt. Zusätzlich können auch primäre Immundefizienz und schwere Autoimmunerkrankungen mit einer ASCT behandelt werden (5).

Um eine ASCT sicher durchführen zu können, muss vorab ein passender Spender gefunden werden, der in möglichst vielen Gewebemerkmalen mit dem Empfänger übereinstimmt. Am wichtigsten ist dabei die HLA-Kompatibilität. In der Regel werden von Spender und Empfänger HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 bestimmt. Am günstigsten für den Erfolg der ASCT und das Gesamtüberleben ist eine Übereinstimmung in allen genannten HLA-Merkmalen. Indes gehen HLA-A, -B und -DRB1 Fehlpaarungen mit der höchsten Sterblichkeit einher (7).

Vor der eigentlichen Stammzelltransplantation erfolgt eine Konditionierungstherapie. Dabei werden durch Einsatz von Chemotherapie mit oder ohne Ganzkörperbestrahlung einerseits die malignen Zellen eliminiert. Andererseits werden durch die Konditionierung sämtliche hämatopoetische Zellen zerstört und es kommt zur Immunsuppression. Diese ist wichtig, um eine Abstoßung der später erhaltenen Stammzellen zu verhindern und ihr Anwachsen zu ermöglichen. Die Intensität der Konditionierungsprotokolle ist unter anderem abhängig vom Alter des

Patienten, der Schwere seiner Grunderkrankung und der bisher erfolgten Therapie (8). Neben der myeloablativen Konditionierung gibt es demnach die Möglichkeit einer dosisreduzierten Konditionierung (RIC). Sie ist weniger toxisch und ermöglicht eine sichere Durchführung für ältere und komorbide Patienten (9).

In den Anfangszeiten der Stammzelltransplantation wurden die Stammzellen unter Vollnarkose aus dem Beckenkamm extrahiert. Heute kommen hauptsächlich periphere Blutstammzellen (PBSC) aus venösem Blut zum Einsatz. Dafür muss der Spender vorab mit Wachstumsfaktoren wie dem Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF) behandelt werden, der eine Migration der Stammzellen vom Knochenmark in das Blutsystem bewirkt. Durch diese Stimulation ver Hundertfacht sich die Anzahl der zirkulierenden hämatopoetischen Stammzellen im Blut und somit können ausreichend Zellen gewonnen werden. Zudem ist eine Blutentnahme mit wesentlich geringeren Komplikationen behaftet. Eine weitere, jedoch selten angewandte Methode stellt die Gewinnung von Stammzellen aus dem Nabelschnurblut dar (10).

Die immunkompetenten Zellen des Spenders sind im Stande die malignen Tumorzellen des Empfängers erfolgreich zu eliminieren. Dieser Graft-versus-Leukämie-Effekt (GvL) trägt maßgeblich zur Bekämpfung der Grunderkrankung bei. Neben diesem erwünschten Effekt erkennen die Immunzellen des Spenders auch gesundes Gewebe des Empfängers als fremd und greifen es an, was zu der unerwünschten Komplikation einer Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD) führen kann (11). Zu den weiteren Komplikationen der ASCT zählen Infektionen mit Viren, Bakterien und Pilzen, gegen die sich das supprimierte Immunsystem nicht zur Wehr setzen kann und die daher nicht selten tödlich verlaufen. Andere Folgen sind Hypothyreose, Infertilität durch Gonadendysfunktion, das idiopathische Pneumoniesyndrom, Niereninsuffizienz, chronische Lebererkrankungen, verschiedene Autoimmunerkrankungen und Sekundär malignome als Folge der Konditionierung oder der Immunsuppression (12).

1.2 Graft-versus-Host-Erkrankung

Abhängig von einer Vielzahl an Faktoren entwickeln 30 bis 60 % der Patienten nach ASCT eine akute GvHD (aGvHD). Die aGvHD ist mit einer Mortalitätsrate von 15 bis 30 % eine der größten Herausforderungen der ASCT. Eine chronische GvHD (cGvHD) findet sich bei jedem zweiten Patienten nach ASCT. Sie ist mitverantwortlich für 25 % der Todesfälle (13). Die frühere Einteilung, bei der für die Unterscheidung zwischen akuter und chronischer GvHD

allein der Zeitraum nach ASCT entscheidend war, gilt mittlerweile als überholt. Nach der aktuell gültigen Definition des National Institutes of Health (NIH) unterscheidet man die klassische aGvHD mit einem Onset klinischer Symptome innerhalb von 100 Tagen nach ASCT von der späten aGvHD mit typischen Symptomen der aGvHD, die erst nach 100 Tagen einsetzen. Weiter differenziert man die klassische cGvHD mit Einsetzen nach 100 Tagen von dem Überlappungssyndrom, bei dem gleichzeitig Symptome der aGvHD und der cGvHD auftreten (14).

1.2.1 Pathogenese und Risikofaktoren für die GvHD

Für die Entstehung einer GvHD wurden 1966 von Billingham drei wesentliche Faktoren benannt:

- Das Transplantat muss immunkompetente Zellen enthalten
- der Empfänger exprimiert Antigene, die im Spenderorganismus nicht vorhanden sind und somit von Spender T-Zellen als fremd erkannt werden
- das Immunsystem des Wirts ist unfähig das Transplantat abzustößen (15).

Pathophysiologisch lässt sich die Entstehung der aGvHD in drei Phasen einteilen:

Phase 1: Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen (APC) des Empfängers

Der erste Schritt beginnt bereits nach der Konditionierungstherapie. Zusammen mit der Grunderkrankung führt diese zu Gewebeschäden, durch die es zur Liberation von proinflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interleukin (IL)-1 α und IL-6 kommt (16). Die freigesetzten Zytokine TNF α und Interferon γ (IFN γ) führen zu einer vermehrten Expression von Haupthistokompatibilitätskomplex(MHC)- Antigenen auf den Zellen des Empfängers (17). Dadurch werden sie in Phase 2 verstärkt von den Spender T-Zellen erkannt. Zudem aktivieren die freigesetzten Zytokine APC des Empfängers, welche für die T-Zell Aktivierung benötigt werden (18).

Zusätzlich kommt es im Gastrointestinaltrakt (GIT) durch die konditionierungsbedingte Schädigung von Epithelzellen zur Translokation von Lipopolysacchariden (LPS) und Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMP) aus dem Darmlumen ins Gewebe und die Blutbahn. LPS stimulieren wiederum die Produktion von TNF α durch Makrophagen, die zu den APC zählen (19). PAMP führen mithilfe von Toll-like Rezeptoren (TLR) und NOD-like Rezeptoren (NLR) zudem zur Aktivierung weiterer APC (20).

Phase 2: Aktivierung von Spender T-Zellen

In der zweiten Phase werden T-Zellen des Spenders aktiviert, indem sie mit ihren T-Zell-Rezeptoren an Alloantigene binden, die ihnen von den APC mittels HLA (humane Form der MHC-Antigene) präsentiert werden. Existiert zwischen Spender und Empfänger ein HLA-Mismatch, werden die fremden Antigene von den T-Zellen des Spenders erkannt und führen zu deren Aktivierung. Zur Aktivierung von $CD4^+$ T-Zellen müssen die Antigene von MHC der Klasse II (HLA-DR, -DQ, -DP) präsentiert werden, wohingegen $CD8^+$ T-Zellen MHC der Klasse I (HLA-A, -B, -C) benötigen. Aber auch bei HLA-kompatiblen Spendern kann sich eine aGvHD entwickeln. Dabei erkennen die T-Zellen des Spenders mit dem passenden T-Zell-Rezeptor Minor-Histokompatibilitätsantigene, die auf jedem Gewebe des Empfängers exprimiert werden (21).

Phase 3: Effektorphase

Ein komplexes Zusammenspiel der löslichen und zellulären Faktoren aus den ersten beiden Phasen führt in der Effektorphase zur Verstärkung des Gewebeschadens und der Entstehung einer Entzündungsreaktion. Durch die T-Zell Aktivierung werden multiple intrazelluläre Signalwege eingeleitet. Als Endprodukt exprimieren die T-Zellen unter anderem die Zytokine $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$. Letzteres aktiviert weitere APC, verstärkt die T-Zell Aktivierung und Proliferation und führt durch die Induktion von Apoptose und Nekrose zur direkten Zellschädigung. $IFN\gamma$ hat zwei entgegengesetzte Wirkungen. Einerseits verstärkt es die aGvHD, indem es eine vermehrte Expression von Chemokin-Rezeptoren initiiert, Makrophagen und Monozyten für LPS sensibilisiert und Zellen im GIT direkt zerstört. Andererseits beschleunigt $IFN\gamma$ die Apoptose von Spender T-Zellen was der Entstehung einer aGvHD entgegenwirkt. Die Überaktivität löslicher Mediatoren sorgt auf zellulärer Ebene zusätzlich für eine Migration weiterer T-Zellen aus lymphatischem Gewebe in die Zielorgane. Dort angekommen führen hauptsächlich zytotoxische T-Zellen über Fas/FasL und Perforin/Granzym Signalwege zur Zelllyse und somit zur Gewebeschädigung. Weil dadurch erneut inflammatorische Mediatoren freigesetzt werden, entsteht ein Kreislauf, der letztendlich in den für die aGvHD charakteristischen Zytokinsturm mündet (22).

Abbildung (Abb.) 1 fasst die Pathophysiologie der aGvHD zusammen.

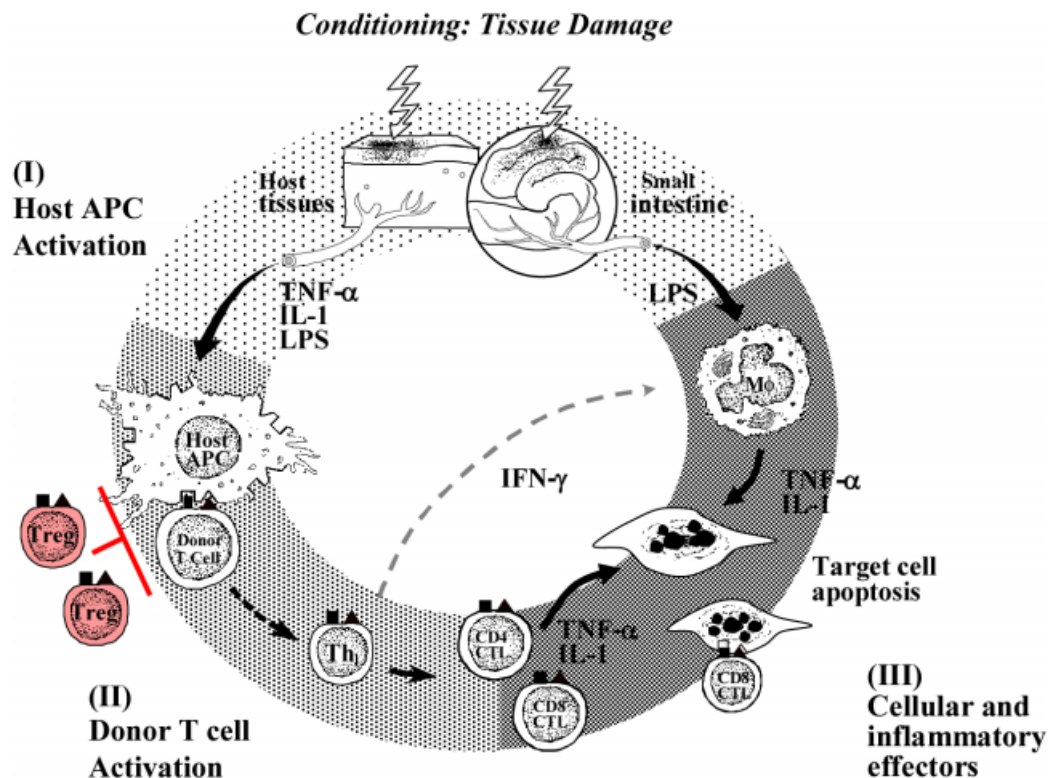


Abb. 1: Pathophysiologie der aGvHD

Übersicht über die drei Phasen der Entstehung einer aGvHD (23)

Wie in Abb. 1 zu erkennen ist, existieren auch Immunzellen, die der Entwicklung einer aGvHD entgegenwirken. Regulatorische T-Zellen (Treg) sind $CD4^+$ T-Zellen, die auf ihrer Oberfläche forkhead box Protein P3 (FoxP3) exprimieren. FoxP3 fungiert als Transkriptionsfaktor, der die Differenzierung von T-Zellen zu Treg steuert. Gleichzeitig dient FoxP3 als Marker für Treg (24). Diese Untergruppe der T-Zellen ist in der Lage, $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), B-Zellen und APC in ihrer Aktivität und Funktion zu unterdrücken und somit Entzündungsreaktionen zu begrenzen (25).

Zu den größten Risikofaktoren für die aGvHD zählen ein HLA-Mismatch und die Anwendung einer hochdosierten Konditionierungstherapie. Zudem wird vermutet, dass unterschiedliche Polymorphismen in den Genen, die für die Zytokine $TNF\alpha$, IL-1, -6, -10 und $IFN\gamma$ kodieren, eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der aGvHD spielen. Ein weiterer Erklärungsversuch stützt sich auf die Tatsache, dass die Hauptorgane, die von der aGvHD betroffen sind (GIT, Leber, Haut), allesamt Kontakt zu mikrobiellen Pathogenen haben. So könnten individuelle Unterschiede in der Interaktion von Antigenen und Pathogen-Recognition Rezeptoren (PRR) vor einer aGvHD schützen oder eine Entwicklung begünstigen (26). Holler et al. konnten

beispielsweise zeigen, dass eine Mutation im Gen für den PRR NOD2 das Risiko für transplantationsassoziierte Mortalität (TRM) und das Auftreten einer schweren GvHD erhöht (27).

Die Pathogenese der cGvHD ist bisher nur unzureichend erforscht. Es handelt sich um eine multisystemische Störung mit Beteiligung verschiedenster Organe. Dabei sind neben alloreaktiven Spender T-Zellen auch B-Zellen an den Prozessen beteiligt. In welcher Weise die Immunzellen, Auto- und Alloantigene, Chemokine und Zytokine miteinander wechselwirken ist jedoch noch nicht bekannt (22). Größter Risikofaktor für die Entwicklung einer cGvHD ist das Auftreten einer aGvHD in der Vergangenheit. Zu den weiteren Faktoren, die die Entstehung einer cGvHD begünstigen, zählen höheres Patientenalter, Einsatz von Knochenmark ohne T-Zell Depletion und weibliche Spender bei männlichen Empfängern (28).

1.2.2 Klinik und Diagnostik der GvHD

Klinisch manifestiert sich die aGvHD vor allem in der Haut, im GIT und in der Leber. Die Einteilung erfolgt gemäß den 1974 von Glucksberg et al. (29) festgelegten Kriterien. Diese sind in Tabelle (Tab.) 1 aufgeführt. Dabei wird jedes der oben genannten Organsysteme einzeln betrachtet und je nach Ausprägung der Symptome erfolgt die Zuteilung eines Schweregrades. Abhängig davon erfolgt dann die Einstufung des Gesamtschweregrades, was in Tab. 2 dargestellt wird.

Tab. 1: Schweregradeinteilung der am häufigsten betroffenen Organe nach Glucksberg et al. (29)

Schweregrad	Haut Klinisches Bild	Leber Bilirubin mg/dl	Darm Diarrhoe ml/Tag
1	Exanthem < 25 % Körperoberfläche	2 – 2,9	≥ 500
2	Exanthem 25 – 50 % Körperoberfläche	3 – 5,9	≥ 1000
3	generalisierte Erythrodermie	6 – 14,9	≥ 1500
4	generalisierte Erythrodermie mit Blasenbildung, häufig Desquamation	≥ 15	≥ 2000

Tab. 2: Gesamtschweregrad der aGvHD (30)

Gesamtgrad	Haut	Darm	Leber	Einschränkung Allgemeinzustand
I (leicht)	1-2	0	0	Keine
II (mäßig)	1-3	1	1	Leicht *
III (schwer)	2-3	2-3	2-3	Mäßig *
IV (lebensbedrohlich)	2-4	2-4	2-4	deutlich

* das Auftreten eines Merkmals an Darm oder Leber reicht aus, um den jeweiligen Gesamtgrad zu ergeben.

Bei der kutanen Manifestation einer aGvHD leiden Patienten unter Pruritus. Daneben kommt es zu unspezifischen Rötungen und Schwellungen von Haut und Schleimhäuten. Häufig entwickeln sich daraus Enantheme der Schleimhäute und makulopapulöse Exantheme der Haut. Davon betroffen sind meistens das Gesicht, die Handflächen und Fußsohlen und Stellen am Körper, die vermehrter Lichtexposition ausgesetzt sind. Mit zunehmender Schwere der Erkrankung kann sich aus dem Exanthem eine Erythrodermie mit Blasenbildung entwickeln.

Eine hepatische Beteiligung führt zu Ikterus und erhöhten Werten für Bilirubin, alkalische Phosphatase und Transaminasen. Zudem kann es zur Entwicklung einer Cholestase und/oder Hepatitis kommen.

Patienten mit einer GIT-GvHD leiden unter Übelkeit mit Erbrechen, abdominellen Schmerzen, voluminösen Durchfällen mit Blutbeimengungen und entwickeln teilweise sogar einen paralytischen Ileus. In Folge kommt es auch zu Malabsorption und Kachexie.

Differentialdiagnostisch ist die aGvHD der oben genannten Organsysteme oft schwer zu unterscheiden von Medikamentennebenwirkungen, Infektionen oder Folgen der Konditionierung. Für eine Diagnose müssen daher immer alle Organsysteme zusammen betrachtet werden und sämtliche andere Ursachen ausgeschlossen werden. Neben den klinischen Erkennungszeichen fußt die Diagnostik auf histologischen Merkmalen. Je nach Schweregrad zeigen sich in den intestinalen Biopsien vermehrt apoptotische Epithelzellen, erweiterte Krypten, veränderte Kryptenarchitektur bis hin zum vollständigen Kryptenverlust und eosinophile und neutrophile Infiltrate (8, 31).

Abb. 2 zeigt exemplarisch histologische Veränderungen durch die GvHD im Colon.

Da diese morphologischen Kennzeichen auch bei den genannten Differentialdiagnosen auftreten können, wird zunehmend nach anderen Methoden gesucht, die die Diagnostik verbessern.

So kann das ^{18}F -FDG PET/CT helfen, die richtige Stelle für eine Biopsie zu identifizieren (32) und mithilfe von kontrastmittelverstärktem Ultraschall (CEUS) kann die Aktivität einer GvHD im Verlauf beobachtet werden (33).

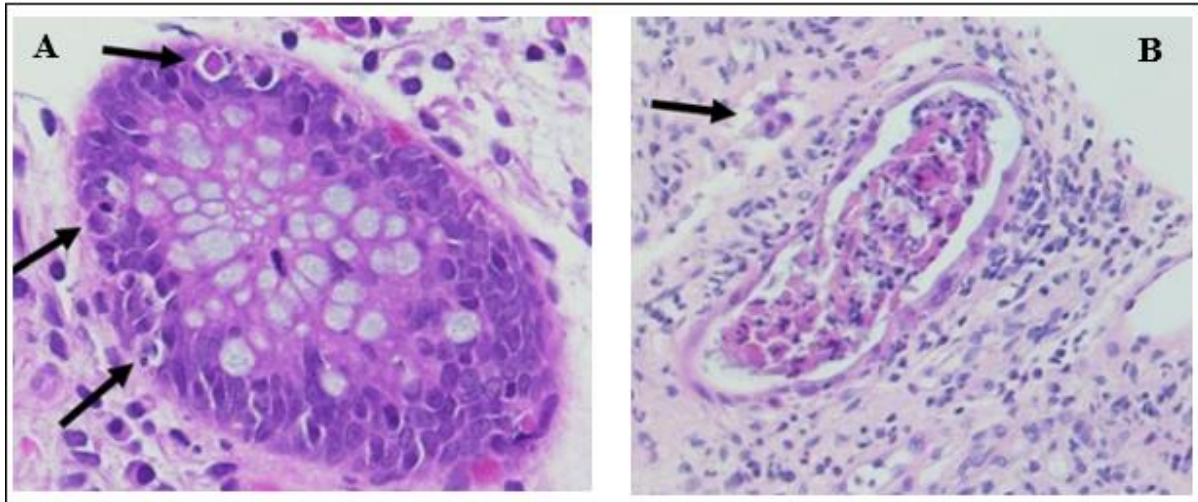


Abb. 2: Histologie der GvHD im Colon

A: Pfeile zeigen auf Apoptosen innerhalb der Krypte; **B:** ektatische Krypte mit Kryptendestruktion mit abgeflachtem Epithel und Zelldetritus im Lumen (34)

1.2.3 Prophylaxe und Therapie der GvHD

Weil die GvHD eine der gefährlichsten Komplikation der ASCT darstellt, gilt es die Entstehung zu verhindern. Neben der Berücksichtigung der unter 1.2.1 genannten Risikofaktoren spielt die medikamentöse Prophylaxe eine entscheidende Rolle. Als Standardprophylaxe erhalten Patienten Calcineurininhibitoren wie Cyclosporin A oder Tacrolimus in Kombination mit Methotrexat (MTX) oder Mycophenolatmofetil (MMF) (35). Die alleinige Gabe von Cyclosporin A ergab im Vergleich zur Kombination von Cyclosporin A mit MTX ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der Überlebenszeit. Patienten, die die Kombinationstherapie erhielten, zeigten jedoch seltener eine aGvHD. Ähnliche Ergebnisse zeigte der Vergleich von MTX und Cyclosporin A mit MTX und Tacrolimus. Für die Überlebensrate wurden auch hier keine Unterschiede festgestellt, unter Kombination mit Tacrolimus kam es aber seltener zu aGvHD (36, 37).

Die oben genannten Medikamente haben eine immunsuppressive Wirkung, mit der vor allem die T-Zellen beeinflusst werden sollen, da diese maßgeblich an der Entwicklung einer aGvHD

beteiligt sind. Calcineurininhibitoren blockieren das Enzym Calcineurin. Dadurch kann der Transkriptionsfaktor nuclear factor of activated T-cells (NFAT) seine Wirkung nicht entfalten, was wiederum zu verminderter Bildung von IL-2 und anderen Zytokinen führt und die Aktivierung und Funktion der T-Zellen einschränkt. MTX ist ein Folsäure-Antagonist und hemmt den Stoffwechsel in aktivierten T-Zellen. MMF blockiert die Inosinmonophosphat-Dehydrogenase, das Schlüsselenzym für die de novo Purinsynthese. Da vor allem die proliferierenden T-Zellen von dieser Synthese abhängig sind, kann MMF deren Aktivität und Funktion deutlich reduzieren (30, 38).

Die T-Zell-Depletion ist eine weitere, sehr effektive Methode, um die Entstehung einer GvHD zu vermeiden. Anwendung findet sie hauptsächlich, wenn Stammzellen von nicht verwandten Spendern transplantiert werden oder wenn ein HLA-Mismatch zwischen Spender und Empfänger vorliegt (38). Dabei versucht man durch verschiedene Verfahren die Anzahl der Spender-T-Zellen zu reduzieren. Dadurch werden die GvHD-Raten sehr effektiv gesenkt, gleichzeitig verzögert sich aber die Rekonstitution des Immunsystems, wodurch sich das Risiko für Transplantatversagen, ein Rezidiv der Grunderkrankung und die Reaktivierung von CMV und EBV erhöht. Eine der gängigsten Methoden zur T-Zell-Depletion ist die Gabe von Antikörpern, die sich gegen Strukturen auf den T-Zellen richten und zu deren Lyse führen. Einer der ersten verwendeten Antikörper war Antithymozytenglobulin (ATG). Es handelt sich um einen polyklonalen Antikörper, der sich gegen Epitope auf T-Zellen und NK-Zellen richtet (30). In einer randomisierten, nicht verblindeten, multizentrischen Studie zeigte sich, dass eine um ATG ergänzte Standardprophylaxe mit Cyclosporin A und MTX die Inzidenz von akuter und chronischer GvHD bei HLA-identischen Fremd Spendern senken konnte, ohne einen negativen Einfluss auf das Überleben der Patienten zu haben (39).

Kommt es trotz der genannten prophylaktischen Maßnahmen zu einer GvHD, erfolgt im Rahmen der Primärtherapie die Gabe von Glukokortikoiden. Wenn sich die Erkrankung nur leicht an der Haut manifestiert, ist eine topische Anwendung ausreichend. Bei schweren Formen oder der Beteiligung weiterer Organe ist eine hochdosierte, systemische Applikation notwendig. Schlägt diese Behandlung nicht an, kommen als Zweitlinientherapie die Gabe des Januskinase-Inhibitors Ruxolitinib oder eine extrakorporale Photopherese zum Einsatz. Dabei werden die weißen Blutzellen aus dem Patientenblut isoliert und einer Behandlung mit ultravioletter Licht unterzogen. Dies führt unter anderem zur Induktion von Apoptose in den Immunzellen und hat somit einen antiinflammatorischen Effekt. Andere Therapieoptionen konzentrieren sich auf die Blockade von inflammatorischen Zytokinen wie TNF α oder IL-2 (23, 40).

1.2.4 Bedeutung von Biomarkern für Diagnose, Prognose und Therapie

Ergänzend werden spezifische Biomarker für die Diagnostik, Prognoseerstellung und Therapieplanung eingesetzt. Dabei eignet sich ein Algorithmus aus den beiden Proteinen Regenerating islet-derived protein 3 alpha (Reg3 α) und Suppressor of tumorigenicity-2 (ST2) am besten zur Vorhersage des Risikos für Non-Relapse Mortality (NRM) zum Zeitpunkt des Onsets einer aGvHD. Durch die Möglichkeit der frühen Identifizierung von Hochrisikopatienten trägt die Bestimmung dieser Biomarker zu einer optimalen Therapie von Patienten mit aGvHD bei und hilft sowohl eine Über- als auch eine Unterbehandlung zu vermeiden (41, 42).

Ein weiterer Biomarker zur Prognoseabschätzung ist die Anzahl von Treg im Blut. Proben von Patienten mit aGvHD zeigten 40 % weniger Treg im Vergleich zu Patienten ohne GvHD. Außerdem sank die Zahl an Treg mit zunehmenden Schweregrad der aGvHD nahezu linear und Patienten mit einer Treg Anzahl kleiner als der Median zeigten eine signifikant höhere NRM im ersten Jahr nach ASCT als Patienten, deren Treg Anzahl über dem Median lag (43).

1.3 Bedeutung des Mikrobioms für die GvHD

Bisherige Studien haben gezeigt, dass auch das Mikrobiom eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der GvHD spielt und vor allem eine reduzierte Vielfalt der vorkommenden Mikroorganismen mit einer schlechten Prognose einhergeht. Holler et al. zeigten, dass es nach ASCT zu einer Umverteilung der Mikroorganismen und einem Verlust ihrer Diversität kommt. Die Zahl von Enterokokken, die zur Klasse der Bacilli gehören, nimmt demnach stark zu. Gleichzeitig kommt es zur Reduktion von Vertretern der Firmicutes, zu denen Milchsäurebakterien (Lactobacillales) und Bakterien aus der Klasse Clostridia zählen. Diese Veränderung war am stärksten bei Patienten mit aktiver GIT GvHD zu beobachten. Bei ihnen gingen kommensale Bakterien nahezu komplett verloren (44). Eine weitere entscheidende Ursache für den Verlust der mikrobiellen Diversität und dem damit verbundenem erhöhten Mortalitätsrisiko ist der Einsatz von Breitspektrumantibiotika wie Piperacillin/Tazobactam oder Meropenem (45).

Taur et al. konnten zeigen, dass der Diversitätsverlust ein unabhängiger Risikofaktor für die Mortalität nach ASCT darstellt. Die Patienten wurden nach Analyse ihres Mikrobioms im Stuhl in drei Gruppen mit niedriger, mittelgradiger und hoher Diversität eingeteilt. Dabei fanden sich Mortalitätsraten von 67 %, 60 % und 36 % nach drei Jahren (46).

Ein Grund für die veränderte Zusammensetzung des Mikrobioms bei Patienten mit GvHD ist die verminderte Produktion von α -Defensinen durch Paneth-Körnerzellen, welche durch die GvHD zerstört werden. Die α -Defensine sind maßgeblich an der Regulation des Mikrobioms beteiligt, da sie bakterizid gegen opportunistische Bakterien wirken und gleichzeitig nur wenig Einfluss auf die natürlich vorkommenden, dem Körper nützenden Bakterien haben (47).

Ein indirekter Marker für die Anwesenheit kommensaler, protektiver Bakterienspezies ist das 3-Indoxylsulfat (3-IS) im Urin. Es entsteht bei der Verstoffwechslung von in der Nahrung enthaltenem L-Tryptophan. Für den ersten Schritt dieser Umwandlung benötigt es ein Enzym, welches nur von bestimmten Bakterien exprimiert wird. 3-IS ist unter anderem an der Regulation der Barrierefunktion der Schleimhaut und der Ausschüttung entzündungsfördernder und -hemmender Mediatoren beteiligt. Während das Vorhandensein von Vertretern der Klasse Bacilli negativ mit den 3-IS Spiegeln korreliert, steigen die Spiegel in Anwesenheit von Kommensalen wie *E. rectale* und anderen Clostridien. Dadurch erlaubt die Analyse von 3-IS Rückschlüsse auf die Zusammensetzung und die Vielfalt des Mikrobioms. Die 3-IS Spiegel werden außerdem durch bestimmte Antibiotika und den Zeitpunkt ihrer Applikation beeinflusst. Eine Therapie mit Ciprofloxacin/Metronidazol führte im Vergleich zur Gabe von Rifaximin zu signifikant geringeren 3-IS Werten. Bei Patienten, die bereits vor der ASCT systemisch mit Antibiotika behandelt wurden, fanden sich ebenfalls niedrigere 3-IS Konzentrationen. Das 3-IS kann zudem bei der Risikoabschätzung für die Entwicklung einer GIT-GvHD herangezogen werden. So ist die TRM bei Patienten deutlich erhöht, die in den ersten zehn Tagen nach ASCT vergleichsweise niedrige 3-IS Spiegel aufweisen, was auf eine verminderte Vielfalt der Mikroorganismen hindeutet (48).

1.4 GPR43 Rezeptor im Zusammenhang mit der GvHD

1.4.1 Kurzkettige Fettsäuren

Von den unzähligen Mediatoren, die vom Mikrobiom gebildet werden und die Homöostase des menschlichen Körpers beeinflussen, nehmen die kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) eine Sonderstellung ein. Sie entstehen bei der anaeroben Fermentation von unverdaulichen Kohlenhydraten, die auch als Ballaststoffe bezeichnet werden. Die häufigsten SCFA sind Acetat, Propionat und Butyrat (49). Hauptproduzenten von Acetat und Propionat sind Bacteroidetes. Butyrat wird hingegen hauptsächlich von Firmicutes produziert (50).

SCFA dienen dem Körper einerseits als Energiequelle. Andererseits fördern sie die Integrität des intestinalen Epithels und hemmen die Zytokinproduktion in mononukleären Zellen und in T-Zellen (51).

Ihre Wirkung entfalten sie über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Hemmung der Histone-Deacetylase (HDAC) und Stabilisierung des Hypoxie-induzierten Faktors (HIF) (52 - 54). Auch die Entstehung von Immunantworten und Entzündungen wird maßgeblich von SCFA mitbestimmt. Auf die zugrundeliegenden Mechanismen und die Rolle der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in diesem Zusammenhang wird im folgenden Absatz eingegangen.

1.4.2 Physiologie und Vorkommen des GPR43 Rezeptors

G-protein-gekoppelte Rezeptoren, die Fettsäuren binden, bestehen aus insgesamt sieben transmembranösen Untereinheiten. Liganden für den GPR43 Rezeptor sind die SCFA Acetat, Propionat und Butyrat. Der GPR43 Rezeptor, der auch Free fatty acid receptor 2 (FFAR2) genannt wird, kann G_i gekoppelt sein und somit die Aktivität der Adenylatcyclase herabsetzen und Extracellular signal-regulated kinases (ERK) aktivieren. Zudem kann der FFAR2 G_q gekoppelt für einen Anstieg des intrazellulären Calciums sorgen und die Mitogen-activated protein kinase (MAPK) aktivieren. Eine Expression von GPR43 findet sich in Zellen des weißen Fettgewebes, enteroendokrinen Zellen des GIT, intestinalen Epithelzellen, β -Zellen des Pankreas und verschiedenen Zellen des Immunsystems (55). Vor allem neutrophile Granulozyten, Monozyten und B-Lymphozyten exprimieren den FFAR2 (56). Somit beeinflussen SCFA die Entstehung von Entzündungen und steuern Immunreaktionen, indem sie sowohl die Produktion pro- als auch antiinflammatorischer Zytokine regulieren. Es konnte gezeigt werden, dass GPR43 in einem β -Arrestin 2 abhängigen Weg die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF κ B herabsetzt, wodurch weniger pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IL-1 β freigesetzt wurden (57). Im Gegensatz dazu führt die Aktivierung von GPR43 über den nachgeschalteten ERK1/2 und p38MAPK Signalweg zur vermehrten Liberation von entzündungsfördernden Mediatoren (58).

Neben diesen Effekten sind SCFA auch an der Rekrutierung von Immunzellen beteiligt. Vinolo et al. beobachteten bei Ratten eine vermehrte Expression von L-Selectin auf neutrophilen Granulozyten durch Applikation von SCFA. L-Selectin fungiert als Adhäsionsmolekül, welches Immunzellen ein Anheften an Endothelzellen ermöglicht. Dadurch gelangen sie zum Ort der Entzündung und können ihre Wirkung entfalten (59). Dort angekommen bekämpfen

neutrophile Granulozyten Pathogene unter anderem durch die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Die ROS Liberation wird wiederum durch die Anwesenheit von SCFA in einer GPR43 abhängigen Weise gesteigert (60).

Neutrophile Granulozyten sind jedoch nicht die einzigen Immunzellen, deren Funktion und Migration durch SCFA beeinflusst werden. Nach Zufuhr von Propionat über das Trinkwasser beobachteten Smith et al. eine deutliche Zunahme der Treg im Colon von keimfreien Mäusen. Neben der vermehrten Anzahl sorgte die Supplementierung von SCFA bei Treg auch für eine gesteigerte Produktion und Freisetzung von IL-10. Dieses Interleukin ist essenziell für die Unterdrückung anderer Immunzellen. Im Vergleich von Wildtyp Mäusen mit GPR43 Knockout-Mäusen konnte zudem bewiesen werden, dass die Effekte von SCFA GPR43 abhängig entfaltet werden, vermutlich durch die Hemmung von HDAC (61).

Der GPR43 Rezeptor ist ferner verantwortlich für den Erhalt und Schutz der Barrierefunktion des intestinalen Epithels. Eine Aktivierung von GPR43 führt durch Mobilisation von Calcium in der Zelle und Ausstrom von Kalium zur Hyperpolarisation und dadurch zur Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms (62). Dieses trug im Mausmodell durch kompensatorische Proliferation von intestinalen Epithelzellen zum Erhalt der Barrierefunktion des Epithels nach induzierter Inflammation bei (63). Auch im humanen Modell konnte gezeigt werden, dass unter Anwesenheit von Butyrat weniger pro-inflammatorische Zytokine von Epithelzellen gebildet werden. Außerdem konnte die Integrität des Epithels nach inflammatorischer Stimulation in Gegenwart von Butyrat stärker aufrechterhalten werden, als in Zelllinien ohne Zugabe von Butyrat (64).

1.4.3 Zusammenhang zwischen dem GPR43 Rezeptor und der Pathogenese der GvHD

Mit dem Ziel, die schützenden Effekte von SCFA auf den GIT bei GvHD zu identifizieren und den Zusammenhang eines gestörten Mikrobioms und der Entwicklung einer GvHD besser zu verstehen, wurde die Expression des Fettsäurerezeptors GPR43 im Tiermodell genauer untersucht. Bei der Untersuchung von GPR43 Knockout-Mäusen nach ASCT zeigte sich eine signifikant stärkere Ausprägung der GvHD mit erhöhter Mortalität im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Die fehlende Expression von GPR43 beeinflusste maßgeblich das Mikrobiom. Vor der Transplantation zeigten beide Gruppen eine vergleichbare Zusammensetzung des Mikrobioms. Durch die ASCT kam es in den GPR43 Knockout-Mäusen jedoch zur Reduktion von Vertretern

der Klasse Clostridia und einer Zunahme des Phylums Proteobacteria (65). Beide Veränderungen tragen zur stärkeren Ausprägung der GvHD und erhöhter Mortalität bei (44, 46).

Unter den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren für SCFA ist der FFAR2 der Einzige, dessen Expression durch eine ASCT beeinflusst wird. Nach ASCT kam es zu einer signifikanten Abnahme der Expression auf intestinalen Epithelzellen im Mausmodell. Diese Feststellung und die Beobachtung, dass die GvHD in GPR43 Knockout-Mäusen deutlich stärker ausgeprägt war als in den Wildtyp Mäusen, verdeutlichen den GPR43 spezifischen Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf der GvHD. Zur Identifizierung der verantwortlichen Zellen wurde zudem die GPR43 Expression auf APC, intestinalen Epithelzellen als Vertreter nicht hämatopoetischer Zellen und Spender T-Zellen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass nur die Expression auf nicht hämatopoetischen Zellen mit der Ausprägung der GvHD korreliert. Ein zusätzlicher Beitrag durch Immunzellen konnte jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Als zugrundeliegender Mechanismus für den schützenden Effekt der SCFA wurde die GPR43 abhängige Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms in nicht hämatopoetischen Stammzellen identifiziert (65).

Ghimire et al. konnten zusätzlich zeigen, dass der FFAR2 auch die Pathogenese der GvHD im humanen Organismus beeinflusst. In einer Analyse mittels Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde bei Patienten mit symptomatischer aGvHD eine größere Menge GPR43 mRNA gefunden als bei Patienten ohne GvHD, bei denen eine routinemäßige Biopsie entnommen wurde. Zudem wurde aus Proben mit höherem Lerner Grad (2 - 4) mehr mRNA isoliert als aus Proben mit milderer GvHD. Überdies induzierte die Gabe von Butyrat eine Zunahme der GPR43 mRNA in Enterozyten. Dies impliziert, dass die Erhöhung der Rezeptordichte von der Anwesenheit von SCFA abhängt, welche wiederum von kommensalen Bakterien gebildet werden. Damit steht der protektive Effekt von FFAR2 im direkten Zusammenhang mit dem Mikrobiom. Gestützt wird dies auch durch die Beobachtung, dass nach Einsatz von Breitbandantibiotika, die die Anzahl von Kommensalen bekanntlich reduzieren, signifikant weniger GPR43 RNA isoliert werden konnte.

Als verantwortliche Zellen sieht auch diese Untersuchung Epithelzellen als Vertreter der nicht hämatopoetischen Zellen. Die Tatsache, dass im Ileum - dem Darmabschnitt mit dem größten Vorkommen an Immunzellen - am meisten RNA isoliert werden konnte, lässt darüber hinaus auch eine Beteiligung von Immunzellen vermuten. Hierfür spricht auch, dass die Gabe von

SCFA zu einer Zunahme von GPR43 mRNA in dendritischen Zellen von gesunden Spendern führte (64).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die verantwortlichen Zellen in der Arbeit von Ghimire et al. wurden durch in vitro Zelllinien identifiziert (64). Somit ist bisher noch unbekannt, welche Zellen im lebenden Organismus mit GvHD GPR43 exprimieren und wovon diese Expression abhängt. Ziel dieser Arbeit ist es daher, mittels histomorphologischer Analyse die Rolle der GPR43 Expression für die Entstehung einer GvHD zu erforschen. Einerseits sollte das Zellkompartiment identifiziert werden, das den Fettsäurerezeptor hauptsächlich exprimiert. Andererseits wurde untersucht, ob sich die Expression von GPR43 in den verschiedenen Anteilen des GIT (Duodenum, Ileum, Colon) unterscheidet.

