

**Aus der Universitätsklinik für Viszerale
Chirurgie und Medizin, Inselspital Bern**

Direktor:

Prof. Dr. med. Andrew Macpherson

Arbeit unter der Leitung von:

Prof. Dr. med. Reiner Wiest

**Untersuchungen zur bakteriellen
Translokation aus dem murinen
terminalen Ileum bei Leberzirrhose**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der
Humanmedizin der Medizinischen Fakultät der Universität
Bern**

vorgelegt von

David Hanspeter Stutz

von Niederwil, AG

**Von der Medizinischen Fakultät der Universität Bern auf
Antrag der Dissertationskommission als Dissertation
genehmigt.**

Promotionsdatum:

Der Dekan der Medizinischen Fakultät:

Inhaltsverzeichnis

Abstract	5
Einführung	7
Die Gut-Liver-Axis	8
Sekretorische Barriere	9
Epitheliale Barriere	10
Gut associated lymphatic tissue (GALT)	11
Gut-vascular barrier	12
Überwinden der Barrieren bei Leberzirrhose	13
Klinische Bedeutung	15
Fragestellung	17
Hypothesen	18
Zielsetzung	19
Material und Methoden	20
Mäuse und Modelle	20
Gallengangligatur (bile duct ligation, BDL)	20
Partielle Portalvenenligatur (partial portal vein ligation, PPVL)	21
Tetrachlormethan-induzierte Leberzirrhose (carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis, CCL ₄)	22
Intestinaler Loop in vivo	24
GFP- <i>E. coli</i>	24
4 kDa Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran	25
Histologische Untersuchung der Leber und der mesenterialen Lymphknoten	25
Fixation, Entwässern, Einbetten	25
Formen der Paraffinblöcke	26
Schneiden am Mikrotom	26
Färben mittels DAPI	26
Digitalisierung der Proben	27
Quantitative Auswertung	27

ImageStream®-Analyse.....	31
Grundlagen der Durchflusszytometrie.....	31
Grundlagen des ImageStream®	34
Test der Nachweisbarkeit von GFP- <i>E. coli</i> mittels ImageStream®	36
ImageStream® des intestinalen Loops in vivo	37
Statistik	55
Resultate	56
A) Route der Translokation: Detektion von 4 kDa FITC-Dextran bzw. GFP- <i>E. coli</i> in mesenterialen Lymphknoten und der Leber im Ileum-Loop-Experiment	56
1. GFP- <i>E. coli</i>	56
2. 4 kDa FITC-Dextran	58
B) Transport translozierender <i>E. coli</i> aus dem Ileum und involvierte Zellen bei gesunden, portal-hypertensiven und zirrhotischen Mäusen	60
Diskussion	72
A) Route der Translokation.....	73
B) Transport translozierender <i>E. coli</i> und involvierte Zellen	74
1. Physiologischer Zustand	75
2. Chronische portalvenöse Hypertension	75
3. Leberzirrhose	75
Key-Findings	78
Abkürzungsverzeichnis	80
Danksagung	83
Literaturverzeichnis	84
Abbildungsverzeichnis.....	90

Abstract

Background and aims: Pathological bacterial translocation (PBT) is an important factor contributing to multiple complications in liver cirrhosis including spontaneous bacterial infections of which most are caused by Enterobacteriaceae such as *E. coli*. Three main barriers keep bacteria at bay from entry into the host: the secretory compartment consisting of mucus and antimicrobial peptides, the epithelium and the gut-associated lymphatic tissue. However, in liver cirrhosis all three barriers seem dysfunctional subsequently leading to PBT. Whether this translocation happens mainly through the lymphatics or through the portal venous circulation currently remains unclear. It is also not clear which cells phagocytose and transport bacteria from the intestine to mesenteric lymph nodes (mLN) or to the liver, and whether there is also a cell-free passage of bacteria. This study thus aims to characterize a) the primary route of PBT from the ileum and b) the cell-population which carries *E. coli* from the ileum to the mLN.

Methods: Animal models used were as for cirrhosis either bile duct ligation (BDL) or CCL₄-inhalation-induced liver cirrhosis, for pre-hepatic portal hypertension but unaffected liver function portal vein ligation (PPVL).

An intestinal loop technique was utilized with injection of GFP-*E. coli* or 4 kDa FITC-Dextran into terminal ileum of mice and assessing translocation to mLN and/or liver after 1 h of incubation time.

Results: Physiological translocation from the ileum is noted to mLN but not the liver in healthy mice. Chronic portal hypertension did not associate with increased translocation of neither 4 kDa FITC-Dextran nor GFP-*E. coli* to mLN and/or liver as compared to healthy controls. Bacterial translocation to the mLN was significantly increased in liver cirrhosis as compared to portal hypertension alone and healthy control animals. Moreover, as for GFP-*E. coli* translocation to the liver was more abundant than to the mLN in cirrhotic mice. The cellular fraction of mLNs and peyer's patches from BDL mice have more GFP-*E. coli* internalized than those from portal hypertensive mice and healthy controls. Subgroup analysis of GFP-*E. coli* transporting cells shows, that mainly CD11c⁺/CD11b⁻ cells phagocytose GFP-*E. coli* in the peyer's patches and transport them to the mLN. In the supernatant from peyer's patches but not mLNs from BDL mice high amount of free GFP-*E. coli* could be detected, indicating cell-independent passage and translocation through peyer's patches.

Conclusion: Chronic pre-hepatic portal hypertension in absence of liver cirrhosis is not sufficient to induce PBT indicating that mechanisms other than portal pressure cause PBT in

liver cirrhosis. PBT in liver cirrhosis appears dominant via the portal venous route but is likewise present via the lymphatics into mLN. Permeation of *E. coli* from ileal lumen to mLN occurs largely via phagocytosis into CD11b⁺/CD11c⁺ cells but can occur also freely cell-independent in peyer's patches. Whether the latter can be the source for increases in portal-venous translocation into the liver rather than orchestrated cellular transport into mLN deserves further studies.

Einführung

Ein Mensch trägt im Darm rund 100 Billionen Mikroorganismen, wohingegen er selbst aus nur rund 10 Billionen humaner Zellen besteht.¹ Der grösste Teil der Mikroorganismen im Darm sind Bakterien. Diese immense Menge an Bakterien ist für den Menschen, der sie trägt, in verschiedenster Weise wichtig. So verhindern Bakterien, welche an das Ökosystem Darm gut angepasst sind, die Kolonisation mit pathogenen Keimen, welche Infektionen hervorrufen können (Kolonisationsresistenz)^{2,3} und helfen beim Aufschluss und der Aufnahme wichtiger Vitamine wie Thiamin, Riboflavin und Vitamin K und produzieren für den Menschen essenzielle Aminosäuren.⁴⁻⁶ Gewisse Darmbakterien sind in der Lage, durch ihren Stoffwechsel Vitamine herzustellen und den menschlichen Körper damit zu versorgen. Durch den Abbau von unverdaulichen Kohlenhydraten durch mehrere in Serie arbeitende Bakterien werden kurzkettige Fettsäuren gebildet, welche durch Darmepithelzellen aufgenommen und verstoffwechselt werden können.^{5,6} So helfen Darmbakterien mit, die Enterozyten mit Energie zu versorgen. Selbst auf das Körpergewicht scheinen die Darmbakterien bzw. ihre genaue Zusammensetzung einen Einfluss zu haben.^{7,8} Umgekehrt hat aber auch die Nahrungszusammensetzung einen Einfluss auf das Mikrobiom des Darmes.^{8,9} Darmbakterien spielen mitunter eine wichtige Rolle als Modulatoren des menschlichen Immunsystems.¹⁰ Das wichtigste hierbei ist die Aufrechterhaltung einer fein regulierten und balancierten Homöostase, welche Protektion gegen pathogene Bakterien und gleichzeitig Toleranz gegenüber den nützlichen Bakterien gewährleistet. So soll eine Immunreaktion gegen nützliche Bakterien möglichst unterdrückt werden (Toleranz), wohingegen pathogene Bakterien wirkungsvoll bekämpft werden müssen. Eine ungenügende Toleranz des Immunsystems gegenüber nützlichen Darmbakterien kann zu chronischen Entzündungen führen und spielt womöglich bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn eine Rolle.¹¹ Eine ungenügende Abwehr pathogener Bakterien im Gegensatz könnte zu Infektionen führen, insbesondere wenn die Bakterien sich ausbreiten und nicht mehr auf das Lumen des Darmes beschränkt sind.

Die meisten Darmbakterien sind unter Kulturbedingungen nicht anzüchtbar.⁵ Aus diesem Grund war es lange nicht möglich, anzugeben, wie viele verschiedene Spezies zum menschlichen Mikrobiom des Darmes gehören. Mittels 16s rRNA-Sequenzierung ist es heute möglich, die verschiedenen Spezies zu differenzieren.^{5,12} Da die 16S rRNA zwischen den verschiedenen Bakterienspezies hoch konserviert ist, kann sie gut für phylogenetische Analysen herbeigezogen werden. Auf diese Weise erkannte man, dass im menschlichen Darm zwischen einigen hundert bis zu 40'000 verschiedene Bakterien-Spezies vorkommen. Die in der grössten Zahl vorkommenden Bakterien-Phyla sind Firmicutes und Bacteroidetes. Sie machen rund 80 % der Bakterien im Darm aus¹³, wohingegen sich die restlichen 20 %

aus Vertretern der Proteobacteria, Fusobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia und Spirochaetes zusammensetzen.^{13–15}

Verschiedenste endogene und exogene Faktoren haben einen Einfluss auf das Mikrobiom des Darmes. Veränderungen der Ernährung führen relativ rasch zu einer Veränderung der Zusammensetzung der Darmflora.⁹ Aber auch andere exogene Faktoren wie Stress oder Alkoholkonsum können die Zusammensetzung der Darmflora beeinflussen.¹⁶

Veränderungen in der Darmflora können zu Krankheiten führen oder den Verlauf von Erkrankungen beeinflussen.² Sehr gut beschrieben ist dies für Clostridium difficile-Infektionen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass besonders Mäuse mit einem durch den Einsatz von Antibiotika gestörten Darm-Mikrobiom anfällig sind für eine Infektion mit Clostridium difficile.¹⁷ Eine Clostridium difficile-Infektion geschieht klinisch meist auf dem Boden einer vorangegangenen Antibiotikatherapie, bei welcher ein grosser Teil der Darmflora zerstört wurde, was zu einem Ungleichgewicht der verschiedenen Bakterienstämme führt und die Möglichkeiten der Kolonisationsresistenz vermindert. Dies ermöglicht Clostridium difficile das überschüssige Wachstum, welches zur Infektionserkrankung führt.¹⁸ Bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen konnte eine Abnahme von Bacteroidetes und Firmicutes, den beiden Hauptvertretern der Darmflora, sowie eine Zunahme von *Escherichia coli*, welches zu den Proteobacteria gehört, gezeigt werden.¹⁷ Bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen, welche Antibiotika erhalten hatten, zeigten sich stärkere Veränderungen der Darmflora als bei gesunden Personen.¹⁸ Dies könnte darauf hinweisen, dass Antibiotika die zugrunde liegenden Ursachen dieser Erkrankungen verstärken.¹⁶

Die Gut-Liver-Axis

Zwischen dem Darm mit seinen Milliarden von Bakterien und Tausenden von Nähr- und Giftstoffen und dem Körper steht die Leber. Sie hält die hauptsächliche Verantwortung darüber, was aus dem Darm über die Pfortader weiter in die systemische Blutzirkulation gelangt und was detoxifiziert oder metabolisiert wird.¹⁹ Die Leber erhält Nährstoffe, bakterielle Produkte und Toxine sowie Metaboliten aus dem Darm. Sie entfernt mikrobielle Produkte und Toxine sehr effizient aus dem portalvenösen Blut. Entscheidend hierfür ist das retikuloendotheliale System der Leber.²⁰ Dieses besteht aus Sinusendothelzellen, welche verschiedenste Makromoleküle aufnehmen und abbauen können, sowie den Kupffer-Zellen, welche über Komplementrezeptoren und Scavenger-Rezeptoren opsonisierte Bakterien und apoptotische Zellen aus dem Blutstrom entfernen können.²¹

Bakterien tragen auf ihrer Oberfläche Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs).²² Dies sind Struktur motive, welche charakteristisch sind für ein breites Spektrum von

Mikroorganismen. Oftmals sind diese Strukturmoleküle hoch konserviert, weswegen sie vom Immunsystem genutzt werden, um eindringende Bakterien sowie weitere Mikroorganismen zu erkennen. Bei PAMPs kann es sich um Zuckermoleküle, Zellwandkomponenten, Peptide oder auch um Nukleinsäuren handeln.²²⁻²⁴ Das Immunsystem erkennt diese PAMPs über Pattern-recognition receptors (PRRs) und phagozytiert anschliessend das erkannte Pathogen als Teil der angeborenen Immunität.²² Dabei schütten die Zellen des Immunsystems Zytokine aus wie Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin-1 (IL-1) und IL-6.²³ Neben den Pathogen-associated molecular patterns existieren auch Damage-associated molecular patterns (DAMPs), welche bei Zellschädigung ohne eingedrungene Mikroorganismen freigesetzt werden und ebenfalls über Pattern-recognition receptors detektiert werden.²⁵ Entsprechend führen auch sie zu einer Entzündungsreaktion.

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.²⁶ Dieser Prozess findet physiologischerweise statt und führt zu keiner nennenswerten Entzündungsreaktion weder in der Leber noch im Darm. Im Gegensatz dazu findet man im Zustand der Leberzirrhose eine pathologische bakterielle Translokation.²⁷ Diese zeigt ein erhöhtes Mass an Translokation. Bei pathologischer Translokation scheinen die Entzündungszellen in der Leber nicht mehr in der Lage zu sein, die ankommenden PAMPs ohne Ausschüttung von Entzündungsmarkern zu entfernen. Die Immunzellen schütten vermehrt TNF, IL-1 und IL-6 aus.¹⁹ Dieses inflammatorische Milieu führt wiederum zur verstärkten Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffspezies durch Leberzellen, was die ohnehin schon geschädigte Leber weiter schädigt und die Fibrosierung über Aktivierung von hepatischen Sternzellen vorantreibt.^{19,28}

Zum Eindämmen der bakteriellen Translokation im Darm scheinen vier Barrieren vorhanden zu sein:^{27,29}

- Sekretorische Barriere (Mucus, Defensine, sekretorische IgA und weitere)
- Epitheliale Barriere
- "Gut associated lymphatic tissue" (GALT) (darmassoziiertes Immunsystem)
- "Gut-vascular barrier" (Darm-Gefäss-Schranke)

Sekretorische Barriere

Die sekretorische Barriere des Darmes ist die erste Barriere und steht in direktem Kontakt mit den Mikroorganismen der Darmflora. Sie besteht hauptsächlich aus Muzinen, der mengenmässig bedeutendste Vertreter ist das Mucin 2 (MUC2).³⁰ Mucin 2 ist ein Glykoprotein, welches im Golgi-Apparat von Becherzellen stark glykosyliert und anschliessend ins Darmlumen sezerniert wird.³⁰⁻³³ Diese Glykoproteine geben dem Mucus

des Darmes seine Struktur, indem sie grosse Mengen Wasser einlagern. Die Mukusschicht ist im Darm räumlich organisiert. So enthält die innere Schicht Mukus keine Bakterien, währenddem die äussere, lockere Mukus-Schicht von sehr vielen Bakterien besiedelt ist.³⁴ Auf diese Weise führt der Mukus zu einer räumlichen Separation der intestinalen Bakterien vom Epithel. Die sekretorische Barriere enthält verschiedene antimikrobielle Peptide (AMPs) wie α - und β -Defensine, Cathelicidin LL-37 und Lysozyme, wobei die Defensine vermutlich die wichtigste Rolle spielen.^{35,36} Viele dieser antimikrobiellen Peptide, besonders α -Defensine, werden von Paneth-Zellen produziert und bei Kontakt mit Mikroorganismen an Pattern-recognition-receptors sezerniert.³⁷ Die Epithelzellen des Dün- und Dickdarms produzieren β -Defensine.³⁸ De Gottardi et al. konnten in Paneth-Zell-dezimierten Ratten mit experimenteller Leberzirrhose bzw. portaler Hypertension eine verringerte portale Hypertension sowie reduzierte portosystemische Shunts nachweisen verglichen mit Kontrollratten mit normaler Anzahl Paneth-Zellen. Sie folgern daraus, dass Paneth-Zellen nach Kontakt mit Mikroorganismen neben AMPs auch proangiogenetische Signalmoleküle ausschütten und somit einen Einfluss auf die portale Hypertension ausüben können.³⁹ Daneben enthält die sekretorische Barriere viele IgA-Antikörper, welche Bakterien effektiv aggregieren und so die Adhärenz und Kolonisation von pathogenen Bakterien am Epithel verhindern und gleichzeitig die Kolonisation durch kommensale Mikroorganismen begünstigen.^{40,41} Der Mukus verhindert auch mechanischen oder chemischen Schaden am Epithel, indem er einerseits als Schmiermittel wirkt und andererseits aggressive chemische Stoffe vom Epithel fernhält.^{42,43}

Epitheliale Barriere

Das Epithel des Darmes ist ein einschichtiges Zylinderepithel mit Becherzellen. Es besteht zum grössten Teil aus Enterozyten, welche einen apikalen Bürstensaum aus Mikrovilli aufweisen. Diese Mikrovilli sind im Dünndarm länger als im Kolon. Im Dünndarm wird durch Zottenbildung eine Oberflächenvergrösserung erreicht, im Kolon finden sich nur Krypten ohne Zotten. Neben den Enterozyten befinden sich im Darmepithel auch Becherzellen, besonders viele im Kolon. Ihre Hauptfunktion ist die Produktion und Sekretion von Mucinen. Die Enterozyten des Epithels sind untereinander über Tight Junctions verbunden. Diese Verbindungen sind sehr dicht und verhindern den parazellulären Transport von Ionen und Flüssigkeit. Somit können Bakterien bei intaktem Epithel nicht an den Enterozyten vorbei eindringen.^{43,44} Zusätzlich zu den Enterozyten und den Becherzellen finden sich auch endokrine Zellen verstreut in der Mukosa des Dün- und Dickdarmes. Im Ileum sowie im Colon kommen solitäre Lymphfollikel innerhalb der Mukosa vor, diese werden im Ileum Peyer-Patches genannt.⁴³

Gut associated lymphatic tissue (GALT)

Das gut associated lymphatic tissue (GALT, darmassoziiertes Immunsystem) ist das grösste lymphatische Organ des menschlichen Körpers. Es enthält mehr als die Hälfte aller lymphoiden Zellen des Körpers, darunter viele Plasmazellen, Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Paneth-Zellen und M-Zellen.²⁷ Bakterien, welche das Epithel überwunden haben, werden vom GALT aufgrund ihrer PAMPs über pattern recognition receptors (PRR) erkannt. Diese pattern recognition receptors befinden sich sowohl auf der Zelloberfläche und in endosomalen Kompartimenten der Zellen des GALT. Das gut associated lymphatic tissue stellt somit eine weitere Barriere dar, welche eindringende Bakterien und Bakterienbestandteile aufnimmt und an der freien Translokation hindert.⁴³

Das Immunsystem versucht jedoch nicht, Bakterien um jeden Preis ausserhalb des Epithels zu halten. Über verschiedene Wege nimmt es gezielt Mikroorganismen aus dem Darmlumen auf. Einerseits senden dendritische Zellen der Lamina propria ihre Fortsätze zwischen den Enterozyten ins Lumen des Darms und phagozytieren gezielt Bakterien. Andererseits werden Bakterien durch M-Zellen in Peyer-Patches aktiv durch das Epithel geschleust und auf der basalen Seite von antigenpräsentierenden Zellen phagozytiert.⁴⁵ Schlussendlich können Bakterien und bakterielle Produkte aber auch durch beschädigtes Epithel in die Submukosa gelangen.

Die dendritischen Zellen (DCs) der Lamina propria des Darmes setzen sich aus zwei Subgruppen zusammen, CD103⁺/CX3CR1⁻ DCs, welche regulatorische T-Zellen induzieren und CD103⁻/CX3CR1⁺ DCs, welche ähnlich wie Makrophagen TNF produzieren und die Entwicklung von Th1/Th17 T-Zellen anregen.^{46,47} Beide Subgruppen sind CD11c^{hi} und mehrheitlich CD11b⁺/CD8α⁻.⁴⁸ Es konnte gezeigt werden, dass diese CD11c^{hi} DCs transepitheliale Dendriten aussenden.⁴⁹ Im gesunden Zustand werden Bakterien über die dendritischen Zellen bis in die mesenterialen Lymphknoten transportiert und dort zerstört. Dies führt jedoch zu keiner systemischen Immunität.⁴⁵ Wurden die mesenterialen Lymphknoten jedoch chirurgisch entfernt, transportieren die dendritischen Zellen die phagozytierten Bakterien in die Milz, was zu einer spezifischen Immunantwort mit folgender systemischer Immunität führt.⁴⁵

Immunfluoreszenz-Studien in Mäusen zeigen, dass es in den Peyer-Patches drei Populationen von CD11c⁺ dendritischen Zellen (DCs) gibt. CD8α⁺/CD11b⁰ DCs wurden im Bereich der T-Zell-reichen interfollikulären Region der Peyer-Patches gefunden, währenddem CD11b⁺ DCs im Bereich der subepithelialen Dome der Peyer-Patches gefunden wurden und enge Kontakte mit epithelialen M-Zellen aufweisen, welche luminale Antigene aufnehmen. Eine dritte Gruppe an DCs in Peyer-Patches war doppelt negativ, wies also weder CD8α noch CD11b auf.⁵⁰

In den mesenterialen Lymphknoten von Mäusen wurden drei Populationen von dendritischen Zellen beschrieben, eine $CD8\alpha^-/CD11b^+$, eine $CD8\alpha^{int}/CD11b^-$ und eine $CD8\alpha^+/CD11b^-$.⁵¹ Ein Teil der DCs in den mLN ist $CD103^+$ und zeigt phänotypisch eine grosse Ähnlichkeit mit den $CD103^+$ DCs in der Lamina propria.⁴⁷ Die genaue Herkunft der $CD103^+$ DCs in den mLN ist jedoch noch nicht geklärt.⁵²

Milling et al. untersuchten mittels Kanülierung des Ductus thoracicus direkt die migrierenden dendritischen Zellen. Sie entfernten die mesenterialen Lymphknoten, damit die im Ductus thoracicus gesammelte Lymphe äquivalent der afferenten Lymphe ist und somit mehr dendritische Zellen enthält, als wenn die mesenterialen Lymphknoten in situ belassen würden. In ihren Untersuchungen zeigte sich, dass die migrierenden dendritischen Zellen in Mäusen wie auch in Ratten sich in zwei Gruppen aufteilen. Die eine Gruppe ist $CD11c^+/CD11b^+$ und $CD8\alpha^-$, die andere Gruppe ist $CD11c^+/CD11b^-$ und $CD8\alpha^+$. Da die dendritischen Zellen direkt aus der Lymphe entnommen wurden, sind sie per definitionem migratorisch.⁵³

Zurzeit ist es noch unklar, welche Zellen genau bei der pathologischen bakteriellen Translokation im Zustand der Leberzirrhose die Bakterien transportieren.²⁷ Interessant wäre es insbesondere zu wissen, welche der zwei Gruppen an migratorischen dendritischen Zellen die Bakterien bei Leberzirrhose hauptsächlich transportieren oder ob sich die Bakterien auf beide Zellgruppen gleichmässig aufteilen.

Zur Differenzierung verschiedener Zelltypen mittels Durchflusszytometrie werden Oberflächenmarker eingesetzt. Diese werden mittels spezifischer farbstoffgekoppelter Antikörper markiert und so differenziert. Ein gebräuchlicher Oberflächenmarker zur Differenzierung myeloischer Zellen ist Gr-1, welcher auf Granulozyten und Monozyten vorkommt, jedoch nicht auf Makrophagen.⁵⁴ $CD11c$ ist ein relativ spezifischer Marker für dendritische Zellen, jedoch können auch gewisse Makrophagen und Monozyten $CD11c$ exprimieren.⁵⁵ $CD11b$ kann als Marker für alle myeloiden Zellen verwendet werden und wird besonders von Makrophagen und Monozyten exprimiert, sowie auch von adulten natürlichen Killerzellen und $CD103^+$ dendritischen Zellen.⁵⁵

Gut-vascular barrier

Spadoni et al. beschreiben als erste die gut-vascular barrier (GVB, Darm-Gefäss-Schranke), eine Barriere ähnlich der Blut-Hirn-Schranke.²⁹ Nahrungsmittel-Antigene erreichen vom Darm aus die mesenterialen Lymphknoten (mLNs) sowie den Blutstrom, welcher sie zur Leber transportiert. Im Gegensatz dazu erreichen Mikroorganismen aus dem Darm weder die Leber, noch können sie die Milz erreichen, sofern die mLNs nicht entfernt worden sind.^{41,45} Spadoni et al. nehmen folglich an, dass es einen aktiven Mechanismus in den

Endothelzellen des Darmes gibt, welcher den Zugang zum Blutstrom reguliert und den Eintritt von Bakterien verhindert. Untersuchungen mit intravenös injiziertem Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran) zeigten, dass die GVB eine Grössenselektivität aufweist. Sie verhindert bei gesunden Mäusen den Durchtritt von FITC-Dextran mit 70 kDa (Kilodalton) Molekülmasse, erlaubt jedoch den Durchtritt von FITC-Dextran mit 4 kDa Molekülmasse. Eine Infektion mit *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* führte zum Durchtritt von 70 kDa FITC-Dextran durch die Gefässwände. Aus weiteren Experimenten folgern sie, dass die Permeabilität der GVB abhängig ist vom β -Catenin-Signalweg, welcher die Permeabilität mindert und den Durchtritt von Bakterien und grösseren Molekülen durch die Endothelzellen verhindert. *Salmonella Typhimurium* kann mithilfe des salmonella pathogenicity island 2 (Spi2) den β -Catenin-Signalweg in Endothelzellen des Darmes hemmen und die GVB so durchlässiger machen. Dies erlaubt schlussendlich die systemische Dissemination von *Salmonella Typhimurium* nach oraler Infektion.²⁹

Überwinden der Barrieren bei Leberzirrhose

Die Leberzirrhose ist Endpunkt verschiedenster Erkrankungen. Sie ist definiert als das Vorhandensein von übermässiger Fibrose und in der Folge entstehenden Regeneratknoten aus Hepatozyten.²¹ Die Leberzirrhose entwickelt sich über die Leberfibrose durch eine chronische Entzündungsreaktion, welche zur Aktivierung von hepatischen Sternzellen führt. Diese aktivierten Sternzellen beginnen Bindegewebe zu produzieren, welches den Disse-Raum auffüllt und die Blutzirkulation in den Sinusoiden der Leber einschränkt. Diese Einschränkung des Blutflusses führt zu einer Druckerhöhung in der Vena portae und reduziert den Stoffaustausch zwischen portalem Blut und den Hepatozyten.²¹ Gleichzeitig geschieht bei der Leberzirrhose auch eine Vasodilatation im Splanchnicusgebiet, welche den Blutfluss über die Vena portae und somit auch den Druck weiter erhöht. Diese Vasodilatation findet im gesamten Körper statt, was den arteriellen Blutdruck senkt und das Herzminutenvolumen ansteigen lässt. Die Ursachen hierfür sind vermutlich einerseits zu hohe Konzentrationen an systemischen Vasodilatoren (proinflammatorische Zytokine und NO), welche im Rahmen der Entzündungsantwort bei der pathologischen bakteriellen Translokation ausgeschüttet werden⁵⁶ und andererseits eine verminderte Reaktion der Gefässe auf Vasokonstriktoren.^{57,58}

Es wurden verschiedenste Mechanismen vorgeschlagen, um zu erklären, wie Bakterien aus dem Darm die verschiedenen beschriebenen Barrieren überwinden können und schlussendlich zu pathologischer bakterieller Translokation führen können. Diese wiederum hat einen direkten Einfluss auf die Leber, da die Bakterien und Bakterienbestandteile wie auch die Zytokine, welche vom darmassoziierten Immunsystem produziert werden, wenn Mikroorganismen das Epithel in übermässigem Rahmen überschreiten, die hepatischen

Sternzellen und Kupffer-Zellen aktivieren können. Dies treibt die Prozesse der Entzündung, Fibrogenese und Karzinogenese in der Leber an.⁵⁹ Neuere Untersuchungen zeigen entsprechend eine Korrelation zwischen den Entzündungsparametern im Blut von Patienten mit Leberfibrose und dem Grad der Leberfibrose.⁶⁰ Andererseits können diese translozierenden Bakterien zu Infektionen führen, wie beispielsweise einer spontanen bakteriellen Peritonitis.¹⁹

Ein erster Schritt, um Zugang zum Epithel zu erhalten, ist die Penetration der ansonsten sterilen inneren Mukus-Schicht. Dies kann erleichtert werden, wenn die in die innere Mukus-Schicht eingelagerten antimikrobiellen Substanzen (AMPs wie Defensine, Lysozym), welche vom Epithel und von Paneth-Zellen produziert werden, in zu geringer Konzentration vorliegen. Auch eine verringerte Produktion von Mukus könnte dazu führen, dass diese erste Barriere des Epithels durchgängig wird und die Bakterien Kontakt mit dem Epithel herstellen können.

Die Enterozyten des Darmepithels sind untereinander mittels Tight Junctions verbunden. Diese limitieren den parazellulären Transport von Stoffen auf solche, die eine Molekülmasse von weniger als 2 kDa aufweisen.²⁷ Somit sind Bakterien und Makromoleküle wie Lipopolysaccharide nicht fähig, unter normalen Bedingungen parazellulär durchs Epithel zu gelangen. Die Funktion der Tight Junctions ist dynamisch und wird von Signalmolekülen wie der Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK) reguliert.⁶¹ Studien in Mäusen mit cholestatischer Lebererkrankung (bile duct ligation, BDL) zeigen eine erhöhte MLCK-Aktivierung mit entsprechend erhöhter Durchlässigkeit der Tight Junctions.⁶² Dies könnte zu Bereichen in der Mukosa führen, in denen Bakterien parazellulär durchs Epithel gelangen könnten. Vermutlich viel wichtiger als die parazelluläre Route ist die transzelluläre Route. Besonders für *E. coli* konnte gezeigt werden, dass der transzelluläre Transport durch Enterozyten unabhängig von Veränderungen der parazellulären Permeabilität vorkommt.⁶³ Gerade Epithelzellen unter Stress transportieren Bakterien vermehrt transzellulär aus dem Lumen in die Lamina propria.⁶⁴

In die Lamina propria eindringende Bakterien werden normalerweise von Monozyten und Granulozyten des GALT phagozytiert, ohne dass grössere Mengen an Entzündungsmediatoren ausgeschüttet werden.^{26,65} Wenn nun aber zu viele Bakterien die Lamina propria erreichen, wie dies bei beeinträchtigtem Mukus bzw. Epithel der Fall sein kann, werden vermehrt Monozyten in die Lamina propria rekrutiert. Es konnte gezeigt werden, dass mehr Monozyten in der Lamina propria zu mehr TNF-Freisetzung (Tumornekrosefaktor) führen.^{61,62} Dies führt zu verminderter Expression von Tight Junction-Proteinen und aktiviert die Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK), was die Durchlässigkeit der Tight Junctions wiederum erhöht.⁶¹ Auf diese Weise führen infiltrierende Monozyten zu

einer verstärkten Durchlässigkeit des Epithels, was wiederum die Rekrutierung von Monozyten fördert.⁶²

Die Phagozytose von Bakterien führt nicht zwangsläufig zur Zerstörung der phagozytierten Bakterien.⁴⁵ Gerade bei fortgeschrittener Leberzirrhose zeigte sich, dass die angeborene Immunantwort in der Lamina propria des Darmes nur eingeschränkt funktioniert. Dies äussert sich in einer verminderten Fähigkeit mononukleärer Zellen zur Phagozytose und dem Abtöten von Bakterien.^{66,67}

Welche Mechanismen die «Gut-Vascular-Barrier» beeinträchtigen, ist zurzeit noch nicht klar. Es muss angenommen werden, dass Veränderungen im Wnt/ β -Catenin-Signalweg einen Einfluss auf die Durchlässigkeit der «Gut-Vascular-Barrier» haben. Wie sich dies im Rahmen der Leberzirrhose oder der portalen Hypertension darstellt ist Gegenstand aktueller Forschung. Ein Zusammenhang zwischen der Störung der «Gut-Vascular-Barrier» und der Weiterentwicklung einer nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (NAFLD) in eine nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) konnte kürzlich nachgewiesen werden.⁶⁸

Die Translokation von Bakterien ist grundsätzlich abhängig von der Schwere der Lebererkrankung.²⁷ Es ist anzunehmen, dass die Schwere der Lebererkrankung den grösseren Einfluss auf die pathologische Translokation von Bakterien hat, da in Tiermodellen, welche Leberinsuffizienz ohne portale Hypertension entwickeln, häufiger bakterielle Translokation nachgewiesen werden konnte als in Tiermodellen, welche portale Hypertension ohne Leberinsuffizienz entwickeln.⁶⁹

Klinische Bedeutung

Bei Patienten mit einer Leberzirrhose ist das Risiko, eine bakterielle Infektion zu entwickeln, stark erhöht gegenüber Patienten ohne Leberzirrhose.⁷⁰ Die Prävalenz bakterieller Infektionen bei hospitalisierten Patienten mit Leberzirrhose beträgt laut Caly et al. 47 %. Die häufigsten Infektionen dabei sind spontane bakterielle Peritonitis mit einer Prävalenz von 31 %, Infekte der ableitenden Harnwege mit 25 % und Pneumonie mit 21 %. In 72 % der Fälle fanden sich gramnegative Bakterien am Infektionsfokus. In der Gruppe der Patienten mit einer bakteriellen Infektion lag die Mortalität bei 30 %, währenddem sie in der Gruppe ohne bakterielle Infektion bei 5,5 % lag. Neuere Daten einer prospektiven Studie von Fernández et al. zeigen, dass die Inzidenz bakterieller Infektionen bei Patienten mit Leberzirrhose bei Spitaleintritt oder während der Hospitalisation rund 25-35 % beträgt. Die Studie zeigt weiter, dass die Infektionen mit grampositiven Bakterien zugenommen haben und aktuell (2002) rund 53 % der Infektionen bei Patienten mit Leberzirrhose ausmachen. Sie versuchen diese Veränderung gegenüber der Studie von Caly et al. damit zu begründen, dass Patienten mit Leberzirrhose zunehmend mehr mit invasiven Methoden überwacht und therapiert werden.⁷¹

Heute sind bakterielle Infektionen bei Patienten mit Leberzirrhose eine der häufigsten Ursachen für die Hospitalisation.⁷² Die häufigsten Infektionen sind spontane bakterielle Peritonitis und Infekte der ableitenden Harnwege, gefolgt von Pneumonie, Haut- und Bindegewebe-Infektionen sowie Bakteriämie.⁷¹ Risikofaktoren für Infektionen sind schlechte Leberfunktion, Varizenblutung, tiefe Konzentration von Protein im Aszites, vorhergehende spontane bakterielle Peritonitis sowie Hospitalisation. Bakterielle Infektionen erhöhen die Mortalität bei Patienten mit dekompensierter Leberzirrhose um den Faktor 3.75, was zu einer 1-Jahres-Mortalität von 63 % führt.⁷³ Die Mehrzahl bakterieller Infektionen bei Zirrhose werden durch Enterobakterien und Streptokokken hervorgerufen. Zur Prävention von Infektionen bei Leberzirrhose werden deshalb β -Lactame und Chinolone eingesetzt.^{72,74} Dies zusammen mit vermehrt invasiven Methoden, die bei Patienten mit Leberzirrhose eingesetzt werden, verändert die Epidemiologie bakterieller Infektionen bei Leberzirrhose.⁷²

Bakterielle Infektionen sind des Weiteren eine häufige Ursache für die Dekompensation einer Leberzirrhose.⁷⁴ Hierbei gibt es zwei grosse Gruppen von Patienten. Diejenigen mit dekompensierter Zirrhose ohne zusätzliche neu aufgetretene Organinsuffizienz und diejenigen mit dekompensierter Zirrhose und zusätzlich neu aufgetretener Organinsuffizienz (acute-on-chronic liver failure, ACLF). Gerade Patienten mit bakterieller Infektion und ACLF haben ein hohes Mortalitätsrisiko.⁷⁵ Es ist auch bekannt, dass bakterielle Infektionen bei Leberzirrhose Trigger sind für die Entwicklung einer Niereninsuffizienz. Diese wiederum erhöht das Mortalitätsrisiko und Komplikationsrisiko vor und nach Lebertransplantation.⁵⁸ Selbst die hepatische Enzephalopathie kann durch bakterielle Infektionen getriggert werden, wobei die genauen Mechanismen noch unklar sind.⁷⁶

Fragestellung

Trotz zunehmender Forschung im Bereich der bakteriellen Translokation sind aktuell noch viele Fragen unbeantwortet.

Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass eine physiologische Translokation von Bakterienteilen und bakterieller DNA aus dem Darm in die mesenterialen Lymphknoten besteht.^{26,27} Ebenfalls konnten im Zustand der dekompensierten Leberzirrhose positive Bakterienkulturen aus portalvenösem Blut entnommen werden.⁷⁷ Dies deutet darauf hin, dass die Translokation von Bakterien bei dekompensierter Leberzirrhose auch über die hämatogene Route führt. Unklar ist aktuell,

- a) ob die lymphatische oder die portalvenöse Route diejenige ist, über welche sich der Hauptteil der Translokation bei Leberzirrhose vollzieht und
- b) welche Subpopulation der mononukleären Zellen für den Transport pathologisch translozierender *E. coli* aus dem terminalen Ileum in die mesenterialen Lymphknoten primär verantwortlich ist.

Milling et al. wiesen nach, dass es zwei primäre Gruppen von über die Lymphe migrierenden dendritischen Zellen aus dem Intestinum gibt. Eine ist CD11c⁺/CD11b⁺ und CD8α⁻, die andere ist CD11c⁺/CD11b⁻ und CD8α⁺.⁵³ Was jedoch noch unklar bleibt, ist, welche dieser beiden Gruppen die translozierenden *E. coli* in sich trägt. Man könnte argumentieren, dass es die CD11c⁺/CD11b⁺ Gruppe sein müsste, da diese in den Immunfluoreszenzstudien in räumlicher Nähe zu den M-Zellen gefunden wurden, welche bekanntlich Antigene aus dem Darmlumen aufnehmen.⁵³ Jedoch sind die genauen Wege, wie *E. coli* bei dekompensierter Leberzirrhose die Darmwand überschreitet noch nicht eingehend geklärt.²⁷ Somit könnte bei dekompensierter Leberzirrhose auch ein parazellulärer Transport von *E. coli* über das Darmepithel vorherrschend sein.

Weiter ist unklar, ob die Translokation von *E. coli* sowohl im Gesunden, bei portalvenöser Hypertension und bei dekompensierter Leberzirrhose über die gleiche Zellgruppe geschieht oder ob sich die Zellgruppe, welche in diesen Zuständen hauptsächlich die *E. coli* aus den Peyer-Patches in die mesenterialen Lymphknoten transportiert, unterscheidet. Ebenfalls ist nicht vollständig geklärt, ob der Transport der *E. coli* von den Peyer-Patches des Ileums bis in die mesenterialen Lymphknoten in allen Fällen zellgebunden geschieht oder ob in gewissen Krankheitssituationen eine Translokation freier *E. coli* vorhanden ist.

Hypothesen

A) Route der Translokation aus dem Ileum bei gesunden, portal-hypertensiven und zirrhotischen Mäusen:

1. Im Gesunden findet physiologischerweise eine Translokation von 4 kDa FITC-Dextran sowie gelegentlich von *E. coli* aus dem Ileum zu den mesenterialen Lymphknoten, nicht jedoch in die Leber, statt.
2. Bei chronischer portalvenöser Hypertension ist die Translokation von 4 kDa FITC-Dextran und von *E. coli* aus dem Ileum zu den mesenterialen Lymphknoten nicht erhöht und eine Translokation in die Leber ist ebenfalls von unbedeutender Quantität.
3. Bei Leberzirrhose jedoch ist die Translokation von 4 kDa FITC-Dextran sowie *E. coli* aus dem Ileum zu den mesenterialen Lymphknoten und der Leber pathologisch erhöht, die primäre Route der Translokation ist die lymphatische.

B) Transport translozierender *E. coli* aus dem Ileum und involvierte Zellen bei gesunden, portal-hypertensiven und zirrhotischen Mäusen:

1. Physiologischerweise phagozytieren dendritische Zellen *E. coli* in den Peyer-Patches des Ileums und transportieren diese *E. coli* in die mesenterialen Lymphknoten.
2. Bei chronischer portalvenöser Hypertension phagozytieren dendritische Zellen *E. coli* in den Peyer-Patches des Ileums und transportieren diese *E. coli* in die mesenterialen Lymphknoten. Die Menge an translozierenden *E. coli* ist identisch mit dem physiologischen Zustand.
3. Bei Leberzirrhose phagozytieren dendritische Zellen *E. coli* in den Peyer-Patches des Ileums und transportieren diese *E. coli* in die mesenterialen Lymphknoten. Zusätzlich finden sich *E. coli* «frei», nicht intrazellulär/phagozytiert, in den Peyer-Patches, da die phagozytotische Funktion der mononukleären Zellen bei Leberzirrhose eingeschränkt und die Menge an translozierenden *E. coli* pathologisch gesteigert ist.⁶⁷ Die Menge an translozierenden *E. coli* ist erhöht, verglichen mit dem physiologischen Zustand und demjenigen der chronischen portalvenösen Hypertension.

Zielsetzung

- A) Definieren der primären Route der Translokation für 4 kDa FITC-Dextran sowie *E. coli* aus dem terminalen Ileum im Gesunden, bei chronischer portalvenöser Hypertension sowie bei Leberzirrhose.

- B) Charakterisieren und Quantifizieren der Subpopulation der mononukleären Zellen, welche die Translokation von *E. coli* aus dem terminalen Ileum in die mesenterialen Lymphknoten vermittelt.

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.⁷⁸ Sie wurden in der Central Animal Facility der Universität Bern unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen (SPF, specific pathogen-free) gehalten. Dies bedeutet, dass die Mäuse auf bestimmte vordefinierte Krankheitserreger, opportunistische Krankheitserreger und Kommensalen untersucht werden, welche sie nicht aufweisen sollen. Die vollständige Liste der gesuchten Mikroorganismen und Viren findet sich hier.^a 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)

Das Ziel der Gallengangligatur (bile duct ligation) ist es, den Fluss der Galle aus der Leber in den Dünndarm zu stoppen. Dazu wird der Ductus choledochus mittels eines Fadens ligiert und der Gallefluss folglich gestoppt. Dies führt abhängig von der Dauer der Obstruktion des Gallenganges zu verschiedenen Zuständen. Kurz nach der Ligatur fehlt die Galle in Dünn- und Dickdarm und staut sich im Gallenwegsystem der Leber an. Im Verlauf von zehn Tagen nach Ligatur entwickelt sich eine portalvenöse Hypertension bei einer noch nicht zirrhotischen Leber. Innerhalb von drei bis sechs Wochen nach Ligatur entwickelt sich aufgrund der durch die Cholestase entstehenden Entzündung eine zunehmende Leberfibrose, welche im Verlauf dieser drei bis sechs Wochen in eine Leberzirrhose fortschreitet.⁷⁹ Die Experimente wurden jeweils zwei Wochen nach Gallengangligatur durchgeführt, somit hat sich noch keine Leberzirrhose ausgebildet, jedoch ein cholestatischer Zustand mit beginnender Leberfibrose und portalvenöser Hypertension.

Für die Gallengangligatur wurde die Maus in steriler Umgebung auf eine Wärmeplatte bei 37 °C gelegt und die Anästhesie mittels Isofluran (isocare 100 % w/v, Animalcare Ltd, York, UK) gestartet, bis keine Reaktion mehr auf Schmerzstimuli erfolgte. Anschliessend wurde das Abdomen rasiert, desinfiziert und Buprenorphin 60 µg/kg Körpergewicht intraabdominal injiziert. Nun 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. Nun erfolgte unter dem Operationsmikroskop bei 16-facher Vergrößerung die Visualisierung des Leberhilus und darin des Gallenganges. Dieser

^a <https://david-stutz.ch/dissertation/>

wurde stumpf frei präpariert 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 reseziert. 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 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 Hypertension losgelöst von der Lebererkrankung untersucht werden kann. Dies erlaubt die Differenzierung der Auswirkungen der Leberzirrhose von denjenigen der portalvenösen Hypertension, welche konsekutiv durch die Leberzirrhose ausgelöst wird. Nach PPVL steigt der portalvenöse Druck schnell an und erreicht am Tag zwei bis vier nach der Operation den höchsten Wert. Anschliessend bleibt er über die nächsten zwei Wochen pathologisch erhöht, nimmt mit der Zeit aber langsam ab. PPVL-Mäuse entwickeln keine Fibrose oder Zirrhose, die Leber bleibt normal.⁸⁰

Wir nutzten im Grunde die Methode, welche von Chojkier und Groszmann 1980 bei Ratten beschrieben worden war.⁸¹ Für die partielle Portalvenenligatur wurde die Maus in steriler Umgebung auf eine Wärmeplatte bei 37 °C gelegt und die Anästhesie mittels Isofluran (isocare 100 % w/v, Animalcare Ltd, York, UK) gestartet, bis keine Reaktion mehr auf Schmerzstimuli erfolgte. Anschliessend wurde das Abdomen rasiert, desinfiziert und Buprenorphin 60 µg/kg Körpergewicht intraabdominal injiziert. Nun 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. Nun erfolgte die Visualisierung des Leberhilus und die Identifizierung der Vena portae, welche stumpf freipräpariert wurde. Nun wurde eine 20 Gauge Nadel parallel zur Vena portae gelegt und ein 3-0 nicht resorbierbarer Faden um die Nadel und die Vena portae geknotet.⁸² Dabei wurde darauf geachtet, die Vena portae beim Knoten des Fadens nicht zu verletzen. Im Anschluss wurde die Nadel entfernt und die Vena portae konnte sich auf die normierte Grösse ausdehnen. 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 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 Teil-Ligatur um die Vena portae.

Tetrachlormethan-induzierte Leberzirrhose (carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis, CCL₄)

Bei der Tetrachlormethan-induzierten Leberzirrhose wird Tetrachlormethan über die Atemluft appliziert. Dieses wird intrahepatisch via Cytochrom P450 in Trichlormethyl (CCL₃) umgebaut und schädigt als freies Radikal die Leberzellen direkt. Um die toxische Wirkung von CCL₄ auf die Leber zu verstärken, wird dem Trinkwasser der Mäuse Phenobarbital (0,3 g/l) beigemischt. Dies ist ein Induktor von Cytochrom P450, was dann zu einer verstärkten Metabolisierung von CCL₄ zu CCL₃ führt und den Leberschaden verstärkt. Nach 12 bis 16 Wochen CCL₄-Inhalation entwickeln die Mäuse eine mikronoduläre Zirrhose, portalvenöse Hypertension mit portosystemischen Shunts sowie einen hyperdynamischen zirkulatorischen Zustand (hyperdynamic circulatory state, HCS).⁸³⁻⁸⁵ Die Experimente wurden jeweils nach 16 Wochen CCL₄-Inhalationen durchgeführt.

In einem ersten Schritt wurde dem Trinkwasser der Mäuse Phenobarbital in der Konzentration 0,3 g/l zugesetzt. Nach einer Woche wurden die CCL₄-Inhalationen gestartet. Die Mäuse wurden drei Mal pro Woche in eine Gaskammer gesetzt. Es wurde Druckluft durch eine Flasche mit CCL₄ geblasen, dass sich die Luft mit CCL₄ anreichert und diese anschliessend über einen Durchflussmesser in die Gaskammer geleitet. Der Luftfluss wurde auf 2 l/min justiert. Anschliessend konnten die Mäuse Frischluft atmen, welche direkt in die Gaskammer eingeblasen wurde. In der ersten Woche des Experimentes atmeten die Mäuse jeweils eine Minute lang CCL₄-angereicherte Luft ein, in der zweiten Woche 1,5 Minuten und anschliessend 2 Minuten über den Rest des Experimentes. Im Verlaufe des Experimentes wurde die Anzahl der Inhalationen in der Gaskammer wie folgt gesteigert: In den ersten 3 Wochen wurde jede Woche 3 Mal 1 Inhalationszyklus durchgeführt wie oben beschrieben, in der 4. Woche wurden 3 Mal 2 Inhalationszyklen durchgeführt (mit 10 Minuten Pause in Raumluft zwischen den Inhalationszyklen) und in den folgenden Wochen jeweils 3 Mal 3 Inhalationszyklen (mit jeweils 10 Minuten Pause in Raumluft zwischen den Inhalationszyklen).^{85,86} Diese CCL₄-Inhalationen wurden für die Dauer von 16 Wochen durchgeführt. Die Kontroll-Mäuse erhielten keine CCL₄-Inhalationen.

Tabelle 1 – Vergleich der Tiermodelle

Modell	Zeit	Leberzirrhose	Portalvenöse Hypertension	Intestinale Galle
Tetrachlormethan-induzierte Leberzirrhose (CCL₄)	16 Wochen	Ja	Ja	Reduziert
Partielle Portalvenenligatur (PPVL)	2 Wochen	Nein	Ja	Normal
Gallengangligatur (BDL)	3 Tage	Nein	Nein	Nicht vorhanden
	2 Wochen	Nein	Ja	Nicht vorhanden
	> 4 Wochen	Ja	Ja	Nicht vorhanden

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die verschiedenen verwendeten Modelle, die Zeit vom Beginn des Experimentes bis zum Töten der Maus, ob eine Leberzirrhose und/oder eine portalvenöse Hypertension innerhalb dieser Zeit auftritt und ob bei diesem Modell intestinale Galle vorhanden ist oder nicht.^{80,86} Die Mäuse nach PPVL entwickeln eine reine portalvenöse Hypertension bei unbeeinträchtigter Leber, währenddem Mäuse nach BDL zusätzlich zur portalvenösen Hypertension einen beginnenden cholestatischen Leberschaden mit Entzündung aufweisen. Zusätzlich fehlt nach BDL die Galle im Darm. Nach 16 Wochen CCL₄-Inhalationen weisen diese Mäuse eine mikronodulare Leberzirrhose mit portalvenöser Hypertension auf.

Intestinaler Loop in vivo

Die Mäuse wurden mittels Isofluran (isocare 100 % w/v, Animalcare Ltd, York, UK) anästhesiert bis keine Reaktion mehr auf Schmerzstimuli erfolgte. Zum Temperaturerhalt lagen die Mäuse auf einer 37 °C warmen Wärmeplatte. Auf eine rektale Temperaturmessung wurde verzichtet, um den Darm nicht zu irritieren. Anschliessend wurde das Abdomen mittels Ethanol 70 % (Alcosuisse, Schweiz) desinfiziert, durch eine Mittellinien-Laparotomie eröffnet und das Peritoneum entlang der Linea alba durchtrennt. Nach dem Zurückschlagen des Omentum majus wurde das terminale Ileum identifiziert. Nun wurde eine Ligatur am aboralen Ende gesetzt, rund 1 cm vom Caecum entfernt. Anschliessend wurde eine zweite Ligatur 1 cm oral der ersten Ligatur gesetzt (Vicryl 6-0, Ethicon, Johnson & Johnson, Spreitenbach, Schweiz). In das so ligierte 1 cm lange Stück terminales Ileum wurden nun 8 mg 4 kDa Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran) (Sigma-Aldrich) oder 10^5 koloniebildende Einheiten (CFU) GFP-*E. coli* über eine feine Nadel (Omnican 50, B. Braun, Meisungen) injiziert, jeweils aufgelöst in 200 µl NaCl 0,9 %. Nach erfolgter Injektion wurde das Wundgebiet mittels feuchter Gazetupfer abgedeckt. Eine Stunde nach der Injektion wurde Blut retrobulbär entnommen und die Mäuse mittels kraniozervikaler Dislokation euthanasiert. Anschliessend wurden Leber, mesenteriale Lymphknoten (mLN), Milz und der intestinale Loop entnommen. Leber und Milz wurden in Methanol-Carnoy-Lösung fixiert. Aus dem intestinalen Loop wurden die Peyer-Patches mittels einer Schere entnommen und zweimalig in Isocove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Thermo Fisher Scientific) gewaschen, um eine allfällige mechanische Kontamination mit GFP-*E. coli* aus dem ligierten Darmabschnitt zu entfernen. Die mesenterialen Lymphknoten (mLN) wurden ebenfalls in IMDM gegeben.

GFP-*E. coli*

Für das Experiment wurde der *E. coli*-Stamm K-12 MG1655 verwendet. Dieser hat grosse Ähnlichkeit mit Wildtyp *E. coli*-Stämmen und weist nur minimale genetische Veränderungen auf.^{87,88} Es wurde bewusst kein stärker pathogener *E. coli*-Stamm verwendet, da mit diesem Stamm eher Aussagen über das Verhalten der normalerweise im menschlichen oder tierischen Darm anzutreffenden *E. coli* gemacht werden können.⁸⁹ Der *E. coli*-Stamm wurde mittels des Plasmides pGLO (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) transformiert. Dieses Plasmid enthält das Gen für grün fluoreszierendes Protein (GFP) der Qualle *Aequorea victoria*, das Gen *Bla*, welches für eine Beta-Laktamase codiert, sowie *araC*, eine Promoter-Region, welche die Expression von GFP bei Vorhandensein von Arabinose induziert. Die Beta-Laktamase gibt den transformierten Bakterien eine Resistenz gegen Beta-Laktam-Antibiotika wie Ampicillin. Wenn ein Bakterium das Plasmid verliert, verliert es auch die Resistenz gegen Ampicillin.

Die GFP-*E. coli* wurden im Labor bereits mehrfach verwendet und wurden für jede Anwendung neu aus einem bei -70 °C tiefgekühlten Vorrat kultiviert. Dazu wurden einige tiefgefrorene Bakterien in ein Nährmedium bestehend aus 30 ml LB-Medium mit 0,1 µg/ml Ampicillin übertragen und über Nacht bei 37 °C und 220 Umdrehungen pro Minute auf dem Rütteltisch inkubiert. Aus bisherigen Experimenten im Labor ist bekannt, dass bei Inkubation über Nacht die *E. coli* auf diese Art eine Konzentration von ca. $5 \cdot 10^4$ CFU/100 µl (koloniebildende Einheiten, colony forming units) erreichen. Am Folgetag wurde das Nährmedium bei 4'000 rpm (Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in PBS-Lösung (phosphatgepufferte Salzlösung, phosphate-buffered saline) aufgelöst. Die so entstandene GFP-*E. coli*-Suspension wurde auf Eis gestellt und gleichentags in den intestinalen Loop injiziert.

4 kDa Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran

Verwendet wurde Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran) mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 4'000 Dalton (Sigma-Aldrich, Katalog-Nr. 60842-46-8, Missouri, USA). Dabei handelt es sich um Dextran mit einem definierten Molekulargewicht, welches mittels Fluorescein-Isothiocyanat fluoreszenzmarkiert ist. Experimente in unserem Labor zeigten, dass FITC-Dextran mit einem Molekulargewicht von 4 kDa in gesunden Mäusen die Leber nicht erreicht, bei Leberzirrhose jedoch erreicht 4 kDa FITC-Dextran die Leber.⁸⁶ Die von Spadoni et al. beschriebene Darm-Gefäss-Schranke zeigt eine Grössenselektivität. Sie lässt 4 kDa FITC-Dextran frei über die Endothelzellen passieren, unterbindet aber den Transport von 70 kDa FITC-Dextran.²⁹ Intaktes Darmepithel lässt Moleküle von mehr als 2 kDa nicht frei passieren.²⁷

Histologische Untersuchung der Leber und der mesenterialen Lymphknoten

Fixation, Entwässern, Einbetten

Die entnommenen Proben wurden für 24 Stunden in Methanol-Carnoy-Lösung bei Raumtemperatur fixiert. Anschliessend wurden sie zweimal in wasserfreiem Methanol für je 30 Minuten, zweimal in 100 % Ethanol für je 20 Minuten und zweimal in 100 % Xylol für je 15 Minuten gewaschen. Nun wurden die Proben in Paraffin (TEK III Processing and Embedding Wax, Sakura Finetek Europe B.V.) gelegt und bei 60 °C während 24 Stunden eingebettet.

Methanol-Carnoy-Lösung:

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

Formen der Paraffinblöcke

Die nun mit Paraffin gesättigten Proben wurden aus dem flüssigen Paraffin entnommen und in eine vorgewärmte Form gelegt. Dann wurde flüssiges Paraffin zugegeben, bis die Form voll war. Jetzt wurde die gefüllte Form auf eine Kühlplatte gelegt, wo das Paraffin erstarrte und so die Probe räumlich fixierte. Für diese Arbeit wurde das Shandon Histocentre 3 der Thermo Electron Corporation verwendet. Die erstarrten Paraffinblöcke wurden bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert.

Schneiden am Mikrotom

Die in Paraffin eingebetteten Proben wurden nun in 5 µm dicke Scheiben geschnitten. Die Paraffinblöcke wurden dazu erst im Kühlschrank auf einer Aluminiumplatte gekühlt mit der Schnittfläche nach unten. Anschliessend wurden die Blöcke ins Mikrotom HM355S von Fisher Scientific eingespannt und mit 20 µm angeschnitten, bis das Gewebe mitgeschnitten wurde. Nun wurden die Blöcke erneut im Kühlschrank gekühlt, da beim Schneiden lokal Wärme freigesetzt wird und das Paraffin weich wird, was das Schneidergebnis verschlechtert. Nach erneutem Abkühlen des Blockes wurde dieser wieder eingespannt und es wurden jeweils ein bis drei Schnitte von 5 µm Dicke gemacht, welche auf ein Wasserbad übertragen wurden (37 °C, vollentsalztes Wasser). Es wurden jeweils zwei bis drei auf dem Wasser schwimmende Schnitte auf einen Objektträger aufgezogen (Menzel-Gläser Superfrost® Plus, Thermo Scientific, Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig, Deutschland). Überschüssiges Wasser zwischen Paraffinschnitt und dem Objektträger wurde entfernt und die Objektträger mit den Proben in einem Rack bei 37 °C im Ofen während 48 Stunden getrocknet. Die Temperatur im Ofen wurde mit einem Thermometer überwacht. Die maximal gemessene Temperatur am gleichen Ort, wie die Objektträger trockneten, betrug 39,0 °C. Die Gewebeschnitte wurden wo immer möglich im Dunkeln verarbeitet, damit das darin vorhandene GFP bzw. FITC nicht ausbleicht.

Von jedem Block (mLN sowie Leber) wurde ein Objektträger angefertigt mit zwei bis drei Schnitten darauf. Die getrockneten Schnitte wurden bei 4 °C im Dunkeln gelagert, die Paraffinblöcke bei Raumtemperatur im Dunkeln.

Färben mittels DAPI

Die Gewebeschnitte auf den Objektträgern wurden nun mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) gefärbt, das Vorgehen ist unten beschrieben. DAPI ist ein DNA-Färbestoff, welcher die Nuklei der Zellen sichtbar macht, indem es sich in AT-reiche Regionen der DNA einlagert.⁹⁰

Die Gewebeschnitte wurden in Xylol entparaffiniert und anschliessend in einer absteigenden Alkoholreihe hydriert (100 %, 90 %, 70 %, 50 % Ethanol in vollentsalztem Wasser) und zum

Schluss in TBS-Puffer (Tris-buffered saline) gewaschen. Anschliessend wurden 300 µl DAPI mit einer Konzentration von 1 µg/ml in TBS-Puffer auf die Objektträger aufgetragen und für 60 Sekunden belassen. Danach wurden die Gewebeschnitte wieder in TBS-Puffer gewaschen, um nicht gebundenes DAPI zu entfernen. Die Gewebeschnitte wurden nun mit Eindeckmedium (Dako Faramount Aqueous Mounting Medium Ready-to-use, Dako North America Inc, Ca, USA) und einem Deckglas (Biosystems, Muttenz, CH) versiegelt. Die gefärbten Gewebeschnitte wurden im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt und gleichentags digitalisiert.

Digitalisierung der Proben

Die Digitalisierung ganzer Objektträger erfolgte mit dem Panoramic 250 FLASH II von 3DHISTECH. Die Gewebeschnitte wurden auf dem Objektträger mit schwarzem Filzstift umkreist, damit sie vom Scanner einfacher und vollständig erkannt werden. Es wurden bei allen Proben die gleichen Beleuchtungszeiten und -intensitäten mit den gleichen Filtern verwendet, damit Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen quantifiziert werden können. Zur Visualisierung von DAPI wurde der voreingestellte Filter für DAPI verwendet mit einer Beleuchtungszeit von 25 Millisekunden bei maximaler Beleuchtungsstärke. Zur Visualisierung von FITC wurde der voreingestellte Filter für FITC verwendet mit einer Beleuchtungszeit von 85 Millisekunden bei maximaler Beleuchtungsstärke. Diese Einstellungen wurden so gewählt, um möglichst keine Überbelichtung hervorzurufen und gleichzeitig möglichst alle vorhandenen GFP-*E. coli* sichtbar zu machen. Die Daten wurden im proprietären Format MRXS gespeichert und konnten mit dem CaseViewer von 3DHISTECH analysiert und betrachtet werden.

Quantitative Auswertung

Um quantitativ einen Unterschied zwischen den verschiedenen experimentellen Gruppen nachzuweisen, musste erst eine Analysemöglichkeit entwickelt werden. Der genaue Vorgang der Auswertung wird nachfolgend beschrieben.

Die digitalisierten Objektträger wurden mit dem CaseViewer geöffnet. Um lymphoides Gewebe (bei den mLN) sowie um Lebergewebe (bei der Leber) wurde eine Markierung gezogen. Alles, was in der späteren Analyse stören würde, musste sich ausserhalb dieser Markierung befinden. Dazu gehört alles, was nicht lymphatisches Gewebe bzw. Lebergewebe ist (grosse Blutgefässe, Fett, schlecht fokussierte Bereiche, Fremdkörper auf dem Objektträger, beschädigte Gewebereiche etc.) wie Abbildung 1 zeigt. Alles, was sich innerhalb der roten Linie befindet, wird später für die Analyse verwendet. Grosse Gefässe können die Analyse beeinflussen, da die eventuell noch darin vorhandenen Erythrozyten im grünen Fluoreszenzkanal eine Autofluoreszenz aufweisen oder falls keine Erythrozyten mehr darin vorhanden sind, handelt es sich um leere Räume, welche weder Hepatozyten noch

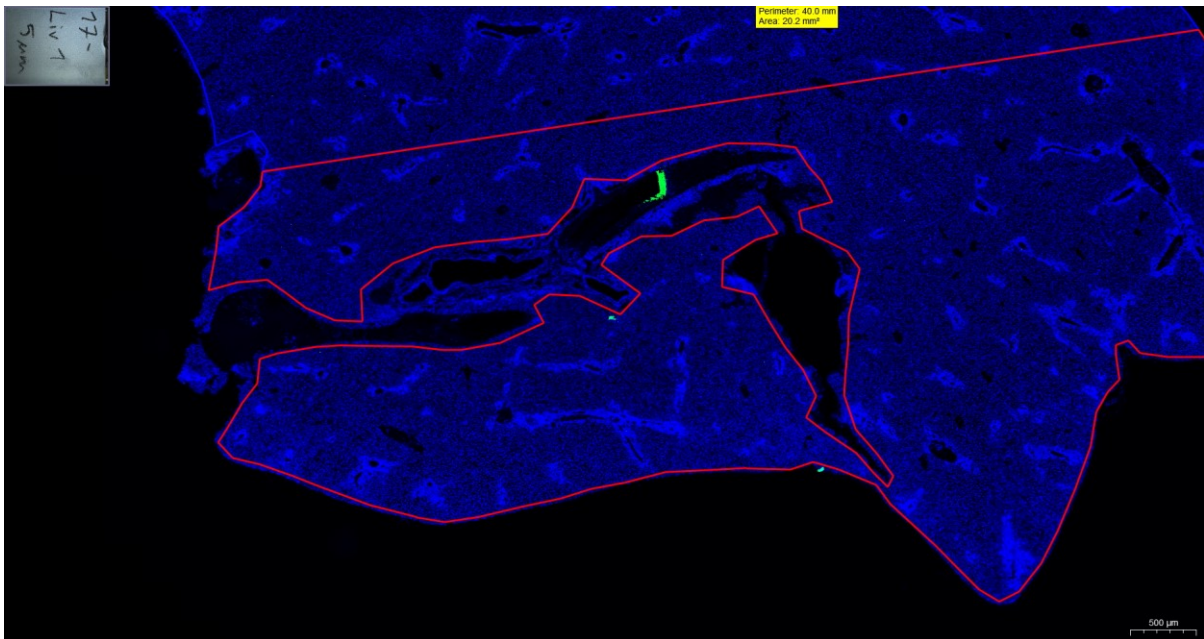


Abbildung 1 - Lebergewebe, bei welchem grosse Blutgefässe sowie Gewebedefekte durch die Markierung (rot) ausgeschlossen sind. Blau DAPI, Grün FITC, Skala 500 µm

Lymphozyten enthalten und somit auch kein GFP-*E. coli* oder FITC-Dextran aufweisen. Beides würde die Messung verfälschen. Kleinere Gefässe wurden aus praktischen Gründen nicht von der Analyse ausgeschlossen, diese enthielten jeweils keine Erythrozyten mehr. Die eingekreisten Bereiche durften nicht zu gross sein, da in den weiteren Verarbeitungsschritten zu grosse Dateien nicht verarbeitet werden konnten.

Die eingekreisten Bereiche wurden nun mittels des SlideConverters in verlustlos komprimierte 8-Bit TIFF-Dateien konvertiert, wobei sowohl für den DAPI- als auch für den

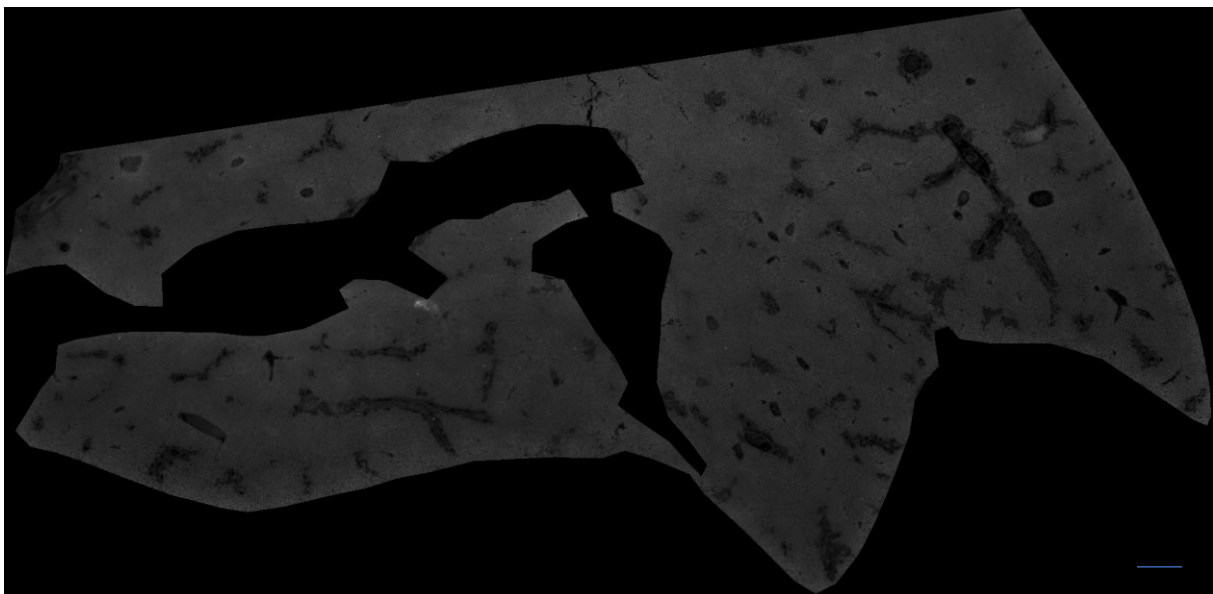


Abbildung 2 – Graustufen TIFF-Datei des FITC-Kanals des ungefähren Bereiches von Abbildung 1. Die schwarzen Bereiche sind nicht als Pixel gespeichert, die grauen Bereiche zeigen die Intensität des grünen Bildkanals (je heller, desto intensiver ist das Signal). Der schwarze Bereich in der Mitte entspricht den ausgeschnittenen Blutgefässen. Grau FITC, Skala 500 µm

FITC-Kanal eine eigene Datei erstellt wurde. Die TIFF-Datei des FITC-Kanals wurde nun in ImageJ geöffnet, wozu das bioFormats Plugin verwendet wurde, welches grosse TIFF-Dateien in ImageJ importieren kann.^b Abbildung 2 zeigt die so verarbeitete TIFF-Datei für den FITC-Kanal der in Abbildung 1 dargestellten Region.

Nun wurde kontrolliert, ob es sich bei der eingegebenen Datei um eine 8-Bit Datei handelt und falls nicht, wurde die Datei nach 8-Bit konvertiert. Anschliessend wurde die gesamte Anzahl Pixel dieser Datei gemessen. Dabei wurden nur diejenigen Bereiche gemessen, welche sich innerhalb der ursprünglichen Markierung auf dem digitalen Objektträger befinden. Die anderen Bereiche wurden nicht berücksichtigt. Anschliessend wurde ein Grenzwert angewandt und danach erneut gemessen. Jetzt wurden nur noch diese Pixel gemessen, deren Wert grösser gleich der eingegebene Grenzwert war. Zum Schluss wurden

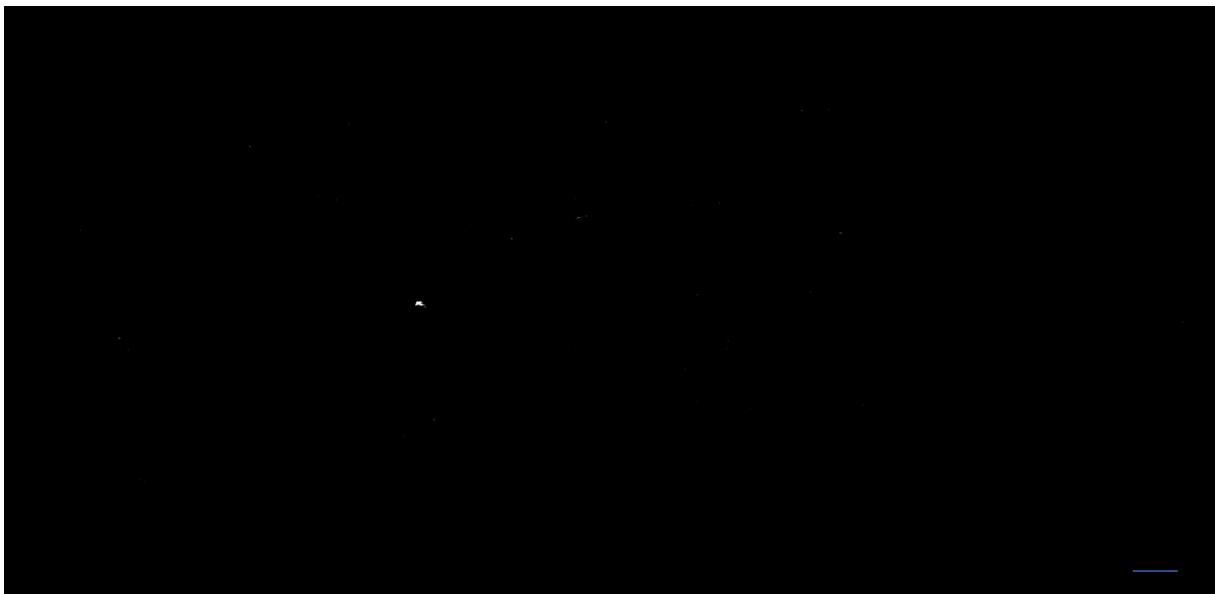


Abbildung 3 – Gleiche Region wie in Abbildung 2 nach Anwenden des Grenzwertes. Weiss: Pixel, deren Wert grösser oder gleich gross wie der Grenzwert ist, Schwarz: Pixel, deren Wert kleiner als der Grenzwert ist. Skala 500 μm

diejenigen Pixel, deren Wert grösser gleich der eingegebene Grenzwert war, weiss gesetzt und alle anderen Pixel schwarz und das entstandene Bild unter neuem Namen gespeichert. So konnte das Resultat der Berechnung grafisch dargestellt werden. Abbildung 3 zeigt die gleiche Region wie in Abbildung 1 und 2 mit angewandtem Grenzwert.

Aus den gemessenen Pixelwerten aller Bilder einer untersuchten Maus wurde der Anteil positiver Pixel verglichen mit allen Pixeln pro Maus berechnet. Dieser sogenannte positive Pixelanteil ist umso grösser, je mehr Pixel oberhalb des definierten Grenzwertes sind und er ist umso kleiner je weniger Pixel oberhalb dieses definierten Grenzwertes liegen. Durch die Nutzung des Anteils und nicht mehr der absoluten Anzahl von Pixeln können verschiedene

^b <https://imagej.net/Bio-Formats>

Mäuse miteinander verglichen werden, selbst wenn die analysierte Fläche an histologischem Gewebe nicht identisch ist. Der Grenzwert wurde anhand einiger digitalisierter Objektträger definiert, sodass nur diejenigen Regionen als positiv gewertet werden, welche auch makroskopisch sichtbares Signal aufweisen.

ImageStream®-Analyse

Grundlagen der Durchflusszytometrie

Ein Durchflusszytometer ist ein Gerät, welches einzelne Zellen in einer Zellsuspension aufgrund ihrer Fluoreszenzintensität analysieren und gruppieren kann. Der grundsätzliche Aufbau eines Durchflusszytometers ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

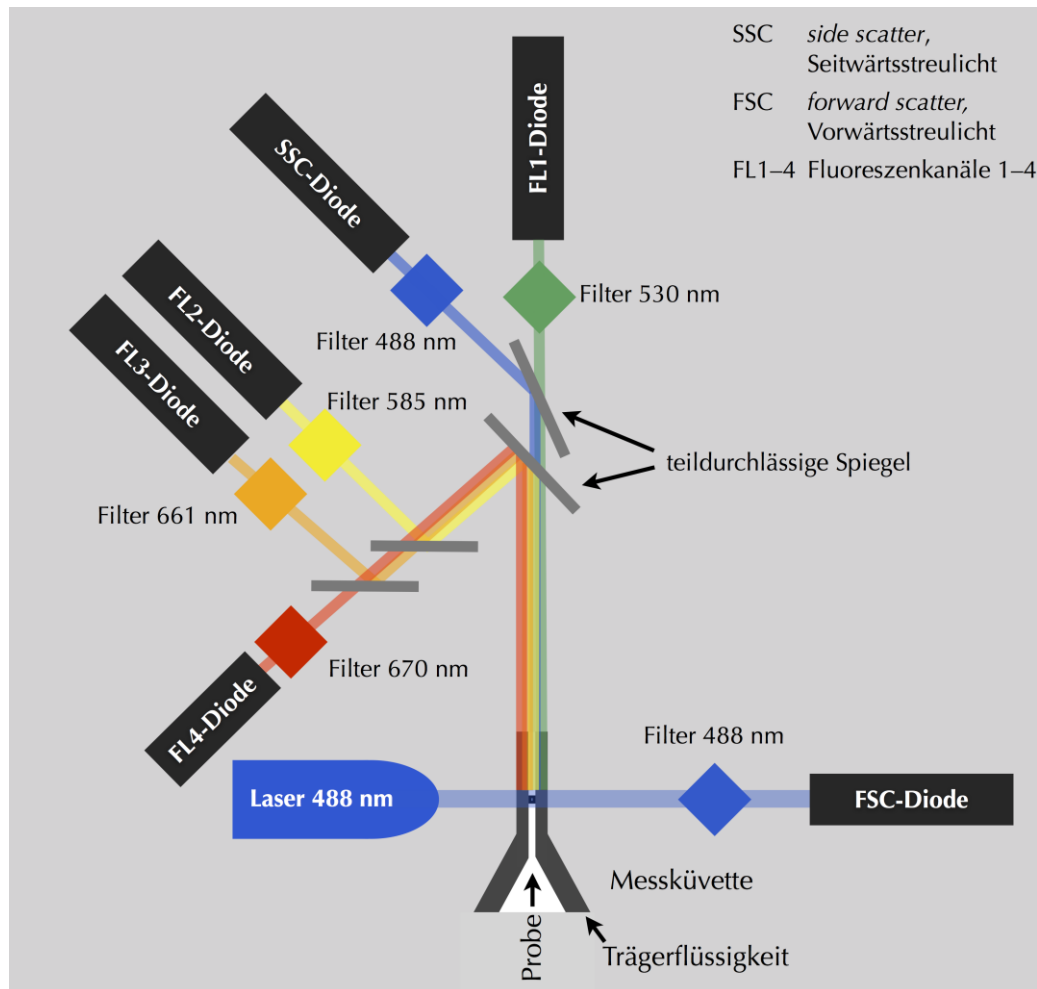


Abbildung 4 - Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers mit einem 488 nm Laser und vier Fluoreszenzkanälen. nm: Nanometer.

Mit freundlicher Genehmigung von Fabian K.

(<https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Duchflusszytometer.png>)

Ein Durchflusszytometer besitzt eine Messkuvette, welche aus Glas oder Quarz besteht und so dünn ist, dass die Zellen in der Lösung nacheinander diese Messkuvette passieren müssen. Die Zellen gelangen in den Messbereich des Laserstrahls, welcher die Fluoreszenzfarbstoffe, mit welchen gewisse Strukturen der Zelle oder Zellpopulationsmarker gefärbt worden sind, anregt, woraufhin diese Licht mit einer definierten Wellenlänge aussenden. Dieses Licht wird anschliessend über Spiegel und Filter zu Messdioden geleitet, welche die Intensität des emittierten Lichtes messen und zur Auswertung speichern. Wenn eine untersuchte Zelle mehrere Fluoreszenzfarbstoffe gebunden hat, so wird Licht mit verschiedenen definierten Frequenzen emittiert, welches von verschiedenen Messdioden

wahrgenommen und aufgezeichnet wird. Auf diese Weise wird für jede Zelle die entsprechende Intensität in allen untersuchten Frequenzspektren des Lichts gespeichert. Aufgrund dieser Intensitätsmessung kann bei der Auswertung des Datensatzes für jede Zelle die relative Menge an gebundenem Fluoreszenzfarbstoff angegeben werden. Als Fluoreszenzfarbstoffe werden entweder Stoffe eingesetzt, welche direkt an die DNA von Zellen binden (z. B. DAPI) oder die Fluoreszenzfarbstoffe werden an Antikörper gekoppelt, welche ihrerseits spezifisch für ein bestimmtes Epitop sind. Häufig werden Antikörper gegen Antigene des Cluster of Differentiation (CD) verwendet, dies sind immunphänotypische Oberflächenmerkmale von Zellen. Anhand dieser können Zellen nach Funktion oder Aktivitätsgrad eingeteilt werden. Jeder Durchflusszytometer zeichnet sich durch eine unterschiedliche Anzahl von anregenden Lasern unterschiedlicher Wellenlänge sowie eine unterschiedliche Anzahl von Messdioden aus, welche Licht unterschiedlicher Wellenlänge wahrnehmen und aufzeichnen. Je mehr verschiedene anregende Laser und analysierende Messdioden vorhanden sind, desto mehr verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe können voneinander unterschieden werden.⁹¹

Exzitations- und Emissionsspektre

Jeder Fluoreszenzfarbstoff wird durch Licht eines definierten Wellenlängenbereiches angeregt (Exzitationsspektrum). Falls einer der Laser des Durchflusszytometers Licht in einer Wellenlänge aussendet, durch welches der entsprechende Fluoreszenzfarbstoff angeregt wird, emittiert dieser Licht einer anderen definierten Wellenlänge (Emissionsspektrum). Exzitationsspektrum und Emissionsspektrum sind für jeden Fluoreszenzfarbstoff charakteristisch.

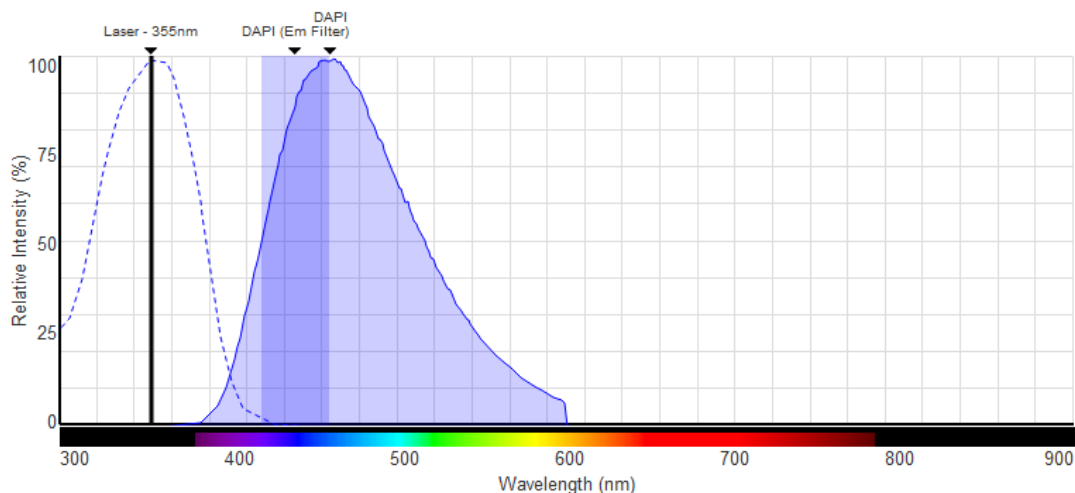


Abbildung 5 – Exzitationsspektrum (gestrichelte Linie) und Emissionsspektrum (durchgezogene Linie) von DAPI. Senkrechte schwarze Linie: Laser mit 355 nm Wellenlänge, violette Rechteck: Emissionsfilter. (Fluorescence SpectraViwer, Thermo Fisher)

DAPI beispielsweise kann durch Licht mit einer Wellenlänge von ca. 300 nm bis 400 nm angeregt werden, woraufhin es Licht mit einer Wellenlänge von 400 nm bis 600 nm emittiert,

wie Abbildung 5 zeigt. Im Beispiel erfolgt die Anregung von DAPI mittels eines Lasers mit einer Wellenlänge von 355 nm. Dieser regt DAPI im besten Bereich seines Exzitationsspektrums an. Daraufhin emittiert DAPI Licht in einer anderen Wellenlänge. Da das Emissionsspektrum von DAPI relativ breit ist und sich mit anderen Emissionsspektren überlagern kann, wird ein Emissionsfilter verwendet, welcher nur Licht mit einer Wellenlänge von 400 nm bis 480 nm zur Messdiode passieren lässt. Durch die korrekte Auswahl von Fluoreszenzfarbstoffen, Exzitationslasern sowie Emissionsfiltern lassen sich verschiedene zelluläre Ziele in einer Zelle gleichzeitig untersuchen, ohne sich gegenseitig stark zu beeinflussen.

Kompensation

Da die Emissionsspektren verschiedener verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sich jedoch teilweise überlagern können, könnte dies zu falschen Messungen führen, wie folgendes Beispiel in Abbildung 6 zeigt.

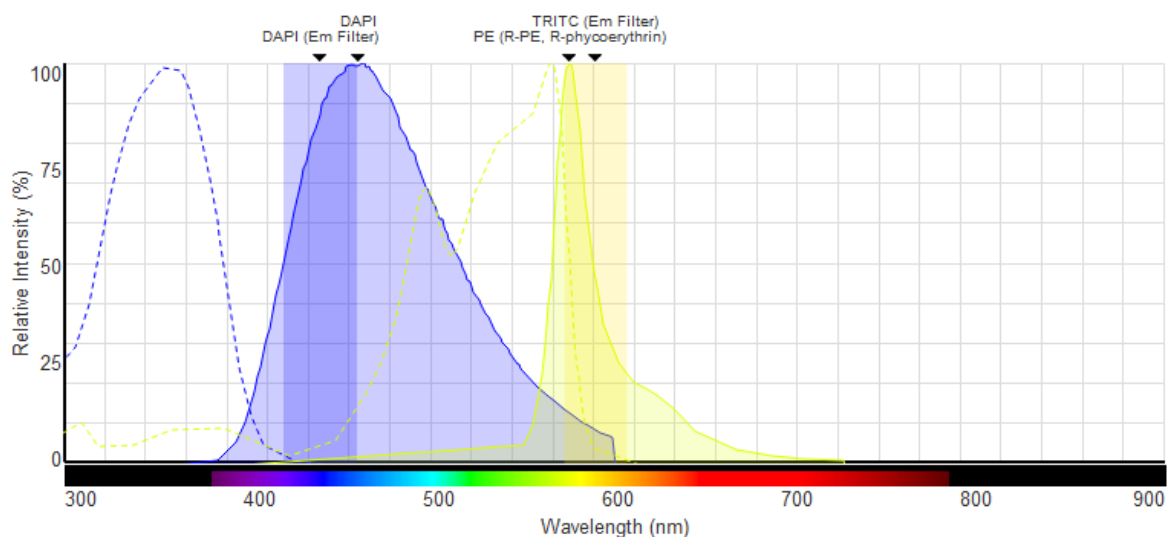


Abbildung 6 – Exzitations- und Emissionsspektren von DAPI (blau) und PE (gelb). Violette Rechteck: Exzitationsfilter für DAPI, gelbes Rechteck: Exzitationsfilter für PE. PE: Phycoerythrin. (Fluorescence SpectraViewer, Thermo Fisher)

Man kann sehen, dass das Emissionsspektrum von DAPI und das Emissionsspektrum von PE (Phycoerythrin) sich in einem relativ weiten Bereich zwischen 550 nm und 600 nm überlagern.[°] Die Überlagerung ist jedoch nur dann ein Problem, wenn sie im Bereich des Emissionsfilters eines der beiden überlagernden Fluoreszenzfarbstoffe auftritt. Hier passiert diese Überlagerung hauptsächlich im Emissionsfilterbereich von PE (TRITC-Filter). DAPI

[°] Für die Darstellung und Berechnung der Exzitations- und Emissionsspektren sowie der Exzitationslaser und Emissionsfilter wurde der Fluorescence SpectraViewer von Thermo Fisher verwendet: <https://www.thermofisher.com/ch/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>

emittiert also auch etwas Licht im Bereich des Emissionsfilters für PE. Dieses emittierte Licht kann vom Durchflusszytometer nicht vom emittierten Licht von PE unterschieden werden, da beide die gleiche Wellenlänge haben und somit den Emissionsfilter für PE (TRITC-Filter) passieren können. Der Durchflusszytometer würde also ein stärkeres Signal für PE aufzeichnen, als es der Realität entsprechen würde.

Aus diesem Grund muss eine sogenannte Kompensation durchgeführt werden. Dabei werden Zellen mit nur einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Wenn man die Zellen nur mit DAPI färbt und sie analysieren lässt, zeigt der Durchflusszytometer in obigem Beispiel für diese Zellen auch ein schwaches Signal bei PE an (da das Emissionsspektrum von DAPI den Emissionsfilter für PE erreicht). Dieses Phänomen nennt man Spillover. Die Intensität des Signals bei PE ist hier direkt proportional zum Signal von DAPI. Aufgrund dieser Proportionalität kann die Analyse-Software nun anhand des gemessenen DAPI-Signals das PE-Signal um den gemessenen Spillover reduzieren und beide Fluoreszenzfarbstoffe können im Experiment eindeutig voneinander unterschieden werden. Die Kompensation wird relevanter, wenn mehrere stärker überlappende Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden. Aus diesem Grund ist eine saubere Kompensation aller im jeweiligen Experiment verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe notwendig. Andernfalls wäre eine saubere Trennung der Farbstoffe bei der Auswertung nicht möglich.⁹¹

Grundlagen des ImageStream®

Der ImageStream Mark II Imaging Flow Cytometer® stellt eine Kombination aus Durchflusszytometer und Mikroskop dar. Vom Aufbau her entspricht er grundsätzlich einem Durchflusszytometer wie Abbildung 7 zeigt. Er besitzt 5 Exzitationslaser plus ein System für die Hellfeldbelichtung der Probe. Insgesamt besitzt er 6 Bildkanäle, welche mittels vorgelagerter Emissionsfilter nur Licht mit gewisser Wellenlänge passieren lassen (ähnlich den Messdioden in konventionellen Durchflusszytometern). Im Unterschied zu konventionellen Durchflusszytometern misst der ImageStream® jedoch nicht nur die Gesamtintensität des emittierten Lichtes in einem bestimmten Frequenzbereich, sondern er nimmt ein zweidimensionales Bild der zu untersuchenden Zelle im entsprechenden Wellenlängenbereich auf. Diese Aufnahme passiert für alle zu untersuchenden Wellenlängenbereiche sowie im Hellfeldmodus simultan. Das emittierte Licht der untersuchten Zelle wird entsprechend seiner Wellenlänge aufgeteilt und in unterschiedliche Bereiche der Kamera gelenkt, wo für jeden der 6 Bildkanäle ein Bild der Zelle aufgenommen wird. Der ImageStream® nutzt eine komplexe, proprietäre spektrale Entmischung, mit welcher der simultan genutzte Hellfeldkanal von den Fluoreszenzkanälen getrennt analysiert werden kann, obwohl die zu untersuchende Zelle gleichzeitig durch die Exzitationslaser und die Hellfeldlichtquelle belichtet wird.

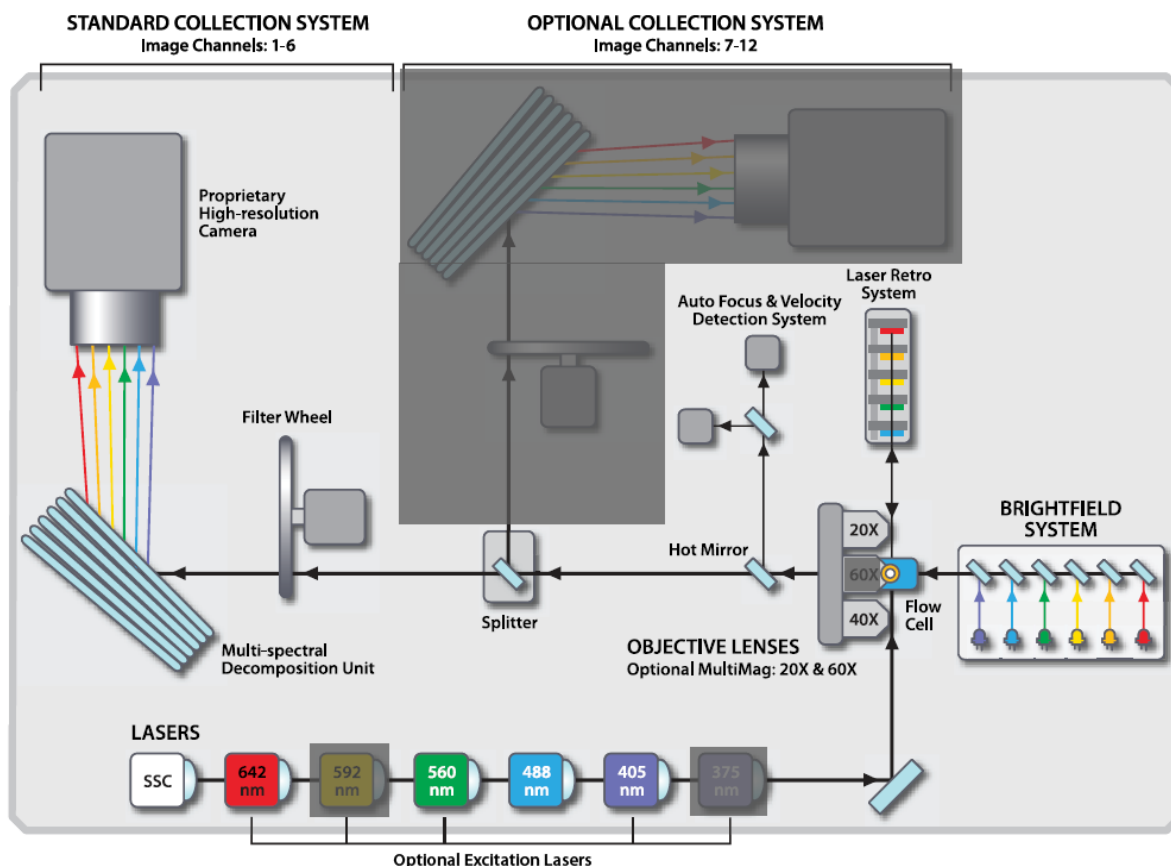


Abbildung 7 – Schematische Darstellung des ImageStream Mark II Imaging Flow Cytometers® von Amnis®, graue Bereiche sind im verwendeten Gerät nicht eingebaut, Copyright by Amnis®

Die Daten werden mittels der Software INSPIRE® als Rohdaten am ImageStream® aufgenommen und gespeichert. Erst im Anschluss wird bei der Analyse die notwendige Fluoreszenz-Kompensation digital auf die Rohdaten gerechnet. Somit kann die Analyse der Kompensationsproben vor oder nach der Analyse der experimentellen Proben stattfinden. Bereits bei der Analyse der Zellen und der Aufnahme der Daten kann selektiert werden, was aus der Probe gespeichert werden soll und was verworfen werden soll. Wenn eine Probe viele kleine Fragmente (beispielsweise zerfallene Zellen) enthält, kann dies von der Aufnahme ausgeschlossen werden, um den Aufnahmecomputer nicht zu überlasten. Im hier durchgeführten Experiment wurden alle vom Gerät erkannten Objekte gespeichert und für die weitere Analyse verwendet, da der Algorithmus, welcher Zellen von kleinen Fragmenten unterscheidet, auch allfällige frei vorhandene GFP-*E. coli* verworfen hätte. Der Nachteil dieses Vorgehens liegt jedoch darin, dass sehr viele Bilddaten gespeichert werden müssen, was bei der Analyse einen grossen Rechenaufwand bedeutet.

Bei der Analyse der Daten mittels IDEAS® wird im Grundsatz ähnlich vorgegangen wie bei der Analyse von Daten aus konventionellen Durchflusszytometern. Der genaue Vorgang der Analyse wird im Kapitel Analyse der Daten mittels IDEAS® näher erläutert.

Test der Nachweisbarkeit von GFP-*E. coli* mittels ImageStream®

Da in der Literatur keine bisherigen Experimente gefunden werden konnten, bei welchen GFP-*E. coli* mittels ImageStream® detektiert werden, musste erst überprüft werden, ob dies prinzipiell funktioniert. Es wurde ein Protokoll erstellt, um einerseits herauszufinden, ob GFP-*E. coli* im Blut von Mäusen mittels ImageStream® nachgewiesen werden können und ob eine Zentrifugationsgeschwindigkeit von 2'000 rpm ausreicht, um die GFP-*E. coli* zu pelletieren, oder ob ein beträchtlicher Anteil im Überstand verbleibt.

Es wurden 100 µl Blut von 3 verschiedenen Mäusen retrokulär entnommen und in EDTA-Sammelröhrchen gegeben. Anschliessend wurde das Blut mit 10^4 CFU GFP-*E. coli* beimpft und bei 37 °C für eine Stunde in den Wärmeschrank gestellt. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Proben mittels FACS-Puffer gewaschen und bei 2'000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 4'000 rpm zentrifugiert und in 50 µl FACS-Puffer aufgelöst. Das Blutpellet wurde in BD FACS lysis solution (1 zu 10 mit deionisiertem Wasser verdünnt) aufgelöst (BD Biosciences, San Jose, California, USA). Während 10 Minuten wurden die Erythrozyten so lysiert. Im Anschluss wurde mit FACS-Puffer gewaschen und erneut bei 2'000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in FACS-Puffer aufgelöst. Jetzt wurde die Zellsuspension wie auch der erste Überstand am ImageStream® analysiert.

FACS-Puffer:

- 500 ml DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline, Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung) (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, California, USA)
- 10 ml FCS (Fetal Calf Serum, fetales Kälberserum)
- 10 ml 0.5 M EDTA (Ethylendiamintetraacetat)

Unter sterilen Bedingungen hergestellt und bei 4 °C gelagert. Allenfalls kann FACS-Puffer durch Zugabe von 0,5 g NaN₃ (Natriumazid) länger konserviert werden.

Die am ImageStream® analysierten Suspensionen von GFP-*E. coli* in Blut von Mäusen wurden mit IDEAS® analysiert. Es wurde versucht, die GFP-*E. coli* eindeutig zu identifizieren, um ihre Nachweisbarkeit zu bestätigen. Bei der Auswertung zeigte ein Grossteil der Zellen, welche im GFP-Kanal Fluoreszenz zeigten, ebenfalls starke Fluoreszenzsignale in den benachbarten Kanälen. Folglich gelang die Identifikation einzelner GFP-*E. coli* nicht mit genügender Präzision. Im GFP-Kanal wurde bei vielen Proben die maximal messbare Intensität des Signals erreicht. Bei dieser Analyse war der 488 Nanometer Laser auf eine Leistung von 85 mW eingestellt und der 405 Nanometer Laser auf eine Leistung von 90 mW.

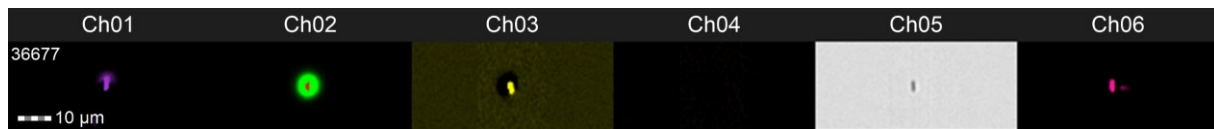


Abbildung 8 – ImageStream® Aufnahme eines GFP-*E. coli*-Bakteriums. Kanal 1-4 sowie 6 sind die Fluoreszenzkanäle, Kanal 5 ist der Hellfeldkanal. Rot markiert sind gesättigte Pixel im GFP-Kanal (Ch02).

In Abbildung 8 ist ersichtlich, dass aufgrund der starken Exzitation durch die Laser zu viel Signal im GFP-Kanal aufgenommen wird und es zur Sättigung einzelner Pixel kommt. Die starke Exzitation führt zu einer derart starken Emission von Licht, dass selbst weit entfernte Fluoreszenzkanäle Signal auffangen, wie hier der Kanal 06.

In einem zweiten Test wurde die Intensität des 405 Nanometer Lasers sowie des 488 Nanometer Lasers stark reduziert (405 nm Laser: 50 mW; 488 nm Laser: 5 mW), was die Fluoreszenz der GFP-*E. coli* reduzierte, dass es zu keiner Sättigung mehr kam, wie Abbildung 9 zeigt.



Abbildung 9 - ImageStream® Aufnahme eines GFP-*E. coli*-Bakteriums. Kanal 1-4 sowie 6 sind die Fluoreszenzkanäle, Kanal 5 ist der Hellfeldkanal. Im GFP-Kanal (Kanal 2) ist ein GFP-*E. coli* sichtbar, ebenso im Hellfeldkanal.

Anhand der Daten dieses Testes wurde die Analysevorlage erstellt, welche die GFP-*E. coli* aus dem Überstand der ersten Zentrifugation darstellen soll. Die angepassten Lasereinstellungen wurden für alle folgenden Experimente übernommen.

Der Test zeigte auch, dass ein relevanter Anteil GFP-*E. coli* im Überstand der ersten Zentrifugation verbleibt. Somit ist es notwendig, den ersten Überstand separat zu analysieren, um nicht frei flotierende GFP-*E. coli* zu verpassen.

ImageStream® des intestinalen Loops in vivo

Vorbereitung der Zellen

Für die ImageStream®-Analyse wurden nur Proben aus den Intestinalen-Loop-Experimenten mit Injektion von GFP-*E. coli* verwendet, da vorhergehende Experimente in unserem Labor zeigten, dass GFP-*E. coli* im ImageStream® einzeln nachweisbar sind.

Die exzidierten Gewebe (mesenteriale Lymphknoten und Peyer-Patches) wurden in IMDM (Isocove's Modified Dulbecco's Medium, Gibco, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) in kleine Stücke geschnitten. Anschliessend wurde der Zellverband durch Zugabe von Collagenase IA 1 mg/ml (*Clostridium histolyticum*, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und DNase I 0,1 mg/ml (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) in IMDM plus 2 % fetalem Kälberserum (FCS) bei 37 °C auf dem Rütteltisch während 30

Minuten aufgelöst. Nun wurden die Lösungen durch einen 100 µm Zellfilter gefiltert, um größere Rückstände zu entfernen. Die Funktion der Collagenase IA und der DNase I wurde nun mittels Zugabe von 20 ml EDTA 2 mM in IMDM plus 2 % FCS blockiert. Nach Zentrifugation bei 4 °C wurde das Pellet in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (Thermo Fisher Scientific) aufgelöst und in eine 96-Loch-Platte übertragen. Der bei der Zentrifugation entstandene Überstand wurde ein weiteres Mal bei höherer Geschwindigkeit zentrifugiert und das Sediment in 50 µl FACS-Buffer aufgelöst und für die Analyse am ImageStream® bei 4 °C kühl gestellt.

Das Blut wurde direkt nach der Entnahme in FACS-Puffer gegeben. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in BD FACS lysis solution (1 zu 10 mit deionisiertem Wasser verdünnt) aufgelöst, um die Erythrozyten zu lysieren. Der Überstand wurde aufgefangen, bei höherer Geschwindigkeit zentrifugiert, durchlief dann ebenfalls die Lyse mittels BD FACS lysis solution und wurde anschliessend in 50 µl FACS-Puffer aufgelöst und für die Analyse am Image-Stream bei 4 °C kühl gestellt. Anschliessend wurde die lysierte Blut-Suspension mit FACS-Puffer gewaschen, in phosphatgepufferter Salzlösung aufgelöst und in eine 96-Loch-Platte übertragen.

Im Anschluss wurden die Zellen in der 96-Loch-Platte zuerst mittels fixable viability dye eFluor450 1:1'000 verdünnt gefärbt. Anschliessend erfolgte die Blockierung frei liegender Fc-Rezeptoren mittels Fc-Block 1:1'000 verdünnt. Nun wurde die Antikörper-Mischung zugegeben. Diese setzt sich aus den in Tabelle 2 aufgeführten Antikörpern zusammen. Anschliessend wurden die Zellen mittels BD Cytfix Fixation Buffer fixiert, in FACS-Puffer aufgelöst und für die Analyse am ImageStream® bei 4 °C kühl gestellt.

Tabelle 2 – Eingesetzte Antikörper mit den gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen

Epitop	Fluoreszenz-Farbstoff	Klon	Produzent	Verdünnung
Gr-1 (Ly6G + Ly6C)	PE (Phycoerythrin)	RB6-8C5	BD	1:100
CD11c	PE-CF594	HL3	BD	1:50
CD11b	PE-Cy7	M1/70	BioLegend	1:100

Das im Experiment eingesetzte ImageStream®-Modell verfügt über sechs Bildkanäle und fünf Exzitationslaser. Ein Bildkanal wurde für die Hellfeld-Betrachtung der Zellen genutzt. Somit konnten nur fünf verschiedene Fluoreszenzmarker eingesetzt werden. Dies waren: eFluor450 für die Differenzierung lebender von toten Zellen, GFP in den GFP-*E. coli*, PE-CF594-markiertes CD11c für die Differenzierung von dendritischen Zellen, PE-Cy7-

markiertes CD11b für die Differenzierung von myeloiden Zellen sowie natürlichen Killerzellen und PE-markiertes Gr-1 (Ly6G + Ly6C) für die Differenzierung von neutrophilen Granulozyten sowie Monozyten.⁵⁵

Datenakquisition mittels INSPIRE®

Die simultane Aufnahme zweidimensionaler Bilder in allen Bildkanälen beim ImageStream® erlaubt neben der Analyse der Intensität eines Signals auch die Analyse der räumlichen Position des Signales in Bezug auf die räumliche Position anderer Signale innerhalb einer Zelle. So werden Analysen zur Phagozytose möglich, weswegen in diesem Experiment ImageStream® verwendet wurde. Verwendet wurde der ImageStream Mark II Imaging Flow Cytometer® von Amnis® (EMD Millipore, Seattle, Washington, USA).

Zum Betrieb des ImageStream® Flow Cytometers wurden folgende Lösungen verwendet:

- Amnis® SpeedBead® Kit for ImageStream® (EMD Millipore, Seattle, Washington, USA)
- Sterilisationslösung: 0,4 % Kaliumhypochlorit
- Reinigungslösung: Coulter Clenz® (Beckman Coulter Switzerland, Nyon, Schweiz)
- Debubbler (entfernt Luftblasen aus dem System): 70 % Isopropanol (VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA)
- Spüllösung: CytoFLEX Sheath Fluid (Katalog-Nummer B 51503, Beckman Coulter Switzerland, Nyon, Schweiz)
- Hüllstrom-Lösung: PBS pH 7,4 Flow Cytometry Grade (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, California, USA)

Bei jedem Neustart des Systems wurden entsprechend den Herstelleranweisungen sämtliche automatisch ablaufenden Kalibrierungen durchgeführt und Aufnahmen erst dann gestartet, wenn sämtliche geprüften Werte innerhalb des jeweiligen Toleranzbereiches lagen.

Die Beleuchtungseinstellungen der Exzitationslaser am ImageStream® wurden wie folgt gewählt und bei allen Experimenten identisch gehalten: 405 nm-Laser mit 50 mW, 488 nm-Laser mit 5 mW, 561 nm-Laser mit 200 mW und der 642 nm-Laser mit 150 mW, zusätzlich wurde der Hellfeld-Kanal verwendet. Alle Daten wurden als Rohdaten unkompensiert aufgenommen und die aufgenommene Kompensation wurde nachträglich auf die Daten gerechnet, um den Aufnahme-Computer nicht zu überlasten.

Da der ImageStream® die Zellsuspension über eine Spritze aufzieht und in die Messküvette injiziert, kann er die genaue Menge an analysierter Flüssigkeit messen. So kann direkt aus

den Daten die Konzentration von Zellen sowie die absolute Zellzahl in der Probe errechnet werden.

Am ImageStream® wurde zuerst der Überstand, welcher wie zuvor beschrieben vorbereitet worden ist, analysiert. Dieser wurde nicht fixiert, um Fixationsartefakte an den GFP-*E. coli* zu vermeiden, weswegen er schnellstmöglich analysiert worden ist. Anschliessend wurden die mittels Antikörper-Mix gefärbten und fixierten Zellen analysiert. Pro Probe wurden jeweils 2 Mal 1'000'000 Objekte analysiert, oder wenn die Konzentration geringer war, wurde während 55 Minuten analysiert. Im Anschluss wurden die errechneten Zellzahlen auf das totale Volumen der untersuchten Probe hochgerechnet.

Am ImageStream® wurde bei den Einstellungen zum Flüssigkeitssystem die maximale Sensitivität mit einer Grösse des Kernstromes von 10 µm gewählt. Im Kernstrom werden die zu untersuchenden Zellen fokussiert und durch die Messküvette geleitet. Die Fokussierung der Optik auf die Zellen und die Zentrierung des Kernstromes wurden automatisch durch die Software INSPIRE® for the ISX MKII Version 200.1.614.0 geregelt.

Analyse der Daten mittels IDEAS®

Die aufgenommenen Daten wurden mittels IDEAS® Version 6.2.183.0 bearbeitet. Zuerst wurde aus den Kompensationsdateien der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe eine Kompensationsmatrix erstellt. Diese Matrix enthält von jedem Fluoreszenzkanal die Information, wie viel Spillover er in den anderen Fluoreszenzkanälen verursacht. Um eine solche Matrix errechnen zu können, müssen für jeden verwendeten Fluoreszenzfarbstoff bzw. Fluoreszenzkanal Proben analysiert werden, welche einzig mit dem entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff gefärbt worden sind. Aus den Signalen in den benachbarten Fluoreszenzkanälen misst die Software, wie viel Spillover pro Fluoreszenzfarbstoff vorhanden ist.

Die aufgenommenen Rohdaten wurden zuerst durch die Software mittels dieser Kompensationsmatrix kompensiert und als kompensierte Version gespeichert. Nun können die Daten sinnvoll dargestellt werden. Erst jetzt kann begonnen werden, die Daten zu gaten, das bedeutet, sie anhand der einzelnen aufgenommenen Werte in Gruppen gleicher Zellen zu sortieren. Die Gating-Strategie des ImageStream® unterscheidet sich deutlich von der Gating-Strategie konventioneller Durchflusszytometer, denn es können auch grafische Faktoren wie die Rundheit des Objektes oder die Überlagerung verschiedener Fluoreszenzmarker eingesetzt werden. Die Gating-Strategie wurde für jedes untersuchte Organ (mesenteriale Lymphknoten, Peyer-Patches, sowie Blut) einzeln optimiert und diese Gating-Strategie dann für alle jeweiligen Organe genutzt, um vergleichbare Gruppen von Zellen zu erzeugen.

Abbildung 10 zeigt einen groben Überblick über die Gating-Strategie. Zuerst werden diejenigen Zellen ausgewählt, welche im Fokus aufgenommen worden sind, anschliessend werden alle Einzelzellen ausgewählt, dann sämtliche toten Zellen ausgeschlossen und im Anschluss diejenigen Zellen ausgewählt, welche ein GFP-Signal im Bild aufweisen. Diese GFP positiven Zellen werden anschliessend mittels der Internalisationsanalyse in Zellen, welche GFP internalisiert haben und Zellen, welche GFP ausserhalb der oder an der Plasmamembran angehängt haben, aufgeteilt. Nun werden diese beiden Gruppen sowie diejenigen Zellen, welche nirgendwo GFP aufweisen, anhand der Marker CD11c sowie CD11b weiter unterteilt. Anschliessend werden die CD11c positiven ($CD11c^+$) und gleichzeitig CD11b negativen ($CD11b^-$) Zellen ($CD11c^+/CD11b^-$ Zellen) anhand der Intensität des Markers Gr-1 weiter unterteilt in eine $Gr-1^+$ und eine $Gr-1^-$ Gruppe. Im Folgenden wird auf die einzelnen Schritte dieser Gating-Strategie näher eingegangen.

ImageStream® Gating-Strategie

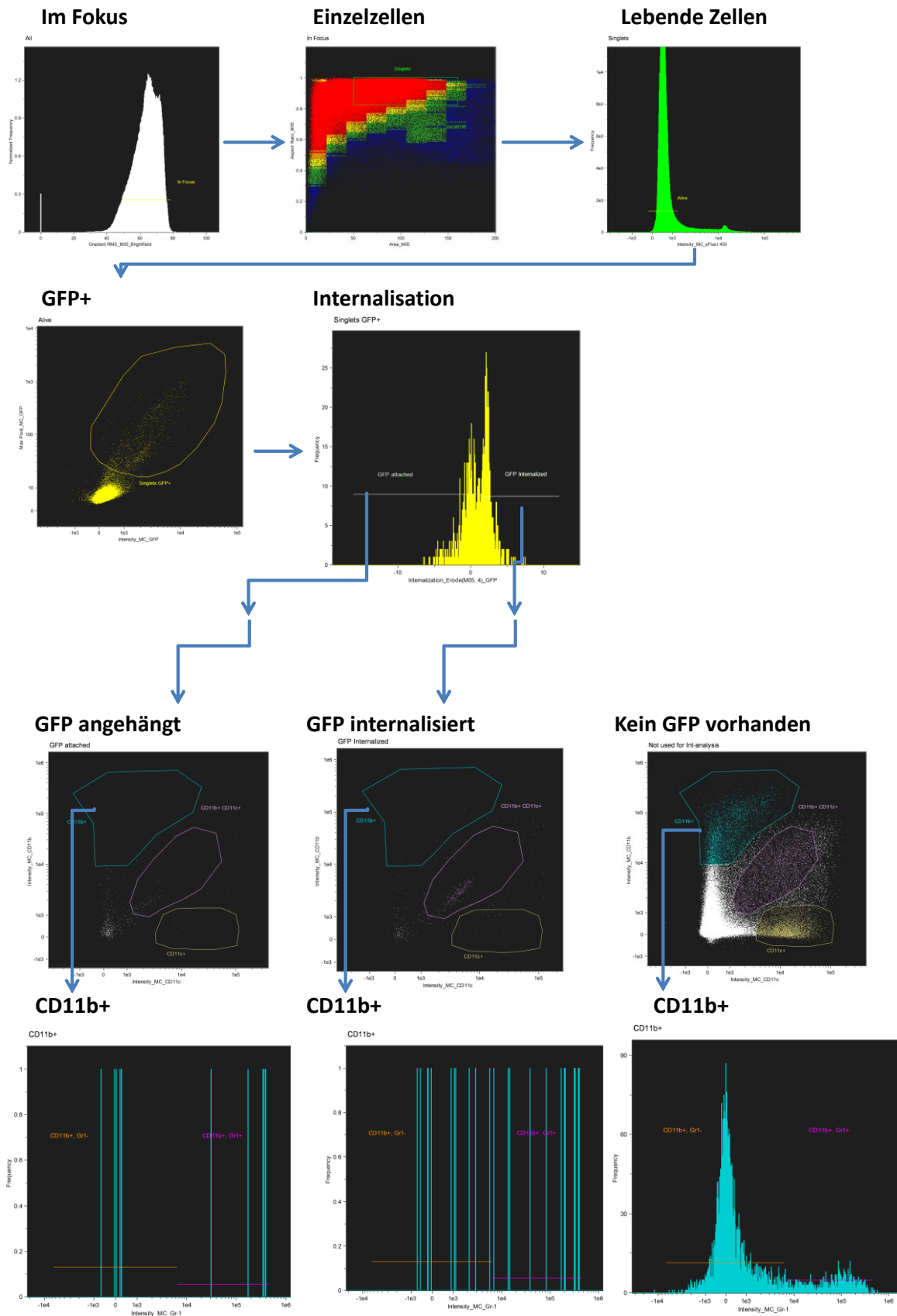


Abbildung 10 – Überblick über die Gating-Strategie der am ImageStream® aufgenommenen Daten. Die einzelnen Diagramme werden nachfolgend genauer erläutert.

Fokus-Gate

Der erste Schritt in der Analyse der Daten besteht darin, diejenigen Aufnahmen zu selektieren, welche das Objekt scharf abgebildet haben. Dazu stellt IDEAS® den sogenannten Gradient RMS zur Verfügung. Dieser Wert wird standardmässig im Hellfeld-Kanal berechnet. Er bezeichnet den Intensitätsunterschied zwischen zwei Pixel innerhalb des Bildes, welche 3 Pixel voneinander entfernt sind. Je grösser der Gradient RMS ist, desto grösser sind also die Signalunterschiede innerhalb des Bildes.

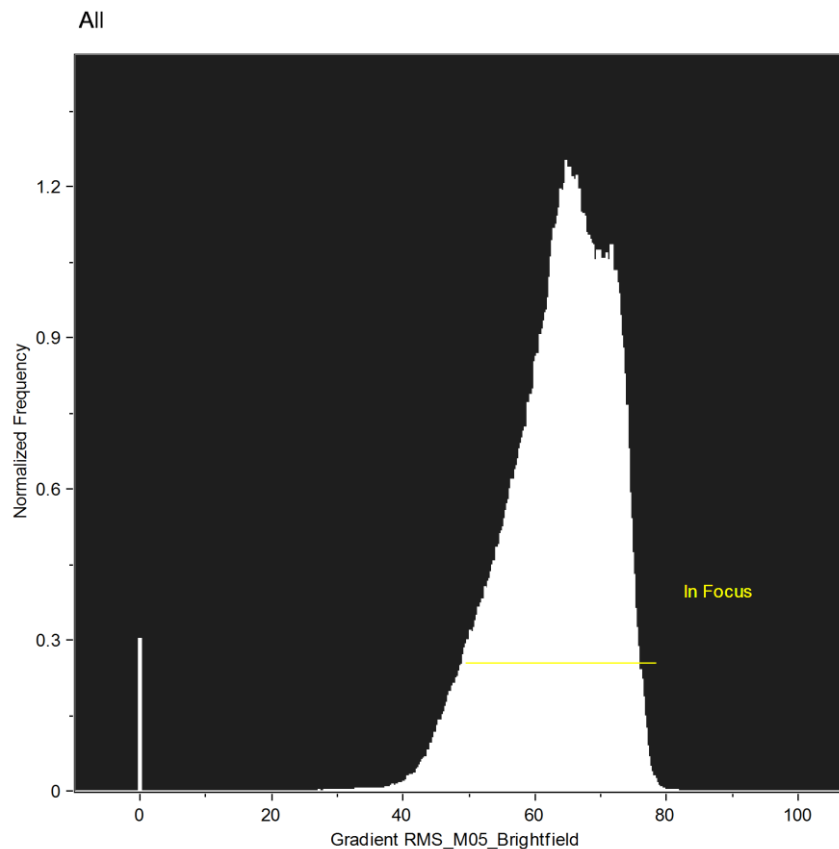


Abbildung 11 - Dargestellt sind alle vom ImageStream® aufgenommenen Daten als Histogramm mit dem Gradient RMS als x-Achse und der relativen Häufigkeit als y-Achse. Die gelbe Linie stellt das Gate dar, mit welchem die scharf abgebildeten Zellen weiterverwendet werden. Der Rest wird verworfen.

Da ein unscharf aufgenommenes Bild nur verschwommene Übergänge von hell zu dunkel aufweist, ist der Gradient RMS bei einem unscharf aufgenommenen Bild niedrig. Ein scharf aufgenommenes Bild weist grössere Intensitätsunterschiede zwischen nahe beieinanderliegenden Pixeln auf, weshalb der Gradient RMS dort höher ist. IDEAS® zeigt für jede Säule im Histogramm die darin enthaltenen Objekte an.

So kann morphologisch definiert werden, ab welchem Gradient RMS-Wert die Objekte scharf abgebildet sind. Dieser Wert wurde anschliessend für die Analysen verwendet und das Gate, wie in Abbildung 11 dargestellt, gesetzt.

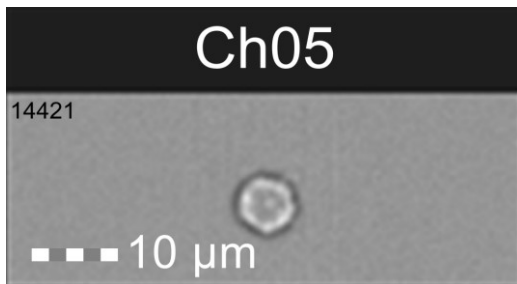


Abbildung 12 - Hoher Gradient RMS, scharfes Bild, Hellfeldaufnahme

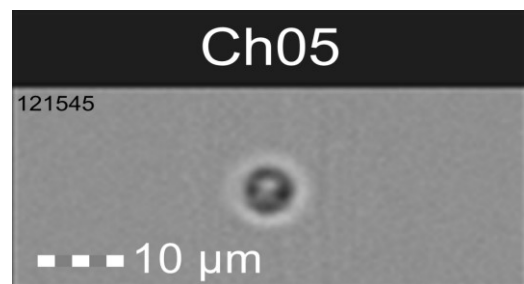


Abbildung 13 - Niedriger Gradient RMS, unscharfes Bild, Hellfeldaufnahme

Einzelzellen-Gate

Im nächsten Schritt werden Zellpaare, Zellabfall sowie kleine Fragmente und sehr grosse Partikel von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die Zellsuspensionen enthalten oftmals viele Fragmente zerstörter Zellen oder Überreste der extrazellulären Matrix, die nicht vollständig abgebaut worden ist. Das Ziel ist es, möglichst nur einzelne Zellen im Gate zu haben. Im Streudiagramm der Abbildung 14 wird als x-Achse die Fläche der Objekte im Hellfeldkanal und als y-Achse der Aspect Ratio (der Quotient der kurzen Achse geteilt durch

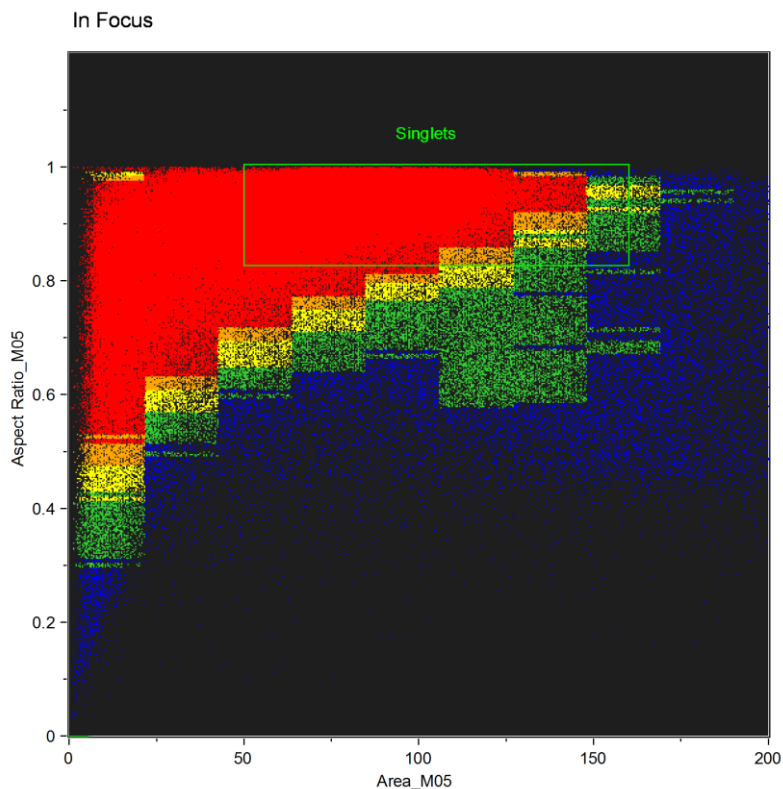


Abbildung 14 - Streudiagramm der Objekte im Fokus. x-Achse: Fläche des Objektes im Hellfeldkanal, y-Achse: Aspect Ratio des Objektes im Hellfeldkanal. Die Farbe gibt die Dichte der Objekte im Streudiagramm wieder (blau gering, rot hoch). Jeder farbige Punkt entspricht einem Objekt.

die lange Achse des Objektes) gewählt. IDEAS® erstellt von jedem Objekt automatisch eine Maske, welche die Umrisse des Objektes abbildet. Anhand dieser Maske wird die Fläche des Objektes, seine lange und kurze Achse sowie der Aspect Ratio berechnet.

Abbildung 15 zeigt auf, wie das Fläche zu Aspect Ratio Streudiagramm die einzelnen Objekte anhand ihrer Form und Grösse voneinander unterscheiden kann. Ein Objekt mit grosser Fläche sowie einem hohen Aspect Ratio ist oben rechts zu finden und kann beispielsweise ein Konglomerat mehrerer Zellen oder ein grösseres Konglomerat von Zellabfall sein. Ein Objekt mit grosser Fläche sowie einem niedrigen Aspect Ratio ist unten rechts zu finden und ist folglich dünn und lang. Ein Objekt mit kleiner Fläche und niedrigem Aspect Ratio, im Streudiagramm unten links zu finden, ist klein und länglich. Ein Objekt mit kleiner Fläche und hohem Aspect Ratio ist oben links zu finden, es ist klein und rund. Zellen in einer Suspension sind meist rundlich bei einer mittleren Fläche, also im Streudiagramm oben in der Mitte zu finden. Um sicherzugehen, dass die korrekten Objekte ausgewählt werden, werden die hinterlegten Bilder der Objekte beurteilt.

Fläche / Aspect Ratio

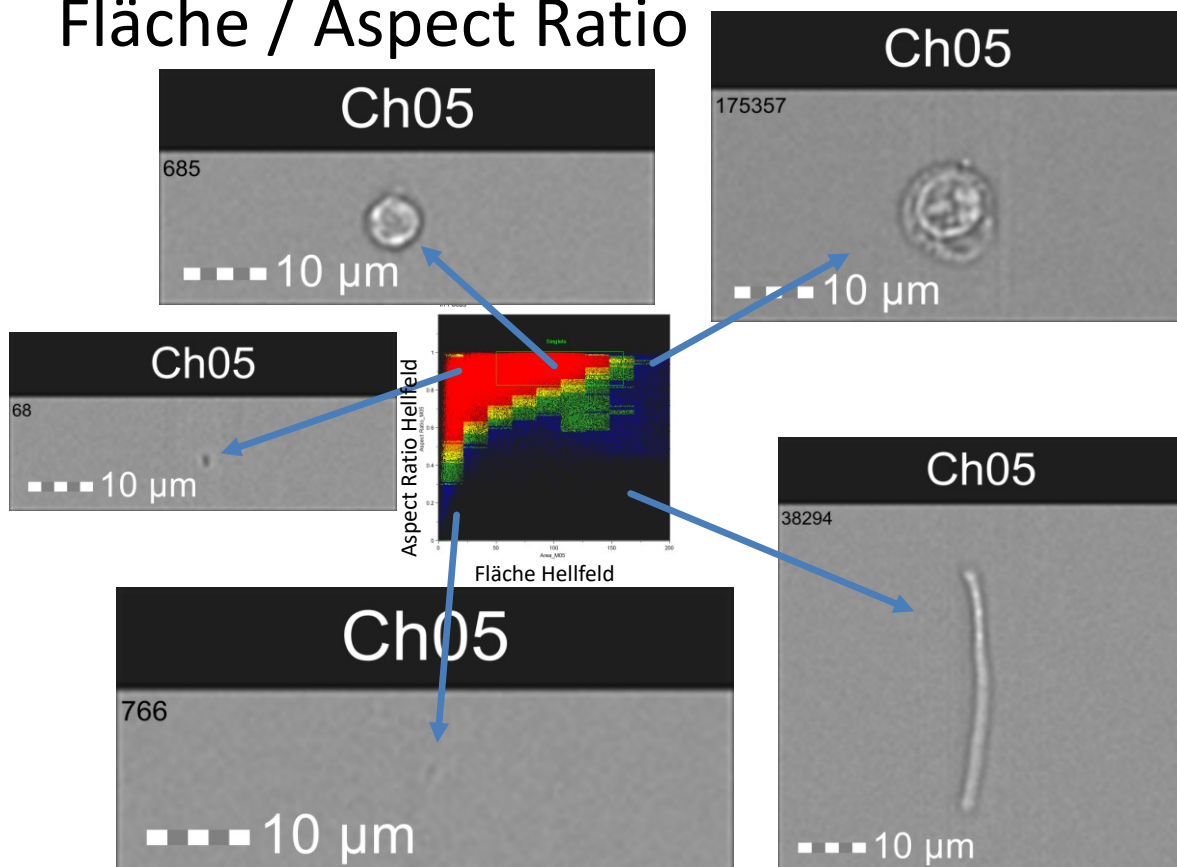


Abbildung 15 – In der Mitte das in Abbildung 14 dargestellte Streudiagramm. Die Pfeile zeigen, wo die dargestellten Objekte in diesem Streudiagramm positioniert sind. Aufnahmen im Hellfeldkanal.

Gate für lebende Zellen

Im nächsten Schritt werden alle toten Zellen ausgeschlossen. Dies geschieht anhand der Intensität des Fluoreszenzsignals im Kanal 1 durch den Fixable Viability Dye eFluor 450. Untergegangene oder untergehende Zellen binden vermehrt eFluor 450, wodurch die Fluoreszenzintensität dieser Zelle im Kanal 1 zunimmt. Es werden folglich diejenigen Zellen ausgewählt, welche eine geringe Fluoreszenzintensität im Kanal 1 aufweisen. Anhand der Hellfeld-Bilder wird wiederum verifiziert, dass die als lebend eingestufteten Zellen korrekt ausgewählt wurden und das Gate wenn notwendig angepasst.

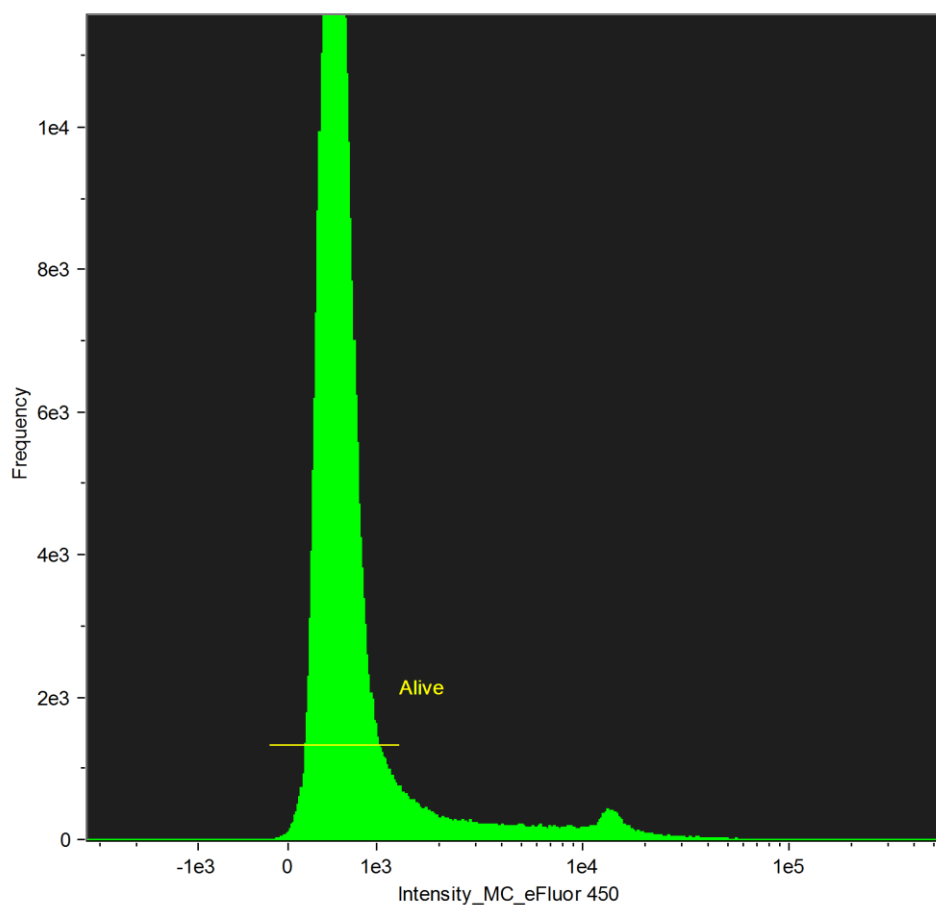


Abbildung 16 - Histogramm der Intensität der Fluoreszenz von eFluor 450 von allen Einzelzellen. x-Achse: Fluoreszenzintensität von eFluor 450, y-Achse: relative Häufigkeit

GFP⁺ Zellen

Die lebenden Zellen werden nun aufgeteilt in solche, welche GFP irgendwo im Bild aufweisen und solche, die kein GFP aufweisen. Dazu wird ein Streudiagramm angelegt, welches die Intensität des GFP-Signals aller Pixel der jeweiligen Zelle auf der x-Achse und die Intensität des hellsten Pixels im GFP-Kanal dieser Zelle auf der y-Achse darstellt.

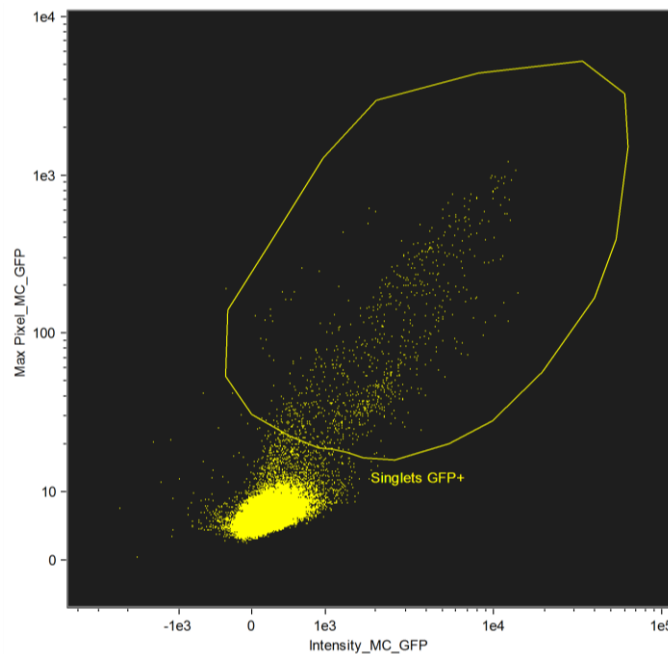


Abbildung 17 – Streudiagramm der lebenden Zellen. x-Achse: Intensität des GFP-Signals aller Pixel, y-Achse: Intensität des hellsten Pixels im GFP-Kanal. Jeder Punkt entspricht einer Zelle.

Daraus werden diejenigen Zellen ausgewählt, welche sowohl ein hohes Gesamt-GFP-Signal als auch ein hohes maximales GFP-Signal aufweisen. So werden die beiden Möglichkeiten abgedeckt, dass ein kleines, aber sehr helles Bakterium vorhanden ist sowie die Möglichkeit, dass ein internalisiertes Bakterium sein GFP in einem zellulären Lysosom verteilt hat und somit punktuell weniger hell ist, dafür in einem grösseren Bereich Signal emittiert. Die visuelle Darstellung der hier ausgewählten Zellen zeigt, dass diese ein deutliches GFP-Signal enthalten.

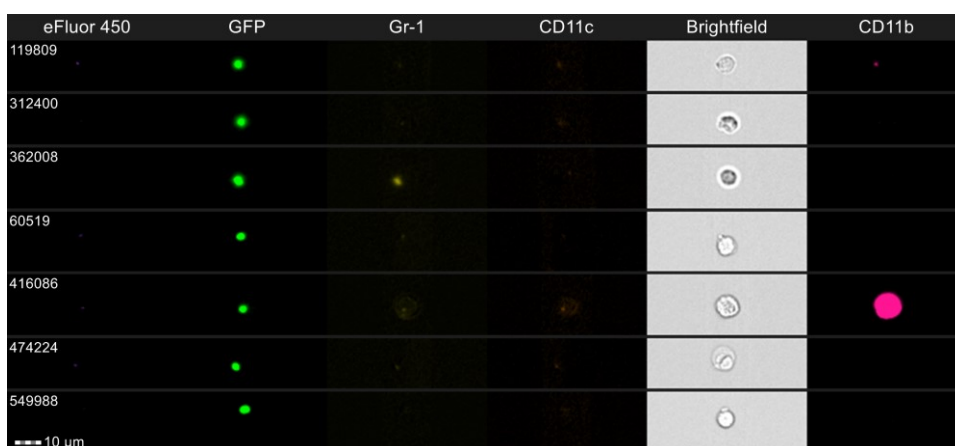


Abbildung 18 – Darstellung der durch die in Abbildung 17 gezeigten Gate ausgewählten Zellen. Die Spalten entsprechen den bezeichneten Fluoreszenzkanälen sowie dem Hellfeldkanal (Brightfield). Jede Spalte zeigt eine analysierte Zelle.

Internalisationsanalyse

Als Nächstes wird untersucht, ob die GFP+ Zellen das GFP-*E. coli*-Bakterium internalisiert haben oder ob es ausserhalb der Zellmembran liegt. Dazu wird die Internalisationsanalyse verwendet. Diese nutzt die von IDEAS® erstellte Maske der Zelle. Diese Maske wird automatisch für jedes Objekt erstellt und unterscheidet im aufgenommenen Bild zwischen dem Objekt selbst und seiner Umgebung. Die Maske wird aus dem Bild des Hellfeldkanales berechnet. Sie ist in diesem Experiment so eingestellt, dass sie möglichst genau die Zelle abbildet. Alle Pixel innerhalb der Maske sind folglich entweder Plasmamembran oder interne Zellorganellen der Zelle. In diesem Experiment wurden keine Zellorganellen spezifisch gefärbt, weshalb diese nicht weiter unterteilt werden können. Die Pixel ausserhalb der Maske sind Raum ausserhalb der Zelle. Für die Unterscheidung zwischen internalisiertem GFP und angehängtem GFP (ausserhalb der Zellmembran) wird die errechnete Maske erst um vier Pixel verkleinert, damit die gesamte Plasmamembran als extrazellulär angesehen wird. Nur so können an der Plasmamembran haftende GFP-*E. coli* von internalisierten GFP-*E. coli* differenziert werden. Jetzt wird die mittlere Intensität des GFP-Signals innerhalb dieser verkleinerten Zellmaske verglichen mit der mittleren Intensität des GFP-Signals der gesamten Zellmaske (inklusive Plasmamembran und etwas Raum ausserhalb der Plasmamembran). Dieses Verhältnis wird als Logarithmus ausgegeben. Je höher der Wert, desto mehr GFP-Signal ist innerhalb der Zelle, je tiefer der Wert, desto mehr GFP-Signal ist im Bereich der Zellmembran lokalisiert. Im Histogramm von Grafik 19 zeigen sich zwei

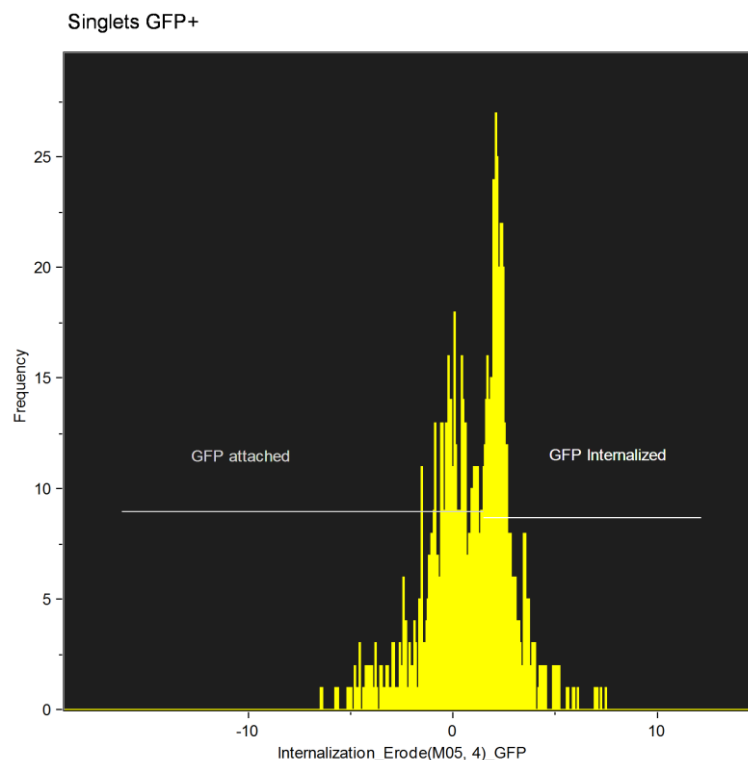


Abbildung 19 – Histogramm des Verhältnisses zwischen intrazellulärem GFP-Signal und GFP-Signal der gesamten Zelle inklusive Plasmamembran als Logarithmus. Dargestellt sind auch die beiden Gates für internalisiert (rechts) und angehängt (links).

Peaks, wobei der rechte Zellen entspricht, welche GFP-*E. coli* internalisiert haben und der linke solchen, welche GFP-*E. coli* an ihrer Plasmamembran angeheftet haben. Anhand der Bilder und der Überlagerung des Hellfeld- sowie des GFP-Kanales wird überprüft, ob die Gates für internalisiert bzw. angehängt korrekt gesetzt sind, also ob die als internalisiert markierten Zellen auch tatsächlich GFP internalisiert haben.

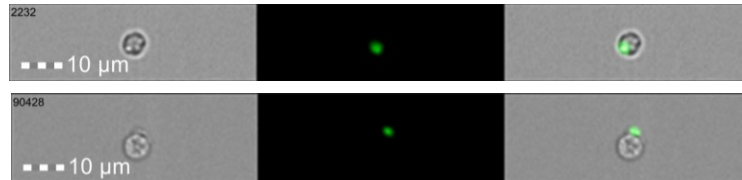


Abbildung 20 - Die obere Zelle hat GFP internalisiert, die untere Zelle hat GFP ausserhalb der Plasmamembran angeheftet. Links Hellfeldkanal, Mitte GFP-Kanal (grün), Rechts Überlagerung von Hellfeld- und GFP-Kanal.

CD11b / CD11c Streudiagramm, Gr-1 Histogramm

Jetzt wird jede Zelle anhand ihrer Fluoreszenzmarker weiter in Gruppen unterteilt. Dabei werden diejenigen Zellen, welche GFP internalisiert haben, diejenigen, welche GFP angeheftet haben und diejenigen, welche kein GFP aufweisen, separat nach den gleichen Gates sortiert. Als erster Schritt wird ein Streudiagramm mit der Intensität der Färbung für CD11c auf der x-Achse und der Intensität der Färbung für CD11b auf der y-Achse erstellt, wie es Abbildung 21 zeigt. Es wurde die mittlere Intensität im jeweiligen Fluoreszenzkanal im Bereich der Zellmaske gewählt. So wurde die mittlere Intensität kleiner Zellen nicht

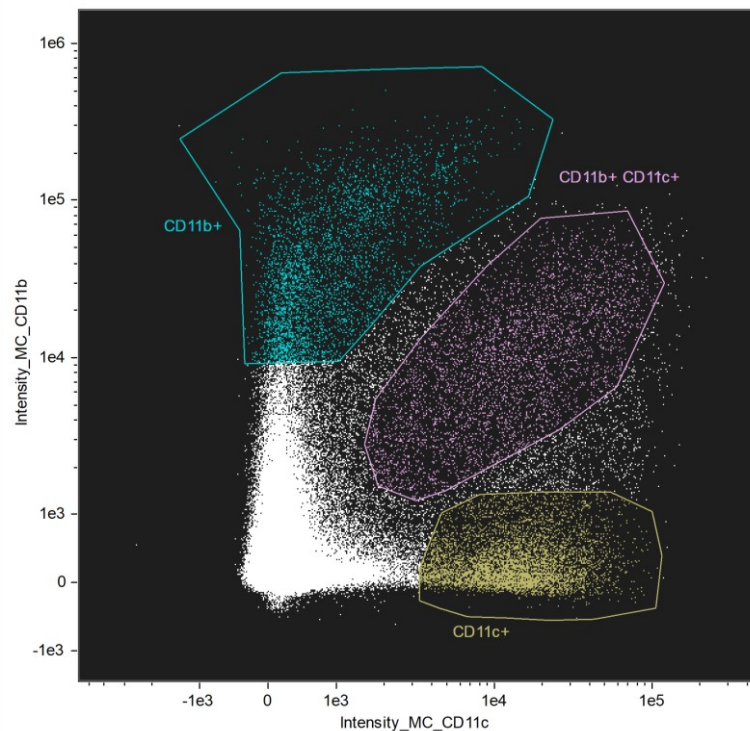


Abbildung 21 – Streudiagramm der Intensität der Färbung von CD11c auf der x-Achse und der Intensität der Färbung von CD11b auf der y-Achse. Dargestellt sind die drei Gates, jeder Punkt entspricht einer Zelle.

unterschätzt und die mittlere Intensität grosser Zellen nicht überschätzt, denn die Maske passt sich der Zellgrösse an. Hier werden drei Populationen ausgewählt: die CD11b⁻/CD11c⁺ Zellen, die CD11b⁺/CD11c⁺ Zellen und die CD11b⁺/CD11c⁻ Zellen. Die Zellen unten links im Streudiagramm zeigen keine Färbung für CD11c oder CD11b und werden nicht weiter analysiert.

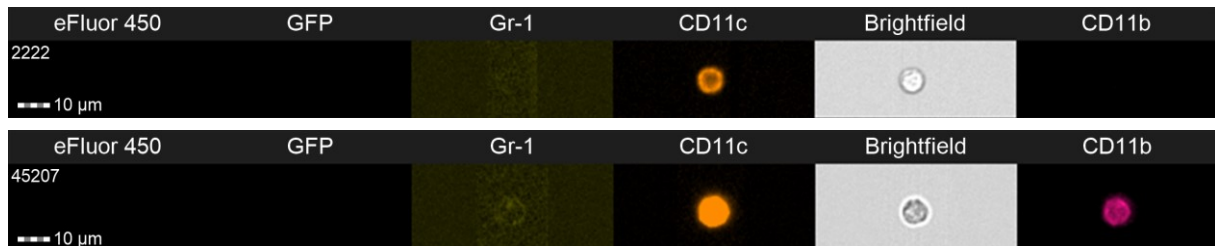


Abbildung 22 – Oben: Beispiel einer CD11b⁻/CD11c⁺ Zelle. Unten: Beispiel einer CD11b⁺/CD11c⁺ Zelle. Dargestellt sind alle Fluoreszenzkanäle sowie der Hellfeldkanal.

Die CD11b⁺/CD11c⁻ Zellen werden anschliessend weiter unterteilt in diejenigen, die Gr-1⁺ sind und diejenigen, die Gr-1⁻ sind (Siehe Abbildungen 23 und 24). Dies geschieht mittels eines Histogrammes, bei dem auf der x-Achse die Intensität der Färbung mittels Gr-1 aufgeführt ist. Es zeigen sich zwei Populationen, eine CD11b⁺/CD11c⁻/Gr-1⁻ sowie eine CD11b⁺/CD11c⁻/Gr-1⁺.

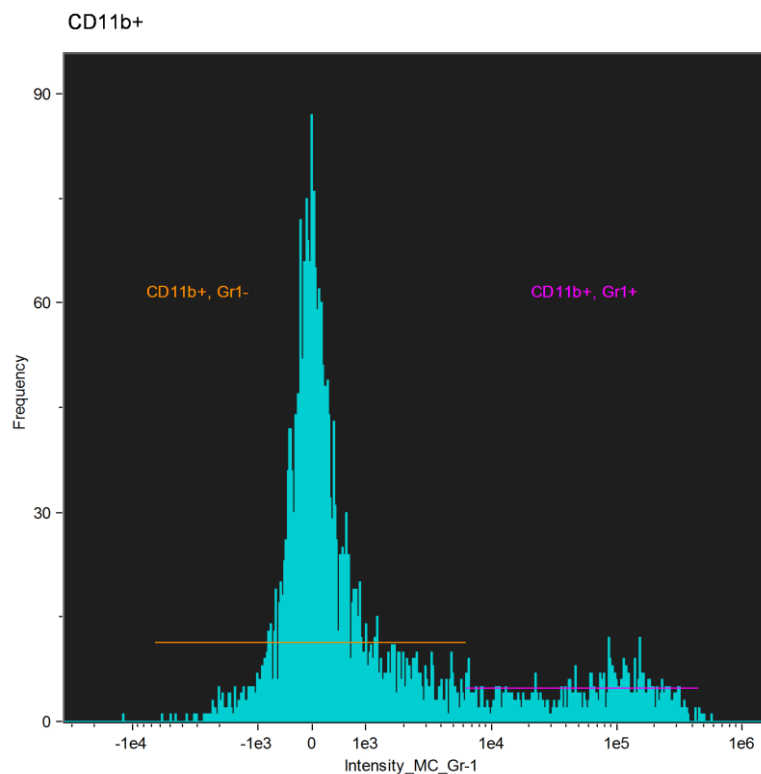


Abbildung 23 – Histogramm mit der Intensität der Färbung für Gr-1 auf der x-Achse und der relativen Häufigkeit auf der y-Achse. Dargestellt sind die beiden Gates für Gr-1⁺ sowie Gr-1⁻.

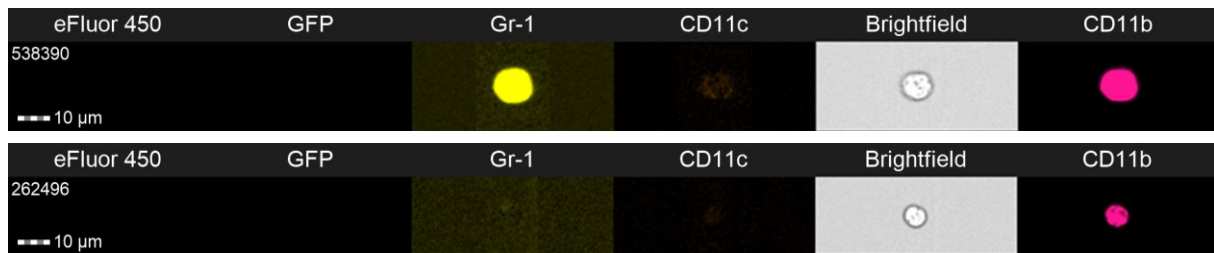


Abbildung 24 - Oben: Beispiel einer CD11b⁺/CD11c⁻/Gr-1⁺ Zelle. Unten: Beispiel einer CD11b⁺/CD11c⁻/Gr-1⁻ Zelle. Dargestellt sind alle Fluoreszenzkanäle sowie der Hellfeldkanal.

Die hier gezeigten Gates wurden für die einzelnen Organe angepasst, die grundsätzliche Gating-Strategie blieb jedoch dieselbe. Für verschiedene Proben eines Organes in verschiedenen experimentellen Bedingungen wurden die identischen Gates verwendet, damit ein quantitativer Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen möglich ist.

Gating-Strategie im Überstand

Nach dem Auflösen der Gewebeverbände in der Vorbereitung der Zellen für die Untersuchung wurde der Überstand der ersten Zentrifugation aufgefangen und bei höherer Drehzahl erneut zentrifugiert. Das dabei entstehende Pellet wurde aufgelöst und am ImageStream analysiert. Darin finden sich keine Zellen mehr, sondern allenfalls frei flotierende GFP-*E. coli* sowie Zelldetritus. Zur Detektion dieser GFP-*E. coli* wurde folgende Gating-Strategie angewandt. Diese unterscheidet sich stark von der oben beschriebenen Gating-Strategie, weil es sich hierbei nicht um Mäusezellen handelt, sondern lediglich um einzelne Bakterien. In Abbildung 25 ist ein Überblick über die Gating-Strategie dargestellt, welche später ausführlicher beschrieben wird.

E. Coli Gating-Strategie

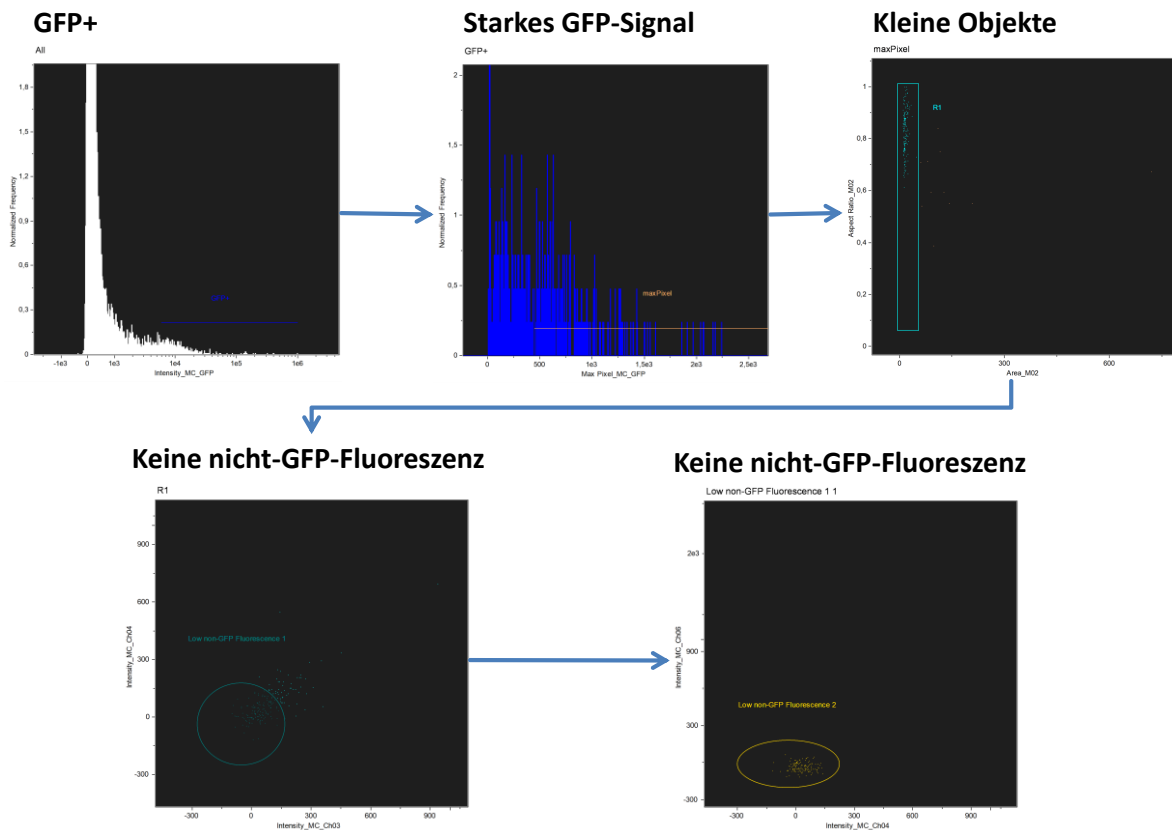


Abbildung 25 - Überblick über die Gating-Strategie zur Detektion von GFP-*E. coli* im Überstand. Die einzelnen Diagramme werden nachfolgend genauer erläutert.

Zuerst wurden diejenigen Objekte ausgewählt, welche im grünen Fluoreszenzkanal ein helles Signal abgaben. Der grosse Peak in Abbildung 26 kommt durch Zelldetritus zustande und soll für die weitere Analyse ausgeschlossen werden.

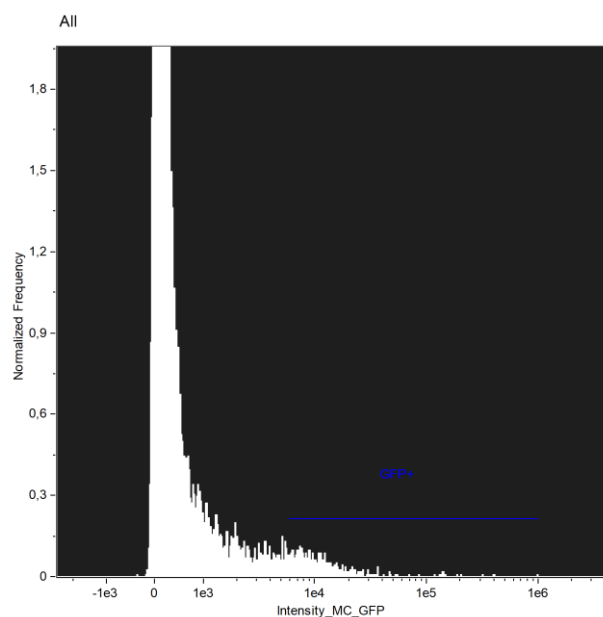


Abbildung 26 – Dargestellt sind alle aufgenommenen Daten als Histogramm mit der Intensität im grünen Fluoreszenzkanal als x-Achse und der relativen Häufigkeit als y-Achse. Die blaue Linie stellt das Gate dar, mit welchem GFP+ Objekte selektiert werden.

Als nächster Schritt wurden diejenigen Objekte ausgewählt, welche nicht nur eine hohe mittlere Intensität im grünen Fluoreszenzkanal aufweisen, sondern ein intensives hellstes Pixel im Bild haben, wie in Abbildung 27 dargestellt.

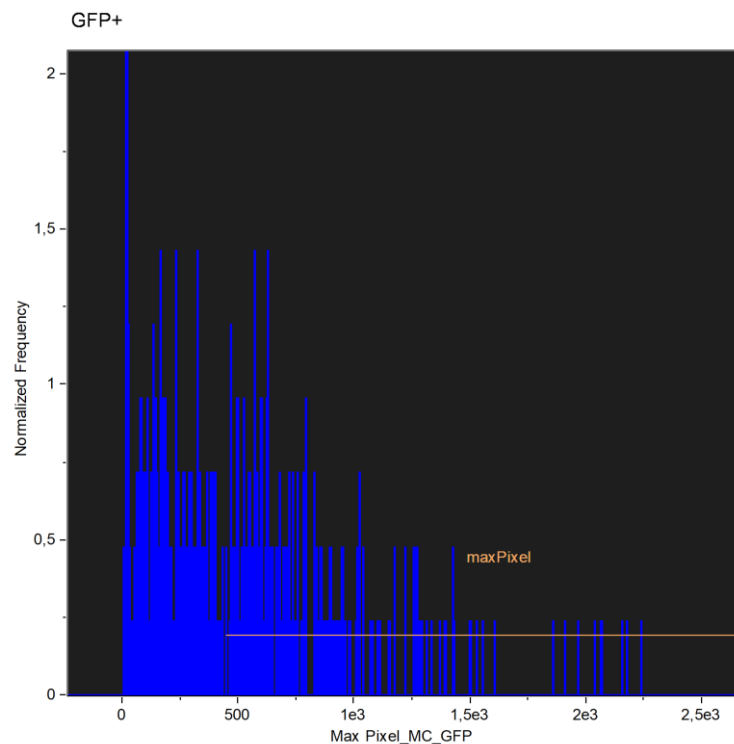


Abbildung 27 – GFP+ Objekte als Histogramm mit der Intensität des hellsten Pixels im Bild als x-Achse und der relativen Häufigkeit als y-Achse. In orange ist das Gate dargestellt, welches nur diejenigen Objekte auswählt, welche ein helles Pixel im GFP-Kanal aufweisen.

Im nächsten Schritt werden nun im Fläche zu Aspect Ratio-Diagramm diejenigen Objekte ausgewählt, welche eine geringe Fläche haben, also klein sind (siehe Abbildung 28).

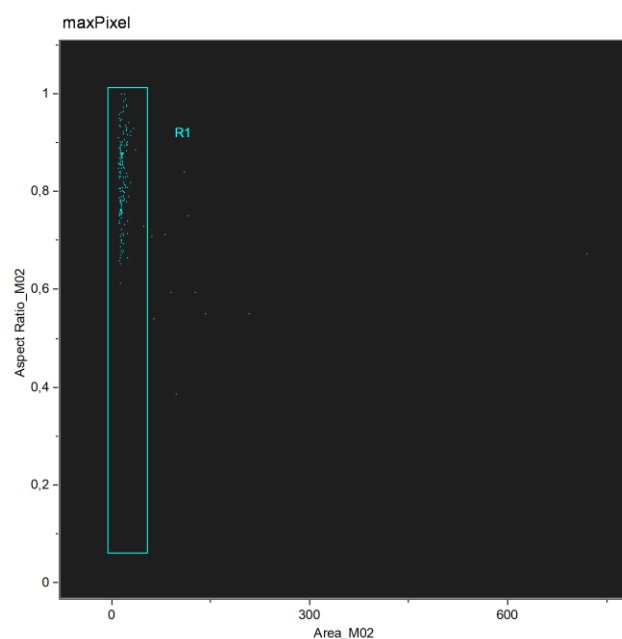


Abbildung 28 – Streudiagramm der gegateten Objekte aus Abbildung 27. x-Achse: Fläche des Objektes im Hellfeldkanal, y-Achse: Aspect Ratio des Objektes im Hellfeldkanal.

Zum Schluss werden noch alle Objekte ausgeschlossen, welche in anderen Fluoreszenzkanälen neben dem grünen Fluoreszenzkanal ein Signal abgeben. Dazu wurden Gates definiert, welche nur Zellen selektionieren, die in den Fluoreszenzkanälen 3, 4 und 6 kein Signal abgeben, wie in Grafik 29 dargestellt ist. Im Kanal 5 wurde das Hellfeld-Bild aufgenommen, somit kann dieser nicht ausgeschlossen werden.

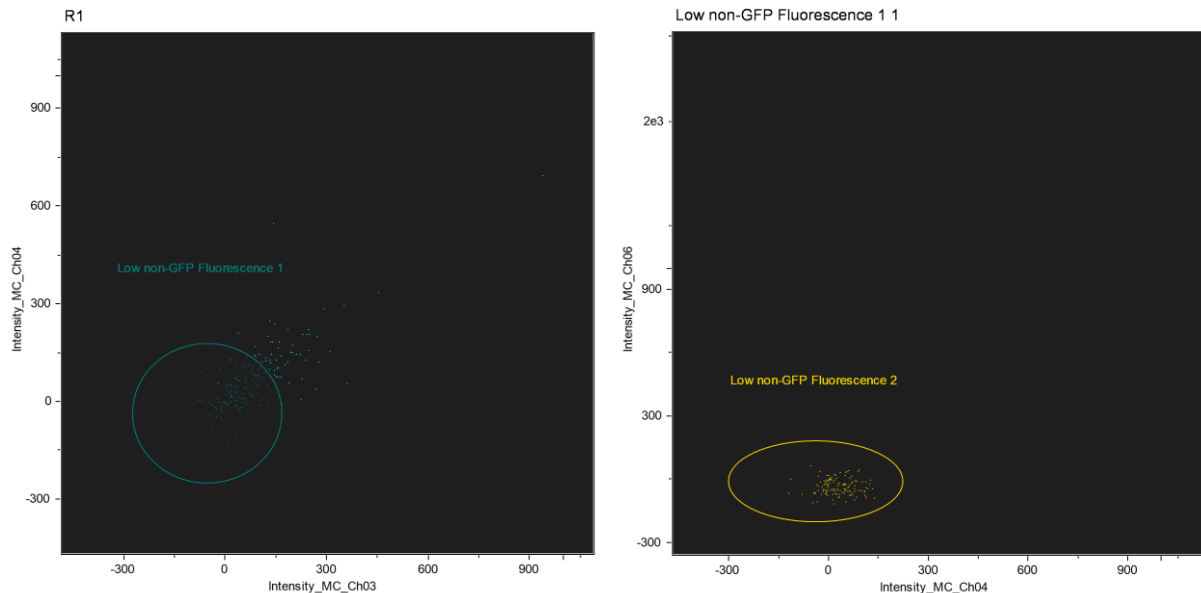


Abbildung 29 – Streudiagramm der gegateten Objekte aus Abbildung 28. Die Achsen zeigen die Intensitäten in den Fluoreszenzkanälen 3, 4 und 6 dar. Das rechte Streudiagramm verwendet die Objekte des Gates aus dem linken Streudiagramm.

Grafik 30 zeigt die durch obige Gating-Strategie aus dem Überstand von Peyer-Patches gewonnenen GFP-*E. coli*. Durch die grafische Darstellung im Hellfeldkanal (Kanal 5) kann verifiziert werden, dass es sich um bakterienähnliche Objekte handelt. Dazu haben sie im GFP-Kanal eine deutliche Fluoreszenz.

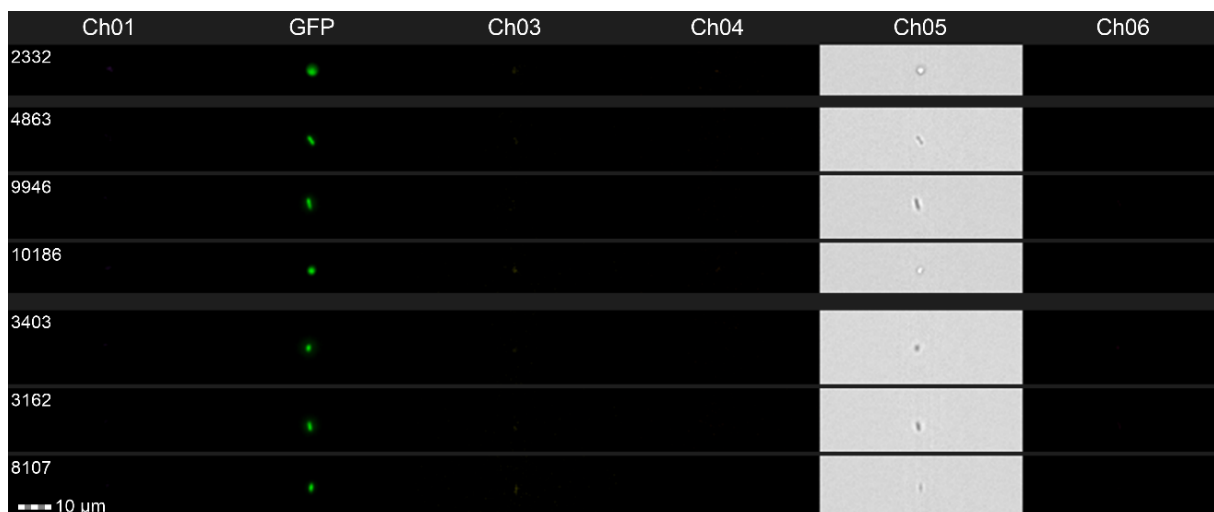


Abbildung 30 – Beispiele von gegateten GFP-*E. coli*. Dargestellt sind alle Fluoreszenzkanäle und der Hellfeldkanal (Ch05).

Statistik

Für die statistische Auswertung und die grafische Darstellung wurden sowohl Excel als auch GraphPad Prism Version 8.3.0 verwendet.

Um statistisch signifikante Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen der ImageStream®-Analyse zu finden, wurde der one-way-ANOVA (One-way analysis of variance) eingesetzt.⁹² Zur genauen Bestimmung der statistischen Signifikanz dieser Unterschiede wurde der Bonferroni's multiple comparisons test eingesetzt.⁹³ Um die statistische Signifikanz von Unterschieden zwischen den experimentellen Gruppen in der histologischen Untersuchung zu errechnen, wurde der t-Test genutzt. Resultate werden angegeben als Differenz der Mittelwerte zweier Gruppen mit dem zugehörigen p-Wert. Grafiken zeigen den Mittelwert mit der zugehörigen Standardabweichung. Die statistische Signifikanz der Differenz der Mittelwerte zweier Gruppen wird grafisch angegeben:

* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$. Andere Darstellungsweisen sind entsprechend gekennzeichnet.

Resultate

A) Route der Translokation: Detektion von 4 kDa FITC-Dextran bzw. GFP-*E. coli* in mesenterialen Lymphknoten und der Leber im Ileum-Loop-Experiment

In diesem Abschnitt werden die Resultate der histologischen und immunfluoreszenz-Untersuchung von Leber und mesenterialen Lymphknoten vorgestellt. Dargestellt wird jeweils der positive Pixelanteil, also der relative Anteil der Pixel, welche oberhalb des definierten Grenzwertes liegen. Verwendet wurde ein Grenzwert von 100 für alle Auswertungen. Dieser Grenzwert definiert, welche Pixel darüber liegen (positive Pixel) und welche darunter (negative Pixel). Anschliessend wird daraus der positive Pixelanteil errechnet.

1. GFP-*E. coli*

Die Unterschiede zwischen Leber und mesenterialen Lymphknoten sind nur in der CCL₄-Gruppe statistisch signifikant ($p=0,0477$). In der Kontrollgruppe unterscheiden sich die Mittelwerte von Leber und mesenterialen Lymphknoten um 0,1389 bei einem p-Wert von 0,0651. In der PPVL-Gruppe unterscheiden sich die Mittelwerte von Leber und mesenterialen Lymphknoten um 0,01122 bei einem p-Wert von 0,2815. In der BDL-Gruppe unterscheiden sich die Mittelwerte ebenfalls nicht statistisch signifikant voneinander, wie Abbildung 31 zeigt.

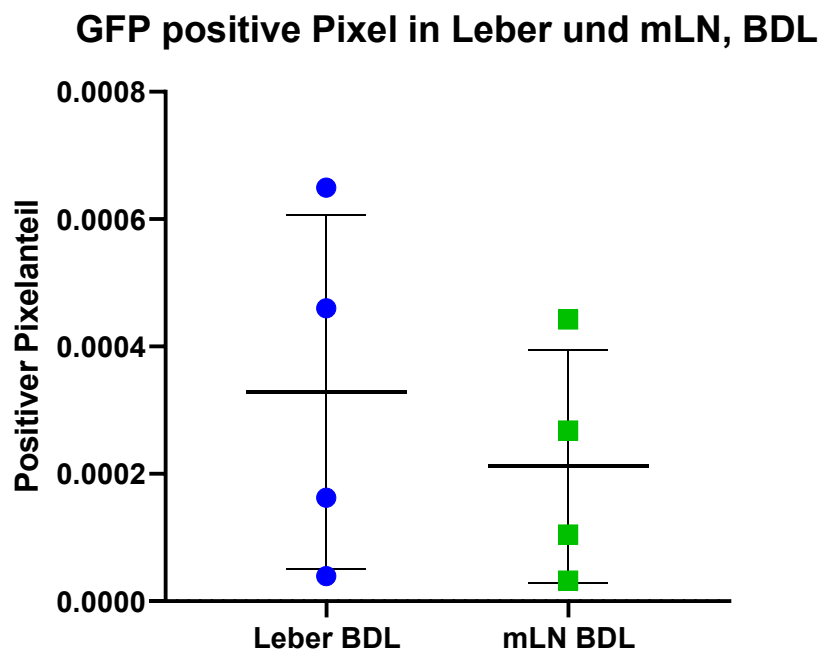


Abbildung 31 - Positiver Pixelanteil von Leber und mLN der BDL-Gruppe.

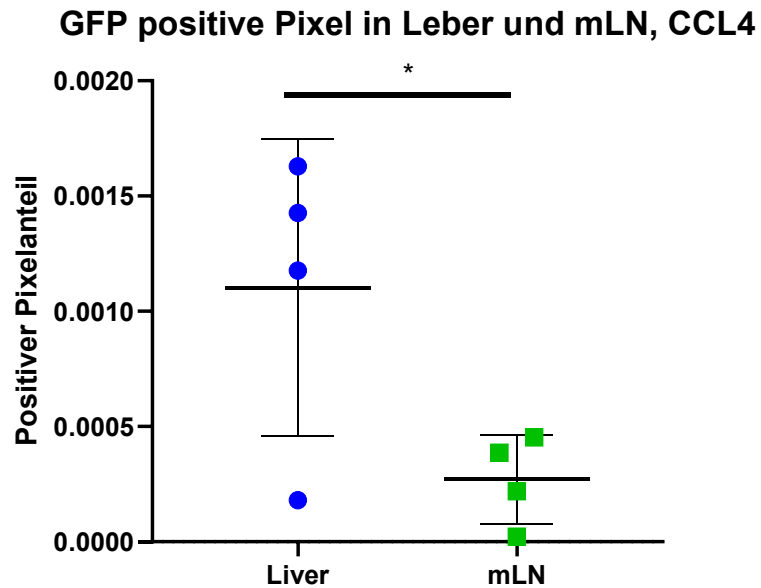


Abbildung 32 -Positiver Pixelanteil von Leber und mLN der CCL₄-Gruppe. * = p<0,05

Bei der CCL₄-Gruppe in Abbildung 32 zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Leber und mLN, wobei der Mittelwert der Leber höher ist als derjenige der mLN ($p=0,0477$). Bei der Leber gibt es einen Einzelwert, welcher deutlich tiefer ist als die anderen drei Werte. Dieser Wert kann statistisch nicht als eindeutiger Ausreisser klassifiziert werden, weshalb er in die Auswertung miteinbezogen worden ist. Die Experimente in den Proben der Leber zeigten eine grosse Streuung der Ergebnisse, welche in der Ctrl- und der PPVL-Gruppe am ausgeprägtesten ist und bei der BDL- und der CCL₄-Gruppe deutlich geringer ausfällt. Diese Streuung war bei den mLN deutlich kleiner ausgefallen, die Resultate lagen in allen experimentellen Gruppen viel näher beieinander.

Abbildung 33 zeigt die Unterschiede des positiven Pixelanteils innerhalb der mesenterialen Lymphknoten in den verschiedenen experimentellen Gruppen. Auffallend ist, dass die Werte in der Ctrl- sowie der PPVL-Gruppe eher homogen und tief sind und in der BDL- sowie der CCL₄-Gruppe heterogener verteilt sind und einen höheren Mittelwert aufweisen. Dabei unterscheiden sich die PPVL- und die CCL₄-Gruppe statistisch signifikant ($p=0,0311$, Bonferroni's multiple comparisons test). Die Ctrl und die CCL₄-Gruppe unterscheiden sich nicht signifikant ($p=0,22$), die weiteren Gruppen unterscheiden sich ebenfalls nicht signifikant voneinander.

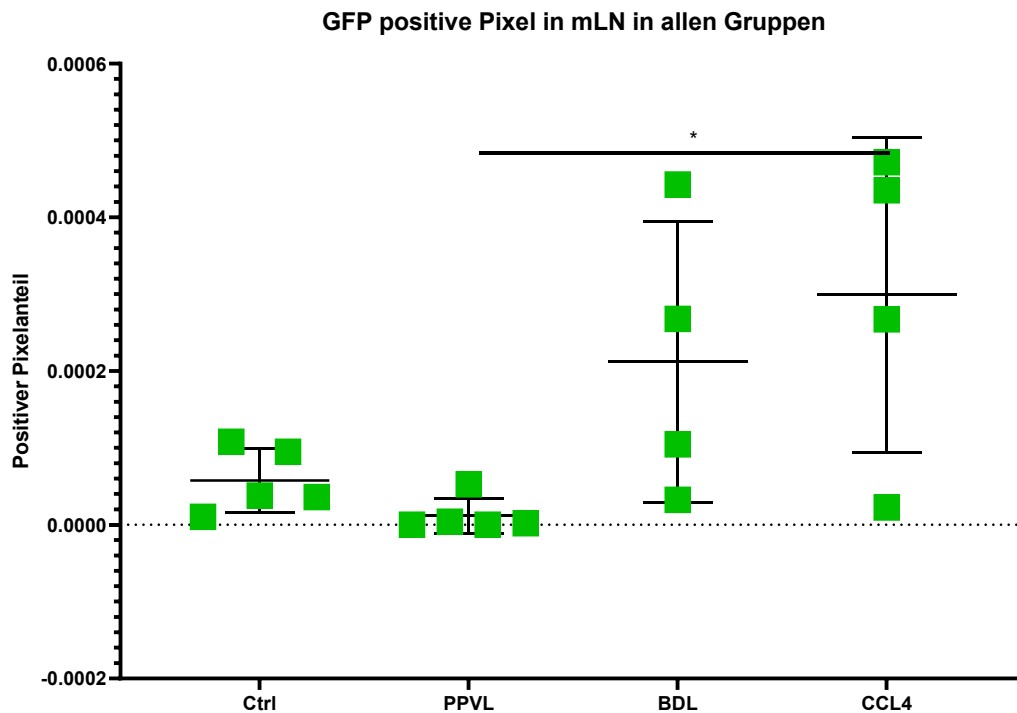


Abbildung 33 – Positiver Pixelanteil in den mesenterialen Lymphknoten für alle untersuchten experimentellen Gruppen des intestinalen Loops mit Injektion von GFP-*E. coli*. Ctrl: Kontrolle, PPVL: Partielle Portalvenenligatur, BDL: Gallengangligatur, CCL₄: Tetrachlormethan-induzierte Leberzirrhose. * = $p<0,05$

2. 4 kDa FITC-Dextran

Bei den intestinalen Loop-Experimenten mit Injektion von 4 kDa FITC-Dextran sind drei experimentelle Gruppen vorhanden: Ctrl, PPVL und BDL. Bei diesen fällt auf, dass die Einzelwerte der Leber deutlich heterogener verteilt sind als diejenigen der mesenterialen Lymphknoten. Die Verteilung ist in der Kontrollgruppe am heterogensten, gefolgt von der PPVL-Gruppe. In der BDL-Gruppe sind die Werte der Leber am wenigsten heterogen verteilt. Die Werte sind bei den mLN deutlich homogener verteilt. In allen experimentellen Gruppen unterscheiden sich Leber und mLN nicht statistisch signifikant voneinander. Der p-Wert (Vergleich Leber mit mLN) für die Ctrl-Gruppe beträgt 0,1380, derjenige für die PPVL-Gruppe beträgt 0,0646 und derjenige für die BDL-Gruppe beträgt 0,2169. Abbildung 34 zeigt den positiven Pixelanteil in mLN der verschiedenen experimentellen Gruppen bei Experimenten

mit Injektion von 4 kDa FITC-Dextran in den intestinalen Loop. Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind nicht signifikant.

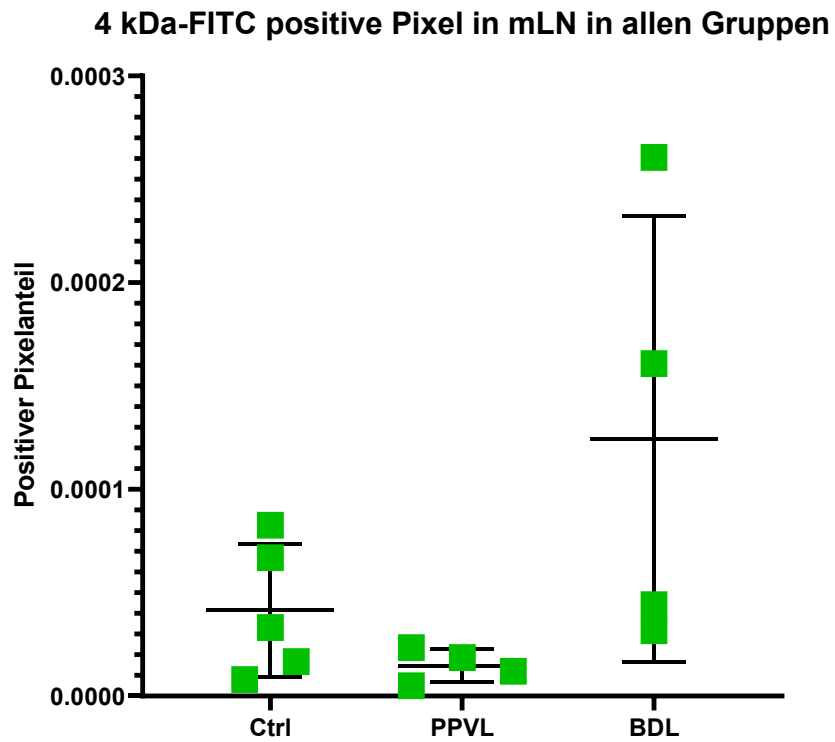


Abbildung 34 - Positiver Pixelanteil in den mesenterialen Lymphknoten für alle untersuchten experimentellen Gruppen des intestinalen Loops mit Injektion von GFP-*E. coli*. Ctrl: Kontrolle, PPVL: Partielle Portalvenenligatur, BDL: Gallengangligatur

B) Transport translozierender *E. coli* aus dem Ileum und involvierte Zellen bei gesunden, portal-hypertensiven und zirrhotischen Mäusen

Im folgenden Abschnitt werden die Resultate aus dem intestinalen Loop-Experiment mit Injektion von GFP-*E. coli* vorgestellt. Der Abschnitt ist unterteilt in die drei untersuchten Organe beziehungsweise Gewebe (mesenteriale Lymphknoten, Peyer-Patches, Blut) sowie den Überstand der ersten Zentrifugation. Es werden jeweils die Ergebnisse der drei verschiedenen experimentellen Gruppen Gallengangligatur (bile duct ligation, BDL), partielle Portalvenenligatur (partial portal vein ligation, PPVL) sowie der Kontrollgruppe (Ctrl) gezeigt.

Mesenteriale Lymphknoten

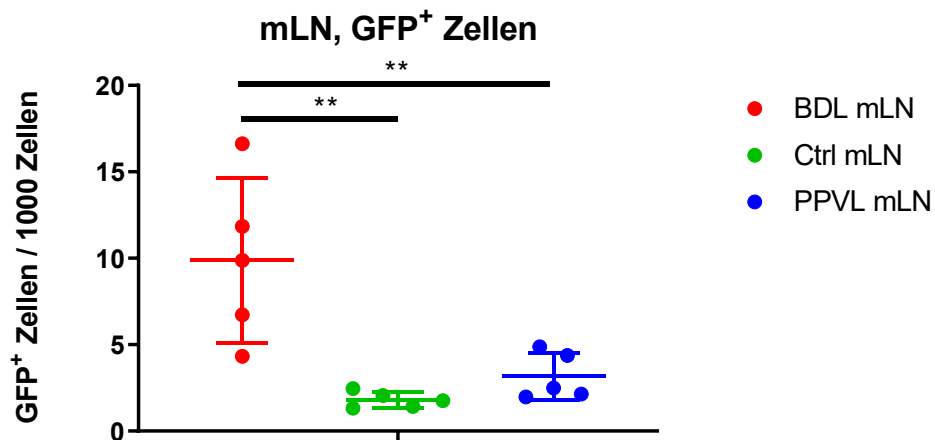


Abbildung 35 – Relative Häufigkeit GFP positiver Zellen in Proben der mesenterialen Lymphknoten (mLN) für die drei experimentellen Gruppen BDL (Gallengangligatur), PPVL (partielle Portalvenenligatur) und Ctrl (Kontrolle). ** = $p < 0,01$

Abbildung 35 zeigt die relative Anzahl GFP positiver Zellen in BDL, PPVL und Ctrl. Dies stellt diejenige Gruppe an Zellen dar, welche im Anschluss mittels der Internalisationsanalyse weiter differenziert wird in Zellen, welche GFP internalisiert haben und Zellen, welche GFP angehängt haben. Die Differenz der Mittelwerte zwischen BDL und PPVL sowie Ctrl ist statistisch signifikant bei einem p-Wert von 0,0023 für BDL gegen Ctrl und einem p-Wert von 0,0090 für BDL gegen PPVL. Die Variabilität der Daten ist in der BDL-Gruppe am grössten, die Werte in der Ctrl- sowie der PPVL-Gruppe sind homogener verteilt.

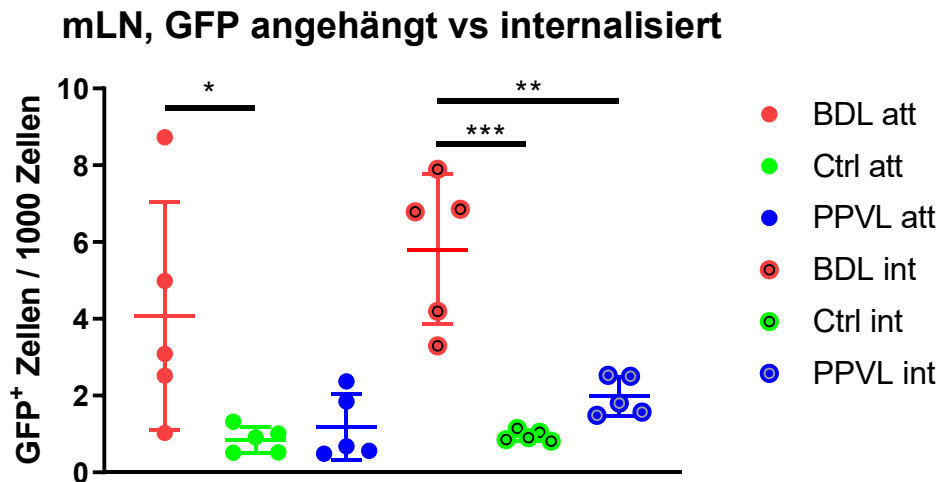


Abbildung 36 – Relative Häufigkeit der Zellen, die GFP internalisiert (int) beziehungsweise angehängt (att) haben für die drei experimentellen Gruppen BDL, PPVL und Ctrl. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,001$**

Abbildung 36 zeigt die Aufteilung der Zellen nach der Internalisationsanalyse in diejenigen, die GFP angehängt und diejenigen, die GFP internalisiert haben für die drei experimentellen Gruppen. Wiederum sind die Werte in der BDL-Gruppe heterogener verteilt als in der PPVL- und Ctrl-Gruppe. Bei den Zellen, welche GFP angehängt haben, unterscheiden sich die BDL- und die Ctrl-Gruppe signifikant voneinander mit einem p-Wert von 0,0451. Bei den Zellen, welche GFP internalisiert haben, unterscheidet sich die BDL-Gruppe signifikant von der Ctrl- sowie von der PPVL-Gruppe ($p = 0,0005$ und $p = 0,008$). Die relative Anzahl Zellen, welche GFP internalisiert haben, ist in der BDL-Gruppe deutlich höher als in den beiden anderen Gruppen. Die gleichen experimentellen Gruppen unterscheiden sich zwischen angehängt und internalisiert nicht signifikant voneinander. Ebenfalls unterscheiden sich die Ctrl- und die PPVL-Gruppe sowohl bei GFP internalisiert als auch bei GFP angehängt nicht signifikant voneinander.

Die weitere Aufteilung derjenigen Zellen, die GFP internalisiert haben anhand der Fluoreszenzmarker CD11b, CD11c sowie Gr-1 ergibt folgende relative Häufigkeit der entsprechenden Zellen wie in Abbildung 37 dargestellt.

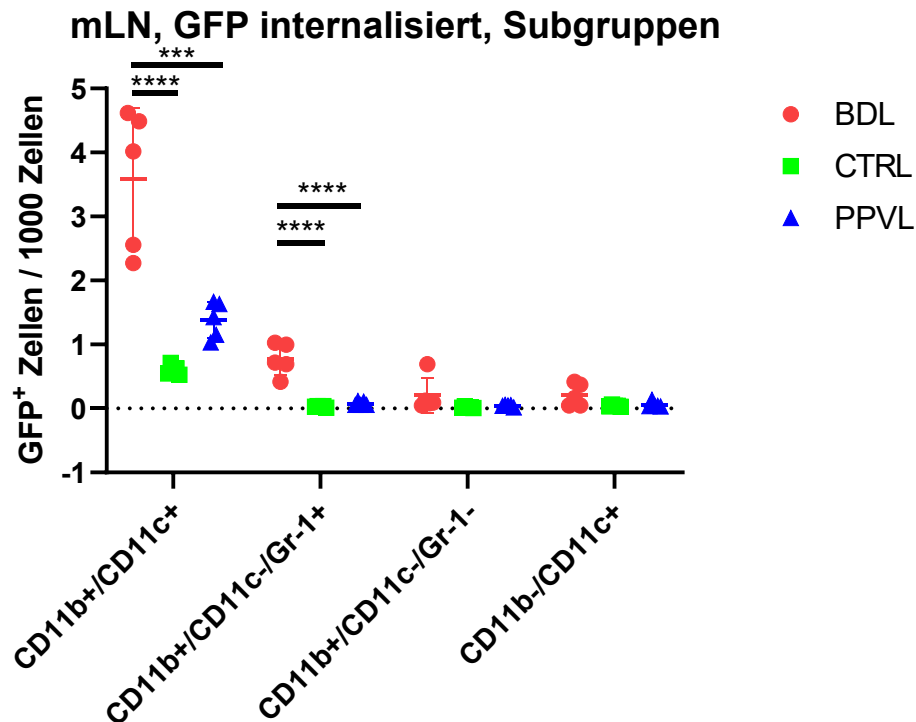


Abbildung 37 – Relative Häufigkeit der Zellen aus mLN, welche GFP internalisiert haben aufgeteilt in die vier Subgruppen anhand der Marker CD11b, CD11c sowie Gr-1 wie im Kapitel «Analyse der Daten mittels IDEAS®» beschrieben. Für jede der Subgruppen ist die relative Häufigkeit der Zellen in den drei experimentellen Gruppen dargestellt. *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$

Abbildung 37 zeigt nur Daten von Zellen, welche GFP internalisiert haben. In der Subgruppe der CD11b⁺/CD11c⁺ Zellen unterscheidet sich die BDL-Gruppe signifikant von der PPVL- ($p = 0,0006$) sowie der Ctrl-Gruppe ($p < 0,0001$). Die PPVL- und die Ctrl-Gruppe unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. In der Subgruppe der CD11b⁺/CD11c⁻/Gr-1⁺ Zellen unterscheidet sich die BDL-Gruppe ebenfalls signifikant von der PPVL- ($p < 0,0001$) sowie der Ctrl-Gruppe ($p < 0,0001$). Die PPVL- und die Ctrl-Gruppe unterscheiden sich auch hier nicht signifikant voneinander. In der Subgruppe der CD11b⁺/CD11c⁻/Gr-1⁻ Zellen unterscheiden sich die experimentellen Gruppen nicht signifikant voneinander. Auch in der Subgruppe der CD11b⁻/CD11c⁺ Zellen unterscheiden sich die experimentellen Gruppen nicht signifikant voneinander. Des Weiteren fällt auf, dass die Zellen der Subgruppe CD11b⁺/CD11c⁺ mit Abstand am häufigsten vertreten sind, über alle experimentellen Gruppen hinweg.

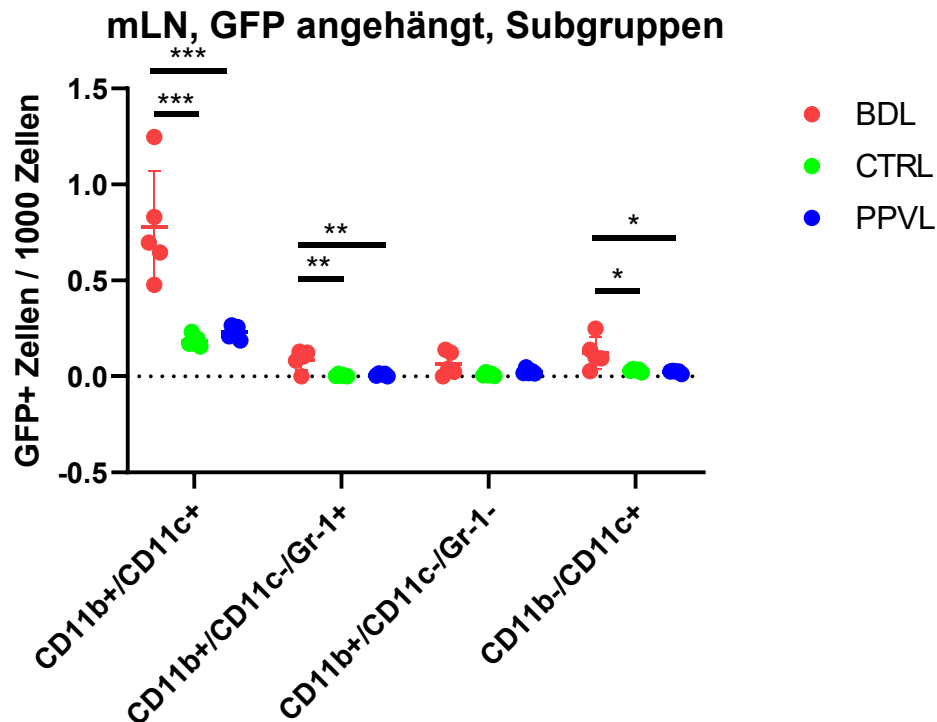


Abbildung 38 - Relative Häufigkeit der Zellen aus mLN, welche GFP angehängt haben aufgeteilt in die vier Subgruppen anhand der Marker CD11b, CD11c sowie Gr-1 wie im Kapitel «Analyse der Daten mittels IDEAS®» beschrieben. Für jede der Subgruppen ist die relative Häufigkeit der Zellen in den drei experimentellen Gruppen dargestellt. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,001$**

Abbildung 38 zeigt nur Daten von Zellen, welche GFP an der Aussenseite der Plasmamembran angehängt haben. In der Subgruppe der CD11b⁺/CD11c⁺ Zellen unterscheidet sich die BDL-Gruppe signifikant von der PPVL- ($p = 0,0008$) sowie der Ctrl-Gruppe ($p = 0,0004$). Die PPVL- und die Ctrl-Gruppe unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. In der Subgruppe der CD11b⁺/CD11c⁻/Gr-1⁺ Zellen unterscheidet sich die BDL-Gruppe ebenfalls signifikant von der PPVL- ($p = 0,0046$) sowie der Ctrl-Gruppe ($p = 0,0032$). Die PPVL- und die Ctrl-Gruppe unterscheiden sich auch hier nicht signifikant voneinander. In der Subgruppe der CD11b⁺/CD11c⁻/Gr-1⁻ Zellen unterscheiden sich die experimentellen Gruppen nicht signifikant voneinander. In der Subgruppe der CD11b⁻/CD11c⁺ Zellen unterscheidet sich die BDL-Gruppe signifikant von der PPVL- ($p = 0,0204$) sowie der Ctrl-Gruppe ($p = 0,0332$). Auch hier fällt auf, dass die Zellen der Subgruppe CD11b⁺/CD11c⁺ am häufigsten vertreten sind, über alle experimentellen Gruppen hinweg.

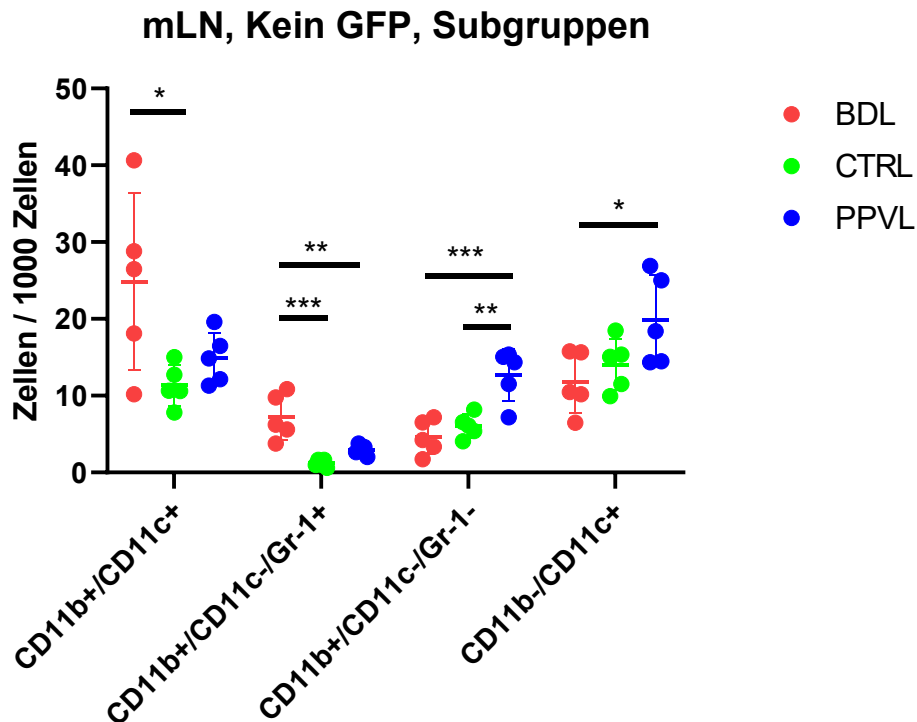


Abbildung 39 - Relative Häufigkeit der Zellen aus mLN, welche kein GFP enthalten, aufgeteilt in die vier Subgruppen anhand der Marker CD11b, CD11c sowie Gr-1 wie im Kapitel «Analyse der Daten mittels IDEAS®» beschrieben. Für jede der Subgruppen ist die relative Häufigkeit der Zellen in den drei experimentellen Gruppen dargestellt. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$

Die Abbildung 39 zeigt nun diejenigen Zellen, welche kein GFP enthalten, aufgeteilt in die vier Subgruppen. Diese Zellen weisen nirgendwo im Bild ein GFP-Signal auf.

In der Subgruppe der CD11b⁺/CD11c⁺ Zellen unterscheidet sich die BDL-Gruppe signifikant von der Ctrl-Gruppe ($p = 0,0327$). Die BDL-Gruppe unterscheidet sich jedoch nicht signifikant von der PPVL-Gruppe und die Ctrl- sowie die PPVL-Gruppe unterscheiden sich ebenfalls nicht signifikant voneinander. In der Subgruppe der CD11b⁺/CD11c⁻/Gr-1⁻ Zellen unterscheidet sich die BDL-Gruppe signifikant von der PPVL- ($p = 0,0065$) als auch von der Ctrl-Gruppe ($p = 0,0005$). Die PPVL und die Ctrl-Gruppe unterscheiden sich nicht signifikant. In der Subgruppe der CD11b⁺/CD11c⁻/Gr-1⁺ Zellen unterscheidet sich die PPVL-Gruppe signifikant von der BDL- ($p = 0,0008$) sowie der Ctrl-Gruppe ($p = 0,0040$). Die BDL- und die Ctrl-Gruppe unterscheiden sich hier nicht signifikant voneinander. In der Subgruppe der CD11b⁻/CD11c⁺ Zellen unterscheidet sich die PPVL-Gruppe signifikant von der BDL-Gruppe ($p = 0,0455$), jedoch nicht von der Ctrl-Gruppe. Die BDL- und die Ctrl-Gruppe unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

Die relative Häufigkeit der Zellen ohne GFP ist über alle experimentellen Gruppen hinweg deutlich höher als die relative Häufigkeit der Zellen mit GFP.

Peyer-Patches

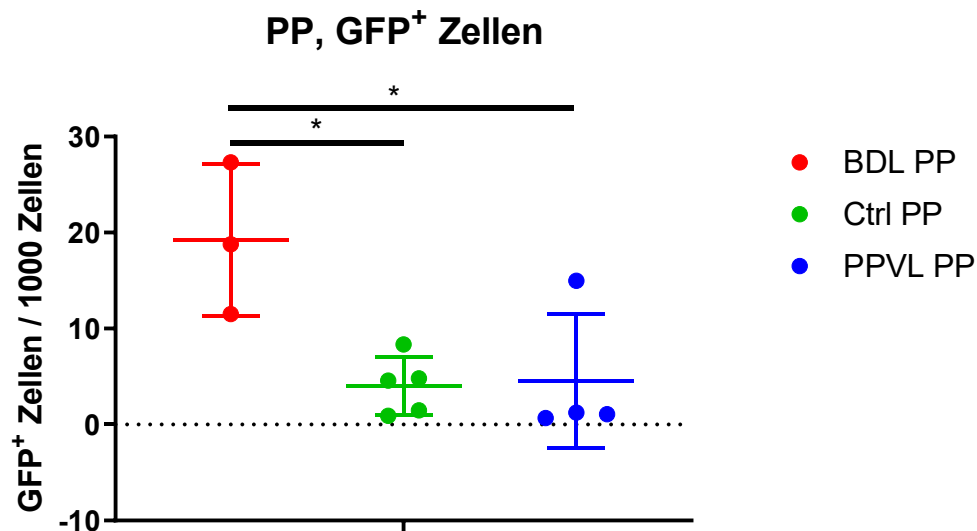


Abbildung 40 - Relative Häufigkeit GFP positiver Zellen in Proben der Peyer-Patches (PP) für die drei experimentellen Gruppen BDL (Gallengangligatur), PPVL (partielle Portalvenenligatur) und Ctrl (Kontrolle). * = $p < 0,05$

Abbildung 40 zeigt die relative Anzahl GFP positiver Zellen in der Zellsuspension aus Peyer-Patches des Ileums in BDL, PPVL und Ctrl. Diese GFP⁺ Zellen werden anschliessend für die Internalisationsanalyse weiterverwendet. Die unterschiedliche Probenanzahl zwischen den Gruppen kommt dadurch zustande, dass in BDL und PP nicht bei allen Mäusen makroskopisch abgrenzbare Peyer-Patches identifiziert werden konnten. Die BDL-Gruppe unterscheidet sich signifikant von der PPVL- ($p = 0,0281$) sowie der Ctrl-Gruppe ($p = 0,0186$). Die Ctrl- und die PPVL-Gruppe unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Vergleicht man Abbildung 40 mit Abbildung 35, so fällt auf, dass die Variabilität der Werte in der Ctrl- und PPVL-Gruppe in den Peyer-Patches-Proben grösser ist als in den mLN-Proben. Die Variabilität in den BDL-Proben ist in beiden Geweben relativ gross.

PP, GFP angehängt vs internalisiert

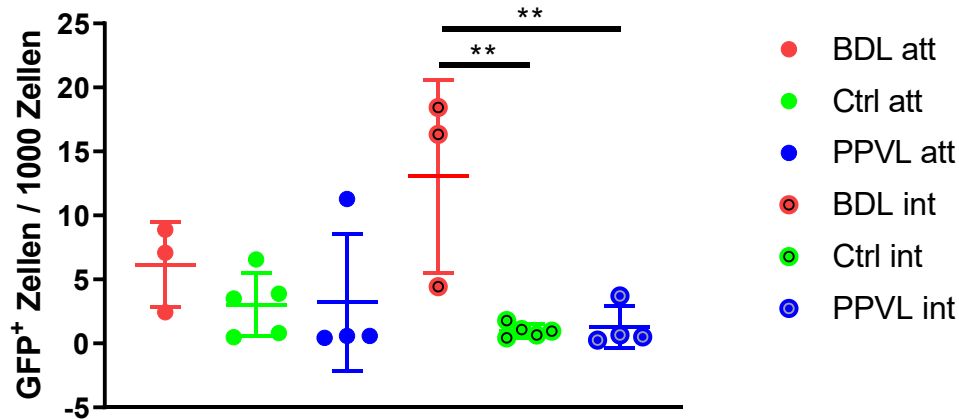


Abbildung 41 - Relative Häufigkeit der Zellen aus Peyer-Patches, die GFP internalisiert (int) beziehungsweise angehängt (att) haben für die drei experimentellen Gruppen BDL, PPVL und Ctrl. ** = $p < 0,01$

Abbildung 41 zeigt die Aufteilung der Zellen nach der Internalisationsanalyse in diejenigen, die GFP angehängt und diejenigen, die GFP internalisiert haben für die drei experimentellen Gruppen. In der Subgruppe der Zellen, welche GFP angehängt haben, unterscheiden sich die drei experimentellen Gruppen nicht signifikant voneinander und die Werte sind in allen Gruppen ähnlich verteilt mit einem Ausreisser nach oben in der PPVL-Gruppe. In der Subgruppe der Zellen, welche GFP internalisiert haben, unterscheidet sich die BDL-Gruppe signifikant von der PPVL- ($p = 0,0072$) sowie der Ctrl-Gruppe ($p = 0,0046$). Hier sind die Werte in der PPVL- und der Ctrl-Gruppe deutlich homogener verteilt als in der BDL-Gruppe und der gesamten Subgruppe der Zellen, welche GFP angehängt haben.

Die Aufteilung der Zellen, welche GFP internalisiert haben in die Subgruppen anhand der Fluoreszenzmarker ist in Abbildung 42 ersichtlich.

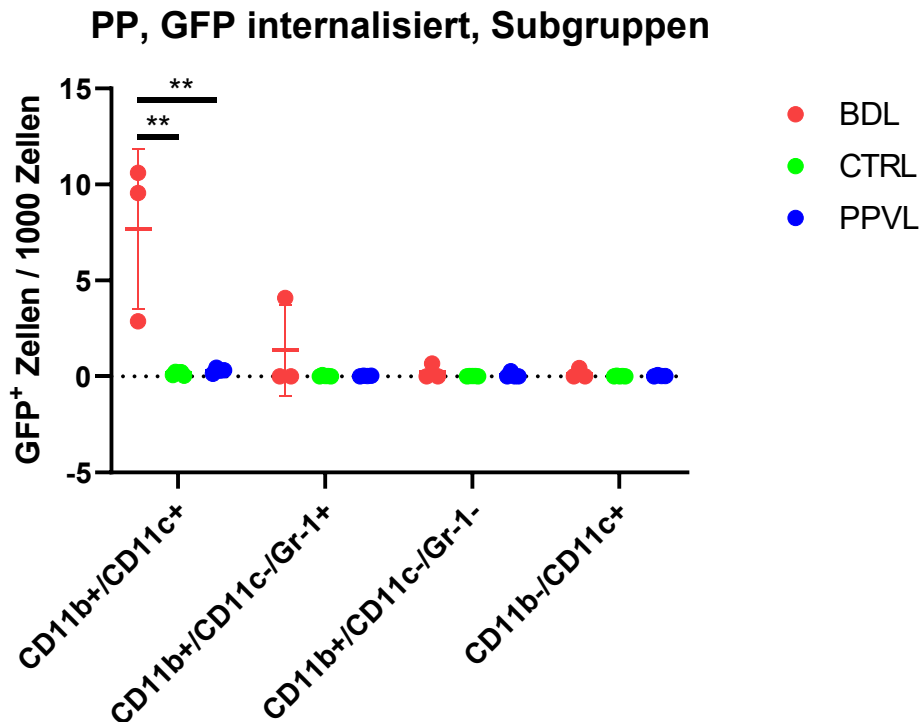


Abbildung 42 - Relative Häufigkeit der Zellen aus Peyer-Patches, welche GFP internalisiert haben aufgeteilt in die vier Subgruppen anhand der Marker CD11b, CD11c sowie Gr-1 wie im Kapitel «Analyse der Daten mittels IDEAS®» beschrieben. Für jede der Subgruppen ist die relative Häufigkeit der Zellen in den drei experimentellen Gruppen dargestellt. ** = $p < 0,01$

Bereits in Abbildung 41 war zu sehen, dass in der BDL-Gruppe am meisten Zellen vorhanden sind, die GFP internalisiert haben. In Abbildung 42 zeigt sich nun, dass diese Zellen zum grössten Teil positiv sind für CD11b und CD11c. In der Subgruppe der CD11b⁺/CD11c⁺ Zellen unterscheidet sich die BDL-Gruppe signifikant von der PPVL- ($p = 0,0026$) sowie der Ctrl-Gruppe ($p = 0,0017$). In den anderen Subgruppen unterscheiden sich die experimentellen Gruppen nicht signifikant voneinander. In der Subgruppe der CD11b⁺/CD11c⁻/Gr-1⁺ Zellen sind die Ctrl- sowie die PPVL-Gruppe homogen verteilt bei Werten um 0 Zellen/1000 lebende Zellen, in der BDL-Gruppe gibt es jedoch einen erhöhten Wert sowie zwei Werte, welche ebenfalls um 0 Zellen/1000 lebende Zellen liegen. Der erhöhte Wert stammt aus dem gleichen Versuchstier, welches den zweithöchsten Wert in der BDL-Gruppe in der Subgruppe der CD11b⁺/CD11c⁺ Zellen aufweist. Die Werte in der Subgruppe der CD11b⁺/CD11c⁻/Gr-1⁻ sowie der CD11b⁻/CD11c⁺ Zellen liegen alle im Bereich um 0 Zellen/1000 lebende Zellen.

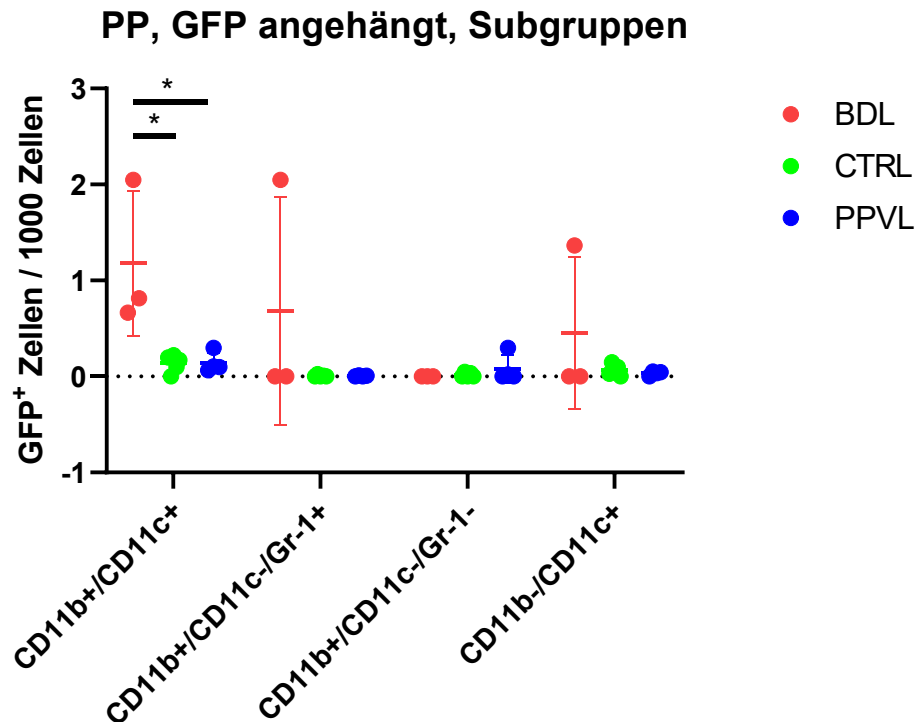


Abbildung 43 - Relative Häufigkeit der Zellen aus Peyer-Patches, welche GFP angehängt haben aufgeteilt in die vier Subgruppen anhand der Marker CD11b, CD11c sowie Gr-1 wie im Kapitel «Analyse der Daten mittels IDEAS®» beschrieben. Für jede der Subgruppen ist die relative Häufigkeit der Zellen in den drei experimentellen Gruppen dargestellt. * = $p < 0,05$

In Abbildung 41 zeigten sich keine Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen bei den Zellen, welche GFP angehängt haben. Nach Aufteilung dieser Zellen in die verschiedenen Subgruppen anhand ihrer Fluoreszenzmarker zeigt sich in Abbildung 43 ein statistisch signifikanter Unterschied in der Subgruppe der CD11b⁺/CD11c⁺ Zellen zwischen der BDL-Gruppe und der PPVL- ($p = 0,0152$) sowie der Ctrl-Gruppe ($p = 0,0115$). In den anderen Subgruppen unterscheiden sich die experimentellen Gruppen nicht statistisch signifikant voneinander. Auffällig sind die Werte eines BDL-Versuchstieres, welche in drei der vier Subgruppen deutlich höher sind als die Werte der anderen BDL-Versuchstiere. Es handelt sich dabei um das gleiche Versuchstier, welches in Abbildung 42 in der Subgruppe der CD11b⁺/CD11c⁻/Gr-1⁺ Zellen einen erhöhten Wert aufweist. Die relative Häufigkeit der Zellen, welche GFP angehängt haben, ist hier tief verglichen mit der relativen Häufigkeit der Zellen, welche GFP internalisiert haben.

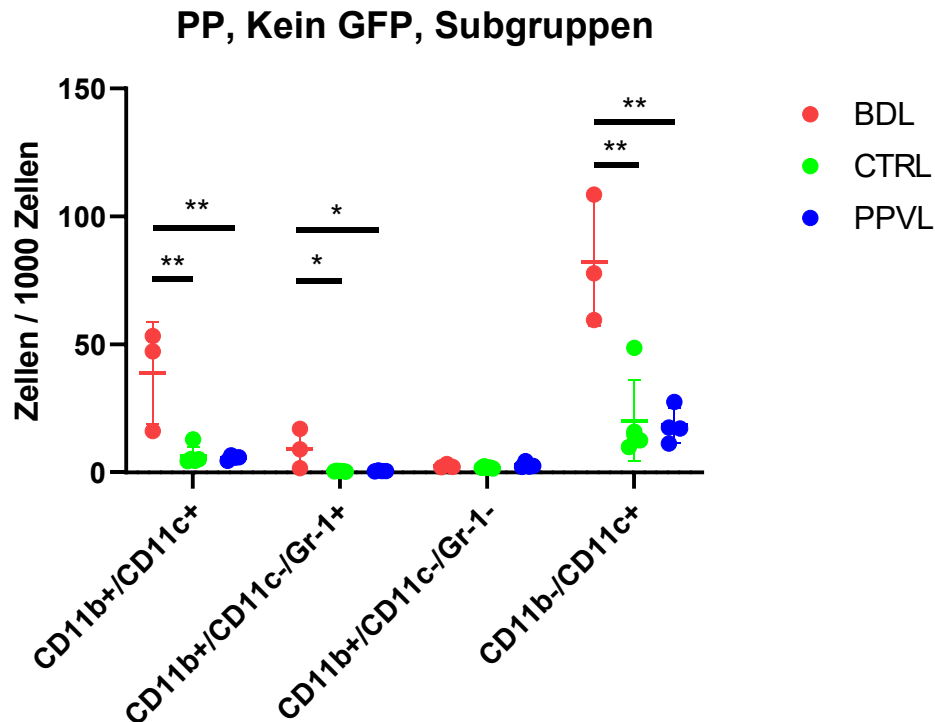


Abbildung 44 - Relative Häufigkeit der Zellen aus Peyer-Patches, welche kein GFP enthalten, aufgeteilt in die vier Subgruppen anhand der Marker CD11b, CD11c sowie Gr-1 wie im Kapitel «Analyse der Daten mittels IDEAS®» beschrieben. Für jede der Subgruppen ist die relative Häufigkeit der Zellen in den drei experimentellen Gruppen dargestellt. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$

Die Aufteilung der Zellen ohne GFP-Signal in die Subgruppen ergibt die in der Abbildung 44 dargestellten Werte. In der Subgruppe der CD11b⁺/CD11c⁺ Zellen unterscheidet sich die BDL-Gruppe statistisch signifikant von der PPVL- ($p = 0,0046$) sowie der Ctrl-Gruppe ($p = 0,0040$), wobei sich die PPVL- und die Ctrl-Gruppe nicht signifikant voneinander unterscheiden. In der Subgruppe der CD11b⁺/CD11c⁻/Gr-1⁺ Zellen unterscheidet sich die BDL-Gruppe ebenfalls statistisch signifikant von der PPVL- ($p = 0,0370$) sowie der Ctrl-Gruppe ($p = 0,0279$), wobei sich die PPVL- und die Ctrl-Gruppe wiederum nicht signifikant unterscheiden. In der Subgruppe der CD11b⁺/CD11c⁻/Gr-1⁻ Zellen unterscheiden sich alle drei experimentellen Gruppen nicht statistisch signifikant voneinander. Auffällig ist die Subgruppe der CD11b⁻/CD11c⁺ Zellen. Hier unterscheidet sich die BDL-Gruppe statistisch signifikant von der PPVL- ($p = 0,0019$) und von der Ctrl-Gruppe ($p = 0,0017$), währenddem sich die Ctrl- und die PPVL-Gruppe nicht statistisch signifikant voneinander unterscheiden.

Peripheres Blut

Im peripheren Blut konnten keine GFP-*E. coli* morphologisch identifiziert werden. Die wenigen als GFP⁺ identifizierten Zellen wurden anhand der Bilder geprüft und als unspezifisch positiv befunden.

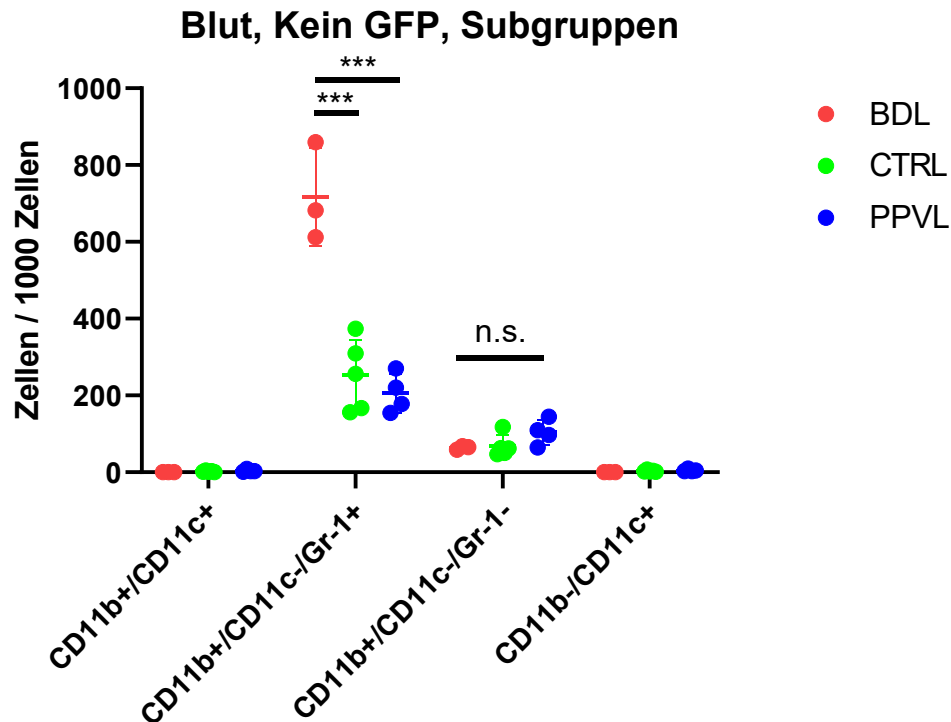


Abbildung 45 - Relative Häufigkeit der Zellen aus peripherem Blut, welche kein GFP enthalten, aufgeteilt in die vier Subgruppen anhand der Marker CD11b, CD11c sowie Gr-1 wie im Kapitel «Analyse der Daten mittels IDEAS®» beschrieben. Für jede der Subgruppen ist die relative Häufigkeit der Zellen in den drei experimentellen Gruppen dargestellt. *** = $p < 0,001$, n.s.: nicht signifikant

Werden die Zellen, welche kein GFP aufweisen, in ihre Subgruppen differenziert, zeigen sich Unterschiede wie in Abbildung 45 aufgeführt. In der Subgruppe der CD11b⁺/CD11c⁻/Gr-1⁺ Zellen unterscheidet sich die BDL-Gruppe statistisch signifikant von der PPVL- ($p = 0,0001$), wie auch von der Ctrl-Gruppe ($p = 0,0002$). Die anderen Gruppen unterscheiden sich jeweils nicht statistisch signifikant voneinander. Auffallend ist, dass die Subgruppen der CD11b⁺/CD11c⁺ Zellen sowie der CD11b⁻/CD11c⁺ Zellen praktisch keine Zellen enthalten, währenddem die Subgruppe der CD11b⁺/CD11c⁻/Gr-1⁺ am meisten Zellen enthält, gefolgt von der Subgruppe der CD11b⁺/CD11c⁻/Gr-1⁻ Zellen.

Überstand

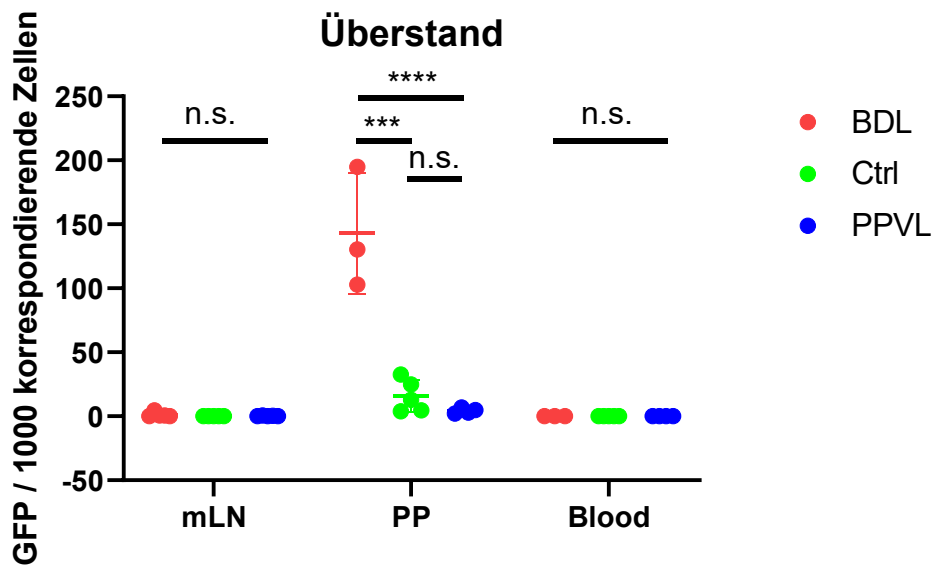


Abbildung 46 – Relative Häufigkeit von GFP-*E. coli* im Überstand der ersten Zentrifugation aus mLN, PP und Blut für die drei experimentellen Gruppen BDL, PPVL und Ctrl. *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$, n.s.: nicht signifikant

Der Überstand der ersten Zentrifugation nach der Auflösung der Gewebeverbände wurde separiert, bei höherer Drehzahl erneut zentrifugiert und das aufgelöste Pellet am ImageStream® gleichentags analysiert (siehe Abschnitt «Vorbereitung der Zellen» für weitere Informationen hierzu). Die Gating-Strategie für die GFP-*E. coli* ist im Abschnitt «Gating-Strategie im Überstand» beschrieben. Abbildung 46 zeigt die Resultate dieser Analyse in Anzahl GFP-*E. coli* pro 1000 Zellen der korrespondierenden Zellsuspension, denn der Überstand enthält keine Zellen mehr.

In den mLN-Proben konnten keine GFP-*E. coli* nachgewiesen werden. Die wenigen positiven Signale erwiesen sich bei der morphologischen Beurteilung als falsch-positive Signale. Ebenfalls konnten in den Blutproben keine GFP-*E. coli* nachgewiesen werden.

In den Peyer-Patches konnten GFP-*E. coli* nachgewiesen werden. Dabei weist die BDL-Gruppe am meisten GFP-*E. coli* im Überstand der Peyer-Patches auf und unterscheidet sich statistisch signifikant von der PPVL- ($p < 0,0001$) wie auch von der Ctrl-Gruppe ($p = 0,0001$). Die PPVL- und die Ctrl-Gruppe der Peyer-Patches unterscheiden sich nicht statistisch signifikant voneinander.

Diskussion

Die zwei Ziele dieser Arbeit sind es, a) die primäre Route der Translokation von FITC-Dextran sowie *E. coli* im Gesunden, bei chronischer portalvenöser Hypertension sowie bei Leberzirrhose zu charakterisieren und b) die Subpopulation mononukleärer Zellen zu charakterisieren und quantifizieren, welche die Translokation von *E. coli* in die mesenterialen Lymphknoten vermittelt.

Die histologischen Untersuchungen liessen erkennen, dass das Lebergewebe eine unterschiedlich starke Hintergrundfluoreszenz aufweist. Bei der Betrachtung der digitalisierten Objektträger zeigt sich, dass die Fluoreszenz nicht lokalisiert auftritt, sondern ein gleichmässig verteiltes Muster aufweist. Faszinierenderweise ist diese Hintergrundfluoreszenz in einigen Proben intensiver als die Autofluoreszenz der Erythrozyten, von welchen bekannt ist, dass sie im grünen Fluoreszenzkanal eine deutliche Autofluoreszenz aufweisen.^{94,95} Es ist auch bekannt, dass die Leber grundsätzlich eine schwache Autofluoreszenz im grünen Fluoreszenzkanal aufweist.⁹⁶ Mit Ausnahme einiger Proben (insbesondere in der Kontrollgruppe) ist diese Autofluoreszenz jedoch deutlich geringer als das aufgefangene GFP-Signal. Weshalb es einen Unterschied in der Intensität der Autofluoreszenz des Lebergewebes zwischen den experimentellen Gruppen gibt, ist unklar. Die grosse Streuung der Werte in der Kontrollgruppe kann hinweisend darauf sein, dass es sich eher um eine verfahrenstechnische Verfälschung der Ergebnisse handelt als um einen tatsächlichen Unterschied. Dann nämlich sollten die Werte in der Kontrollgruppe allesamt erhöht sein, was nicht der Fall ist. Diese Autofluoreszenz ist perivascular betont, wie Abbildung 47 zeigt. Studien an Ratten zeigten unterschiedliche Autofluoreszenzmuster in

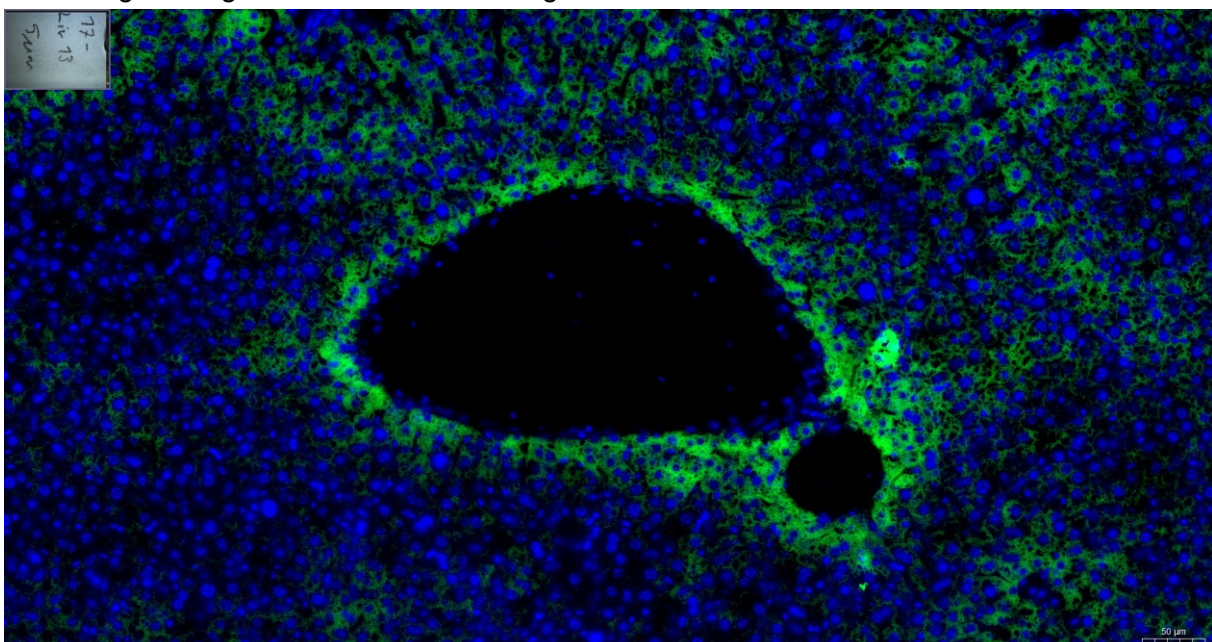


Abbildung 47 - Autofluoreszenz im Lebergewebe, Ctrl-Gruppe, intestinaler Loop mit Injektion von GFP-*E. coli*, Blau: DAPI-Filter, Grün: FITC-Filter, Skala 50 µm

unterschiedlichen metabolischen Zuständen, doch die gemessenen Unterschiede waren deutlich geringer als die hier gemessenen.^{96,97} Bei der Analyse der Fluoreszenzintensität der Proben mit 4 kDa FITC-Dextran zeigt sich ein ähnliches Muster wie bei der Analyse der Proben mit GFP-*E. coli*. Auch hier ist das Fluoreszenzmuster eine eher gleichmässige Verteilung in der Kontrollgruppe. Bisherige Studien untersuchten die Unterschiede der Autofluoreszenz zwischen Kontrolle und CCL₄. Diese zeigten Unterschiede in der Autofluoreszenz, welche mittels Algorithmen des maschinellen Lernens erkannt werden können und so die Diagnose einer Leberzirrhose unterstützen können. Jedoch zeigen diese Studien keinen derart grossen Unterschied zwischen Kontrolle und CCL₄ wie er hier gemessen wurde.⁹⁶

A) Route der Translokation

Eine Aussage darüber, ob die portalvenöse oder die lymphatische Route die primäre ist für die Translokation ist aufgrund der hier gezeigten Daten nicht abschliessend möglich, doch zeigt sich die Tendenz, dass bei Leberzirrhose die Translokation von GFP-*E. coli* in die Leber stärker ausgeprägt ist als die Translokation in die mLN. Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt in der CCL₄-Gruppe, welche die stärkste Leberschädigung aufweist. In der BDL-Gruppe ist eine leichte Tendenz zu mehr Translokation in die Leber zu erkennen, jedoch sind die Resultate nicht statistisch signifikant. Diese Erkenntnisse favorisieren die portalvenöse Route als primäre Route der bakteriellen Translokation bei Leberzirrhose.

Das Hauptproblem bei der Interpretation liegt im hohen Signalbackground im grünen Fluoreszenzkanal der Leber, welcher in den verschiedenen experimentellen Gruppen nicht gleich gross war und allfällige Unterschiede zwischen den Gruppen vermutlich zu überdecken vermochte. Dieser Background war sowohl bei den Experimenten mit Injektion von GFP-*E. coli* als auch bei Injektion von 4 kDa FITC-Dextran und der Kontrolle ohne GFP oder FITC-Dextran vorhanden und somit tatsächlich als Background des Lebergewebes zu werten. Durch die Methodik der automatisierten Analyse mittels eines fixen Grenzwertes konnten diese Unterschiede nicht kompensiert werden, da der Grenzwert über alle experimentellen Gruppen hinweg gleich gewählt wurde. In Experimenten von Sorribas et al. mit Injektion von GFP-*E. coli* in den intestinalen Loop zeigte sich im Gesunden kein mikrobiologisches Wachstum von GFP-*E. coli* in Proben der Leber und bei in-vivo-Mikroskopie der Leber konnten keine GFP-*E. coli* in der gesunden Leber nachgewiesen werden.⁸⁶ Bei Leberzirrhose jedoch zeigte sich eine deutliche Translokation von GFP-*E. coli* in die Leber.⁸⁶

Diese Hintergrundfluoreszenz der Leber im grünen Farbspektrum zeigt in diesem Experiment Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen Ctrl, PPVL, BDL und CCL₄, wobei sie bei BDL und CCL₄ am geringsten ausgeprägt ist. Da diese Hintergrundfluoreszenz der Leber

in CCL₄ und BDL am geringsten ist konnten die GFP-*E. coli* dort am spezifischsten nachgewiesen werden, weshalb der Vergleich zwischen Leber und mLN in diesen Gruppen durchgeführt werden konnte.

Ein nächstes Experiment, welches die Fragestellung der primären Route der Translokation zu beantworten sucht, könnte anstelle von GFP das rot fluoreszierende Protein drFP583 in *E. coli* einsetzen. Diese rot fluoreszierenden *E. coli* können anschliessend in den intestinalen Loop injiziert werden.⁹⁸ Dies sollte das Problem der Autofluoreszenz beheben, da die Leber praktisch keine Autofluoreszenz im roten Spektrum aufweist. Analog könnte auch ein Dextran verwendet werden, welches mit einem anderen Fluorophor verknüpft ist, welches im roten Spektrum fluoresziert. Falls jedoch dieser andere Fluorophor während der Translokation verändert wird (beispielsweise durch die Phagozytose des Bakteriums), könnten auch mittels Radionuklid markierte Bakterien beziehungsweise Dextran eingesetzt werden. Eine derartige Veränderung ist in diesem Experiment mit GFP nicht beobachtet worden.

Lymphknoten zeigen praktisch keine Autofluoreszenz im grünen Fluoreszenzkanal. Somit ist hier aufgefangenes Signal eindeutig den GFP-*E. coli* bzw. dem 4 kDa FITC-Dextran zuzuordnen. Hier zeigt sich ein Unterschied zwischen den Stadien ohne Leberschädigung und den Stadien mit kompensierter bzw. dekomensierter Leberzirrhose. Die Ctrl- sowie die PPVL-Gruppe zeigen geringere Werte als die BDL- und die CCL₄-Gruppe (Abbildung 33). Diese Resultate deuten darauf hin, dass die Translokation von *E. coli* in die mesenterialen Lymphknoten im Gesunden sowie bei portalvenöser Hypertension von gleicher Quantität ist. Im Zustand der Leberzirrhose ist die bakterielle Translokation von *E. coli* in die mesenterialen Lymphknoten erhöht. Die gleiche Tendenz ist bei Injektion von 4 kDa FITC-Dextran in den intestinalen Loop zu beobachten. Auch hier ist die Translokation von 4 kDa FITC-Dextran in die mesenterialen Lymphknoten im Gesunden sowie bei portalvenöser Hypertension von gleicher Quantität. Bei Leberzirrhose jedoch ist die Translokation von 4 kDa FITC-Dextran in die mesenterialen Lymphknoten erhöht (Abbildung 34). Weitere Experimente in unserem Labor zeigen, dass im Gesunden kein 4 kDa FITC-Dextran in die Leber gelangt, was mit den hier gezeigten Resultaten in Einklang steht.⁸⁶

B) Transport translozierender *E. coli* und involvierte Zellen

Die Resultate der ImageStream[®]-Analyse geben Aufschluss über die Subpopulation mononukleärer Zellen, welche die Translokation von GFP-*E. coli* vermitteln. Entsprechend der Resultate von Milling et al. ist dieses Experiment darauf ausgerichtet, die Zellpopulation der dendritischen Zellen in die beiden Gruppen CD11c⁺/CD11b⁺ sowie CD11c⁺/CD11b⁻ zu differenzieren. Denn diese beiden Gruppen von dendritischen Zellen migrieren lymphatisch aus dem Intestinum in die mesenterialen Lymphknoten.⁵³

Grundsätzlich konnte gezeigt werden, dass mit dem ImageStream® eine sinnvolle Möglichkeit vorhanden ist, wie die Internalisation von Bakterien in murinen Zellen nachgewiesen werden kann. Auch konnte gezeigt werden, dass der Nachweis einzelner fluoreszenzmarkierter Bakterien in einer Suspension problemlos möglich ist.

1. