



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

Untersuchungen zum Einfluss von Antibiotika auf die
Entstehung intestinaler Barrierestörungen bei Mäusen
mit diätinduzierter NAFLD

verfasst von / submitted by

Katja Csarmann, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Master of Science (MSc)

Wien, 2021 / Vienna 2021

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
Degree programme code as it appears on
The student record sheet:

UA 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt /
Degree programme as it appears on
The student record sheet:

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von / Supervisor:

Univ. -Prof. Dipl. oec. Troph. Dr. Ina Bergheim, Privatdoz.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Ina Bergheim für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und für die Betreuung meiner Masterarbeit bedanken. Vielen Dank für die intensive wissenschaftliche Unterstützung und die zahlreichen konstruktiven Tipps während der Durchführung und Erstellung meiner Arbeit.

Außerdem möchte ich einen großen Dank an die gesamte Arbeitsgruppe aussprechen, da ich immer um Hilfe bitten konnte und eine tolle Arbeitsatmosphäre genossen habe.

Besonders möchte ich mich hiermit bei Annette Brandt bedanken, die mich intensiv unterstützt hat und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Danke auch für den Zuspruch und die Geduld wenn Versuche nicht direkt auf Anhieb funktioniert haben.

Außerdem möchte ich mich bei Anja Baumann, Finn Jung, Beate Gärtner, Katharina Burger, Raphaela Staltner und Victor Manuel Sánchez Juárez bedanken, die für meine Fragen immer ein offenes Ohr hatten. Mein Dank gilt auch meinen Kolleginnen Franziska Kromm, Anna Weichenberger, Julia Jelleschitz und Sophie Haselsteiner, für den tollen Austausch und die angenehme Zeit und Zusammenarbeit im Labor.

Besonders möchte ich mich bei meiner Familie, vor allem meinen Eltern Birgit und Franz bedanken, die mich während meines gesamten Studiums liebevoll unterstützt haben und immer an mich geglaubt haben und für mich da waren. Hiermit möchte ich auch meinem Freund Daniel ganz besonders danken, der mich immer bestärkt hat und für mich da war. Ohne euch hätte ich das nicht geschafft.

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung.....	1
1.1. Prävalenz, Pathogenese und Ursachen der nicht-alkoholbedingten Fettlebererkrankung	1
1.2. Der Darm – das Mikrobiom und die Darmbarriere	4
1.3. Fragestellung und Ziel der Arbeit	9
2. Material	10
2.1. Versuchstierhaltung	10
2.2. Gewebepräparation (Einbettung und Anfertigung von Gewebeschnitten).....	10
2.3. Histologische und immunhistochemische Färbungen	11
2.4. Messung der Lipidperoxidation - TBARS	13
2.5. Proteinbestimmung nach Bradford.....	14
2.6. RNA Isolation und quantitative mRNA Expressions Analyse.....	14
2.7. Xylose Messung	15
2.8. Quantitativer Proteinnachweis – Western Blot	16
2.9. Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	19
2.10. Software zur allgemeinen Ergebnisauswertung.....	21
3. Methoden	22
3.1. Aufbau des Tierversuchs, Haltung.....	22
3.2. Gewebepräparation – Paraffineinbettung und Anfertigung histologischer Schnitte	23
3.3. Histologische Färbungen	24
3.4. Messung der Lipidperoxidation des Lebergewebes – TBARS.....	28
3.5. Proteinbestimmung nach Bradford.....	30
3.6. Analyse mRNA Expression von F4/80 des Lebergewebes.....	31
3.7. Bestimmung der Darmpermeabilität mittels Xylose Assay.....	34
3.8. Bestimmung der Proteinkonzentration von Occludin des Dünndarmgewebes mittels Western Blot	35
3.9. Statistische Auswertung	38
4. Ergebnisse	39
4.1. Einfluss der Fütterung einer Fett- Fruktosereichen Diät und der oralen Gabe von Antibiotika auf die Nahrungsaufnahme, hepatische Fetteinlagerung und Parameter der Leberschädigung	39
4.2. Einfluss der Fütterung einer Fett- Fruktosereichen Diät und der oralen Gabe von Antibiotika auf die Anzahl neutrophiler Granulozyten, F4/80 mRNA Expression und die TBARS Konzentration im Lebergewebe	42
4.3. Einfluss der Fütterung einer Fett- Fruktosereichen Diät und der oralen Gabe von Antibiotika auf Veränderungen der intestinalen Darmpermeabilität	44

4.4. Einfluss der Fütterung einer Fett- Fruktosereichen Diät und der oralen Gabe von Antibiotika auf die Anzahl an Becherzellen und die Morphologie im Duodenum	47
5. Diskussion	50
5.1. Das Mausmodell zur Untersuchung molekularer Mechanismen der NAFLD.....	50
5.2. Einfluss einer fett- und fruktosereichen Diät auf die NAFLD Entstehung im Mausmodell	52
5.3. Die gleichzeitige Gabe von Antibiotika schützt vor der Entstehung der diätinduzierten NAFLD im Mausmodell.....	52
Fazit	58
Zusammenfassung.....	59
Summary	60
Literaturverzeichnis.....	61
Anhang	72
Selbstständigkeitserklärung	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gruppeneinteilung der Versuchstiere	22
Tabelle 2: Schritte der Paraffineinbettung.....	24
Tabelle 3: Semiquantitative Auswertung der Steatose nach dem NAS	25
Tabelle 4: Entparaffinierung und Rehydrierung Naphthol AS-D-Chloracetat Esterase Färbung	25
Tabelle 5: Entparaffinierung und Rehydrierung Alicanblau-PAS Färbung	27
Tabelle 6: Dehydrierung Alicanblau-PAS-Färbung	27
Tabelle 7: Schritte der ZO-1 Proteinfärbung	28
Tabelle 8: Herstellung Standardverdünnungsreihe TBARS	29
Tabelle 9: Herstellung Standardverdünnungsreihe Bradford-Bestimmung.....	30
Tabelle 10: Mastermix (cDNA-Synthese).....	32
Tabelle 11: cDNA-Synthese	32
Tabelle 12: Primer Sequenz Information	33
Tabelle 13: Protokoll der einzelnen PCR Zyklen	33
Tabelle 14: Xylose-Standards für den D(+)-Xylose Assay	34
Tabelle 15: Zusammensetzung der Trenngele, Angaben für 2 Gele bei 1mm Spacer	36
Tabelle 16: Zusammensetzung der Sammelgele, Angaben für 2 Gele bei 1mm Spacer.....	36
Tabelle 17: Zusammenfassung Bestimmung der spezifischen Proteinkonzentration	38
Tabelle 18: Mittlere Nahrungsaufnahme, Start- und Endgewicht sowie Lebergewicht	40
Tabelle 19: Detaillierte Zusammensetzung der Kontrolldiät und der FFr-Diät	72
Tabelle 20: Entparaffinierung und Rehydrierung H&E Färbung.....	74
Tabelle 21: Eosin Färbung	75
Tabelle 22: Herstellung Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (KRH-Puffer)	77
Tabelle 23: Lösungen für den Western Blot.....	78

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der verschiedenen Stadien der NAFLD-Erkrankung	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Interaktion von Darmbarriere und Leber in der Pathogenese der NAFLD.....	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Hauptkomponenten der epithelialen interzellulären Verbindungen.....	7
Abbildung 4: Schema des Versuchsaufbaus.....	23
Abbildung 5: Aufbau des Blottingsandwiches.....	37
Abbildung 6: Einfluss der Fütterung einer Fett- und Fruktosereichen Diät und einer zusätzlichen Antibiotikagabe auf den NAFLD-Activity Score	41
Abbildung 7: Einfluss der Fütterung einer Fett- und Fruktosereichen Diät und einer zusätzlichen Antibiotikagabe auf die Zahl der neutrophilen Granulozyten im Lebergewebe.....	43
Abbildung 8: Einfluss der Fütterung einer Fett- und Fruktosereichen Diät und einer zusätzlichen Antibiotikagabe auf die mRNA Expression von F4/80 im Lebergewebe.....	43
Abbildung 9: Einfluss der Fütterung einer Fett- und Fruktosereichen Diät und einer zusätzlichen Antibiotikagabe auf die TBARS Konzentration im Lebergewebe.	44
Abbildung 10: Einfluss der Fütterung einer Fett- und Fruktosereichen Diät und einer zusätzlichen Antibiotikagabe auf die Darmpermeabilität in einem Ex vivo Modell.....	45
Abbildung 11: Einfluss der Fütterung einer Fett- und Fruktosereichen Diät und einer zusätzlichen Antibiotikagabe auf das Tight Junction Protein Occludin im Duodenum.	45
Abbildung 12: Einfluss der Fütterung einer Fett- und Fruktosereichen Diät und einer zusätzlichen Antibiotikagabe auf das Tight Junction Protein ZO-1 im Duodenum.....	46
Abbildung 13: Einfluss der Fütterung einer Fett- und Fruktosereichen Diät und einer zusätzlichen Antibiotikagabe auf die Anzahl an Becherzellen im Duodenum.....	48
Abbildung 14: Einfluss der Fütterung einer Fett- und Fruktosereichen Diät und einer zusätzlichen Antibiotikagabe auf die Morphologie im Duodenum..	49
Abbildung 15: Schematische Darstellung des Einflusses einer Fett-und fruktosereichen Diät und einer gleichzeitigen Antibiotikagabe auf die NAFLD Entstehung.	58

Abkürzungsverzeichnis

AB	Antibiotikum
AJ	Adherent Junctions
AMV	Vogel-Myeloblastose-Virus
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
BL	Blockierlösung
CAF	Citrat-Aceton-Formalin-Lösung
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
DPBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
FFr	Fett- und Fruktosereich
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCl	Salzsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
H&E	Hämatoxylin & Eosin
IGEPAL	Octylphenoxypolyethoxyethanol
IL	Interleukin
K	Kontrolle
KG	Körpergewicht
KRH	Krebs-Hepes-Puffer
LPS	Lipopolysaccharide
MDA	Malondialdehyd
MMP	Magermilchpulver
MOPS	3-(N-)Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
n	Anzahl

NaCl	Natriumchlorid
NAFDL	Nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung
NAS	NAFLD-Acitivity-Score
NASH	Nicht-alkoholbedingte Steatohepatitis
PAK	Primärer Antikörper
PAS	Perjodsäure-Schiffs-Reaktion
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	Radioimmunpräzipitationsassay
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
sAK	Sekundärer Antikörper
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
SPF	Spezifisch-pathogenfrei
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung-Polysorbat 20
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TJ	Tight Junctions
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ZEN	Zeiss Efficient Navigation
ZO-1	Zonula Occludens

1. Einleitung

1.1. Prävalenz, Pathogenese und Ursachen der nicht-alkoholbedingten Fettlebererkrankung

Prävalenz und Pathogenese der nicht-alkoholbedingten Fettlebererkrankung

Die weltweit hohe Prävalenz von Übergewicht und Adipositas führte dazu, dass seit 1980 das Auftreten der Nicht-alkoholbedingten Fettlebererkrankung (engl.: non-alcoholic fatty-liver disease = NAFLD) rapide gestiegen ist [1]. Global gesehen wird die Prävalenz der NAFLD auf etwa 25% geschätzt, womit sie zu der häufigsten Lebererkrankung weltweit zählt [2].

Definiert wird die NAFLD als Anreicherung von Leberfett wovon über 5% der Hepatozyten betroffen sind, und unter Ausschluss eines signifikanten Alkoholkonsum (bei Männern weniger als 20g pro Tag, bei Frauen weniger als 10g pro Tag), einer Virusinfektion, oder einer anderen spezifischen Ätiologie einer Lebererkrankung [3].

Die NAFLD umfasst ein pathologisches Krankheitsspektrum, das über eine Steatose, Steatohepatitis, Steatohepatitis mit Fibrose, Zirrhose bis hin zu einem hepatzellulären Karzinom reicht [4]. Die Steatohepatitis (engl.: non-alcoholic steatohepatitis = NASH) selbst kann nur durch eine Leberbiopsie am eindeutigsten diagnostiziert werden [5]. Bei dieser reversiblen Form der Leberschädigung sind wesentliche pathologische Mechanismen, wie die Fettakkumulierung und eine gleichzeitige Degeneration der Hepatozyten, erkennbar [6]. Außerdem entsteht vermehrt oxidativer Stress, womit eine entzündliche Reaktion einhergeht, welche insbesondere in den Makrophagen sichtbar ist [6]. Schreitet die Steatohepatitis zur Fibrose voran, kommt es zu narbigen Bindegewebsvermehrungen im Lebergewebe, wodurch die Funktion der Leber weiter eingeschränkt wird [2, 5]. Mit jedem Stadium steigt auch das Risiko für die Entstehung eines hepatzellulären Karzinom (engl.: hepatocellular carcinoma = HCC) [4]. Abbildung 1 soll hierzu veranschaulichen, wie die einzelnen Stadien der NAFLD zusammenhängen und deren Progression darstellen.

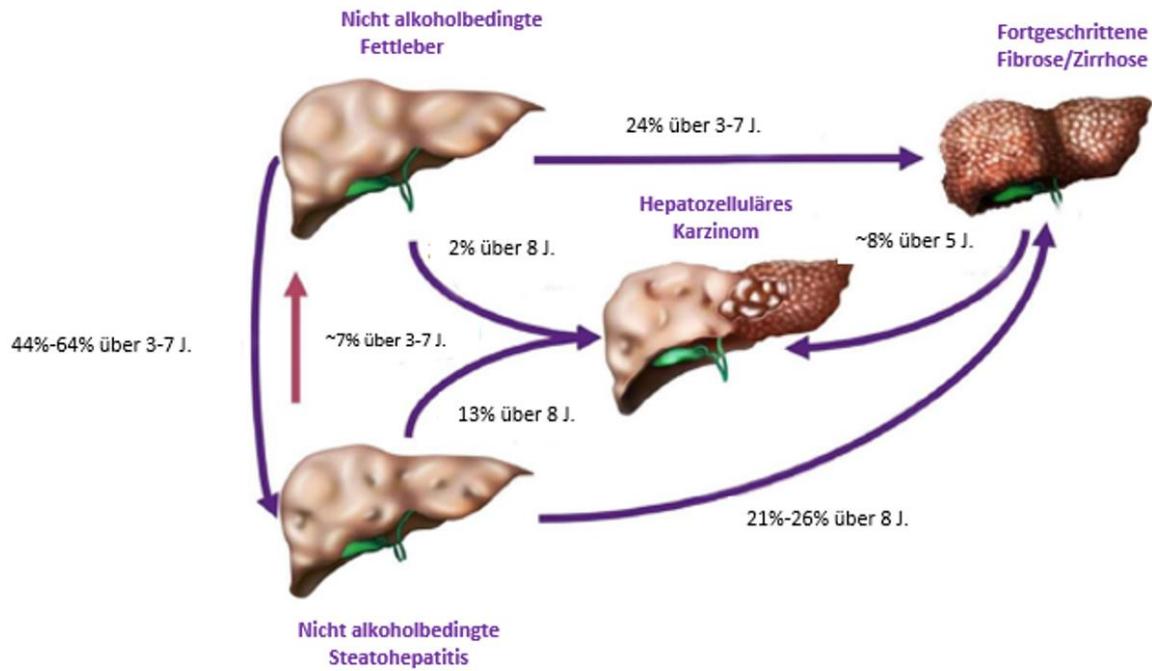


Abbildung 1: Schematische Darstellung der verschiedenen Stadien der NAFLD-Erkrankung (modifiziert nach [7]). Die nicht-alkoholbedingte Fettleber schreitet langsamer und seltener zu höhergradigen NAFLD Stadien voran. Besteht jedoch bereits eine Steatohepatitis, so kommt es oft zu schwereren und schnelleren Progressionen. Bei der Steatohepatitis handelt es sich um ein reversibles Stadium [7].

Risikofaktoren der NAFLD

In Europa sind mehr als 50% der Erwachsenen von Übergewicht oder Fettleibigkeit betroffen, was den größten Risikofaktor für die NAFLD Entstehung darstellt [3]. Daten zeigen eine weiter steigende Prävalenz, weswegen die Prävention dieser Risikofaktoren in Zukunft ein wesentliches Ziel der öffentlichen Gesundheit ist [3].

Das Risiko der Progression von einer Steatose zur Steatohepatitis hängt von vielen Faktoren ab, wie zum Beispiel dem Lebensstil des Patienten, genetischen Faktoren, aber auch das Vorhandensein des metabolischen Syndroms stellt einen großen Risikofaktor dar [5]. Personen, die an Diabetes mellitus Typ 2 leiden, haben ein deutlich höheres Risiko für das Fortschreiten der NAFLD als Personen ohne Insulinresistenz [8]. Eine Insulinresistenz führt dazu, dass es in der Leber zu einer erhöhten Insulinexposition kommt. Studien haben gezeigt, dass die Hyperinsulinämie die Fettsäureaufnahme stimuliert und es dadurch zu einer erhöhten Triglyceridsynthese in der Leber kommt [9]. Für eine Dysbalance im Fettsäurestoffwechsel wurde gezeigt, dass sie die Entwicklung und Progression der NAFLD

begünstigt [10]. Diabetes mellitus Typ 2 wirkt sich auch in den fortgeschrittenen Stadien der NAFLD negativ aus. Studien konnten einen Zusammenhang zwischen der Diabetesprävalenz und dem Fortschreiten zu einem HCC feststellen [11].

Studien weisen darauf hin, dass die Ernährung ein wichtiger Faktor in der Entwicklung der NAFLD ist und auch mit dem Fortschreiten zur NASH in Verbindung steht. Der Zusammenhang ist relativ komplex und geht über die Gesamtenergiezufuhr hinaus. Eine westliche Ernährung die reich an Fett, Cholesterin und Zucker ist, wird häufig bei NAFLD Patienten beobachtet [12, 13]. Häufig konsumieren NAFLD Patienten auch geringe Mengen an Milch- und Vollkornprodukten sowie geringe Mengen von Gemüse [14]. Ein Bewegungsmangel und ein hoher Konsum von Fleisch, Fett und Süßwaren führt häufig zu einer zu hohen Kalorienzufuhr, was die NAFLD Entstehung begünstigen kann [14]. Vor allem Fruktose scheint einen wesentlichen Einfluss bei der Entstehung der NAFLD zu spielen, und konnte in Tierexperimentellen Studien und Humanstudien mit der Entstehung und Progression der NAFLD in Zusammenhang gebracht werden [15, 16, 17].

Nach derzeitigem Wissensstand gibt es keinen spezifisch medikamentösen Therapieansatz zur Behandlung der NAFLD [5]. Der primäre Ansatz konzentriert sich auf der Kontrolle der zugrunde liegenden Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, Fettleibigkeit und anderen Komorbiditäten. Änderungen des Lebensstils, durch eine Modifikation der Ernährung und körperlicher Aktivität, haben sich als etablierte Therapiestrategien herausgestellt [18]. Darüber hinaus ist bekannt, dass ein signifikanter Gewichtsverlust, unabhängig vom zugrunde liegenden Mechanismus, sich positiv auf die NASH auswirkt, wobei ein anhaltender Gewichtsverlust von 10% mit einer Verringerung der Leberschädigung verbunden ist [19, 20]. Ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen und insbesondere der Wirkung einzelner Nahrungsbestandteile wäre daher hilfreich, um neue Behandlungsstrategien zu entwickeln.

1.2. Der Darm – das Mikrobiom und die Darmbarriere

Das Mikrobiom, der menschliche Organismus und Krankheiten

Neben den erwähnten Risikofaktoren wie Insulinresistenz und Übergewicht scheint auch das Mikrobiom und die Darmbarriere bei der Entstehung der NAFLD eine entscheidende Rolle zu spielen [21]. Das Darmmikrobiom umfasst das kollektive Genom von etwa 100 Billionen Mikroorganismen im Magen-Darm-Trakt, und scheint eine wichtige Rolle als Modulator des Gesundheitszustandes des Menschen zu spielen [22]. Die Zusammensetzung des Mikrobioms unterscheidet sich wesentlich zwischen Individuen und hängt mit zahlreichen Umwelteinflüssen und der genetischen Disposition zusammen [23]. Bei der Geburt hängt die mikrobielle Besiedelung sehr davon ab, ob eine natürliche Entbindung oder ein Kaiserschnitt stattgefunden hat [24]. Auch das Stillen hat einen wesentlichen Einfluss auf die Mikrobiota, und erst mit Einführung von fester Nahrung wird der Darm von jenen Bakterien dominiert, die für die Kohlenhydrat-, Protein-, und Fettverwertung notwendig sind [25].

Das Mikrobiom verändert sich aber nicht nur am Beginn des Lebens, sondern ist ständig in Interaktion mit der Umwelt und somit auch Veränderungen ausgesetzt. So sind zum Beispiel auch die geografische Lage und die Ethnizität nachweisliche Determinanten für die Vielfalt und Zusammensetzung der Mikrobiota [26]. Der wahrscheinlich größte Einflussfaktor ist die Ernährung. Vor allem ein hoher Verzehr von Ballaststoffen aus Obst, Gemüse und Getreide wird mit einer vielfältigeren Mikrobiota in Verbindung gebracht [27]. Stress, sowie die Einnahme von Medikamenten kann zu Veränderungen der Darmmikrobiota führen, wodurch es zu einer Dysregulation der intestinalen Homöostase kommen kann. In weiterer Folge kommt es so zu einer erhöhten Anfälligkeit für Krankheiten [28]. Dieses Ungleichgewicht kann zu Funktionsstörungen des intestinalen Immunsystems führen und wird im Kontext mit einer Vielzahl von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa, diskutiert. [29]. Neuere Studien konnten auch einen Zusammenhang zwischen Veränderungen der Darmmikrotazusammensetzung und systemischen Erkrankungen wie Arthritis, Atherosklerose, Diabetes mellitus, Lebererkrankungen und Fettleibigkeit feststellen [30,31].