Außerdem wurde geprüft, ob die Schwere der GvHD die Expression des Fettsäurerezeptors beeinflusst. Neben dem Lerner Grad wurden zudem als weitere mögliche Einflussfaktoren der Zeitpunkt der Biopsie nach ASCT, die Gabe von systemischer Antibiose zum Biopsiezeitpunkt und die verabreichte Steroiddosis analysiert. Des Weiteren sollte geprüft werden, ob die ermittelten Werte aus der PCR-Analyse mit den immunhistochemischen Daten vergleichbar sind und einen Rückschluss auf das Kompartiment der GPR43 Expression zulassen. Da Treg eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der GvHD spielen und ihre Anzahl durch die Anwesenheit von SCFA gesteigert wird, wurde zudem untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der GPR43 Expression und der Anzahl FoxP3 positiver Zellen gibt. Um herauszufinden, inwieweit die Zusammensetzung des Mikrobioms die GPR43 Expression beeinflusst, wurden die erhobenen Daten mit den 3-IS Werten aus Urinproben korreliert.

Zuletzt wurde überprüft, ob es einen Zusammenhang zwischen der GPR43 Expression und der Überlebenszeit der Patienten gibt.

Die erhobenen Daten sollen zum besseren Verständnis des Zusammenhangs zwischen GPR43 und der Pathogenese der GvHD beitragen. Außerdem sollen sie die Rolle des Mikrobioms als mögliches Bindeglied deutlich machen. Die Erkenntnisse könnten für die Therapieentscheidung und Identifikation von Risikopatienten einen wichtigen Beitrag leisten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Alle verwendeten Geräte, Software, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien sind Tabellen 3 - 5 zu entnehmen.

Tab. 3: Geräte und Software

Produkt	Hersteller
HistoStar TM Ausgießstation	ThermoFisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Shandon Pathcentre Gewebeprozessor (Fixierautomat)	ThermoFisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
HM 430 Schlittenmikrotom	ThermoFisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
HM 340E elektronisches Rotationsmikrotom	ThermoFisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
CTM6 Glaseindeckautomat	ThermoFisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
Automatischer Färbe- und Glaseindeckautomat Tissue-Tek [®] Prisma & Tissue-Tek [®] Glas TM g2d	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, DE
Pannoramic 250 FLASH III	3DHISTECH, Budapest, Ungarn
DESERT Probentrockner	MICROS Produktions- & Handelsges.m.b.H., St. Veit/Glan, AT
VENTANA E-Bar TM II Printing System	Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
VENTANA BenchMark ULTRA Färbesystem	Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
FiF Mikrowelle mit Grill MD 42035	MEDION AG, Essen, DE
ACER Aspire E 15 (E5-576-72PC), Notebook	Acer Computer GmbH, Ahrensburg, DE
LG Flatron L1919S-SFQ.AEUREP	LG Group, Seoul, Südkorea
IBM SPSS Statistics, Version 26	International Business Machines Corporation, Armonk, USA
CaseCenter 2.9	3DHISTECH, Budapest, Ungarn
CaseViewer 2.4	3DHISTECH, Budapest, Ungarn
Mikroskop Axioskop 40	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE

Tab. 4: Reagenzien

Produkt	Hersteller
Formalinlösung 4 %	SG Planung, Holzkirchen, DE
EZ Prep Concentrate (10X), Code: 950-102	Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
ULTRA Cell Conditioning Solution (UL- TRA CC1), Code: 950-224	Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Reaction Buffer Concentrate (10X), Code: 950-300	Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
OptiView DAB IHC Detection Kit, Code: 760-700	Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
ULTRA LCS (Predilute), Code: 650-210	Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Bluing Reagent, Code: 760-2037	Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Antibody Diluent, Code: 251-018	Ventana Medical Systems Inc., Tucson, USA; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Papanicolaous Lösung 1a Harris' Häma- toxylinlösung, Code: 1.09253	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Essigsäure (Eisessig) 100 %, Code: 100063	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, Code: 1.06448	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Citronensäure-Monohydrat, Code: 1.00244	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Isopropanol 99 %, Code: ISOP-5000-100-1	SAV LP GmbH, Flintsbach a. Inn, DE
Xylol, Code: A-000551101	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
HCL 37 %, Code: 100.317	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Dako REAL Antibody Diluent, Code: S2022	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK
Dako REAL Peroxidase-Blocking Solu- tion, Code: S2023	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK
Dako Liquid DAB + Substrate Chromogen System, Code: K3468	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK

Dako Wash Buffer (10x), Code: S3006	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK
N-Histofine® Simple Stain MAX PO (R), Universal Immuno-peroxidase Polymer, Anti-Rabbit, Code: 414141F	Nichirei Biosciences Inc., Tokyo, Japan
Mayers Hämlaunlösung, Code: 1.09249	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Polyclonal Rabbit Anti-Human FFAR2/GPR43 Antibody (extracellular domain), LS-A6599	LifeSpan BioSciences, Inc., Seattle, USA
Polyclonal Rabbit Anti-Human FFAR2/GPR43 Antibody (cytoplasmic domain), LS-A1578	LifeSpan BioSciences, Inc., Seattle, USA
FOXP3 Monoclonal Antibody (236A/E7), eBioscience™, Code: 14-4777-82	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

Tab. 5: Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Gewebe-Einbettkassetten	KABE LABORTECHNIK GmbH, Nümbrecht-Elsenroth, DE
SuperFrost Plus™ Adhäsionsobjektträger	Thermo Fisher Scientific™ GmbH, Schwerte, DE
Einbetttschälchen	Engelbrecht GmbH, Edermünde, DE
Mikroskopische Deckgläser, 24 x 50 mm; Stärke 1 (0,13 – 0,16 mm)	R. Langenbrick GmbH Labor- und Medizintechnik, Emmedingen, DE
Spülmittel	August Wencke OHG, Bremen-Lesum, DE

2.2 Patientenkollektiv und Biopsieauswahl

Insgesamt wurden für diese Arbeit 100 Gewebeproben von 97 Patienten ausgewählt, die im Zeitraum von Juli 2007 bis September 2019 eine ASCT in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie am Universitätsklinikum Regensburg erhielten. Das durchschnittliche Alter zum Zeitpunkt der Transplantation lag bei 54,5 Jahren (20,8 bis 69,4 Jahre). Die Auswertung erfolgte unter ärztlicher Supervision (Dr. med. Katrin Hippe). Bei den Proben handelte es sich

um Biopsien und Resektate aus verschiedenen Bereichen des GIT von Patienten vor und nach einer ASCT (86 Proben nach ASCT, 14 Proben vor ASCT). Dabei stammten 40 Proben aus dem distalen Colon, 30 Proben aus dem Ileum und 30 Proben aus dem Duodenum. Es wurden nur Proben gewählt, die dem Onset einer GvHD im Darm entsprachen. Biopsien aus Adenomen, Polypen und anderen Neoplasien wurden ausgeschlossen. Außerdem wurde von jedem Patienten bevorzugt nur eine Probe ausgewählt. Zur Kontrolle dienten Biopsien aus den oben genannten Lokalisationen, die vor ASCT entnommen wurden. Bei der Auswahl wurde zusätzlich der Lerner Grad der GvHD beachtet und eine gleichmäßige Verteilung desselben angestrebt. Vor der Biopsieentnahme hatten alle Patienten der Analyse ihrer Biopsie für Studienzwecke zugestimmt. Dieses Projekt wurde durch die Ethikkommission der Universität Regensburg genehmigt (Ethikvotum der Universität Regensburg 09/059: Untersuchung zur intestinalen Immundysregulation nach allogener SCT an Darmbiopsien).

Weitere demographische und klinische Daten zu den Patienten sind Tab. 6 zu entnehmen. Die Prozentangaben sind dabei auf die erste Nachkommastelle gerundet.

Tab. 6: Patientencharakteristika

Merkmal	N	Anteil (%)
Gesamtzahl Patienten	97	100
Geschlecht		
Männlich	57	58,8
Weiblich	40	41,2
Zugrundeliegende Diagnose		
AML	39	40,2
Myelodysplastische Syndrom	15	15,5
NHL	11	11,3
OMF, MPS, CML	7	7,2
Plasmozytom	7	7,2
Aplastische Anämie, CTLA 4 Defekt	4	4,1
ALL	5	5,2
CLL	5	5,2
M. Hodgkin	2	2,1
Andere	2	2,1
Spender		
Nicht verwandter Spender	65	67,0
Geschwister	27	27,8
Haploidentischer Familienspender	5	5,2
Stammzellquelle		
PBSC	83	85,6
Knochenmark	14	14,4
Konditionierungstherapie		
RIC	84	86,6
Standard	12	12,4
Andere	1	1,0

2.3 Eingang der Proben und Fixierung

Die eingehenden Proben wurden mithilfe des automatisierten Gewebeprozessors bearbeitet. Dieser fixierte die Gewebeproben zuerst in einer gepufferten, 4%igen Formalinlösung. Anschließend erfolgte die Dehydrierung durch eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol. Zuletzt wurden die Proben von flüssigem Paraffin durchtränkt und anschließend mithilfe der Ausgießstation in Einbettkassetten aus Kunststoff ausgegossen. Routinemäßig wurde von jeder Probe im Eingangslabor mit einem Rotationsmikrotom ein 3 µm dicker Schnitt angefertigt und dieser mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt.

2.4 Immunhistochemie

2.4.1 Grundlagen

Antigendemaskierung

Bei der Fixierung der Biopsien reagiert das Formalin mit basischen Aminosäuren und bildet Quervernetzungen mittels Hydroxymethylenbrücken aus. Dabei kann sich die dreidimensionale Struktur der Epitope verändern, was die Bindung des Primärantikörpers erschwert. Diese Maskierung der Epitope muss vor Beginn des Färbeprozesses rückgängig gemacht werden. Dazu werden die Objektträger in eine wässrige Pufferlösung mit definiertem pH-Wert gebracht und anschließend bei Temperaturen von etwa 100 °C für 10 - 60 min inkubiert (66).

Detektion des Zielantigens

Um die GPR43 positiven Zellen unter dem Mikroskop sichtbar zu machen, wurde für den Antikörper LS-A6599 ein Polymer-basiertes, indirektes Verfahren angewandt. Im ersten Schritt erfolgt die Bindung des unmarkierten Primärantikörpers LS-A6599 an den GPR43 Rezeptor. Dabei handelt es sich um einen polyklonalen Antikörper, der im Kaninchen hergestellt wird. Anschließend erfolgt die Zugabe eines Polymers, welches sich aus Aminosäurepolymeren, der Meerrettichperoxidase (HRP) und zu Fab'-Fragmenten reduzierten Sekundärantikörpern zusammensetzt. Die Sekundärantikörper binden spezifisch an Kaninchen- und Maus-Immunglobuline. Folglich bindet das Polymer über die enthaltenen Sekundärantikörper an die Fc-Region des verwendeten Primärantikörpers. Für das Farbsignal sorgt dann die Enzymreaktion der HRP (67). Eine schematische Übersicht dieser Methode zeigt Abb. 3.

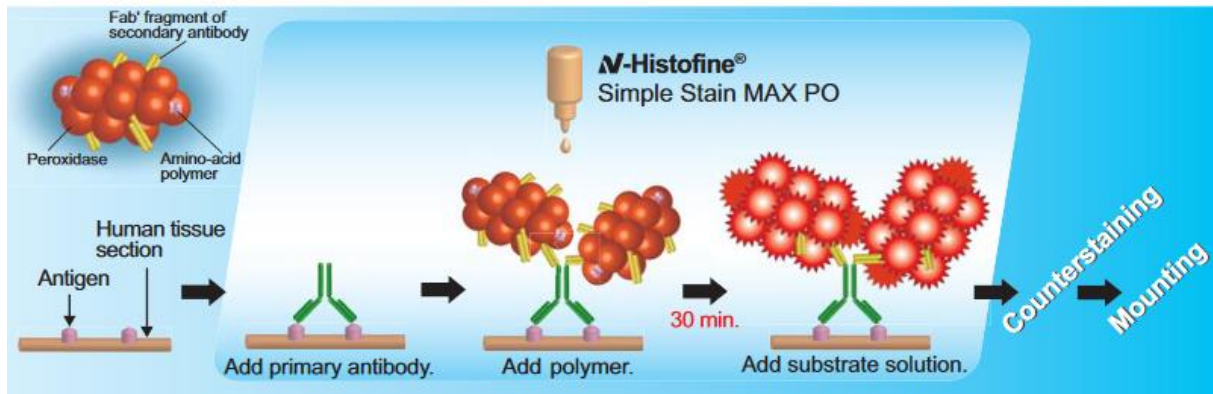


Abb. 3: Detektionsmethode für Antikörper LS-A6599 (68)

Das für den Antikörper LS-A1578 verwendete Detektionssystem basiert auf einer indirekten Methode, die drei verschiedene Antikörper verwendet. Im ersten Schritt bindet der im Kaninchen hergestellte polyklonale Primärantikörper LS-A1578 an das Zielantigen. Im zweiten Schritt wird dieser Antikörper durch eine Mischung aus Sekundärantikörpern lokalisiert. Dabei handelt es sich um haptenmarkierte Antikörper der Ziege, die Maus- und Kaninchen-Primärantikörper spezifisch nachweisen. Im dritten Schritt binden HRP markierte Tertiärantikörper an die Haptene, die kovalent an die Sekundärantikörper gebunden sind. Auch hier ist die Reaktion der HRP für das Farbsignal verantwortlich (69). Abb. 4 verdeutlicht diese Methode.

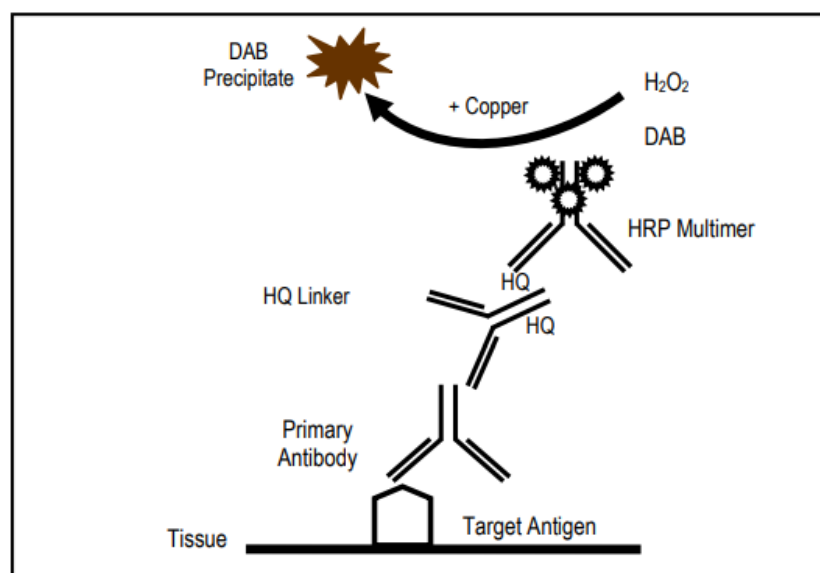


Abb. 4: Detektionsmethode für Antikörper LS-A1578 (69)

Enzymreaktion der Meerettichperoxidase

Im katalytischen Zentrum der HRP befindet sich eine Häm-Gruppe. Die HRP katalysiert die Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff. Als Elektronendonoren dienen dabei chromogene Substanzen, die bei der Reaktion selbst oxidiert werden. Das 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) bildet durch die Oxidation einen braunen Farbkomplex, der das Antigen unter dem Mikroskop dann sichtbar macht. Um zu verhindern, dass endogene Peroxidasen mitangefärbt werden und ein unspezifisches Signal liefern, blockiert man diese im Vorfeld durch Zugabe von Wasserstoffperoxid im Überschuss (66).

2.4.2 Austestung der Primärantikörper

Vor der Färbung wurden passende Antikörper von verschiedenen Herstellern verglichen und ausgetestet. Das Unternehmen LSBio bot zwei unterschiedliche Antikörper an, die beide gegen den GPR43 Rezeptor gerichtet sind und spezifisch Membranen und Zytoplasma färben sollen. Im Vergleich wiesen die beiden Antikörper jedoch ein sehr unterschiedliches Färbemuster auf. LS-A1578 zeigte im Dünndarm und Colon eine stärkere Färbung der Epithelien als LS-A6599. Mit LS-A6599 kam es hingegen zu einer stärkeren Färbung von Stromazellen und Immunzellen der Lamina propria. Diese Unterschiede sind am ehesten auf den molekularen Aufbau der beiden Antikörper zurückzuführen. Während LS-A1578 sich gegen ein Epitop der zytoplasmatischen Domäne richtet, bindet LS-A6599 an ein Epitop der extrazellulären Domäne des GPR43 Rezeptors. Je nach exprimierender Zelle variiert möglicherweise die Zugänglichkeit der Antikörper Bindungsstelle am GPR43 Rezeptor. Um die Proteinexpression sowohl im Epithel als auch im Stroma optimal darzustellen, wurden in dieser Arbeit alle Gewebeproben jeweils mit beiden Antikörpern gefärbt.

Für optimale Färbeergebnisse wurden vorab verschiedene Puffer, Antikörperverdünnungen, Inkubationszeiten und -temperaturen verglichen. Die Beurteilung erfolgte im Vergleich mit Kontrollen aus gesundem Darmgewebe und einem aus 25 verschiedenen Geweben bestehenden Tissue-Microarray durch Dr. med. Katrin Hippe am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg. Das Ergebnis diente als Grundlage für die Erstellung der Färbeprotokolle.

2.4.3 Vorbereiten der Proben für die immunhistochemische Färbung

Zuerst wurden die in Paraffinblöcke eingebetteten Biopsien mit einer Kühlplatte auf -20 °C gekühlt, um eine glatte und präzise Schnittführung zu ermöglichen. Nach dem Einspannen in das Rotationsmikrotom wurden 2 µm dicke Schnitte angefertigt, die in ein Wasserbad mit 38 °C gegeben wurden, wodurch sie sich optimal streckten. Danach wurden sie auf beschichtete Objektträger (OT) aufgezogen und für 30 min bei 70 °C auf den Probentrockner verbracht. Dadurch trockneten die Schnitte und es wurde eine bessere Haftung auf dem OT gewährleistet.

2.4.4 Färbeprotokoll für LS-A6599

Zur Entfernung des Paraffins wurden die OT für jeweils zehn Minuten in drei Küvetten mit Xylol eingetaucht und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe mit Isopropanol rehydriert. Nach dieser Behandlung wurden die OT in vollentsalztes (VE) Wasser getaucht und dann in einer Küvette mit Citratpuffer bei pH 7,2 für 35 min bei 320 W in der Mikrowelle erwärmt. Für die Herstellung dieses Puffers wurden zwei Lösungen benötigt. Lösung A enthielt 2,1 g Citronensäure-Monohydrat auf 10 ml destilliertem Wasser und Lösung B 29,41 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat auf 1 l destilliertem Wasser. Für den Puffer wurden 1 ml aus Lösung A und 49 ml aus Lösung B zusammengegeben und 450 ml Millipore Wasser (Reinstwasser Typ 1) zugegeben.

Nachdem die OT im Puffer auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt waren, wurden sie mit VE Wasser gespült. Um eine optimale Färbung der Schnitte zu erhalten und ein gleichzeitiges Austrocknen derselben zu verhindern, wurden die OT anschließend in Cover Plates eingespannt. Durch die darin wirkenden Kapillarkräfte wurden die einzelnen OT mit einer definierten Menge an pipettierter Flüssigkeit gleichmäßig benetzt. Der Vorteil gegenüber einer Färbung in der feuchten Kammer ist, dass alle Spülvorgänge hier durchgeführt werden können, ohne dass die OT dafür ausgespannt werden müssen.

Mit dem 1:10 verdünnten Waschpuffer wurden die einzelnen OT in den Reaktionskammern gespült. Für die Blockierung der endogenen Peroxidase wurde jeder OT mit 100 µl der Peroxidase-Blocking Solution für fünf Minuten bei RT inkubiert und im Anschluss mit Waschpuffer gespült. Danach erfolgte das Auftragen von 100 µl Primärantikörper in einer 1:100 Verdünnung. Als Negativkontrolle dienten OT mit Gewebeschnitten, auf die nur der

Verdünnungspuffer ohne Antikörper aufgetragen wurde. Dadurch wurde überprüft, ob der Antikörper spezifisch an das Zielantigen bindet. Bei dem Primärantikörper handelte es sich um einen polyklonalen Kaninchenantikörper, der sich gegen ein aus 17 Aminosäuren bestehendes Peptid in der dritten extrazellulären Domäne des humanen GPR43 Rezeptors richtet.

Nach 50 min wurden alle OT erneut mit Waschpuffer gespült, um überschüssige, nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Von dem gebrauchsfertigen Sekundärantikörper, einem Universal Immuno-peroxidase Polymer, wurden auf jeden OT 100 µl aufgetragen und erneut bei RT für 50 min inkubiert. Anschließend erfolgte zweimaliges Spülen mit Waschpuffer und die Zugabe von 100 µl Liquid DAB + Substrate Chromogen System in einer 1:50 Verdünnung. Nach zehn Minuten wurden die OT mit VE Wasser gespült. Anschließend erfolgte das Ausspannen der OT und die Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun. Zur Differenzierung wurden die OT für wenige Sekunden in eine 1%ige Salzsäure-Alkohol-Lösung getaucht. Um das Hämatoxylin zum farbigen Hämatein zu oxidieren und einen stabilen blauen Farbkomplex zu erhalten, benötigte es einen pH Umschlag. Dazu wurden die OT in eine Küvette mit Leitungswasser überführt.

Vor dem Eindecken mit hydrophoben Entellan wurden die OT in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Xylol getaucht. Das anschließend aufgebrachte Deckglas sorgte für einen luftdichten Verschluss des gefärbten Schnittes.

2.4.5 Färbeprotokoll für LS-A1578

Färbesystem

Die Färbung mit diesem Antikörper erfolgte mit Hilfe eines vollautomatisierten VENTANA BenchMark Färbesystems. Das Gerät erlaubte die gleichzeitige Färbung von 30 OT in unabhängigen Reaktionskammern. Über eine Barcode-Steuerung wurden die zuvor festgelegten Färbeprotokolle erkannt und das Reagenzienkarussell wurde computergesteuert zu den einzelnen OT geführt.

Färbeprotokoll

Zunächst wurden die Proben bei einer Temperatur von 72 °C durch Zugabe von EZPrep entparaffiniert und rehydriert. Durch die Inkubation mit Trishydroxymethylaminomethan-Ethylen-diamintetraessigsäure (Tris-EDTA) Puffer für 16 min bei 100 °C erfolgte die

Antigendemaskierung. Danach wurde die endogene Peroxidase bei 36 °C mittels Primärperoxidase-Hemmer blockiert. Anschließend wurde der Primärantikörper in einer 1:150 Verdünnung aufgetragen und für 32 min inkubiert. Dieser polyklonale Kaninchenantikörper richtet sich gegen ein aus 19 Aminosäuren bestehendes Peptid in der zweiten zytoplasmatischen Domäne des humanen GPR43 Rezeptors.

Danach wurde der Sekundärantikörper für 8 min zugegeben und im Anschluss mit dem DAB IHC Detection Kit detektiert. Zuletzt erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin, welches vom Institut für Pathologie in Regensburg hergestellt wurde. Zur Optimierung der blauen Färbung der basophilen Zellkerne diente ein lithiumionenhaltiges Reagenz, das zusätzlich den pH-Wert des Puffers anhebt. Zwischen den Reaktionsschritten wurden die OT mit einer Pufferlösung gespült und von einer Eindecklösung bedeckt. Diese besteht aus Ölmolekülen und verhindert die Evaporation der wasserhaltigen Reagenzien. Das Eindecken wurde analog zum anderen Antikörper vorgenommen.

Abb. 5 stellt die Färbeergebnisse von LS-A1578 und LS-A6599 im Colon dar.

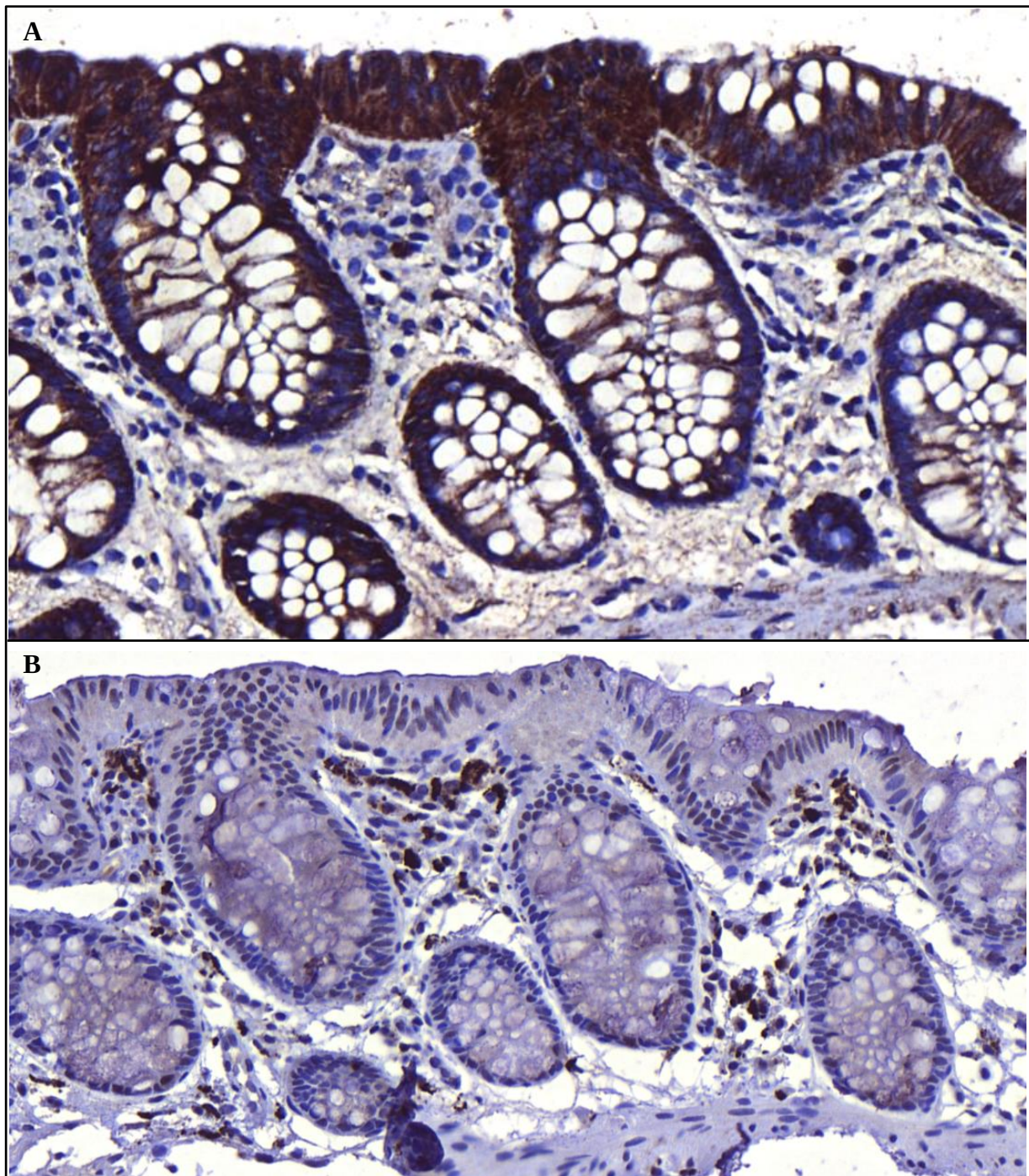


Abb. 5: Immunhistochemischer Nachweis GPR43 positiver Zellen im Stroma und Epithel des Colons

A: Färbung mit LS-A1578; vereinzelt braune Stromazellen, nahezu jede Epithelzelle weist eine chromogene, braune Färbung auf; **B:** Färbung mit LS-A6599; chromogene, braune Färbung der Stromazellen, Epithelzellen nicht angefärbt; jeweils 400-fache Vergrößerung

2.5 Auswertungskriterien GPR43

Die gefärbten Schnitte wurden mit dem Pannoramic 250 FLASH III Scanner digitalisiert und in der Datenbank der Software CaseCenter gespeichert. Mithilfe des CaseViewers wurden die Proben ohne Kenntnis der klinischen Daten ausgewertet. Um für alle Schnitte gleiche Bedingungen zu schaffen, erfolgte die Auswertung uneingeschränkt an einem Bildschirm von LG, welcher mit einem Notebook von Acer verbunden wurde.

Dabei wurde eine Fläche von mindestens drei hochauflösenden Gesichtsfeldern (high-power fields, HPF) betrachtet. Ein HPF hat eine definierte Fläche von $0,31 \text{ mm}^2$ und kann mithilfe des CaseViewers im Präparat digital markiert werden. Die Auswertung erfolgte mit Fokus auf die Tunica mucosa unter Ausschluss der Lamina muscularis mucosae. Stromazellen und Enterozyten im Epithel der Zotten und Krypten wurden getrennt voneinander betrachtet. Kriterien für die Auswertung der Stromazellen waren ein sichtbarer Zellkern und eine mindestens mittelstarke Färbung. Ausgeschlossen wurden intravaskuläre Zellen, Endothelzellen und Paneth-Körnerzellen. Die Auswertung des Epithels erfolgte semiquantitativ (0 %, 1 - 10 %, 11 - 25 %, 26 - 50 %, 51 - 75 %, 76 - 90 %, 91 - 100 %). Dabei wurden tiefliegende Krypten (anatomische Nähe zur Lamina muscularis mucosae), oberflächliche Krypten (lumennahe Kryptenanteile) und im Ileum und Duodenum das Epithel der Zotten getrennt voneinander ausgewertet, um mögliche Unterschiede in der Verteilung herauszuarbeiten. Die tiefliegenden Krypten werden im Folgenden als basale Krypten bezeichnet. Als Mindestkriterium für die Auswertbarkeit wurde die Anzahl von mindestens drei Lumen führenden Krypten bzw. eine Größe der verbliebenen Krypten von mindestens 200 Epithelzellen festgelegt. Vorab wurde die Intraobserver-Variabilität getestet.

Abb. 6 zeigt beispielhaft die Unterteilung des Kryptenepithels in die genannten Abschnitte.

Die Ergebnisse wurden in einer SPSS Datei dokumentiert. Dabei wurden Auffälligkeiten bezüglich Färbung und Verteilung der positiven Zellen, die Anzahl ausgewerteter HPF, die Anzahl GPR43-positiver Stromazellen in den einzelnen HPF und die semiquantitative Auswertung des Epithels festgehalten. Daraus wurde dann die mittlere Anzahl positiver Stromazellen pro HPF ermittelt.

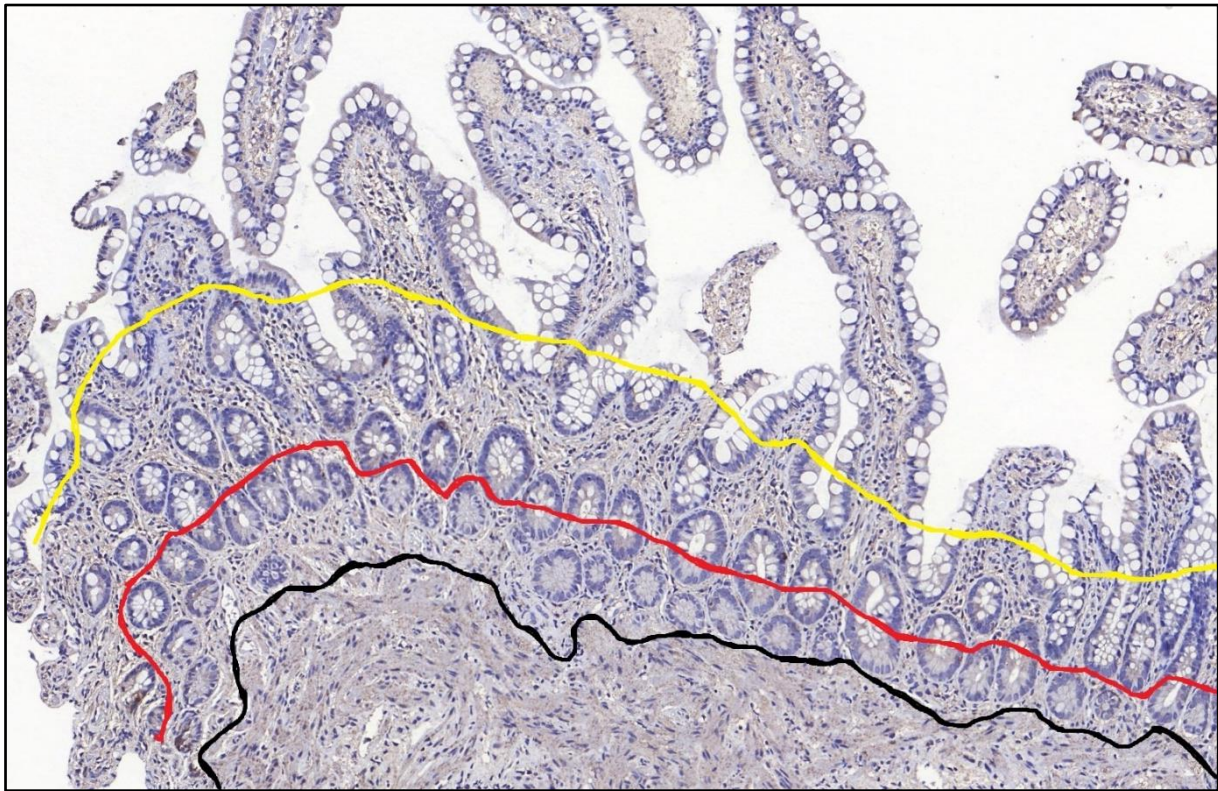


Abb. 6: Unterteilung des Epithels in tiefliegende, oberflächliche Kryptenabschnitte und Zottenepithel

Die schwarze Linie markiert in etwa die Lamina muscularis mucosae, zwischen der schwarzen und roten Linie befinden sich die basalen Krypten, zwischen der roten und gelben Linie liegen die oberflächlichen Krypten und oberhalb der gelben Linie beginnt das Zottenepithel; 100-fache Vergrößerung

2.6 Färbeprotokoll und Auswertungskriterien FoxP3

Von den gleichen Patientenproben erfolgte zusätzlich eine Anfärbung von FoxP3, einem Marker für Treg (siehe 1.2.1). Die Anfertigung der Schnitte erfolgte analog zum Vorgehen bei GPR43. Die Färbung wurde auch hier mit Hilfe des vollautomatisierten VENTANA Benchmark Färbesystems durchgeführt. Im ersten Schritt wurden die Proben bei einer Temperatur von 72 °C durch Zugabe von EZPrep entparaffiniert und rehydriert. Die Antigendemaskierung erfolgte durch Inkubation mit Ultra CC1 für 48 min bei 95 °C. Anschließend wurde die endogene Peroxidase bei 36 °C mittels Primärperoxidase-Hemmer blockiert. Danach wurde der Primärantikörper in einer 1:100 Verdünnung aufgetragen und für 32 min bei ebenfalls 36 °C inkubiert. Dieser monoklonale Mausantikörper richtet sich gegen das menschliche FoxP3.

Die Detektion des Primärantikörpers, die Gegenfärbung mit Hämatoxylin und das Eindecken der fertigen Schnitte erfolgten analog zum Färbeprotokoll von LS-A1578. Auch hier wurden die OT zwischen den Reaktionsschritten mit einer Pufferlösung gespült und von einer Eindecklösung bedeckt.

Die Auswertung erfolgte auch hier ohne Kenntnis der klinischen Daten. Die Schnitte für FoxP3 wurden am Zeiss Axioskop 40 Mikroskop ausgewertet. In einer Fläche von drei bis zwölf HPF wurde die Anzahl der FoxP3 positiven Stromazellen bestimmt und dann die mittlere Anzahl pro HPF berechnet. Diese wurde dann ebenfalls in die SPSS Datei übertragen. Die Auswertung der positiven Immunzellen erfolgte mit Focus auf die Tunica mucosa und die Färbung musste mindestens mittelstark bis stark sein. Da ein Schnitt aufgrund von zu wenig Material nicht auswertbar war, erfolgte die Auswertung von 99 Proben.

Abb. 7 zeigt FoxP3 positive Immunzellen im Ileum.

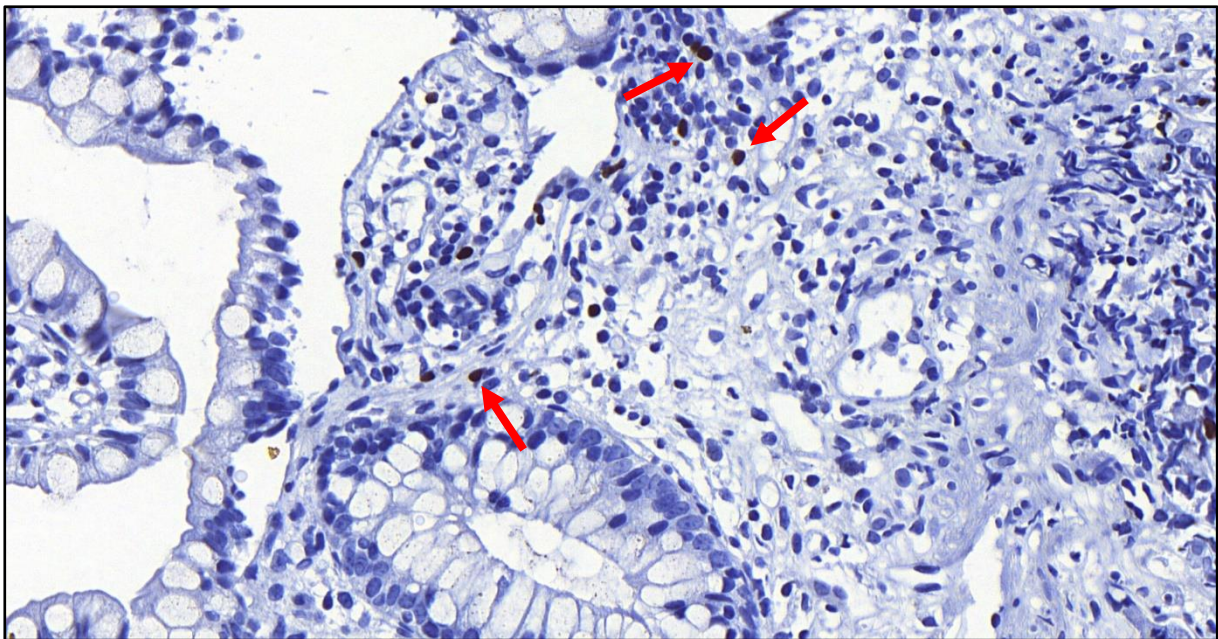


Abb. 7: Immunhistochemischer Nachweis von FoxP3 positiven Zellen im Ileum

beispielhaft sind einige Zellen mit Pfeilen markiert; 400-fache Vergrößerung

2.7 Statistische Methoden

Die statistische Analyse erfolgte mit der Statistiksoftware IBM SPSS Statistics, Version 25. Um die Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung der Epithelzellen statistisch auswerten zu können, wurden für die prozentualen Angaben Ziffern vergeben. Die detaillierte Zuteilung ist Tab. 7 zu entnehmen.

