



---

b  
UNIVERSITÄT  
BERN

**Medizinische Fakultät der Universität Bern**

**MASTERARBEIT**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Master of Medicine (M Med)

**Etablierung Immunhistologischer Färbung von  
MUC2 in intestinalen Proben von Mäusen:  
Präliminare Daten bei experimenteller portaler  
Hypertension und Cholestase**

Laborstudie

Vorgelegt am 07.03.2020 von

**David Hanspeter Stutz**

**von Niederwil AG**

Matrikelnummer 14-124-366

Betreuung: Dr. Marcel Sorribas,  
Forschungsgruppe Gastroenterologie / Mukosale  
Immunologie, Department for BioMedical  
Research, Universität Bern

Arbeit unter Leitung von: Prof. Dr. med. Reiner Wiest  
Universitätsklinik für Viszerale Chirurgie und Medizin,  
Inselspital Bern

## Inhaltsverzeichnis

---

Hintergrund und Zielsetzung.....	3
Barrieren.....	3
Mucus-Barriere .....	3
Prozesse bei Leberzirrhose .....	4
Ziel der Arbeit .....	5
Material und Methoden.....	6
Mäuse und Modelle.....	6
Gallengangligatur (Bile duct ligation, BDL): experimentelles Cholestase-Modell.....	6
Partielle Portalvenenligatur (Partial portal vein ligation, PPVL) .....	7
Histologische Verarbeitung der Gewebe .....	8
Gewinnung der Gewebe .....	8
Fixation, Entwässern, Einbetten.....	8
Blöcke formen.....	9
Schneiden am Mikrotom .....	9
Verschiedene Färbemethoden .....	10
Grundsätze der Immunhistochemie / Immunfluoreszenz .....	10
Färbemethode für das Epithel.....	12
Färbemethode für den Mucus .....	13
Färbemethode für Bakterien .....	13
Färbeprotokolle.....	14
Liste verwendeter Antikörper/Farbstoffe .....	15
Testung neuer primärer Antikörper .....	15
Mikroskopie .....	17
Quantitative Auswertung der Mucusdicke .....	18
Resultate.....	19
Färbung mit anti-MUC2 H-300 plus Hämatoxylin-Eosin .....	19
Quantitative Auswertung.....	23
Färbung mit anti-MUC2 H-300, anti- $\beta$ -Aktin, sowie Sytox Green.....	24

Testung neuer Antikörper .....	25
Hochauflösende Darstellung des mit Sytox Green gefärbten Mukus im Kolon .....	26
Diskussion .....	28
Key-Findings .....	31
Danksagung .....	32
Literaturverzeichnis .....	33
Abbildungsverzeichnis .....	35
Eigenständigkeitserklärung .....	37

## Hintergrund und Zielsetzung

---

Jeder Mensch trägt in seinem Darm rund 100 Billionen Mikroorganismen, besteht selbst jedoch nur aus rund 10 Billionen humanen Zellen.<sup>1</sup> Zwischen dem Darmlumen mit seiner immensen Anzahl Mikroorganismen und dem sterilen Körperinnern stehen verschiedene Barrieren, sowie Systeme, welche allenfalls eingedrungene Bakterien wirksam zerstören, ohne eine klinisch relevante Entzündungsreaktion nach sich zu ziehen.

### Barrieren

Es gibt nach aktuellem Kenntnisstand folgende Barrieren, welche die Mikroorganismen daran hindern in zu grosser Zahl, das heisst in pathologischem Ausmass, in den Körper einzudringen:

- Sekretorische Barriere (zum Beispiel Mukus)
- Epitheliale Barriere
- «Gut-associated lymphatic tissue» (GALT) (Darmassoziiertes Immunsystem)
- «Gut-vascular barrier» (Darm-Gefäss-Schranke)

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf dem durch die Becherzellen des Epithels produzierten Schleim, der Mukus-Barriere.

### Mucus-Barriere

Das Darmepithel ist ein einschichtiges Zylinderepithel. Es besteht zum grössten Teil aus Enterozyten mit einem apikalen Bürstensaum aus Mikrovilli. Neben den Enterozyten enthält das Darmepithel auch Becherzellen, welche Mucine produzieren und sezernieren.<sup>2-4</sup> Mucine sind Glykoproteine, welche grosse Mengen Wasser einlagern und somit dem Mukus eine Struktur geben. Das mengenmässig bedeutendste Mucin ist das Mucin 2 (MUC2).<sup>3</sup> Mucin 2 ist ein grosses Glykoprotein, welches im Endoplasmatischen Retikulum aus zwei Dimeren entsteht und anschliessend im Golgi-Apparat stark glykosyliert wird.<sup>5</sup> Das fertige Glykoprotein kann nun über seinen N-Terminus mit anderen Mucin 2-Molekülen polymerisieren und eine netzartige Struktur aufbauen, welche dem Mukus eine gewisse Festigkeit und Organisation gibt.<sup>6</sup>

Bisherige Experimente konnten zeigen, dass die Mukusschicht des Kolons in zwei unterschiedliche Schichten unterteilt werden kann.<sup>6</sup> Eine innere dichte Mukusschicht nahe am Epithel, in welcher keine Bakterien nachgewiesen werden konnten, sowie eine äussere lockerere Mukusschicht, in welcher massenhaft Bakterien nachgewiesen werden konnten und welche gegen das Darmlumen hin keine klare Abgrenzung aufweist. Messungen der Mukusdicke im Kolon von Mäusen mittels In-vivo-Methoden ergaben Werte um 150 µm,

wobei die lockere äussere Mukusschicht rund 100 µm und die innere feste Mukusschicht rund 50 µm dick ist.<sup>6</sup> Molekularbiologische Untersuchungen ergaben, dass beide Mukusschichten hauptsächlich aus Mucin 2 bestehen, was für die These spricht, dass die äussere Mukusschicht aus der inneren Mukusschicht entsteht.

Immunhistochemische Färbung von Carnoy-fixierten distalen Kolon-Exzisaten von Mäusen mittels anti-MUC2-Antiserum zeigten die zwei verschieden aufgebauten Mukusschichten, wobei die innere Schicht eine Dicke von rund 25 µm aufwies.<sup>6</sup> Die geringere gemessene Dicke verglichen mit der In-vivo-Messung ist hier vermutlich auf die histologische Aufarbeitung, besonders auf die Fixierung der Proben, zurückzuführen.

### Prozesse bei Leberzirrhose

Die Leberzirrhose ist der Endpunkt verschiedener Erkrankungen. Definiert wird sie durch das Vorhandensein von übermässiger Fibrose und Regeneratknoten. Wird die Leber repetitiv geschädigt, führt dies zu einer chronischen Entzündungsreaktion, welche zur Aktivierung von Sternzellen führt. Aktivierte Sternzellen produzieren Bindegewebe, welches den Raum zwischen Sinusoiden und Hepatozyten (Dissé-Raum) auffüllt und so die Blutzirkulation in der Leber einschränkt. Dies führt zu einer Druckerhöhung in der Vena portae.<sup>7</sup>

Bakterielle Translokation ist laut Berg et al. definiert als Translokation von Bakterien und/oder bakteriellen Produkten (Lipopolysaccharide, Peptidoglykane, Muramyl-Dipeptide, bakterielle DNA, etc.) vom Darm in die mesenterialen Lymphknoten.<sup>8</sup> Grundsätzlich unterscheidet man zwei Arten von bakterieller Translokation: Einerseits findet im gesunden Organismus eine Translokation von bakteriellen Produkten und/oder lebenden Bakterien aus dem Darm bis in die mesenterialen Lymphknoten statt, ohne eine grössere Entzündungsreaktion auszulösen.<sup>9</sup> Andererseits gibt es im Zustand der Leberzirrhose die pathologische bakterielle Translokation, bei welcher die Menge an bakterieller Translokation dauerhaft erhöht ist. Die Translokation von Bakterien ist primär abhängig von der Schwere der Lebererkrankung. Basierend auf Tierstudien hat die Schwere der Lebererkrankung einen grösseren Einfluss auf die pathologische Translokation von Bakterien als die reine portale Hypertension.<sup>10,11</sup>

Inwiefern die Struktur der Mukusschicht bei Leberzirrhose bzw. portaler Hypertension verändert ist, bleibt aktuell noch offen. Auch ist unklar wie sich die innere Mukusschicht im Zustand der Leberzirrhose beziehungsweise portaler Hypertension verhält, und ob sie dabei ihre strukturelle Stabilität aufrechterhalten kann, oder ob sie durchlässiger wird und somit den Bakterien eine direkte Kontaktfläche mit dem Epithel freigibt.

## Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung einer Immunfluoreszenzfärbung für das

- intestinale Epithel,
- Mucin 2 und
- die im Mukus vorhandenen Bakterien.

Hierdurch soll mittels simultaner Färbung der genannten Kompartimente und der Bakterien die genaue Dicke der inneren und der äusseren Mukusschicht charakterisiert werden. Durch Anwendung bei gesunden Mäusen, Mäusen mit einer isolierten prä-hepatischen portalvenösen Hypertension, sowie Mäusen mit Cholestase (ohne intestinale Galle und portalvenöse Hypertension) sollen Veränderungen der inneren und äusseren Mukus-Schichtdicke in Abhängigkeit von portaler Hypertonie und/oder Cholestase charakterisiert werden.

## Material und Methoden

---

### Mäuse und Modelle

Für das Experiment wurden weibliche C57BL/6J Mäuse von ENVIGO (Horst, Niederlande) genutzt. Dieser Stamm wurde ursprünglich im Jackson Laboratory, Bar Harbour, Maine isoliert. Heute sind dies die meistverwendeten Labormäuse weltweit. Die Haltung erfolgte in der Central Animal Facility der Universität Bern unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF, specific pathogen-free). Dies bedeutet, dass die Mäuse auf bestimmte vordefinierte Krankheitserreger, opportunistische Krankheitserreger und Kommensalen untersucht werden, welche sie nicht aufweisen dürfen. Die vollständige Liste der gesuchten Mikroorganismen und Viren kann unter diesem Link heruntergeladen werden.<sup>a</sup> Alle Tierexperimente wurden von der kantonalen Tierversuchskommission Bern bewilligt und so durchgeführt, dass das Leid der Tiere auf ein Minimum begrenzt blieb.

### Gallengangligatur (Bile duct ligation, BDL): experimentelles Cholestase-Modell

Bei der Gallengangligatur wird der Ductus choledochus mittels eines Fadens ligiert und damit der Gallefluss dauerhaft unterbrochen. Somit fehlt die Galle in Dünn- und Dickdarm und staut sich im Gallengangsystem der Leber an. Je nach Dauer der Gallengangligatur zeigen sich andere Zustände. Im Verlauf von zehn Tagen nach der Ligatur entwickelt sich eine portalvenöse Hypertonie bei einer noch nicht zirrhotischen Leber. Aufgrund der Cholestase entwickelt sich eine Entzündung mit beginnender Fibrose, welche sich im Verlauf der nächsten drei Wochen zu einer Leberzirrhose entwickelt.<sup>12</sup>

Für die Gallengangligatur wurde die Maus in sauberer Umgebung auf eine Wärmeplatte bei 37 °C gelegt und die Anästhesie mittels Isofluran gestartet, bis keine Reaktion mehr auf Schmerzstimuli erfolgte. Anschliessend erfolgte die Rasur des Abdomens und es erfolgte eine Injektion von Buprenorphin 60 µg/kg Körpergewicht intraabdominal. Nun wurde das Abdomen durch eine Mittellinien-Laparotomie eröffnet und das Peritoneum entlang der Linea alba durchtrennt. Das Operationsgebiet wurde unter Verwendung von Wundspreizer offengehalten und die intraabdominalen Organe mittels eines feuchten Wattestäbchens zur Seite gedrängt. Nun erfolgte unter dem Operationsmikroskop bei 16-facher Vergrösserung die Visualisierung des Leberhilus und darin des Gallenganges. Dieser wurde stumpf freipräpariert und lebernahe durch zwei Ligaturen mit nicht resorbierbarem Faden abgebunden, sowie leberfern mit einer dritten Ligatur. Der Gallengang wurde nun zwischen der 2. und der 3. Ligatur durchtrennt. Anschliessend wurden die Fadenenden kurz abgeschnitten, die intraabdominalen Organe wieder in ihre anatomische Position gebracht und die Cavitas peritonealis mittels sterilen NaCl 0,9 % gespült. Nun erfolgte der

---

<sup>a</sup> <https://david-stutz.ch/home/bakterielle-translokation/>

Verschluss des Peritoneums mittels Einzelknopfnähten und der Verschluss der Subcutis und Cutis mittels Stapler. Das Vorgehen bei den Sham-operierten Mäusen entspricht dem oben beschriebenen mit Ausnahme des Setzens der Ligaturen und der Durchtrennung des Gallenganges, was nicht durchgeführt wurde.