Das Mikrobiom als Einflussfaktor auf die NAFLD

Wie zuvor bereits erwähnt, wird der Darm von einer Vielzahl an Bakterien besiedelt. Ein hier herrschendes Ungleichgewicht wird als Dysbiose bezeichnet, was im Kontext mit der Entstehung zahlreicher Krankheiten diskutiert wird. Auch die NAFLD Entstehung steht im Zusammenhang mit einem gestörten Mikrobiom [32]. Eine Studie von Wang et al., verglich das Mikrobiom von NAFLD-Patienten mit gesunden Probanden und zeigte, dass NAFLD Patienten bis zu 20% mehr Bacteriodetes und bis zu 24% weniger Firmicutes Bakterien aufwiesen, im Vergleich zu gesunden Personen [33]. Für eine verringerte Prävalenz von Firmicutes wird diskutiert, dass weniger kurzkettige-Fettsäurenproduzierende Bakterien im Darm vorhanden sind. In einer Studie von Loomba et al., wurde gezeigt, dass es während des Fortschreitens der NAFLD zu einer Zunahme von Proteobakterien und einer Abnahme von Firmicutes Bakterien kommt, was darauf hindeutet, dass das Darmmikrobiom auch während des Fortschreitens der NAFLD nicht stabil dysbiotisch ist [34].

Die intestinale Barriere als Einflussfaktor auf die NAFLD

Häufig wird bei NAFLD Patienten nicht nur eine Dysbiose des Mikrobioms beobachtet, sondern auch eine erhöhte intestinale Permeabilität gemessen [35]. Studien weisen inzwischen darauf hin, dass Veränderungen der intestinalen Barriere direkt in der Entwicklung und dem Voranschreiten der NAFLD involviert sind. (siehe Abbildung 2) [36].

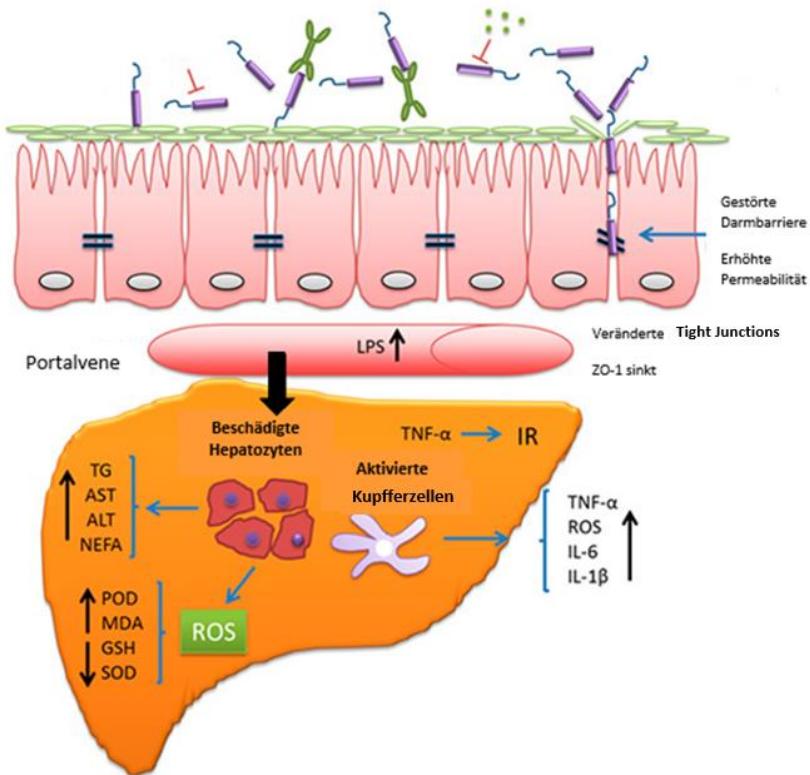


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Interaktion von Darmbarriere und Leber in der Pathogenese der NAFLD (modifiziert nach [36]). Eine gestörte Darmbarriere geht mit einer erhöhten Translokation von bakteriellen Endotoxin einher. Über die Portalvene gelangt das bakterielle Endotoxin in die Leber und führt dort zu einer Aktivierung von Kupfferzellen. Diese Aktivierung induziert verschiedene Zytokine wie IL-1 β , IL-6 oder TNF-Alpha. Diese können Veränderungen der Hepatozyten hervorrufen und zu einer gesteigerten Lipidakkumulation in der Leber führen [36].

Die intestinale Barriere ist eine komplexe Struktur welche aus mikrobiologischer, chemischer, physischer und immunologischer Barriere besteht. Diese Barrieren spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Stabilität der internen und externen Umgebung [36]. Die gastrointestinale Schleimhaut hat die komplexe Aufgabe als semipermeable Barriere zu fungieren. Dabei muss die Absorption von Nährstoffen und die Immunerkennung ermöglicht werden und gleichzeitig der Transport von potenziell schädlichen Antigenen und Mikroorganismen verhindert werden [37]. Dies wird durch das Zusammenspiel von Strukturkomponenten und molekularen Wechselwirkungen ermöglicht, um die Darmintegrität und Immunhomöostase aufrechtzuerhalten [37]. Durch Entzündungen oder bakterielle Überbesiedelung kommt es zu einer erhöhten Permeabilität der Darmschleimhautbarriere wodurch Darmbakterien und deren

Stoffwechselprodukte in den Blutkreislauf zur Leber gelangen können [36]. Der Transport von Molekülen zwischen intestinalen Epithelzellen wird durch verschiedene Verbindungskomplexe der physischen Membran reguliert. Dieser parazelluläre Transport ist essenziell für eine normale Darmfunktion und weist deswegen ein hohes Maß an struktureller und funktioneller Spezialisierung auf [38]. Die drei wichtigsten membranüberspannenden Strukturen sind Tight Junctions (TJ), Adherens Junctions (AJ) und Desmosomen [39]. Tight Junctions liegen apikal und decken den Interzellularraum weitestgehend ab. Sie bestehen aus Transmembranproteinen, wie zum Beispiel Claudin, Occludin und aus peripheren Membranproteinen wie Zonula Occludens [40]. Adherens Junctions stellen zusammen mit den Desmosomen starke Haftbindungen dar, um die Integrität des Epithels aufrechtzuerhalten (siehe Abbildung 3) [41]. Sowohl Tight Junctions als auch Adherens Junctions sind mit dem Peri-Junction-Ring von Actin und Myosin verbunden, der die Regulation der Junctions über das Zytoskelett ermöglicht [42]. Die Darmbarriere sollte deshalb nicht als statische Struktur angesehen werden, sondern ist dynamisch und reagiert sowohl auf interne als auch auf externe Reize [42].

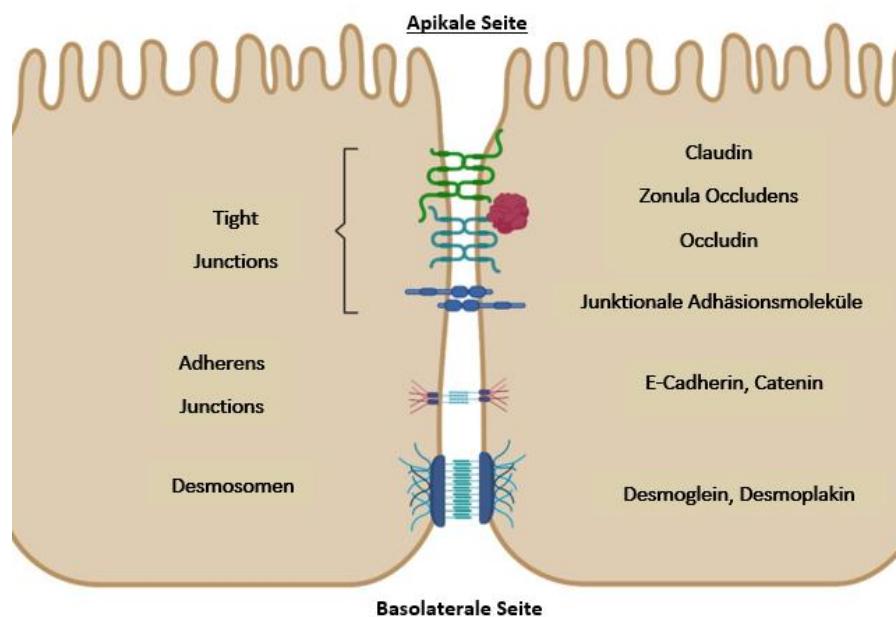


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Hauptkomponenten der epithelialen interzellulären Verbindungen (modifiziert nach [41]). Desmosomen stellen die stärkste Verbindung zwischen Epithelzellen dar. Die Transmembranproteine E-Cadherin und Catenin bilden die sogenannten Adherens Junctions und sind für die Zell-Zell-Adhäsion und die Aufrechterhaltung der Zellschichtstruktur verantwortlich. Adherens Junctions sind auch an der intrazellulären Signalübertragung beteiligt, um die Tight-Junction Expression zu induzieren. Tight Junctions gelten als Hauptbarriere gegen die parazelluläre Diffusion und sind nicht direkt für die Zellschichtstruktur verantwortlich [41].

Studien von Sellmann et al., und Brandt et al., weisen darauf hin, dass die Entstehung der diätinduzierten NAFLD mit einem Verlust an Tight Junction Proteinen einhergeht [16, 17]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Entzündungen der Darmschleimhaut und eine Zerstörung der Darmepithelbarriere zur Translokation mikrobieller Produkte und damit auch zur Induktion der NAFLD führen kann [16, 17]. Somit gelangen Metabolite von LPS über das Portalsystem zur Leber und Entzündungsfaktoren wie TNF-Alpha und Interleukin 6 werden freigesetzt [43]. Ob Funktionsstörungen der Darmbarriere ein primärer Defekt beim Fortschreiten der NAFLD sind oder nicht bleibt unklar. Eine an Mäusen mit milder Lebersteatose durchgeföhrte Studie von Gäbele et al. hat gezeigt, dass durch Dextran Sulfat-Natrium, welches ein schädliches Mittel für die Darmbarriere darstellt, die Leberentzündung und Fibrose Entstehung verstärkt wurde und LPS-Spiegel im portalen Blut erhöht waren [44]. Eine Studie von Luther et al., ebenfalls an Mäusen durchgeföhrte, fand heraus, dass die Leberschädigung der Entwicklung von Darmpermeabilitätsänderungen voraus ging [45]. Wie diese Prozesse auf den Menschen übertragbar sind, bleibt weiterhin unklar. Jedoch scheint die NASH-Progression mit Veränderungen der Darmpermeabilität zusammenzuhängen und somit auch die Pathogenese der NAFLD entscheidend mit zu beeinflussen [46].

1.3. Fragestellung und Ziel der Arbeit

Mit einer Prävalenz von bis zu 44% in der europäischen Bevölkerung und etwa 25% in der nordamerikanischen Population, stellt die Nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung inzwischen die häufigste Lebererkrankung weltweit dar [2, 3]. Molekulare Mechanismen, die der Entstehung unterliegen, sind trotz intensiver Forschung noch nicht vollständig geklärt. Aus diesem Grund sind auch die Behandlungsmöglichkeiten begrenzt und Therapien, die über die Veränderungen des Lebensstils und Ernährungsgewohnheiten hinaus gehen, sind noch nicht etabliert [47].

Veränderungen der Darmbarriere und des intestinalen Mikrobioms werden in Zusammenhang mit der Entstehung der NAFLD diskutiert. [48,49]. Die Ergebnisse mehrerer Studien weisen darauf hin, dass die Entstehung der NAFLD mit Veränderungen der intestinalen Barrierefunktion einhergehen. Dabei kommt es zur Verringerung von Tight Junctions Proteinen, sowie einem erhöhten LPS-Spiegel [17, 35, 50, 51, 52].

Die orale Gabe von Antibiotika konnte in tierexperimentellen Studien die Entstehung der NAFLD abmildern [16, 50, 53]. Es liegen jedoch auch gegenteilige Befunde vor [54]. Gründe dieser gegensätzlichen Ergebnisse sind bisher nicht geklärt. Der protektive Effekt ging mit weniger Endotoxin im Pfortaderblut und einer verminderten Produktion von TLR in der Leber einher [16, 50]. Offen ist, ob der Verlust der Darmbarrierefunktion kausal mit Veränderungen der intestinalen Bakterien zusammenhängt, d.h. ob auch der protektive Effekt von Antibiotika eher mit dem Verlust von Mikroorganismen und/oder dem Verlust von Mikroorganismen und einer Verbesserung der intestinalen Barriere zusammenhängt.

Ausgehend von diesem Hintergrund, liegt die zentrale Bedeutung der vorliegenden Arbeit in folgender Fragestellung:

Schützt die orale Gabe von Antibiotika vor der Entstehung der NAFLD? Und wenn ja, geht das mit einer Verbesserung der intestinalen Barrierefunktion einher?

2. Material

2.1. Versuchstierhaltung

Antibiotikum

Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Vancomycin Hydrochlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Gentamycinsulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Metronidazol	Abcam plc, Cambridge, UK
C57BL/6J Mäuse (männlich)	Janvier S.A.S., Le-Genest-Saint-Isle, Frankreich
Experimentalfutter	SSniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland
Kontrolldiät (S0514-E772)	
Fett und Fruktosereiche-Diät (S0514-E761)	
Pelletfutter (V1534-300)	SSniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland

2.2. Gewebepräparation (Einbettung und Anfertigung von Gewebeschnitten)

Brutschrank (für Paraffin)

Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach,
Deutschland

Einbettkassetten

Sanova Pharma GesmbH, Wien, Österreich

Einbettschälchen

Weckert Labortechnik, Kitzingen, Deutschland

Einbettstation: Cryo Console,

Microm International GmbH, Walldorf,

Dispensing Console, Thermal Console

Deutschland

AP250

Ethanol (C_2H_6O) ≥ 99,8%, vergällt

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Filterpapier (für Einbettkassetten)

MEDITE Medical GmbH, Burgdorf, Deutschland

Formalin (4%)

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Formaldehydlösung säurefrei 37%ig

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

(PBS-gepuffert)

Mikrotom Leica RM2245

Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar,

Deutschland

Objektträger Superfrost® plus

Labxperts GmbH, Klosterneuburg, Österreich

Paraffin – Paraplast® Plus™	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Paraffin-Streckbad GFL 1052	LAUDA-GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Roti Histol (C ₁₀ H ₁₈)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SB Einwegklingen	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Wärmeschrank – Thermo Scientific™	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Heratherm™ Compact	

2.3. Histologische und immunhistochemische Färbungen

Allgemeine Materialien und Geräte für Färbungen:

Deckgläschchen	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Digital Orbital Shaker	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Ethanol (C ₂ H ₆ O) ≥ 99,8%, vergällt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Entellan®	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Färbegestell Glas	Sanova Pharma GesmbH, Wien, Österreich
Färbeppette	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Färbeschale - StainTray™	Simport Scientific Inc., Quebec, Kanada
Färbetrog Kunststoff weiß	Sanova Pharma GesmbH, Wien, Österreich
Färbetrog Glas	Sanova Pharma GesmbH, Wien, Österreich
Fettstift – Super HT PAP Pen	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glasstab	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin Lösung, Gill No. 2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Objektträgerhalter Kunststoff blau	Sanova Pharma GesmbH, Wien, Österreich
Roti Histol (C ₁₀ H ₁₈)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Hämatoxylin und Eosin (H&E) Färbung:

Eosin Y Lösung Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen,
Deutschland

Naphthol AS-D Chloracetat Esterase – Färbung:

Aceton (C ₃ H ₆ O)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehydlösung säurefrei 37%ig	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Naphthol AS-D Chloracetat Esterase Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Wärmeschrank – Thermo Scientific™	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Heratherm™ Compact	
wässriges Eindeckmedium – CC Mount	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Alcianblau-PAS-Färbung:

Alcianblau 8 GS	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Essigsäure 100% (C ₂ H ₄ O ₂)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Perjodsäurelösung 1%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Schiffs-Reagenz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

ZO-1 Proteinfärbung im Duodenum:

Dako - DAB+ Chromogen	Agilent Technologies Österreich GmbH, Wien, Österreich
Dako - DAB+ Substrat Puffer	Agilent Technologies Österreich GmbH, Wien, Österreich
Dako - Labelled Polymer HRP Anti-Rabbit	Agilent Technologies Österreich GmbH, Wien, Österreich

Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) ≥ 99%, wasserfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl) ≥ 99,5%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) ≥ 99%, wasserfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl) ≥ 99,9%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Protease (Streptomyces griseus, P5147)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
ZO-1 Polyclonal Antibody	Invitrogen - Thermo Fisher Scientific GmbH, Massachusetts, USA

Auswertung Färbungen:

Mikroskop ZEISS Axiolab 5	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland
Mikroskop Leica DM6 B	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica Application Suite X	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland
ZEN Imaging-Software	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland

2.4. Messung der Lipidperoxidation - TBARS

3-(N-)Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ethylenediamintetraessigsäure (EDTA) IGEPAL ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_n\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}$)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl) ≥ 99,9%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$) (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Phosphatase Inhibitor Cocktail II	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail III	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail I	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Tetramethoxypropan ($C_7H_{16}O_4$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Thiobarbitursäure 0,67% ($C_4H_4N_2O_2S$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Trichloressigsäure ($C_2HCl_3O_2$)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.5. Proteinbestimmung nach Bradford

Protein Assay Dye Reagent	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Albumin Fraktion V (BSA) >98%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.6. RNA Isolation und quantitative mRNA Expressions Analyse

RNA Isolation

Chloroform ($CHCl_3$) ≥ 99,5%	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (C_2H_6O) ≥ 99,8%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol (C_3H_8O) ≥ 99,5%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
peqGOLD Trifast™ (Trizol)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
ROTIPURAN® Wasser	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

cDNA Synthese

AMV Reverse Transcriptase (15U)	Promega Cooperation, Madison, USA
dNTP Mix (10mM)	Promega Cooperation, Madison, USA
DLAB Mini Zentrifuge Typ D1008	DLAB Scientific Co., Ltd., Beijing, China
LifeECO Thermal cycler	Hangzhou Bioer Technology Co., Hangzhou, China

Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) (25 mM)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Multiply® μ Strip Pro 8-strip, 0,2 μ l	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Random Primer	Promega Cooperation, Madison, USA
Reverse Transkriptase Puffer	Promega Cooperation, Madison, USA
RNAsin	Promega Cooperation, Madison, USA
RNA/UV Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
ROTIPURAN® Wasser	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
RQ1 DNase Stop Solution	Promega Cooperation, Madison, USA
RQ1 RNase-Free DNase	Promega Cooperation, Madison, USA
RQ1 RNase-Free DNase 10x Reaction Buffer	Promega Cooperation, Madison, USA

RT-qPCR

CFX Connect™ Real- Time system	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
DLAB Mini Zentrifuge Typ D1008	DLAB Scientific Co., Ltd., Beijing, China
Forward Primer (18S, F4/80)	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
Hard Shell PCR Plates 96 well	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
iTaq™ Universal SYBR® Green	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Nuclease-freies Wasser	Promega Cooperation, Madison, USA
Reverse Primer (18S, F4/80)	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland

2.7.Xylose Messung

37% konzentrierte Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Benzoesäure ($C_7H_6O_2$)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Calciumchlorid-Dihydrat (anhydrous) ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
D (+)-Xylose ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HEPES (PUFFERAN® ≥ 99,5%) ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure 100% ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumsulfat (anhydrous, 99,5%) (MgSO_4)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Phloroglucin-Dihydrat ≥ 98% ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

2.8. Quantitativer Proteinnachweis – Western Blot

Materialien und Geräte

ChemiDoc™ Imaging Systems (XRS+System)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Extra Thick Blot Paper	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Gel Releasers	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Impuls Schweißgerät PM-FS-200-S	ALLPAX GmbH + Co. KG, Papenburg, Deutschland
Mini-PROTEAN® Casting Stand Gaskets	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Mini-PROTEAN® Glass Plates	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Mini-PROTEAN® Spacer Plates (1,5mm)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Mini-PROTEAN® System Comb 15 well	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA

Mini-PROTEAN® Tetra Cell Casting Stands & Clamps	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Mini-PROTEAN® Tetra Electrode Assembly	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell for Mini Precast Gels	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Multifunktionsrotor PS-M3D	Grant Instruments Ltd, Cambridge, UK
Orbi-Blotter™	Benchmark Scientific Inc, Sayreville, USA
Plastikkassetten	Laborbestand
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
PowerPac™ HC High-Current Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Schlauchfolie zum Einschweißen	ALLPAX GmbH + Co. KG, Papenburg, Deutschland
Trans Blot Turbo Transfer System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA

Chemikalien

2-β-Mercaptoethanol (C_2H_6OS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
37% konzentrierte Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid/Bis (30%) (C_3H_5NO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS) ($(NH_4)_2S_2O_8$)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT 100mM) ($C_4H_{10}O_2S_2$)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 100% ($C_2H_4O_2$)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA) (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol (C ₃ H ₈ O ₃)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
IGEPAL (C ₂ H ₄ O) _n C ₁₄ H ₂₂ O)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Magermilchpulver	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Methanol (CH ₃ OH)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS) (NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail III	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ponceau S (C ₂₂ H ₁₆ N ₄ O ₁₃ S ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Precision Plus Protein Standard	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Primärantikörper Occludin	Invitrogen - Thermo Fisher Scientific GmbH, Massachusetts, USA
Primärantikörper β-Actin	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA
Protease Inhibitor Cocktail I	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Sekundärantikörper Anti-Mouse IgG (HRP-linked)	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande

SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Tetramethylethyldiamin ($C_6H_{16}N_2$) (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS base)($C_4H_{11}NO_3$)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween® 20 ($C_{58}H_{114}O_{26}$)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

2.9. Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte

96-Well Platten	BRANDplates, BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Aluminiumblock (-20 °C)	Laborbestand
Bechergläser	Laborbestand
CryoCube F570h	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Falcon-Tubes (15ml, 50ml)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Feinwaage	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Flockeneisbereiter EF 103	Scotsman Industries Inc., Vernon Hills, USA
Flüssigstickstoff	Air Liquide Austria GmbH, Schwechat, Österreich
Flüssigstickstoffbehälter	KGW-Isotherm Karlsruher Glastechnisches Werk Schieder GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glastrichter	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Homogenisator - Potter	Laborbestand
Laborhandschuhe	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland
Laborstift	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Labortücher - Kimtech	Kimberly-Clark GmbH, Koblenz, Deutschland
Magnetheizrührer RSM 10 HS	Phoenix Instruments GmbH, Garbsen, Deutschland
Magnetstäbchen ROTILABO®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Mehrkanalpipette Research Plus® (100µl, 300µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Messbecher	Technischen Glaswerke Ilmenau GmbH, Ilmenau, Deutschland
Messzylinder (100ml, 1 Liter)	Laborbestand
Mixing Block MB - 102	Hangzhou Bioer Technology Co., Hangzhou, China
pH-Meter 420 A	Orion Research Inc., Jacksonville, USA
Microplate Reader SpectraMax M3	Molecular Devices GmbH, San Jose, USA
Pinzetten	Laborbestand
Pipettenspitzen (20µl, 100µl, 1000µl)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pufferwanne Kunststoff	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2ml) (Eppis)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel (2ml, hitzebeständig)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäßständer - ROTILABO®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Research Plus ® Pipetten (2,5µl, 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Schere	Laborbestand
Schwimmteile	Laborbestand
Serologische Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Stainless Steel Beads (5mm)	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Stoppuhr	Laborbestand
Styroporboxen	Laborbestand
TipOne Filterspitzen	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland
Tissue Lyser	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Trockeneis Nuggets	Linde Gas GmbH, Eggendorf, Österreich
Ultraschallbad Bandelin Sonorex Digital	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland

Ultraschallhomogenisator	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Vortex REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Wägeschälchen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge Z216 MK	HERMLE Labortechnik GmbH, Wehingen, Deutschland

2.10. Software zur allgemeinen Ergebnisauswertung

GraphPad Prism 7.0	GraphPad Software, Inc., San Diego, USA
Microsoft Office 365	Microsoft Corporation, Redmon, USA
SoftMax Pro7 Software	Molecular Devices GmbH, San Jose, USA

3. Methoden

3.1. Aufbau des Tierversuchs, Haltung

Die Gewebeproben der C57BL/6J Mäuse, die für die Untersuchungen notwendig waren, standen bereits vor Beginn der Masterarbeit zur Verfügung. Der Versuch wurde vom BMBWF genehmigt (Aktenzeichen: BMBWF-66.006/0019-V/3b/2018). Im Folgenden sind die Versuchsbedingungen und das Studiendesign kurz zusammengefasst.