Tab. 7: Zuordnung von Ziffern zur semiquantitativen Auswertung des Epithels

Semiquantitative Auswertung	Ziffer
0 %, keine positiven Zellen	0
1 - 10 % positive Zellen	1
11 - 25 % positive Zellen	2
26 - 50 % positive Zellen	3
51 - 75 % positive Zellen	4
76 - 90 % positive Zellen	5
91 - 100 % positive Zellen	6

Die Untersuchung der Daten auf Normalverteilung erfolgte mithilfe des Shapiro-Wilk Tests. Angepasst an die Verteilung der Daten wurde für Korrelationsanalysen der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman verwendet. Für die Darstellung der unterschiedlichen Färbeverhalten der beiden verwendeten Antikörper wurde der nicht parametrischer Wilcoxon Test bei abhängigen Stichproben gewählt.

Weiterhin erfolgte die Beurteilung von Unterschieden in der GPR43 Expression zwischen und innerhalb verschiedener Darmabschnitte mithilfe des nicht parametrischen Wilcoxon Test (abhängige Stichproben), Mann-Whitney-U-Test (unabhängige Stichproben zweier Gruppen) oder dem Kruskal-Wallis Test bei mehr als zwei Gruppen. Zeigte der Kruskal-Wallis Test signifikante Unterschiede, wurden die Gruppen paarweise verglichen und nach Dunn-Bonferroni korrigierte p-Werte angegeben. Auf gleiche Weise wurden die Daten auf Unterschiede hinsichtlich des Ausprägungsgrades der GvHD untersucht. Die Einteilung erfolgte hierfür nach den histologischen Lerner Graden 1 bis 4. Zuerst wurden die Biopsien der Kontrollgruppe (vor der ASCT (präTx) entnommen) mit den Biopsien von Patienten nach ASCT (postTx: keine GvHD und Lerner 1 bis 4) verglichen. Nach genauer Analyse der einzelnen Schweregrade erfolgte die

Bildung von Subgruppen. Dabei wurden Lerner 1 und 2 sowie Lerner 3 und 4 zu je einer Kategorie zusammengefasst und die Gruppen auf Unterschiede geprüft. Außerdem wurde untersucht, ob sich die GPR43 Expression in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Biopsieentnahme nach ASCT verändert. Dafür wurden die Biopsien abhängig vom Entnahmezeitpunkt zu drei Gruppen zusammengefasst (0 bis 30 Tage nach ASCT, 31 bis 180 Tage nach ASCT und über 180 Tage nach ASCT) und anschließend wieder verglichen. Die Einteilung orientierte sich dabei an den Phasen der Immunrekonstitution nach ASCT.

Der Mann-Whitney-U-Test wurde zudem eingesetzt, um den Einfluss von Steroiden und Breitbandantibiotika auf die GPR43 Expression zu überprüfen.

Für die einzelnen Gruppen wurden jeweils die Fallzahl, der Median, kleinster und größter Wert und der Interquartilsbereich ermittelt. Dabei wurde jeweils auf eine Nachkommastelle gerundet.

Bei der Korrelationsanalyse der Expression von FoxP3 und GPR43 wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman verwendet. Ebendieser kam bei dem Vergleich der immunhistochemisch ermittelten Daten mit denen aus der GPR43 PCR-Analyse zum Einsatz. Und auch die Korrelationsanalyse der 3-IS Werte mit den GPR43 positiven Zellen erfolgte mithilfe dieses Koeffizienten. Die Methodik zur Durchführung der PCR ist dem Forschungsbericht von Ghimire et al. zu entnehmen (64). Das Vorgehen zur Analyse der 3-IS Werte wird von Weber et al. beschrieben (48).

Die Überlebenszeitanalyse erfolgte mithilfe der Kaplan-Meier Methode und mithilfe des Logrank-Tests wurden die Gruppen auf signifikante Unterschiede geprüft.

Alle Tests wurden zweiseitig zu einem Signifikanzniveau mit $\alpha = 0,05$ durchgeführt. P-Werte kleiner als 0,05 gelten demnach als statistisch signifikant.

Zur grafischen Darstellung der unterschiedlichen GPR43 Expression bezüglich Lokalisation, Lerner Grad, Zeitpunkte der Biopsieentnahme nach ASCT und Steroiddosis, wurde der Box-Plot verwendet. Zur Darstellung von Korrelationen wurde ein Streudiagramm verwendet und die Überlebenszeitanalyse wurde mithilfe von Kaplan-Meier-Kurven dargestellt.

2.8 Vorbereitende Methodik

Von den insgesamt 200 Proben (je Antikörper 100 Biopsien) wurden jeweils die Stromazellen und die verschiedenen Anteile des Epithels ausgewertet. Aufgrund des Schweregrades der GvHD war das Epithel der Krypten in zwölf Proben nicht ausreichend vorhanden und damit nicht auswertbar. Gleiches galt für das Zottenepithel der insgesamt 60 Dünndarmbiopsien. Hier waren 11 Proben nicht auswertbar. In die statistische Analyse gingen nur die auswertbaren Fälle ein. Die genauen Daten sind in Tab. 8 dargestellt.

Tab. 8: Daten zur Auswertbarkeit der Biopsien

Fallzahl gesamt N = 100		
	Auswertung möglich	Auswertung nicht möglich
Stromazellen	100	0
Epithel der Krypten	88	12
Epithel der Zotten	49	11

2.8.1 Verteilung der Daten zur Expression von GPR43

Zu Beginn wurden die gesammelten Daten mithilfe des Shapiro-Wilk Tests auf Normalverteilung untersucht. Für beide Antikörper war der p-Wert sowohl für die verschiedenen Anteile des Epithels als auch für die Stromazellen kleiner als 0,05 (Epithelzellen bei LS-A6599 jeweils $p < 0,001$; Stromazellen bei LS-A6599: $p = 0,001$; Epithel der basalen und oberflächlichen Krypten bei A1578 jeweils $p = 0,001$; Epithel der Zotten und Stromazellen bei A1578: $p < 0,001$). Damit kann die Nullhypothese des Shapiro-Wilk Tests, nachdem die Daten normalverteilt wären, abgelehnt werden. Folglich wurden für die weitere statistische Analyse nicht parametrische Tests gewählt.

2.8.2 Darstellung GPR43 positiver Stromazellen

Als Flächenmaß für die positiven Stromazellen wurde das HPF gewählt. Dies dient der besseren Vergleichbarkeit mit anderen Arbeiten, die das HPF üblicherweise für ihre Angaben nutzen.

2.8.3 Färbeverhalten der beiden Antikörper

Bei der Auswertung der beiden Antikörper fiel auf, dass sie ein sehr unterschiedliches Färbemuster aufwiesen. Abb. 8 verdeutlicht die Unterschiede zwischen den Antikörpern.

Der Antikörper LS-A1578 ließ deutliche Unterschiede bei der Anfärbung des Epithels zwischen den Biopsien erkennen (Abb. 8A und C), wohingegen die Epithelien bei der Färbung mit LS-A6599 kaum oder gar nicht angefärbt wurden (Abb. 8B und D).

Im Vergleich zur Färbung mit LS-A1578 vermochte der Antikörper LS-A6599 die Verteilung der GPR43-positiven Zellen innerhalb des Stromas deutlicher hervorzuheben und zeigte generell mehr positive Stromazellen (Abb. 8B und C).

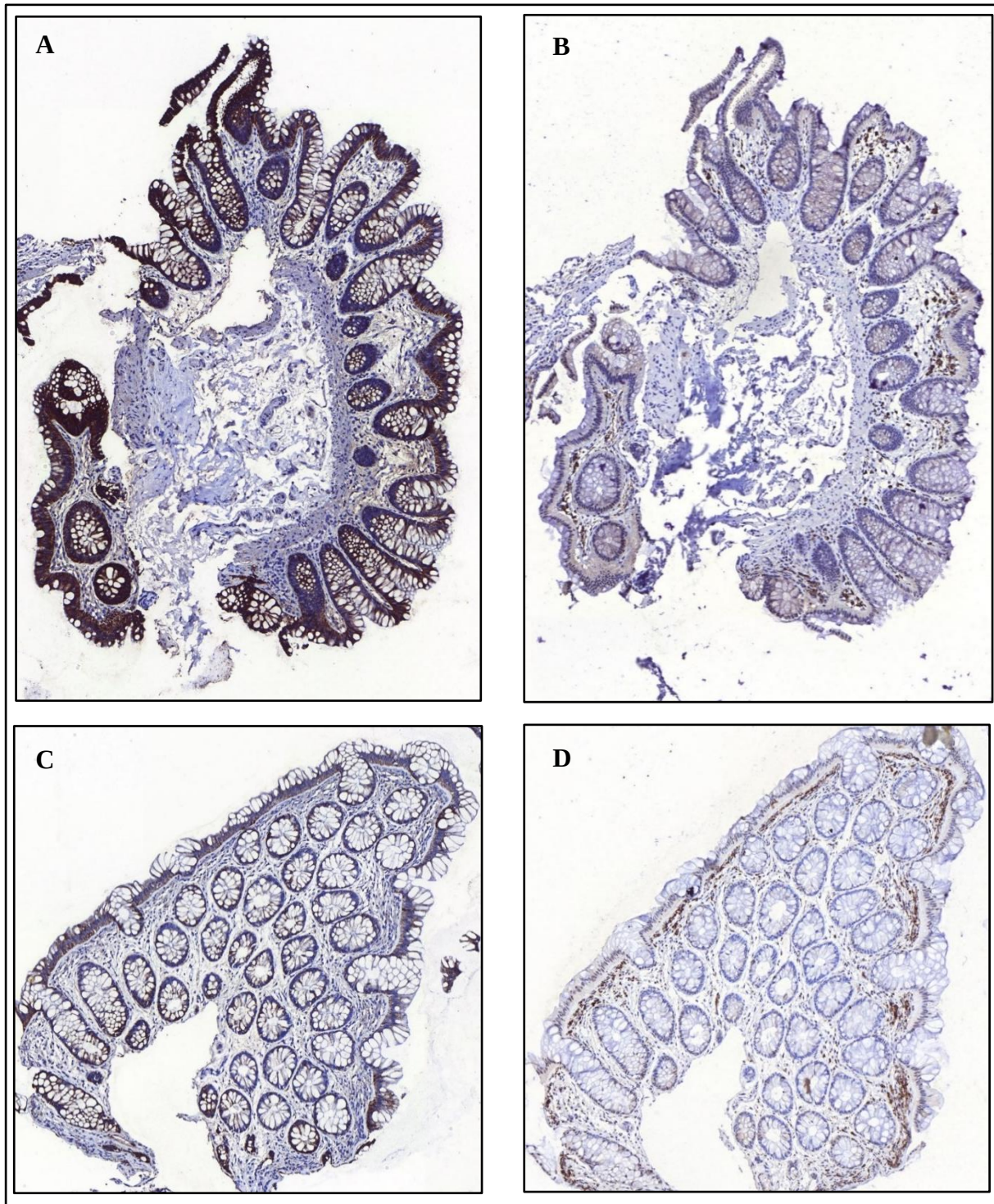


Abb. 8: Gegenüberstellung des immunhistochemischen Nachweises von GPR43 mit LS-A1578 und LS-A6599 im Colon

A: LS-A1578, stark positive Epithelzellen (76 – 90 % aller Epithelzellen sind positiv); kaum positive Stromazellen; **B:** LS-A6599, im Epithel finden sich nur wenig positive Epithelzellen (in den basalen Krypten finden sich 1 – 10 % positive Zellen, in den oberflächlichen Krypten keine positiven Epithelzellen); viele positive Stromazellen mit subepithelialer Ansammlung;

C: LS-A1578, Epithelzellen exprimieren hier weniger GPR43 (26 - 50 % aller Epithelzellen sind positiv); auch hier kaum positive Stromazellen; **D:** LS-A6599, auch hier nur wenig positive Epithelzellen (basale Krypten: 1 - 10 % positive Zellen; oberflächliche Krypten: keine positiven Zellen) und subepitheliale Ansammlung positiver Stromazellen; jeweils 100-fache Vergrößerung

Dies legte die Vermutung nahe, dass die Antikörper spezifischer Epithel- oder Stromazellen färben. Um dies zu überprüfen, wurden die beiden Antikörper mit dem Wilcoxon-Test bei verbundenen Stichproben verglichen. In der Färbung der Stromazellen konnten mit LS-A5699 (Median: 16,6) signifikant mehr Zellen detektiert werden als mit LS-A1578 (Median: 2,0; $p < 0,001$; $Z = -8,672$; $N = 100$).

Die Effektstärke lag bei $r = 0,61$ und entsprach nach Cohen (70) einem starken Effekt:

$$r = \left| \frac{Z}{\sqrt{N}} \right|$$

Abb. 9 zeigt das unterschiedliche Färbeverhalten der beiden Antikörper für die Stromazellen.

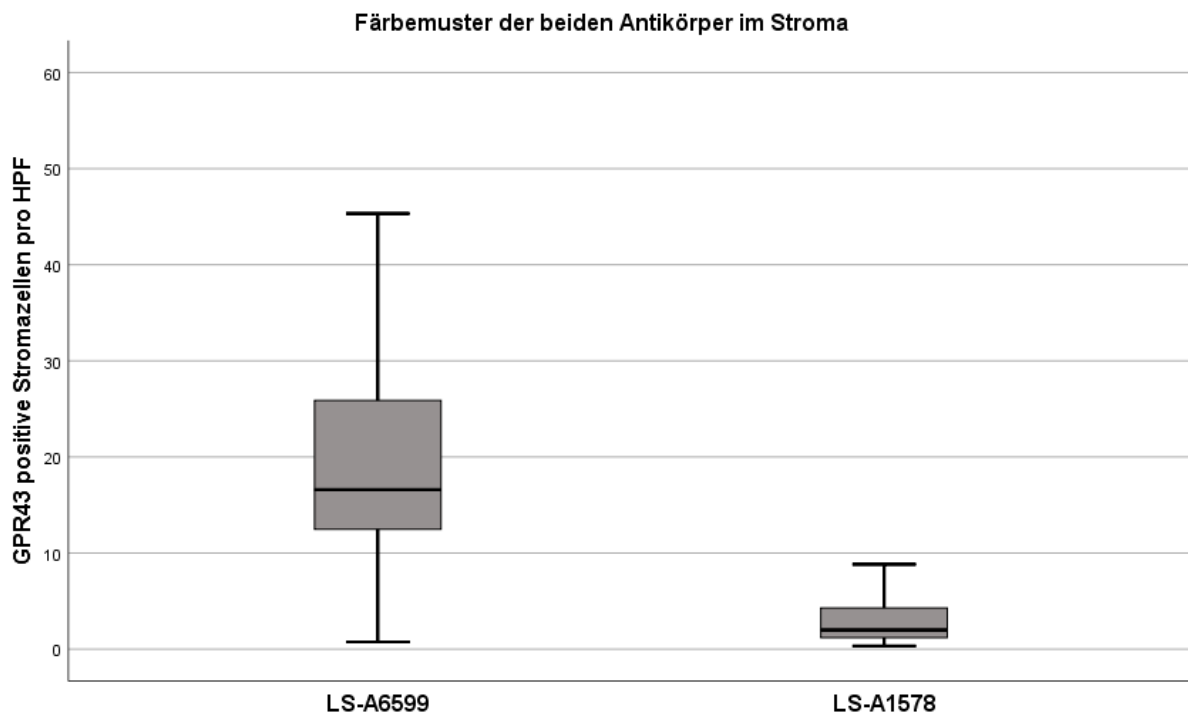


Abb. 9: Boxplot zur deskriptiven Statistik zum Färbeverhalten der beiden Antikörper im Stroma

Auch bei der Färbung der Epithelzellen kristallisierte sich ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Antikörpern heraus.

Die basalen Epithelanteile wurden durch LS-A1578 mit einem Median von 3,0 stärker gefärbt als durch LS-A6599 mit einem Median von 1,0 ($p < 0,001$; $Z = -7,806$; $N = 88$; $r = 0,59$).

Auch im oberflächlichen Epithel konnten GPR43 positive Zellen mittels LS-A1578 (Median: 3,0) kräftiger angefärbt werden als mit LS-A6599 (Median: 1,0; $p < 0,001$, $Z = -7,949$, $N = 88$, $r = 0,60$).

Ein dazu passendes Färbeverhalten zeigten die beiden Antikörper im Epithel der Zotten. Auch hier vermochte LS-A1578 (Median: 2,0) die positiven Zellen stärker zu färben als LS-A5699 (Median: 0,0; $p < 0,001$; $Z = -5,613$; $N = 49$; $r = 0,57$). Alle genannten Effektstärken entsprachen nach Cohen einem starken Effekt.

Abb. 10 zeigt exemplarisch das Färbemuster der beiden Antikörper für das Epithel der basalen Krypten.

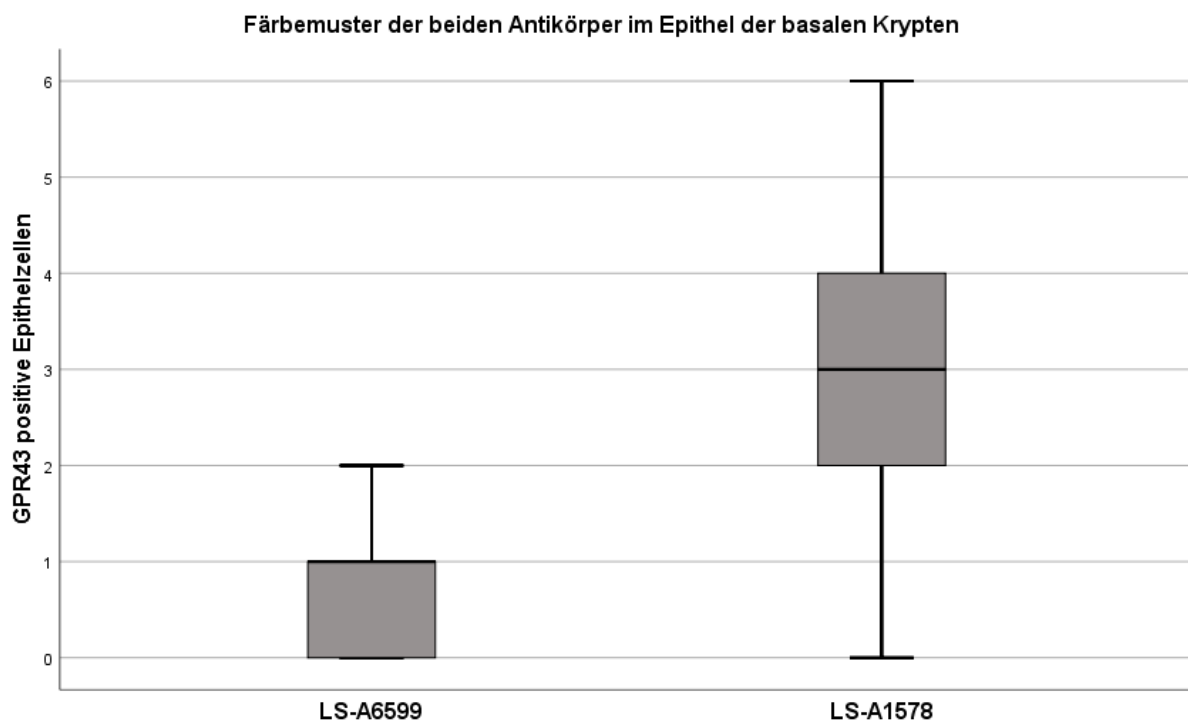


Abb. 10: Boxplot zur deskriptiven Statistik zum Färbeverhalten der beiden Antikörper im Epithel der basalen Krypten

Aufgrund dieser Beobachtungen werden im Folgenden die Ergebnisse für die Färbung der Stromazellen nur mit dem Antikörper LS-A6599 dargestellt und die Beurteilung des Epithels erfolgte mithilfe der Daten aus der Färbung mit LS-A1578.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von GPR43 in den verschiedenen Darmabschnitten

Da sich die Zusammensetzung des Mikrobioms in Dünn- und Dickdarm unterscheidet und die bakterielle Produktion von SCFA die Expression von GPR43 beeinflusst, wurde die Expression von GPR43 in den Abschnitten Duodenum, Ileum und Colon getrennt betrachtet und auf signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Lokalisationen geprüft. Die Ermittlung der p-Werte erfolgte dabei mithilfe des Kruskal-Wallis Test, Wilcoxon oder Mann-Whitney-U-Test und im paarweisen Vergleich der Lokalisationen mittels Dunn-Bonferroni-Test.

3.1.1 Expression der GPR positiven Stromazellen in den verschiedenen Darmabschnitten

Die größte Anzahl positiver Stromazellen fand sich im Colon. Hier betrug der Median 18,3 Zellen pro HPF (N = 40). Im Duodenum fanden sich im Schnitt 17,6 Zellen (N = 30) und somit eine geringfügig niedrigere Proteinexpression als im Colon. Im Ileum hingegen wurde mit einem Median von 13,1 die geringste GPR43 Expression detektiert (N = 30).

In der statistischen Analyse zeigten die genannten Darmabschnitte eine signifikant unterschiedliche Expression GPR43 positiver Stromazellen ($H = 8,971$; $p = 0,011$).

Im paarweisen Vergleich wies das Ileum eine signifikant geringere Zahl positiver Stromazellen als das Colon auf ($p = 0,013$). Im Colon konnten mehr positive Zellen detektiert werden als im Duodenum. Dieser Unterschied war dabei nicht signifikant ($p = 1,000$). Bei Betrachtung von Ileum und Duodenum fanden sich im Duodenum mehr GPR43 exprimierende Stromazellen, wenngleich auch dieser Unterschied nicht signifikant war ($p = 0,069$).

Abb. 9 zeigt die Expression positiver Stromazellen in den jeweiligen Darmabschnitten.

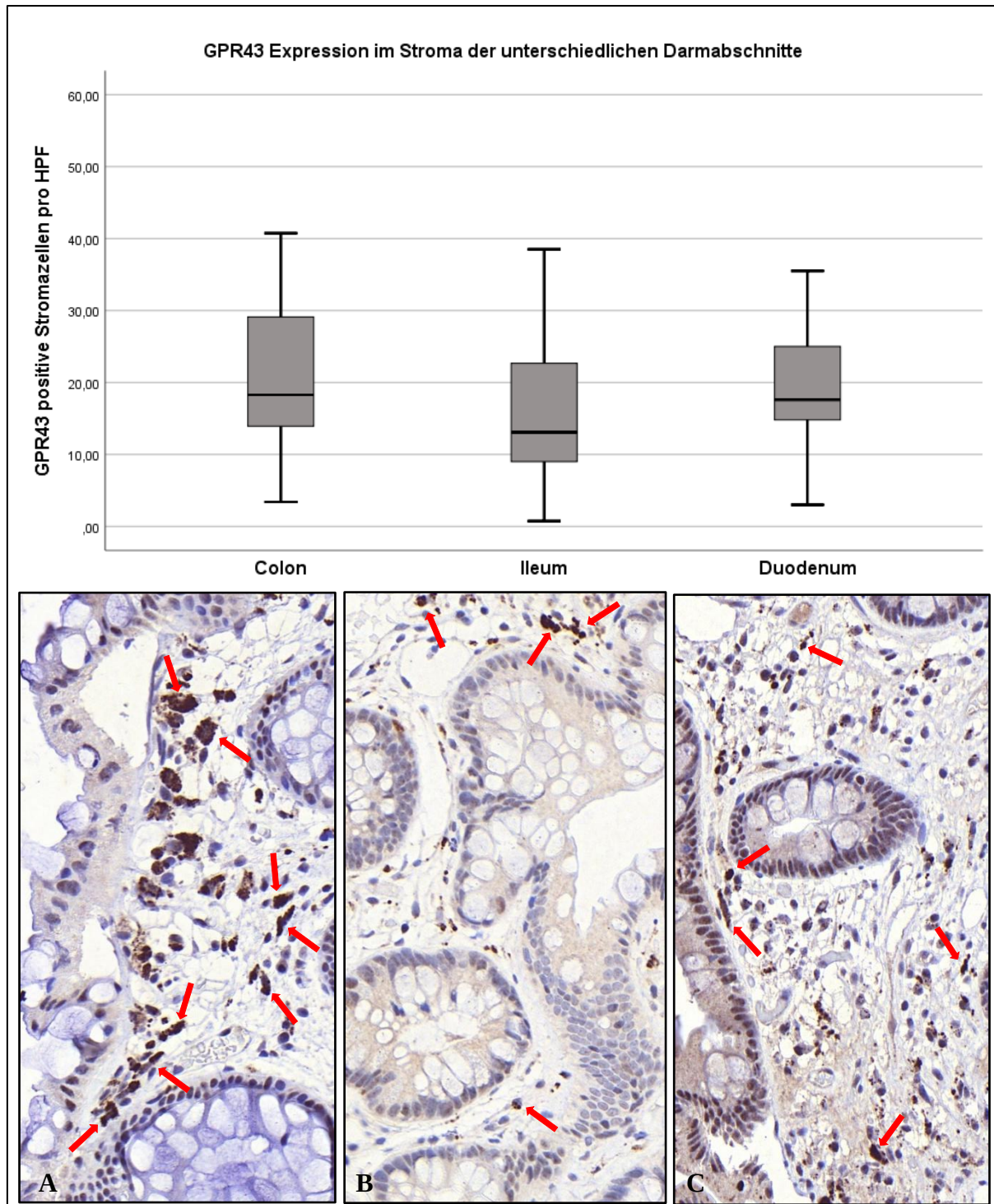


Abb. 11: Boxplot zur Expression von GPR43 im Stroma der verschiedenen Darmabschnitte und beispielhafte Biopsien

A: Ausschnitt aus dem Colon, Median von 18,3 positiven Stromazellen pro HPF; **B:** deutlich weniger positive Stromazellen im Ileum, Median von 13,1 Zellen pro HPF; **C:** Ausschnitt aus dem Duodenum, Median von 17,6 positiven Zellen pro HPF, zur Veranschaulichung sind einzelne Zellen mit Pfeilen markiert; LS-A5699, jeweils 400-fache Vergrößerung

3.1.2 Expression der GPR43 positiven Epithelzellen in Krypten und Zotten der verschiedenen Darmabschnitte

Bei der Analyse des Epithels der Krypten wurde mittels Wilcoxon-Tests zunächst geprüft, ob sich die Expression von GPR43 in basalen Kryptenanteilen von der in oberflächlichen unterscheidet. Dabei ergaben sich unter Berücksichtigung aller auswertbaren Gewebeproben in beiden Abschnitten identische Werte für die Expression von GPR43 (Median: 3,0). Es konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl GPR43 positiver Zellen entlang der Krypten festgestellt werden ($H = -1,387$; $p = 0,166$).

Bei isolierter Betrachtung des Colons fand sich jedoch eine stärkere Expression im oberflächlichen Kriptenepithel verglichen zu basalen Abschnitten. Die statistische Analyse ergab eine signifikant stärkere Expression von GPR43 in oberflächlichen Kryptenanteilen im Colon verglichen zu den basalen Abschnitten ($H = -2,236$; $p = 0,025$).

Im Ileum wich die Auswertung der oberflächlichen und tiefliegenden Krypten nur in zwei der 23 Biopsien voneinander ab und es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($H = -0,577$; $p = 0,564$). Ein Vergleich der Proteinexpression in den Zotten und Krypten des Ileums erbrachte einen signifikanten Unterschied. Sowohl die basalen als auch die oberflächlichen Kryptenanteile exprimierten mehr GPR43 als das Epithel der Zotten (p jeweils 0,001).

Interessanterweise zeigten 15 der 27 ausgewerteten Biopsien aus dem Duodenum eine im Vergleich zu den Krypten signifikant stärkere Expression in den Zotten (basale Krypten: $p < 0,001$; oberflächliche Krypten $p < 0,001$).

Genaue Daten zu der differentiellen Expression in den verschiedenen Epithelabschnitten der einzelnen Lokalisationen sind Tab. 9 zu entnehmen. Abb. 12 veranschaulicht die GPR43 Expression entlang des Epithels im Duodenum.

Tab. 9: Deskriptive Statistik zu der unterschiedlichen Expression von GPR43 in den einzelnen Epithelabschnitten

Unterschiede der GPR43 Expression in den einzelnen Epithelabschnitten in Abhängigkeit von der Lokalisation			
	Colon	Ileum	Duodenum
Gültige Fälle	38	23	27
Kein Unterschied	33	9	7
Basal > oberflächlich	0	1	2 *
Oberflächlich > basal	5	1	3
Zotten > Krypten	-	0	15 *
Zotten < Krypten	-	12	1

* eine Biopsie zeigte in basalen Krypten mehr positive Epithelzellen als in oberflächlichen Krypten und zusätzlich eine stärkere Expression in den Zotten

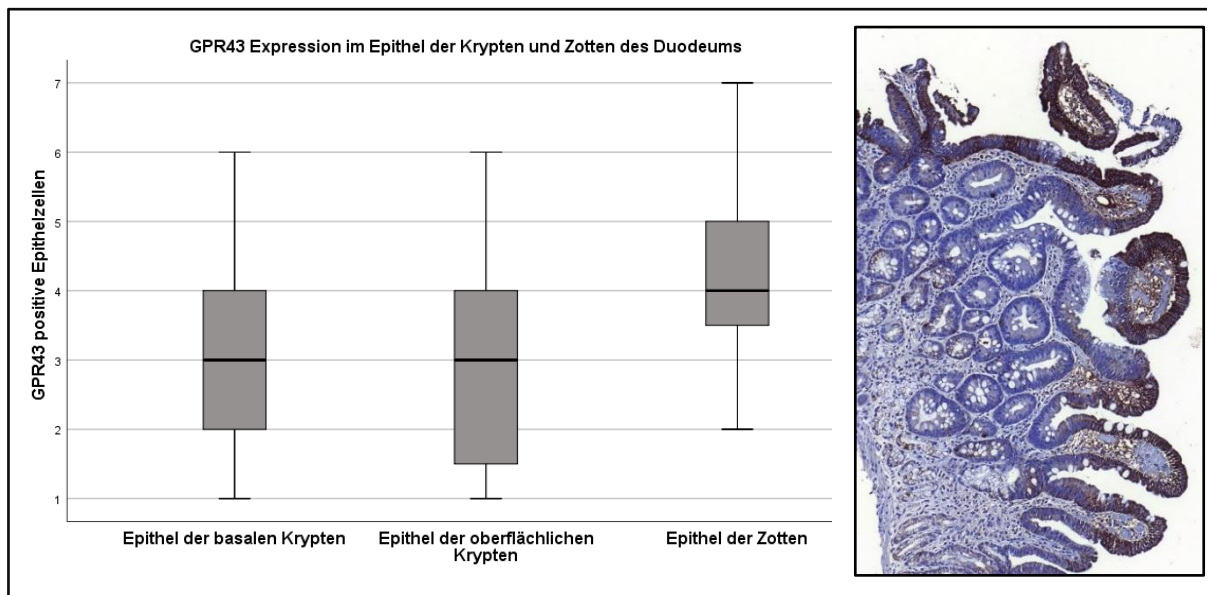


Abb. 12: Boxplot zur Expression von GPR43 im Epithel der Zotten und Krypten des Duodenums und histologischer Ausschnitt aus dem Duodenum; LS-A1578, 100-fache Vergrößerung

Bei der isolierten Betrachtung der basalen Epithelanteile fanden sich die meisten positiven Epithelzellen in Colon und Duodenum (Median jeweils 3,0), wohingegen das Ileum mit einem Median von 2,0 weniger GPR43 in basalen Kryptenanteilen exprimierte ($H = 3,654$; $p = 0,161$).

Dasselbe Ergebnis erbrachte die Analyse der oberflächlichen Epithelanteile. Auch hier wurden in Colon und Duodenum (Median jeweils 3,0) mehr positive Epithelzellen detektiert als im Ileum (Median: 2,0; $H = 5,171$; $p = 0,075$).

Für die vergleichende Analyse der Expression im Zottenepithel zwischen Ileum und Duodenum wurde der Mann-Whitney-U-Test herangezogen. Dieser ergab analog zur Proteinexpression in den Krypten eine signifikant höhere Zahl GPR43 positiver Zellen im Duodenum (Median: 4,0) als im Ileum (Median: 1,0; $H = -4,155$; $p < 0,001$).

Abb. 13 zeigt die Expression positiver Zellen im Epithel der Zotten im Duodenum und Ileum.

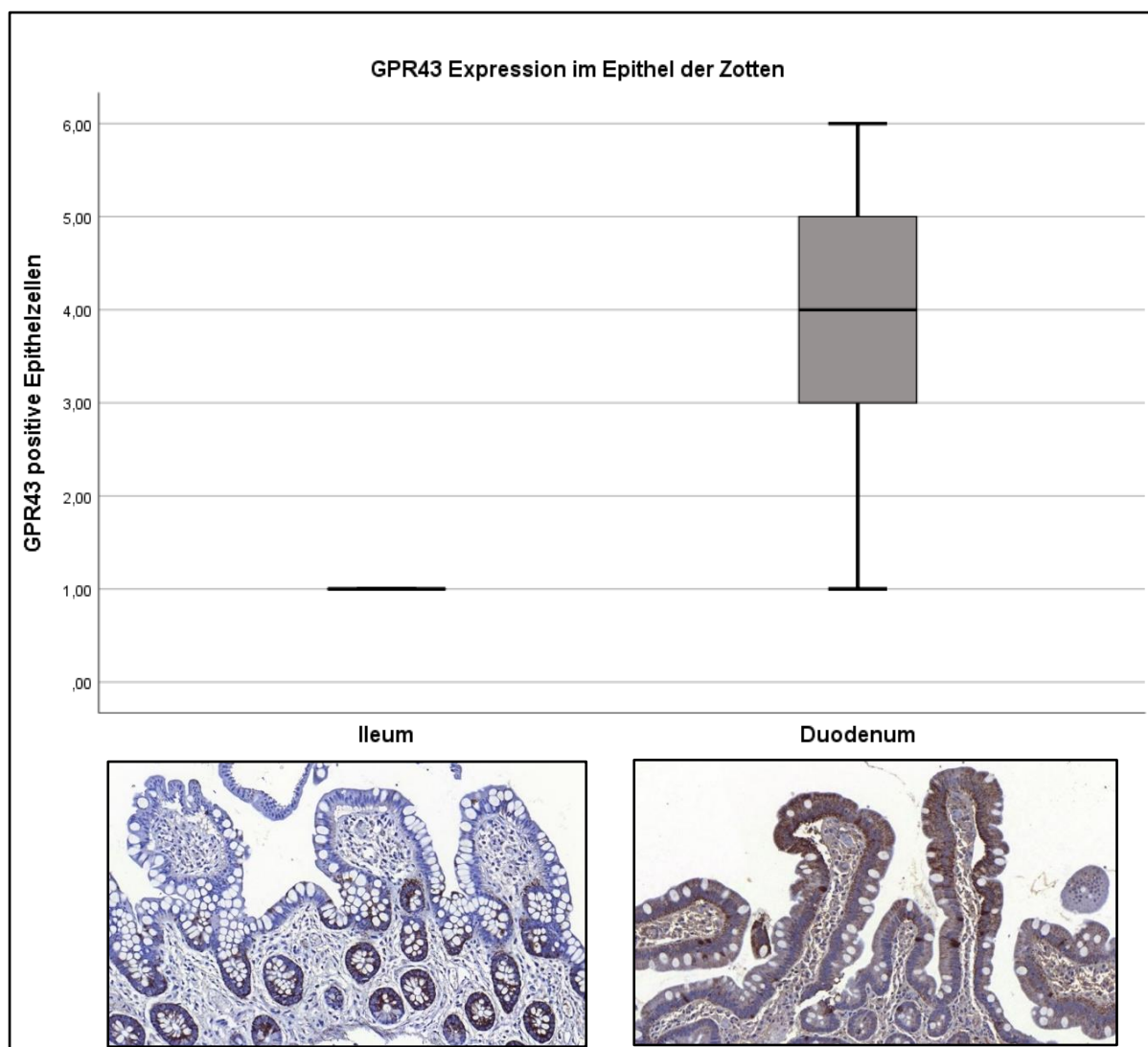


Abb. 13: Boxplot zur Expression von GPR43 im Epithel der Zotten von Ileum und Duodenum; LS-A1578, 100-fache Vergrößerung

3.2 Einfluss des Schweregrades der GvHD auf die GPR43 Expression

Sowohl im Tiermodell als auch im humanen Organismus konnte ein Zusammenhang zwischen der GPR43 Expression und dem Schweregrad der GvHD festgestellt werden. GPR43 Knock-out-Mäuse zeigten demnach eine stärkere Ausprägung der GvHD (65) und in humanen Darmbiopsien stieg die Menge extrahierter GPR43 RNA mit zunehmendem Schweregrad der GvHD (64).

Um herauszufinden, inwiefern die GPR43 Expression in humanen intestinalen Biopsien durch die ASCT beeinflusst wird, wurde zunächst die Expression in Proben präTx mit der in Proben postTx (keine GvHD und Lerner 1 bis 4) mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen. Anschließend wurde die Proteinexpression in Zusammenhang mit dem Lerner Grad betrachtet und die einzelnen Schweregrade wurden zu sinnvollen Gruppen zusammengefasst.

3.2.1 Einfluss des Schweregrades der GvHD auf die GPR43 Expression im Stroma

Um die Veränderung der GPR43 Expression durch die ASCT zu analysieren, wurden die Biopsien in zwei Gruppen eingeteilt. Dabei wurden in Biopsien postTx mit einem Median von 17,7 signifikant mehr GPR43 positive Zellen gezählt als in den Vergleichsbiopsien, die den Patienten präTx entnommen wurden (Median 12,7; $p = 0,004$).

Abb. 14 zeigt die Expression der GPR43 positiven Stromazellen in Biopsien vor und nach ASCT.