### Partielle Portalvenenligatur (Partial portal vein ligation, PPVL)

Im Unterschied zur Gallengangligatur führt die partielle Portalvenenligatur nicht zu einer Leberzirrhose, sondern zu einer alleinigen Hypertonie im portalvenösen System, ohne die Leber gross zu beeinträchtigen. Dies ist insofern interessant, da so die Wirkung der durch eine Leberzirrhose entstehenden portalvenösen Hypertonie losgelöst von der Lebererkrankung untersucht werden kann.<sup>13</sup> Dies erlaubt die Differenzierung der Auswirkungen der Leberzirrhose an sich von denjenigen der portalvenösen Hypertonie, welche konsekutiv durch die Leberzirrhose ausgelöst wird. Nach PPVL steigt der portalvenöse Druck schnell an, erreicht am Tag 2 – 4 den höchsten Wert und bleibt über die nächsten zwei Wochen pathologisch erhöht, nimmt aber langsam ab. PPVL-Mäuse entwickeln keine Fibrose oder Zirrhose, die Leber bleibt normal.<sup>13</sup>

Grundsätzlich wurde die Methode benutzt, welche bereits 1980 von Chojkier und Groszmann bei Ratten beschrieben worden war.<sup>14</sup>

Für die partielle Portalvenenligatur wurde die Maus in sauberer Umgebung auf eine Wärmeplatte bei 37 °C gelegt und die Anästhesie mittels Isofluran gestartet, bis keine Reaktion mehr auf Schmerzstimuli erfolgte. Anschliessend wurde das Abdomen rasiert und Buprenorphin 60 µg/kg Körpergewicht intraabdominal injiziert. Sodann wurde das Abdomen durch eine Mittellinien-Laparotomie eröffnet und das Peritoneum entlang der Linea alba durchtrennt. Das Operationsgebiet wurde mittels Wundspreizer offengehalten und die intraabdominalen Organe mittels eines feuchten Wattestäbchens zur Seite gedrängt. Der Leberhilus mit der Vena portae wurde identifiziert und die Vene freipräpariert. Parallel zur Vena portae wurde eine 20 Gauge Nadel gelegt und ein 3-0 nicht resorbierbarer Faden um die Nadel und die Vena portae geknotet. Nach Entfernung der Nadel konnte sich die Vena portae nun auf die normierte Grösse ausdehnen, was zu einem definierten erhöhten Widerstand im portalvenösen System führt. Schlussendlich wurden die Fadenenden kurz abgeschnitten, die intraabdominalen Organe wieder in ihre anatomische Position gebracht und die Bauchhöhle mittels sterilen NaCl 0,9 % gespült. Das Peritoneum wurde nun mittels Einzelknopfnähten und die Subcutis und Cutis mittels Stapler verschlossen. Das Vorgehen bei den Sham-operierten Mäusen entspricht dem oben beschriebenen mit Ausnahme des Setzens der Ligatur.



Tabelle 1 - Vergleich der Tiermodelle

Modell	Zeit	Leberzirrhose	Portalvenöse Hypertonie	Intestinale Galle
<b>Partielle Portalvenenligatur (PPVL)</b>	<b>14 Tage</b>	Nein	Ja	<b>Normal</b>
<b>Gallengangligatur (BDL)</b>	3 Tage	Nein	Nein	Nicht vorhanden
	<b>7 Tage</b>	Nein	Ja	<b>Nicht vorhanden</b>
	> 4 Wochen	Ja	Ja	Nicht vorhanden

In dieser Arbeit wurde die Partielle Portalvenenligatur für 14 Tage aufrechterhalten und die Gallengangligatur für 7 Tage bis die Gewebe entnommen wurden. Der Hauptunterschied zwischen diesen beiden Gruppen ist somit die Anwesenheit intestinaler Galle in PPVL und die Abwesenheit intestinaler Galle in BDL, wie Tabelle 1 ausführt.

## Histologische Verarbeitung der Gewebe

### Gewinnung der Gewebe

Die Mäuse wurden mittels zervikaler Dislokation unter Isofluran-Anästhesie euthanasiert. Anschliessend wurde die Bauchhöhle über eine Mittellinien-Laparotomie eröffnet und das Peritoneum entlang der Linea alba durchtrennt. Um die Mukus-Schicht zu erhalten, wurden wo immer möglich kotgefüllte Darmabschnitte reseziert und direkt in ein mit Methanol-Carnoy gefülltes Gefäss zur Fixation gegeben. Es wurden Proben aus dem Duodenum, dem Jejunum, dem terminalen Ileum, sowie dem Kolon entnommen. Für die Färbungen wurden nur die Proben aus dem terminalen Ileum sowie dem Kolon verwendet, da dort laut Johansson et al. der Mukus am besten erhalten bleibt.<sup>15</sup>

### Fixation, Entwässern, Einbetten

Da der Mukus zum grössten Teil aus Wasser besteht, welches in den Mucin-Glykoproteinen gebunden ist, führt eine Entwässerung der Proben während der Fixation zu einer Veränderung der Mukusschicht. Eine solche Veränderung wird beispielsweise durch

Fixation in 4 % Paraformaldehyd-Lösung hervorgerufen, denn diese Lösung enthält grosse Mengen Wasser, welches vermutlich während des Fixationsprozesses mit der Mukusschicht interagieren oder sie gar degradieren kann. Beim Einsatz von wasserfreien Fixantien wie Methanol-Carnoy-Lösung kann die Mukusschicht besser erhalten werden wie Experimente von Johansson et al. zeigen.<sup>15,16</sup> Die entnommenen Proben wurden für 24 Stunden in Methanol-Carnoy-Lösung (Methacarn) fixiert und wie nachfolgend beschrieben in Paraffin eingebettet. Zuerst wurden die Proben zweimal in wasserfreiem Methanol für je 30 Minuten gewaschen, gefolgt von zweimaligem Waschen in 100 % Ethanol für je 20 Minuten und zweimaligem Waschen in 100 % Xylol für je 15 Minuten. Die Proben wurden in Paraffin [TEK III Processing and Embedding Wax, Sakura Finetek Europe B.V.] eingelegt und bei 60 °C während 24 Stunden belassen.

Methanol-Carnoy-Lösung (Methacarn):

- 60 % (v/v) Methanol wasserfrei
- 30 % (v/v) Chloroform
- 10 % (v/v) Essigsäure wasserfrei

### Blöcke formen

Die mit Paraffin gesättigten Proben wurden nach dem Einbetten in Paraffinblöcke transferiert. Hierzu wurden die Proben aus dem flüssigen Paraffin entnommen und in eine vorgewärmte Form gelegt. Diese wurde mit flüssigem Paraffin gefüllt, wobei darauf geachtet werden musste, dass die Proben aufrecht standen, um anschliessend beim Schneiden das Lumen schön treffen zu können. Die mit Paraffin und den Proben gefüllte Form wurde auf eine Kühlplatte gelegt, wo das Paraffin erstarrte. Genutzt wurde das Shandon Histocentre 3 von Thermo Electron Corporation.

### Schneiden am Mikrotom

Die zuvor in Paraffinblöcke transferierten Proben wurden in 4 µm dicke Scheiben (Slices) geschnitten. Dazu wurden die Paraffinblöcke erst auf der Kühlplatte des Shandon Histocentre 3 gekühlt. Dabei zeigte die Schnittfläche nach unten auf die Kühlplatte. Das verwendete Mikrotom ist ein HM355S von Fisher Scientific. Die Blöcke wurden mit 20 µm messender Schnittdicke initialisiert, bis die Gewebestücke allesamt angeschnitten waren. Im Anschluss an die Initialisierung wurden die Blöcke jeweils wieder auf der Kühlplatte gekühlt. Es wurden ein bis drei Schnitte gemacht, welche auf das Wasserbad (37 °C vollentsalztes Wasser) übertragen wurden. Nach jeweils ein bis drei Schnitten wurde der Paraffinblock wieder auf die Kühlplatte gelegt, um das Schnittergebnis zu verbessern. Denn durch das Schneiden des Blockes erhitzt sich die Mikroumgebung der Schnittfläche, und das Paraffin wird weich, was die Schnittqualität negativ beeinflusst. Die auf dem Wasserbad

schwimmenden Slices wurden auf Objektträger aufgezogen (Menzel-Gläser Superfrost® Plus, Thermo Scientific, Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig, Deutschland). Dabei wurden zwei Schnitte auf einem Objektträger platziert. Die Objektträger wurden in Racks verladen und im Ofen bei rund 37 °C während mindestens 48 Stunden getrocknet. Die Temperatur im Ofen wurde mit einem Thermometer überwacht. Die maximal gemessene Temperatur am Boden des Ofens (gleicher Ort wie die Objektträger trockneten) betrug 39,5 °C.

Von jedem Block wurden 10 Objektträger mit insgesamt 20 Schnitten angefertigt, um genügend Material für die Tests der einzelnen Färbungen und Färbekombinationen zu haben. Laut Johansson et al. können solche sogenannten Leerschnitte, wie auch die Paraffinblöcke bei Raumtemperatur mehrere Jahre aufbewahrt werden ohne, dass sich Veränderungen am Mukus ergeben.<sup>15</sup>

## Verschiedene Färbemethoden

### Grundsätze der Immunhistochemie / Immunfluoreszenz

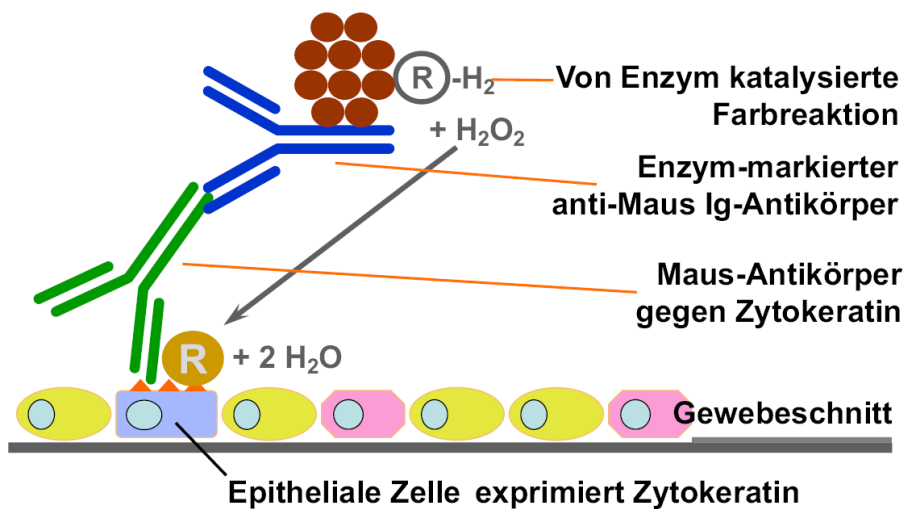


Abbildung 1 - Schematische Darstellung der Antikörperbindung bei der Immunhistochemie mit enzymgekoppeltem sekundärem Antikörper. Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. pharm. E. Vassella, Institut für Pathologie Universität Bern

Bei einfachen histologischen Färbungen wird die unterschiedliche Affinität eines Farbstoffes für verschiedene Zellstrukturen und -produkte verwendet, um den Kontrast unter dem Lichtmikroskop zu erhöhen. Die Immunhistochemie im Gegensatz dazu erlaubt es spezifische Epitope im Gewebe nachzuweisen und am Ort dieser Epitope eine Farbreaktion herbeizuführen, welche lichtmikroskopisch nachweisbar ist.

Zuerst wird im Beispiel der Abbildung 1 ein Maus-Antikörper verwendet, welcher ein Epitop an Zytokeratin erkennt. Dieser Antikörper bindet folglich nur an Orten, wo Zytokeratin auf der Zelloberfläche exprimiert wird. In einem nächsten Schritt wird ein Antikörper eingesetzt, welcher die schwere Kette des ersten Antikörpers erkennt. Da der erste (primäre) Antikörper in einer Maus produziert worden ist, kann als zweiter Antikörper einer verwendet werden, welcher alle Maus-Antikörper bindet,

ein sogenannter anti-Maus-Antikörper. Dieser zweite (sekundäre) Antikörper hat an seiner schweren Kette ein kovalent gebundenes Enzym (meist eine Peroxidase), oder er ist biotinyliert. Falls der sekundäre Antikörper biotinyliert ist, wird noch ein Avidin-Biotin-Komplex zugegeben, welcher mit sehr hoher Affinität an das Biotin bindet und selbst eine Peroxidase enthält. Jetzt wird 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) zugegeben, welches durch die Peroxidase oxidiert wird. Das Produkt dieser Oxidation hat eine braune Farbe, welche einfach durch das Lichtmikroskop nachgewiesen werden kann.

Im Grundsatz ist das Verfahren bei der Immunfluoreszenz sehr ähnlich, wie das oben Beschriebene. Der primäre Antikörper bindet an das gewünschte Epitop und der sekundäre Antikörper bindet an den primären Antikörper. Nun ist aber der sekundäre Antikörper nicht mit einer Peroxidase verbunden oder biotinyliert, sondern er ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Das bedeutet, dass nach Zugabe des sekundären Antikörpers die Färbung direkt sichtbar gemacht werden kann und die Zwischenschritte, wie sie bei der immunhistologischen Färbung gemacht werden, nicht notwendig sind. Der Nachteil davon ist, dass diese Fluoreszenzfarbstoffe nur unter Anregung durch Licht mit einer spezifischen Wellenlänge sichtbar werden. Sie können also nur unter einem speziellen Mikroskop untersucht werden. Es gibt jedoch einen grossen Vorteil, den die Immunfluoreszenz deswegen bietet. Es können Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden, welche Licht in verschiedenen Wellenlängen emittieren. Somit können mehrere verschiedene primäre und sekundäre Antikörper eingesetzt werden, welche unter dem Fluoreszenzmikroskop eindeutig voneinander unterschieden werden können, selbst wenn sie am gleichen Ort binden. Aus diesem Grund wurde für diese Arbeit die Immunfluoreszenz gewählt, da drei verschiedene primäre Ziele gleichzeitig gefärbt werden sollen.