Die tierexperimentelle Studie wurde mit männlichen C57BL/6J Mäuse von Janvier in der SPF-Haltung der Universität Wien unter standardisierten Bedingungen (12h-Hell-,12h-Dunkel Zyklus, Luftfeuchtigkeit ~ 55%, Raumtemperatur 24-25°C) durchgeführt. Wasser stand während des gesamten Versuchs ad libitum für alle Versuchsgruppen zur Verfügung. 1 Woche vor dem tatsächlichen Versuchsbeginn wurden die Versuchstiere an die Flüssigdiät adaptiert (siehe Abbildung 4). Danach erhielten die Mäuse (n=8/Gruppe, insgesamt 4 Gruppen) für 8 Wochen entweder eine flüssige Kontrolldiät oder eine fett- und fruktosereiche Diät (Zusammensetzung der Diäten siehe Anhang Tabelle 19) mit oder ohne zusätzlicher Antibiotikagabe (siehe Tabelle 1). Die beiden Kontrollgruppen sowie die beiden fett- und fruktosereich gefütterten Gruppen wurden jeweils isokalorisch gefüttert. Nach 8 Wochen war der Versuch beendet und die Mäuse wurden narkotisiert, getötet und Gewebeproben entnommen, um weiterführende Untersuchungen durchführen zu können.

Tabelle 1: Gruppeneinteilung der Versuchstiere

Versuchsgruppe	Tieranzahl pro Gruppe	Fütterung und Behandlung
Kontrolle (K)	8	Kontrolldiät flüssig
Fett-Fructose-reiche Diät (FFr)	8	FFr-Diät flüssig
K + Antibiotikum (KAB)	8	Kontrolldiät flüssig + Ampicillin 1g/L, Vancomycin 1g/L, Metronidazol 1g/L, Gentamycin 160mg/kg KG
FFr + Antibiotikum (FFrAB)	8	FFr - Diät flüssig + Ampicillin 1g/L, Vancomycin 1g/L, Metronidazol 1g/L, Gentamycin 160mg/kg KG

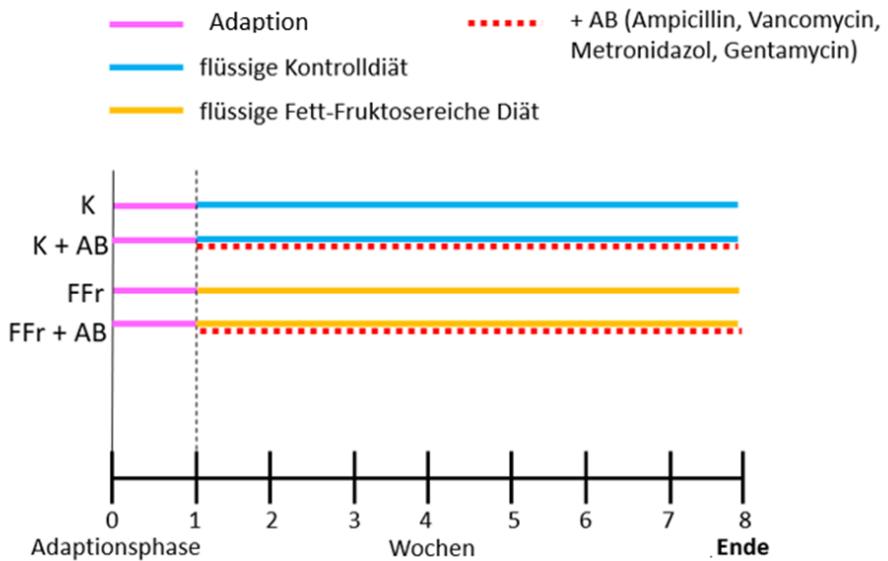


Abbildung 4: Schema des Versuchsaufbaus. Die Kontrollgruppe und die FFr-Gruppe bekamen nach der Adoptionsphase eine Flüssigdiät. Die Zusammensetzung der Diät ist im Anhang in Tabelle 19 beschrieben. K- Kontrolle, FFr – Fett und Fruktose-reich, AB – Antibiotikum

3.2. Gewebepräparation – Paraffineinbettung und Anfertigung histologischer Schnitte

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit lagen Leberschnitte bereits befundet vor, und auch die Querschnitte des proximalen Dünndarms waren im Vorfeld von anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe hergestellt worden. Daher sind die hier zur Anwendung kommenden Methoden nur kurz folgend zusammengefasst. Für das Anfertigen von Gewebeschnitten am Mikrotom war es zuvor notwendig, die entnommenen Gewebeproben des proximalen Dünndarms und der Leber in 4% PBS-gepufferten Formalin (siehe Anhang Lösung 3) zu fixieren und sie anschließend in Paraffin einzubetten (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Schritte der Paraffineinbettung

Inkubationszeit	Lösung
≥ 48 Stunden	4% PBS-gepuffertes Formalin*
15 Minuten	Unter fließendem, kaltem Leitungswasser spülen
≥ 1 Stunde	75% Ethanol
≥ 1 Stunde	85% Ethanol
Über Nacht	95% Ethanol
≥ 3 Stunden	100% Ethanol
30 Minuten	100% Ethanol + Roti Histol (1:1)
≥ 2 Stunden	Roti Histol
30 Minuten	Paraffin I (bei 60 °C)
30 Minuten	Paraffin II (bei 60 °C)
30 Minuten	Paraffin III (bei 60 °C)

*Zusammensetzung siehe Anhang Lösung 3

Danach wurden die Gewebeproben in einer Einbettstation in die Einbettkassetten überführt, mit flüssigen Paraffin bedeckt, dass bei Raumtemperatur aushärtet. Die fertig ausgehärteten Gewebepräparate wurden vor dem Anfertigen der Gewebedünnschnitte für mindestens 10 Minuten im Gefrierschrank bei -20 °C abgekühlt. Danach konnten am Mikrotom 4µm dünne Schnitte angefertigt werden, die vor dem Überführen auf den Objektträger noch in einem Streckbad bei 37 °C geglättet wurden. Danach wurden die auf den Objektträger überführten Schnitte für 3 Tage bei 37 °C im Wärmeschrank getrocknet.

3.3. Histologische Färbungen

3.3.1. Hämatoxylin & Eosin Färbung des Lebergewebes

Die H & E Färbung des Lebergewebes lag bereits vor, weshalb diese Methode nur im Anhang (siehe Methode H&E Färbung) kurz beschrieben ist.

Die Leberhistologie wurde unter dem Mikroskop mittels NAFLD-Activity Score befundet [55]. Dafür wurden acht Bildausschnitte pro Schnitt angefertigt und danach der Grad der Inflammation und Steatose semiquantitativ bewertet (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Semiquantitative Auswertung der Steatose nach dem NAS

Grad der Steatose/Inflammation	Fettanteil in Flächenprozent	Inflammationen pro Gesichtsfeld
0	<5%	Abwesend
1	5% - 33%	<2
2	34% - 66%	2-4
3	>66%	>4

3.3.2. Naphthol AS-D Chloracetat Esterase-Färbung des Lebergewebes

Die Naphthol AS-D Chloracetat Esterase Färbung dient dem histologischen Nachweis neutrophiler Granulozyten. Das Enzym Esterase ist ein in diesen Zellen spezifisch vorkommendes Enzym. Verläuft die Färbung erfolgreich, sind neutrophile Granulozyten unter dem Mikroskop als pinkfarbene Punkte im Zytoplasma erkennbar [56]. Zur Färbung wurde ein kommerziell erhältliches Kit entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung der 4µm dicken Lebergewebeschnitte (siehe Tabelle 4) auf dem Orbitalschüttler bei 80rpm, wurden die Präparate mit 1-4 Tropfen der zuvor hergestellten CAF-Lösung (siehe Anhang Lösung 5). 30 Sekunden fixiert. Danach wurden die Schnitte für 60 Sekunden mit destilliertem Wasser gespült.

Tabelle 4: Entparaffinierung und Rehydrierung Naphthol AS-D-Chloracetat Esterase Färbung

Inkubationszeit	Lösung
10 Minuten	Roti Histol
5 Minuten	100% Ethanol
5 Minuten	95% Ethanol
5 Minuten	70% Ethanol
10 Minuten	destilliertes Wasser

Anschließend wurden die Gewebeschnitte bei 37 °C für 20 Minuten mit vorgewärmten Farbreagenz (siehe Anhang Lösung 6) inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte erneut

für 2 Minuten mit destilliertem Wasser gespült und danach mit Hämatoxylin gegengefärbt. Dafür wurden die Schnitte für 20 Sekunden in die Hämatoxylin-Lösung getaucht und leicht geschwenkt, und danach für jeweils 10 Sekunden in zwei Behälter mit Leitungswasser gebläut. Die Reaktion wurde mit destillierten Wasser gestoppt und die gefärbten Schnitte wurden mit einem wässrigen Eindeckmedium bedeckt und über Nacht unter dem Abzug getrocknet.

Das Zählen der neutrophilen Granulozyten erfolgte am Mikroskop bei 200-facher Vergrößerung, wobei 8 Bildausschnitte pro Gewebeschnitt herangezogen wurden. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte der Zählung angegeben.

3.3.3. Alcianblau-PAS-Färbung des Dünndarmgewebes inkl. Morphologie

Das Alcianblau färbt saure Mucine der Becherzellen und sulfatierte Glykosaminoglykane blau, wohingegen mit der PAS-Reaktion neutrale Mucine und neutrale Glykoproteine magenta bis rosa angefärbt werden. Bei der PAS-Reaktion dient die Perjodsäure als Oxidationsmittel, die Glykole zu Aldehyden oxidiert. Mit dem Schiffs-Reagenz reagieren die Aldehyde zu leuchtend magentafarbenen Komplexen. Das Färbeergebnis umfasst somit eine magenta-rote bis rosa Färbung neutraler Mucopolysaccharide, blauviolette Zellkerne und zart rosa bzw. bei einer erhöhten RNA-Konzentration ein bläulich gefärbtes Cytoplasma [57,58].

Zunächst wurden die 4µm dünnen Dünndarmschnitte entparaffiniert und rehydriert (siehe Tabelle 5, die verschiedenen Inkubationszeiten bei der Rehydrierung und Dehydrierung erfolgten aufgrund etablierter Protokolle der Arbeitsgruppe). Danach wurden die Schnitte mit Alcianblau-Lösung (1g Alcianblau in 100ml 3% Essigsäure) für 30 Minuten in der feuchten Färbeschale bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte wurden danach für 3 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült und für 10 Sekunden in destilliertes Wasser getaucht. Anschließend wurden die Gewebepräparate mit Perjodsäure in der feuchten Färbeschale für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte erneut in Leitungswasser gespült und mit destilliertem Wasser abgestoppt. Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte für 15 Minuten mit Schiffs-Reagenz inkubiert und nach einem erneuten Waschschritt erfolgte die Gegenfärbung mit

Hämatoxylin. Danach erfolgte die Dehydrierung auf dem Orbitalenschüttler bei 80rpm (siehe Tabelle 6). Nach der Dehydrierung konnten die Schnitte mit Entellan und Deckgläsern eingedeckt und getrocknet werden.

Tabelle 5: Entparaffinierung und Rehydrierung Alcanblau-PAS Färbung

Inkubationszeit	Lösung
4 Minuten	Roti Histol
2 Minuten	100% Ethanol
2 Minuten	95% Ethanol
2 Minuten	70% Ethanol
4 Minuten	destilliertes Wasser

Tabelle 6: Dehydrierung Alcanblau-PAS-Färbung

Inkubationszeit	Lösung
2 Minuten	70% Ethanol
2 Minuten	95% Ethanol
2 Minuten	100% Ethanol
4 Minuten	Roti Histol

Für die Auswertung wurden pro Schnitt am Mikroskop 8 Bilder bei 200-facher Vergrößerung entlang der Darmwand angefertigt. Mit dem Computerprogramm ZEN wurde die Zottenlänge abgemessen und die Anzahl an Becherzellen pro Zotte gezählt. Anschließend wurde die Anzahl an Becherzellen pro 100µm Zotte ermittelt und der Mittelwert der 8 Schnitte gebildet.

Zur Bewertung der Morphologie des Dünndarmgewebes wurde die Zottenlänge, Zottenbreite, Enterozytenhöhe und Kryptentiefe herangezogen. Für die Messung der Parameter wurden Dünndarmschnitte der Alcanblau-PAS-Färbung verwendet. Dafür wurden jene Schnitte herangezogen, die einen Querschnitt des Duodenalgewebes zeigten. Mit Hilfe des Computerprogramms ZEN wurde die Länge jeder Zotte, sowie die Breite, die Enterozytenhöhe und die Kryptentiefe gemessen.

3.3.4. ZO-1 Proteinfärbung im Duodenum

Um das Tight Junction Protein ZO-1 im Dünndarmgewebe anzufärben, wurden 4µm dünne Dünndarmgewebeschnitte immunhistochemisch gefärbt, bei der das DAB-Substrat an den Stellen des Zielantigens zur Braunfärbung führt [59].

Wie oben bereits beschrieben, wurden die Paraffinschnitte zunächst entparaffiniert und rehydriert (vgl. Tabelle 4). Nach der Rehydrierung wurden die Objektträger mit dem PAP Pen umrandet, um ein Auslaufen von Flüssigkeit zu verhindern. Danach erfolgte die Protease-Inkubation (2mg/ml in 1x PBS) bei 37 °C für 10 Minuten. Die Schnitte wurden anschließend für 10 Minuten in 1 x PBS (siehe Anhang Lösung 2) gewaschen. Daraufhin erfolgte die Antikörperinkubation (siehe Tabelle 7) in der feuchten Färbeschale.

Tabelle 7: Schritte der ZO-1 Proteinfärbung

Inkubationszeit	Lösung
Über Nacht bei 4°C	Primärantikörper (1:100 in 1 x PBS)
10 Minuten	1 x PBS
30 Minuten	Sekundärantikörper HRP-Anti-Rabbit
10 Minuten	1 x PBS
Ca. 90 Sekunden	Substrat + DAB

Die Braunfärbung wurde mit destilliertem Wasser abgestoppt und danach wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt und kurz in eine aufsteigende Ethanolreihe (70%, 95%, 100%) getaucht und danach für 10 Minuten in Roti-Histol inkubiert. Zuletzt wurden die Schnitte mit Entellan und Deckgläschen eingedeckt und getrocknet.

3.4. Messung der Lipidperoxidation des Lebergewebes – TBARS

Die Lipidperoxidation läuft über einen Radikalkettenmechanismus, wobei Aldehyde als Endprodukte gebildet werden. Malondialdehyd (MDA) zählt hier zu einem wichtigen Marker für oxidative Schäden in physiologischen Systemen. MDA kann mit Thiobarbitursäure zu einer rosa gefärbten dimeren Verbindung reagieren. Das entsprechende rosa Addukt kann mittels Spektrometrie quantifiziert werden, wodurch

auf die antioxidative Aktivität im zu messenden Gewebe rückgeschlossen werden kann [60].

Zu Beginn wurden etwa 20mg tiefgefrorenes Lebergewebe in 500µl RIPA-Lysepuffer (pro ml RIPA-Puffer 10µl Protease-Inhibitor I und Phosphatase-Inhibitor II und III) mit Hilfe eines Potters homogenisiert. Das Homogenat wurde für 10 Sekunden mittels Ultraschall weiter aufgebrochen. Nun wurden die Proben für 10 Minuten bei 4 °C und 3000rpm zentrifugiert. 100µl des Überstands wurde in ein neues Eppi überführt und 50µl des Überstands wurden für die Proteinbestimmung nach Bradford verwendet (siehe 3.5). Zur Fällung des Proteins wurde zu den Proben 200µl 10%ige Trichloressigsäure gegeben und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben für 15 Minuten bei 4 °C und 2200rpm zentrifugiert. Währenddessen konnte bereits die Standardreihe hergestellt werden (siehe Tabelle 8), bei der 500µM Tetramethoxypropanlösung die Stocklösung darstellte.

Tabelle 8: Herstellung Standardverdünnungsreihe TBARS

	Tetramethoxypropan (500µM)	H ₂ O	Konzentration (µM)
Standard 1	–	500 µl H ₂ O	0
Standard 2	500µl aus Standard 3	500 µl H ₂ O	0,625
Standard 3	500µl aus Standard 4	500 µl H ₂ O	1,25
Standard 4	500µl aus Standard 5	500 µl H ₂ O	2,5
Standard 5	500µl aus Standard 6	500 µl H ₂ O	5
Standard 6	200µl aus Standard 7	500 µl H ₂ O	10
Standard 7	500µl aus Standard 8	500 µl H ₂ O	50
Standard 8	200µl aus der 500µM Stocklösung	800 µl H ₂ O	100

Nun wurden 200µl Standard und 200µl Überstand mit je 200µl frisch angesetzter 0,67%iger Thiobarbitursäure (67mg in 10ml destillierten Wasser gelöst) versetzt und für 10 Minuten bei 95 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 160µl pro Well an Proben und Standards mittels Doppelbestimmung in eine 96-Well-Platte pipettiert. Die Absorption

wurde im Photometer bei 532nm gemessen und daraufhin konnte die Bradford-Bestimmung durchgeführt werden. Die Ergebnisse der TBARS Messung wurden mit der Bradfordbestimmung normalisiert und in μm TBARS pro g Protein angegeben.

3.5. Proteinbestimmung nach Bradford

Das Prinzip der Proteinbestimmung ist der Farbstoff Bio-Rad der in saurer Lösung mit kationischen, unpolaren Seitenketten des Proteins Komplexe bildet. Der Extinktionskoeffizient des Farbstoff-Protein-Komplexes kann photometrisch gemessen werden und dient somit der Konzentrationsbestimmung des Proteins [61].

Der Extraktionspuffer wurde für die TBARS Messung in einem Verhältnis von 1:40 und für den Western Blot in einem Verhältnis von 1:30 verdünnt. Nach der Verdünnung der Proben konnte mit der Standardreihe begonnen werden (siehe Tabelle 9). Bei der Stocklösung handelte es sich um bovines Serumalbumin (BSA).

Tabelle 9: Herstellung Standardverdünnungsreihe Bradford-Bestimmung

	BSA-Verdünnungsreihe	Verdünnter Extraktionspuffer (μl)	Konzentration (mg BSA/ml)
A	2 μl Stocklösung	198 μl	1,0
B	100 μl A	100 μl	0,5
C	100 μl B	100 μl	0,25
D	100 μl C	100 μl	0,125
E	100 μl D	100 μl	0,0625
F	-	100 μl	0

Nun wurden 5 μl der Standards und der Proben in eine 96-Well-Platte in Dreifachbestimmung pipettiert und 200 μl des Bio-Rad Farbreagens (1 Volumen BioRad Stammlösung mit 4 Volumen destilliertem Wasser verdünnt) zupipettiert. Danach wurde die Absorption bei 590nm im Photometer gemessen. Die Proteinkonzentration der Proben konnte anschließend anhand der Standardgerade berechnet werden.

3.6. Analyse mRNA Expression von F4/80 des Lebergewebes

3.6.1. RNA Isolation des Lebergewebes

Für die Isolation von RNA aus dem Lebergewebe wurde ein kommerziell erhältliches Reagenz (peqGOLD TriFastTM) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Die Methode wurde von Chomczynski und Sacchi 1987 entwickelt und führt zur Inaktivierung von Ribonukleasen und Zellysierung [62].

In 2ml Eppis wurden dafür 1000µl Trizol vorgelegt, und ein großes Stück gefrorenes Lebergewebe zugegeben. Daraufhin kam ein 5mm Stainless Steels Bead hinzu und die Eppis wurden für 1 Minute bei 25Hz/s und danach nochmal für 30 Sekunden bei 25Hz/s im Tissue Lyser homogenisiert. Daraufhin wurden die Eppis für 30 Sekunden gevortext und danach bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurden 200µl Chloroform hinzugefügt und daraufhin erneut im Tissue Lyser für 20 Sekunden bei 25Hz/s homogenisiert und danach für 10 Sekunden gevortext. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 12000rcf für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die obere Phase der Proben wurde abgenommen und in einen 1,5ml Eppi überführt. Nun wurde 500µl Isopropanol hinzugegeben, die Proben kurz gevortext, und auf Eis für 15 Minuten inkubiert. Danach wurden sie erneut für 10 Minuten bei 12000rcf und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig in ein Becherglas gekippt und nun erfolgten zwei Waschschritte mit Ethanol. Dafür wurde 1ml Ethanol hinzugegeben, kurz gevortext bis das Pellet schwimmt und bei 7500rcf bei 4°C für 8 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgekippt und der Schritt einmal wiederholt. Danach wurden die Eppis geöffnet und über Kopf auf einem Filterpapier etwa 10 Minuten getrocknet. Je nach entstandener Pelletgröße wurde nun zwischen 100 und 200µl DNase- und RNase-freies Wasser zupipettiert. Zum Schluss wurden die Eppis bei 55 °C und 300rpm für 10 Minuten erhitzt, um das Pellet zu lösen. Danach wurden die Eppis sofort auf Eis gesetzt und bei -80 °C gelagert.

3.6.2. Reverse Transkription von RNA in komplementäre DNA

Das Umschreiben von RNA in einzelsträngige cDNA erfolgte mittels AMV Reverse. Dafür wurde ein kommerziell erhältliches Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Vor der Umschreibung fand ein DNase-Verdau statt, um die DNA zu degradieren.

Zuerst wurde eine RNA Konzentrationsmessung durchgeführt, um die RNA so zu verdünnen, dass 1,11 μ g RNA in 8 μ l dH₂O vorhanden ist. Dafür wurden 5 μ l RNA mit 95 μ l dH₂O verdünnt und im Plattenreader bei 160nm gemessen. Nun fand der DNase-Verdau statt, bei dem in die Tubes 1 μ l RQ1 RNase-Free DNase 10x Reaction Buffer und 1 μ l RQ1 RNase-Free DNase pipettiert wurden. Anschließend wurden die Tubes kurz abzentrifugiert und für 30 Minuten im Thermocycler inkubiert. Danach wurde 1 μ l RQ1 DNase Stop Solution in die Tubes pipettiert und für 10 Minuten bei 65°C im Thermocycler inkubiert, damit die DNase inaktiviert wird. Für die cDNA-Synthese wurde ein Mastermix hergestellt (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Mastermix (cDNA-Synthese)

Substanz	Volumen
MgCl ₂	4 μ l
Reverse Transkriptase Puffer	2 μ l
dNTP Mix (10mM)	2 μ l
RNAsin	0,5 μ l
Random Primer	1 μ l
AMV Reverse Transkriptase (15U)	0,6 μ l

Die Tubes wurden kurz zentrifugiert und auf Eis gestellt und danach wurden 10,1 μ l Mastermix in jedes Tube pipettiert. Im Thermocycler erfolgte danach die cDNA-Synthese (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: cDNA-Synthese

Zeit	Temperatur
10 Minuten	25°C
15 Minuten	42°C
5 Minuten	95°C
5 Minuten	4°C

Der cDNA wurde 80 μ l DNase- und RNase-freies Wasser zugegeben, kurz abzentrifugiert und bei -20 °C gelagert.

3.6.3. mRNA Expression mittels RT-qPCR

Die quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (RT-qPCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren mit zusätzlicher Quantifizierung der gewonnenen DNA [63]. Zuerst musste der Mastermix hergestellt werden, dafür wurden 3µl nuklease freies Wasser, 10µl iTaq™ Universal SYBR® Green und 1µl Reverse und 1µl Forward Primer des jeweiligen Zielgens (siehe Tabelle 12) vermischt.

Tabelle 12: Primer Sequenz Information

	Forward (5' → 3')	Reverse (3' → 5')
F4/80	TGGCTGCCCTCCCTGACTTC	CAAGATCCCTGCCCTGCACT
18 S	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	GTAACCCGTTGAACCCCATT

Nun wurden 15µl Mastermix in jedes Well pipettiert und 5µl der jeweiligen Probe in Doppelbestimmung zupipettiert. Die Platte wurde kurz abzentrifugiert, in das RT-qPCR Detektions-System gestellt und danach wurde das Programm gestartet (siehe Tabelle 13). Zu Beginn der RT-qPCR wurde die DNA denaturiert und in die Einzelstränge aufgetrennt. In mehreren darauffolgenden Zyklen banden die Primer an die Einzelstränge und die Polymerase ergänzte diese wieder zu Doppelsträngen. Die Quantifizierung wurde durch die laufende Fluoreszenzmessung ermöglicht. Die Zahl an PCR Zyklen bei welchen die Fluoreszenz des Zielgens (F4/80) über einen Schwellenwert, dem sogenannten C_t Wert, gelangt wurde mit einem Referenzgen (18S) verglichen.

Tabelle 13: Protokoll der einzelnen PCR Zyklen

	Temperatur (°C)	Zeit (Sekunden)	Zyklen (n)
Polymerase Aktivierung	95	30	
DNA Denaturierung	95	5	
Annealing/Elongation			
18S	55	30	25
F4/80	64	30	49
	95	10	
Schmelzkurvenanalyse	65-95	5	

3.7. Bestimmung der Darmpermeabilität mittels Xylose Assay

Die Proben zu dieser Messung lagen bereits vor und stammten aus dem Everted Gut Sac Modell. Dabei wurde den Mäusen nach einer zervikalen Dislokation der Dünndarm entnommen und in phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS) gegeben. Dafür wurde der Dünndarm in etwa 3cm große Stücke geschnitten, umgestülpt und in KRH-Puffer gelegt. Daraufhin wurden die Enden der Darmgewebestücke zugeknotet und mit KRH-Puffer (siehe Anhang Tabelle 22) gefüllt und am anderen Ende ebenfalls zugeknotet. Zu Beginn mussten die Standardlösungen (siehe Tabelle 14) und das Farbreagenz hergestellt werden. Für die Standardreihe wurde destilliertes Wasser als Blank verwendet und für die Proben KRH-Puffer. Die Gewebeproben wurden auf Eis aufgetaut, gevortext und bei 1000rcf 2 Minuten lang zentrifugiert. Daraufhin wurden 500µl Farbreagenz (100ml Essigsäure, 10ml 37% Salzsäure, 0,5g Phloroglucin-Dihydurat) in den Reaktionsgefäß en vorgelegt und jeweils mit 5µl Probe, Standard oder Blank versetzt. Der Standard und Blank wurde in Doppelbestimmung, die Proben in Dreifachbestimmung gemessen. Im Mixing Block wurden die Proben danach für 4 Minuten bei 100 °C erhitzt. Die Farbreaktion wurde durch Abkühlen auf Raumtemperatur gestoppt und danach wurden 200µl der Proben in eine 96-well-Platte pipettiert und im Photometer bei 540nm gemessen. Mit Hilfe des Xylose-Standards konnte eine Geradengleichung angefertigt werden und somit die Xylose-Konzentration der Proben bestimmt werden.

Tabelle 14: Xylose-Standards für den D(+) -Xylose Assay

	D (+)-Xylose (mg)	Lösungsmittel (Liter)	Konzentration (mg/Liter)
Standard 1	52,6	0,5	0,7
Standard 2	97,6	0,5	1,3
Standard 3	195,2	0,5	2,6

Lösungsmittel: 3,9g Benzoësäure in 1,5 Liter dH₂O

3.8. Bestimmung der Proteinkonzentration von Occludin des Dünndarmgewebes mittels Western Blot

Die Proteinkonzentration spezifischer Proteine wurde mit Hilfe des Western Blots bestimmt. Hierzu wurden die Proben zunächst in ein SDS-PAGE im elektrischen Feld aufgetragen. Nach der Auftrennung des Gemisches folgte das Blotten und Übertragen der Proteine auf eine Polyvinyliden-Difluorid (PVDF)-Membran. Die Proteinexpression wurde danach durch spezifische Bindung von Antikörpern, an das sich auf der Membran befindende Protein, ermittelt [64]. Alle notwendigen Puffer und Lösungen sind im Anhang Tabelle 23 aufgelistet.

3.8.1. Proteinextraktion und Probenvorbereitung

Etwa 8mm große Gewebestücke wurden mit 120µl RIPA-Lysepuffer (pro ml RIPA-Puffer 20µl Protease-Inhibitor I und Phosphatase-Inhibitor II und III) und 5mm Stainless Steel Beads im Tissue Lyser für 1 Minute bei 25Hz/s homogenisiert. Danach wurde das Lysat für 10 Sekunden im Ultraschallbad behandelt und darauffolgend für 15 Minuten bei 13200 rpm zentrifugiert.

Anschließend wurde die Proteinkonzentration der Proben gemessen (siehe 3.5. Proteinbestimmung nach Bradford), um die benötigte Proteinmenge für die Beladung der Gele einzustellen. Hierzu wurden die Proben entsprechend mit Extraktionspuffer und Ladepuffer verdünnt. Die Proben wurden auf eine Zielkonzentration von 1µg/µl (β -Actin) bzw. 3µg/µl (Occludin) eingestellt. Am Ende wurde durch Zugabe von Dithiothreitol (DTT) die vollständige Denaturierung der Proteine erreicht. Daraufhin wurden die Proben für 5 Minuten am Heizblock inkubiert und danach sofort bei 4 °C abzentrifugiert.

3.8.2.SDS-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Dafür wurden 10% und 8% Trengelle und 5% bzw. 4% Sammelgele hergestellt, wobei APS immer frisch hergestellt wurde (siehe Tabelle 15, 16). Nach der Polymerisierung der Gele wurden diese in die Gelelektrophorese-Apparatur eingebaut und mit einfachen Elektrophoresepuffer bedeckt. Anschließend wurden die Proben (10µl) zusammen mit einem Protein-Ladder (2µl) auf das Gel aufgetragen und in der Gelelektrophoresekammer bei 110V für 90 Minuten aufgetrennt.

Tabelle 15: Zusammensetzung der Trenngele, Angaben für 2 Gele bei 1mm Spacer

Acrylamidgehalt	8%	10%
dH ₂ O	4500 µl	4170 µl
1,5 M Tris pH 8,8	2600 µl	2600 µl
30% Acryl/Bis (Roth)	2700 µl	3330 µl
10% SDS	100 µl	100 µl
10% APS	100 µl	100 µl
TEMED	6 µl	6 µl

Tabelle 16: Zusammensetzung der Sammelgele, Angaben für 2 Gele bei 1mm Spacer

Acrylamidgehalt	4%	5%
dH ₂ O	1575 µl	1512,5 µl
0,5 M Tris pH 6,8	625 µl	625 µl
30% Acryl/Bis (Roth)	250 µl	312,50 µl
10% SDS	25 µl	25 µl
10% APS	25 µl	25 µl
TEMED	3 µl	3 µl

3.8.3. Blotten

Nach der Proteinauf trennung erfolgte die Überführung der Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran. Dafür musste diese zuvor in Methanol aktiviert werden und zusammen mit zwei Filterpapieren für 10 Minuten in Transferpuffer inkubiert werden. Auch die Gele wurden für 10 Minuten in Transferpuffer gelegt, bevor das Gel und die Membran zwischen die beiden Filterpapiere gegeben wurde (siehe Abbildung 5). Bei 25V wurde im Turboblotter für 30 Minuten der Transfer der Proteine vom Gel auf die

Membran durchgeführt. Danach wurde die Membran für mindestens eine Stunde getrocknet.

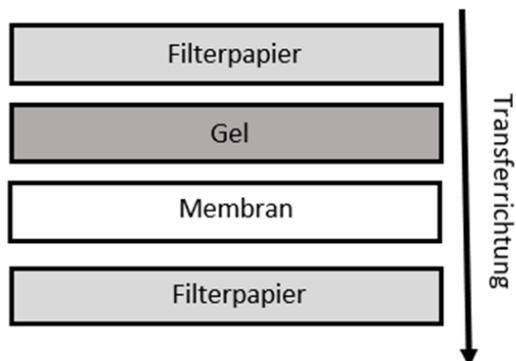


Abbildung 5: Aufbau des Blottingsandwiches

3.8.4. Ponceau Färbung und Bestimmung der spezifischen Proteinkonzentration

Die getrocknete Membran wurde danach erneut in Methanol aktiviert und für 3 Minuten in Ponceau-Lösung geschwenkt. Dabei bindet die negative Komponente des Ponceau Farbstoffs an die positiv geladenen Aminosäuren der Proteine [65]. Danach wurde die Membran mehrmals mit destilliertem Wasser gewaschen und konnte direkt im nicht angetrockneten Zustand weiterverarbeitet werden.

Je nach untersuchten Protein unterscheiden sich die Treppengele zur Proteinauf trennung, die Verdünnung der primären Antikörper, die Blockierlösung und der sekundäre Antikörper. Alle sonstigen Schritte erfolgten nach demselben Prinzip und sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17: Zusammenfassung Bestimmung der spezifischen Proteinkonzentration

Inkubationszeit	Lösung (Occludin)	Lösung (β -Actin)
30 Minuten	1xTBST	1xTBST
1 Stunde	Blockierlösung 5% MMP in 1x TBST	Blockierlösung 2,5% MMP in 1x TBST
Über Nacht (4°C)	pAK 1:500 in BL	pAK 1:750 in BL
5,10, 15 Minuten	1xTBST	1xTBST
90 Minuten	sAK (Anti-mouse) 1:5000 verdünnt in BL	sAK (Anti-mouse) 1:5000 verdünnt in BL
5,10, 15 Minuten	1xTBST	1xTBST

pAK = primäre Antikörperlösung; sAK = sekundäre Antikörperlösung; BL = Blockierlösung

Zuletzt erfolgte die Detektion. Dafür wurde die Membran in einer abgedunkelten Schale mit einer 1:1 verdünnten Peroxidase Puffer Lösung und Luminol/Enhancer Solution für 5 Minuten inkubiert. Daraufhin wurde die Membran in das Detektionsgerät überführt und die detektierten Banden festgehalten.

3.9. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der experimentellen Untersuchungen sowie die grafische Darstellung der Ergebnisse wurde mit GraphPad Prism 7.0 durchgeführt. Die Ergebnisse der Gruppen wurden als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler dargestellt. Ausreißer wurden mittels Grubbs-Test detektiert und eliminiert. Um die Signifikanz der Ergebnisse zu ermitteln, wurde eine Two-way-ANOVA durchgeführt. Dabei wurden die Ergebnisse auf Varianzhomogenität überprüft, falls dies nicht gegeben war, wurden die Daten transformiert und mit den neu transformierten Werten eine Two-way-ANOVA durchgeführt. Bei jenen als signifikant bezeichneten Unterschieden wurde ein p-Wert von $\leq 0,05$ ermittelt.

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sind zum besseren Verständnis der Ergebnisse, neben den Messergebnissen, die im Rahmen der Arbeit erhoben wurden, auch weitere Daten mit ausgewertet worden. So wurden Daten der Nahrungsaufnahme und des Gewichtsverlaufs der Mäuse in die Auswertung miteinbezogen.

4.1. Einfluss der Fütterung einer Fett- Fruktosereichen Diät und der oralen Gabe von Antibiotika auf die Nahrungsaufnahme, hepatische Fetteinlagerung und Parameter der Leberschädigung

Die mittlere Nahrungsaufnahme, sowie der Einfluss der Fütterung auf das Körpergewicht und das Gewicht der Leber sind in Tabelle 18 zusammengefasst. Um den Einfluss der Fütterung auf den Leberstatus zu messen, wurde bei der Probenentnahme das Körpergewicht und das Gewicht der Leber bestimmt, um damit die Leber-/Körpergewichts-Ratio zu bilden.

Da die Mäuse über den gesamten Versuchszeitraum innerhalb der Kontrollgruppen bzw. der fett-fruktosereich gefütterten Gruppen isokalorisch gefüttert wurden, unterschied sich die Nahrungsaufnahme nicht innerhalb der Kontrollgruppen und der fett-fruktosereich gefütterten Gruppen. Jedoch nahmen die Tiere der FFr-Gruppen signifikant mehr Kalorien auf als die Tiere der Kontrollgruppen ($p<0,05$). Sowohl das Start- als auch das Endgewicht unterschied sich nicht zwischen den vier Versuchstiergruppen. Jedoch war die absolute Gewichtszunahme in der FFr+AB-gefütterten Gruppe höher als in der Kontrollgruppe ($p<0,05$). Das Lebergewicht und die Leber-/Körpergewichts-Ratio waren bei beiden FFr-Gruppen signifikant höher als in den beiden Kontrollgruppen ($p<0,05$).

Tabelle 18: Mittlere Nahrungsaufnahme, Start- und Endgewicht sowie Lebergewicht

Versuchsgruppe	K	FFr	KAB	FFrAB
n	8	8	8	8
Nahrungsaufnahme (kcal/Maus/Tag)	$9,0 \pm 0,2$	$10,9 \pm 0,1^{\text{a,c}}$	$8,6 \pm 0,1$	$10,7 \pm 0,2^{\text{a,c}}$
Startgewicht (g)	$24,3 \pm 1,2$	$23,8 \pm 1,7$	$23,6 \pm 0,4$	$23,2 \pm 1,0$
Endgewicht (g)	$25,9 \pm 1,6$	$25,7 \pm 1,5$	$25,9 \pm 1,2$	$26,3 \pm 1,2$
Absolute Gewichtszunahme (g)	$1,6 \pm 1,1$	$1,9 \pm 1,0$	$2,1 \pm 1,2$	$3,1 \pm 0,5^{\text{a}}$
Lebergewicht (g)	$1,1 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1^{\text{a,c}}$	$1,1 \pm 0,0$	$1,3 \pm 0,1^{\text{a,c}}$
Leber- /Körpergewichts- Ratio (%)	$4,2 \pm 0,3$	$5,0 \pm 0,3^{\text{a,c}}$	$4,1 \pm 0,1$	$4,9 \pm 0,3^{\text{a,c}}$

K = Kontrolldiät, FFr = Fett-, Fruktosereiche Diät, AB = Antibiotikum, ^ap<0,05 im Vergleich zu K,
^cp<0,05 im Vergleich zu KAB, die Ergebnisse sind als MW ± SD angegeben.

Um den Grad der Leberschädigung und den Effekt der Antibiotikagabe auf die Leber zu beurteilen, wurden histologische Schnitte des Lebergewebes mit der Hämatoxylin & Eosin Färbung gefärbt und mittels NAFLD-Activity Score (NAS) befundet.

Die 8-wöchige Aufnahme der FFr-Diät führte zu einer signifikanten Verfettung der Leber mit beginnenden Entzündungsgeschehen (p<0,05). Im Gegensatz dazu trat bei der FFr+AB-Versuchstiergruppe, genauso wie bei den Kontrollgruppen, keine Verfettung oder Entzündung des Lebergewebes auf (Abbildung 6B). Der Grad der Steatose und die Fettakkumulation war auch in der Kontrollgruppe mit zusätzlicher Antibiotikagabe signifikant geringer als in der Kontrollgruppe (p<0,05).

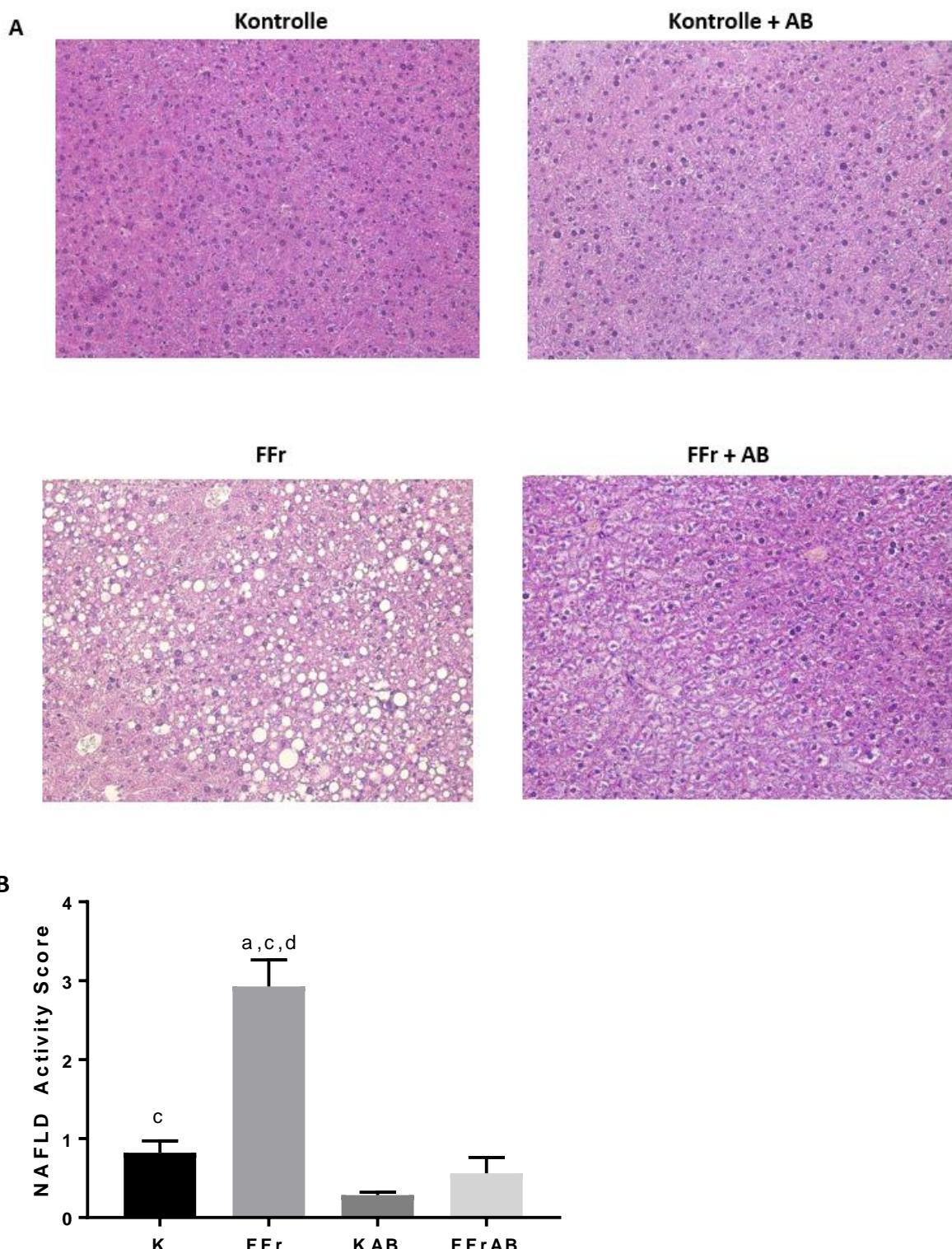
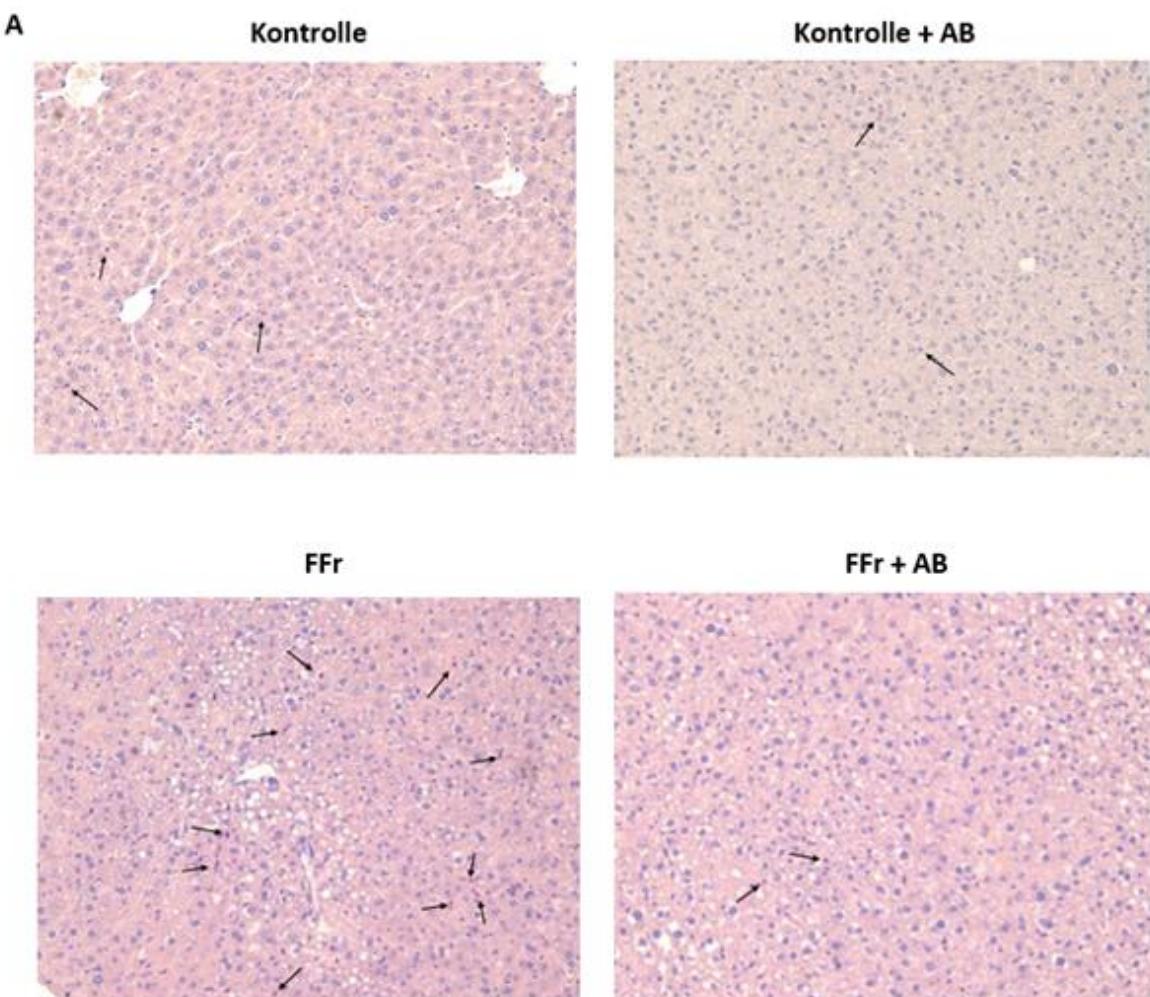


Abbildung 6: Einfluss der Fütterung einer Fett- und Fruktosereichen Diät und einer zusätzlichen Antibiotikagabe auf den NAFLD-Activity Score. (n=7-8). A) Repräsentative Bilder der H&E-Färbung in 200-facher Vergrößerung, B) statistische Auswertung des NAS, K = Kontrolldiät, FFr = Fett-, Fruktosereiche Diät, AB = Antibiotikum, ^ap<0,05 im Vergleich zu K, ^cp<0,05 im Vergleich zu KAB, ^dp<0,05 im Vergleich zu FFrAB, die Ergebnisse sind als MW ± SEM angegeben.

4.2. Einfluss der Fütterung einer Fett- Fruktosereichen Diät und der oralen Gabe von Antibiotika auf die Anzahl neutrophiler Granulozyten, F4/80 mRNA Expression und die TBARS Konzentration im Lebergewebe

Um zu untersuchen, ob die in der H&E Färbung gefundene beginnende Entzündung mit einer Veränderung der Zahl der neutrophilen Granulozyten einhergeht, wurden acht Bildausschnitte pro Objektträger der Naphthol-AS-D Chloracetat-Esterase Färbung herangezogen.

Wie in Abbildung 7 zu sehen, wies die Gruppe der fett- fruktosereich gefütterten Mäuse, verglichen mit den drei anderen Versuchstiergruppen, eine signifikant höhere Anzahl neutrophiler Granulozyten auf ($p<0,05$). Die beiden Versuchstiergruppen, die eine Antibiotikagabe erhalten haben, genauso wie die Kontrolltiergruppe, zeigten keine messbaren Unterschiede in der Zahl der neutrophilen Granulozyten.



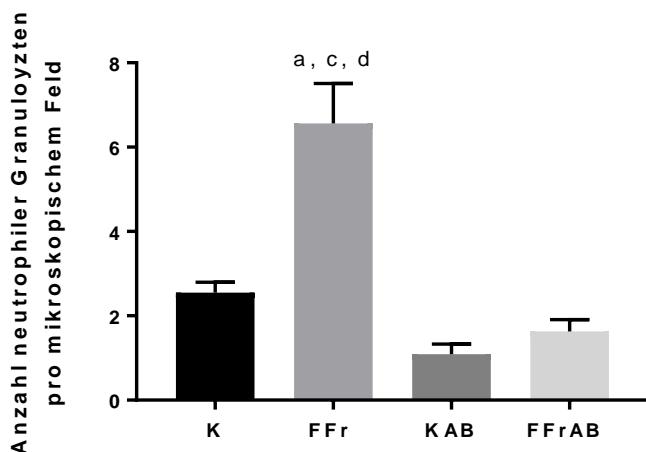
B

Abbildung 7: Einfluss der Fütterung einer Fett- und Fruktosereichen Diät und einer zusätzlichen Antibiotikagabe auf die Zahl der neutrophilen Granulozyten im Lebergewebe. (n=6-8). A) Repräsentative Bilder der Naphthol-AS-D Chloracetat Esterase-Färbung in 200-facher Vergrößerung, Pfeile repräsentieren die neutrophilen Granulozyten B) Statistische Auswertung der Anzahl neutrophiler Granulozyten, K = Kontrolldiät, FFr = Fett-, Fruktosereiche Diät, AB = Antibiotikum, ^ap<0,05 im Vergleich mit K, ^cp<0,05 im Vergleich mit KAB, ^dp<0,05 im Vergleich zu FFrAB, die Ergebnisse sind als MW ± SEM angegeben.

Um zu untersuchen, ob neben der Zahl der neutrophilen Granulozyten, auch F4/80 positive Zellen im Lebergewebe der FFr-gefütterten Tiere verändert waren, wurde die Expression von F4/80 mRNA im Lebergewebe gemessen. Die mRNA Expression war bei der fett- fruktosereich gefütterten Versuchstiergruppe signifikant höher als in den drei weiteren Versuchsgruppen (Abbildung 8, p<0,05). Innerhalb der anderen Versuchsgruppen gab es keine Unterschiede.

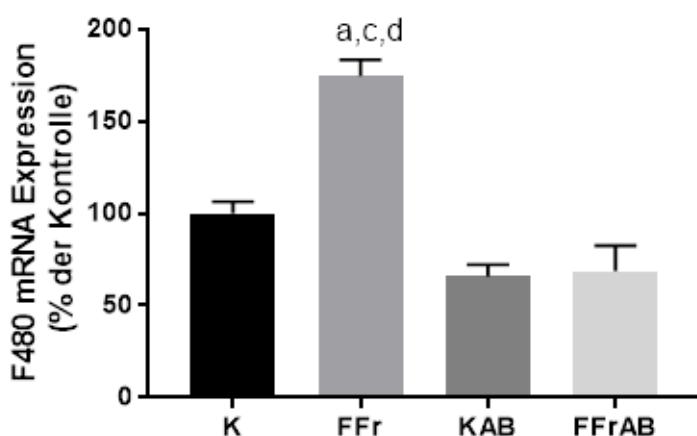


Abbildung 8: Einfluss der Fütterung einer Fett- und Fruktosereichen Diät und einer zusätzlichen Antibiotikagabe auf die mRNA Expression von F4/80 im Lebergewebe. (n=7-8). mRNA Expression in % zur Kontrolle, K = Kontrolldiät, FFr = Fett-, Fruktosereiche Diät, AB = Antibiotikum, ^ap<0,05 im Vergleich zu K, ^cp<0,05 im Vergleich zu KAB, ^dp<0,05 im Vergleich zu FFrAB, die Ergebnisse sind als MW ± SEM angegeben.

Um zu untersuchen, ob das Entzündungsgeschehen der Zellen auch auf Proteinebene quantitativ zu messen ist, wurde die TBARS Konzentration in $\mu\text{M/g}$ Protein herangezogen. Dabei zeigte sich eine signifikant höherer Konzentration an TBARS bei jenen Mäusen, die mit einer fett-fruktosereichen Diät gefüttert wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe und fett-fruktosereich gefütterten Versuchsgruppe mit Antibiotikagabe (siehe Abbildung 9, $p<0,05$). Die beiden Kontrollgruppen und die FFr+AB gefütterte Gruppe unterschieden sich nicht.

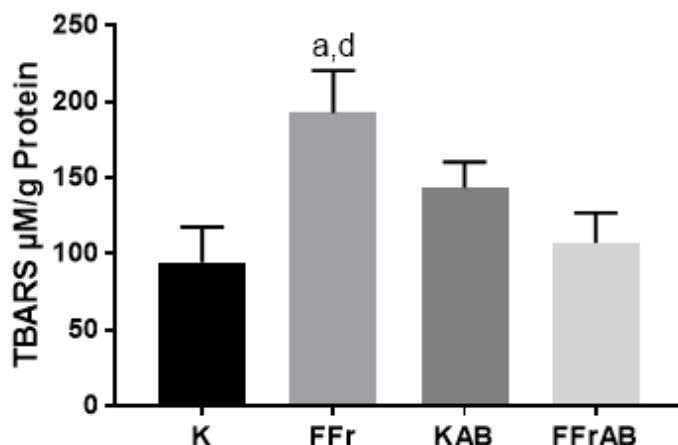


Abbildung 9: Einfluss der Fütterung einer Fett- und Fruktosereichen Diät und einer zusätzlichen Antibiotikagabe auf die TBARS Konzentration im Lebergewebe. ($n=6-8$). TBARS Konzentration, K = Kontroldiät, FFr = Fett-, Fruktosereiche Diät, AB = Antibiotikum, ^a $p<0,05$ im Vergleich mit K, ^d $p<0,05$ im Vergleich zu FFrAB, die Ergebnisse sind als MW \pm SEM angegeben.

4.3. Einfluss der Fütterung einer Fett- Fruktosereichen Diät und der oralen Gabe von Antibiotika auf Veränderungen der intestinalen Darmpermeabilität

Um zu untersuchen, ob das Antibiotikum die Darmpermeabilität beeinflusst, wurden am Ende des Fütterungsversuchs Stücke des Dünndarms jedes Tieres zur Herstellung sogenannter Everted Sacs verwendet. Hierbei wurde die Permeation von Xylose gemessen. Die FFr+AB-Gruppe, sowie die FFr-Gruppe im Trend, wiesen eine höhere Permeation der Xylose auf (Abbildung 10). Auch bei der K+AB-Gruppe war die Permeation der Xylose im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht erhöht. Ein ungepaarter T-Test zeigte eine Signifikanz zwischen der Kontrollgruppe und der FFr-Gruppe, sowie zwischen den beiden Versuchsgruppen mit zusätzlicher Antibiotikagabe ($p<0,05$).

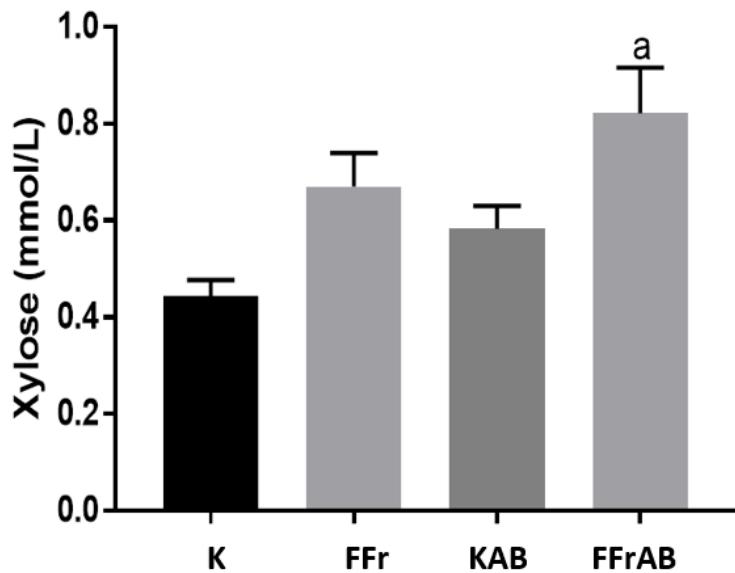


Abbildung 10: Einfluss der Fütterung einer Fett- und Fruktosereichen Diät und einer zusätzlichen Antibiotikagabe auf die Darmpermeabilität in einem Ex vivo Modell. (n=5-7). Quantifizierung der Permeation von Xylose, K = Kontrolldiät, FFr = Fett-, Fruktosereiche Diät, AB = Antibiotikum, ^ap<0,05 im Vergleich zu K, die Ergebnisse sind als MW ± SEM angegeben.

Um zu untersuchen, ob das Antibiotikum die durch die fett- und fruktosereiche Diät veränderte Darmpermeabilität beeinflusst, wurde das Tight Junction Protein Occludin in Relation zu β -Actin im Western Blot untersucht. Aufgrund der zu hohen Streuung der Werte und der geringen n-Zahl konnte hierfür keine densitometrische Auswertung durchgeführt werden.

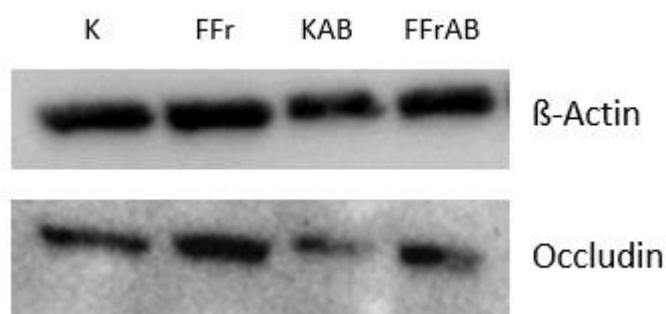


Abbildung 11: Einfluss der Fütterung einer Fett- und Fruktosereichen Diät und einer zusätzlichen Antibiotikagabe auf das Tight Junction Protein Occludin im Duodenum. Repräsentativer Western Blot der β -Actin und Occludinkonzentration. K = Kontrolldiät, FFr = Fett-, Fruktosereiche Diät, AB = Antibiotikum.

Zusätzlich wurde eine ZO-1 Proteinfärbung im Duodenum durchgeführt, um dieses Tight Junction Protein anzufärben und damit weitere Aufschlüsse über den Einfluss der verschiedenen Diäten und der Antibiotikagabe auf die Darmbarriere zu erlangen. Aufgrund der uneinheitlichen Anfärbung des Gewebes, konnte keine quantitative Auswertung vorgenommen werden. Jedoch weisen die Ergebnisse auf, dass die fett- und fruktosereich gefütterte Gruppe eine geringere Menge an ZO-1 im apikalen Bereich der Zotten haben (Abbildung 12).

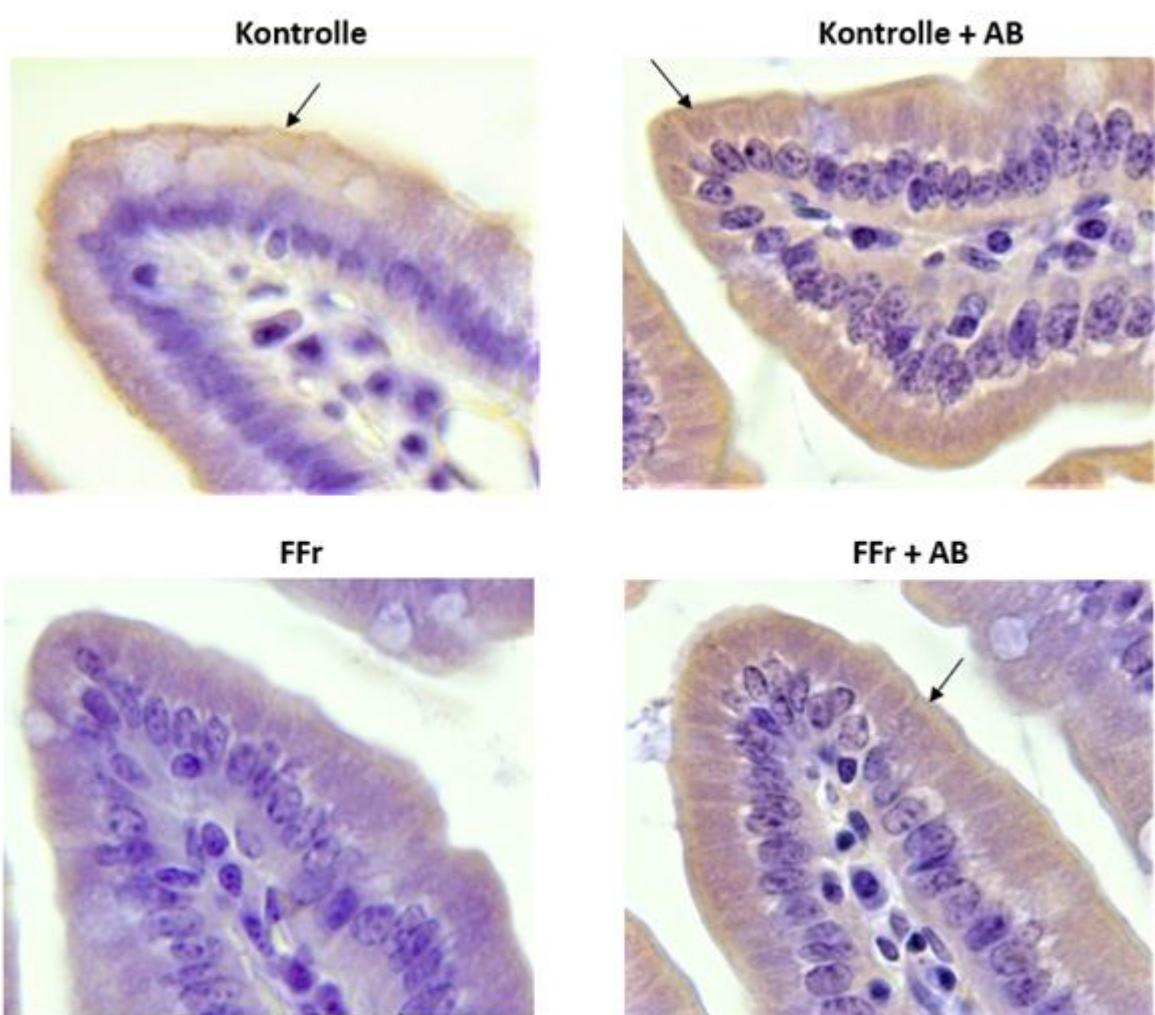
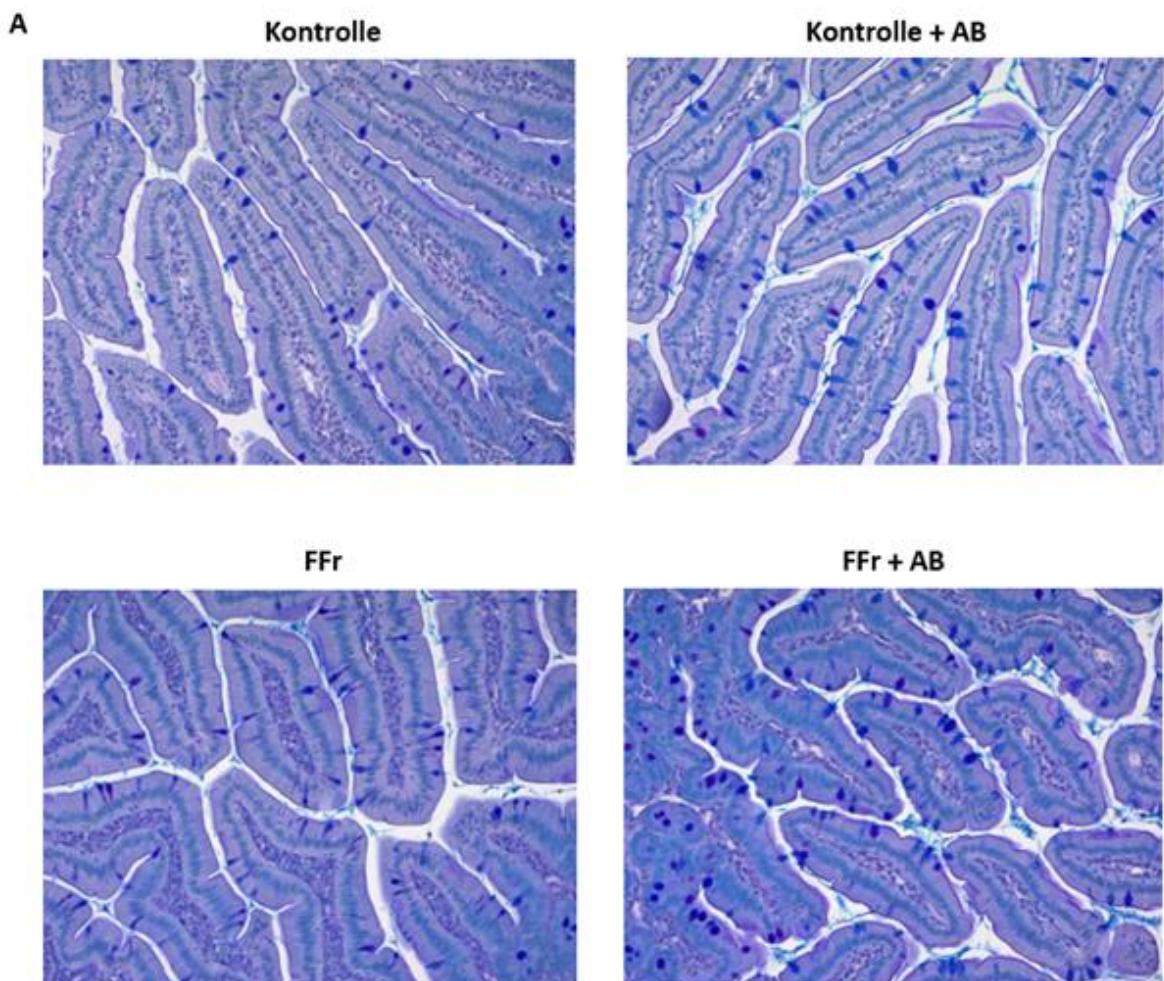


Abbildung 12: Einfluss der Fütterung einer Fett- und Fruktosereichen Diät und einer zusätzlichen Antibiotikagabe auf das Tight Junction Protein ZO-1 im Duodenum. Repräsentative Bilder der ZO-1 Proteinfärbung im Duodenum in 200-facher Vergrößerung. FFr = Fett-, Fruktosereiche Diät, AB = Antibiotikum.