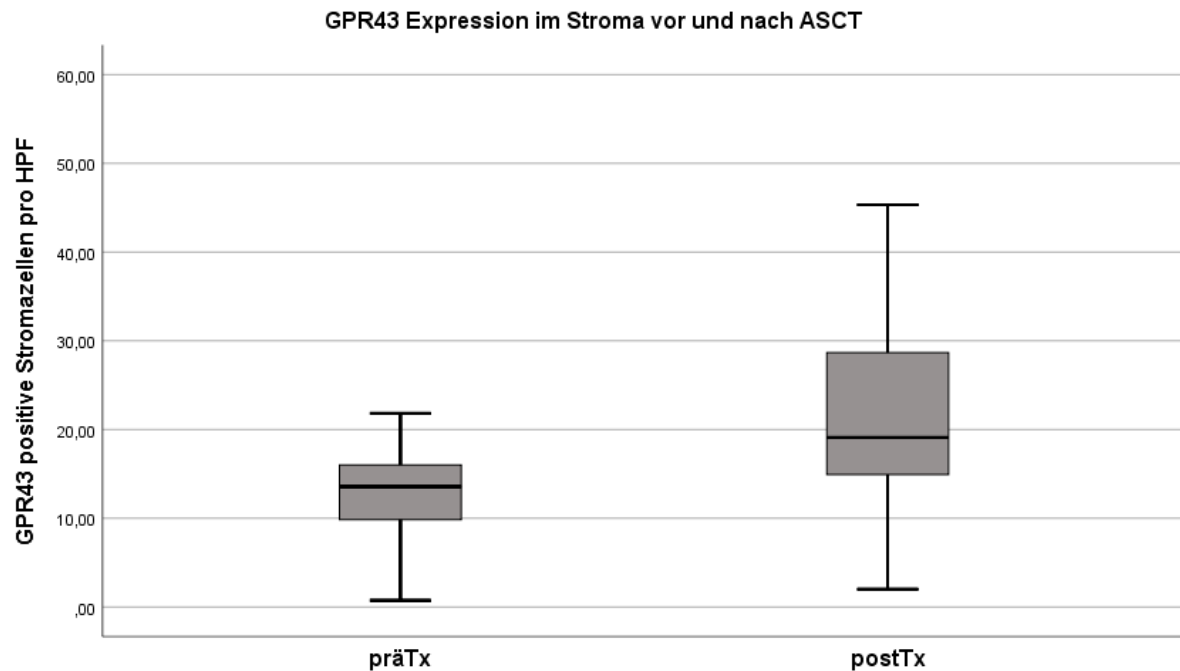


Abb. 14: Boxplot zur Expression von GPR43 im Stroma vor und nach ASCT

Bei detaillierter Betrachtung der postTx Biopsien fiel auf, dass die Zahl positiver Stromazellen mit zunehmendem Schweregrad anstieg ($H = 15,140$; $p = 0,004$). So fanden sich in den Biopsien postTx, bei denen keine GvHD gefunden wurde, im Mittel 13,7 positive Zellen pro HPF. Litt der Patient unter einer GvHD mit Schweregrad Lerner 1 stieg die Expression auf durchschnittlich 19,2 positive Zellen (Lerner 0 vs. Lerner 1: $p = 0,039$). Eine Ausnahme von diesem Trend bildeten die Biopsien mit Lerner 2 (Median 13,8). Hier nahmen die positiven Stromazellen im Vergleich zum vorherigen Schweregrad ab. Dies war mit einem $p = 1,000$ (Lerner 1 vs. Lerner 2) jedoch nicht signifikant. Verglichen dazu stieg die Proteinexpression bei weiterer Zunahme der GvHD danach wieder (Lerner 3: Median 18,0; Lerner 2 vs. Lerner 3: $p = 1,000$). Die höchste Proteinexpression konnte mit einem Median von 32,5 bei Patienten mit Lerner 4 detektiert werden (Lerner 4 vs. Lerner 3: $p = 0,461$).

Abb. 15 zeigt die Verteilung der GPR43 positiven Zellen in Abhängigkeit vom Schweregrad der GvHD.

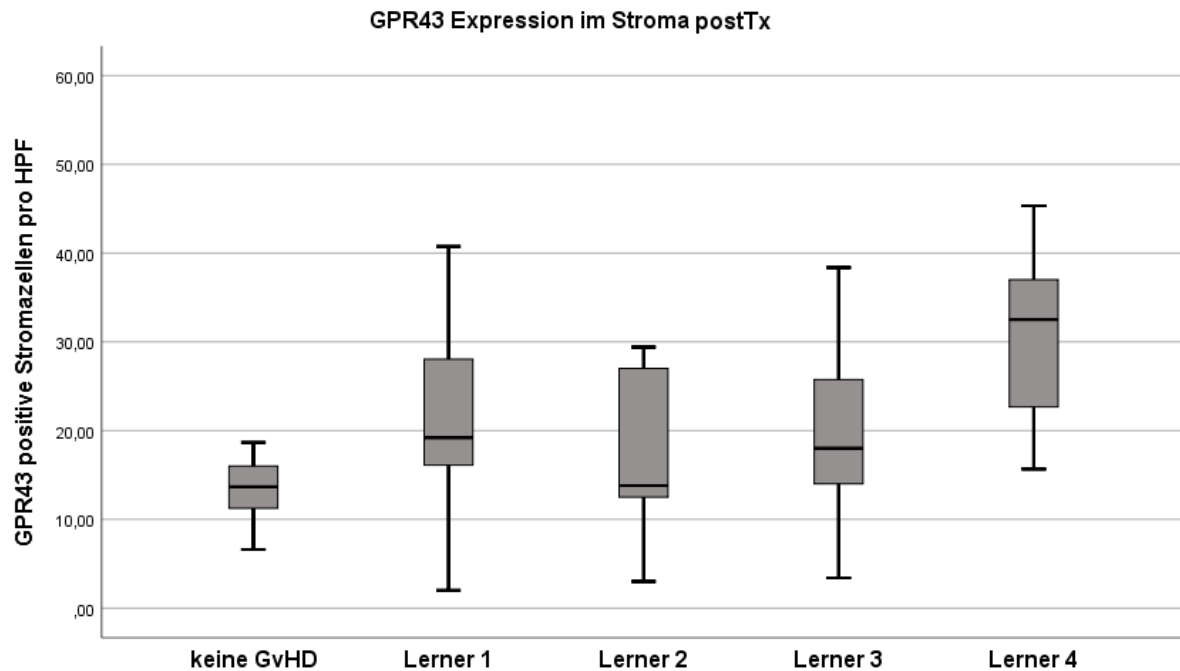


Abb. 15: Boxplot zur Expression von GPR43 im Stroma postTx nach einzelnen Schweregraden

Gestützt auf diese Beobachtung erfolgte im nächsten Schritt die Bildung von Subgruppen. Die Biopsien wurden eingeteilt in „Proben vor ASCT“ (präTx), „histologisch keine GvHD“ (keine GvHD), „schwache Ausprägung der GvHD“ (Grad 1 und 2) und „starke Ausprägung der GvHD“ (Grad 3 und 4).

Die einzelnen Gruppen unterschieden sich dabei signifikant in der Menge der Proteinexpression ($H = 17,556$; $p < 0,001$). Der paarweise Vergleich lieferte folgende Ergebnisse:

Im Vergleich zu präTx Biopsien, stieg die Zahl positiver Zellen in Gewebeproben ohne GvHD nach der Transplantation leicht an (Median von 12,7 auf 13,7). Dieser Trend war jedoch nicht signifikant ($p = 1,000$). Beim Vorliegen einer schwachen GvHD (Median 18,5) verstärkte sich dies und die Proteinexpression nahm signifikant zu im Vergleich zu den präTx Proben ($p = 0,016$).

Auch im Vergleich zu Biopsien mit starker GvHD, die im Schnitt 22,5 positive Zellen exprimierten, zeigten präTx Biopsien signifikant weniger GPR43 positive Stromazellen ($p = 0,005$). Litt der Patient nach der ASCT unter einer schweren Ausprägung der GvHD, exprimierte er eine höhere Anzahl positiver Zellen als Patienten ohne nachweisbare GvHD ($p = 0,022$). Die gleiche Tendenz wies der Vergleich von Biopsien mit schwacher GvHD und histologisch nicht nachweisbarer GvHD auf, wenngleich dieser Unterschied nicht signifikant war ($p = 0,063$).

Passend zu den restlichen Beobachtungen übertraf die Proteinexpression bei starker GvHD diejenige in Biopsien mit schwach ausgeprägter Erkrankung ($p = 1,000$).

Tab. 10 fasst die einzelnen Werte der Subgruppen nochmals zusammen und Abb. 16 zeigt die steigende Proteinexpression bei Zunahme der GvHD.

Tab. 10: Deskriptive Statistik der erhobenen Daten zur Expression von GPR43 im Stroma vor und nach ASCT, unterteilt in Subgruppen

GPR43 positive Stromazellen vor und nach ASCT, Subgruppen		
präTx	Gültige Fälle	14
	Median	12,7
	präTx vs. keine GvHD	$p = 1,000$
	präTx vs. schwache GvHD	$p = 0,016$
	präTx vs. starke GvHD	$p = 0,005$
Keine GvHD	Gültige Fälle	18
	Median	13,7
	Keine vs. schwache GvHD	$p = 0,063$
	Keine vs. starke GvHD	$p = 0,022$
Schwache GvHD (Lerner 1 und 2)	Gültige Fälle	38
	Median	18,5
	Schwache vs. starke GvHD	$p = 1,000$
Starke GvHD (Lerner 3 und 4)	Gültige Fälle	30
	Median	22,5

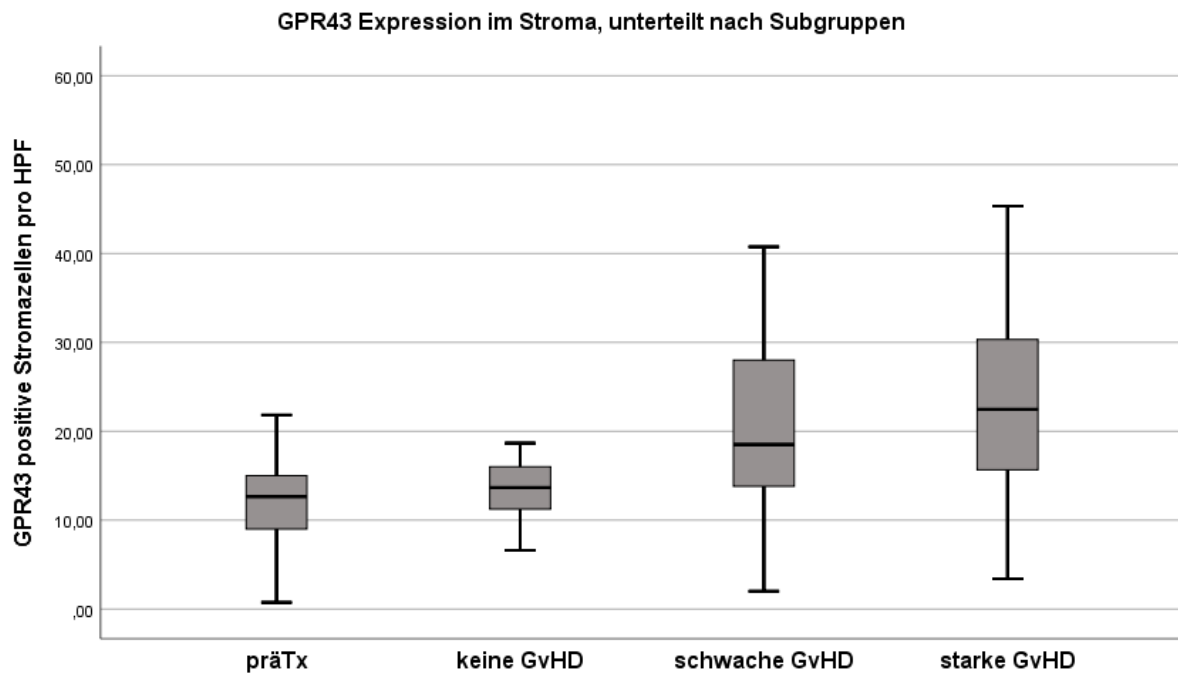


Abb. 16: Boxplot zur Expression von GPR43 im Stroma vor und nach ASCT, unterteilt in Subgruppen

3.2.2 Einfluss des Schweregrades der GvHD auf die GPR43 Expression im Epithel der Krypten und Zotten

Analog zur Analyse des Stromas wurde im Anschluss der Einfluss der ASCT auf die GPR43 Expression im Epithel der Krypten untersucht.

Der Vergleich der Anzahl positiver Epithelzellen in den basalen Krypten in präTx Biopsien mit der in Biopsien postTx, zeigte sich eine Abnahme der Expression durch die ASCT (Median präTx: 3,5; postTx: 2,5). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p = 0,077$).

Entsprechend wurde die Expression positiver Epithelzellen in den oberflächlichen Krypten untersucht. Hier fand sich in beiden Gruppen ein Median von 3,0 und die statistische Analyse erbrachte ebenfalls kein signifikantes Ergebnis ($p = 0,083$).

Somit unterschied sich die Expression von GPR43 positiven Zellen im Epithel der oberflächlichen Krypten zwischen den Biopsien vor und nach ASCT nicht.

Abb. 17 zeigt die Expression GPR43 positiver Zellen im Epithel der basalen und oberflächlichen Krypten in Biopsien vor und nach ASCT.

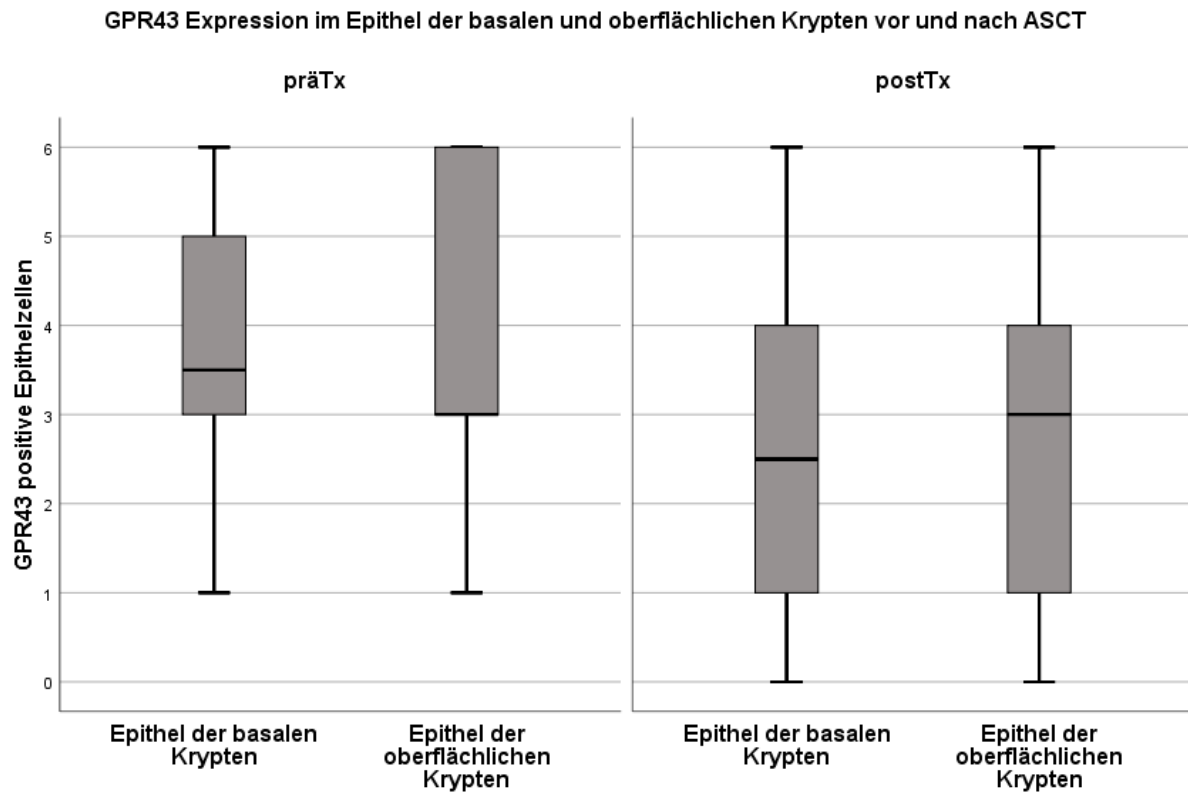


Abb. 17: Boxplot zur Expression von GPR43 im Epithel der basalen und oberflächlichen Krypten vor und nach ASCT

Bei detaillierter Betrachtung der einzelnen Lerner Grade fiel auf, dass die Zahl positiver Epithelzellen in den basalen Krypten in Biopsien ohne GvHD und mit Lerner Grad 1 bis 2 konstant blieb (Median 2,5) und erst bei Lerner 4 mehr positive Zellen gefunden wurden (Median 3,0). Biopsien mit Lerner 3 zeigten mit einem Median von 2,0 etwas weniger positive Epithelzellen als die restlichen Lerner Grade. Im Kruskal-Wallis Test zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Schweregraden ($H = 1,022$; $p = 0,906$) und auch der paarweise Vergleich lieferte keine signifikanten Ergebnisse.

Abb. 18 zeigt die Verteilung GPR43 positiver Zellen im Epithel der basalen Krypten in Abhängigkeit vom Schweregrad der GvHD.

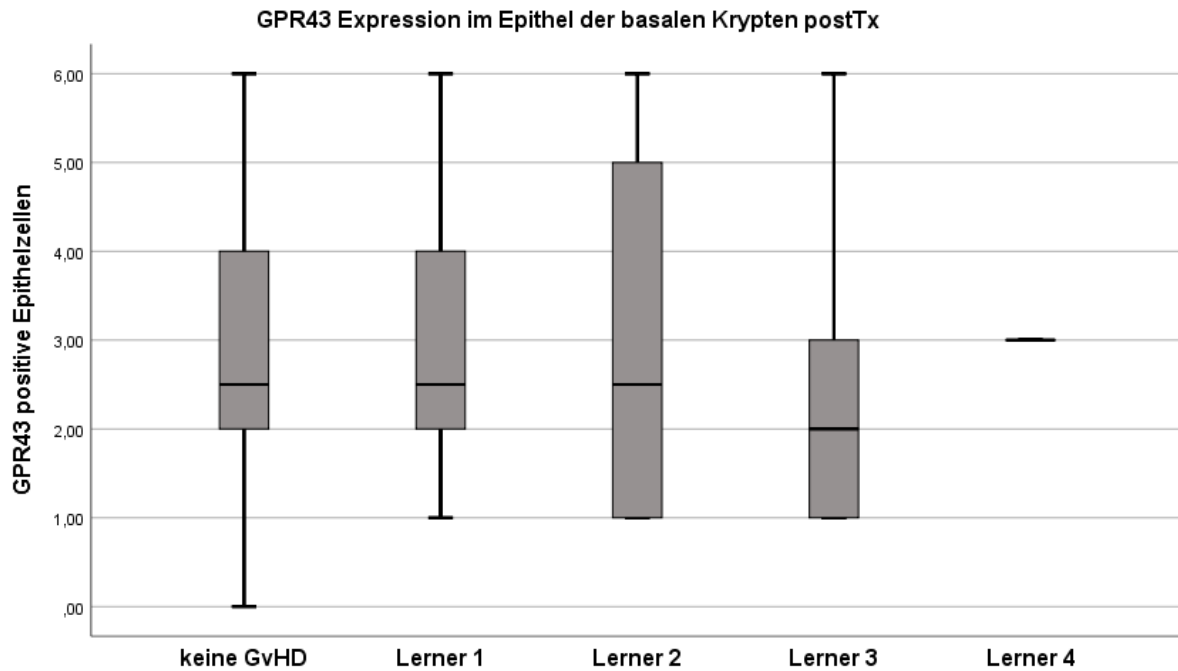


Abb. 18: Boxplot zur Expression von GPR43 im Epithel der basalen Krypten postTx nach einzelnen Schweregraden

Analog zu 3.3.1 erfolgte für die Expression von GPR43 im Epithel der basalen Krypten ebenfalls eine Bildung von Subgruppen (präTx, keine GvHD, schwache GvHD und starke GvHD). Dabei exprimierten alle postTx Gruppen mit einem Median von 2,5 weniger positive Epithelzellen als Biopsien, die vor der ASCT entnommen wurden (Median 3,5). Auch hier war der Unterschied nicht signifikant ($H = 3,668$; $p = 0,300$).

Abb. 19 und Tab. 11 zeigen die Verteilung GPR43 positiver Zellen im Epithel der basalen Krypten in Abhängigkeit vom Schweregrad der GvHD, unterteilt in die genannten Subgruppen.

Tab. 11: Deskriptive Statistik der erhobenen Daten zur Expression von GPR43 im Epithel der basalen Krypten vor und nach ASCT, unterteilt in Subgruppen

GPR43 positive Epithelzellen in den basalen Krypten, unterteilt in Subgruppen		
präTx	Gültige Fälle	14
	Median	3,5
	Minimum	1,0
	Maximum	6,0
	Interquartilbereich	2,5
Keine GvHD	Gültige Fälle	18
	Median	2,5
	Minimum	0,0
	Maximum	6,0
	Interquartilbereich	2,3
Schwache GvHD (Lerner 1 und 2)	Gültige Fälle	36
	Median	2,5
	Minimum	1,0
	Maximum	6,0
	Interquartilbereich	2,8
Starke GvHD (Lerner 3 und 4)	Gültige Fälle	20
	Median	2,5
	Minimum	1,0
	Maximum	6,0
	Interquartilbereich	2,0

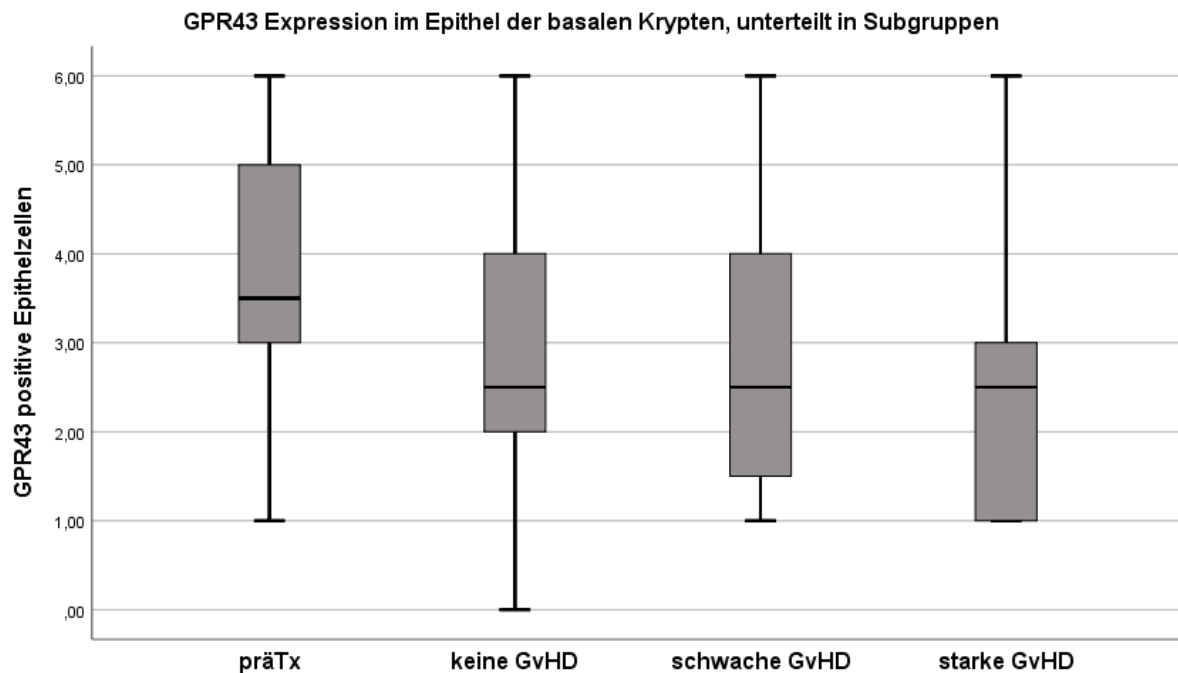


Abb. 19: Boxplot zur Expression von GPR43 im Epithel der basalen Krypten vor und nach ASCT, unterteilt in Subgruppen

Im Epithel der oberflächlichen Krypten konnten weder zwischen prä und postTx (siehe oben), noch zwischen den einzelnen Lerner Graden (Kruskal-Wallis Test mit $H = 0,688$ und $p = 0,953$) statistisch signifikante Unterschiede detektiert werden. Dabei war der Median von Lerner Grad 1, 2 und 4 identisch zum Wert der präTx Biopsien (3,0). Patienten mit Lerner 3 zeigten auch im oberflächlichen Kryptenepithel die geringste Expression (Median 2,0) und Patienten ohne GvHD exprimierten mit einem Median von 2,5 etwas weniger GPR43 als die anderen Schweregrade.

Wurden die Biopsien in oben beschriebene Subgruppen unterteilt, zeigten sich identische Werte für Biopsien vor ASCT und denen mit schwacher GvHD (Median 3,0). Verglichen dazu zeigten Patienten ohne GvHD und mit starker GvHD im Mittel etwas weniger positive Epithelzellen (Median 2,5). Auch diese Unterschiede waren weder im Kruskal-Wallis Test ($H = 3,355$; $p = 0,340$) noch im paarweisen Vergleich signifikant.

Tab. 12 zeigt die Verteilung GPR43 positiver Zellen im Epithel der oberflächlichen Krypten in Abhängigkeit vom Schweregrad der GvHD, unterteilt in die genannten Subgruppen.

Tab. 12: Deskriptive Statistik der erhobenen Daten zur Expression von GPR43 im Epithel der oberflächlichen Krypten vor und nach ASCT, unterteilt in Subgruppen

GPR43 positive Epithelzellen in den oberflächlichen Krypten, unterteilt in Subgruppen		
präTx	Gültige Fälle	14
	Median	3,0
	Minimum	1,0
	Maximum	6,0
	Interquartilbereich	3,0
Keine GvHD	Gültige Fälle	18
	Median	2,5
	Minimum	0,0
	Maximum	6,0
	Interquartilbereich	3,0
Schwache GvHD (Lerner 1 und 2)	Gültige Fälle	36
	Median	3,0
	Minimum	1,0
	Maximum	6,0
	Interquartilbereich	2,8
Starke GvHD (Lerner 3 und 4)	Gültige Fälle	20
	Median	2,5
	Minimum	1,0
	Maximum	6,0
	Interquartilbereich	1,0

Ein Vergleich der Anzahl GPR43 positiver Zellen im Zottenepithel in präTx Biopsien mit der in Biopsien nach ASCT ergab einen Anstieg der Proteinexpression durch die Transplantation (Median 1,0 auf 3,0). Im Mann-Whitney-U-Test zeigte sich diese Zunahme jedoch nicht signifikant ($p = 0,236$).

Abb. 20 zeigt die Expression GPR43 positiver Zellen im Zottenepithel in Biopsien vor und nach ASCT.

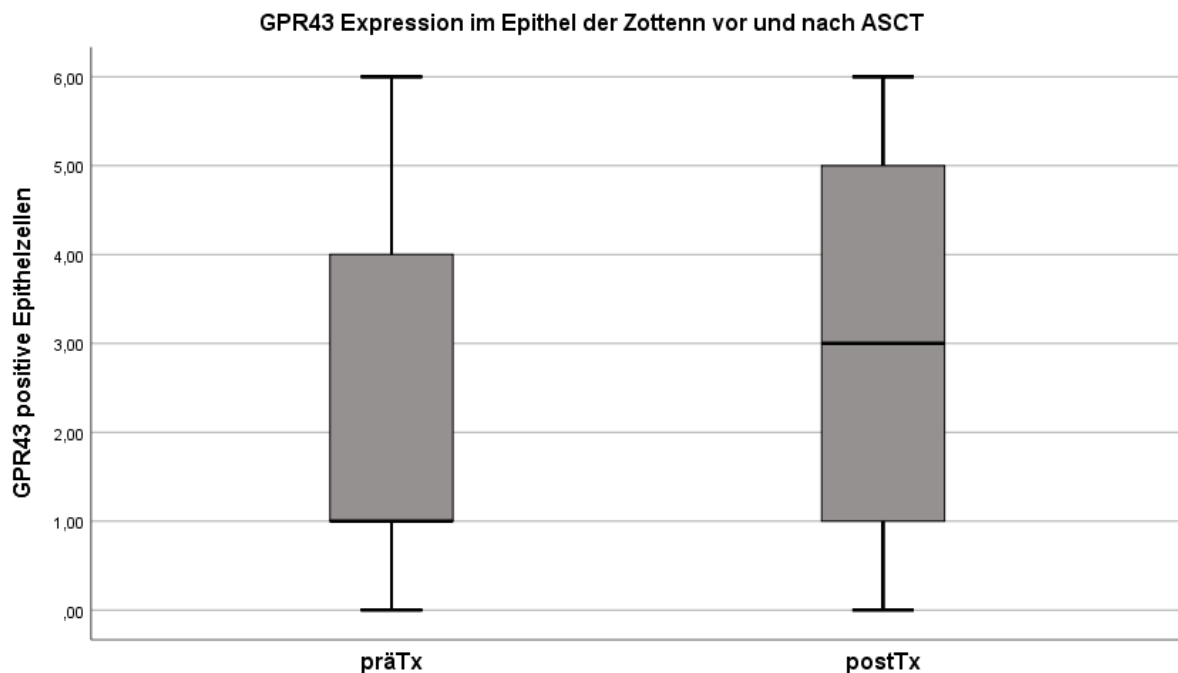


Abb. 20: Boxplot zur Expression von GPR43 im Epithel der Zotten vor und nach ASCT

Bei detaillierter Betrachtung der einzelnen Lerner Grade zeigten sich in Biopsien ohne GvHD (Median: 4,0), mit Lerner Grad 1 (Median: 3,0) und Lerner Grad 2 (Median: 5,0) deutlich mehr positive Epithelzellen als bei Lerner Grad 3 (Median: 1,5), wenngleich dies in der statistischen Analyse nicht signifikant war ($H = 4,079$, $p = 0,395$). Von den Proben mit Lerner Grad 4 erfüllte lediglich eine die Auswertungskriterien für die Zotten (1 - 10 % positive Zellen).

Analog zu 3.3.1 erfolgte für die Expression von GPR43 im Epithel der Zotten ebenfalls eine Bildung von Subgruppen (präTx, keine GvHD, schwache GvHD und starke GvHD). Dabei nahm die Proteinexpression in postTx Biopsien ohne GvHD im Vergleich zu präTx Biopsien deutlich zu (Median 1,0 zu 4,0). Gleiches galt für die schwache GvHD (Median 3,5). In den wenigen Fällen schwerer GvHD, bei denen noch auswertbares Zottenepithel gefunden wurde ($N = 7$), sank die Expression wieder auf das Niveau der präTx Biopsien.

In der statistischen Analyse unterschieden sich die Subgruppen nicht signifikant voneinander ($H = 3,561$; $p = 0,313$) und auch der Vergleich der Gruppen untereinander blieb ohne signifikantes Ergebnis.

Tab. 13 und Abb. 21 zeigen die Verteilung GPR43 positiver Zellen im Epithel der Zotten in Abhängigkeit vom Schweregrad der GvHD, unterteilt in die genannten Subgruppen.

Tab. 13: Deskriptive Statistik der erhobenen Daten zur Expression von GPR43 im Epithel der Zotten vor und nach ASCT, unterteilt in Subgruppen

GPR43 positive Epithelzellen in den Zotten vor und nach ASCT, unterteilt in Subgruppen		
präTx	Gültige Fälle	9
	Median	1,0
	Minimum	0,0
	Maximum	6,0
	Interquartilbereich	3,5
Keine GvHD	Gültige Fälle	11
	Median	4,0
	Minimum	0,0
	Maximum	6,0
	Interquartilbereich	4,0
Schwache GvHD (Lerner 1 und 2)	Gültige Fälle	22
	Median	3,5
	Minimum	1,0
	Maximum	6,0
	Interquartilbereich	4,0
Starke GvHD (Lerner 3 und 4)	Gültige Fälle	7
	Median	1,0
	Minimum	1,0
	Maximum	4,0
	Interquartilbereich	2,0

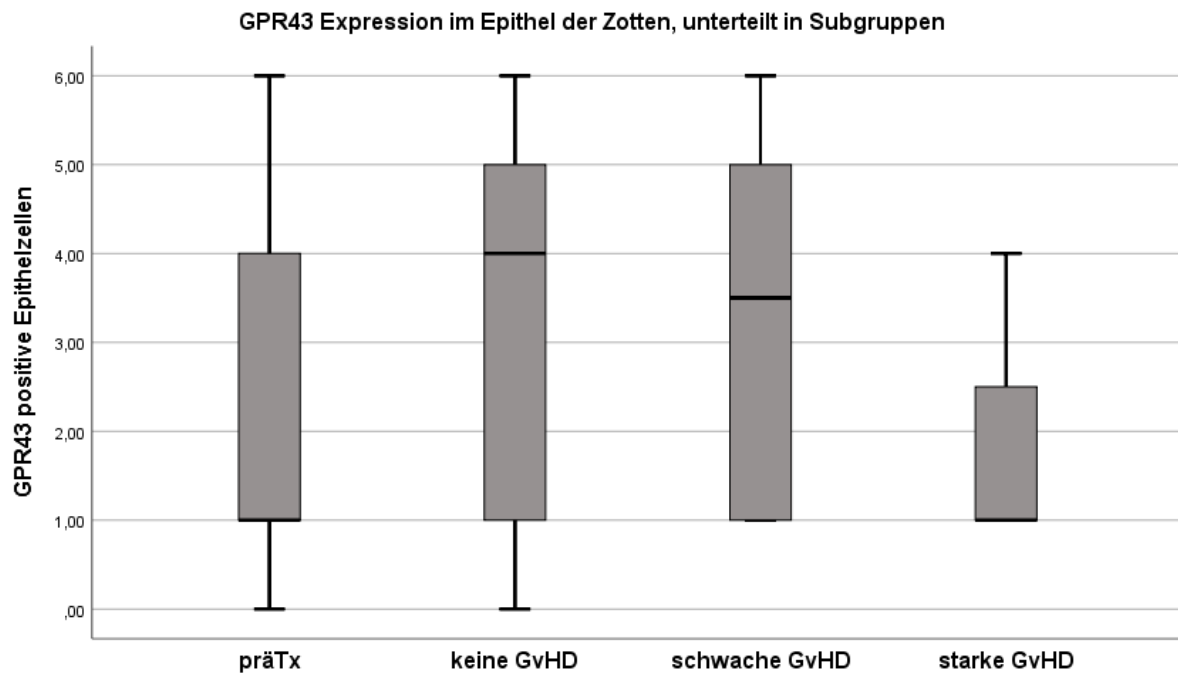


Abb. 21: Boxplot zur Expression von GPR43 im Epithel der Zotten vor und nach ASCT, unterteilt in Subgruppen

3.3 Einfluss des Biopsiezeitpunktes auf die GPR43 Expression

Um zu überprüfen, wie sich die Anzahl GPR43 positiver Zellen im zeitlichen Verlauf nach ASCT verändert, erfolgte eine Einteilung der Biopsien abhängig von ihrem Entnahmepunkt nach ASCT. In Anlehnung an die Phasen des Engraftments nach ASCT umfassten die Gruppen Biopsien präTx sowie Biopsien entnommen zwischen Tag null und Tag 30 nach ASCT, zwischen Tag 31 und Tag 180 nach ASCT und Biopsien, die mehr als 180 Tage nach ASCT entnommen wurden.

Das „pre-engraftment“ von Tag null bis 30 nach ASCT wird dominiert von der Neutropenie und der durch Chemotherapie induzierten Schädigung der mucosalen Barriere. Im „early-post-engraftment“ von Tag 30 bis 100 spielt die Dysfunktion der B- und T-Lymphozyten eine wichtige Rolle und das „late-post-engraftment“ von Tag 100 bis zur vollständigen Erholung des Immunsystems ist von diversen humoralen und zellvermittelten Störungen des Immunsystems geprägt (71).

3.3.1 Einfluss des Biopsiezeitpunktes auf die GPR43 Expression im Stroma

Wie bereits unter 3.2.1 festgestellt, nahm die Expression von GPR43 im Stroma postTx zu. So konnte auch in der statistischen Analyse der oben definierten Zeiträume eine signifikante Zunahme der Proteinexpression festgestellt werden ($H = 9,890$; $p = 0,020$).

Dies war am deutlichsten in den ersten 30 Tagen nach ASCT zu beobachten. Hier stieg die Anzahl positiver Stromazellen von 12,7 (präTx) auf 18,3 Zellen pro HPF. Im paarweisen Vergleich war diese Zunahme mit $p = 0,010$ signifikant.

Vergingen nach der ASCT mehr als 30, aber weniger als 180 Tage, sank die GPR43 Expression geringfügig auf 16,0 Zellen pro HPF. Damit zu vergleichen war die mittlere Expression von 16,2 positiven Stromazellen pro HPF in Biopsien, die mehr als 180 Tage nach ASCT entnommen wurden.

Somit war die Expression von GPR43 im Stroma zu allen Zeitpunkten postTx höher als vor der Transplantation, allerdings fand sich im paarweisen Vergleich der restlichen Gruppen kein weiterer signifikanter Unterschied. Die genauen Ergebnisse dazu sind in Tab. 14 dargestellt.

Abb. 22 verbildlicht die Proteinexpression im Stroma in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Biopsieentnahme vor und nach ASCT.

Tab. 14: Statistik der erhobenen Daten zur Expression von GPR43 im Stroma in Abhängigkeit vom Biopsiezeitpunkt

GPR43 positive Stromazellen in Abhängigkeit vom Biopsiezeitpunkt		
präTx	Gültige Fälle	14
	Median	12,7
	präTx vs. 0 - 30 d postTx	p = 0,010
	präTx vs. 31 - 180 d postTx	p = 0,197
	präTx vs. > 180 d postTx	p = 0,296
0 - 30 d postTx	Gültige Fälle	41
	Median	18,3
	0 - 30 d vs. 31 - 180 d postTx	p = 1,000
	0 - 30 d vs. > 180 d postTx	p = 1,000
31 - 180 d postTx	Gültige Fälle	30
	Median	16,0
	31 - 180 d vs. > 180 d postTx	p = 1,000
> 180 d postTx	Gültige Fälle	15
	Median	16,2

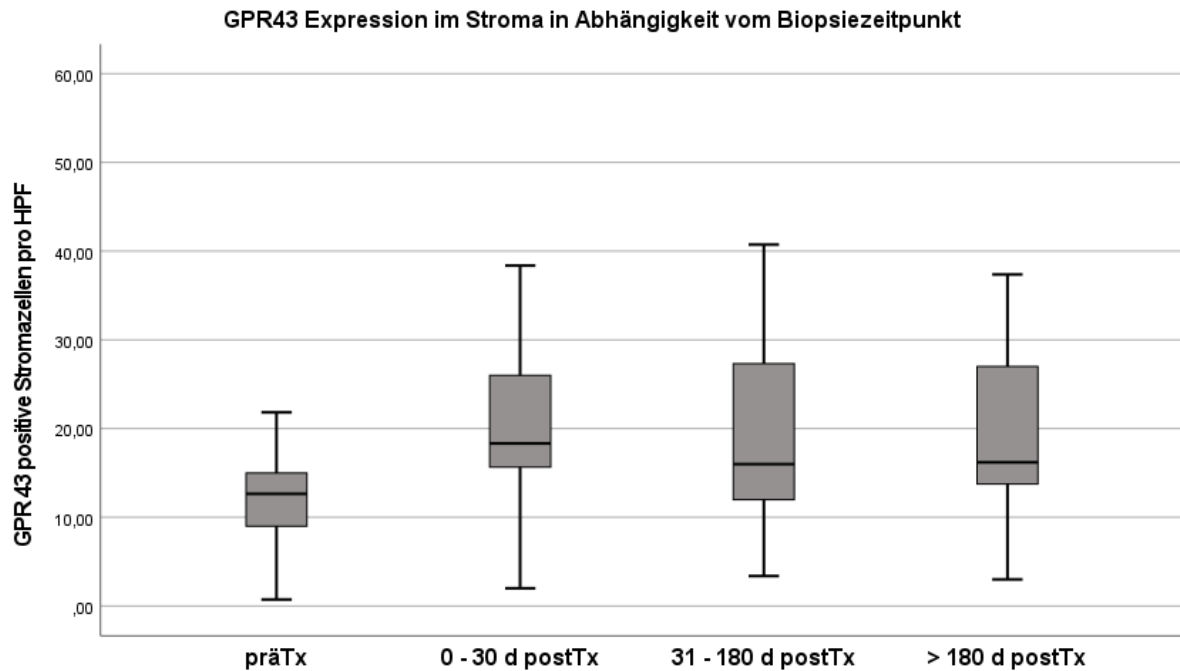


Abb. 22: Boxplot zur Expression von GPR43 im Stroma in Abhängigkeit vom Biopsiezeitpunkt

3.3.2 Einfluss des Biopsiezeitpunktes auf die GPR43 Expression im Epithel der Krypten und Zotten

Im Anschluss wurde auf gleiche Art und Weise die Proteinexpression im Kryptenepithel im Zeitverlauf postTx beleuchtet.

Dabei sank in allen Zeiträumen postTx sowohl in den basalen als auch in den oberflächlichen Krypten die Zahl GPR43 positiver Epithelzellen ab oder blieb zum Ausgangswert präTx identisch. In der statistischen Analyse waren diese Veränderungen weder in den basalen Kryptenanteilen ($H = 4,759$; $p = 0,190$) noch in oberflächlich gelegenen Krypten ($H = 4,126$; $p = 0,248$) signifikant.

Fand sich in den präTx Biopsien noch ein Median von 3,5 (basale Anteile) bzw. 3,0 (oberflächliche Anteile), sank dieser Wert über die gesamten Krypten in den ersten 30 Tagen auf 2,0. Diese Abnahme war im paarweisen Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test für die basalen Krypten signifikant (basal: $p = 0,037$). Biopsien der beiden späteren Zeitpunkte (31 bis 180

Tage und später als 180 Tage) zeigten verglichen zum ersten Zeitpunkt postTx (Tag 0 bis 30) eine geringfügig stärkere Proteinexpression (Median in beiden Anteilen jeweils 3,0).

Weitere signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen konnten nicht ausgemacht werden. Tab. 15 fasst die Ergebnisse der statistischen Analyse zusammen.

Abb. 23 zeigt die Expression von GPR43 im Epithel der basalen Krypten in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Biopsieentnahme vor und nach ASCT.

Tab. 15: Statistik der erhobenen Daten zur Expression von GPR43 im Epithel der basalen und oberflächlichen Krypten in Abhängigkeit vom Biopsiezeitpunkt

		Basale Krypten	Oberflächliche Krypten
präTx	Gültige Fälle	14	14
	Median	3,5	3,0
	präTx vs. 0 - 30 d postTx	p = 0,037	p = 0,05
	präTx vs. 31 - 180 d postTx	p = 0,316	p = 0,298
	präTx vs. > 180 d postTx	p = 0,261	p = 0,285
0 – 30 d postTx	Gültige Fälle	37	37
	Median	2,0	2,0
	0 - 30 d vs. 31 - 180 d postTx	p = 0,235	p = 0,329
	0 - 30 d vs. > 180 d postTx	p = 0,392	p = 0,456
31 – 180 d postTx	Gültige Fälle	23	23
	Median	3,0	3,0
	31 - 180 d vs. > 180 d postTx	p = 0,824	p = 0,914
> 180 d postTx	Gültige Fälle	14	14
	Median	3,0	3,0

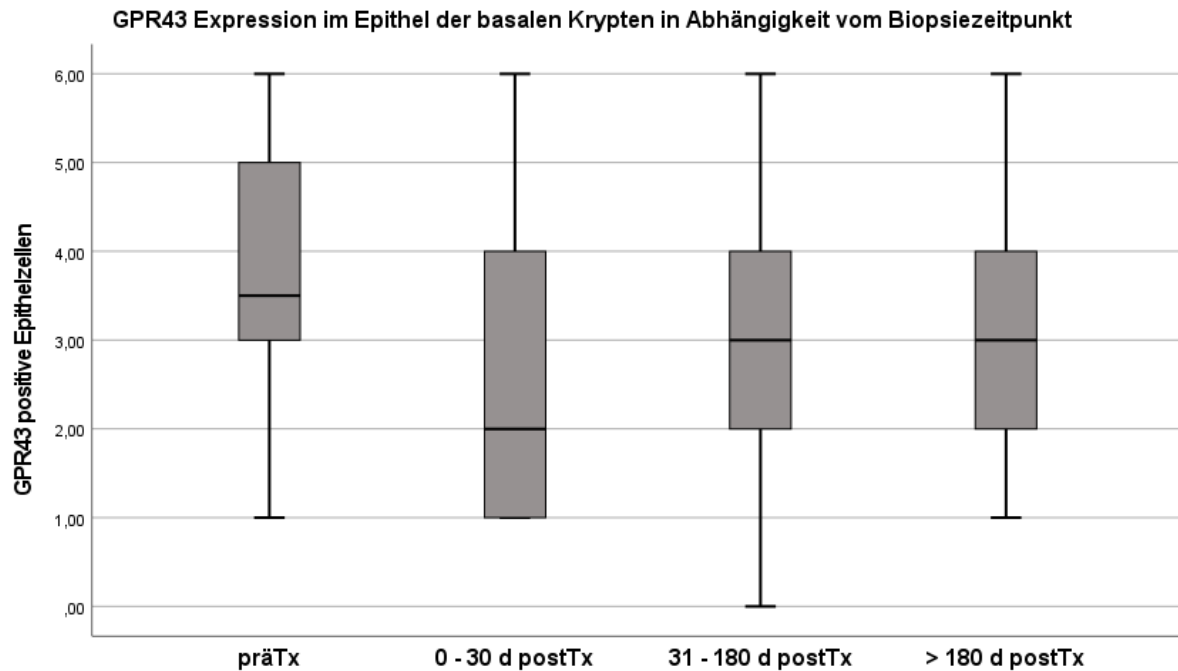


Abb. 23: Boxplot zur Expression von GPR43 im Epithel der basalen Krypten in Abhängigkeit vom Biopsiezeitpunkt

Im Gegensatz zur Proteinexpression in den Krypten zeigte sich im Zottenepithel in postTx Biopsien ein Anstieg GPR43 positiver Zellen. Zu allen Zeitpunkten lag der Median höher als in den präTx Biopsien (Median: 1,0). In den ersten 30 Tagen stieg der Median auf 3,0. Bis Tag 180 erreichte die Expression mit einem Median von 4,5 dann seinen höchsten Wert. Vergingen mehr als 180 Tage postTx sank die Proteinexpression ab, blieb aber immer noch über dem Ausgangswert (Median 2,0).

Im Kruskal-Wallis Test war diese Dynamik nicht signifikant ($H = 2,863$; $p = 0,413$). Auch die paarweisen Vergleiche mittels Mann-Whitney-U-Test erbrachten keine signifikanten Ergebnisse. Die genauen Daten dazu sind Tab. 16 zusammen.

Abb. 24 zeigt die Expression von GPR43 positiven Epithelzellen in den Zotten in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Biopsieentnahme vor und nach ASCT.

Tab. 16: Statistik der erhobenen Daten zur Expression von GPR43 im Epithel der Zotten in Abhängigkeit vom Biopsiezeitpunkt

GPR43 positive Epithelzellen in den Zotten in Abhängigkeit vom Biopsiezeitpunkt		
präTx	Gültige Fälle	9
	Median	1,0
	präTx vs. 0 - 30 d postTx	p = 0,248
	präTx vs. 31 - 180 d postTx	p = 0,218
	präTx vs. > 180 d postTx	p = 0,837
0 - 30 d postTx	Gültige Fälle	27
	Median	3,0
	0 - 30 d vs. 31-180 d postTx	p = 0,416
	0 - 30 d vs. > 180 d postTx	p = 0,345
31 - 180 d postTx	Gültige Fälle	8
	Median	4,5
	31 - 180 d vs. > 180 d postTx	p = 0,295
Über 180 d postTx	Gültige Fälle	5
	Median	2,0

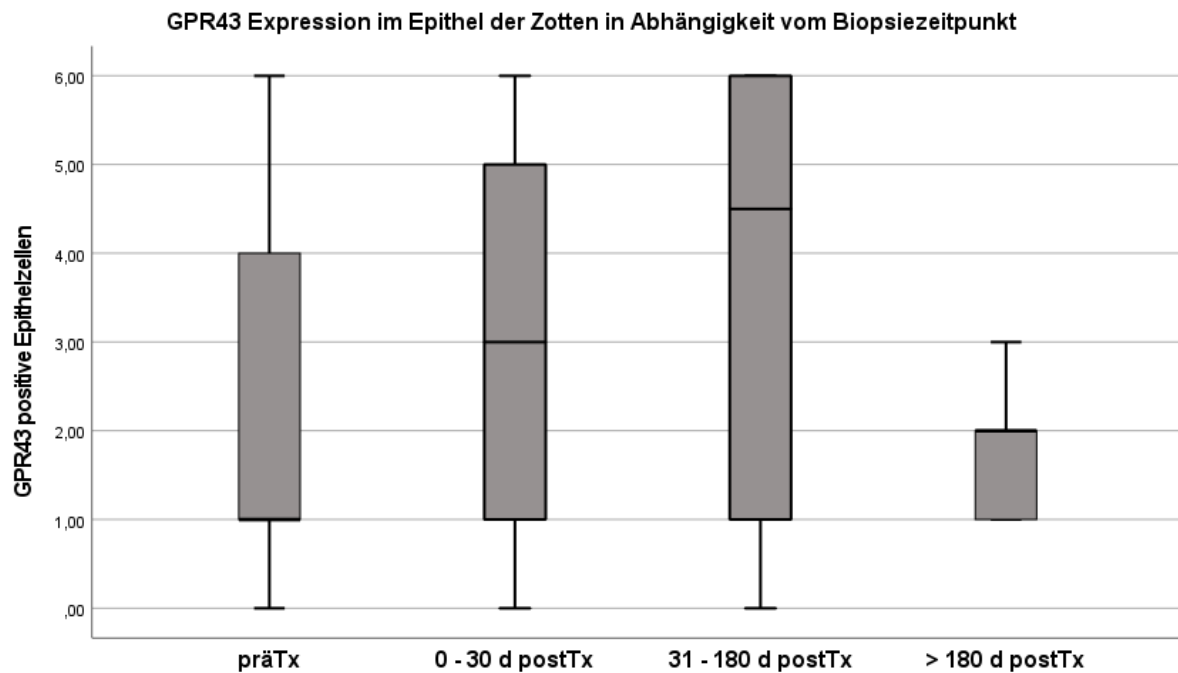


Abb. 24: Boxplot zur Expression von GPR43 im Epithel der Zotten in Abhängigkeit vom Biopsiezeitpunkt

3.4 Einfluss der Steroiddosis auf die Expression von GPR43

Um den Einfluss der verabreichten Steroiddosis auf die GPR43 Expression zu untersuchen, wurden retrospektiv aus den Patientenakten die relevanten Dosen von Prednisolon zum Zeitpunkt der Biopsie gesammelt. Die erste Gabe musste mindestens 24 Stunden vor der Biopsie erfolgt sein, damit von einem systemischen Effekt der Steroide ausgegangen werden konnte. Die Patienten wurden dann in zwei Gruppen unterteilt. Gruppe 1 erhielt keine Steroide oder eine Dosis kleiner als 20 mg/d. Bei der zweiten Gruppe wurden mehr als 20 mg/d verabreicht. Anschließend erfolgte auch hier wieder ein Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test.

3.4.1 Einfluss der Steroiddosis auf die Expression von GPR43 im Stroma

Die Betrachtung der Proteinexpression im Stroma in Abhängigkeit von der Steroiddosis zum Biopsiezeitpunkt zeigte in der Gruppe, die weniger als 20 mg/d erhielt, eine mittlere Expression von 16,1 Zellen pro HPF (N = 38). Bei Patienten mit einer verabreichten Dosis von mehr als

20 mg/d fanden sich mehr GPR43 positive Stromazellen (Median: 18,6 Zellen pro HPF; N = 48; p = 0,273).

Abb. 25 zeigt die Expression von GPR43 positiven Stromazellen in Abhängigkeit von der Steroiddosis zum Biopsiezeitpunkt

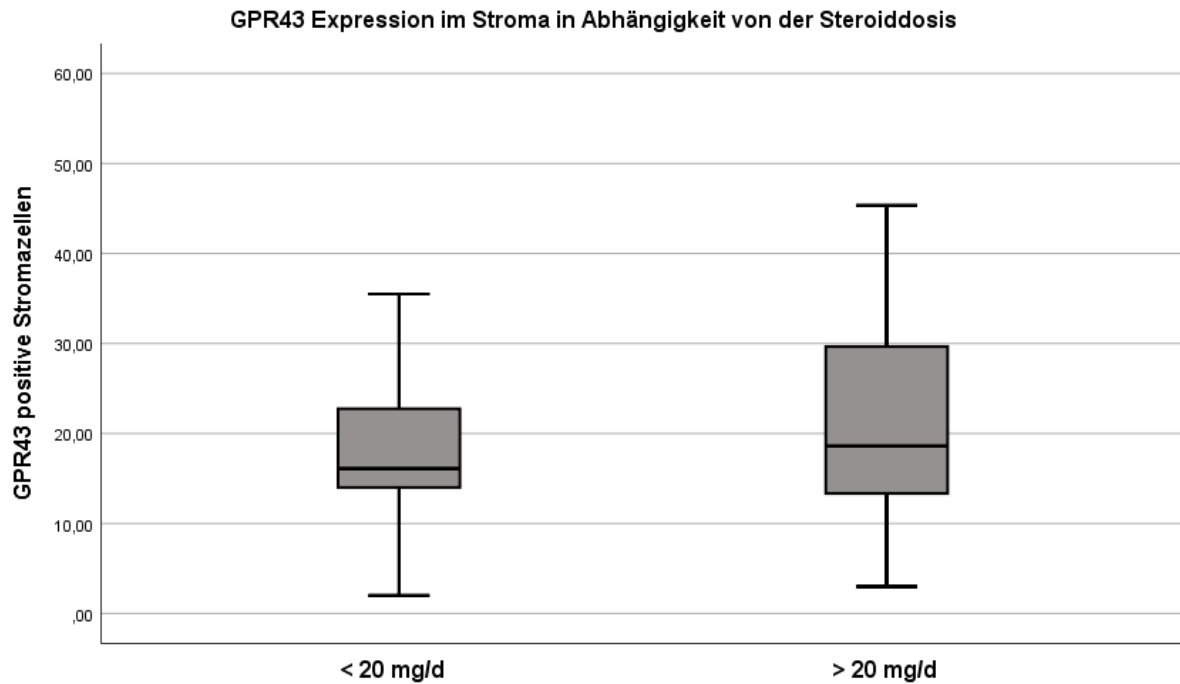


Abb. 25: Boxplot zur Expression von GPR43 im Stroma in Abhängigkeit von der Steroiddosis zum Biopsiezeitpunkt

3.4.2 Einfluss der Steroiddosis auf die Expression von GPR43 im Epithel der Krypten und Zotten

Analog wurde der Einfluss der Steroiddosis auf die Proteinexpression im Epithel der Krypten und Zotten analysiert.

Dabei zeigte sich in den basalen Kryptenanteilen eine identische Expression von GPR43 bei beiden Gruppen (Median: 2,5; p = 0,340). Die Expression in den oberflächlichen Kryptenanteilen zeigte eine Abnahme mit zunehmender Steroiddosis. So fand sich in Gruppe 1 (< 20 mg/d; N = 36) ein Median von 3,0 wohingegen in Gruppe 2 (> 20 mg/d; N = 38) ein Median von 2,5 vorlag (p = 0,349).

Den größten Unterschied zeigte jedoch das Epithel der Zotten. Erhielten die Patienten weniger als 20 mg/d exprimierten sie mit einem Median von 4,0 (N = 23) deutlich mehr als die Gruppe mit einer Dosis über 20 mg/d (Median: 1,0; N = 17; $p = 0,162$).

Dieser Unterschied ist in Abb. 26 bildlich dargestellt.

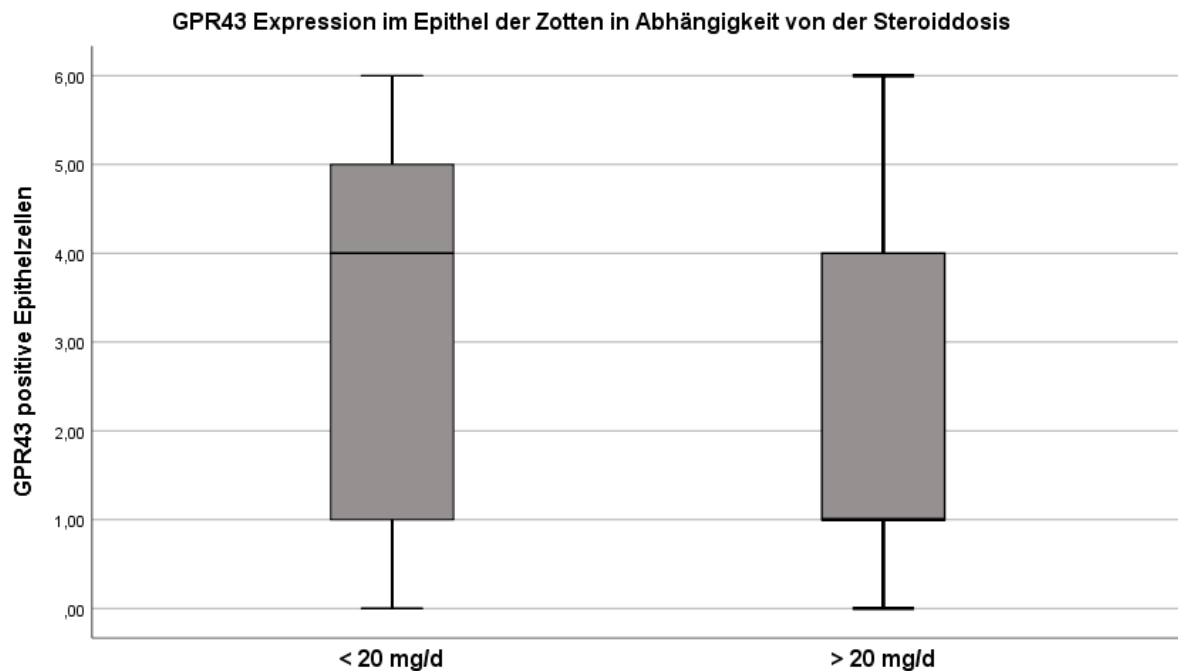


Abb. 26: Boxplot zur Expression von GPR43 im Zottenepithel in Abhängigkeit von der Steroiddosis

3.5 Einfluss der Gabe von Antibiotika auf die Expression von GPR43 im Stroma und Epithel der Krypten und Zotten

Um den Einfluss der verabreichten Antibiotika zu analysieren, wurden retrospektiv aus den Patientenakten die Art des Antibiotikums, der Zeitpunkt und die Dauer der Gabe ermittelt. Folgende Kriterien wurden dabei berücksichtigt:

- Es musste sich bei dem Antibiotikum um ein systemisch wirksames Bretibandantibiotikum handeln. Dazu zählten Vertreter der Cephalosporine, Carbapeneme, Piperacillin/Tazobactam und Linezolid (Vertreter der Oxazolidinone)
- Eine erstmalige Gabe der Antibiose erfolgte mindestens 48 Stunden vor der Biopsienahme

- Da die Mikrobiomstörung auch nach Absetzen der Antibiose anhält, wurden Patienten, bei denen die letzte Gabe innerhalb von sieben Tagen vor der Biopsie erfolgte, ebenfalls zu der Gruppe gezählt, die Antibiotika erhielt.

Anschließend erfolgte auch hier wieder ein Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test.

Bei Betrachtung der Proteinexpression im Stroma in Abhängigkeit von der Antibiotikagabe exprimierten Patienten ohne antibiotische Therapie im Mittel 16,0 Zellen pro HPF (N = 44). Erhielten die Patienten hingegen Antibiotika, stieg die Expression auf 18,3 Zellen pro HPF (N = 41; $p = 0,119$).

Im Epithel der Krypten fand sich sowohl in den basalen als auch in den oberflächlichen Anteilen unter Antibiose eine geringere Expression von GPR43 (Median basal: 2,0; Median oberflächlich 2,5; N = 36). Wurden die Patienten nicht mit oben genannten Medikamenten behandelt, konnten mehr positive Epithelzellen detektiert werden (Median jeweils 3,0; N = 38). Diese Unterschiede waren im Mann-Whitney-U-Test nicht signifikant (basal: $p = 0,908$; oberflächlich: $p = 0,987$).

Die Expression im Zottenepithel ließ sich mit der des Stromas vergleichen. Auch hier konnten in Biopsien von Patienten mit Antibiotika mehr positive Zellen detektiert werden (Median: 3,0; N = 22). Wurden keine antibakteriellen Medikamente verabreicht betrug der Median 2,5 (N = 18; $p = 1,000$).

Abb. 27 zeigt die GPR43 Expression im Epithel der basalen Krypten in Abhängigkeit von der Antibiotikagabe.

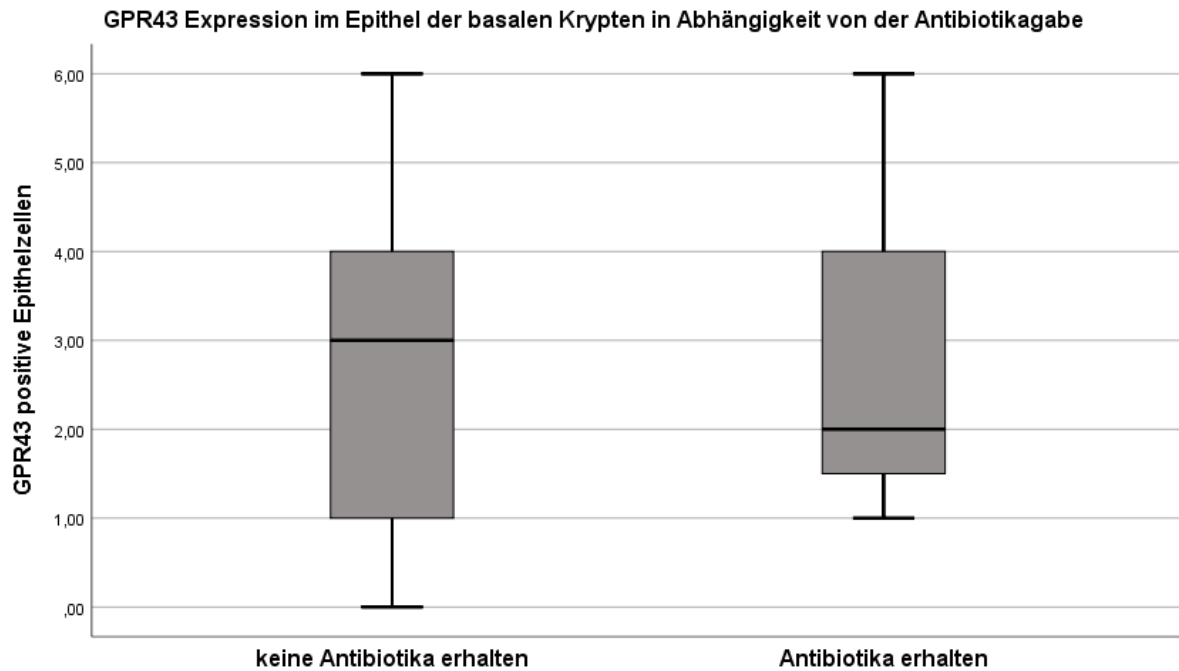


Abb. 27: Boxplot zu Expression von GPR43 im Epithel der basalen Krypten in Abhängigkeit von der Antibiotikagabe

3.6 Zusammenhang der GPR43 Expression im Stroma mit der Anzahl FoxP3 positiver regulatorischer T-Zellen

In der Pathogenese und der Ausprägung der GvHD spielen Treg eine wichtige Rolle, da sie im Stande sind die Entzündungsreaktion zu begrenzen (25). Die Anzahl dieser Zellen konnte im Tiermodell über die Gabe von SCFA gesteigert werden (61). Um zu verstehen, ob und wie die Anzahl GPR43 tragender Zellen nach ASCT mit der Anwesenheit regulatorischer T-Zellen im Stroma zusammenhängt, wurden im Folgenden FoxP3 positive Zellen (Marker für Treg (24)) mit der Anzahl GPR43 positiver Zellen korreliert.

Im Stroma ergab die Korrelationsanalyse für die beiden Zellentitäten einen schwach positiven Zusammenhang ($N = 85$; $\rho = 0,246$; $p = 0,023$). Demnach stieg mit der Anzahl GPR43 tragender Zellen auch die Menge der Treg. Dies wird in Abb. 28 mithilfe eines Streudiagramms dargestellt.

Erhielten die Patienten keine Antibiotika (Kriterien wie in 3.5 beschrieben) verstärkte sich diese Beobachtung ($N = 44$; $\rho = 0,402$; $p = 0,007$). In der Gruppe mit Antibiotika war hingegen keine

Korrelation der jeweiligen Proteinexpression mehr feststellbar ($N = 40$; $\rho = 0,046$; $p = 0,778$). Abb. 29 zeigt den Zusammenhang von GPR43 und FoxP3 in Abhängigkeit von der Antibiotikagabe.

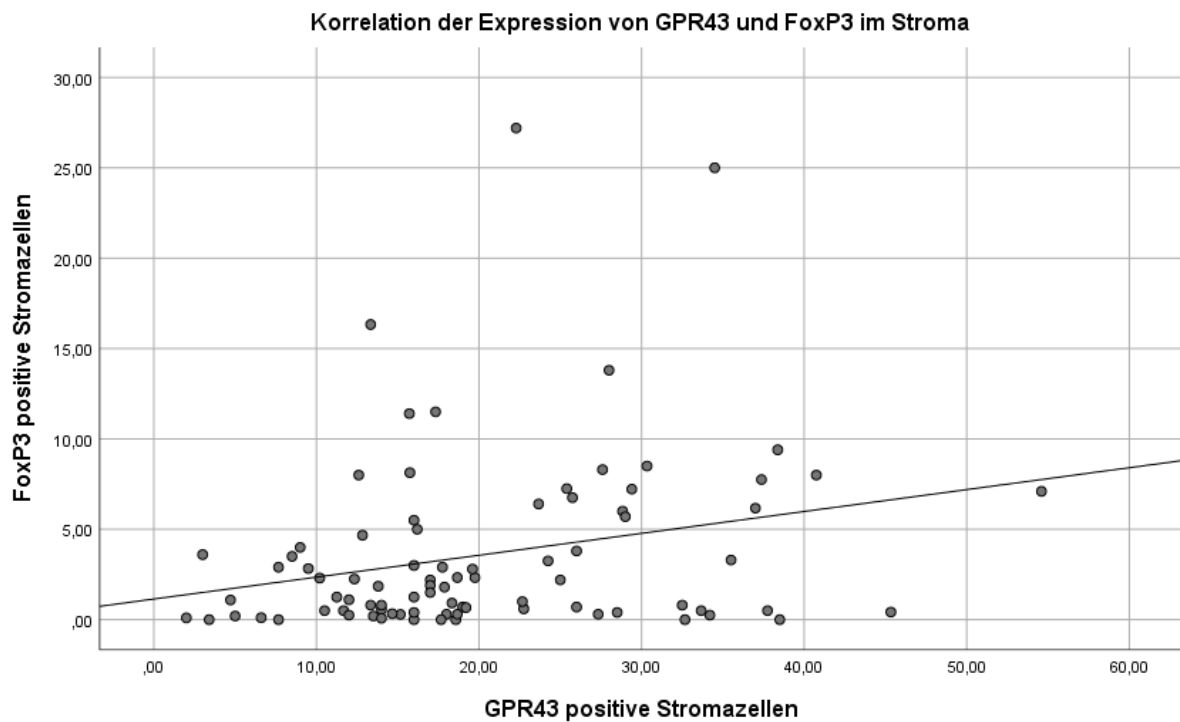


Abb. 28: Streudiagramm zur Korrelation der Expression von FoxP3 und GPR43 im Stroma

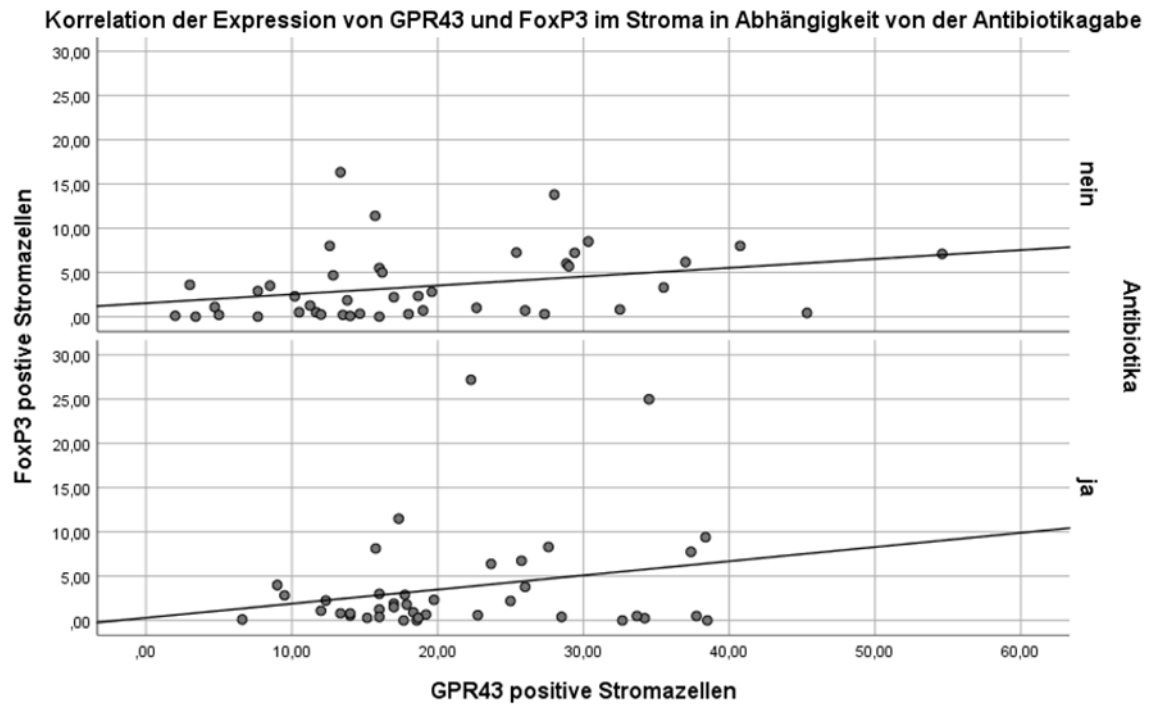


Abb. 29: Streudiagramm zur Korrelation der Expression von FoxP3 und GPR43 im Stroma in Abhängigkeit von der Antibiotikagabe

Betrachtete man die Werte für GPR43 und FoxP3 positive Zellen in Abhängigkeit von der Steroiddosis mit den unter 3.5 genannten Kriterien, zeigte sich auch hier ein deutlicher Unterschied der Korrelationen. Diese lag in der Gruppe vor, welche keine Steroide oder weniger als 20 mg/d erhielt ($N = 38$; $\rho = 0,501$, $p = 0,001$). Bei Patienten mit einer höheren Dosis an Steroiden konnte hingegen kein Zusammenhang mehr zwischen GPR43 und FoxP3 nachgewiesen werden ($N = 47$; $\rho = 0,07$, $p = 0,642$).

Abb. 30 zeigt die Korrelation in Abhängigkeit von der Steroiddosis.

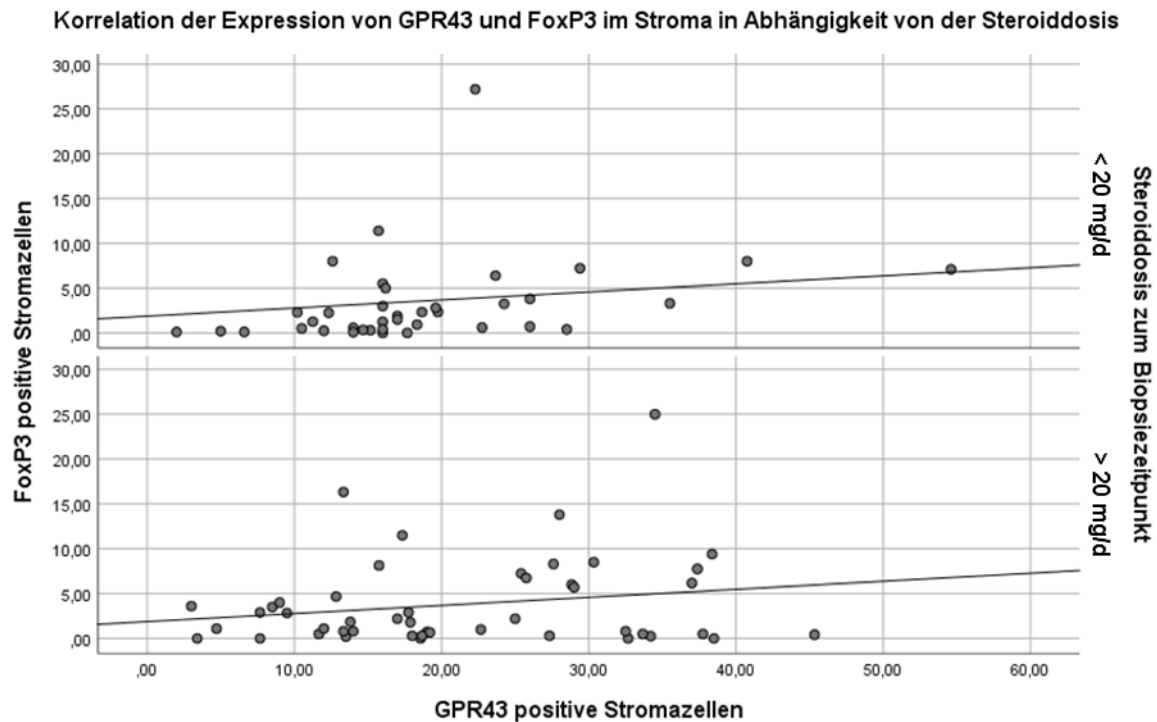


Abb. 30: Streudiagramm zur Korrelation der Expression von FoxP3 und GPR43 im Stroma in Abhängigkeit von der Steroiddosis

3.7 Zusammenhang der GPR43 Expression im Stroma und Epithel mit 3-IS Werten im Urin

Die 3-IS Werte im Urin sind ein indirekter Marker für die Zusammensetzung des Mikrobioms (48, 72). Zumal die Produktion von SCFA und damit die Anzahl der GPR43 Rezeptoren von den vorhandenen Bakterienspezies abhängt, wurde der Zusammenhang zwischen 3-IS Werten und der GPR43 Expression in Stroma und Epithel nach ASCT mittels Korrelationsanalyse untersucht.

Es wurden alle Werte von 3-IS Spiegeln eingeschlossen, deren Urinproben im Zeitraum von sieben Tagen vor bis 14 Tage nach der Biopsieentnahme gewonnen wurden.

Dabei zeigte sich weder im Stroma ($N = 23$; $\rho = -0,270$; $p = 0,213$) noch im Epithel (basale Krypten: $N = 19$; $\rho = 0,062$; $p = 0,801$; oberflächliche Krypten: $N = 19$; $\rho = 0,094$; $p = 0,701$; Epithel der Zotten: $N = 15$; $\rho = -0,01$; $p = 0,973$) eine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl GPR43 positiver Zellen und den 3-IS Werten.

Anschließend erfolgte die Unterteilung der Patienten in eine Gruppe, welche keine Antibiotika erhielt, und eine zweite Gruppe, welche mit Antibiotika therapiert wurde (Kriterien 3.5). Eine Korrelation der beiden Parameter konnte in keiner der beiden Gruppen festgestellt werden.

3.8 Korrelation der immunhistochemisch ermittelten Ergebnisse zur GPR43 Expression mit Daten aus der PCR-Analyse

Zur Expression des GPR43 Rezeptors wurde von Ghimire et al. eine Analyse mithilfe einer quantitativen Echtzeit-PCR durchgeführt (64). Da in der PCR die DNA aller Zellen untersucht wird, lässt sich nicht unterscheiden, von welchen Zellen GPR43 exprimiert wird. Um zu prüfen, ob aufgrund der PCR-Analyse möglicherweise Rückschlüsse auf das Kompartiment der GPR43 Expression gezogen werden können, wurden die ermittelten Werte der PCR-Analyse mit den Werten der immunhistochemischen Auswertung korreliert. Dabei kam der Spearman Korrelationskoeffizient zum Einsatz. Für die in dieser Arbeit untersuchten Biopsien wurden in 42 Fällen durch die Arbeitsgruppe von Prof. Holler eine PCR durchgeführt. Die Fallzahl für das Stroma lag demnach bei 42 und für das Epithel bei 40 (Krypten) beziehungsweise zwölf (Zotten).

3.8.1 Korrelation der immunhistochemisch ermittelten Ergebnisse mit Daten aus der PCR-Analyse im Stroma

Die Ergebnisse der PCR-Analyse werden als Dezimalzahlen dargestellt. Um die Werte besser mit den immunhistochemischen Ergebnissen vergleichen zu können, wurden sie vor der Korrelationsanalyse logarithmiert und die Analyse mit der neuen Variable $\log_{10}(\text{PCR})$ durchgeführt.

Bei der Durchführung der Korrelationsanalyse für die Werte im Stroma ergab sich kein Anhalt für einen Zusammenhang zwischen den immunhistochemischen Daten und denen aus der PCR-Analyse ($\rho = -0,074$; $p = 0,639$).

Tab. 17 und Abb. 31 zeigen die Daten zur GPR43 Expression im Stroma aus der immunhistochemischen Analyse und der PCR-Analyse.

Tab. 17: Deskriptive Statistik zu den erhobenen Daten aus der immunhistochemischen Untersuchung und der PCR-Analyse zur GPR43 Expression im Stroma

GPR43 positive Stromazellen in verschiedenen Formen der Analyse		
	Immunhistochemie	Log10(PCR) /Dezimalzahl
Gültige Fälle	42	42
Median	16,0	-2,8 / $1,7 \times 10^{-3}$
Minimum	3,0	-3,7 / $1,9 \times 10^{-4}$
Maximum	40,8	-0,1 / $8,5 \times 10^{-1}$
Interquartilbereich	13,6	0,7 / 0,0

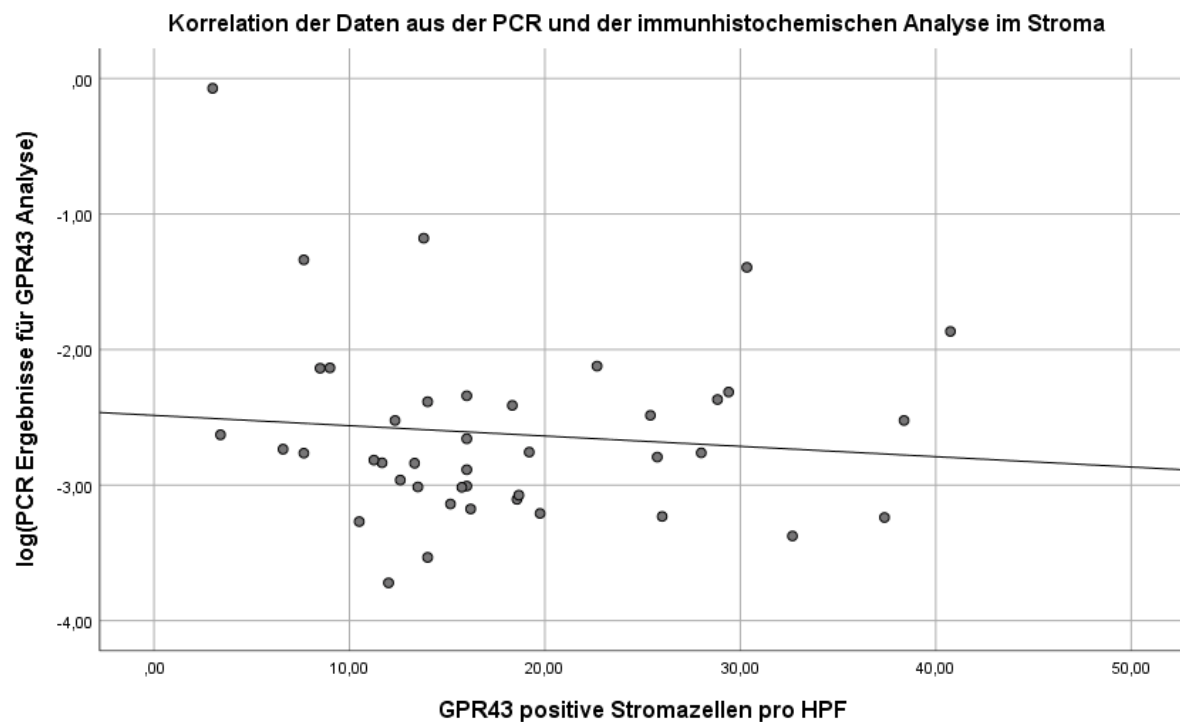


Abb. 31: Streudiagramm zur Korrelation der Daten aus der immunhistochemischen Untersuchung und der PCR-Analyse im Stroma

3.8.2 Korrelation der immunhistochemisch ermittelten Ergebnisse mit Daten aus der PCR-Analyse im Epithel der Krypten und Zotten

Im Vergleich der ermittelten PCR-Daten mit den immunhistochemisch gewonnenen Werten für das Epithelien der Krypten, fand sich weder in den basalen Krypten ($\rho = -0,157$; $p = 0,334$) noch in den oberflächlichen Kryptenanteilen ($\rho = -0,116$; $p = 0,474$) eine signifikante Korrelation. Zum gleichen Ergebnis kam die Korrelationsanalyse für das Epithel der Zotten ($\rho = 0,221$; $p = 0,491$).

Tab. 18 zeigt die Daten zur GPR43 Expression im Epithel der Krypten und Zotten aus der immunhistochemischen Analyse und der PCR-Analyse.

Tab. 18: Deskriptive Statistik zu den erhobenen Daten aus der immunhistochemischen Untersuchung und der PCR-Analyse zur GPR43 Expression im Epithel der Krypten und Zotten

GPR43 positive Epithelzellen in den Krypten in verschiedenen Formen der Analyse (Werte für basale und oberflächliche Krypten identisch)		
	Immunhistochemie	Log (PCR) / Dezimalzahl
Gültige Fälle	40	40
Median	3,0	$-2,8 / 1,7 \times 10^{-3}$
Minimum	0,0	$-3,7 / 1,9 \times 10^{-4}$
Maximum	6,0	$-0,1 / 8,5 \times 10^{-1}$
Interquartilbereich	2,0	0,7 / 0,0
GPR43 positive Epithelzellen in den Zotten in verschiedenen Formen der Analyse		
Gültige Fälle	12	12
Median	4,5	$-2,8 / 1,6 \times 10^{-3}$
Minimum	0,0	$-3,7 / 1,9 \times 10^{-4}$
Maximum	6,0	$-1,3 / 5,0 \times 10^{-2}$
Interquartilbereich	4,8	0,7 / 0,0

3.9 Überlebenszeitanalyse mit Kaplan-Meier

Für die Überlebenszeitanalyse wurde die Kaplan-Meier Methode verwendet. Alle Biopsien nach ASCT wurden abhängig vom Median der GPR43 Expression in Stroma und Epithel in zwei Gruppen unterteilt (Expression kleiner als Median und Expression gleich/größer als Median). Die Überlebenszeit war die Zeit ab der Transplantation bis zum Ereignis. Als Ereignisse wurden die transplantationsassoziierte Mortalität (TRM) und die rezidivassoziierte Mortalität (RRM) getrennt voneinander betrachtet. Waren die Patienten zum Zeitpunkt der Analyse noch am Leben, wurde die Zeit ab der Transplantation bis zur letzten Kontrolluntersuchung (last follow up) verwendet. Der kürzeste Beobachtungszeitraum lag bei 36 Tagen und der längste Zeitraum bei über zehn Jahren (3696 Tage). Mithilfe des Logrank-Tests wurde das Überleben von Patienten, bei denen die GPR43 Expression in Stroma bzw. Epithel gleich oder über dem Median lag mit der Überlebenszeit von Patienten verglichen, bei denen die Expression unter dem Median lag. Bei den zensierten Fällen handelte es sich um die überlebenden Patienten.

3.9.1 Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von der medianen Expression GPR43 positiver Stromazellen

Die Daten zur GPR43 Expression im Stroma wurden anhand des Medians von 17,7 Zellen pro HPF wie oben beschrieben unterteilt. Mittels Logrank-Tests wurde dann geprüft, ob die Höhe der Proteinexpression im Stroma zum Biopsiezeitpunkt bezogen auf diesen Median die Prognose der Patienten hinsichtlich TRM und RRM beeinflusste. Die dabei entstanden Kaplan-Meier-Kurven ließen vermuten, dass eine über dem Median liegende Expression sowohl mit einem erhöhten Risiko für TRM als auch für RRM einhergeht. Die statistische Untersuchung ergab jedoch weder für die TRM ($p = 0,338$) noch für die RRM ($p = 0,168$) einen signifikanten Überlebensvorteil für eine der beiden Gruppen.

Anhand der immunhistochemisch ermittelten Anzahl GPR43 positiver Stromazellen konnte demnach keine Vorhersage über den Eintritt von TRM oder RRM getroffen werden.

Die Anzahl von Ereignissen und zensierten Fällen in den Gruppen ist in Tab. 19 dargestellt. Abb. 32 und 33 zeigen die Kaplan-Meier Kurven zur TRM und RRM.

Tab. 19: Daten zur Überlebenszeitanalyse hinsichtlich der TRM und RRM nach ASCT in Abhängigkeit von der GPR43 Expression im Stroma

Daten für Überlebenszeitanalyse hinsichtlich GPR43 Expression im Stroma		
TRM		
GPR43 positive Zellen < Median	Gültige Fälle	43
	Anzahl Ereignisse	15
	Zensierte Fälle	28
GRP43 positive Zellen $\geq$ Median	Gültige Fälle	43
	Anzahl Ereignisse	16
	Zensierte Fälle	27
Daten für Überlebenszeitanalyse hinsichtlich GPR43 Expression im Stroma		
RRM		
GPR43 positive Zellen < Median	Gültige Fälle	43
	Anzahl Ereignisse	7
	Zensierte Fälle	36
GRP43 positive Zellen $\geq$ Median	Gültige Fälle	43
	Anzahl Ereignisse	9
	Zensierte Fälle	34

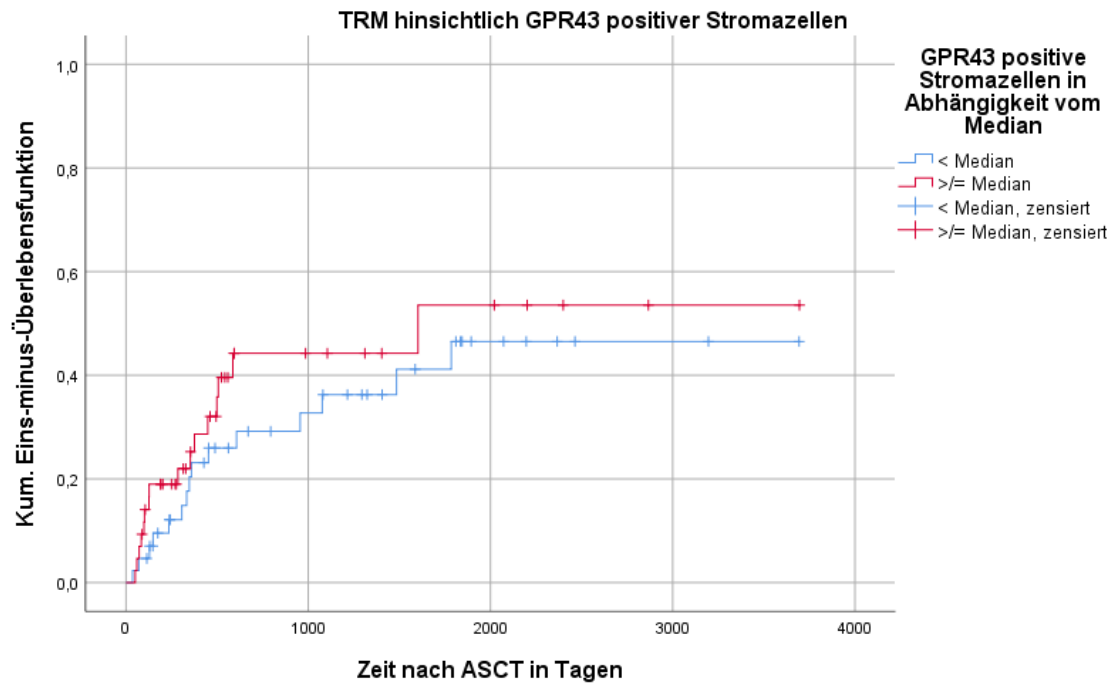


Abb. 32: Kaplan-Meier-Kurve zur TRM nach ASCT in Abhängigkeit von der GPR43 Expression im Stroma

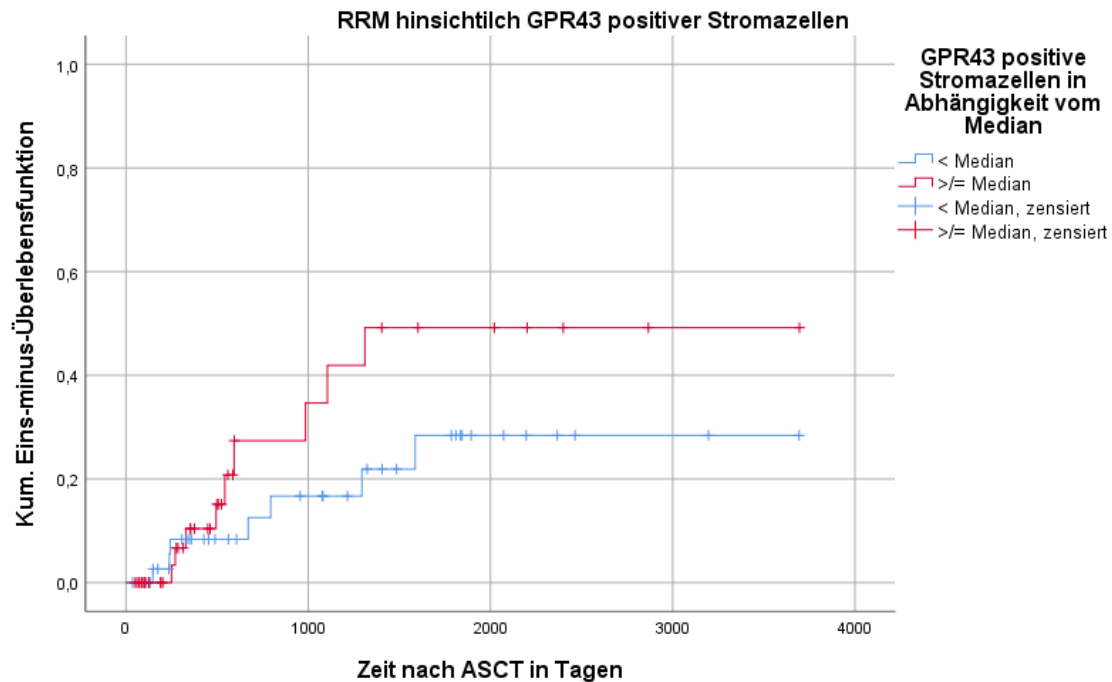


Abb. 33: Kaplan-Meier-Kurve zur RRM nach ASCT in Abhängigkeit von der GPR43 Expression im Stroma

3.9.2 Überlebenszeitanalyse in Abhängigkeit von der medianen Expression GPR43 positiver Epithelzellen in Krypten und Zotten

Die Daten zur GPR43 Expression im Epithel der basalen Krypten wurden anhand des Medians von 2,5 in zwei Gruppen unterteilt. Dafür wurde der Median auf 3,0 aufgerundet (kleiner Median: 0 - 2, größer/gleich Median: 3 - 6). Hier konnte der Logrank-Test ebenfalls keinen Überlebensvorteil hinsichtlich TRM ($p = 0,742$) oder RRM ($p = 0,741$) aufzeigen.

Zum gleichen Ergebnis kam die Analyse der Expression in oberflächlichen Kryptenanteilen (Median 3,0; TRM: $p = 0,840$; RRM: $p = 0,443$). Somit konnte aufgrund der immunhistochemisch bestimmten Höhe der GPR43 Expression im Kryptenepithel keine prognostische Aussage für die Patienten getroffen werden.

Auch Anhand der mittleren Proteinexpression im Epithel der Zotten (Median 3,0) konnte kein Vorteil für das Eintreten einer TRM ($p = 0,860$) oder RRM ($p = 0,888$) getroffen werden.

4 Diskussion

Um zu überprüfen, inwieweit die hier gewonnenen Daten auf ein allgemeines Patientenkollektiv, welches sich einer ASCT unterzieht, übertragbar sind, wurden die Patientencharakteristika mit Daten aus Veröffentlichungen der European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) und des deutschen Registers für Stammzelltransplantation (DRST) verglichen. In beiden Quellen wurden zur optimalen Vergleichbarkeit Daten aus dem Jahr 2019 betrachtet. Dabei ergab sich, dass die vorliegende Arbeit bezüglich der zugrundeliegenden Diagnose, der Spenderauswahl und der Stammzellquelle repräsentativ für deutsches beziehungsweise europäisches Patientenkollektiv ist. So erhielten 62,9 % der hier eingeschlossenen Patienten eine ASCT aufgrund eines myeloischen Malignoms (EBMT: 56,7 %; DRST: 67,0 %), 30,9 % (EBMT: 28,3 %, DRST: 24,4 %) wegen einer malignen lymphatischen Grunderkrankung und bei 6,2 % (EBMT: 15,0 %, DRST: 8,6 %) lag eine anderweitige Diagnose vor. 33,0 % (EBMT: 49,0 %, DRST: 26,4 %) der Patienten erhielten Stammzellen von verwandten Spendern und 67,0 % (EBMT: 51,0 %, DRST: 73,6 %) von nicht-verwandten Spendern. Die Stammzellen wurden in 14,4 % (EBMT: 18,8 %, DRST: 12,6 %) der Fälle durch eine Knochenmarkpunktion gewonnen und in 85,6 % (EBMT: 79,5 %, DRST: 87,4 %) kamen PBSC zum Einsatz (5,73).

Die Stichprobengröße von 100 Biopsien von 97 verschiedenen Patienten bietet eine gute Grundlage zur Erhebung der Daten. Dennoch ist denkbar, dass einige Ergebnisse in der statistischen Analyse signifikant werden, wenn eine größere Stichprobe untersucht wird. So lässt die Anzahl positiver Stromazellen in den einzelnen Darmabschnitten vermuten, dass auch der Unterschied zwischen Ileum und Duodenum sowie Colon und Duodenum bei einer höheren Patientenzahl signifikant wird und auch die Überlebenszeitanalyse zeigt einen gewissen Trend, dass eine höhere Anzahl GPR43 positiver Stromazellen möglicherweise mit einem erhöhten Risiko für TRM und RRM einhergeht. Um Verzerrungen zu vermeiden, wurde bei der Auswahl der Patienten darauf geachtet, von jedem möglichst nur eine Biopsie auszuwählen. Dies ist vor allem für die Überlebenszeitanalyse wichtig, da die Mehrfachwertung des Outcomes eines Patienten die Ergebnisse verfälschen würde. Bei der Auswahl der Proben ist anzumerken, dass die Verteilung der Lerner Grade nicht gleichmäßig ist. Generell existieren wenige Proben mit schwerer GvHD (Grad 3 und 4). Dies liegt daran, dass abhängig vom Gesamtzustand und den Symptomen der Patienten nicht immer eine Koloskopie und Gastroskopie simultan durchgeführt werden. Eine zusätzliche Herausforderung ist die Auswertung des Epithels bei zunehmenden Schweregrad, weil der Verlust des Epithels definitionsgemäß ein Kriterium für die

histologische Einteilung der GvHD darstellt (74). Um dennoch eine Analyse zu ermöglichen, wurde das Epithel nur ausgewertet, falls im Präparat mindestens drei Lumen führenden Krypten bzw. eine Größe der verbliebenen Krypten von mindestens 200 Epithelzellen zu finden war. Daher ist die Fallzahl insbesondere für Lerner Grad 3 und 4 im Epithel der Zotten und Krypten gering. Ebenfalls erwähnenswert ist, dass trotz zahlreicher Bestrebungen für eine einheitliche histopathologische Graduierung der GvHD nach wie vor eine hohe Interobservervariabilität besteht und die Ergebnisse bezüglich der Einteilung nach Lerner Graden daher kritisch bewertet werden müssen (75).

4.1 Unterschiedliche Expression des GPR43 Rezeptors in den einzelnen Darmabschnitten

Bei Betrachtung der Biopsien in den Darmabschnitten Duodenum, Ileum und Colon unterschied sich das Expressionsmuster von GPR43 deutlich. So wurden im Stroma des Colons signifikant mehr positive Zellen gefunden als im Ileum. Das Ileum exprimierte im Vergleich zu den restlichen Abschnitten am wenigsten GPR43 und das Duodenum nahm eine Mittelstellung ein. Die Anzahl GPR43 exprimierender Zellen steigt mit der Anwesenheit von SCFA, welche wiederum vom Mikrobiom produziert werden (siehe 1.4.3). Demnach scheinen Unterschiede im Mikrobiom der einzelnen Darmabschnitte eine naheliegende Erklärung für diese Beobachtung zu sein. In einer Analyse von Mailhe et al. nahm die mikrobiologische Diversität der gefundenen Bakterien von oral nach aboral zu und im Duodenum fanden sich signifikant weniger verschiedene Spezies als im Ileum und Colon. Darüber hinaus dominierten im Duodenum vor allem aerotolerante Actinobacteria, wohingegen im Ileum und Colon überwiegend Firmicutes und Bacteroidetes isoliert wurden (76). Letztere sind bekanntlich die Hauptproduzenten von SCFA (50). Zu beachten ist jedoch, dass die von Mailhe et al. untersuchten Patienten aufgrund verschiedener Symptome und Vorerkrankungen einer diagnostischen Endoskopie unterzogen wurden und die Ergebnisse somit nicht zweifelsohne auf gesunde Probanden oder Patienten nach ASCT übertragbar sind. Um eine definitive Aussage über die wechselseitige Beeinflussung von Mikroben und der GPR43 Expression treffen zu können, sind weitere Arbeiten, welche die Zusammensetzung des Mikrobioms entlang des Darms nach ASCT und bei Patienten mit GvHD analysieren, unabdingbar.

Die Zusammensetzung und Diversität des Mikrobioms von Ileum und Colon unterschieden sich in der oben genannten Arbeit nicht wesentlich (76). Es ist jedoch bekannt, dass die absolute

Menge der Bakterien von oral nach aboral zunimmt und im Colon die höchste Dichte erreicht (77). Dies ist eine mögliche Begründung dafür, dass die größten Unterschiede in der immunhistochemischen Auswertung zwischen Colon und Ileum gefunden wurden. Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz hierfür ist die differente zelluläre Zusammensetzung der beiden Darmabschnitte. Im Gegensatz zum Colon ist das darmassoziierte lymphatische Gewebe (GALT) im Ileum in Form von Peyer-Plaques deutlich stärker ausgeprägt. Zudem wurden Biopsien für die vorliegende Arbeit ausschließlich aus dem terminalen Ileum entnommen. Hier findet sich die größte Anzahl an Peyer-Plaques und somit eine komplexe Interaktion zwischen Immunzellen und den übrigen intestinalen Zellen. Die Studie von Mailhe et al. untersuchte hingegen die Mikrobiomzusammensetzung im gesamten Ileum. Denkbar ist, dass die GPR43 Expression neben der Anzahl von SCFA auch von bisher nicht analysierten Signalwegen des Immunsystems beeinflusst wird. Um dies weiter abzuklären, braucht es weitere Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Zellentitäten, dem Mikrobiom und der GPR43 Expression.

Die hohe Expression von GPR43 im Colon kann auch damit erklärt werden, dass SCFA vor allem im Dickdarm produziert werden (78). So konnten Cummings et al. in postmortalen Untersuchungen im Ileum nur 13 ± 6 mmol/kg SCFA detektieren, wohingegen im Colon bis zu zehnfach höhere Konzentrationen gefunden wurden (Colon ascendens 123 ± 12 mmol/kg; Colon transversum: 117 ± 9 mmol/kg; Colon descendens: 80 ± 17 mmol/kg) (79). Die vermehrte Anwesenheit von SCFA führt bekanntlich zur gesteigerten Expression von GPR43 (1.4.3).

Ebenso denkbar ist, dass die immunologischen Prozesse der GvHD die einzelnen Darmabschnitte unterschiedlich stark beeinflussen und schädigen. Die damit verbundene Translokation von Bakterien und ihren Stoffwechselprodukten durch das gereizte Epithel bedingen dann die mannigfaltige GPR43 Expression. Untermauert wird dieser Gedanke durch Ma et al. Die Forschungsgruppe analysierte Biopsien aus dem oberen und unteren GIT von Patienten mit klinisch diagnostizierter GvHD. Dabei zeigte sich bei 75 % eine Beteiligung beider Darmabschnitte, bei 19 % war nur der untere GIT befallen und 6 % zeigten eine isolierte GvHD des oberen GIT. Generell fand sich im distalen Abschnitt des GIT im Mittel ein höherer histologischer Schweregrad als im Duodenum. Außerdem stieg innerhalb des unteren GIT der Schweregrad vom Ileum zum Colon signifikant. Zusammenfassend überstieg der untere GIT demnach sowohl in der Prävalenz als auch in der Ausprägung der GvHD das proximale Intestinum (80).

Ein weiterer Einflussfaktor auf die Proteinexpression der einzelnen Darmabschnitte ist die einheitliche Transitzeit. Diese ist im Colon vergleichsweise länger als im Duodenum (81). In

einer in vitro Untersuchung von Tottey et al. führte die Prolongation der Darmpassage innerhalb des Colons zur Zunahme der Konzentration von SCFA (82). Da der Darminhalt im Colon länger verweilt als im Dünndarm, begünstigt dies durch das erhöhte Metabolitenangebot möglicherweise ebenfalls eine gesteigerte GPR43 Expression. Die längere Transitzeit des Colons erklärt vermutlich auch, weshalb nur in diesem Darmabschnitt die GPR43 Expression in lumennahen Krypten signifikant höher war als in den basalen Anteilen. Zum einen besteht in den oberflächlichen Kryptenanteilen eine anatomische Nähe zum Lumen und somit auch zu den SCFA. Zum anderen ist durch die längere Transitzeit im Colon ausreichend Zeit für eine Hochregulation der GPR43 Expression. Gleichzeitig ist bei der Übertragung dieser Ergebnisse auf die vorliegende Arbeit zu berücksichtigen, dass die Transitzeit bei Patienten mit symptomatischer GvHD durch Diarrhöen verändert ist. Um abschließend zu beweisen, dass die GPR43 Expression durch die Passagezeit beeinflusst wird, benötigt es eine vergleichende Analyse der SCFA Konzentrationen der einzelnen Darmabschnitte nach ASCT. Zur Vermeidung von Verzerrungen kann dies zunächst im murinen Modell unter standardisierter Ernährung erfolgen.

Die GPR43 Expression im Epithel der Krypten lieferte keine signifikanten Unterschiede, zeigte jedoch den gleichen Trend in der Verteilung wie das Stroma. Demnach war die Proteinexpression in den Krypten des Colons und des Duodenums höher als im Ileum. Daher können obige Überlegungen auch hier Anwendung finden.

Die Proteinexpression des Zottenepithels unterschied sich sowohl im Ileum als auch im Duodenum von der des Kryptenepithels. Im Zwölffingerdarm zeigte sich eine signifikante Zunahme der Proteinexpression im Zottenepithel verglichen zum Epithel in den Krypten. Erklärbar ist dies durch ein unterschiedliches Ausmaß der immunologischen Prozesse entlang des Epithels. Aus Untersuchungen von Patienten mit Autoimmungastritis weiß man, dass in der ersten Phase der Inflammation Plasmazellen und Lymphozyten in die Mucosa einwandern. Dabei nimmt die Anzahl dieser Immunzellen von luminal nach basal ab. Diese Analogie untermauert den Gedanken, dass sich autoimmunologische Prozesse intestinal primär oberflächennah abspielen (83). Deckungsgleich hierzu wurden in oberflächlichen Kryptenanteilen des Colons mehr GPR43 tragende Zellen detektiert als in den basalen Abschnitten.

Im Ileum hingegen überstieg die Proteinexpression des Kryptenepithels die des Zottenepithels. Möglicherweise wird die GPR43 Expression im Streckenverlauf des GIT auf unterschiedliche Weise induziert und hat eine divergente Funktion in der Regulation der Inflammation im

Rahmen der GvHD. Denkbar ist auch, dass sich die Kompartimente Stroma und Epithel bei der Eindämmung der Inflammation gegenseitig beeinflussen.

Diese Überlegungen können zudem die signifikant stärkere Proteinexpression im duodenalen Zottenepithel verglichen zum Ileum erklären. Zum Beweis benötigt es weiterführende Analysen zur detaillierten Induktion der Expression je nach Darmabschnitt und Ausprägung der GvHD.

Die Tatsache, dass es im Epithel der Krypten keinen signifikanten Unterschied zwischen Colon, Ileum und Duodenum gibt, im Epithel der Zotten hingegen schon, könnte mit dem physiologischen Konzentrationsgefälle an Mikroben und ihren Metaboliten entlang des Epithels zusammenhängen. Es ist naheliegend, dass die in das Darmlumen hineinragenden, beweglichen Zotten eine stärkere Exposition zum Darminhalt und seinem Mikrobiom haben als die starren Krypten. Diese liegen anatomisch vom Lumen abgewandt und dadurch geschützt.

4.2 Veränderung der GPR43 Expression durch den Schweregrad der GvHD

Im Vergleich zu Proben vor ASCT konnten in Biopsien nach der Transplantation signifikant mehr GPR43 positive Stromazellen detektiert werden. Auch innerhalb der postTx Proben nahm die Proteinexpression mit zunehmenden Schweregrad der GvHD zu. Biopsien mit Lerner Grad 3 und 4 zeigten sogar eine signifikant höhere Expression als Proben ohne nachweisbarer GvHD. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der molekularen Analyse von GPR43 mittels PCR von Ghimire et al. Diese Arbeit unterteilte die Biopsien nach ihrem histologisch definiertem Schweregrad in niedrige Lerner Grade (keine GvHD und Lerner 1) und hohe (Lerner 2 - 4). Dabei konnte aus Proben der zweiten Gruppe signifikant mehr RNA isoliert werden (64).

Für die zunehmende Proteinexpression bei steigendem Schweregrad der GvHD gibt es manifolde Erklärungen. Untersuchungen an humanen und murinen Zellkulturen ergaben eine Zunahme der FFAR2 Expression auf Monozyten und Makrophagen ausgelöst durch den Kontakt zu LPS (84). Da bei zunehmender GvHD das Epithel vermehrt geschädigt wird, können mehr LPS und andere PAMPs in die Lamina propria eindringen, in welche inflammationsbedingt anschließend zahlreiche Monozyten und Makrophagen einwandern. Damit lässt sich die erhöhte Anzahl GPR43 positiver Stromazellen nach ASCT und mit zunehmenden Schweregrad der GvHD erklären. Darüber hinaus demonstrieren zahlreiche Untersuchungen den GPR43 abhängigen antiinflammatorischen Effekt von SCFA. Die Forschungsarbeit von Ang et al.

detektierte eine Abnahme der monozytären Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 α und IL-1 β unter der Gabe von Acetat (84). SCFA führen zudem in mononukleären Zellen des Blutes zu einer Abnahme der LPS induzierten TNF α und IFN γ Sekretion (85). Über GPR43 kann Butyrat ferner die Aktivierung, Proliferation, IFN γ und IL-17 Sekretion von CD4 $^{+}$ T-Zellen hemmen (86). Auch die Produktion des antiinflammatorisch wirksamen IL-10 durch Th1 Zellen konnte durch SCFA in einem GPR43 abhängigen Weg gesteigert werden (87). All diese Untersuchungen implizieren eine kompensatorische Hochregulierung von GPR43 im intestinalen Stroma als Antwort auf den durch die GvHD verursachten Gewebeschaden und den daraus resultierenden Zytokinsturm. Im Umkehrschluss ergibt sich dadurch die Möglichkeit einer therapeutischen Gabe von SCFA bei Patienten mit GvHD. Zur Applikation von SCFA bei Patienten mit GvHD gibt es bisher keine Studien.

Die Auswertung des Zottenepithels zeigte ebenfalls mehr FFAR2 in den postTx Proben. Die soeben aufgeführten Effekte von GPR43 können auch hier als mögliche Erklärung herangezogen werden.

Im Epithel der basalen und oberflächlichen Krypten hingegen unterschied sich die GPR43 Expression in postTx und präTx Proben nicht signifikant voneinander. Tendenziell nahm die Anzahl GPR43 positiver Epithelzellen nach der ASCT jedoch ab. Dies deckt sich mit der bereits erwähnten Analyse von Fujiwara et al. Hier kam es im murinen Modell zur Abnahme der GPR43 Expression auf intestinalen Epithelzellen nach ASCT (65).

In Zusammenschau deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass der GPR43 Rezeptor im Stroma anderen Regulationsmechanismen unterliegt als im Epithel. Auch bei anderen autoimmunen Prozessen wie der Zöliakie laufen im Epithel der Zotten und Krypten und in der Lamina propria unterschiedliche Prozesse ab. Durch die Erkrankung erhöht sich die Anzahl intraepithelialer Lymphozyten. Während es initial zu einer Hypertrophie der Krypten kommt, flachen die Zotten im Verlauf der Erkrankung ab und atrophieren. In die Lamina propria wandern vermehrt Plasmazellen und Lymphozyten ein. Die Bedeutung der isolierten Betrachtung der einzelnen Kompartimente wird durch die histologische Einteilung nach Marsh-Oberhuber nochmals unterstrichen (88). Eingangs wurden bereits die pro- und antiinflammatorischen Effekte des GPR43 Rezeptors und die dazugehörigen Signalwege beleuchtet. Die zelluläre Zusammensetzung von Zotten und Krypten unterscheidet sich maßgeblich. Das Zottenepithel besteht überwiegend aus Mikrovilli tragenden Enterozyten, dazwischen finden sich vereinzelt Becherzellen und eine geringe Anzahl enteroendokriner Zellen. Das Epithel der

Krypten hingegen setzt sich aus Paneth-Körnerzellen, multipotenten Stammzellen, zahlreichen enteroendokrinen Zellen und Becherzellen zusammen (89). Zu prüfen ist demnach, über welche Signalwege der GPR43 Rezeptor in den verschiedenen Zellen aktiv ist und durch welche Kommunikationswege seine Expression reguliert wird. Mögliche Unterschiede zwischen den Zellentitäten liefern eine Erklärung für die hier vorliegenden Ergebnisse.

Im Zuge dessen ist auch die wechselseitige Beeinflussung der GPR43 Expression zwischen den Kompartimenten Stroma und Epithel zu überprüfen. Epithelzellen haben als erste Kontakt zu den LPS und SCFA. Dadurch entsteht möglicherweise eine Rückkopplung zum Stroma mit dem Ziel die beginnende Invasion von Mikroben und die damit verbundene Entzündung zu begrenzen. Umgekehrt könnten auch eingewanderte Immunzellen des Stromas über Mediatoren die Expression von GPR43 im Epithel beeinflussen. Um die genauen molekularen Signalwege und Wechselwirkungen der Kompartimente zu ergründen, kann man sich spezieller in vitro Organ-on-Chip Systemen bedienen. Damit ist nicht nur die Nachahmung der anatomischen Zellanordnung gegeben, sondern auch die Mikroumgebung veränderbar. Folglich lassen sich gezielt Erkrankungsbilder reproduzieren, Mikrobiomveränderungen erzeugen und die jeweiligen Auswirkungen auf Proteinexpression und Zellinteraktionen genauestens analysieren (90).

4.3 Anstieg der GPR43 Expression im zeitlichen Verlauf nach ASCT im Stroma

Die Konditionierungstherapie und die Transplantation fremder Stammzellen induzieren multiple Veränderungen im Körper und gehen mit Gewebeschäden einher. Neben den immunologischen Prozessen kommt es auch zu einer veränderten Zusammensetzung des Mikrobioms. Chiusolo et al. fanden 15 Tage nach ASCT in den Stuhlproben ihrer Patienten eine Zunahme von Vertretern der Gattung *Bacteroides* und eine reduzierte Anzahl an *Firmicutes* im Vergleich zum Ausgangswert vor der Konditionierungstherapie. Entwickelten die Patienten eine intestinale GvHD, zeigte sich hingegen wieder eine Reduktion der *Bacteroides*, während *Firmicutes* und *Proteobacteria* zunahmen (91). In einer anderen Studie reduzierte die ASCT ebenfalls die Menge einiger Vertreter der *Firmicutes*, führte jedoch gleichzeitig zum Anstieg von Enterokokken (44). Infolgedessen ändert sich auch die Zusammensetzung der vom Mikrobiom produzierten Metabolite im zeitlichen Verlauf nach ASCT. In pädiatrischen Stuhlproben nach ASCT waren Butyrat und Propionat an Tag 14 nach der Transplantation deutlich erniedrigt (92). Bisher existieren nur wenige, lediglich über kurze Zeitverläufe reichende Analysen des

Mikrobioms und seiner Metabolite nach ASCT. Bansal et al. fanden eine erniedrigte Diversität des Mikrobioms an Tag 14 und 28 nach Transplantation. Erst nach 100 Tagen war die Zusammensetzung des Mikrobioms vergleichbar mit der vor ASCT (93). Um herauszufinden, wie sich diese Veränderungen auf die GPR43 Expression auswirken, wurden die hier analysierten Proben angelehnt an die Phasen des Engraftments in verschiedene Gruppen eingeteilt (71).

In der vorliegenden Arbeit fand sich im Stroma und Epithel der Zotten nach ASCT stets eine höhere Menge GPR43 als in präTx Proben. In der frühesten Gruppe (Tag 0 - 30) war die gesteigerte Proteinexpression der Stromazellen signifikant. Da der GPR43 Rezeptor maßgeblich zur Entstehung und dem Erhalt der intestinalen Epithelbarriere beiträgt (62 - 64), ist zu vermuten, dass als Antwort auf die Konditionierungstherapie und den dadurch entstandenen Schaden vor allem während des „pre-engraftments“ vermehrt GPR43 im Zottenepithel exprimiert wird. Die ins Lumen ragenden und beweglichen Zotten werden kontinuierlich vom Darminhalt umgeben und haben dadurch eine wichtige Rolle in der Barrierefunktion.

Der GPR43 Rezeptor wird zudem von diversen Immunzellen exprimiert und ist unter anderem an der Rekrutierung von Neutrophilen beteiligt (59). Die Anzahl neutrophiler Granulozyten erholt sich nach der ASCT im „pre-engraftment“ langsam. Durch eine erhöhte GPR43 Expression im Stroma in den ersten 30 Tagen versucht der Körper womöglich, vermehrt Neutrophile anzulocken, um im Rahmen der gestörten Barrierefunktion Erreger abzuwehren. Sobald die Neutropenie überstanden ist und die Inflammation durch eine ausreichende Zellzahl begrenzt wurde, ist es nicht mehr notwendig, dass weitere Neutrophile in die Mucosa einwandern. Daher wird in den späteren Gruppen weniger GPR43 exprimiert und die Unterschiede sind nicht mehr signifikant. Auch denkbar ist eine negative Rückkopplung zwischen der Anzahl von Neutrophilen und der GPR43 Expression. Durch die induzierte Neutropenie wird dieser Mechanismus unterbrochen und sobald sich die Zellzahl erholt hat, kommt es reaktiv zu einer Abnahme der GPR43 Expression.

Im Epithel der Krypten fanden sich nach ASCT zu keinem Zeitpunkt höhere Werte als vor der Transplantation. Die Expression sank nach der ASCT sogar leicht ab oder blieb unverändert. Die bereits erwähnte anatomische Distanz der Krypten zum Darmlumen und die Anwesenheit anderer Zellentitäten können auch hierfür als Erklärung herangezogen werden. Zudem vorstellbar ist, dass sich einige Bakterienspezies bevorzugt in bestimmten Bereichen des Epithels aufhalten. *Helicobacter pylori* favorisiert im Magen beispielsweise den Schleimhautmucus der oberflächlichen Zellen und ist seltener im Mucus der Drüsenzellen zu finden (94). Analog dazu

ist denkbar, dass sich SCFA produzierende Spezies lokalisationsspezifisch entlang der Zotten und Krypten ansiedeln und somit durch die ASCT und GvHD unterschiedlich beeinflusst werden. In Abhängigkeit davon variiert die GPR43 Expression als Folge des jeweiligen Metabolitenangebots. Für definitive Aussagen braucht es spezifische Färbungen für einzelne SCFA produzierende Bakterienspezies, welche eine Lokalisationsbestimmung möglich machen und somit Rückschlüsse auf ein Konzentrationsgefälle von SCFA entlang des Epithels und Veränderungen durch die ASCT erlauben.

Zur besseren Einordnung des Zusammenhangs zwischen dem Biopsiezeitpunkt und der GPR43 Expression können ergänzend longitudinale Untersuchungen beitragen. Indem der gleiche Patient zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht wird, werden interindividuelle Verzerrungen vermieden. Dadurch können mehr Informationen über die Bedeutung des Zeitpunktes nach ASCT als Einflussfaktor für die Expression von GPR43 gewonnen werden. Zudem können Rückschlüsse gezogen werden, inwiefern die Proteinexpression im zeitlichen Verlauf die Entstehung einer GvHD beeinflusst.

4.4 Veränderung der GPR43 Expression durch den Einsatz von Steroiden

Zur Auswirkung von Steroiden auf den GIT und das vorhandene Mikrobiom existieren konträre Forschungsergebnisse. Im murinen Organismus konnte eine vermehrte Translokation von Bakterien in mesenteriale Lymphknoten nach intraperitonealer Injektion von Dexamethason beobachtet werden. Dies impliziert eine durch Steroide ausgelöste zunehmende Permeabilität des Darmepithels, wodurch vermehrt Bakterien aus dem Darmlumen in den Körper eindringen können (95). Passend dazu konnte durch die Gabe von Dexamethason eine Abnahme der Muc2 Genexpression im proximalen Colon von Mäusen beobachtet werden. Bei dem kodierten Protein handelt es sich um ein Mucin, welches an der Bildung der Schleimschicht beteiligt ist und somit maßgeblich zur Integrität der Darmbarriere beiträgt (96). Im Widerspruch zu diesen Beobachtungen steht eine in vitro Zellkulturuntersuchung von Boivin et al. Durch die Gabe von Glucocorticoiden wurde die TNF α abhängige Durchlässigkeit von Tight junctions im intestinalen Epithel blockiert und die Barrierefunktion damit verstärkt (97).

In der hier vorliegenden Arbeit wiesen Patienten, die täglich mit mehr als 20 mg Steroiden behandelt wurden, tendenziell mehr GPR43 exprimierende Stromazellen auf. Gleichzeitig

zeigte diese Gruppe in den untersuchten Dünndarmproben eine verminderte Proteinexpression im Epithel der Zotten und oberflächlichen Krypten.

Aufgrund der bereits beschriebenen Untersuchung von Alverdy et al. und Huang et al. im Tiermodell ist es naheliegend, dass die Gabe höherer Steroiddosen auch im humanen Organismus zu einer verminderten Barrierefunktion des Darms führt. Die Translokation von Bakterien ins Stroma führt zu einer Entzündungsreaktion. Denkbar ist, dass als Gegenregulation mehr GPR43 exprimiert wird, um einerseits die Inflammation zu begrenzen und andererseits die verlorene Darmintegrität wiederherzustellen. Im Widerspruch dazu steht jedoch die verminderte GPR43 Expression des Zottenepithels nach Steroidgabe. Möglicherweise kommt es als Folge der defekten Schleimhautbarriere zu einer Störung der Kommunikation zwischen den Epithelzellen, wodurch physiologische Regulationsmechanismen wie die GPR43 Expression beeinträchtigt sind. Um diese Vermutung zu bestätigen, braucht es konkrete Untersuchungen der humanen Zellinteraktion auf molekularer Ebene nach der Gabe von Steroiden.

Zusätzlich denkbar ist, dass es durch den Einsatz von Steroiden zu einer Veränderung der Zusammensetzung und Diversität des Mikrobioms kommt und dadurch die Anzahl von SCFA produzierenden Spezies wie Bacteroidetes und Firmicutes (50) abnimmt. Auch hier finden sich in der aktuellen Literatur widersprüchliche Ergebnisse. Die Dexamethason Applikation führte im murinen Modell einerseits zu einer Zunahme von Bifidobakteriales (Ordnung des Phylums Aktinobakteria) und Lactobacillales (Phylum Firmicutes) (96). Tourret et al. konnten ebenfalls eine Zunahme von Vertretern der Firmicutes durch Prednisolon bei Mäusen beobachten. Andererseits fand sich im Stuhl der behandelten Tiere eine reduzierte Anzahl von Vertretern der Bacteroidetes (98). Letztere nahmen neben verschiedenen Vertretern der Klasse Clostridia (Phylum Firmicutes) auch in einer Analyse von Zhang et al. nach Steroidgabe ab. Ferner untersuchte diese Arbeit auch die Veränderung der mikrobiellen Metabolite wie SCFA durch die Therapie mit Prednisolon. Die Menge an SCFA nahm im Vergleich zur Kontrollgruppe, die keine Steroide erhielt, ab (99). Unter der Annahme, dass sich all die Ergebnisse aus dem murinen Modellen auch auf den Menschen übertragen lassen, ist die verminderte GPR43 Expression im Epithel der Zotten und oberflächlichen Krypten von Patienten mit höheren Steroiddosen erklärbar. Um dies abschließend zu beweisen, benötigt es eine Analyse der Zusammensetzung und Veränderung des humanen Mikrobioms und seiner Metabolite nach Applikation von Steroiden.

Vor allem Patienten mit einem Risiko für die Entwicklung einer GvHD oder bereits diagnostizierter GvHD werden mit Steroiden behandelt. Daher ist bei der Korrelationsanalyse für die Steroiddosis und die Expression von GPR43 die GvHD als wichtiger Einflussfaktor zu berücksichtigen. Um den komplexen Zusammenhang zwischen der Gabe von Steroiden, der Proteinexpression und anderen Einflussfaktoren verstehen zu können, eignet sich bei Erhöhung der Fallzahl eine multivariate Varianzanalyse. Alternativ kann ein Tiermodell verwendet werden. Dieses erlaubt eine Analyse der GPR43 Expression unter standardisierten Steroiddosen. Gleichzeitig können weitere mögliche Einflussfaktoren wie Ernährung oder Mikrobiomzusammensetzung vereinheitlicht werden.

4.5 Veränderung der GPR43 Expression durch Antibiotika

Zur Vermeidung eines neutropenischen Fiebers werden viele Patienten vor und nach ihrer ASCT prophylaktisch oder therapeutisch mit Antibiotika behandelt. Diverse Forschungsteams konnten zeigen, dass der Einsatz von Breitbandantibiotika die Zusammensetzung des Mikrobioms und die GvHD assoziierte Mortalität beeinflusst. Letztere nahm beispielsweise zu, wenn die Patienten mit Piperacillin/Tazobactam oder Imipenem/Cilastatin behandelt wurden. Zurückzuführen ist dies am wahrscheinlichsten auf die ausgeprägte antibakterielle Wirkung dieser Antibiotika auf obligate Anaerobier (100). Dazu zählen unter anderem zahlreiche Spezies, die SCFA produzieren. Passend dazu zeigten Meedt et al., dass die Anzahl Butyrat-produzierender Spezies nach der Gabe von Ciprofloxacin und Metronidazol abnahm. Die Menge dieser Produzenten wirkte sich auch auf die Schwere der GvHD und das Risiko für TRM aus. So war die GvHD umso stärker ausgeprägt, je geringer die mikrobiologische Diversität war. Zudem ging eine niedrige Anzahl Butyrat-produzierender Bakterien 30 Tage nach ASCT mit erhöhter TRM einher (101).

Weber et al. konnten zeigen, dass neben der Wahl der Substanzklasse auch der Verabreichungszeitpunkt entscheidend für das Überleben der Patienten ist. Erhielten die Patienten Rifaximin, das nur geringfügig intestinal resorbiert wird, zeigte ihr Mikrobiom eine höhere Diversität als die Gruppe, die mit systemisch wirksamen Antibiotika behandelt wurde. Dazu zählten neben Piperacillin/Tazobactam auch Ciprofloxacin/Metronidazol, Meropenem/Vancomycin und Ceftazidim (72). Eine verringerte Vielfalt des Mikrobioms ist wie bereits erwähnt ein unabhängiger Risikofaktor für die Mortalität nach ASCT (46). Bei Patienten, die bereits vor ihrer ASCT Antibiotika erhielten, fanden sich niedrigere 3-IS Werte, eine reduzierte Zahl kommensaler

Clostridien und eine erhöhte TRM im Vergleich zur Gruppe, die erst nach ASCT mit Antibiotika behandelt wurde (102). Dies führte zu einer sehr strengen Indikationsstellung für die genannten Breitspektrumantibiotika am Transplantationsstandort Regensburg und zu einer bevorzugten Therapie mit Rifaximin.

Die Expression von GPR43 hängt maßgeblich von der Diversität des Mikrobioms ab und kann folglich durch den Einsatz von Breitbandantibiotika beeinflusst werden. Demnach ist es wenig überraschend, dass die Menge der isolierten RNA des FFAR2 durch die Gabe von Breitbandantibiotika sank (64). Daraus nicht ableitbar ist jedoch, ob die GPR43 Expression in Stroma und Epithel gleichermaßen von Antibiotika beeinflusst wird. Dies wurde in der hier vorliegenden Arbeit genauer untersucht, indem die Biopsien getrennt nach Art der erhaltenen Antibiose zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme betrachtet wurden. Da vor allem die systemisch wirksamen Antibiotika zu Veränderungen des Mikrobioms und einer zunehmenden Mortalität führen, wurden alle Patienten, die mit Cephalosporinen, Carbapenemen, Piperacillin/Tazobactam oder Linezolid behandelt wurden, zu einer Gruppe zusammengefasst. Als Vergleich dienten Patienten, die entweder ohne Antibiotika oder lediglich mit Rifaximin therapiert wurden. Wenngleich die statistische Auswertung hier keine signifikanten Unterschiede detektierte, zeigt sich im Epithel der Krypten tendenziell eine Abnahme der GPR43 positiven Zellen unter den oben beschriebenen systemisch wirksamen Antibiotika. Im Gegensatz dazu stieg die Proteinexpression im Stroma und dem Zottenepithel in dieser Gruppe. Hier könnte man vermuten, dass vor allem Patienten mit höheren Lerner Graden infolge von Komplikationen mit Antibiotika behandelt wurden und die GPR43 Expression allein aufgrund der GvHD Ausprägung – unabhängig von den verabreichten Antibiotika – höher lag. Da die Verteilung der Lerner Grade zwischen den beiden Gruppen (keine Antibiotika: 24,4 % keine GvHD; 43,9 % Lerner 1 und 2; 31,7 % Lerner 3 und 4; mit Antibiotika: 18,2 %, 45,4 % und 36,4 %) vergleichbar ist, bleibt offen, weshalb die Verabreichung von Antibiotika die Expression von GPR43 im Stroma und Epithel unterschiedlich beeinflusst. Hilfreich kann hier ebenfalls eine multivariate Varianzanalyse bei höheren Fallzahlen sein. Denkbar ist auch, dass neben der Menge an SCFA auch noch andere bisher unbekannte Metabolite oder Botenstoffe an der Expression von GPR43 beteiligt sind. Abzuklären bleibt dann, inwieweit diese Faktoren durch die Gabe von Breitbandantibiotika beeinflusst werden.

Da die Gabe von Antibiotika die Zusammensetzung des Mikrobioms ändert (44) und somit auch die Produktion bestimmter immunmodulatorischer Metabolite, welche die Pathophysiologie der GvHD maßgeblich beeinflussen, scheint es sinnvoll die GPR43 Expression direkt mit

diesen Metaboliten zu korrelieren. Thiele Orberg et al. identifizierten eine Kombination aus immunmodulatorischen Metaboliten, welche sich zur Risikoabschätzung von Patienten mit aGvHD eignet. Je mehr SCFA, verzweigtkettige Fettsäuren und Typ-I-IFN Signal induzierende Stoffwechselprodukte aus dem Stuhl isoliert werden konnten, desto geringer waren die Rückfallraten und das Mortalitätsrisiko. Die Anwesenheit der genannten Metabolite korrelierte dabei mit Bakterien der Familie der Lachnospiraceae und Oscillospiraceae sowie den damit verbundenen Bakteriophagen. Die Verabreichung von Antibiotika führte zu einer Abnahme der Metabolitendichte (103). Durch die Korrelation der aufgeführten Stoffwechselprodukte mit der GPR43 Expression könnten einerseits Rückschlüsse gezogen werden, inwieweit bestimmte Mikrobiomveränderungen die GPR43 Expression beeinflussen. Andererseits kann dadurch auch indirekt der Einfluss von Antibiotika auf die Proteinexpression analysiert werden.

4.6 Positiver Zusammenhang der GPR43 Expression mit FoxP3 positiven Zellen und fehlender Zusammenhang mit 3-IS Werten im Urin

In der bisherigen Interpretation der Ergebnisse wurde davon ausgegangen, dass die GPR43 Expression von der Diversität des Mikrobioms abhängt. Um herauszufinden, ob und wie die Zusammensetzung des Mikrobioms die GPR43 Expression im Darm beeinflusst, wurden die erhobenen Daten mit den 3-IS Werten korreliert. Dies ist ein aus dem Urin ermittelter Marker, der Rückschlüsse auf die Komposition des Mikrobioms zulässt. In den ersten beiden Wochen nach der ASCT sinken die 3-IS Spiegel signifikant ab. Dieser Zeitraum entspricht der Phase der Neutropenie, in der Antibiotika sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch eingesetzt werden. Am deutlichsten ist die Abnahme bei Patienten zu beobachten, die an einer intestinalen GvHD leiden und mit Antibiotika behandelt wurden. Ab der dritten Woche nach der Transplantation steigen die 3-IS Werte an, erreichen aber auch 100 Tage nach der ASCT nicht das Ausgangslevel (44).

Für die Korrelation mit 3-IS wurden nur Urinproben eingeschlossen, die im Zeitraum von sieben Tagen vor bis 14 Tage nach der Biopsieentnahme gewonnen wurden. Durch diesen relativ ausgedehnten Zeitraum sind die Ergebnisse der Korrelationsanalyse unter Vorbehalt zu bewerten. Grund dafür ist, dass sich die Zusammensetzung des Mikrobioms durch multiple Einflussfaktoren wie Ernährung, Medikamente, Stress oder Erkrankungen innerhalb kurzer Zeit verändern kann. So führt beispielsweise die Aufnahme von Ballaststoffen oder Joghurt bereits nach einem Tag zu deutlichen Modifikationen. (104). Die Aussagekraft der Korrelation von 3-IS

Werten mit der GPR43 Expression könnte in zukünftigen Arbeiten durch eine Urinanalyse am gleichen Tag der Biopsieentnahme erhöht werden.

Es fand sich weder im Stroma noch im Epithel ein Zusammenhang zwischen der GPR43 Expression und den 3-IS Werten. Das 3-IS ist ein Marker für die Anwesenheit bestimmter kommensaler Bakterien aus der Klasse der Clostridia, welche zu den SCFA-Produzenten gerechnet werden. Daneben existieren jedoch noch andere Bakterienklassen, die SCFA produzieren und nicht durch die Bestimmung von 3-IS erfasst werden (44, 50). Daher erscheint es sinnvoll, eine Korrelationsanalyse der hier erhobenen Daten mit anderen Werten vorzunehmen, die präzisere Rückschlüsse auf die Anwesenheit und Menge der SCFA produzierenden Bakterien geben. Dafür käme beispielsweise die Bestimmung der Kopienanzahl der Butyryl-Coenzym A:Acetat Coenzym A-Transferase (BCoAT) mittels PCR aus Stuhlproben in Frage. Dieses Enzym katalysiert einen der letzten Schritte bei der bakteriellen Produktion von Butyrat und erlaubt somit einen Rückschluss auf die Menge der produzierenden Spezies (101).

Die SCFA abhängige Induktion von Treg konnte bisher in mehreren Tiermodellen nachgewiesen werden. So sind die SCFA Propionat, Butyrat und Acetat in unterschiedlichem Ausmaß imstande, über einen GPR43 abhängigen Weg die Anzahl von Treg im Colon zu steigern und die extrathymische de novo Synthese von regulatorischen T-Zellen zu induzieren (61, 105, 106). Wie bereits erwähnt, tragen Treg mithilfe ihrer antiinflammatorischen Wirkung maßgeblich zur Gegenregulation der GvHD bei. Ihre Anzahl eignet sich darüber hinaus als prognostischer Parameter für Patienten, die unter einer GvHD leiden. Um herauszufinden inwieweit SCFA die Treg Population beeinflussen, wurde eine Korrelationsanalyse der erhobenen Daten im Stroma mit den FoxP3 positiven Zellen durchgeführt. FoxP3 dient als Marker für die Treg (24).

Dabei zeigte sich eine stärkere Expression von FoxP3 mit zunehmender Zahl GPR43 positiver Stromazellen. Dieser Zusammenhang stellte sich als statistisch signifikant dar. Interessant war die Veränderung dieser Korrelation bei Betrachtung von Subgruppen in Abhängigkeit von verabreichten Antibiotika und Steroiden. Bei Patienten ohne Antibiotika verstärkte sich die Korrelation zwischen FoxP3 und GPR43, wohingegen in der Gruppe mit Antibiotika kein Zusammenhang mehr zwischen der Anzahl GPR43 und FoxP3 positiver Stromazellen gefunden wurde. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus der PCR-Analyse von GPR43 und FoxP3 von Ghimire et al. Einerseits wurde eine positive Korrelation zwischen extrahierter GPR43 und FoxP3 mRNA festgestellt. Andererseits wurde die Antibiotikagabe als unabhängiger

Risikofaktor für die Reduktion von Treg und die GPR43 Expression identifiziert. Durch die von Antibiotika induzierte Mikrobiomveränderung werden weniger SCFA produziert, folglich wird weniger GPR43 exprimiert und die Interaktion zwischen SCFA, GPR43 und FoxP3 positiven Treg gestört (64).

Ähnliche Ergebnisse lieferte die erneute Analyse in Abhängigkeit von der Steroiddosis. In der Subgruppe mit weniger als 20 mg Steroiden verstärkte sich die Korrelation, wohingegen bei Patienten mit mehr als 20 mg kein Zusammenhang mehr nachweisbar war. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die verabreichten Medikamente zu einer Dysbiose des Mikrobioms führen und gleichzeitig die Funktion wichtiger Zellen für die Immunregulation beeinträchtigen. Um herauszufinden über welche Signalwege Antibiotika und Steroide die Interaktion zwischen GPR43 und Treg beeinflussen, bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen der molekularen Mechanismen.

4.7 Fehlender Zusammenhang der immunhistochemischen Daten mit der PCR-Analyse

Ghimire et al. untersuchten die intestinale GPR43 Expression mittels quantitativer Echtzeit-PCR (64). Da die PCR-Analyse lediglich die genetische Voraussetzung zur GPR43 Expression beweist, nicht aber von welchem Zellkompartiment und in welcher Menge der Rezeptor dort exprimiert wird, wurde die FFAR2 Expression in dieser Arbeit mittels immunhistochemischer Färbung nochmals untersucht. Die PCR-Daten wurden im Labor der Inneren Medizin III des Uniklinikums Regensburg bestimmt. Dafür wurden den Patienten endoskopisch Proben entnommen. Eine Probe wurde für die PCR-Analyse verwendet, die andere für die histopathologische Aufarbeitung. Somit fanden die beiden Untersuchungen technisch bedingt nicht an der identischen Probe statt. Beim Vergleich des makroskopischen Bildes in der Endoskopie und dem histologischen Befund stimmen die GvHD Schweregrade in 71 % überein (107). Aufgrund dieser Diskrepanz und der Tatsache, dass die GvHD assoziierten Veränderungen ungleichmäßig über das Intestinum verteilt sind, empfiehlt die American Society for Gastrointestinal Endoscopy die Entnahme von mindestens vier Biopsien aus den jeweiligen Darmabschnitten (108). Die inhomogene Affektion des Darms bei GvHD konnte in einer systematischen Aufarbeitung eines Ileum-Resektats aufgezeigt werden (109). Folglich ist bei dem Vergleich der beiden Methoden zu berücksichtigen, dass die Menge der GPR43 exprimierenden Zellen in den

jeweiligen Proben voneinander abweichen kann, obwohl sie von benachbarten Schleimhautarealen entnommen wurden.

Bei beiden Methoden wurde eine verstärkte Expression des GPR43 Rezeptors mit zunehmenden Schweregrad der GvHD beobachtet. In der immunhistochemischen Analyse war dies jedoch nur im Stroma und im Epithel der Zotten zu beobachten. Auch bei der Betrachtung der einzelnen Darmabschnitte zeigte sich eine Divergenz der beiden Methoden. Mit der PCR wurde im Ileum signifikant mehr GPR43 isoliert als im Colon und Duodenum. Diese Arbeit detektierte hingegen sowohl im Stroma als auch im Epithel der Zotten und Krypten des Ileums am wenigsten positive Zellen. In Anbetracht dieser Abweichungen überraschte es nicht, dass bei der Korrelationsanalyse der beiden Datensätze weder im Stroma noch im Epithel der Krypten und Zotten ein Zusammenhang der beiden Methoden gefunden wurde. Möglicherweise liegt dies an der kleinen Anzahl an Biopsien (Stroma: N = 42; Krypten: N = 40; Zotten: N = 12), von denen neben der immunhistochemischen Färbung zusätzlich Daten aus der PCR-Analyse vorlagen. Eine größere Fallzahl erlaubt eine genauere Aussage zur Korrelation der beiden Methoden und kann gegebenenfalls Zusammenhänge in den einzelnen Darmabschnitten aufzeigen.

Eine denkbare Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse wäre auch, dass bei der PCR ein Genabschnitt untersucht wurde, der die basenkodierte Information für das Epitop, an den die Antikörper in der immunhistochemischen Analyse binden, nicht enthielt. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass die Epitope für die Antikörper im Zellverband des histologischen Präparats weniger gut zugänglich sind. In der PCR hingegen wird die RNA aus den Zellen isoliert und somit optimal zugänglich für die Primer gemacht. Abschließend lässt sich festhalten, dass anhand der PCR-Analyse keine Rückschlüsse auf die tatsächliche in vivo Expression von GPR43 gezogen werden können. Eine mögliche Erklärung hierfür können epigenetische Veränderungen sein, die zu einer Modifikation der Proteinexpression auf DNA-Ebene führen. Diese spiegeln nicht die tatsächliche GPR43 Expression wider, fließen aber in die PCR-Ergebnisse mit ein. Am ehesten vergleichbar sind die Resultate der PCR-Analyse mit den positiven Stromazellen, die immunhistochemisch mithilfe des Antikörpers LS-A5699 detektiert wurden.

In der aktuellen Literatur wird vor allem die Expression auf Epithelzellen und Makrophagen für die Beeinflussung der GvHD verantwortlich gemacht (64, 65). In dieser Arbeit fanden sich hauptsächlich Unterschiede bei der Betrachtung der Stromazellen, wohingegen die Ergebnisse der Epithelzellen, vor allem in den Krypten weniger aussagekräftig waren. Dies lässt vermuten, dass vor allem Stromazellen die Ausprägung und den Verlauf der GvHD in einem GPR43

abhängigen Weg beeinflussen. Um herauszufinden, welche Zellentitäten beteiligt sind, bedarf es weiterer Untersuchungen, die sich mit der exakten Spezifikation der GPR43 exprimierenden Stromazellen befassen. Als geeignete Methode kommen Doppelfärbungen in Frage. Voraussetzung dafür ist, dass die angefärbten Zellbestandteile charakteristisch einer bestimmten Zellart zuzuordnen sind. Möchte man verschiedene Antigene derselben Zelle sichtbar machen, wird das Ergebnis am aussagekräftigsten, wenn die unterschiedlichen Antigene nicht im gleichen Zellkompartiment liegen. Das bedeutet, dass sich ein Antikörper idealerweise gegen zytoplasmatische oder membranständige Proteine richten sollte und der andere gegen nukleäre Antigene. Bislang existieren nur wenige Antikörper für nukleäre Proteine, vorrangig Transkriptionsfaktoren. Einer davon ist der bereits erwähnte Antikörper gegen FoxP3. In einer Doppelfärbung könnten damit GPR43 exprimierende Treg identifiziert werden. Für andere Zellentitäten ist die Immunfluoreszenz zur Identifikation besser geeignet, da hier mit deutlich reduziertem Arbeitsaufwand Antigene des gleichen Zellkompartiments zuverlässig markiert werden können (110).

Eine alternative Option stellt die Multiplex-Chip-Technologie dar. Dabei wird der histologische Schnitt mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper gefärbt, gescannt und der Farbstoff ohne Veränderung oder Schädigung des Gewebes wieder entfernt. Im Anschluss erfolgt analog die Visualisierung der nächsten antikörpermarkierten Struktur. Die hieraus entstandenen Bilder können im Anschluss übereinander projiziert werden und erlauben im Hinblick auf die hier vorliegende Arbeit neben der Darstellung der GPR43 Expression auch die Identifikation der jeweiligen Zelle. Neben der guten Auflösung der einzelnen Signale, der Reduktion von Artefakten und der Möglichkeit der automatischen und somit weniger fehleranfälligen Quantifizierung der Signalintensität bietet dieses Verfahren auch den Vorteil, dass die gefärbten Präparate im Anschluss unversehrt für zukünftige Färbungen aufbewahrt und erneut verwendet werden können (111). Mithilfe dieser Methode konnten bereits neue Erkenntnisse über die komplexe Pathophysiologie der GvHD gewonnen werden. In einer Kombination mit Einzelzell-RNA-Sequenzierung und Mikrobiomanalysen aus Stuhlproben lieferte die Multiplex-Chip-Technologie neue Informationen über die Veränderung von Anzahl und Differenzierung von CD4 und CD8 positiven Zellen nach ASCT. Außerdem konnte der Einfluss von Antibiotika und der Mikrobiomzusammensetzung auf die Differenzierung und Funktion von Treg untersucht werden (112). Es bietet sich demnach an, in zukünftigen Arbeiten mithilfe der Multiplex-Chip-Technologie auch die Interaktion zwischen Treg, dem GPR43 Rezeptor, Antibiotika, Steroiden und Parametern des Mikrobioms weiter zu erforschen.

4.8 Eignung des GPR43 Rezeptors als prognosebestimmender Parameter

Es existieren zahlreiche Studien, die eine verminderte Diversität des humanen Mikrobioms nach ASCT mit einer erhöhten Letalität in Verbindung bringen (45, 46). Neben einer höheren Vielfalt wurden auch einzelne Spezies aus dem Genus *Blautia* (Klasse Clostridia, Phylum Firmicutes) identifiziert, die die GvHD assoziierte Letalität minimieren und das Gesamtüberleben der Patienten nach ASCT verbessern (113). Da diese Bakterien bekanntlich SCFA wie Butyrat produzieren, überrascht es nicht, dass die Ausprägung der GvHD in Mäusen nach ASCT sowohl durch direkte intestinale Applikation von Butyrat als auch durch Gabe von Vertretern der Klasse Clostridia reduziert werden konnte, was sich positiv auf ihr Überleben auswirkte (114). Auch der GPR43 Rezeptor scheint zumindest im murinen Modell positive Effekte auf das Überleben zu haben. Wie bereits erwähnt, litten GPR43 Knockout-Mäuse an stärker ausgeprägter GvHD und zeigten eine höhere Mortalität als die Vergleichsgruppe (65). Um herauszufinden, inwieweit die GPR43 Expression im Intestinum auch im Menschen eine prognostische Aussage erlaubt, wurde eine Überlebenszeitanalyse mithilfe der Kaplan-Meier Methode durchgeführt. Dabei beeinflusste weder die Proteinexpression im Stroma noch die im Epithel der Zotten und Krypten das Risiko für TRM oder RRM. Die Kurven wiesen im Stroma jedoch darauf hin, dass eine erhöhte Konzentration GPR43 positiver Zellen mit einer höheren Rate an TRM und RRM assoziiert ist. Durch eine Erhöhung der untersuchten Fallzahl, kann dieser Trend statistisch möglicherweise noch stärker untermauert werden. Gleichzeitig muss beachtet werden, dass die Mortalität nach ASCT maßgeblich von der Ausprägung der GvHD bestimmt wird. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die GPR43 Expression im Stroma mit zunehmendem Schweregrad der GvHD steigt. Um herauszufinden, ob die GPR43 Expression die Mortalität als unabhängiger Faktor beeinflusst oder lediglich als Reaktion auf die GvHD zu verstehen ist, braucht es zusätzlich zur Ausweitung der Fallzahlen eine anschließende Cox-Regressionsanalyse.

Bisher wurde von einem schützenden Effekt von GPR43 für die GvHD ausgegangen. Dies würde gegen den GPR43 Rezeptor als Mortalitätsfaktor sprechen. Eine Untersuchung von Glob et al. zeigte jedoch, dass der GPR43 Rezeptor neben dem protektiven Effekt auch negative Einflüsse auf die Darmwand hat. Demnach scheint Butyrat zwar vor einem GvHD-Onset zu schützen (114), sobald sich jedoch eine GvHD entwickelt hat, verhindert diese SCFA eine Regeneration des intestinalen Epithels, indem sie die Proliferation von Stammzellen hemmt. Dies führt zu einer erhöhten Durchlässigkeit des Epithels und verstärkt die intestinale Inflammation

(115). Um zu prüfen, ob dieser Ansatz als Erklärung für die Überlebenszeitanalyse der hier vorliegenden Arbeit herangezogen werden kann, ist eine detaillierte Untersuchung der Stammzellen in den Biopsien sinnvoll. Mithilfe eines Antikörpers, der an den leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5 (LGR5) bindet, können die Stammzellen immunhistochemisch identifiziert und quantifiziert werden. LGR5 wird von intestinalen Stammzellen exprimiert und dient als Marker für diese Zellentität (116). Dadurch dass man die gewonnenen Ergebnisse in einen Zusammenhang mit der GPR43 Expression bringt, können Rückschlüsse gezogen werden, inwiefern dieser Rezeptor die Proliferation der Stammzellen beeinflusst. Als Ergänzung können auch hier longitudinale Untersuchungen mehrerer Proben desselben Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt werden. Hiermit können weitere Einflussfaktoren auf die Interaktion zwischen GPR43 und Stammzellen wie beispielsweise der Zeitpunkt nach ASCT oder der Schweregrad der GvHD identifiziert werden.

5 Zusammenfassung

Aufgrund der hohen Mortalitätsrate gilt die GvHD nach wie vor als eine der größten Herausforderungen nach ASCT. Neben der Identifikation diverser Biomarker zur Früherkennung und Prognoseeinschätzung einer GvHD beschäftigte sich die Forschung der letzten Jahre vor allem mit der Rolle des Mikrobioms in der Pathogenese der GvHD.

Als einer der wichtigsten Metaboliten des Mikrobioms wurden SCFA zusammen mit ihren Rezeptoren sowohl im Tier- als auch im humanen Modell untersucht. Dabei wurden bisher die Effekte von SCFA auf einzelne Zellgruppen und die Rezeptorexpression der jeweiligen Zellentitäten betrachtet. Bislang gibt es keine in vivo Untersuchung der GPR43 Expression in der humanen Darmwand von Patienten nach ASCT. Ziel dieser Arbeit war es daher, den Zusammenhang zwischen der GPR43 Expression und der GvHD mittels immunhistochemischer Färbemethoden in intestinalen Biopsien von Patienten nach ASCT aufzuzeigen.

Dazu wurden retrospektiv 100 Biopsien von 97 Patienten untersucht, die sich im Zeitraum von 2007 bis 2019 am Uniklinikum Regensburg einer ASCT unterzogen. Es erfolgte eine immunhistochemische Färbung des GPR43 Rezeptors mithilfe zweier unterschiedlicher Antikörper und als Ergänzung die Detektion FoxP3 exprimierender Lymphozyten. Als Kontrollproben dienten vor der ASCT gewonnene Gewebeproben. Um mögliche Einflussfaktoren für die GPR43 Expression zu identifizieren, erfolgte zusätzlich die Erfassung wichtiger klinischer Daten wie die Ausprägung der GvHD, der Biopsiezeitpunkt, die Dosierung verabreichter Antibiotika und Steroide und 3-IS Werte aus dem Urin.

Beim Vergleich der Färbeergebnisse der beiden Antikörper stellte sich heraus, dass LS-A6599 zur Visualisierung der GPR43 Expression im Stroma am geeignetsten ist, wohingegen die Darstellung der Proteinexpression im Epithel mit LS-A1578 bessere Resultate lieferte. Während die Auswertung im Colon die meisten positiven Stromazellen detektierte, wies das Ileum die geringste Menge auf. Ferner exprimierte das Zottenepithel des Duodenums signifikant mehr GPR43 als jenes im Ileum. Verglichen zu den Kontrollproben nahm die Proteinexpression sowohl im Stroma als auch im Zottenepithel nach ASCT signifikant zu. Innerhalb der postTx Proben stieg die GPR43 Expression im Stroma mit zunehmendem Schweregrad der GvHD an. Demgegenüber veränderte sich die Anzahl GPR43 positiver Zellen im Epithel der Krypten nach ASCT und in Abhängigkeit vom Lerner Grad kaum. Überdies beeinflusste der Zeitpunkt der Biopsie die Expression von GPR43. Diese war im Stroma innerhalb der ersten 30 Tage nach

ASCT am höchsten und sank auch danach nicht unter den Ausgangswert vor Transplantation. Einen ähnlichen Trend zeigte das Zottenepithel, während sich die Expression in den Krypten abhängig vom Biopsiezeitpunkt nicht veränderte. Des Weiteren beeinflusste die Gabe von Steroiden und Antibiotika die Menge GPR43 positiver Zellen. Erhielten Patienten mehr als 20 mg Steroide am Tag, stieg die Proteinexpression im Stroma und sank im Epithel der Zotten und oberflächlichen Krypten. Durch die Behandlung mit Breitspektrumantibiotika erhöhte sich die GPR43 Expression sowohl im Stroma als auch im Zottenepithel, während sie in den Krypten abnahm. Die Anzahl FoxP3 positiver Treg korrelierte mit der Anzahl GPR43 positiver Zellen im Stroma. Dieser Zusammenhang verstärkte sich bei Patienten, die nicht mit Breitspektrumantibiotika behandelt wurden oder weniger als 20 mg Steroide erhielten. Eine Korrelation der immunhistochemischen GPR43 Expression mit 3-IS Werten aus dem Urin lag weder im Stroma noch im Epithel der Zotten und Krypten vor. Gleiches galt für den Vergleich der hier gewonnenen Ergebnisse mit den Resultaten aus der PCR-Analyse. In der Überlebenszeitanalyse konnte anhand der GPR43 Expression außerdem keine prognostische Aussage hinsichtlich des Risikos für TRM oder RRM getroffen werden.

Die immunhistochemische Analyse legt nahe, dass die GPR43 Expression in Stroma- und Epithelzellen unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterliegt. Um dies zu bestätigen, benötigt es weitere Studien, die sich mit den jeweiligen Signalwegen, den Interaktionen zwischen den Zellentitäten und dem Einfluss von Mikroben und Medikamenten auf die Proteinexpression beschäftigen. Ferner sind entsprechende Untersuchungen notwendig, um zu klären, ob eine Neutropenie für die Hochregulation des FFAR2 im Stroma in der Anfangsphase nach ASCT verantwortlich ist. Überdies gilt es zu erforschen, durch welche genauen Mechanismen Antibiotika und Steroide die GPR43 abhängige Induktion von Treg beeinflussen und ob sich daraus ein therapeutischer Nutzen ergibt. Abschließend sollte der Zusammenhang zwischen BCoAT, einem indirekten Marker für die Anwesenheit Butyrat-produzierender Spezies, und der GPR43 Expression näher analysiert werden. Dadurch kann geklärt werden, ob die Anzahl der Mikroben und die daraus resultierende vermehrte Produktion von SCFA die Expression von GPR43 steigert. Lässt sich dies bestätigen, eröffnet sich mit dem Transfer bestimmter Bakterienstämme eine neue Therapiemöglichkeit, mit der der Verlauf und die Prognose der GvHD günstig beeinflusst werden können. Die deutlichsten Veränderungen hinsichtlich der GPR43 Expression wurden in dieser Arbeit im Stroma festgestellt. Dies deutet darauf hin, dass vor allem die Proteinexpression dieses Kompartiments eine Rolle in der Pathophysiologie der GvHD spielt und den Krankheitsverlauf steuert. Eine Identifikation der einzelnen Stromazellen

kann in zukünftigen Arbeiten mithilfe der Multiplex-Chip-Technologie, welche die Koexpression von GPR43 und zellspezifischen Markern visualisiert, erfolgen. Dadurch können weitere Erkenntnisse hinsichtlich der pathophysiologischen Bedeutung des GPR43 Rezeptors für die GvHD gewonnen werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Barnes DW, Corp MJ, Loutit JF, Neal FE. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow: preliminary communication. *British medical journal*. 1956;2(4993):626–7. doi:10.1136/bmj.2.4993.626 Cited in: PubMed; PMID 13356034.
2. Dausset J. Iso-Leuko-Antibodies. *Vox Sanguinis*. 1958;3(1):40–1. doi:10.1111/j.1423-0410.1958.tb03559.x
3. van Rood J, van Leeuwen, Eernisse JG. Leucocyte antibodies in sera of pregnant women. *Vox Sanguinis*. 1959;4427–44. doi:10.1111/j.1423-0410.1959.tb03651.x Cited in: PubMed; PMID 14438699.
4. Bach FH, Albertini RJ, Joo P, Anderson JL, Bortin MM. Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet*. 1968;292(7583):1364–6. doi:10.1016/S0140-6736(68)92672-X Cited in: PubMed; PMID 4177931.
5. Passweg JR, Baldomero H, Chabannon C, Basak GW, La Cámara R de, Corbacioglu S, Dolstra H, Duarte R, Glass B, Greco R, Lankester AC, Mohty M, Peffault de Latour R, Snowden JA, Yakoub-Agha I, Kröger N. Hematopoietic cell transplantation and cellular therapy survey of the EBMT: monitoring of activities and trends over 30 years. *Bone Marrow Transplant*. 2021;56(7):1651–64. doi:10.1038/s41409-021-01227-8 Cited in: PubMed; PMID 33623153.
6. Hemmati PG. Allogene Stammzelltransplantation: Klinische Praxis und Perspektiven [Allogenic stem cell transplantation; Clinical practice and perspectives]. *best practice onkologie*. 2018;13(3):128–36. doi:10.1007/s11654-018-0078-6
7. Fürst D, Müller C, Vucinic V, Bunjes D, Herr W, Gramatzki M, Schwerdtfeger R, Arnold R, Einsele H, Wulf G, Pfreundschuh M, Glass B, Schrezenmeier H, Schwarz K, Mytilineos J. High-resolution HLA matching in hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective collaborative analysis. *Blood*. 2013;122(18):3220–9. doi:10.1182/blood-2013-02-482547 Cited in: PubMed; PMID 24046013.
8. Travnik R, Beckers M, Wolff D, Holler E, Landthaler M, Karrer S. Graft-versus-Host-Disease (GvHD) - ein Update: Teil 1: Pathophysiologie, Klinik und Stadieneinteilung der GvHD [Graft-versus-Host Disease (GvHD) - an update: Part 1: Pathophysiology, clinical features and classification of GvHD]. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*. 2011;62(2):139-54; quiz 155. ger. doi:10.1007/s00105-010-2107-4 Cited in: PubMed; PMID 21279310.
9. Gyurkocza B, Sandmaier BM. Conditioning regimens for hematopoietic cell transplantation: one size does not fit all. *Blood*. 2014;124(3):344–53. doi:10.1182/blood-2014-02-514778 Cited in: PubMed; PMID 24914142.
10. Buchholz S, Ganser A. Hämatopoetische Stammzelltransplantation. Indikationen, Grundlagen und Ausblick [Hematopoietic stem cell transplantation. Indications, foundations and perspective]. *Internist (Berl)*. 2009;50(5):572–80. ger. doi:10.1007/s00108-008-2273-y Cited in: PubMed; PMID 19396412.

11. Höfler G, Kreipe H, Moch H, editors. Pathologie: Das Lehrbuch [Pathology - the text-book]. 6th ed. München: Elsevier; 2019. 1071 p.
12. Wollmer E, Neubauer A. Komplikationen der allogenen Knochenmark- und Stammzelltransplantation [Complications after allogeneic bone marrow and stem cell transplantation]. Internist (Berl). 2014;55(5):547-60; quiz 561. ger. doi:10.1007/s00108-013-3432-3 Cited in: PubMed; PMID 24770977.
13. Zeiser R, Dreger P, Finke J, Greinix H, Holler E, Luft T, Mielke S, Scheid C, Wolf D. Leitlinien zur allogenen Stammzelltransplantation von der Deutschen Arbeitsgemeinschaft: GvHD-Prophylaxe und Therapie [Guidelines on allogeneic stem cell transplantation from the German Working Group on Allogeneic Stem Cell Transplantation ; GvHD prophylaxis and therapy]. 2016.
14. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, Martin P, Chien J, Przepiorka D, Couriel D, Cowen EW, Dinndorf P, Farrell A, Hartzman R, Henslee-Downey J, Jacobsohn D, McDonald G, Mittleman B, Rizzo JD, Robinson M, Schubert M, Schultz K, Shulman H, Turner M, Vogelsang G, Flowers MED. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. Biol Blood Marrow Transplant. 2005;11(12):945–56. doi:10.1016/j.bbmt.2005.09.004 Cited in: PubMed; PMID 16338616.
15. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. Harvey Lect. 1966;6221–78. Cited in: PubMed; PMID 4875305.
16. Xun CQ, Thompson JS, Jennings CD, Brown SA, Widmer MB. Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice. Blood. 1994;83(8):2360–7. Cited in: PubMed; PMID 8161803.
17. Chang RJ, Lee SH. Effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on the expression of an Ia antigen on a murine macrophage cell line. J Immunol. 1986;137(9):2853–6. Cited in: PubMed; PMID 3093585.
18. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. Science. 2002;296(5566):301–5. doi:10.1126/science.1071059 Cited in: PubMed; PMID 11951032.
19. Hill GR, Crawford JM, Cooke KR, Brinson YS, Pan L, Ferrara JL. Total Body Irradiation and Acute Graft-Versus-Host Disease: The Role of Gastrointestinal Damage and Inflammatory Cytokines. Blood. 1997;90(8):3204–13. doi:10.1182/blood.V90.8.3204
20. Penack O, Holler E, van den Brink MRM. Graft-versus-host disease: regulation by microbe-associated molecules and innate immune receptors. Blood. 2010;115(10):1865–72. doi:10.1182/blood-2009-09-242784 Cited in: PubMed; PMID 20042727.
21. Ghimire S, Weber D, Mavin E, Wang Xn, Dickinson AM, Holler E. Pathophysiology of GvHD and Other HSCT-Related Major Complications. Front Immunol. 2017;879. doi:10.3389/fimmu.2017.00079 Cited in: PubMed; PMID 28373870.

22. Choi SW, Levine JE, Ferrara JLM. Pathogenesis and management of graft-versus-host disease. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2010;30(1):75–101. doi:10.1016/j.iac.2009.10.001 Cited in: PubMed; PMID 20113888.
23. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet.* 2009;373(9674):1550–61. doi:10.1016/S0140-6736(09)60237-3 Cited in: PubMed; PMID 19282026.
24. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003;299(5609):1057–61. doi:10.1126/science.1079490 Cited in: PubMed; PMID 12522256.
25. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 2008;133(5):775–87. doi:10.1016/j.cell.2008.05.009 Cited in: PubMed; PMID 18510923.
26. Holler E, Greinix H, Zeiser R. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies.* 7th ed. Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, editors. Cham (CH); 2019. 1 p.
27. Holler E, Rogler G, Herfarth H, Brenmoehl J, Wild PJ, Hahn J, Eissner G, Schölmerich J, Andreesen R. Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2004;104(3):889–94. doi:10.1182/blood-2003-10-3543 Cited in: PubMed; PMID 15090455.
28. Atkinson K, Horowitz MM, Gale RP, van Bekkum DW, Gluckman E, Good RA, Jacobsen N, Kolb HJ, Rimm AA, Ringdén O. Risk factors for chronic graft-versus-host disease after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood.* 1990;75(12):2459–64. Cited in: PubMed; PMID 2350582.
29. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, Lerner KG, Thomas ED. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation.* 1974;18(4):295–304. doi:10.1097/00007890-197410000-00001 Cited in: PubMed; PMID 4153799.
30. Kröger N, Zander AR. *Allogene Stammzelltherapie - Grundlagen, Indikationen und Perspektiven [Allogeneic stem cell therapy - basics, indications and perspectives].* 3rd ed. Bremen: UNI-MED-Verl.; 2011. 191 p. (Uni-Med science). ger.
31. Salomao M, Dorritie K, Mapara MY, Sepulveda A. Histopathology of Graft-vs-Host Disease of Gastrointestinal Tract and Liver: An Update. *Am J Clin Pathol.* 2016;145(5):591–603. doi:10.1093/ajcp/aqw050 Cited in: PubMed; PMID 27247365.
32. Bodet-Milin C, Lacombe M, Malard F, Lestang E, Cahu X, Chevallier P, Guillaume T, Delaunay J, Brissot E, Moreau P, Kraeber-Bodere F, Mohty M. 18F-FDG PET/CT for the assessment of gastrointestinal GVHD: results of a pilot study. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49(1):131–7. doi:10.1038/bmt.2013.144 Cited in: PubMed; PMID 24076550.
33. Benedetti E, Bruno B, McDonald GB, Paolicchi A, Caracciolo F, Papineschi F, Pelosini M, Campani D, Galimberti S, Petrini M. Prospective qualitative and quantitative non-invasive evaluation of intestinal acute GVHD by contrast-enhanced ultrasound

- sonography. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48(11):1421–8. doi:10.1038/bmt.2013.65 Cited in: PubMed; PMID 23665821.
34. Länger F, Puls F, Buchholz S, Loddenkemper C, Ganser A, Kreipe H. Histopathologie der Graft-versus-Host-Erkrankung [Histopathology of graft-versus-host disease]. *Pathologe*. 2011;32(2):144–51. ger. doi:10.1007/s00292-010-1408-9 Cited in: PubMed; PMID 21279360.
35. Travník R, Beckers M, Wolff D, Holler E, Landthaler M, Karrer S. Graft-versus-Host-Disease (GvHD) - ein Update. Teil 2: Prognose und Therapie der GvHD [Graft-versus-host disease (GvHD) - an update. Part 2: prognosis and therapy of GvHD]. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*. 2011;62(3):229–37; quiz 238–9. ger. doi:10.1007/s00105-010-2118-1 Cited in: PubMed; PMID 21308356.
36. Ram R, Gafter-Gvili A, Yeshurun M, Paul M, Raanani P, Shpilberg O. Prophylaxis regimens for GVHD: systematic review and meta-analysis. *Bone Marrow Transplant*. 2009;43(8):643–53. doi:10.1038/bmt.2008.373 Cited in: PubMed; PMID 18997826.
37. Ratanatharathorn V, Nash RA, Przepiorka D, Devine SM, Klein JL, Weisdorf D, Fay JW, Nademanee A, Antin JH, Christiansen NP, van der Jagt R, Herzig RH, Litzow MR, Wolff SN, Longo WL, Petersen FB, Karanes C, Avalos B, Storb R, Buell DN, Maher RM, Fitzsimmons WE, Wingard JR. Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate and cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood*. 1998;92(7):2303–14. Cited in: PubMed; PMID 9746768.
38. Choi SW, Reddy P. Current and emerging strategies for the prevention of graft-versus-host disease. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014;11(9):536–47. doi:10.1038/nrclinonc.2014.102 Cited in: PubMed; PMID 24958183.
39. Finke J, Bethge WA, Schmoor C, Ottinger HD, Stelljes M, Zander AR, Volin L, Ruutu T, Heim DA, Schwerdtfeger R, Kolbe K, Mayer J, Maertens JA, Linkesch W, Holler E, Koza V, Bornhäuser M, Einsele H, Kolb H-J, Bertz H, Egger M, Grishina O, Socié G. Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2009;10(9):855–64. doi:10.1016/S1470-2045(09)70225-6 Cited in: PubMed; PMID 19695955.
40. Zeiser R, Bubnoff N v., Butler J, Mohty M, Niederwieser D, Or R, Szer J, Wagner EM, Zuckerman T, Mahuzier B, Xu J, Wilke C, Gandhi KK, Socié G. Ruxolitinib for Glucocorticoid-Refractory Acute Graft-versus-Host Disease. *N Engl J Med*. 2020;382(19):1800–10. doi:10.1056/NEJMoa1917635 Cited in: PubMed; PMID 32320566.
41. Levine JE, Braun TM, Harris AC, Holler E, Taylor A, Miller H, Magenau J, Weisdorf DJ, Ho VT, Bolaños-Meade J, Alousi AM, Ferrara JLM. A prognostic score for acute graft-versus-host disease based on biomarkers: a multicentre study. *The Lancet. Haematology*. 2015;2(1):e21–e29. doi:10.1016/S2352-3026(14)00035-0 Cited in: PubMed; PMID 26687425.

42. Hartwell MJ, Özbek U, Holler E, Renteria AS, Major-Monfried H, Reddy P, Aziz M, Hogan WJ, Ayuk F, Efebera YA, Hexner EO, Bunworasate U, Qayed M, Ordemann R, Wölfl M, Mielke S, Pawarode A, Chen Y-B, Devine S, Harris AC, Jagasia M, Kitko CL, Litzow MR, Kröger N, Locatelli F, Morales G, Nakamura R, Reshef R, Rösler W, Weber D, Wudhikarn K, Yanik GA, Levine JE, Ferrara JL. An early-biomarker algorithm predicts lethal graft-versus-host disease and survival. *JCI Insight*. 2017;2(3):e89798. doi:10.1172/jci.insight.89798 Cited in: PubMed; PMID 28194439.
43. Magenau JM, Qin X, Tawara I, Rogers CE, Kitko C, Schlough M, Bickley D, Braun TM, Jang P-S, Lowler KP, Jones DM, Choi SW, Reddy P, Mineishi S, Levine JE, Ferrara JLM, Paczesny S. Frequency of CD4(+)CD25(hi)FOXP3(+) regulatory T cells has diagnostic and prognostic value as a biomarker for acute graft-versus-host-disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(7):907–14. doi:10.1016/j.bbmt.2010.02.026 Cited in: PubMed; PMID 20302964.
44. Holler E, Butzhammer P, Schmid K, Hundsruker C, Koestler J, Peter K, Zhu W, Sporrer D, Hehlhans T, Kreutz M, Holler B, Wolff D, Edinger M, Andreesen R, Levine JE, Ferrara JL, Gessner A, Spang R, Oefner PJ. Metagenomic analysis of the stool microbiome in patients receiving allogeneic stem cell transplantation: loss of diversity is associated with use of systemic antibiotics and more pronounced in gastrointestinal graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(5):640–5. doi:10.1016/j.bbmt.2014.01.030 Cited in: PubMed; PMID 24492144.
45. Peled JU, Gomes ALC, Devlin SM, Littmann ER, Taur Y, Sung AD, Weber D, Hashimoto D, Slingerland AE, Slingerland JB, Maloy M, Clurman AG, Stein-Thoeringer CK, Markey KA, Docampo MD, Burgos da Silva M, Khan N, Gessner A, Messina JA, Romero K, Lew MV, Bush A, Bohannon L, Brereton DG, Fontana E, Amoretti LA, Wright RJ, Armijo GK, Shono Y, Sanchez-Escamilla M, Castillo Flores N, Alarcon Tomas A, Lin RJ, Yáñez San Segundo L, Shah GL, Cho C, Scordo M, Politikos I, Hayasaka K, Hasegawa Y, Gyurkocza B, Ponce DM, Barker JN, Perales M-A, Giralt SA, Jenq RR, Teshima T, Chao NJ, Holler E, Xavier JB, Pamer EG, van den Brink MRM. Microbiota as Predictor of Mortality in Allogeneic Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med*. 2020;382(9):822–34. doi:10.1056/NEJMoa1900623 Cited in: PubMed; PMID 32101664.
46. Taur Y, Jenq RR, Perales M-A, Littmann ER, Morjaria S, Ling L, No D, Gobourne A, Viale A, Dahi PB, Ponce DM, Barker JN, Giralt S, van den Brink M, Pamer EG. The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2014;124(7):1174–82. doi:10.1182/blood-2014-02-554725 Cited in: PubMed; PMID 24939656.
47. Eriguchi Y, Takashima S, Oka H, Shimoji S, Nakamura K, Uryu H, Shimoda S, Iwasaki H, Shimono N, Ayabe T, Akashi K, Teshima T. Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of α -defensins. *Blood*. 2012;120(1):223–31. doi:10.1182/blood-2011-12-401166 Cited in: PubMed; PMID 22535662.
48. Weber D, Oefner PJ, Hiergeist A, Koestler J, Gessner A, Weber M, Hahn J, Wolff D, Stämmle F, Spang R, Herr W, Dettmer K, Holler E. Low urinary indoxyl sulfate levels

- early after transplantation reflect a disrupted microbiome and are associated with poor outcome. *Blood*. 2015;126(14):1723–8. doi:10.1182/blood-2015-04-638858 Cited in: PubMed; PMID 26209659.
49. Cummings JH. Short chain fatty acids in the human colon. *Gut*. 1981;22(9):763–79. doi:10.1136/gut.22.9.763 Cited in: PubMed; PMID 7028579.
50. Kim CH. Immune regulation by microbiome metabolites. *Immunology*. 2018;154(2):220–9. doi:10.1111/imm.12930 Cited in: PubMed; PMID 29569377.
51. D'Souza WN, Douangpanya J, Mu S, Jaeckel P, Zhang M, Maxwell JR, Rottman JB, Labitzke K, Willee A, Beckmann H, Wang Y, Li Y, Schwandner R, Johnston JA, Towne JE, Hsu H. Differing roles for short chain fatty acids and GPR43 agonism in the regulation of intestinal barrier function and immune responses. *PLoS ONE*. 2017;12(7):e0180190. doi:10.1371/journal.pone.0180190 Cited in: PubMed; PMID 28727837.
52. Kelly CJ, Zheng L, Campbell EL, Saeedi B, Scholz CC, Bayless AJ, Wilson KE, Glover LE, Kominsky DJ, Magnuson A, Weir TL, Ehrentraut SF, Pickel C, Kuhn KA, Lanis JM, Nguyen V, Taylor CT, Colgan SP. Crosstalk between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and Intestinal Epithelial HIF Augments Tissue Barrier Function. *Cell host & microbe*. 2015;17(5):662–71. doi:10.1016/j.chom.2015.03.005 Cited in: PubMed; PMID 25865369.
53. Waldecker M, Kautenburger T, Daumann H, Busch C, Schrenk D. Inhibition of histone-deacetylase activity by short-chain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2008;19(9):587–93. doi:10.1016/j.jnutbio.2007.08.002 Cited in: PubMed; PMID 18061431.
54. Yang G, Chen S, Deng B, Tan C, Deng J, Zhu G, Yin Y, Ren W. Implication of G Protein-Coupled Receptor 43 in Intestinal Inflammation: A Mini-Review. *Front Immunol*. 2018;9:1434. doi:10.3389/fimmu.2018.01434 Cited in: PubMed; PMID 29988393.
55. Kimura I, Ichimura A, Ohue-Kitano R, Igarashi M. Free Fatty Acid Receptors in Health and Disease. *Physiol Rev*. 2020;100(1):171–210. doi:10.1152/physrev.00041.2018 Cited in: PubMed; PMID 31487233.
56. Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, Eilert MM, Tcheang L, Daniels D, Muir AI, Wigglesworth MJ, Kinghorn I, Fraser NJ, Pike NB, Strum JC, Steplewski KM, Murdock PR, Holder JC, Marshall FH, Szekeres PG, Wilson S, Ignar DM, Foord SM, Wise A, Dowell SJ. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(13):11312–9. doi:10.1074/jbc.M211609200 Cited in: PubMed; PMID 12496283.
57. Lee SU, In HJ, Kwon MS, Park B, Jo M, Kim M-O, Cho S, Lee S, Lee H-J, Kwak YS, Kim S. β -Arrestin 2 mediates G protein-coupled receptor 43 signals to nuclear factor- κ B. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2013;36(11):1754–9. doi:10.1248/bpb.b13-00312 Cited in: PubMed; PMID 23985900.
58. Kim MH, Kang SG, Park JH, Yanagisawa M, Kim CH. Short-chain fatty acids activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells to promote inflammatory responses in

- mice. *Gastroenterology*. 2013;145(2):396-406.e1-10. doi:10.1053/j.gastro.2013.04.056 Cited in: PubMed; PMID 23665276.
59. Vinolo MAR, Rodrigues HG, Hatanaka E, Hebeda CB, Farsky SHP, Curi R. Short-chain fatty acids stimulate the migration of neutrophils to inflammatory sites. *Clin Sci (Lond)*. 2009;117(9):331–8. doi:10.1042/CS20080642 Cited in: PubMed; PMID 19335337.
60. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, Kranich J, Sierro F, Di Yu, Schilter HC, Rolph MS, Mackay F, Artis D, Xavier RJ, Teixeira MM, Mackay CR. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009;461(7268):1282–6. doi:10.1038/nature08530 Cited in: PubMed; PMID 19865172.
61. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-Y M, Glickman JN, Garrett WS. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*. 2013;341(6145):569–73. doi:10.1126/science.1241165 Cited in: PubMed; PMID 23828891.
62. Macia L, Tan J, Vieira AT, Leach K, Stanley D, Luong S, Maruya M, Ian McKenzie C, Hijikata A, Wong C, Binge L, Thorburn AN, Chevalier N, Ang C, Marino E, Robert R, Offermanns S, Teixeira MM, Moore RJ, Flavell RA, Fagarasan S, Mackay CR. Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. *Nat Commun*. 2015;6:6734. doi:10.1038/ncomms7734 Cited in: PubMed; PMID 25828455.
63. Zaki MH, Boyd KL, Vogel P, Kastan MB, Lamkanfi M, Kanneganti T-D. The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. *Immunity*. 2010;32(3):379–91. doi:10.1016/j.immuni.2010.03.003 Cited in: PubMed; PMID 20303296.
64. Ghimire S, Weber D, Hippe K, Meedt E, Hoepting M, Kattner A-S, Hiergeist A, Gessner A, Matos C, Ghimire S, Wolff D, Edinger M, Hoffmann P, Poeck H, Herr W, Holler E. GPR Expression in Intestinal Biopsies From SCT Patients Is Upregulated in GVHD and Is Suppressed by Broad-Spectrum Antibiotics. *Front Immunol*. 2021;12:753287. doi:10.3389/fimmu.2021.753287 Cited in: PubMed; PMID 34777363.
65. Fujiwara H, Docampo MD, Riwe M, Peltier D, Toubai T, Henig I, Wu SJ, Kim S, Taylor A, Brabbs S, Liu C, Zajac C, Oravec-Wilson K, Sun Y, Núñez G, Levine JE, van den Brink MRM, Ferrara JLM, Reddy P. Microbial metabolite sensor GPR43 controls severity of experimental GVHD. *Nat Commun*. 2018;9(1):3674. doi:10.1038/s41467-018-06048-w Cited in: PubMed; PMID 30201970.
66. Boenisch T. *Handbuch immunochemische Färbemethoden* [Manual immunochemical staining methods]. 3rd ed. Hamburg: DakoCytomation; 2003. 85 p.
67. Clive T, Lars R. *Immunohistochemical Staining Methods Education Guide* [Internet]. 2013 [cited 2020 Jan 13]; [218 p.]. Available from: <https://www.agilent.com/en/dako-pathology-education-guides>
68. NICHIREI BIOSCIENCES INC. *IHC- Polymer Detection System: Catalog 2010-2011* [Internet] [cited 2021 Mar 24]. Available from: <https://www.nichirei.co.jp/bio/english/pdf/catalog2010-2011.pdf>

69. Ventana Medical Systems, Inc. PKB INS OptiView DAB IHC Detection Kit [Internet]. 2011 [cited 2021 Mar 24]. Available from: <https://pim-eservices.roche.com/eLD/api/downloads/e30edb71-1a36-ea11-fa90-005056a772fd?countryIso-Code=de>
70. Cohen J. Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences. 2nd ed. Hoboken: Lawrence Erlbaum Associates; 1988. 567 p. eng.
71. Pereira MR, Pouch SM, Scully B. Infections in Allogeneic Stem Cell Transplantation. Principles and Practice of Transplant Infectious Diseases. 2018;209–26. doi:10.1007/978-1-4939-9034-4_11
72. Weber D, Hiergeist A, Weber M, Dettmer K, Wolff D, Hahn J, Herr W, Gessner A, Holler E. Detrimental Effect of Broad-spectrum Antibiotics on Intestinal Microbiome Diversity in Patients After Allogeneic Stem Cell Transplantation: Lack of Commensal Sparing Antibiotics. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2019;68(8):1303–10. doi:10.1093/cid/ciy711 Cited in: PubMed; PMID 30124813.
73. Kröger N, Fleischhauer K. Deutsches Register für Stammzelltransplantation - Jahresbericht 2020 [German Registry for Stem Cell Transplantation - Annual Report 2020] [Internet]. 2021 [cited 2022 Mar 30]. Available from: <http://www.drst.de/drst/download/jb2020.pdf>
74. Hippe K, Kreft A, Reu-Hofer S, Rosenwald A, Ferrazzi F, Daniel C, Amann K, Kraus S, Holler E, Kandulski A, Hirsch D, Buttner A, Rösler W, Hildner K, Winkler J, Büttner-Herold M. Round-Robin test for the histological diagnosis of acute colonic Graft-versus-Host disease validating established histological criteria and grading systems. Virchows Arch. 2023;483(1):47–58. doi:10.1007/s00428-023-03544-3 Cited in: PubMed; PMID 37165134.
75. Kreft A, Mottok A, Mesteri I, Cardona DM, Janin A, Köhl AA, Andrulis M, Brunner A, Shulman HM, Negri G, Tzankov A, Huber E. Consensus diagnostic histopathological criteria for acute gastrointestinal graft versus host disease improve interobserver reproducibility. Virchows Arch. 2015;467(3):255–63. doi:10.1007/s00428-015-1803-y Cited in: PubMed; PMID 26164839.
76. Mailhe M, Ricaboni D, Vitton V, Gonzalez J-M, Bachar D, Dubourg G, Cadoret F, Robert C, Delerce J, Levasseur A, Fournier P-E, Angelakis E, Lagier J-C, Raoult D. Repertoire of the gut microbiota from stomach to colon using culturomics and next-generation sequencing. BMC Microbiol. 2018;18(1):157. doi:10.1186/s12866-018-1304-7 Cited in: PubMed; PMID 30355340.
77. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. EMBO Rep. 2006;7(7):688–93. doi:10.1038/sj.embor.7400731 Cited in: PubMed; PMID 16819463.
78. Canani RB, Di Costanzo M, Leone L, Pedata M, Meli R, Calignano A. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. World J Gastroenterol. 2011;17(12):1519–28. doi:10.3748/wjg.v17.i12.1519 Cited in: PubMed; PMID 21472114.

79. Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*. 1987;28(10):1221–7. doi:10.1136/gut.28.10.1221 Cited in: PubMed; PMID 3678950.
80. Ma C, Maluf HM, Liu T-C. Acute graft-versus-host disease is more prevalent and severe in the lower than the upper gastrointestinal tract. *Human pathology*. 2015;46(10):1480–7. doi:10.1016/j.humpath.2015.06.005 Cited in: PubMed; PMID 26243672.
81. Amend M, Greiner L. Die Sono-Kapsel: Eine neue Methode zur Messung der gastrointestinalen Motilität [The sono-capsule: a new method for measuring gastrointestinal motility]. *Ultraschall Med*. 1996;17(6):274–6. ger. doi:10.1055/s-2007-1003197 Cited in: PubMed; PMID 9082552.
82. Tottey W, Feria-Gervasio D, Gaci N, Laillet B, Pujos E, Martin J-F, Sebedio J-L, Sion B, Jarrige J-F, Alric M, Brugère J-F. Colonic Transit Time Is a Driven Force of the Gut Microbiota Composition and Metabolism: In Vitro Evidence. *J Neurogastroenterol Motil*. 2017;23(1):124–34. doi:10.5056/jnm16042 Cited in: PubMed; PMID 27530163.
83. Coati I, Fassan M, Farinati F, Graham DY, Genta RM, Rugge M. Autoimmune gastritis: Pathologist's viewpoint. *World J Gastroenterol*. 2015;21(42):12179–89. doi:10.3748/wjg.v21.i42.12179 Cited in: PubMed; PMID 26576102.
84. Ang Z, Er JZ, Tan NS, Lu J, Liou Y-C, Grosse J, Ding JL. Human and mouse monocytes display distinct signalling and cytokine profiles upon stimulation with FFAR2/FFAR3 short-chain fatty acid receptor agonists. *Sci Rep*. 2016;634145. doi:10.1038/srep34145 Cited in: PubMed; PMID 27667443.
85. Cox MA, Jackson J, Stanton M, Rojas-Triana A, Bober L, Lavery M, Yang X, Zhu F, Liu J, Wang S, Monsma F, Vassileva G, Maguire M, Gustafson E, Bayne M, Chou C-C, Lundell D, Jenh C-H. Short-chain fatty acids act as antiinflammatory mediators by regulating prostaglandin E(2) and cytokines. *World J Gastroenterol*. 2009;15(44):5549–57. doi:10.3748/wjg.15.5549 Cited in: PubMed; PMID 19938193.
86. Kibbie JJ, Dillon SM, Thompson TA, Purba CM, McCarter MD, Wilson CC. Butyrate directly decreases human gut lamina propria CD4 T cell function through histone deacetylase (HDAC) inhibition and GPR43 signaling. *Immunobiology*. 2021;226(5):152126. doi:10.1016/j.imbio.2021.152126 Cited in: PubMed; PMID 34365090.
87. Sun M, Wu W, Chen L, Yang W, Huang X, Ma C, Chen F, Xiao Y, Zhao Y, Ma C, Yao S, Carpio VH, Dann SM, Zhao Q, Liu Z, Cong Y. Microbiota-derived short-chain fatty acids promote Th1 cell IL-10 production to maintain intestinal homeostasis. *Nat Commun*. 2018;9(1):3555. doi:10.1038/s41467-018-05901-2 Cited in: PubMed; PMID 30177845.
88. Felber J, Bläker H, Fischbach W, Koletzko S, Laaß M, Lachmann N, Lorenz P, Lynen P, Reese I, Scherf K, Schuppan D, Schumann M, Aust D, Baas S, Beisel S, Laffolie J de, Duba E, Holtmeier W, Lange L, Loddenkemper C, Moog G, Rath T, Roeb E, Rubin D, Stein J, Török H, Zopf Y. Aktualisierte S2k-Leitlinie Zöliakie der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) [Updated S2k guideline on coeliac disease from the German Society for Gastroenterology, Digestive

- and Metabolic Diseases (DGVS)]. *Z Gastroenterol.* 2022;60(5):790–856. ger. doi:10.1055/a-1741-5946 Cited in: PubMed; PMID 35545109.
89. Welsch U, Kummer W. *Lehrbuch Histologie [Textbook Histology]*. 4th ed. München: Urban & Fischer in Elsevier; 2014. 656 p. ger.
90. Siwczak F, Loffet E, Kaminska M, Koceva H, Mahe MM, Mosig AS. Intestinal Stem Cell-on-Chip to Study Human Host-Microbiota Interaction. *Front. Immunol.* 2021;12:798552. doi:10.3389/fimmu.2021.798552 Cited in: PubMed; PMID 34938299.
91. Chiusolo P, Metafuni E, Paroni Sterbini F, Giammarco S, Masucci L, Leone G, Sica S. Gut Microbiome Changes after Stem Cell Transplantation. *Blood.* 2015;126(23):1953. doi:10.1182/blood.V126.23.1953.1953
92. Romick-Rosendale LE, Haslam DB, Lane A, Denson L, Lake K, Wilkey A, Watanabe M, Bauer S, Litts B, Luebbering N, Dandoy CE, Davies SM. Antibiotic Exposure and Reduced Short Chain Fatty Acid Production after Hematopoietic Stem Cell Transplant. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2018;24(12):2418–24. doi:10.1016/j.bbmt.2018.07.030 Cited in: PubMed; PMID 30055351.
93. Bansal R, Park H, Taborda CC, Gordillo C, Mapara MY, Assal A, Uhlemann A-C, Reshef R. Antibiotic Exposure, Not Alloreactivity, Is the Major Driver of Microbiome Changes in Hematopoietic Cell Transplantation. *Transplantation and Cellular Therapy.* 2022;28(3):135–44. doi:10.1016/j.jtct.2021.12.015 Cited in: PubMed; PMID 34958974.
94. Hidaka E, Ota H, Hidaka H, Hayama M, Matsuzawa K, Akamatsu T, Nakayama J, Katsuyama T. *Helicobacter pylori* and two ultrastructurally distinct layers of gastric mucous cell mucins in the surface mucous gel layer. *Gut.* 2001;49(4):474–80. doi:10.1136/gut.49.4.474 Cited in: PubMed; PMID 11559642.
95. Alverdy J, Aoye E. The effect of glucocorticoid administration on bacterial translocation. Evidence for an acquired mucosal immunodeficient state. *Ann Surg.* 1991;214(6):719–23. doi:10.1097/0000658-199112000-00012 Cited in: PubMed; PMID 1741652.
96. Huang EY, Inoue T, Leone VA, Dalal S, Touw K, Wang Y, Musch MW, Theriault B, Higuchi K, Donovan S, Gilbert J, Chang EB. Using corticosteroids to reshape the gut microbiome: implications for inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2015;21(5):963–72. doi:10.1097/MIB.0000000000000332 Cited in: PubMed; PMID 25738379.
97. Boivin MA, Ye D, Kennedy JC, Al-Sadi R, Shepela C, Ma TY. Mechanism of glucocorticoid regulation of the intestinal tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;292(2):G590-8. doi:10.1152/ajpgi.00252.2006 Cited in: PubMed; PMID 17068119.
98. Turret J, Willing BP, Dion S, MacPherson J, Denamur E, Finlay BB. Immunosuppressive Treatment Alters Secretion of Ileal Antimicrobial Peptides and Gut Microbiota, and Favors Subsequent Colonization by Uropathogenic *Escherichia coli*. *Transplantation.* 2017;101(1):74–82. doi:10.1097/TP.0000000000001492 Cited in: PubMed; PMID 27681266.
99. Zhang J, Feng D, Law HK-W, Wu Y, Zhu G-H, Huang W-Y, Kang Y. Integrative Analysis of Gut Microbiota and Fecal Metabolites in Rats after Prednisone Treatment.

- Microbiol Spectr. 2021;9(3):e0065021. doi:10.1128/Spectrum.00650-21 Cited in: PubMed; PMID 34756061.
100. Shono Y, Docampo MD, Peled JU, Perobelli SM, Velardi E, Tsai JJ, Slingerland AE, Smith OM, Young LF, Gupta J, Lieberman SR, Jay HV, Ahr KF, Porosnicu Rodriguez KA, Xu K, Calarfiore M, Poeck H, Caballero S, Devlin SM, Rapaport F, Dudakov JA, Hanash AM, Gyurkocza B, Murphy GF, Gomes C, Liu C, Moss EL, Falconer SB, Bhatt AS, Taur Y, Pamer EG, van den Brink MRM, Jenq RR. Increased GVHD-related mortality with broad-spectrum antibiotic use after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in human patients and mice. *Sci Transl Med.* 2016;8(339):339ra71. doi:10.1126/scitranslmed.aaf2311 Cited in: PubMed; PMID 27194729.
 101. Meedt E, Hiergeist A, Gessner A, Dettmer K, Liebisch G, Ghimire S, Poeck H, Edinger M, Wolff D, Herr W, Holler E, Weber D. Prolonged Suppression of Butyrate-Producing Bacteria Is Associated With Acute Gastrointestinal Graft-vs-Host Disease and Transplantation-Related Mortality After Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2022;74(4):614–21. doi:10.1093/cid/ciab500 Cited in: PubMed; PMID 34043764.
 102. Weber D, Jenq RR, Peled JU, Taur Y, Hiergeist A, Koestler J, Dettmer K, Weber M, Wolff D, Hahn J, Pamer EG, Herr W, Gessner A, Oefner PJ, van den Brink MRM, Holler E. Microbiota Disruption Induced by Early Use of Broad-Spectrum Antibiotics Is an Independent Risk Factor of Outcome after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2017;23(5):845–52. doi:10.1016/j.bbmt.2017.02.006 Cited in: PubMed; PMID 28232086.
 103. Thiele Orberg E, Meedt E, Hiergeist A, Xue J, Heinrich P, Ru J, Ghimire S, Miltiados O, Lindner S, Tiefgraber M, Gödel S, Eismann T, Schwarz A, Göttert S, Jarosch S, Steiger K, Schulz C, Gigl M, Fischer JC, Janssen K-P, Quante M, Heidegger S, Herhaus P, Verbeek M, Ruland J, van den Brink MRM, Weber D, Edinger M, Wolff D, Busch DH, Kleigrewe K, Herr W, Bassermann F, Gessner A, Deng L, Holler E, Poeck H. Bacteria and bacteriophage consortia are associated with protective intestinal metabolites in patients receiving stem cell transplantation. *Nat Cancer.* 2024;5(1):187–208. doi:10.1038/s43018-023-00669-x Cited in: PubMed; PMID 38172339.
 104. David LA, Materna AC, Friedman J, Campos-Baptista MI, Blackburn MC, Perrotta A, Erdman SE, Alm EJ. Host lifestyle affects human microbiota on daily timescales. *Genome Biol.* 2014;15(7):R89. doi:10.1186/gb-2014-15-7-r89 Cited in: PubMed; PMID 25146375.
 105. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veeken J, deRoos P, Liu H, Cross JR, Pfeffer K, Coffey PJ, Rudensky AY. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature.* 2013;504(7480):451–5. doi:10.1038/nature12726 Cited in: PubMed; PMID 24226773.
 106. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T, Takahashi M, Fukuda NN, Murakami S, Miyauchi E, Hino S, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y, Lockett T, Clarke JM, Topping DL, Tomita M, Hori S, Ohara O, Morita T, Koseki H, Kikuchi J, Honda K, Hase K, Ohno H. Commensal microbe-

- derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*. 2013;504(7480):446–50. doi:10.1038/nature12721 Cited in: PubMed; PMID 24226770.
107. Kreisel W, Dahlberg M, Bertz H, Harder J, Potthoff K, Deibert P, Schmitt-Graeff A, Finke J. Endoscopic diagnosis of acute intestinal GVHD following allogeneic hematopoietic SCT: a retrospective analysis in 175 patients. *Bone Marrow Transplant*. 2012;47(3):430–8. doi:10.1038/bmt.2011.137 Cited in: PubMed; PMID 21706064.
108. Sharaf RN, Shergill AK, Odze RD, Krinsky ML, Fukami N, Jain R, Appalaneni V, Anderson MA, Ben-Menachem T, Chandrasekhara V, Chathadi K, Decker GA, Early D, Evans JA, Fanelli RD, Fisher DA, Fisher LR, Foley KQ, Hwang JH, Jue TL, Ikenberry SO, Khan KM, Lightdale J, Malpas PM, Maple JT, Pasha S, Saltzman J, Dominitz JA, Cash BD. Endoscopic mucosal tissue sampling. *Gastrointest Endosc*. 2013;78(2):216–24. doi:10.1016/j.gie.2013.04.167 Cited in: PubMed; PMID 23867371.
109. Kreft A, Russo A, Lux S, Waiz L, Seidmann L, Faber J, Kirkpatrick CJ. Apoptosis of ileal crypt epithelia after allogeneic bone marrow transplantation without graft-versus-host disease. *Clin Case Rep*. 2015;3(5):298–300. doi:10.1002/ccr3.227 Cited in: PubMed; PMID 25984309.
110. Härtig W. Immunologie: Histochemie: Fluorochromierte Antikörper und- (Strept-)avidin-Konjugate [Immunology: Histochemistry; Fluorochromated antibodies and (strept-)avidin conjugates] [Internet]. Hamburg. 2005 [updated 2005 Jun 24; cited 2023 Jun 30]; [8 p.]. Available from: https://www.dianova.com/downloads/Im2AK/dianova_IF-Histo_002.pdf
111. Jarosch S, Köhlen J, Sarker RSJ, Steiger K, Janssen K-P, Christians A, Hennig C, Holler E, D'Ippolito E, Busch DH. Multiplexed imaging and automated signal quantification in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by ChipCytometry. *Cell Rep Methods*. 2021;1(7):100104. doi:10.1016/j.crmeth.2021.100104 Cited in: PubMed; PMID 35475000.
112. Jarosch S, Köhlen J, Ghimire S, Orberg ET, Hammel M, Gaag D, Evert M, Janssen K-P, Hiergeist A, Gessner A, Weber D, Meedt E, Poeck H, D'Ippolito E, Holler E, Busch DH. Multimodal immune cell phenotyping in GI biopsies reveals microbiome-related T cell modulations in human GvHD. *Cell Rep Med*. 2023;4(7):101125. doi:10.1016/j.xcrm.2023.101125 Cited in: PubMed; PMID 37467715.
113. Jenq RR, Taur Y, Devlin SM, Ponce DM, Goldberg JD, Ahr KF, Littmann ER, Ling L, Gobourne AC, Miller LC, Docampo MD, Peled JU, Arpaia N, Cross JR, Peets TK, Lumish MA, Shono Y, Dudakov JA, Poeck H, Hanash AM, Barker JN, Perales M-A, Giralto SA, Pamer EG, van den Brink MRM. Intestinal *Blautia* Is Associated with Reduced Death from Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(8):1373–83. doi:10.1016/j.bbmt.2015.04.016 Cited in: PubMed; PMID 25977230.
114. Mathewson ND, Jenq R, Mathew AV, Koenigsknecht M, Hanash A, Toubai T, Oravec-Wilson K, Wu S-R, Sun Y, Rossi C, Fujiwara H, Byun J, Shono Y, Lindemans C, Calafiore M, Schmidt TM, Honda K, Young VB, Pennathur S, van den Brink M, Reddy P. Gut microbiome-derived metabolites modulate intestinal epithelial cell damage and mitigate

- graft-versus-host disease. *Nat Immunol.* 2016;17(5):505–13. doi:10.1038/ni.3400 Cited in: PubMed; PMID 26998764.
115. Golob JL, DeMeules MM, Loeffelholz T, Quinn ZZ, Dame MK, Silvestri SS, Wu MC, Schmidt TM, Fiedler TL, Hoostal MJ, Mielcarek M, Spence J, Pergam SA, Fredricks DN. Butyrogenic bacteria after acute graft-versus-host disease (GVHD) are associated with the development of steroid-refractory GVHD. *Blood Adv.* 2019;3(19):2866–9. doi:10.1182/bloodadvances.2019000362 Cited in: PubMed; PMID 31585950.
116. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature.* 2007;449(7165):1003–7. doi:10.1038/nature06196 Cited in: PubMed; PMID 17934449.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen, die mich bei der Durchführung und Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben, meinen großen Dank aussprechen.

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Matthias Evert für die Möglichkeit am Institut für Pathologie zu promovieren bedanken. Ebenfalls bedanken möchte ich mich für seine Bereitschaft, die Begutachtung dieser Arbeit zu übernehmen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Ernst Holler, Arbeitsgruppenleiter für die experimentelle Knochenmarktransplantation an der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III, für die umfassende und ausgezeichnete Betreuung, die hervorragende Unterstützung bei der statistischen Auswertung, die unzähligen Denkanstöße, das Beantworten all meiner Fragen und die Korrektur meiner Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Betreuerin Frau Dr. Katrin Hippe für die Unterstützung bei der Biopsienauswahl, die geduldige Einführung in die histopathologische Auswertung, die gewissenhafte Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten und die differenzierte Korrektur meiner Dissertation.

Ein großer Dank geht auch an Frau Doris Gaag für die Betreuung und Hilfe bei der Färbung im Labor und das zügige Beantworten fachspezifischer Fragen. Ihre Expertise und Sorgfalt haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. In diesem Zuge bedanke ich mich beim gesamten Team der Immunhistochemie des Instituts für Pathologie am Universitätsklinikum Regensburg unter der Leitung von Herrn Frank Rey für die Mithilfe bei den Färbungen.

Gleicher Dank gilt Frau Dr. Sakhila Ghimire aus der Arbeitsgruppe von Prof. Holler für das Bereitstellen der Daten zur PCR-Analyse und dem ein oder anderen Denkanstoß.

Ein weiterer Dank gilt Frau Dr. Daniela Weber und ihrem Team für das entgegengebrachte Vertrauen und die Möglichkeit zur Einsicht der klinischen Patientendaten.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Mutter bedanken, die mich während meines gesamten Studiums und dem Entstehungsprozess dieser Arbeit unterstützt und immer wieder motiviert hat.

8 Eidesstaatliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 07.04.2025

Marina Stempfhuber