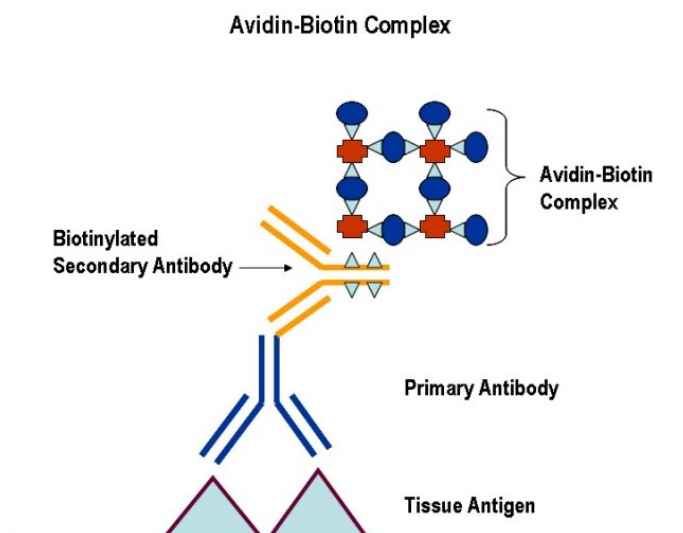


Abbildung 2 - Schematische Darstellung der Antikörperbindung bei der Immunhistochemie mit biotinyliertem sekundärem Antikörper und dem Avidin-Biotin-Komplex; [www.labce.com](http://www.labce.com)

## Färbemethode für das Epithel

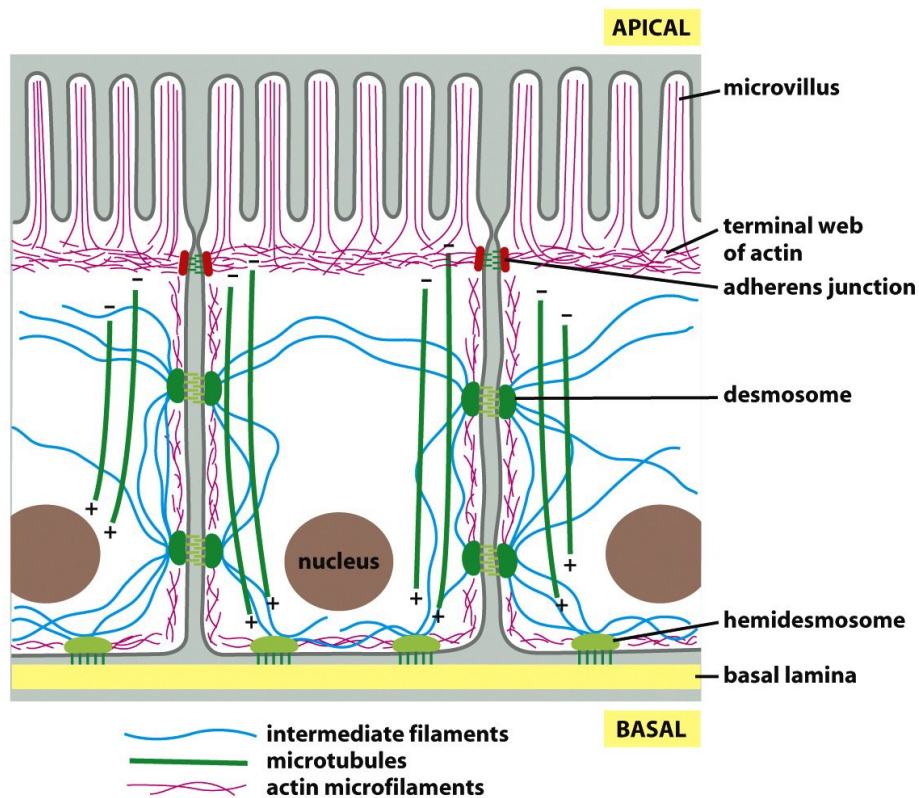


Abbildung 3 – Schematischer Aufbau des Darmepithels; Molecular Biology of the Cell (© Garland Science 2008)

Das Epithel des Darmes besitzt wie jedes Epithel ein Zytoskelett, welches die Stabilität der Zellen bei mechanischer Belastung sichert. Dieses Zytoskelett besteht aus Zell-Zell-Verbindungen, Zell-Matrix-Verbindungen, sowie intrazellulären Filamenten (Aktinfilamente, Intermediärfilamente und Mikrotubuli). Für die Färbung der Zellgrenzen eines Epithels eignen sich hierbei besonders die intrazellulären Aktinfilamente. Diese bilden auf der apikalen Seite des Epithels das terminale Aktinnetz. Dieses ist seitlich mit den Nachbarzellen verbunden und überträgt von aussen einwirkende Kraft auf alle Zellen des Epithels. Da sich das terminale Aktinnetz auch in die Mikrovilli erstreckt, eignet es sich gut, um die luminalen Grenze des Darmepithels zu markieren. In menschlichen (und auch tierischen) Zellen kommen drei Aktin-Untereinheiten vor:  $\alpha$ -Aktin kommt nur in Muskelzellen vor,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aktin kommen in den meisten Zelltypen als Zytoskelett-Anteile vor. Es wurde entschieden, das  **$\beta$ -Aktin** zu markieren, da dies im Labor bereits mehrfach erfolgreich eingesetzt worden ist.

### Färbemethode für den Mukus

Wie vorangehend schon diskutiert, besteht die intestinale Mukusschicht hauptsächlich aus **Mucin 2**. Aus diesem Grund ist es naheliegend, genau dieses Glykoprotein als Ziel der Färbung zu nutzen. Auf dem Markt gibt es eine Vielzahl verschiedener Antikörper, welche gegen verschiedene (teilweise nicht näher bezeichnete) Epitope von Mucin 2 gerichtet sind. In unserem Labor wurde bereits ein gegen Mucin 2 gerichteter Antikörper eingesetzt, welcher gute Resultate lieferte.<sup>17</sup> Das Verfahren wurde von Johansson et al. beschrieben.<sup>15</sup>

Neben der Färbung mittels Antikörpern kann Mukus mittels der PAS-Reaktion (Perjodsäure-Schiff-Reagenz, Periodic acid-Schiff reaction), sowie der Alcian-Blau-Färbung gefärbt werden. Diese beiden Färbungen sind lichtmikroskopisch sichtbar.<sup>15</sup>

Sakamoto et al. zeigten auf, dass es möglich ist, die Mukusschicht mittels eines fluoreszenzmarkierten Lektins zu färben.<sup>18</sup> Lektine sind kohlenhydratbindende Proteine, welche spezifische Zuckergruppen binden können. Da die Mucin-Moleküle stark glykosyliert werden, also viele Zucker-Gruppen besitzen, können sie mittels spezifischer Lektine sichtbar gemacht werden. Genutzt wurde hierfür das Fucose-bindende **Lektin UEA-I** (Ulex Europaeus Agglutinin I). Es bindet an verschiedene Glykoproteine, welche eine per  $\alpha$ -glykosidischer Bindung gebundene Fucose besitzen.

### Färbemethode für Bakterien

Bakterien lassen sich histologisch mittels verschiedener Färbungen sichtbar machen (Gramfärbung, Ziehl-Neelsen-Färbung, Giemsa-Färbung, Papanicolaou-Färbung). Dies erlaubt es, sie in der Lichtmikroskopie zu erkennen. Für die immunhistologische Färbung von Bakterien gibt es weniger Möglichkeiten. Einerseits können Bakterien mittels Farbstoffen gefärbt werden, welche DNA anfärben, denn Bakterienzellen enthalten relativ viel DNA, welche im Unterschied zu Eukaryoten Zellen nicht in einem Zellkern organisiert ist. Beispiele für solche Farbstoffe sind DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) oder **Sytox Green** Nucleic Acid Stain. Andererseits gibt es spezifischere Methoden, um Bakterien anzufärben, wie die Verwendung von eubakteriellen Proben (EUB338), welche direkt mit definierten Abschnitten der DNA hybridisieren und somit dafür verwendet werden können, spezifische Bakteriengruppen zu identifizieren.<sup>19</sup> Das Ziel dieser Arbeit ist es, möglichst alle Bakterien

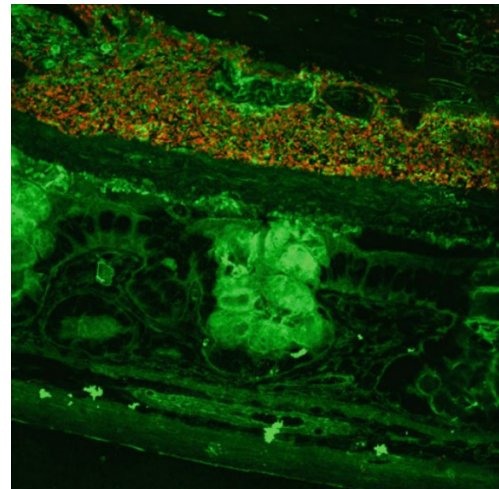


Abbildung 4 - Co-Färbung von Bakterien (rot, EUB338) und MUC2 (grün, anti-MUC2C3), Johansson et al. 2012

anzufärben, weswegen Sytox Green Nucleic Acid Stain als primäres Färbemittel für Bakterien gewählt wurde. Unseres Wissens ist dies die erste Anwendung dieses Färbemittels in der Histologie, normalerweise wird es in der Durchflusszytometrie eingesetzt, weswegen das entsprechende Färbeprotokoll neu erarbeitet und getestet wurde.

### Färbeprotokolle

Die Färbungen wurden in der Live Cell Imaging Core Facility (LCI) des Microscopy Imaging Centers (MIC) der Universität Bern durchgeführt. Es wurden die in der LCI verwendeten Standardprotokolle verwendet und wo notwendig an die spezifischen Proben angepasst. Im Folgenden sind die einzelnen Protokolle aufgeführt.

#### MUC2, Hämatoxylin-Eosin

Die Gewebeschnitte wurden in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe hydriert (100 %, 90 %, 70 %, 50 %). Die Aktivität der endogenen Peroxidase wurde mittels 10-minütigen Eintauchens in eine 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung blockiert. Beim verwendeten primären Antikörper war es nicht nötig, eine Vorbehandlung der Gewebeschnitte durchzuführen, um das Epitop frei zu legen (Mucin-2-spezifischer polyklonaler Antikörper aus Klon H-300 von Santa Cruz, Katalog-Nummer sc-15334, Los Angeles, USA). Durch das Auftragen einer Lösung aus 3 % Ziegen-Serum, 0,5 % Casein (Sigma-Aldrich, C-8654), sowie 0,1 % NaN<sub>3</sub> in TBS-Pufferlösung sollte eine allfällige unspezifische Bindung des primären Antikörpers im Gewebe reduziert werden. Nun wurde der primäre Antikörper 1:100 verdünnt in TBS-Puffer aufgetragen und die Objektträger über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am Folgetag wurde nach dreimaligem Waschen in TBS-Puffer plus 0,01 % Tween 20 (Merck, Hohenbrunn) der sekundäre Antikörper (Affinity-purified, biotin-conjugated Goat anti-rabbit antibody von Dako, Glostrup, Dänemark, Katalog-Nummer EO 432) 1:200 verdünnt in TBS-Puffer aufgetragen und die Objektträger für 90 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dem erneuten Waschen der Objektträger in TBS-Puffer plus 0,01 % Tween 20 wurde der Avidin-Biotin-Meerrettichperoxidase-Komplex (Vectastain Elite PK6100 Standard, Vector Laboratories, Burlingame, California, USA) für 45 Minuten aufgetragen. Im Anschluss wurden die Objektträger nach erneutem Waschen für 60 Sekunden in einer Lösung mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) entwickelt und unter fließendem Leitungswasser gespült. Zum Schluss wurden die Objektträger für 45 Sekunden in Hämatoxylin gefärbt und mit Aquatex (Merck, Darmstadt), sowie einem Deckglas (Biosystems, Muttenz, CH) versiegelt.

#### MUC2, Sytox Green, Anti-β-Aktin

Die Gewebeschnitte wurden in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe hydriert (100 %, 90 %, 70 %, 50 %). Die Aktivität der endogenen Peroxidase wurde mittels

10-minütigen Eintauchens in eine 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung blockiert. Beim verwendeten primären Antikörper war es nicht nötig, eine Vorbehandlung der Gewebeschnitte durchzuführen, um das Epitop frei zu legen (Mucin-2 spezifischer polyklonaler Antikörper aus Klon H-300 von Santa Cruz, Katalog-Nummer sc-15334, Los Angeles, USA). Nun wurde eine Lösung aus 3 % Ziegen-Serum, 0,5 % Casein sowie 0,1 % NaN<sub>3</sub> in TBS-Pufferlösung aufgetragen, welche eine allfällige unspezifische Bindung des primären Antikörpers im Gewebe reduzieren soll. Die primären Antikörper (Siehe Liste verwendeter Antikörper/Farbstoffe) wurden aufgetragen und die Objektträger über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am Folgetag wurden nach dreimaligem Waschen in TBS-Puffer plus 0,01 % Tween 20 die sekundären Antikörper aufgetragen und die Objektträger für drei Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in TBS-Puffer plus 0,01 % Tween 20 wurde Sytox Green 1:5'000 verdünnt aufgetragen und die Objektträger für 60 Minuten in einer feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBS-Puffer plus 0,01 % Tween 20 wurden die Objektträger mittels EMS Shield Mount (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA), sowie einem Deckglas (Biosystems, Muttenz, CH) versiegelt.