4.4. Einfluss der Fütterung einer Fett- Fruktosereichen Diät und der oralen Gabe von Antibiotika auf die Anzahl an Becherzellen und die Morphologie im Duodenum
Um zu untersuchen, ob die Gabe von Antibiotika bzw. die Aufnahme der FFr-Diät Parameter der Darmbarriere verändert, wurden die Becherzellen im Dünndarm gefärbt und gezählt. Bei der Anzahl der Becherzellen pro 100 Mikrometer Zotte fanden sich keine Unterschiede zwischen den vier Versuchstiergruppen (Abbildung 13).



B

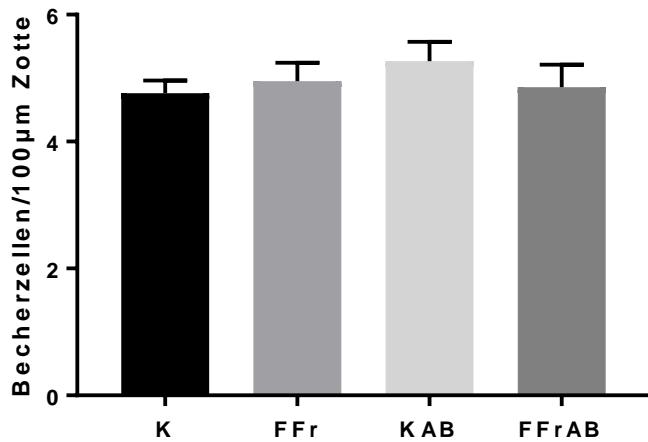


Abbildung 13: Einfluss der Fütterung einer Fett- und Fruktosereichen Diät und einer zusätzlichen Antibiotikagabe auf die Anzahl an Becherzellen im Duodenum. (n=7-8). A) Repräsentative Bilder der Alcianblau-PAS-Färbung in 200-facher Vergrößerung, B) Ergebnisse der Zählung, K = Kontrolldiät, FFr = Fett-, Fruktosereiche Diät, AB = Antibiotikum, die Ergebnisse sind als MW ± SEM angegeben.

Um zu untersuchen, ob die verschiedenen Diäten und Zusätze zur Diät einen Einfluss auf die intestinale Morphologie hatten, wurde die Zottenlänge, Zottenbreite, Enterozytenhöhe und Kryptentiefe bei Querschnitten der Alcianblau-PAS-Färbung untersucht. Bei der Zottenlänge und Zottenbreite gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Versuchsgruppen (Abbildung 14A und 14B). Die Höhe der Enterozyten war bei der fett- fruktosereich gefütterte Versuchstiergruppe signifikant höhere im Vergleich zur Kontrollgruppe mit zusätzlicher Antibiotikagabe (Abbildung 14C, $p<0,05$). Bei den anderen Gruppen gab es hier keine Unterschiede. Ebenfalls unterschieden sich die Gruppen nicht hinsichtlich der Kryptentiefe (Abbildung 14D).

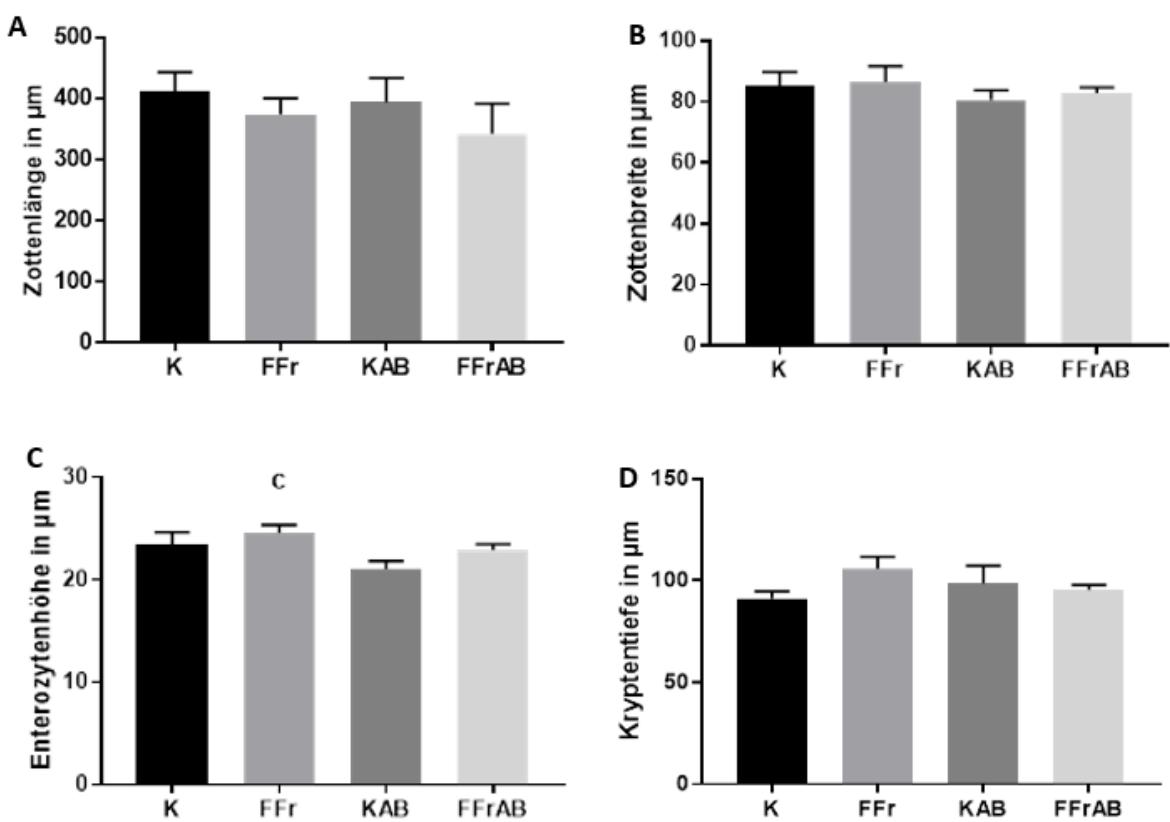


Abbildung 14: Einfluss der Fütterung einer Fett- und Fruktosereichen Diät und einer zusätzlichen Antibiotikagabe auf die Morphologie im Duodenum. (n=5-8). A) statistische Auswertung der Zottenlänge in Mikrometer im Duodenum, B) statistische Auswertung der Zottenbreite in Mikrometer im Duodenum, C) statistische Auswertung der Enterozytenhöhe in Mikrometer im Duodenum, *p<0,05 im Vergleich zu KAB D) statistische Auswertung der Kryptentiefe in Mikrometer im Duodenum, K = Kontrolldiät, FFr = Fett-, Fruktosereiche Diät, AB = Antibiotikum, die Ergebnisse sind als MW ± SEM angegeben.

5. Diskussion

Weltweit steigt die Prävalenz metabolischer Erkrankungen wie der NAFLD an, weshalb ein großer Bedarf an Präventionsmaßnahmen besteht, die weiter ausgebaut werden müssen [2, 66]. Studien weisen darauf hin, dass die Hauptfaktoren, die zu metabolischen Krankheiten führen, zum einen der erhöhte Konsum von hochkalorischen, ballaststoffarmen Lebensmitteln, und zum anderen der Mangel an körperlicher Aktivität ist [67]. Neben diesen Faktoren scheint auch die Darmbarriere einen wesentlichen Einfluss zu nehmen [48, 68]. Studien haben gezeigt, dass NAFLD-Patienten eine höhere intestinale Permeabilität aufweisen [35, 52]. Somit scheint es einen Zusammenhang zwischen einer gestörten Darmbarriere und der NAFLD Entstehung zu geben [69]. Studien haben ebenfalls gezeigt, dass NAFLD-Patienten ein verändertes Mikrobiom, im Vergleich zu gesunden Probanden, aufweisen [33]. Die Anwendung von Antibiotika als Therapiemöglichkeit zur Behandlung der NAFLD ist bis heute nicht etabliert. Dennoch konnten in tierexperimentellen Studien und kleinen Humanstudien bereits Erfolge in Hinblick auf die präventive Funktion von Antibiotika auf die Entstehung der NAFLD gezeigt werden [16, 50, 70]. Ungeklärt ist jedoch, ob die Veränderungen der Mikroorganismen oder andere Faktoren für den Verlust der Barrierefunktion bei NAFLD Patienten von Bedeutung sind. Hintergrund dieser Arbeit war, herauszufinden, ob eine Antibiotikagabe vor der NAFLD Entstehung schützt, und wenn dies der Fall ist, ob dies mit einer Verbesserung der intestinalen Barrierefunktion einhergeht.

5.1. Das Mausmodell zur Untersuchung molekularer Mechanismen der NAFLD

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhielten männliche C57BL/6J Mäuse 8 Wochen lang eine flüssige fett- und fruktosereiche Diät oder eine Kontrolldiät. Zwei weitere Gruppen wurden mit den jeweiligen Diäten und einer zusätzlichen Antibiotikagabe behandelt.

Mausmodelle haben im Vergleich zu Humanstudien einige Vorteile in der Untersuchung molekularer Mechanismen. Es besteht die Möglichkeit bestimmte Variablen, wie Umweltfaktoren oder die Ernährung, die Einfluss auf die Erkrankung nehmen, direkt zu steuern [71]. So gibt es im Mausmodell sowohl einfache und kontrollierbare Haltungsbedingungen, als auch eine einheitliche Fütterung. In Humanstudien kann das Ernährungsverhalten nicht in diesem Ausmaß gesteuert und beeinflusst werden.

Außerdem führt die Fütterung der Mäuse mit einer fett- und fruktosereichen Diät, aufgrund der kürzeren Lebensdauer, zu einer rascheren Krankheitsentwicklung als beim Menschen [72]. Im Vergleich zu in-vitro Modellen kann die Leber der Maus als vollständiges und intaktes Organ untersucht werden, womit dynamische Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen beobachtet werden können [71]. Dennoch müssen die Ergebnisse aus tierexperimentellen Studien in Bezug auf die Übertragbarkeit auf den Menschen immer kritisch beleuchtet werden, da bestimmte metabolische Eigenschaften zwischen Mensch und Maus nicht gänzlich ident sind [73]. Das ideale Tiermodell welches alle Aspekte der humanen NAFLD Pathogenese wie die typischen histologischen Merkmale, metabolischen Hintergrund wie Adipositas, Hyperglykämie, Insulinresistenz, Dyslipidämie, rekapituliert, existiert in dieser Form nicht [73]. In Studien mit Mäusen die mit einer atherogenen Diät, die mit Cholesterin und Cholat angereichert ist, gefüttert wurden, entwickelten zwar eine charakteristische NASH, waren jedoch systematisch insulinsensitiv [74]. Diese Tiermodelle replizieren somit nicht das volle Spektrum der NAFLD beim Menschen, sie können jedoch hilfreich sein, um Hypothesen zur Pathogenese der NASH zu überprüfen und Interventionsstudien durchzuführen [75].

Männliche C57BL/6J Mäuse weisen im Vergleich zu weiblichen Mäusen eine geringere Anfälligkeit für diätinduzierte Leberschäden auf [76]. Häufig kommt es bei männlichen Mäusen zu einer höheren absoluten Gewichtszunahme und gleichzeitig zu weniger lobulären Entzündungen und neutrophilen Granulozyten als bei weiblichen Mäusen [76]. Außerdem wurde im vorliegenden Tierversuch Schweinefett als Fettquelle verwendet, während in zuvor von der Arbeitsgruppe durchgeführten Versuchen Butterfett die Fettquelle darstellte [16, 77, 78]. Dieser Hintergrund sollte im Hinblick auf die vorliegende Arbeit berücksichtigt werden.

5.2. Einfluss einer fett- und fruktosereichen Diät auf die NAFLD Entstehung im Mausmodell

In der vorliegenden Arbeit führte eine 8-wöchige fett- und fruktosereiche Diät bei männlichen C57BL/6J Mäusen zu einer NAFLD Entstehung. Das Gesamtgewicht der vier Versuchstiergruppen unterschied sich nicht, jedoch lag das Lebergewicht der beiden FFr-gefütterten Gruppen über den der Kontrolltiere. Die 8-wöchige Aufnahme der FFr-Diät führte zu einer signifikanten Verfettung der Leber mit beginnenden Entzündungsgeschehen. In Humanstudien gibt es Beobachtungen, dass neben einer generellen Überernährung, die erhöhte Aufnahme bestimmter Makronährstoffe, vor allem gesättigte Fettsäuren und Zucker zur NAFLD-Entstehung beitragen [14, 15, 79]. Insbesondere ein hoher Fruktosekonsum wird in mehreren Studien als Risikofaktor, eine NAFLD zu entwickeln, diskutiert [51, 80, 81]. Ein möglicher zugrunde liegender Mechanismus dahinter ist die Erhöhung der Darmpermeabilität und damit einhergehend erhöhte Endotoxin-Spiegel die TLR4-abhängige Signalwege und Kupfferzellen im Lebergewebe aktivieren könnten [80, 82]. Dies deckt sich auch mit der höheren Expression von F4/80 mRNA im Lebergewebe der FFr-gefütterten Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren.

5.3. Die gleichzeitige Gabe von Antibiotika schützt vor der Entstehung der diätinduzierten NAFLD im Mausmodell

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Antibiotika zu einem geringeren Anstieg der Parameter der diätinduzierte NAFLD Entstehung führte. *Es kam zu einem protektiven Effekt der oralen Antibiotikagabe auf die diätinduzierte NAFLD Entstehung bei C57BL/6J Mäusen.* Bei den durchgeführten Untersuchungen zeigte sich bei Lebern der FFr-gefütterten Mäuse mit zusätzlicher Antibiotikagabe eine reduzierte Leberfettakkumulation. Auch die Zahl neutrophiler Granulozyten und die Expression von F4/80 mRNA war in der FFr-gefütterten Gruppe, die zusätzlich ein Antibiotikum erhalten haben, deutlich geringer im Vergleich zu FFr-gefütterten Mäusen ohne oraler Antibiotikagabe. Außerdem wurde auch die TBARS Konzentration der FFr+AB gefütterten Mäuse beinahe auf das Niveau der Kontrolltiere reduziert. Die Kontrolltiere mit zusätzlicher Antibiotikagabe zeigten bei diesen Parametern keine signifikanten

Unterschiede zu den Kontrolltieren, weswegen davon auszugehen ist, dass die zusätzliche Antibiotikagabe hier keinen schädigenden Effekt auf die Leber gehabt hat.

Diese Ergebnisse sind in Einklang mit zuvor durchgeführten Studien, bei welchen die orale Antibiotikagabe bei C57BL/6J Mäusen ebenfalls die NAFLD Entstehung abmildern konnte [16, 50, 53]. In der Studie von Brandt et al., wurden weibliche C57BL/6J Mäuse untersucht und bei der Fütterung handelte es sich um eine fett-, fruktose- und cholesterinreiche Diät. Bei dem Antibiotikum wurde eine Mischung aus Polymyxin und Neomycin angewendet. Trotz kurzer Dauer von 8 Tagen zeigte das Antibiotikum einen Schutz vor den frühen Anzeichen einer diätinduzierten NAFLD [16]. Außerdem gibt es auch Humanstudien welche einen positiven Effekt einer Antibiotikatherapie bei NAFLD Patienten aufzeigen konnten [83]. Jedoch gibt es auch Studien bei der eine orale Antibiotikagabe zu keiner Verbesserung der diätinduzierten NAFLD geführt hat [54]. In der Studie von Bier et al., wurden Ratten über acht Wochen mit einer 60% igen-fruktosereichen Diät gefüttert und erhielten zusätzlich ein Antibiotikum, das aus Ampicillin und Neomycin bestand. Das Antibiotikum reduzierte die mikrobielle Diversität zwar drastisch und auch die Mikrobiota-Zusammensetzung wurde verändert, dennoch kam es zu keinen metabolischen Unterschieden im Vergleich zu den Ratten ohne zusätzlicher Antibiotikagabe [54]. Im Gegensatz dazu wurden im selben Rattenmodell bei einer 30%igen-Fruktose-Diät und zusätzlicher Antibiotikagabe Parameter der Leber verbessert [84, 85]. Möglicherweise liegen die Unterschiede in der Zusammensetzung der Diät und damit an einer differenzierten Verstoffwechselung, abhängig von der Fruktose-Dosis [54]. In der vorliegenden Arbeit wurde ein nicht resorbierbares Breitbandantibiotikum aus Ampicillin, Vancomycin, Metronidazol und Gentamycin verwendet. Inwiefern die Zusammensetzung des Antibiotikums und auch die Fütterung der Mäuse Einfluss auf die Auswirkung in der Leber hat, müsste weiter untersucht werden. Es gibt somit zahlreiche Unterschiede im Studiendesign, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen.

Insgesamt weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die zusätzliche Antibiotikagabe die Entstehung der diätinduzierten NAFLD deutlich abmildert. Um spezifische Aussagen zu den Wirkungsweisen und Effekten der Behandlung treffen zu können sind weitere Untersuchungen notwendig. Außerdem ist nicht klar, welche langfristigen Effekte eine

Antibiotikagabe bei der diätinduzierten NAFLD hat. Auch dies müsste in weiterführenden Studien geklärt werden.

Eine Studie zeigte, dass die Störung der Darmgefäßbarriere ein frühes Ereignis der NASH-Pathogenese ist [86]. Die erhöhte intestinale Permeabilität der Darmbarriere kann zur Translokation ganzer Bakterien oder bakterieller Produkte führen, die somit über den Pfortaderkreislauf zur Leber gelangen können [86]. In den vorliegenden Untersuchungen könnte durch die orale Gabe des Antibiotikums es zu einer drastischen Reduktion der Mikroorganismen gekommen sein und somit weniger bakterielle Produkte über den Pfortaderkreislauf zur Leber gelangt sein. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keine Reduktion der Permeation von Xylose im Everted Gut Sac Modell bei Mäusen mit zusätzlicher Antibiotikagabe beobachtet werden. Sowohl beim Vergleich der Kontrollgruppe mit der Kontrollgruppe + AB als auch beim Vergleich der FFr-Gruppe zur FFr-Gruppe +AB zeigte sich keine Reduktion der Xylosepermeation. Die beiden FFr-gefütterten Versuchsgruppen zeigten eine höhere Xylosepermeation als die Kontrolltiere. *Der protektive Effekt der Antibiotika Behandlung auf die Entstehung der NAFLD war nicht mit einem Schutz vor der erhöhten intestinalen Permeabilität assoziiert.* Diese Mechanismen sind vermutlich auf die Zusammensetzung der Nahrung, insbesondere dem Zucker- und Fettgehalt, zurückzuführen. In einer Studie von Brandt et al., konnten durch den Austausch von Rapsöl statt Butterfett die Versuchstiere vor einer Translokation von bakteriellen Endotoxin und TLR-4 Aktivierung in der Leber geschützt werden [87]. Dies deutet darauf hin, dass die Unterbrechung der Endotoxin/TLR4-Signalübertragung, sei es durch eine Verbesserung der Darmbarrierefunktion oder durch eine mögliche veränderte Zusammensetzung der Darmmikrobiota, die NAFLD Entstehung abmildern kann [82, 88]. Somit würde die gefundene Schutzwirkung des Antibiotikums auf Parameter der Leber nicht eine primäre Wirkung auf die Darmbarriere sein, sondern durch die deutliche Reduktion der Mikrobiota zustande kommen. In weiterer Folge gelangt somit weniger schädigendes bakterielles Endotoxin über die Pfortader zur Leber und Signalkaskaden der NAFLD Entstehung werden reduziert.

Zusammenfassend legen die Daten nahe, dass die schützende Wirkung einer oralen Antibiotikagabe auf die diätinduzierte NAFLD Entstehung durch weniger schädigendes bakterielles Endotoxin und damit einhergehender Aktivierung von TLR4 in der Leber

resultieren könnte [88, 89]. Das Antibiotikum hat somit keine primäre Schutzwirkung auf die Darmbarriere, sondern ist auf die verminderte Translokation von bakteriellen Endotoxin zurückzuführen.

Sowohl Tier- als auch Humanstudien haben gezeigt, dass die Entwicklung einer NAFLD mit Veränderungen der Darmbarrierefunktion und in weiterer Folge mit einer Translokation von bakteriellen Endotoxin über die Pfortader zur Leber einhergeht [35, 50, 90, 91]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Schutz vor dem Verlust von Tight-Junction-Proteinen im Dünndarm mit einer verringerten portalen Endotoxinkonzentration in Zusammenhang steht [92]. Die Ergebnisse in tierexperimentellen Studien weisen weiters darauf hin, dass es durch die diätinduzierte Veränderung der Darmpermeabilität zu einer verminderten Konzentration an Tight Junction Proteinen wie Occludin und ZO-1 kommt [17, 43, 82, 93]. Die Veränderungen der Tight Junction Proteine werden als ausschlaggebend für die erhöhte Permeabilität der Darmbarriere diskutiert [94]. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass durch eine zusätzliche Antibiotikagabe, zu einer Cholin-defizienten Diät, der Verlust von Tight Junction Proteinen fast vollständig reduziert werden konnte [93]. In der Studie von Brandt et al., zeigte sich, dass C57BL/6J Mäuse bei einer 8-tägigen Fütterung einer modifizierten Western-Style Diät und zusätzlicher Antibiotikagabe ebenfalls keine Reduktion der Tight Junction Proteine Occludin und ZO-1 aufgewiesen haben [16]. In der vorliegenden Arbeit konnte aufgrund der zu hohen Streuung von Occludin im Western Blot und der eingeschränkten Zahl an auswertbaren ZO-1 Proteinfärbung konnten für diese beiden Tight Junction Proteine keine Auswertungen durchgeführt werden. *Tight Junction Proteine sind nicht auswertbar – könnten aber wesentlich sein.* Die Mechanismen, die an der ernährungsabhängigen Regulation der Tight Junction Proteine beteiligt sind, konnten noch nicht vollständig geklärt werden [53]. Es könnte auch die Phosphorylierung der Tight Junction Proteine eine entscheidende Rolle spielen, da diese für die Stabilität der Proteine entscheidend ist [95].

Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es noch keine konkreten Daten über den Zusammenhang der Dünndarmmorphologie und der Leber. In einer Studie zeigte sich, dass die Morphologie des Dünndarms leicht durch verschiedene Ernährungsmuster verändert werden kann [96]. Neben Tight Junction Proteinen stellen auch schleimsezernierende Becherzellen eine wichtige Barriere dar, um Krankheitserreger vor dem Eindringen in die Schleimhaut zu

hindern [97]. Diese Zellen sind essenziell für die Aufrechterhaltung der Immunität des Darmtrakts und sind die erste Verteidigungslinie gegenüber Krankheitserregern [97]. Ein Defekt dieser Schleimschicht würde es zahlreichen Bakterien ermöglichen in das Epithel einzudringen [98]. In welcher Form der Schleimhautdefekt Einfluss auf die Leber und NAFLD hat, ist noch nicht geklärt. Häufig wird diskutiert, dass eine Antibiotikagabe die Darmschleimschicht stören könnte, und dabei entweder den Schleimabbau verstärkt oder die normalen kommensalen Auslöser für die Schleimproduktion hemmt [99]. Bei den vorliegenden Untersuchungen konnte jedoch keine Veränderung der Zahl der schleimsezernierenden Becherzellen gezeigt werden.

Entzündungsmediatoren wie Zytokine oder Lipide können zur vermehrten Freisetzung von Mucinen führen. Die Fixierung der Darmgewebeschnitte führt zum Verlust der Mucine, wodurch keine Aussage über deren Zusammensetzung gemacht werden kann [100]. Eine Studie hat gezeigt, dass zwischen keimfreien Tieren und konventionell aufgezogenen Tieren die Mucinzusammensetzung verändert ist [101]. Becherzellen von keimfreien Nagetieren waren dabei weniger zahlreich und kleiner als bei herkömmlich aufgezogenen Mäusen. Weitere Studien haben gezeigt, dass auch Ernährungsfaktoren die Becherzellzahl und die Mucinheterogenität beeinflussen und damit die Sekretion der Becherzellen modulieren könnten [102, 103]. Studien weisen darauf hin, dass die Mikrobiota die Becherzellfunktion direkt beeinflusst, als auch darauf, dass bioaktive Faktoren die Funktion der Becherzellen verändert. Proinflammatorische Zytokine wie TNF-Alpha oder IL-6 zeigten in Studien eine Stimulation der Mucinsekretion und eine erhöhte Expression von MUC2, MUC5AC, MUC2B und MUC6 [104]. Die Exposition gegenüber Gram-positiven als auch Gram-negativen Bakterien erhöhte die Mucinproduktion ebenfalls [102]. Das Fehlen dieser Bakterien könnte somit zur Reduktion der Mucinproduktion führen, wodurch die Permeabilität der Darmbarriere negativ beeinflusst wird. In der vorliegenden Untersuchung wurde die Sezernierung der Becherzellen nicht erhoben, sondern ausschließlich die Anzahl dieser. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen den vier Versuchsgruppen beobachtet werden. Möglicherweise kommt es durch die drastische Reduktion der Mikrobiota aufgrund des Antibiotikums zu einer Veränderung der Mucinzusammensetzung und Größe der Becherzellen, jedoch hat dies keinen direkten Einfluss auf die Anzahl an Becherzellen.

Diese Einflussfaktoren müssten in weiterführenden Studien untersucht werden und auch ob diese in weiterer Folge Einfluss auf die Leber und NAFLD Entstehung haben.

Bei den vorliegenden Untersuchungen führte die fett- und fruktosereiche Diät zu keiner Veränderung der Dünndarmmorphologie. Eine Ausnahme stellt die Höhe der Enterozyten dar, bei der ein signifikanter Unterschied zwischen der FFr-Gruppe und der Kontrollgruppe mit Antibiotikagabe beobachtet werden konnte. Enterozyten stellen die Hauptkomponenten des Darmepithels dar und sind für die Ionen-, Wasser-, Zucker-, Peptid- und Lipidaufnahme verantwortlich [97]. Ob dies möglicherweise in Zusammenhang mit der erhöhten Permeabilität steht, müsste weiter untersucht werden.
Die Behandlung mit Antibiotika führt zu keiner Veränderung der Becherzellen und Morphologie im Duodenum bei C57BL/6J Mäusen.

Fazit

Insgesamt weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass die orale Antibiotikagabe vor einer diätinduzierten NAFLD Entstehung im Mausmodell schützt. Welche Mechanismen dieser Wirkung zugrunde liegen, konnte in dieser Arbeit jedoch nicht abschließend geklärt werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Schutzwirkung des Antibiotikums keine direkte Wirkung auf die Darmbarriere ist, sondern aufgrund der drastischen Reduktion der Mikrobiota zustande kommt. In weiterer Folge gelangt weniger schädigendes bakterielles Endotoxin über die Pfortader zur Leber und Signalkaskaden der NAFLD Entstehung werden reduziert (siehe Abbildung 15). Inwiefern die Mikrobiotazusammensetzung verändert wird und welche Folge eine langfristige Antibiotikagabe hätte, müsste in weiterführenden Studien untersucht werden.

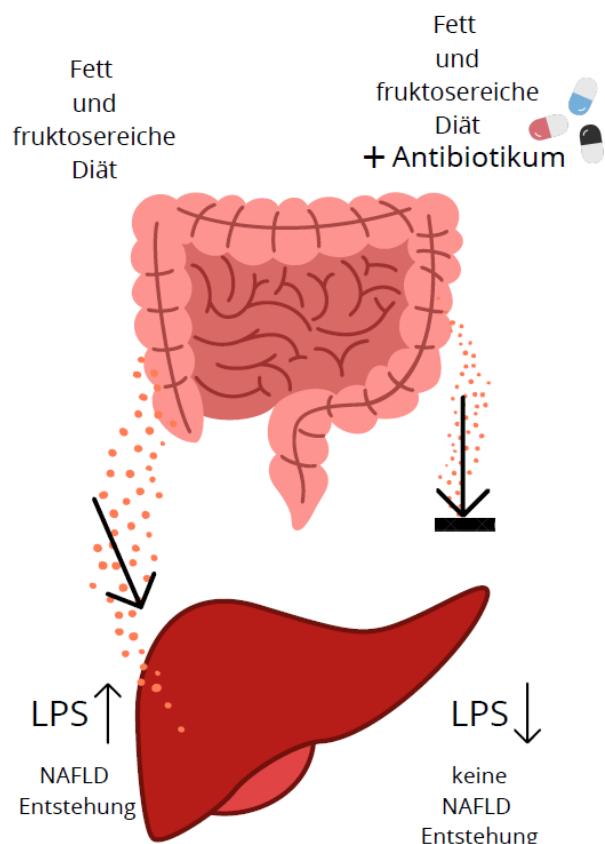


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Einflusses einer Fett- und fruktosereichen Diät und einer gleichzeitigen Antibiotikagabe auf die NAFLD Entstehung. Durch eine fett- und fruktosereiche Diät gelangt vermehrt LPS über die Portalvene zur Leber und aktiviert Signalkaskaden der NAFLD Entstehung. Eine zusätzliche Antibiotikagabe reduziert die Mikrobiota im Darm und führt zu reduzierten LPS Spiegeln und damit einer verringerten NAFLD Entstehung.

Zusammenfassung

Die nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung (NAFLD) ist die häufigste chronische Lebererkrankung weltweit, mit noch immer steigender Prävalenz. Neueste Erkenntnisse zeigen, dass neben Lebensstilfaktoren wie Fettleibigkeit oder Insulinresistenz auch eine Störung der Darmbarriere ein Risikofaktor für die Entwicklung der NAFLD darstellt. In tierexperimentellen Studien führt eine fett- und fruktosereiche Diät zu einem Verlust von Tight Junction Proteinen und damit einhergehend zu einer Störung der Darmbarriere. Aufgrund der erhöhten Darmpermeabilität gelangen bakterielles Endotoxin über die Pfortader vermehrt zur Leber und spezifische Signalkaskaden, die an der NAFLD-Entstehung beteiligt sind, werden somit aktiviert. Eine orale Antibiotikagabe steht in Zusammenhang eine diätinduzierte NAFLD Entstehung reduzieren zu können. Ob dies direkt als Folge einer Verbesserung der Darmbarriere geschieht, oder nur aufgrund der Dezimierung der Darmmikrobiota ist noch nicht klar. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den Einfluss einer oralen Antibiotikagabe auf die diätinduzierte NAFLD Entstehung und die Darmbarriere zu untersuchen. Dazu wurden männliche C57BL/6J Mäuse für acht Wochen mit einer Kontrolldiät oder einer fett- und fruktoserenen Diät gefüttert, die jeweils mit oder ohne ein Antibiotikum angereichert war. Anschließend wurden Parameter der Leber wie der NAFLD-Activity Score, die Anzahl neutrophiler Granulozyten, die Expression von F4/80 mRNA und die Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen Konzentration bestimmt. Zur Untersuchung molekularer Mechanismen im Duodenum wurde die Xylosepermeation im ex vivo Everted Gut Sac Modell gemessen und die Anzahl an Becherzellen und Morphologie des Duodenums bestimmt. Es zeigte sich, dass die orale Antibiotikagabe einen Schutz vor der diätinduzierten NAFLD Entstehung bietet. Die FFr-Versuchstiergruppe mit zusätzlicher Antibiotikagabe zeigte bei allen vier gemessenen Leberparametern Werte, die auf dem Niveau der Kontrolltiere lagen. Wohingegen diese in den FFr-Gruppen deutlich erhöht waren. Bei der Messung der Xylosepermeation zeigte sich keine Veränderung der Permeabilität in den Versuchstiergruppen mit Antibiotikagabe, im Vergleich zu FFr-gefütterten Tieren. Auch die Anzahl an Becherzellen und Parameter der Morphologie im Duodenum zeigten keine Unterschiede zwischen den vier Versuchstiergruppen. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die orale Antibiotikagabe vor der diätinduzierten NAFLD Entstehung schützt, dies aber nicht mit einer Verbesserung der Darmbarrierefunktion einhergeht.

Summary

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common chronic liver disease worldwide, with still increasing prevalence. Recent evidence suggests that, in addition to lifestyle factors such as obesity or insulin resistance, intestinal barrier dysfunction is also a risk factor for the development of NAFLD. In animal studies, a high-fat and high-fructose diet leads to a loss of tight junction proteins and thus to a disturbance of the intestinal barrier. Due to the increased intestinal permeability, bacterial endotoxin reaches the liver via the portal vein and specific signalling cascades involved in the development of NAFLD are activated. Oral antibiotic administration is associated with being able to reduce diet-induced NAFLD development. Whether this occurs directly as a consequence of an improvement of the intestinal barrier or only due to the decimation of the intestinal microbiota is not yet clear. Therefore, starting from this background, the aim of the present work was to investigate the influence of an oral antibiotic administration on diet-induced NAFLD development and the gut barrier. For this purpose, male C57BL/6J mice were fed a control diet or a high-fat and high-fructose diet, each enriched with or without an antibiotic, for eight weeks. Liver parameters such as NAFLD activity score, neutrophil granulocyte count, F4/80 mRNA expression and TBARS concentration were then determined. To investigate molecular mechanisms in the duodenum, xylose permeation was assessed in the ex vivo Everted Gut Sac model, and the number of goblet cells and duodenal morphology were determined. Oral antibiotic administration was found to provide protection against diet-induced NAFLD development. The FFr experimental animal group with additional antibiotic administration showed values for all four measured liver parameters that were at the level of the control animals. Whereas these were significantly increased in the FFr groups. The measurement of xylose permeation showed no change in permeability in the groups of animals with antibiotic administration compared to FFr-fed animals. There was also no effect on the number of goblet cells and on the morphology in the duodenum, and the four groups of experimental animals showed no differences with respect to these parameters. In conclusion, oral antibiotic administration was shown to protect against diet-induced NAFLD development, but this was not associated with an improvement in gut barrier function.

Literaturverzeichnis

1. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011; 34(3):274–285.
2. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease – Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology.* 2016; 64(1):73-84.
3. Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla DC, Roudot-Thoraval F. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol.* 2013; 58(3):593-608.
4. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science.* 2011; 332:1519-23.
5. Schumacher F, Tacke F. Die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD). *Hepatitis&more.* 2017; 1:26-31.
6. Heymann F, Tacke F. Immunology in the liver from homeostasis to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016; 13(2):88-110.
7. Perumpail BJ, Khan MA, Yoo ER, Cholankeril G, Kim D, Ahmed A. Clinical epidemiology and disease burden of non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2017; 23(47):8263-8276.
8. Yiki-Jarvinen H. Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014; 2(11):901-10.
9. Tilg H, Moschen AR, Roden M. NAFLD and diabetes mellitus. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017; 14(1):32-42.
10. Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, Gambino R, Cassader M, Baldi S, Ponti V, Pagano G, Ferrannini E, Rizzetto M. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia.* 2005; 48(4):634-42.
11. Baffy G, Brunt EM, Caldwell SH. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace. *J Hepatol.* 2012; 56(6):1384-91.
12. Wit NJW, Afman LA, Mensink M, Müller M. Phenotyping the effect of diet on non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2012; 57(6):1370-3.

13. Duarte SMB, Stefano JT, Vanni DS, Carriho FJ, Oliveira CPMS. Impact of current diet at the risk of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Arq Gastroenterol*. 2019; 56(4):431-439.
14. Hashemi KA, Alavian SM, Haghigatdoost F, Azadbakht L. Diet macronutrients composition in nonalcoholic fatty liver disease: a review on the related documents. *Hepat Mon*. 2014; 14(2): e10939.
15. Nier A, Brandt A, Conzelmann IB, Özel Y, Bergheim I. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Overweight Children: Role of Fructose Intake and Dietary Pattern. *Nutrients*. 2018; 10(9):1329.
16. Brandt A, Jin CJ, Nolte K, Sellmann C, Engstler AJ, Bergheim I. Short-Term Intake of a Fructose-, Fat- and Cholesterol-Rich Diet Causes Hepatic Steatosis in Mice: Effect of Antibiotic Treatment. *Nutrients*. 2017; 9(9):1013.
17. Sellmann C, Priebs J, Landmann M, Degen C, Engstler AJ, Jin CJ, Gärttner S, Spruss A, Huber O, Bergheim I. Diets rich in fructose, fat or fructose and fat alter intestinal barrier function and lead to the development of nonalcoholic fatty liver disease over time. *J Nutr Biochem*. 2015; 26(11):1183-92.
18. Romero-Gomez M, Zelber-Sagi S, Trenell M. Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. *J Hepatol*. 2017; 67(4):829-846.
19. Vilar-Gomez E, Martinez-Perez Y, Calzadilla-Bertot L, Friedmann SL, Diago M, Romero-Gomez M. Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterol*. 2015; 149:367-378.
20. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med*. 2018; 24(7):908-922.
21. Kolodziejczyk AA, Zheng D, Shibolet O, Elinav E. The role of the microbiome in NAFLD and NASH. *EMBO Mol Med*. 2019; 11(2):e9302.
22. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J; MetaHIT

- Consortium, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010; 464(7285):59-65.
23. Ghaisas S, Maher J, Kanthasamy A. Gut microbiome in health and disease: Linking the microbiome-gut-brain axis and environmental factors in the pathogenesis of systemic and neurodegenerative diseases. *Pharmacol Ther*. 2016; 158:52-62.
 24. Morelli L. Postnatal development of intestinal microflora as influenced by infant nutrition. *J Nutr*. 2008; 138(9):1791S-1795S.
 25. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenent LT, Ley RE. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(1):4578-85.
 26. Prideaux L, Kang S, Wagner J, Buckley M, Mahar JE, De Cruz P, Wen Z, Chen L, Xia B, van Langenberg DR, Lockett T, Ng SC, Sung JJ, Desmond P, McSweeney C, Morrison M, Kirkwood CD, Kamm MA. Impact of ethnicity, geography, and disease on the microbiota in health and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(13):2906-18.
 27. Gentile CL, Weir TL. The gut microbiota at the intersection of diet and human health. *Science*. 2018;362(6416):776-780.
 28. Lyte M, Vulchanova L, Brown DR. Stress at the intestinal surface: catecholamines and mucosa-bacteria interactions. *Cell Tissue Res*. 2011;343(1):23-32.
 29. Shi N, Li N, Duan X, Niu H. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Mil Med Res*. 2017; 4:14.
 30. Scher JU, Ubeda C, Artacho A, Attur M, Isaac S, Reddy SM, Marmon S, Neumann A, Brusca S, Patel T, Manasson J, Pamer EG, Littman DR, Abramson SB. Decreased bacterial diversity characterizes the altered gut microbiota in patients with psoriatic arthritis, resembling dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Arthritis Rheumatol*. 2015; 67(1):128-39.
 31. Ghaisas S, Maher J, Kanthasamy A. Gut microbiome in health and disease: Linking the microbiome-gut-brain axis and environmental factors in the pathogenesis of systemic and neurodegenerative diseases. *Pharmacol Ther*. 2016; 158:52-62.
 32. Safari Z, Gérard P. The links between the gut microbiome and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Cell Mol Life Sci*. 2019; 76(8):1541-1558.

33. Wang B, Jiang X, Cao M, Ge J, Bao Q, Tang L, Chen Y, Li L. Altered Fecal Microbiota Correlates with Liver Biochemistry in Nonobese Patients with Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Sci Rep.* 2016; 6:32002.
34. Loomba R, Seguritan V, Li W, Long T, Klitgord N, Bhatt A, Dulai PS, Caussy C, Bettencourt R, Highlander SK, Jones MB, Sirlin CB, Schnabl B, Brinkac L, Schork N, Chen CH, Brenner DA, Biggs W, Yooseph S, Venter JC, Nelson KE. Gut Microbiome-Based Metagenomic Signature for Non-invasive Detection of Advanced Fibrosis in Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metab.* 2017; 25(5):1054-1062.e5.
35. Miele L, Valenza V, La Torre G, Montalto M, Cammarota G, Ricci R, Masciana R, Forgione A, Gabrieli ML, Perotti G, Vecchio FM, Rapaccini G, Gasbarrini G, Day CP, Grieco A. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2009; 49(6):1877-87.
36. Cui Y, Wang Q, Chang R, Zhou X, Xu C. Intestinal Barrier Function – Non alcoholic Fatty Liver Disease Interactions and Possible Role of Gut Microbiota. *J Agric Food Chem.* 2019; 67:2754-2762.
37. Romero ES, Cotoner CA, Camacho CP, Bedmar MC, Vicario M. The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Rev Esp Enferm Dig.* 2015; 107(11):686-96.
38. Roxas JL, Viswanathan VK. Modulation of Intestinal Paracellular Transport by Bacterial Pathogens. *Compr Physiol.* 2018; 8(2):823-842.
39. Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol.* 1963;17(2):375-412.
40. Förster C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol.* 2008;130(1):55-70.
41. Brunner J, Ragupathy S, Borchard G. Target specific tight junction modulators. *Adv Drug Deliv Rev.* 2021; 171:266-288.
42. Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 2009; 124(1):3-20.
43. Rahman K, Desai C, Iyver SS, Thorn NE, Kumar P, Liu Y, Smith T, Neish AS, Li H, Tan S, Wu P, Liu X, Yu Y, Farris AB, Nusrat A, Parkos CA, Anania FA. Loss of Junctional Adhesion Molecule A Promotes Severe Steatohepatitis in Mice on a Diet High in Saturated Fat, Fructose and Cholesterol. *Gastroenterology.* 2016; 151(4):733-746.

44. Gäbele E, Dostert K, Hofmann C, Wiest R, Schölmerich J, Hellerbrand C, Obermeier F. DSS induced colitis increases portal LPS levels and enhances hepatic inflammation and fibrogenesis in experimental NASH. *J Hepatol.* 2011; 55(6):1391-9.
45. Luther J, Garber JJ, Khalili H, Dave M, Bale SS, Jindal R, Motola DL, Luther S, Bohr S, Jeoung SW, Deshpande V, Singh G, Turner JR, Yarmush ML, Chung RT, Patel SJ. Hepatic Injury in Nonalcoholic Steatohepatitis Contributes to Altered Intestinal Permeability. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2015; 1(2):222-232.
46. Hamilton MK, Boudry G, Lemay DG, Raybould HE. Changes in intestinal barrier function and gut microbiota in high-fat diet-fed rats are dynamic and region dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2015; 308(10):G840-51.
47. Zhu JZ, Hollis-Hansen K, Wan XY, Fei SJ, Pang XL, Meng FD, Yu CH, Li YM. Clinical guidelines of non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review. *World J Gastroenterol.* 2016; 22(36):8226-33.
48. Boursier J, Mueller O, Barret M, Machado M, Fizanne L, Araujo-Perez F, Guy CD, Seed PC, Rawls JF, David LA, Hunault G, Oberti F, Calès P, Diehl AM. The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota. *Hepatology.* 2016; 63(3):764-75.
49. Del Chierico F, Nobili V, Vernocchi P, Russo A, De Stefanis C, Gnani D, Furlanello C, Zandonà A, Paci P, Capuani G, Dallapiccola B, Miccheli A, Alisi A, Putignani L. Gut microbiota profiling of pediatric nonalcoholic fatty liver disease and obese patients unveiled by an integrated meta-omics-based approach. *Hepatology.* 2017; 65(2):451-464.
50. Bergheim I, Weber S, Vos M, Krämer S, Volynets V, Kaserouni S, McClain CJ, Bischoff SC. Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: role of endotoxin. *J Hepatol.* 2008; 48(6):983-92.
51. Thuy S, Ladurner R, Volynets V, Wagner S, Strahl S, Königsrainer A, Maier KP, Bischoff SC, Bergheim I. Nonalcoholic fatty liver disease in humans is associated with increased plasma endotoxin and plasminogen activator inhibitor 1 concentrations and with fructose intake. *J Nutr.* 2008; 138(8):1452-5.
52. Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, McCarthy PJ, Grose RH, Cummins AG. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability,

- endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*. 2001; 48(2):206-11.
53. Wagnerberger S, Spruss A, Kanuri G, Volynets V, Stahl C, Bischoff SC, Bergheim I. Toll-like receptors 1-9 are elevated in livers with fructose-induced hepatic steatosis. *Br J Nutr*. 2012; 107(12):1727-38.
 54. Bier A, Khasbab R, Haberman Y, Braun T, Hadar R, Sosnovski K, Amir A, Leibowitz A, Grossman E. Antibiotic Treatment Does Not Ameliorate the Metabolic Changes in Rats Presenting Dysbiosis After Consuming a High Fructose Diet. *Nutrients*. 2020; 12(1):203.
 55. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005; 41(6):1313-21.
 56. Moloney WC, McPherson K, Fliegelman L. Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. *J Histochem Cytochem*. 1960; 8:200-7.
 57. van der Laarse WJ, van Noort P, Diegenbach PC. Calibration of quantitative histochemical methods: estimation of glycogen content of muscle fibers using the PAS reaction. *Biotech Histochem*. 1992; 67(5):303-8.
 58. Baum S. The PAS Reaction for Staining Cell Walls. *CSH Protoc*. 2008; 2008:pdb.prot4956.
 59. Graham RC Jr, Karnovsky MJ. Glomerular permeability. Ultrastructural cytochemical studies using peroxidases as protein tracers. *J Exp Med*. 1966; 124(6):1123-34.
 60. Ghani MA, Barril C, Bedgood DR Jr, Prenzler PD. Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Food Chem*. 2017; 230:195-207.
 61. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72:248-54.

62. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162(1):156-9.
63. Gadkar Vy, Filion M. New Developments in Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction Technology. *Curr Issues Mol Biol*. 2014; 16:1-6. Epub 2013 Apr 8.
64. Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*. 2012; 4(9):429-34.
65. Stochaj WR, Berkelman T, Laird N. Staining Membrane-Bound Proteins with Ponceau S. *Cold Spring Harb Protoc*. 2006; 2006(5):pdb.prot4543.
66. Saklayen MG. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep*. 2018; 20(2):12.
67. Sherling DH, Perumareddi P, Hennekens CH. Metabolic Syndrome. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2017; 22(4):365-367.
68. Fändriks L. Roles of the gut in the metabolic syndrome: an overview. *J Intern Med*. 2017; 281(4):319-336.
69. Hu H, Lin A, Kong M, Yao X, Yin M, Xia H, Ma J, Liu H. Intestinal microbiome and NAFLD: molecular insights and therapeutic perspectives. *J Gastroenterol*. 2020; 55(2):142-158.
70. Bass NM, Mullen KD, Sanyal A, Poordad F, Neff G, Leevy CB, Sigal S, Sheikh MY, Beavers K, Frederick T, Teperman L, Hillebrand D, Huang S, Merchant K, Shaw A, Bortey E, Forbes WP. Rifaximin treatment in hepatic encephalopathy. *N Engl J Med*. 2010; 362(12):1071-81.
71. Delire B, Stärkel P, Leclercq I. Animal Models for Fibrotic Liver Diseases: What We Have, What We Need, and What Is under Development. *J Clin Transl Hepatol*. 2015; 3(1):53-66.
72. Marin V, Rosso N, Dal Ben M, Raseni A, Boschelle M, Degrassi C, Nemeckova I, Nachtigal P, Avellini C, Tiribelli C, Gazzin S. An Animal Model for the Juvenile Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Non-Alcoholic Steatohepatitis. *PLoS One*. 2016; 11(7):e0158817.
73. Starkel P, Leclercq IA. Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011; 25(2):319-33.
74. Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S, Misu H, Ota T, Ando H, Yokoyama M, Honda M, Zen Y, Nakanuma Y, Miyamoto K, Kaneko S. Lipid-induced oxidative stress

- causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology*. 2007; 46(5):1392-403.
75. Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*. 2012; 18(19):2300-8.
 76. Spruss A, Henkel J, Kanuri G, Blank D, Püschel GP, Bischoff SC, Bergheim I. Female mice are more susceptible to nonalcoholic fatty liver disease: sex-specific regulation of the hepatic AMP-activated protein kinase-plasminogen activator inhibitor 1 cascade, but not the hepatic endotoxin response. *Mol Med*. 2012; 18(1):1346-55.
 77. Rajcic D, Brandt A, Jin CJ, Sánchez V, Engstler AJ, Jung F, Nier A, Baumann A, Bergheim I. Exchanging dietary fat source with extra virgin olive oil does not prevent progression of diet-induced non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *PLoS One*. 2020; 15(9):e0237946.
 78. Baumann A, Jin CJ, Brandt A, Sellmann C, Nier A, Burkard M, Venturelli S, Bergheim I. Oral Supplementation of Sodium Butyrate Attenuates the Progression of Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Nutrients*. 2020; 12(4):951.
 79. Zolfaghari H, Askari G, Siassi F, Feizi A, Sotoudeh G. Intake of Nutrients, Fiber, and Sugar in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Comparison to Healthy Individuals. *Int J Prev Med*. 2016; 7:98.
 80. Spruss A, Bergheim I. Dietary fructose and intestinal barrier: potential risk factor in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem*. 2009; 20(9):657-62.
 81. Alwahsh SM, Gebhardt R. Dietary fructose as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Arch Toxicol*. 2017; 91(4):1545-1563.
 82. Spruss A, Kanuri G, Wagnerberger S, Haub S, Bischoff SC, Bergheim I. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology*. 2009; 50(4):1094-104.
 83. Gangarapu V, Ince AT, Baysal B, Kayar Y, Kılıç U, Gök Ö, Uysal Ö, Şenturk H. Efficacy of rifaximin on circulating endotoxins and cytokines in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2015; 27(7):840-5.

84. Di Luccia B, Crescenzo R, Mazzoli A, Cigliano L, Venditti P, Walser JC, Widmer A, Baccigalupi L, Ricca E, Iossa S. Rescue of Fructose-Induced Metabolic Syndrome by Antibiotics or Faecal Transplantation in a Rat Model of Obesity. *PLoS One*. 2015; 10(8):e0134893.
85. Crescenzo R, Mazzoli A, Di Luccia B, Bianco F, Cancelliere R, Cigliano L, Liverini G, Baccigalupi L, Iossa S. Dietary fructose causes defective insulin signalling and ceramide accumulation in the liver that can be reversed by gut microbiota modulation. *Food Nutr Res*. 2017; 61(1):1331657.
86. Mouries J, Brescia P, Silvestri A, Spadoni I, Sorribas M, Wiest R, Milet E, Galbiati M, Invernizzi P, Adorini L, Penna G, Rescigno M. Microbiota-driven gut vascular barrier disruption is a prerequisite for non-alcoholic steatohepatitis development. *J Hepatol*. 2019; 71(6):1216-1228.
87. Brandt A, Rajcic D, Jin CJ, Sánchez V, Engstler AJ, Jung F, Nier A, Baumann A, Bergheim I. Fortifying diet with rapeseed oil instead of butterfat attenuates the progression of diet-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and impairment of glucose tolerance. *Metabolism*. 2020; 109:154283.
88. Jin CJ, Engstler AJ, Ziegenhardt D, Bischoff SC, Trautwein C, Bergheim I. Loss of lipopolysaccharide-binding protein attenuates the development of diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice. *J Gastroenterol Hepatol*. 2017; 32(3):708-715.
89. Li J, Sasaki GY, Dey P, Chitchumroonchokchai C, Labyk AN, McDonald JD, Kim JB, Bruno RS. Green tea extract protects against hepatic NF κ B activation along the gut-liver axis in diet-induced obese mice with nonalcoholic steatohepatitis by reducing endotoxin and TLR4/MyD88 signaling. *J Nutr Biochem*. 2018; 53:58-65.
90. Alisi A, Manco M, Devito R, Piemonte F, Nobili V. Endotoxin and plasminogen activator inhibitor-1 serum levels associated with nonalcoholic steatohepatitis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010; 50(6):645-9.
91. Farhadi A, Gundlapalli S, Shaikh M, Frantzides C, Harrell L, Kwasny MM, Keshavarzian A. Susceptibility to gut leakiness: a possible mechanism for endotoxaemia in non-alcoholic steatohepatitis. *Liver Int*. 2008; 28(7):1026-33.

92. Spruss A, Kanuri G, Stahl C, Bischoff SC, Bergheim I. Metformin protects against the development of fructose-induced steatosis in mice: role of the intestinal barrier function. *Lab Invest*. 2012; 92(7):1020-32.
93. Douhara A, Moriya K, Yoshiji H, Noguchi R, Namisaki T, Kitade M, Kaji K, Aihara Y, Nishimura N, Takeda K, Okura Y, Kawaratani H, Fukui H. Reduction of endotoxin attenuates liver fibrosis through suppression of hepatic stellate cell activation and remission of intestinal permeability in a rat non-alcoholic steatohepatitis model. *Mol Med Rep*. 2015; 11(3):1693-700.
94. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke JD, Serino M, Tilg H, Watson A, Wells JM. Intestinal permeability--a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol*. 2014; 14:189.
95. Van Itallie CM, Anderson JM. Phosphorylation of tight junction transmembrane proteins: Many sites, much to do. *Tissue Barriers*. 2018; 6(1):e1382671.
96. Makovicky P, Tumova E, Volek Z, Arnone JM, Samasca G, Makovicky P. The relationship between hepatocytes and small bowel after early and short food restriction: What the results show in morphometry. *Bratisl Lek Listy*. 2018; 119(3):156-159
97. Yang S, Yu M. Role of Goblet Cells in Intestinal Barrier and Mucosal Immunity. *J Inflamm Res*. 2021; 14:3171-3183.
98. Van der Sluis M, De Koning BA, De Bruijn AC, Velcich A, Meijerink JP, Van Goudoever JB, Büller HA, Dekker J, Van Seuningen I, Renes IB, Einerhand AW. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology*. 2006; 131(1):117-29.
99. Ng KM, Ferreyra JA, Higginbottom SK, Lynch JB, Kashyap PC, Gopinath S, Naidu N, Choudhury B, Weimer BC, Monack DM, Sonnenburg JL. Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature*. 2013; 502(7469):96-9.
100. Deplancke B, Gaskins HR. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr*. 2001; 73(6):1131S-1141S.
101. Kandori H, Hirayama K, Takeda M, Doi K. Histochemical, lectin-histochemical and morphometrical characteristics of intestinal goblet cells of germfree and conventional mice. *Exp Anim*. 1996; 45(2):155-60.

- 102.Sharma R, Schumacher U. Morphometric analysis of intestinal mucins under different dietary conditions and gut flora in rats. *Dig Dis Sci.* 1995; 40(12):2532-9.
- 103.Sharma R, Schumacher U, Ronaasen V, Coates M. Rat intestinal mucosal responses to a microbial flora and different diets. *Gut.* 1995; 36(2):209-14.
104. Enss ML, Cornberg M, Wagner S, Gebert A, Henrichs M, Eisenblätter R, Beil W, Kownatzki R, Hedrich HJ. Proinflammatory cytokines trigger MUC gene expression and mucin release in the intestinal cancer cell line LS180. *Inflamm Res.* 2000; 49(4):162-9.
105. Feldman AT, Wolfe D. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods Mol Biol.* 2014; 1180:31-43.
106. Cardiff RD, Miller CH, Munn RJ. Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. *Cold Spring Harb Protoc.* 2014; 2014(6):655-8.

Anhang

Tabelle 19: Detaillierte Zusammensetzung der Kontrolldiät und der FFr-Diät

	Kontrolldiät flüssig, 12 kJ% Fett S0514-E772	Modifizierte Western- Style Diät flüssig, 28 kJ% Fett, S0514-E761
Casein (%)	19,500	18,000
Maisstärke, vor-gelatinisiert (%)	36,000	5,100
Maltodextrin (%)	16,690	–
Fruktose (%)	–	50,000
Saccharose (%)	10,000	–
Glucose (%)	–	5,000
Cellulose-Pulver (%)	5,000	2,155
DL-Methionin (%)	0,100	0,300
L-Cystein (%)	0,200	
Vitamin-Vorgemisch (%)	1,000	1,000
Mineralstoff und Spurenelemente Vorgemisch (%)	4,600	4,835
Cholin Cl (50%) (%)	0,200	0,200
Ascorbinsäure (%)	0,100	0,100
Butylhydroxytoluol (%)	0,010	0,010
Xanthangummi (%)	1,600	1,630
Eisen-(III)-citrat H ₂ O (%)	–	0,070
Cholesterin (%)	–	–
Sojabohnenöl (%)	5,000	–
Butterfett (%)	–	–
Schweinefett (%)	–	1,600
Geschätzte Inhalte		
Rohprotein (%)	17,4	16,0
Rohfett (%)	5,1	11,8
Rohballaststoff (%)	5,0	2,2

Rohasche (%)	4,2	4,2
Stärke (%)	34,6	5,0
Saccharose (%)	11,0	-
Fruktose (%)	-	50,0
Glukose (%)	-	5,0
Kohlenhydrate (%)	64,8	63,6
Energie (Atwater) MJ/kg	15,7	17,8
Kcal% Protein	19	15
Kcal% Fett	12	25
Kcal% Kohlenhydrate	69	60
Lysin %	1,43	1,32
Met. & Cys. %	1,00	0,96
Threonin (%)	0,75	0,69
Eisen (mg/kg)	49	190
Vitamin A (IU/kg)	15,000	15,000
Vitamin D (IU/kg)	1,500	1,500
Vitamin E (IU/kg)	150	150
Fettsäuren (% in der Diät)		
C 4:0	-	-
C 6:0	-	-
C 8:0	-	-
C 10:0	-	0,01
C 12:0	-	0,03
C 14:0	0,02	0,17
C 16:0	0,57	2,81
C 18:0	0,18	1,57
C 16:1	0,01	0,34
C 18:1	1,28	4,86
C 18:2	2,65	1,10
C 18:3	0,29	0,12
Cholesterin (mg/kg)	-	86

Methode H & E Färbung

Die Hämatoxylin & Eosin (H&E) Färbung wird auch als Übersichtsfärbung bezeichnet, da sie einen Überblick über das gesamte Gewebe, Strukturen, die Zellverteilung und Kern-Plasma-Relationen gibt [105]. Hierbei färbt das Hämatoxylin Organellen mit negativ geladenen Nukleinsäuren wie z.B. den Zellkern blau. Eosin ist ein saurer Farbstoff und färbt Cytoplasma, Bindegewebe und Kollagenfasern kräftig rot [105]. Die Senkung des pH-Wertes durch Leitungswasser führt zum Farbumschlag und Fixierung des Hämatoxylin [106]. Dieses Phänomen wird als „Bläuen“ bezeichnet [105].

Im Folgenden sind die einzelnen Schritte der H & E Färbung kurz zusammengefasst. Zuerst wurden die Paraffinschnitte der Leber entparaffiniert und rehydriert (siehe Tabelle 20). Dafür wurden die Objektträger in ein Färbegestell gegeben und in die jeweilige Lösung getaucht. Während der Inkubationszeit standen die Behälter auf dem Orbitalschüttler bei 80rpm.

Tabelle 20: Entparaffinierung und Rehydrierung H&E Färbung

Inkubationszeit	Lösung
20 Minuten	Roti Histol
10 Minuten	100% Ethanol
10 Minuten	95% Ethanol
10 Minuten	85% Ethanol
10 Minuten	70% Ethanol
10 Minuten	30% Ethanol
10 Minuten	Destilliertes Wasser
10 Minuten	Destilliertes Wasser (neuer Behälter)

Die entparaffinierten Schnitte wurden anschließend in ein Färbegestell aus Glas gestellt und für 1 Minute in die mit Hämatoxylin gefüllte Färbeküvette gegeben und leicht geschwenkt. Anschließend wurden die Schnitte für jeweils 30 Sekunden zum Bläuen in Leitungswasser getaucht, das mit destilliertem Wasser abgestoppt wurde. Nach dem Bläuen wurde das Färbegestell erneut für etwa 30 Sekunden in zwei Behälter mit destilliertem Wasser gegeben, um die Reaktion abzustoppen. Nun erfolgte die

Dehydrierung, erneut auf dem Orbitalschüttler bei 80rpm, bei der die Schnitte für 7-10 Minuten zuerst in 75% Ethanol und danach in 85% Ethanol inkubiert wurden. Nach der Dehydrierung erfolgte die Gegenfärbung mit Eosin (siehe Tabelle 21).

Tabelle 21: Eosin Färbung

Inkubationszeit	Lösung
1-2 Sekunden	Eosin Y Lösung
10-20 Sekunden	in 95% Ethanol spülen
10-20 Sekunden	in 100% Ethanol spülen
20 Minuten	Roti Histol

Nach diesem Schritt und einer vollständigen Dehydrierung wurden die Gewebepräparate mit Entellan und Deckgläschen eingedeckt.

Zusammensetzung genutzter Arbeitslösungen und Puffer

Lösung 1: 10x PBS

80g Natriumchlorid (NaCl)

2g Kaliumchlorid (KCl)

7,62g Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄)

0,77g Kaliumhydrogenphosphat (KH₂PO₄)

Diese Substrate werden in etwa 800ml destilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt (mit Hilfe von konz. Salzsäure (HCl)). Danach wurde der Puffer mit destilliertem Wasser auf 1000ml aufgefüllt.

Lösung 2: 1x PBS

Für 1x PBS werden 100ml 10x PBS mit 900ml destilliertem Wasser vermischt.

Lösung 3: 4% PBS-gepuffertes Formalin

892ml 1x PBS + 108ml 37%ige Formaldehydlösung

Lösung 4: 5% BSA/PBS

0,5g Albumin Fraktion V (BSA) in 10ml 1x PBS lösen

Lösung 5: Fixierlösung (CAF Lösung) für Naphthol AS-D Chloracetat Esterase-Färbung

Die Lösung wurde frisch, nach Angaben des Herstellers des Naphthol AS-D Chloracetat Esterase-Färbekits Sigma Aldrich, wie folgt hergestellt:

2,5ml Citratlösung

6,5 ml Aceton

0,8ml 37%iges Formalin

Lösung 6: Färbelösung für Naphthol AS-D Chloracetat Esterase-Färbung

Die Färbelösung wurde frisch, nach Angaben des Herstellers des Naphthol AS-D Chloracetat Esterase-Färbekits Sigma Aldrich, wie folgt hergestellt:

100µl Natriumnitrit-Lösung

100µl Fast Red Violet LB Standardlösung

→ Lösung vortexen und 2 Minuten ruhen lassen

4ml 37 Grad Celsius warmes destilliertes Wasser

500µl TRIZMAL 6,3 Pufferkonzentrat

100µl Naphthol-AS-D Chloracetat Lösung

→ Gut mischen

Tabelle 22: Herstellung Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (KRH-Puffer)

	Chemikalien	Menge (1 Liter)
Lösung 1: 10x Salz-Lösung	NaCl (1,15M) KCl (50mM) MgSO ₄ (anhydrous) (12mM) CaCl ₂ *2H ₂ O	67,2g 3,73g 1,44g 2,94g
Lösung 2: 10x HEPES-Lösung	HEPES (250mM)	59,5g
Lösung 3: 10x KH₂PO₄ - Lösung	KH ₂ PO ₄ (19mM)	1,36g
Herstellung 1 Liter 1x KRH-Puffer		
1. 100ml Lösung 1 + 100ml Lösung 2 + 100ml Lösung 3 + 500ml dH ₂ O		
2. pH-Wert von 7,4 einstellen		
3. 2g BSA hinzufügen, auf 1000ml mit dH ₂ O auffüllen		

Tabelle 23: Lösungen für den Western Blot

Lösung	Herstellung
RIPA-Puffer	20mM MOPS; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1% (v/v) IGEPAL; 0,1% (w/v) SDS
Tris (0,5M)	6,05g Tris (base) in 90ml dH ₂ O; pH 6,8 mit HCl einstellen und auf 100ml mit dH ₂ O auffüllen
Tris (1,5M)	18,15g Tris (base) in 80ml dH ₂ O; pH 8,8 mit HCl einstellen und auf 100ml mit dH ₂ O auffüllen
SDS (10%)	10g SDS in 100ml dH ₂ O lösen
APS (10%)	0,1g Ammoniumpersulfat in 1ml dH ₂ O lösen
4X SDS-Ladepuffer	5,217ml Tris 1,5M (pH auf 6,8 einstellen); 2,5g SDS; 12,5ml Glycerol; 5ml 2-β- Mercaptoethanol; 12,5mg Bromphenolblau, auf 25ml mit dH ₂ O auffüllen
10x Elektrophoresepuffer → vor Gebrauch auf 1x Elektrophoresepuffer verdünnen	30,28g Tris (base); 144,13g Glycin; 10g SDS, in einem Endvolumen von 1000ml dH ₂ O lösen
100mM DTT	0,85mg DTT in 2ml dH ₂ O lösen
Towbin Transferpuffer	14,4g Glycin; 3,03g Tris (base); 200ml Methanol; auf 1000ml mit dH ₂ O auffüllen
Ponceau S	0,1g Ponceau S; 500µl Essigsäure 100%, auf 50ml mit dH ₂ O auffüllen
10x TBS → vor Gebrauch auf 1x TBS verdünnen	24,2g Tris (base); 80g NaCl in 900ml dH ₂ O, pH=7,6; mit dH ₂ O auf 1000ml auffüllen
1xTBST	100ml 10xTBS; 900ml dH ₂ O; 0,5ml Tween 20

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegeben Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Ausführungen, die fremden Quellen wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, sind kenntlich gemacht.

Ich erkläre weiterhin, dass die vorliegende Arbeit nur bei der Universität Wien als Prüfarbeit eingereicht wurde.