#### Liste verwendeter Antikörper/Farbstoffe

- Primäre Antikörper
  - Mucin 2 (H-300), rabbit polyclonal IgG, 200 µg/ml, (Catalog number: sc-15334), Santa Cruz Biotechnology
  - Monoclonal Anti-β-Actin antibody produced in mouse, Clone AC-15 (Catalog number: A5441), Sigma-Aldrich
- Sekundäre Antikörper
  - Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG (H+L), 2 mg/ml (Catalog number: A11035), invitrogen molecular probes
  - Alexa Fluor 680 donkey anti-mouse IgG (H+L), 2 mg/ml, (Catalog number: A10038), invitrogen molecular probes
- DNA-Farbstoff
  - Sytox<sup>®</sup> Green nucleic acid stain, 5 mM solution in DMSO, 250 µl, Invitrogen, S7020, Lot: 612352

#### Testung neuer primärer Antikörper

Wo keine primären Antikörper zur Verfügung standen, die bereits im Labor etabliert waren, mussten diese erst an den spezifischen Proben getestet werden. Für ein Epitop sind auf dem Markt jeweils verschiedene primäre Antikörper verfügbar, weshalb der am besten und



präzisesten funktionierende ausgewählt werden muss. Da die meisten primären Antikörper für Formalin-fixiertes Gewebe entwickelt werden, funktionieren viele nicht in gleichem Masse in Methanol-Carnoy-fixiertem Gewebe. Verschiedene Fixierungslösungen verändern die Epitope der Proteine unterschiedlich, was dazu führt, dass einige Antikörper, die in Formalin-fixiertem Gewebe sehr gut funktionieren, in Methanol-Carnoy-fixiertem Gewebe keine Epitopbindung aufweisen.<sup>16</sup>

In diesem Experiment musste ein neuer primärer Anti-MUC2-Antikörper gesucht werden, da der früher verwendete Antikörper Mucin 2 (H-300) nicht mehr produziert wurde, das heisst nicht mehr verfügbar war.

In der Literatur konnten keine bereits durchgeführten Experimente mit den auf dem Markt vorhandenen anti-MUC2-Antikörper in Methanol-Carnoy-fixiertem Gewebe gefunden werden. Somit wurden zwei primäre Antikörper gekauft, welche in Formalin-fixiertem Gewebe von Mäusen als gut funktionierend beschrieben worden sind,<sup>20,21</sup> und wie folgt getestet.

In einem ersten Schritt wurde das Protokoll MUC2, Hämatoxylin Eosin mit dem neuen Antikörper durchgeführt, sowohl mit einer Positivkontrolle (primärer Antikörper wurde aufgetragen) als auch mit einer Negativkontrolle (primärer Antikörper wurde nicht aufgetragen), damit man die unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers im Gewebe erkennen kann. Alternativ konnte auch direkt das Immunfluoreszenzprotokoll MUC2, Sytox Green, Anti- $\beta$ -Aktin verwendet werden.

Je nach Ergebnis des Tests wurde das Protokoll angepasst und optimiert. Der Einsatz verschiedener Verfahren der Epitopfreilegung mit Überprüfung des Färberesultates verglichen mit den anderen Verfahren der Epitopfreilegung zeigte das bestmögliche Protokoll. Untersuchte Verfahren sind:

- Zitrat-Puffer
  - Objektträger für 6-8 Minuten im Mikrowellenofen kochen in einer Lösung aus 10 mM Zitronensäure. Anschliessend langsam abkühlen lassen.
- Triton X-100, 0,2 %
  - Objektträger für 10 Minuten in eine 0,2 % Lösung von Triton X-100 in TBS geben.
- Proteinase K
  - Objektträger für 5 Minuten in eine 37 °C warme Lösung mit 10  $\mu$ g/ml Proteinase K geben.

Falls der untersuchte Antikörper in einem der untersuchten Protokolle in der Positivkontrolle ein gutes Färbeergebnis und in der Negativkontrolle eine geringe oder gar keine Hintergrundfärbung zeigt, kann er verwendet werden. Andernfalls sind weitere Anpassungen an der Epitopfreilegung oder an der Methode der Blockierung unspezifischer Bindung notwendig. Falls alle durchgeführten Anpassungen keine spezifische Bindung des Antikörpers an die Zielsubstanz MUC2 zeigen, muss davon ausgegangen werden, dass dieser primäre Antikörper in Methanol-Carnoy fixiertem Gewebe nicht funktioniert, da vermutlich sein Epitop durch die Fixation verändert worden ist.

Folgende Antikörper wurden untersucht:

- MUC-2, rabbit polyclonal IgG, 1 mg/ml, Katalog-Nr. NBP1-31231, Novus Biologicals
- Mucin 2 (F-2), mouse monoclonal IgG, 0,2 mg/ml, Katalog-Nr. Sc-515032, Santa Cruz Biotechnology

Neben den beiden Antikörpern wurde auch das Lektin UEA-I (Ulex Europaeus Agglutinin 1) untersucht. Dieses bindet Fucose-Reste von Glykoproteinen, welche über eine  $\alpha$ -glykosidische Bindung verbunden sind. Die Färbung von Mukus in Formalin-fixiertem Gewebe wurde bereits beschrieben.<sup>18,22</sup> Das Lektin ist fluoreszenzmarkiert mit Texas Red, sodass das gleiche Protokoll für den Test verwendet wurde, wie für die Immunfluoreszenz-Färbungen mit MUC2. Bei der Anpassung des Protokolls wurde die Inkubationsdauer des Lektins zwischen 30 Minuten und 24 Stunden variiert, sowie die Inkubationstemperatur sowohl bei +4 °C, als auch bei Raumtemperatur untersucht.

Untersuchtes Lektin:

- Texas Red Conjugated Ulex Europaeus Lectin (Gorse, Furze) UEA-I, 2 mg, LubioScience, Zürich

## Mikroskopie

Von den gefärbten Gewebeschnitten wurden entweder direkt am Mikroskop Bilder aufgenommen, oder die Schnitte wurden mittels eines Slide-Scanners digitalisiert.

Als Mikroskop sowohl für die Hellfeldmikroskopie als auch für die Fluoreszenz-Mikroskopie wurde das Leica DMI4000 B der Live Cell Imaging Core Facility der Universität Bern verwendet.

Für hochauflösende Fluoreszenz-Aufnahmen wurde das Zeiss LSM 710 Laser Scanning Microscope der Life Cell Imaging Core Facility der Universität Bern verwendet. Die Aufnahmen erfolgten mittels der voreingestellten Exzitations- und Filterparameter des Mikroskops für die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe und wurden mit der maximalen

Auflösung aufgenommen.

Im Rahmen der Bildaufnahmen am LSM 710 wurde eine Aufnahme nur im Spektrum von Sytox Green gemacht, um das Färbemuster im Mukus dreidimensional hochaufgelöst abzubilden. Es wurde ein Z-Stack mit 86 Positionen bei 63-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Daten wurden mittels Dekonvolution geschärft. Dabei wird mittels einer mathematischen Methode die Unschärfe reduziert, welche durch das optische Abbildungssystem des Mikroskops zustande kommt. Die digitale Bearbeitung und Darstellung der dreidimensionalen Aufnahmen erfolgte mittels ZEN Black Version 2.3 SP1 von ZEISS.

Die Digitalisierung ganzer Objektträger erfolgte mit dem Panoramic 250 FLASH II von 3DHISTECH. Dieser Scanner kann Gewebeschnitte sowohl im Hellfeldmodus als auch mit verschiedenen Fluoreszenzfiltern digitalisieren. Er verfügt über ein 20x sowie ein 40x Objektiv.

### Quantitative Auswertung der Mukusdicke

Für die quantitative Auswertung der Dicke der inneren sowie der äusseren Mukusschicht wurden jeweils nur intakte Bereiche analysiert, bei welchen genügend Nahrungsbestandteile im Lumen des Kolon vorhanden waren, weil dort der Mukus möglichst gut erhalten geblieben ist. Messungen des Ileums waren nicht möglich, da der Mukus dort nicht kontinuierlich vorhanden ist, sondern seine Dicke sehr stark variiert. Es wurden von jeder Gewebeprobe 7 Messungen vorgenommen. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen wurde der one-way-ANOVA (One-way analysis of variance) verwendet. Zur genauen Bestimmung der statistischen Signifikanz dieser Unterschiede wurde der Bonferroni's multiple comparisons test eingesetzt. Die statistischen Auswertungen erfolgten mittels Excel, sowie Graph Pad Prism Version 8.3.0. Dargestellt ist die durchschnittliche Dicke der inneren wie auch der äusseren Mukusschicht in den verschiedenen experimentellen Gruppen mit dem zugehörigen Konfidenzintervall.

## Resultate

---

### Färbung mit anti-MUC2 H-300 plus Hämatoxylin-Eosin

Das Färbeprotokoll ergibt eine deutliche Färbung des Mukus sowie der Becherzellen, was zeigt, dass die Färbung grundsätzlich funktioniert. Es gibt praktisch keine Hintergrundfärbung, einzig der Darminhalt ist teilweise ebenfalls gefärbt. Dabei ist jedoch nicht klar, ob es sich um Brocken von Mukus handelt, oder ob es Nahrungsbestandteile sind, welche falsch-positiv mitgefärbt werden.

Die Färbung im Kolon zeigt eine deutliche Färbung der Becherzellen (Abbildung 5). Gut erkennbar ist die Unterteilung in eine innere sowie eine äussere Mukusschicht, wie sie von Johansson et al. beschrieben wird.<sup>6</sup> Die innere Mukusschicht ist nur braun gefärbt, die äussere Mukusschicht zusätzlich blau, da Hämatoxylin die Bakterien blau färbt. Der Vergleich mit der PAS-Reaktion zeigt deutlich, dass die innere Mukusschicht nur mit der MUC2-Färbung erhalten werden kann, bei der PAS-Reaktion (Abbildung 6) ist dieser Teil der Mukusschicht nicht mehr vorhanden und lediglich die äussere Mukusschicht mit den Bakterien, sowie Reste der inneren Mukusschicht sind erhalten geblieben. Bei der PAS-Färbung ist die Abgrenzung zwischen innerer und äusserer Mukusschicht folglich nicht möglich. Die Becherzellen sind auch in der PAS-Färbung gut identifizierbar.

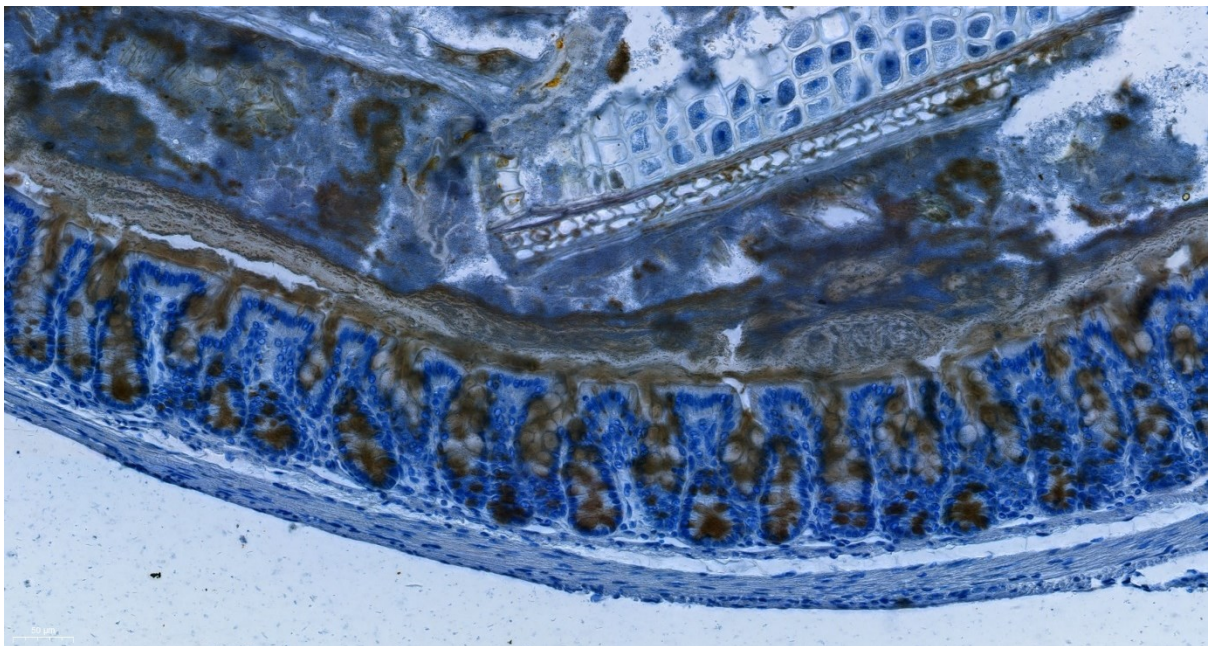
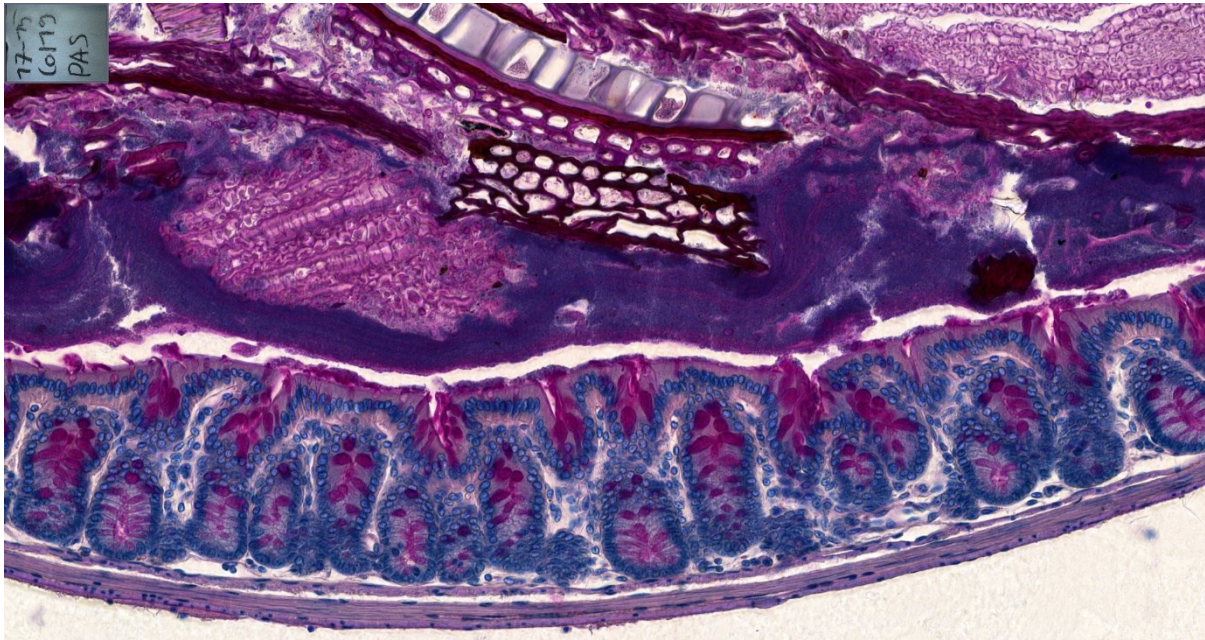


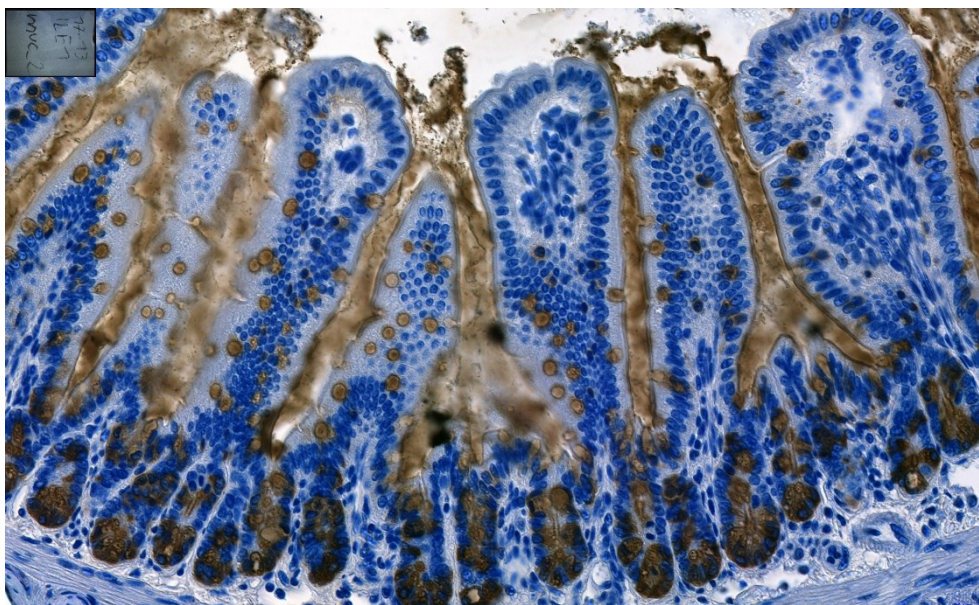
Abbildung 5 - Kolon gefärbt mit anti-MUC2 H-300 sowie Hämatoxylin. MUC2 braun, Zellkerne sowie Bakterien blau. 20x



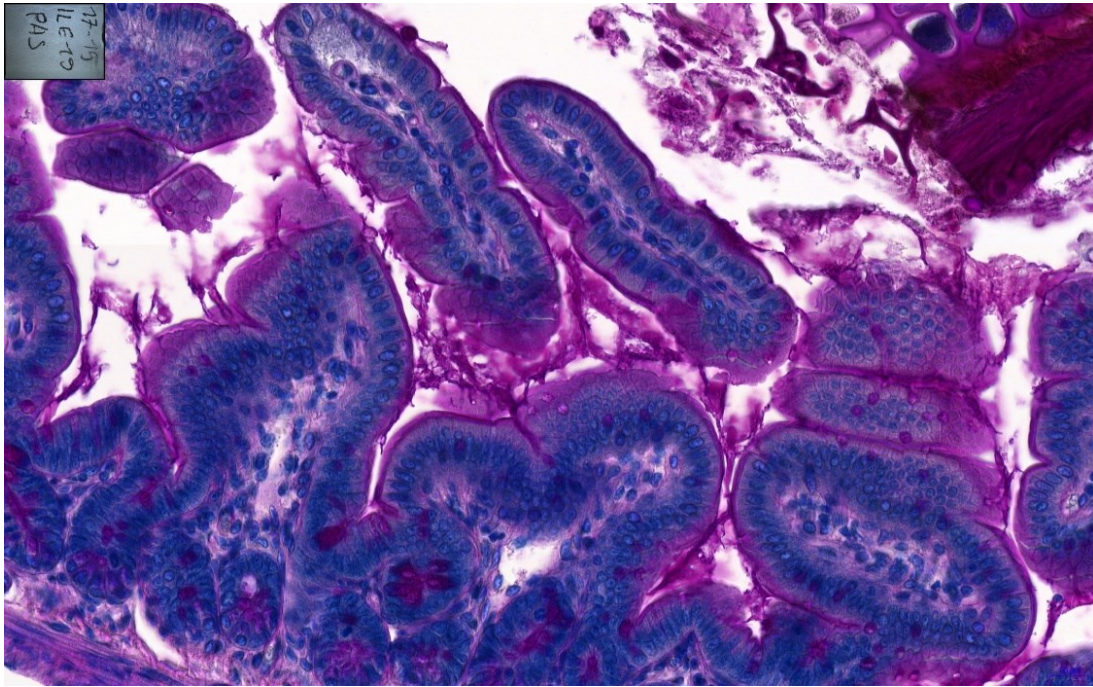
**Abbildung 6 - Kolon gefärbt durch die PAS-Reaktion sowie Hämatoxylin. Muzine rötlich, Zellkerne blau. 20x**

Die Färbung der Becherzellen zeigt sich im Ileum deutlicher als im Kolon, so sind im Ileum die einzelnen Becherzellen klar abgrenzbar (Abbildung 7). Verglichen mit dem Ileum erscheint die Färbung in den Kolon-Proben (Abbildung 5) etwas verwaschen und unschärfer.

Im Ileum ist keine kontinuierliche Mukusschicht über den Zotten erhalten. In gewissen Proben konnte der Mukus zwischen den Zotten gut erhalten werden, wie in Abbildung 7 sichtbar ist, in anderen Proben war der Mukus zwischen den Zotten nur noch in Spuren vorhanden. Eine Distanzmessung war somit nicht möglich.



**Abbildung 7 - Repräsentatives Beispiel der Färbung mit anti-MUC2 H-300 in einer Ileum-Probe. Braun zeigt sich das MUC2, die Zellkerne sind mittels Hämatoxylin blau gefärbt. 40x**



**Abbildung 8 – Mittels PAS-Reaktion gefärbte Ileum-Probe. Muzine sind rötlich gefärbt, die Zellkerne mittels Hämatoxylin blau. 40x**

Der Vergleich mit der PAS-Reaktion macht deutlich, dass mit der MUC2-Färbung der Mukus viel detaillierter analysiert werden kann und auch viel besser erhalten bleibt. Beide hier gezeigten Proben wurden mittels Methanol-Carnoy fixiert, dennoch zeigt die mit der PAS-Reaktion gefärbte Probe einen deutlichen Zerfall des Mukus. Der Mukus in der MUC2-Färbung füllt die Zwischenräume zwischen den Zotten aus. Lediglich auf den Zottenspitzen fehlt er grösstenteils. Auffallend ist, dass auch die Becherzellen mittels der MUC2-Färbung besser sichtbar sind als in der PAS-Reaktion. Gerade kleinere (evtl. am Rand angeschnittene) Becherzellen in den Zotten sind mit MUC2 deutlich besser zu sehen, in der PAS-Reaktion fallen sie praktisch nicht auf.

In der Negativkontrolle zeigt sich in den Kolon-Proben, dass es keine unspezifische Färbung oder einen Färbungshintergrund gibt (Abbildung 9). Lediglich einzelne intestinale Nahrungsbestandteile sind angefärbt. Im Bereich des Epithels und der Mukusschicht ist keine unspezifische Färbung nachweisbar. Die innere Mukusschicht ist als Schemen sehr schwach zu erkennen, jedoch nicht spezifisch gefärbt.

Bei den Negativkontrollen der Ileum-Proben (Abbildung 10) ist ein schwacher Färbungshintergrund in der Kryptenbasis sichtbar, die Zotten sind nicht gefärbt. Auch hier sind einzelne intestinale Nahrungsbestandteile angefärbt. Die Becherzellen imponieren optisch leer ohne Färbung.

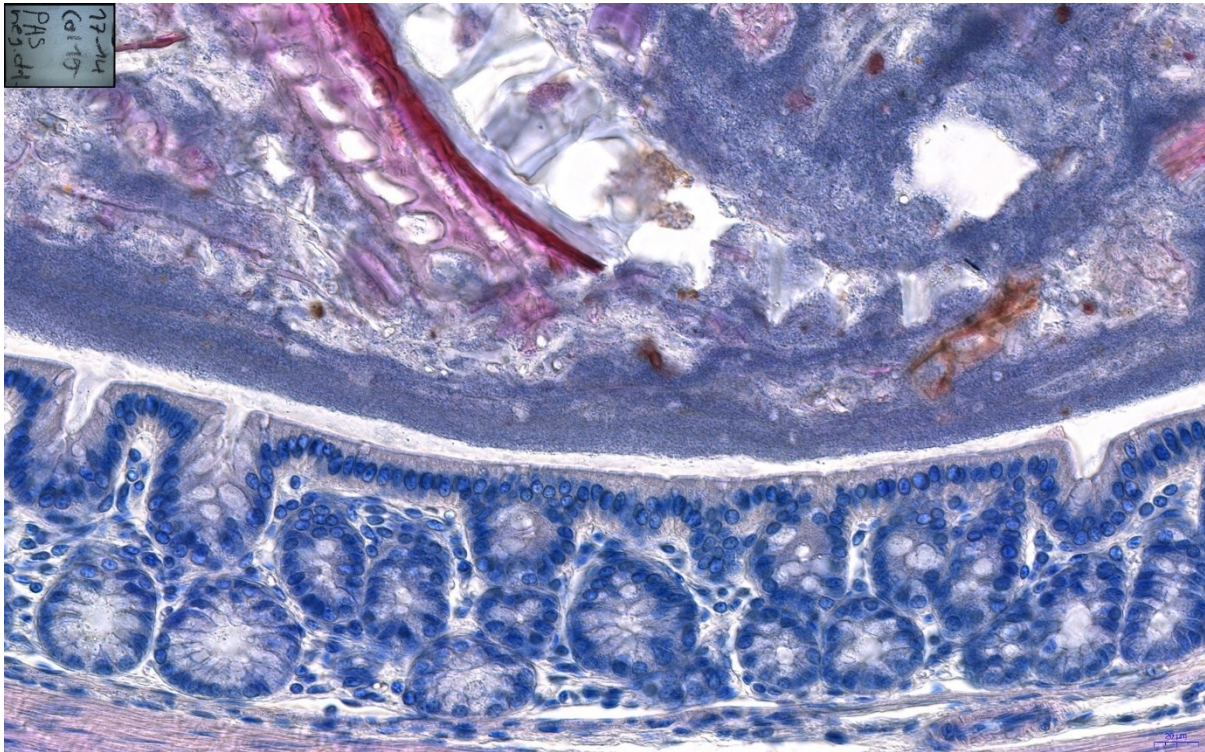


Abbildung 9 - Negativkontrolle ohne Applikation des primären Antikörpers anti-MUC2 H-300 in einer Kolon-Probe. 40x

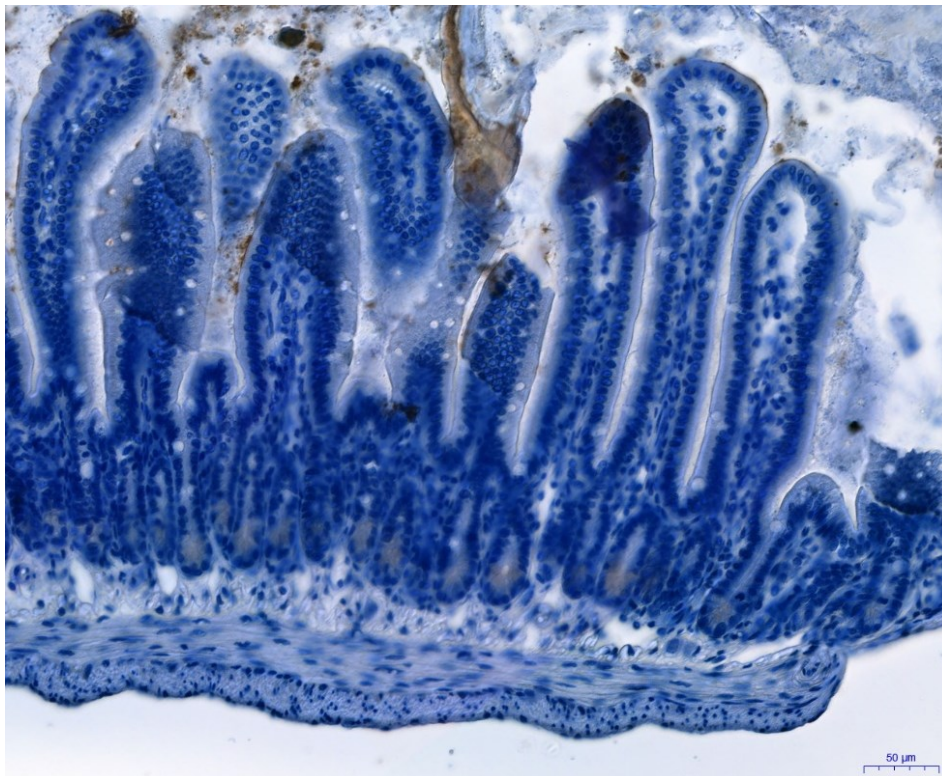


Abbildung 10 - Negativkontrolle ohne Applikation des primären Antikörpers anti-MUC2 H-300 in einer Ileum-Probe. 40x

## Quantitative Auswertung

Die Auswertung der Mukusdicke an den Färbungen mittels anti-MUC2 H-300 sowie Hämatoxylin ergibt in allen drei experimentellen Gruppen ähnliche Werte. Die durchschnittliche Dicke der inneren Mukusschicht ist in allen Gruppen praktisch identisch mit rund 23  $\mu\text{m}$ . Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, wie die Abbildung 11 zeigt.

Die Dicke der äusseren Mukusschicht ist in allen Gruppen grösser als die Dicke der inneren Mukusschicht. Es zeigen sich leichte Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen. Sowohl die PPVL- als auch die Kontroll-Gruppe weisen eine ähnlich dicke äussere Mukusschicht von rund 110  $\mu\text{m}$  auf. Die BDL-Gruppe zeigt dagegen eine geringere Dicke der äusseren Mukusschicht von rund 80  $\mu\text{m}$ , wobei der Unterschied zu den anderen experimentellen Gruppen statistisch nicht signifikant ausfiel (BDL und Ctrl n = 5, PPVL n = 3).

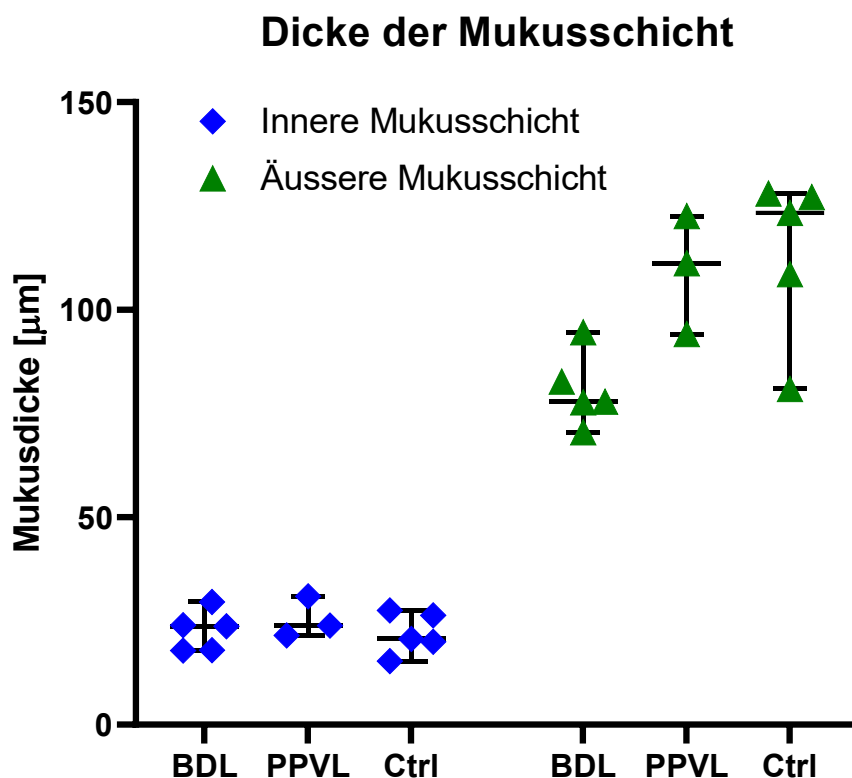


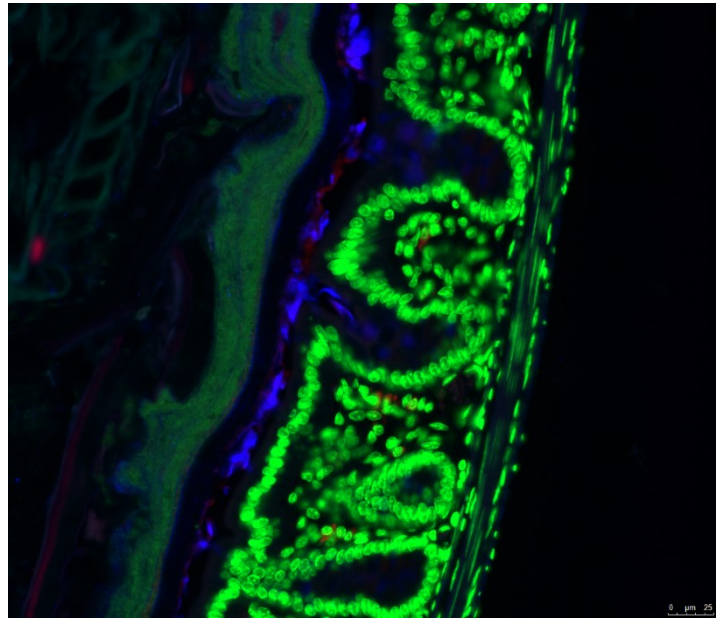
Abbildung 11 - Durchschnittliche Mukusdicke in BDL-, PPVL- und Kontrollmäusen. i bezeichnet die innere Mukusschicht, o die äussere Mukusschicht. Angegeben sind die Mittelwerte mit dem 95 %-Konfidenzintervall. BDL: Bile Duct Ligation (Gallengangligatur), PPVL: Partial Portal Vein Ligation (Partielle Portalvenenligatur), Ctrl: Kontrollgruppe



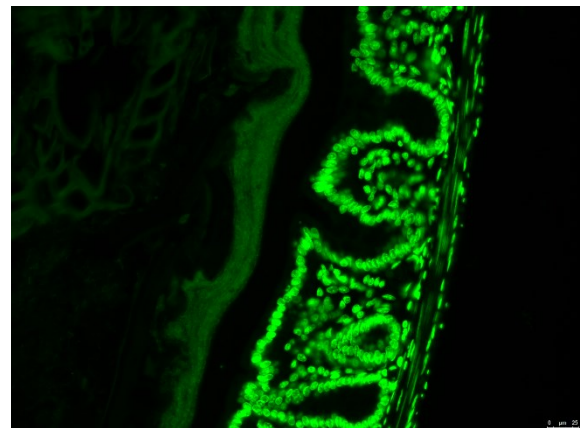
## Färbung mit anti-MUC2 H-300, anti- $\beta$ -Aktin, sowie Sytox Green

Im repräsentativen Ausschnitt von Abbildung 12 ist das Ergebnis des simultanen Färbungsprotokolls sichtbar. Man kann erkennen, dass das Sytox Green insbesondere die Nuklei der epithelialen Zellen stark färbt. Aber auch die Färbung der Bakterien ist deutlich sichtbar als grünes Band etwas oberhalb des Epithels. Das Mucin 2 wurde ebenfalls gefärbt, man erkennt deutlich die blaue Färbung im Bereich der inneren Mukusschicht, sowie etwas schwächer die Becherzellen. In dieser Färbung konnte die innere Mukusschicht nicht vollständig gefärbt werden, sie erscheint diskontinuierlich. Die äussere Mukusschicht ist praktisch nicht gefärbt. Das  $\beta$ -Aktin ist fast nicht sichtbar mit diesem Färbeprotokoll, die epitheliale Grenze kann jedoch schemenhaft erkannt werden.

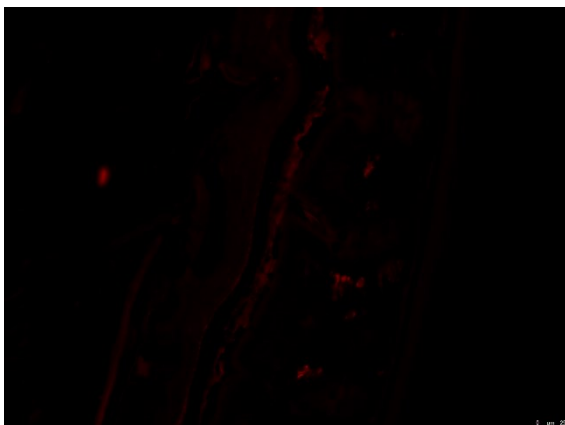
In den einzelnen, separaten Bildkanälen sieht man deutlich, dass Sytox Green, sowie anti-MUC2 H-300 eine starke Färbung ergeben, und dass  $\beta$ -Aktin fast nicht sichtbar ist (Abbildungen 13 – 15).



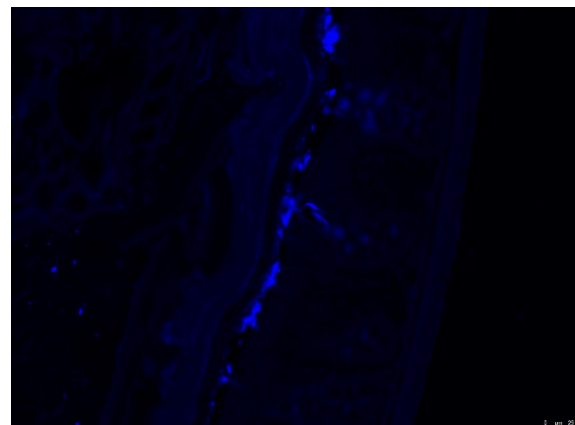
**Abbildung 12 - Repräsentativer Ausschnitt der Färbung. Grün: Sytox Green, Blau: MUC2, Rot:  $\beta$ -Aktin. 40x**



**Abbildung 13 – Grüner Bildkanal, Sytox Green. 40x**



**Abbildung 14 - Roter Bildkanal,  $\beta$ -Aktin. 40x**

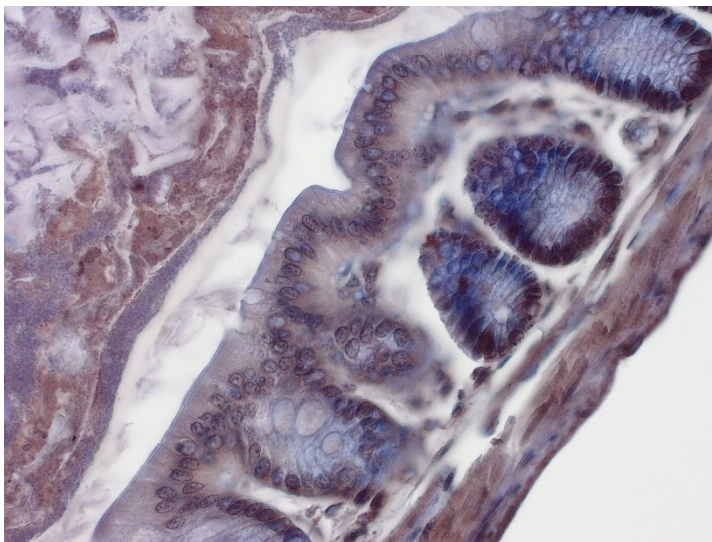


**Abbildung 15 – Blauer Bildkanal, MUC2 H-300. 40x**

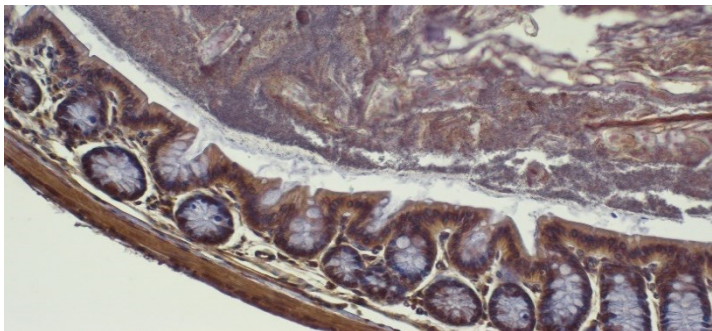
## Testung neuer Antikörper

Der getestete primäre Antikörper (MUC-2 rabbit polyclonal IgG, 1 mg/ml, Katalog-Nummer NBP1-31231, Novus Biologicals) zeigte mit allen drei Varianten der Epitopfreilegung keine Färbung der Mukusschicht in Kolon-Proben von Mäusen, welche mittels Methanol-Carnoy fixiert worden sind (Abbildungen 16 – 18).

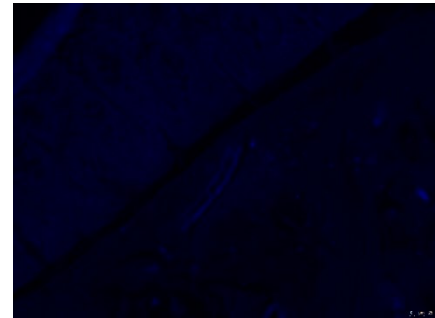
Der zweite getestete primäre Antikörper (Mucin 2 (F-2), mouse monoclonal IgG, 0,2 mg/ml, Katalog-Nr. Sc-515032) zeigte ebenfalls mit allen drei Varianten der Epitopfreilegung keine Färbung der Mukusschicht in Kolon-Proben von Mäusen, welche mittels Methanol-Carnoy fixiert worden sind (Abbildung 19). Es zeigt



**Abbildung 19 - Keine spezifische Färbung der Becherzellen oder der Mukusschicht, Zellkerne blau, Mukus braun. 40x**



**Abbildung 20 - Längere Entwicklungszeit mit starker Hintergrundfärbung. 40x**



**Abbildung 16 - Kochen in Zitrat-Pufferlösung. 40x**



**Abbildung 17 - Proteinase K. 40x**



**Abbildung 18 – Triton. 40x**

sich hier auch in der Immunfluoreszenz keine Färbung in allen Varianten der Epitopfreilegung.

Mit einem leicht veränderten Protokoll, bei welchem die Entwicklungszeit im DAB-Substrat von 60 Sekunden auf fünf Minuten erhöht wurde, konnte beim Mucin 2 (F-2)-Antikörper ebenfalls kein spezifisches Bindungsverhalten in den verwendeten Kolon-Proben gezeigt werden (Abbildung 19).

Diese Veränderung führte lediglich zu einer starken unspezifischen Färbung, ohne gezielt die Becherzellen oder die Mukusschicht stärker zu färben.

Das getestete Lektin UEA-I zeigt ein positives Signal in den Becherzellen. Die innere Mukus-Schicht scheint grösstenteils aufgelöst zu sein, denn an gewissen Stellen ist ein deutliches Signal des Lektins sichtbar. Die äussere Mukusschicht ist jedoch nicht gefärbt. Dazu ist die Färbung nicht in allen Proben auf einem Objektträger gleich stark.

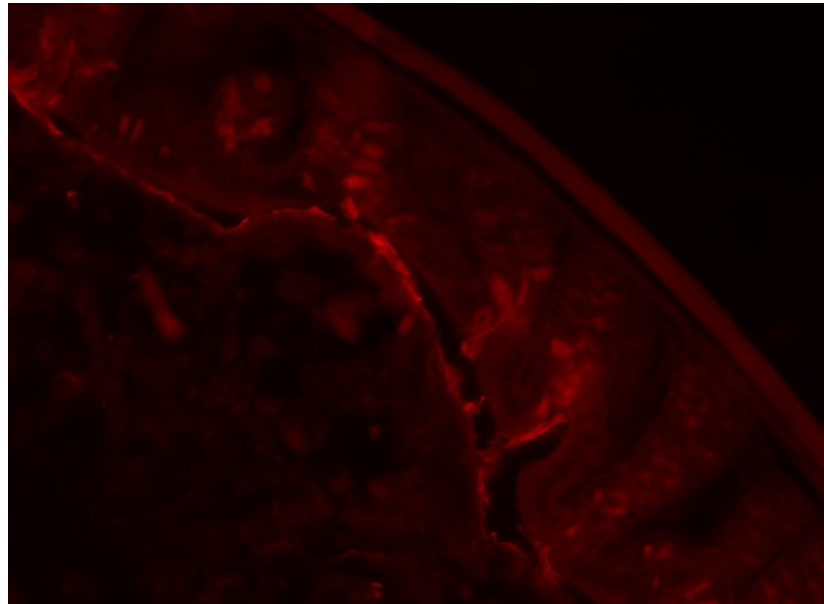


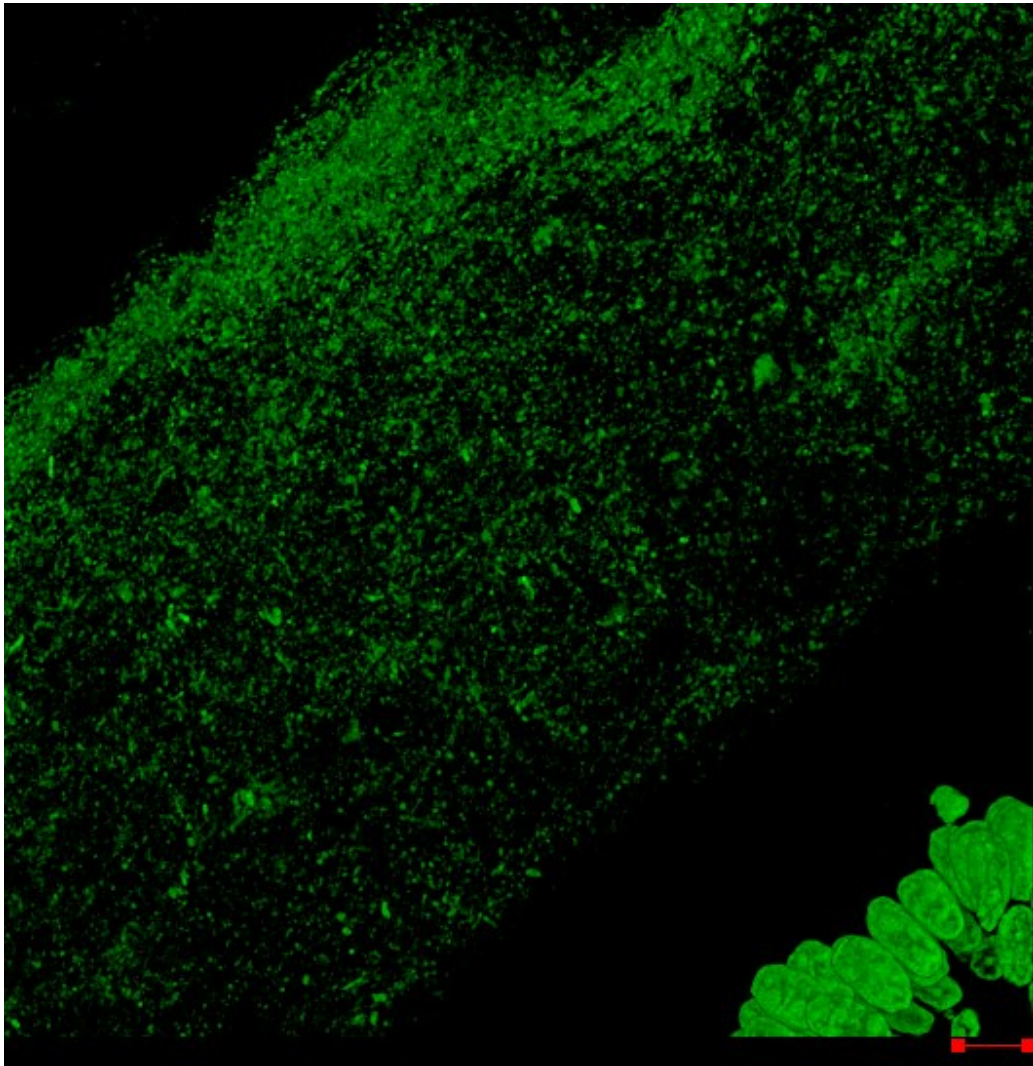
Abbildung 21 - Färbung des FITC-konjugierten Lektins UEA-I im Kolon einer Maus, FITC-Filter. 40x

Die in Abbildung 21 dargestellte Region wurde gut gefärbt, jedoch sind auf dem gleichen Objektträger Regionen vorhanden, welche gar nicht gefärbt worden sind. Es ist auch sichtbar, dass eine relativ starke Hintergrundfärbung vorhanden ist. Eine sichtbare Färbung tritt erst ab einer Lektin-Konzentration von 10 µg/ml auf, wenn pro Objektträger 100 µl Färbelösung aufgetragen werden. Geringere Konzentrationen ergaben dagegen keine ausreichende Färbung. Die Kombination des Lektins mit anti-β-Aktin-Antikörper sowie Sytox Green führte zu keiner gegenseitigen Veränderung des Färbeverhaltens.

### Hochauflösende Darstellung des mit Sytox Green gefärbten Mukus im Kolon

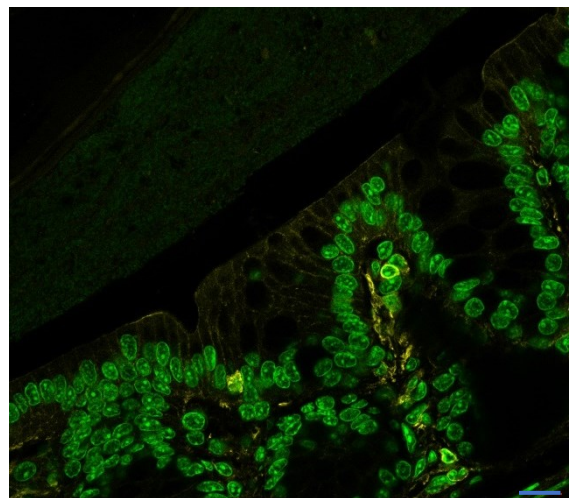
Es zeigte sich, dass Sytox Green praktisch keine Hintergrundfärbung im Mukus selbst hervorruft, sondern gezielt die Bakterien färbt. Auch hier kann klar gezeigt werden, dass es einen Abstand zwischen der Oberfläche des Epithels und den ersten Bakterien der äusseren Mukusschicht gibt, und dass die Bakterien nicht in direktem Kontakt mit dem Epithel stehen. Innerhalb der Mukusschicht scheint die Konzentration der Bakterien gegen das Lumen hin zuzunehmen (siehe Abbildung 22). Verschiedene animierte Darstellungen der Aufnahmen sind online verfügbar, um die dreidimensionale Struktur besser sehen zu können.<sup>b</sup>

<sup>b</sup> <https://david-stutz.ch/home/bakterielle-translokation/>



**Abbildung 22 - Hochaufgelöste Aufnahme der Mukusschicht im Kolon einer Maus, Färbung mittels Sytox Green (Bakterien, Nuklei). Rechts unten sind die Nuklei der Enterozyten zu erkennen, anschliessend die innere Mukusschicht, welche steril ist, gefolgt von der äusseren Mukusschicht, welche gegen das Lumen hin eine zunehmende Konzentration an Bakterien enthält. 63x, Dekonvolution, Skala 10  $\mu\text{m}$**

Die Abbildung 23 zeigt den Überblick über die in Abbildung 22 hochaufgelöst dargestellte Region. In Abbildung 22 wurde zusätzlich zu Sytox Green noch anti-Beta-Aktin eingesetzt, um das Ende des Epithels besser sichtbar zu machen.



**Abbildung 23 - Aufnahme der Mukusschicht im Kolon einer Maus, gefärbt mit Sytox Green (grün) sowie anti-Beta-Aktin (orange). 63x, Skala 20  $\mu\text{m}$**

## Diskussion

---

Die Messung der Schichtdicke ergab für die innere sowie die äussere Mukusschicht in mit anti-MUC2 H-300 gefärbten Proben Werte, welche gut mit den in der Literatur beschriebenen Daten von Johansson et al. übereinstimmen.<sup>6</sup> Bei In-vivo-Experimenten konnten Johansson et al. zeigen, dass die innere Mukusschicht rund 50 µm dick ist. Als Ursache für den gemessenen kleineren Wert bei der Dicke der inneren Mukusschicht in den histologischen Proben verglichen mit den In-vivo-Messungen kommen viele Möglichkeiten in Betracht. Hauptverantwortlich dafür dürfte die Fixation der Proben sein, welche die Struktur der Mukusschicht vermutlich verändert. Auch die weitere histologische Aufarbeitung mit dem Entwässern und Einbetten in Paraffin, sowie die nachfolgende Färbung, bei welcher die Probe wieder rehydriert wird, könnte einen nachteiligen Effekt auf die Erhaltung der Mukusschicht haben.

Die gemessene Dicke der inneren Mukusschicht ist in allen Gruppen vergleichbar. Die Messung der äusseren Mukusschicht zeigt dagegen ein weniger einheitliches Ergebnis. Die Ursache dafür ist die weniger deutliche Grenze zwischen der äusseren Mukusschicht und dem Darminhalt. Teilweise komprimiert der Darminhalt die äussere Mukusschicht, teilweise quillt sie weit ins Lumen. Dies erklärt das grössere Konfidenzintervall bei den Messungen der äusseren Mukusschicht. Nichtsdestotrotz ist die äussere Mukusschicht i) in der Gruppe mit partieller Portalvenenligatur vergleichbar ii) und bei Cholestase vermindert verglichen mit der Kontrollgruppe. Letzteres fiel jedoch aufgrund der Heterogenität der Messung und Tierzahl nicht statistisch signifikant aus. Weitere Daten aus unserem Labor zeigen eine verminderte Dicke der Mukusschicht mit Verlust von Becherzellen bei Mäusen mit Leberzirrhose, jedoch nicht bei Mäusen mit chronischer prähepatischer portaler Hypertonie.<sup>11</sup> In Mäusen mit Leberzirrhose, jedoch nicht in solchen mit chronischer portalvenöser Hypertonie, zeigte sich eine deutlich erhöhte Bakterienmenge in der inneren Mukusschicht. Interessanterweise zeigten die Mäuse mit der geringsten Mukus-Dicke im terminalen Ileum die stärkste Translokation von Bakterien in die Leber.<sup>11</sup>

Die durch die Gallengangligatur hervorgerufene portale Hypertension scheint nicht direkt einen Einfluss auf die Mukusdicke zu haben, denn die Mäuse mit partieller Portalvenenligatur haben eine gleich grosse äussere Mukusschicht wie die Kontrollmäuse. Eventuell spielt die intestinale Galle eine Rolle bei der Produktion oder Freisetzung des Mukus aus den Becherzellen, bei der Stabilisierung der äusseren Mukusschicht oder beim Abbau des Mukus durch Mikroorganismen.<sup>23,24</sup> Hier ist weitere Forschung notwendig, um die Zusammenhänge zwischen der intestinalen Galle und der Mukusschicht weiter aufzuschlüsseln.

Die Färbung mittels anti-MUC2 H-300 zeigt deutlich auf, dass die Erhaltung der Mukusschicht ein anspruchsvolles und komplexes Verfahren ist. Der Erhalt der inneren Mukusschicht gelang nur in der Färbung mit biotinyliertem sekundärem Antikörper, nicht aber mit dem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper. Was genau die entscheidenden Unterschiede sind, welche dazu beitragen, dass die Mukusschicht im einen Protokoll besser erhalten blieb als im anderen, ist unklar. Beide Protokolle sind relativ ähnlich, haben aber Unterschiede zum Beispiel in der Wahl des Eindickmittels, mit welchem das Deckglas befestigt wird, und in der Anzahl der Wasch-Durchgänge im TBS-Puffer.

Für die weitere Forschung im Bereich der Mukusschicht des Darmes wäre es sehr interessant, eine histologische Untersuchungsmethode zu haben, welche es erlauben würde, die Dicke der Mukusschicht nahezu unverändert erhalten zu können. Dies würde die genaue Analyse räumlicher Beziehungen von Bakterien, Mukus, Becherzellen und den Enterozyten in verschiedenen Tiermodellen erlauben.

Die Austestung neuer Antikörper ergab, dass keiner der getesteten Antikörper gegen MUC2 bei Methanol-Carnoy-fixierten Proben spezifisch binden kann. Lediglich das Lektin UEA-I kann als Kandidat betrachtet werden, welcher die Mukusschicht in diesen Proben anfärben könnte. Hier sind jedoch weitere Tests und Anpassungen im Färbeprotokoll notwendig, was den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde. Eine genaue Untersuchung der Epitope der verwendeten Antikörper wäre interessant, um weitere Einsichten in die molekulare Struktur des Mukus erhalten zu können. Dennoch ist unklar, wie sich die Mukusschicht, beziehungsweise die von ihr präsentierten Epitope, durch die Fixation in Formalin oder Methanol-Carnoy verändert.

Die hochaufgelöste Aufnahme des mit Sytox Green gefärbten Mukus zeigt detailliert seine räumliche Struktur und die Verteilung der Bakterien innerhalb der Mukusschicht. So konnte gezeigt werden, dass die innere Mukusschicht keine Bakterien aufweist und somit vermutlich steril ist, was die Ergebnisse von Hansson et al. bestätigt.<sup>6</sup> Weiter konnte gezeigt werden, dass die Konzentration der Bakterien in der äusseren Mukusschicht gegen das Darmlumen hin zunimmt. Dies erscheint auch grundsätzlich nachvollziehbar, da die äussere Mukusschicht gegen das Lumen hin lockerer wird und somit mehr Oberfläche für die Besiedlung mit Bakterien bietet. Spannend wäre es, eine dreidimensionale Aufnahme eines sehr dicken Schnittes aus der Kolonschleimhaut zu erstellen. So könnte man mehr als 86 Schichten aufnehmen und bekäme einen Einblick, wie sich die Mukusschicht dreidimensional im Bereich von Krypten oder Becherzellen verhält. Hier könnte man den ganzen dickeren Schnitt mit anti-MUC2, Sytox Green sowie anti- $\beta$ -Aktin färben, um sowohl die Struktur des Mukus als auch die Grenze des Epithels sehen zu können. In der Literatur wird diskutiert, ob die innere Mukusschicht möglicherweise im Bereich von Becherzellen

mechanisch befestigt ist und dem Mukus so vermehrt Stabilität gibt.<sup>6</sup> Dies könnte mit einer dreidimensionalen Aufnahme eines dicken Schnittes möglicherweise beantwortet werden.

## Key-Findings

---

- Die Dicke der äusseren Mukusschicht im Kolon ist bei Leberzirrhose verringert verglichen mit prähepatischer portaler Hypertension und Kontrollen.
- Die Dicke der inneren Mukusschicht im Kolon ist bei Leberzirrhose und prähepatischer portaler Hypertension unverändert verglichen mit Kontrollen.
- Die innere Mukusschicht ist frei von Bakterien und die Konzentration von Bakterien nimmt in der äusseren Mukusschicht gegen Luminal zu.
- Das Ulex Europaeus Lektin I vermag intestinalen Mukus und somit auch Becherzellen zu färben.
- Die frei zugänglichen Epitope von MUC2 unterscheiden sich zwischen Formalin-fixiertem Gewebe und Methanol-Carnoy-fixiertem Gewebe, was die Auswahl von funktionierenden anti-MUC2-Antikörpern in Methanol-Carnoy-fixiertem Gewebe stark einschränkt.



## Danksagung

---

Ich möchte folgenden Personen und Institutionen danken, welche meine wissenschaftliche Arbeit mit Rat und Tat unterstützten:

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Reiner Wiest, welcher die gesamte Arbeit überwachte, sowie bei Dr. Marcel Sorribas, welcher mich bei der Planung der Experimente und bei der Interpretation der Ergebnisse unterstützte.

Weiter möchte ich danken

- Prof. Dr. Siegfried Hapfelmeier-Balmer
- Forschungsgruppe Gastroenterologie / Mukosale Immunologie
  - Prof. Dr. med. Andrew Macpherson
  - Dr. rer. nat. Stephanie Ganal-Vonarburg
  - Dr. Mercedes Gomez de Agüero
  - Dr. med. Anna Silvia Wenning
  - Dr. rer. nat. Jakob Zimmermann
  - Dr. Bahtiyar Yilmaz
  - Dr. med. Catherine Mooser
  - PD Dr. med. Pascal Juillerat
  - Dr. Hai Li
  - Dr. Julien Limenitakis
  - Dr. rer. nat. Tim Rollenske
  - Dr. Francesca Ronchi
  - Monica Iachizzi
  - Karin Stettler
- Life Cell Imaging Core Facility des Microscopy Imaging Center der Universität Bern
  - Carlos Wotzkow
  - Selina Steiner
  - Dr. Fabian Blank
  - Dr. Yury Belyaev
- Central Animal Facilities der Universität Bern

## Literaturverzeichnis

---

1. Wiest R. The Intestinal Microbiota. In: Handbook of Gastroenterology and liver diseases. Turin – Rome, Italy: Edizioni Minerva Medica - EGI; 2016. p. 15–24.
2. Van Klinken BJ-W, Einerhand AWC, Duits LA, et al. Gastrointestinal expression and partial cDNA cloning of murine Muc2. *Am J Physiol Liver Physiol* 1999;276(1):G115–24.
3. Audie JP, Janin A, Porchet N, Copin MC, Gosselin B, Aubert JP. Expression of human mucin genes in respiratory, digestive, and reproductive tracts ascertained by in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 1993;41(10):1479–85.
4. Birchenough GMH, Johansson MEV, Gustafsson JK, Bergström JH, Hansson GC. New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunol.* 2015;8(4):712–9.
5. Tytgat KMAJ, Büller HA, Opdam FJM, Kim YS, Einerhand AWC, Dekker J. Biosynthesis of human colonic mucin: Muc2 is the prominent secretory mucin. *Gastroenterology* 1994;107(5):1352–63.
6. Johansson MEV, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson GC. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(39):15064–9.
7. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest [Internet]* 2005;115(2):209–18. Available from: <https://www.jci.org/articles/view/24282>
8. Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun* 1979;23(2):403–11.
9. Wiest R, Garcia-Tsao G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology.* 2005;41(3):422–33.
10. Wiest R, Lawson M, Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *J Hepatol* 2014;60(1):197–209.
11. Sorribas M, Jakob MO, Yilmaz B, et al. FXR modulates the gut-vascular barrier by regulating the entry sites for bacterial translocation in experimental cirrhosis. *J Hepatol* 2019;71(6):1126–40.
12. Tag CG, Sauer-Lehnen S, Weiskirchen S, et al. Bile Duct Ligation in Mice: Induction of Inflammatory Liver Injury and Fibrosis by Obstructive Cholestasis. *J Vis Exp* 2015;(96):1–11.
13. Geerts AM, Vanheule E, Praet M, Van Vlierberghe H, De Vos M, Colle I. Comparison of three research models of portal hypertension in mice: Macroscopic, histological and portal pressure evaluation. *Int J Exp Pathol* 2008;89(4):251–63.
14. Chojkier M, Groszmann RJ. Measurement of portal-systemic shunting in the rat by using gamma-labeled microspheres. *Am J Physiol* 1981;240(5):G371–5.
15. Johansson MEV, Hansson GC. Preservation of Mucus in Histological Sections, Immunostaining of Mucins in Fixed Tissue, and Localization of Bacteria with FISH in Mucins - Methods and Protocols. 2012.
16. Puchtler H, Waldrop FS, Meloan SN, Terry MS, Conner HM. Methacarn (methanol-Carnoy) fixation. *Histochemie* 1970;21(2):97–116.
17. Li H, Limenitakis JP, Fuhrer T, et al. The outer mucus layer hosts a distinct intestinal microbial niche. *Nat Commun* 2015;6.
18. Sakamoto K, Hirose H, Onizuka A, et al. Quantitative study of changes in intestinal morphology and mucus gel on total parenteral nutrition in rats. *J Surg Res* 2000;94(2):99–106.
19. Recordati C, Radaelli E, Simpson KW, Scanziani E. A simple method for the production of bacterial controls for immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *J Mol Histol* 2008;39(4):459–62.

20. Janardhan KS, Jensen H, Clayton NP, Herbert RA. Immunohistochemistry in Investigative and Toxicologic Pathology. *Toxicol. Pathol.* 2018;46(5):488–510.
21. Nørgaard K, Müller C, Christensen N, et al. Loss of mismatch repair signaling impairs the WNT–bone morphogenetic protein crosstalk and the colonic homeostasis. *J Mol Cell Biol* 2019;
22. Gouyer V, Gottrand F, Desseyn JL. The extraordinarily complex but highly structured organization of intestinal mucus-gel unveiled in multicolor images. *PLoS One* 2011;6(4):13–6.
23. Barcelo A, Claustre J, Toumi F, et al. Effect of bile salts on colonic mucus secretion in isolated vascularly perfused rat colon. *Dig Dis Sci* 2001;46(6):1223–31.
24. Jakobsson HE, Rodríguez-Piñero AM, Schütte A, et al. The composition of the gut microbiota shapes the colon mucus barrier. *EMBO Rep* 2015;16(2):164–77.

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 1 - Schematische Darstellung der Antikörperbindung bei der Immunhistochemie mit enzymgekoppeltem sekundärem Antikörper. Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. pharm. E. Vassella, Institut für Pathologie Universität Bern .....	10
Abbildung 2 - Schematische Darstellung der Antikörperbindung bei der Immunhistochemie mit biotinyliertem sekundärem Antikörper und dem Avidin-Biotin-Komplex; www.labce.com .....	11
Abbildung 3 – Schematischer Aufbau des Darmepithels; Molecular Biology of the Cell (© Garland Science 2008).....	12
Abbildung 4 - Co-Färbung von Bakterien (rot, EUB338) und MUC2 (grün, anti-MUC2C3), Johansson et al. 2012 .....	13
Abbildung 5 - Kolon gefärbt mit anti-MUC2 H-300 sowie Hämatoxylin. MUC2 braun, Zellkerne sowie Bakterien blau. 20x .....	19
Abbildung 6 - Kolon gefärbt durch die PAS-Reaktion sowie Hämatoxylin. Muzine rötlich, Zellkerne blau. 20x .....	20
Abbildung 7 - Repräsentatives Beispiel der Färbung mit anti-MUC2 H-300 in einer Ileum-Probe. Braun zeigt sich das MUC2, die Zellkerne sind mittels Hämatoxylin blau gefärbt. 40x .....	20
Abbildung 8 – Mittels PAS-Reaktion gefärbte Ileum-Probe. Muzine sind rötlich gefärbt, die Zellkerne mittels Hämatoxylin blau. 40x .....	21
Abbildung 9 - Negativkontrolle ohne Applikation des primären Antikörpers anti-MUC2 H-300 in einer Kolon-Probe. 40x .....	22
Abbildung 10 - Negativkontrolle ohne Applikation des primären Antikörpers anti-MUC2 H-300 in einer Ileum-Probe. 40x.....	22
Abbildung 11 - Durchschnittliche Mukusdicke in BDL-, PPVL- und Kontrollmäusen. i bezeichnet die innere Mukusschicht, o die äussere Mukusschicht. Angegeben sind die Mittelwerte mit dem 95 %-Konfidenzintervall. BDL: Bile Duct Ligation (Gallengangligatur), PPVL: Partial Portal Vein Ligation (Partielle Portalvenenligatur), Ctrl: Kontrollgruppe .....	23
Abbildung 12 - Repräsentativer Ausschnitt der Färbung. Grün: Sytox Green, Blau: MUC2, Rot: $\beta$ -Aktin. 40x.....	24
Abbildung 13 – Grüner Bildkanal, Sytox Green. 40x.....	24
Abbildung 14 - Roter Bildkanal, $\beta$ -Aktin. 40x.....	24
Abbildung 15 – Blauer Bildkanal, MUC2 H-300. 40x.....	24
Abbildung 16 - Kochen in Zitrat-Pufferlösung. 40x.....	25
Abbildung 17 - Proteinase K. 40x .....	25
Abbildung 18 – Triton. 40x.....	25

Abbildung 19 - Keine spezifische Färbung der Becherzellen oder der Mukusschicht, Zellkerne blau, Mukus braun. 40x.....	25
Abbildung 20 - Längere Entwicklungszeit mit starker Hintergrundfärbung. 40x.....	25
Abbildung 21 - Färbung des FITC-konjugierten Lektins UEA-I im Kolon einer Maus, FITC-Filter. 40x .....	26
Abbildung 22 - Hochaufgelöste Aufnahme der Mukusschicht im Kolon einer Maus, Färbung mittels Sytox Green (Bakterien, Nuklei). Rechts unten sind die Nuklei der Enterozyten zu erkennen, anschliessend die innere Mukusschicht, welche steril ist, gefolgt von der äusseren Mukusschicht, welche gegen das Lumen hin eine zunehmende Konzentration an Bakterien enthält. 63x, Dekonvolution, Skala 10 µm.....	27
Abbildung 23 - Aufnahme der Mukusschicht im Kolon einer Maus, gefärbt mit Sytox Green (grün) sowie anti-Beta-Aktin (orange). 63x, Skala 20 µm.....	27

## Eigenständigkeitserklärung

---

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäss aus Quellen entnommen wurden, habe ich als solche kenntlich gemacht. Mir ist bekannt, dass andernfalls der Senat gemäss dem Gesetz über die Universität Bern zum Entzug des auf Grund dieser Arbeit verliehenen Titels berechtigt ist.

07. März 2020

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'D. Stutz', with a long, sweeping horizontal stroke extending to the right.

David Stutz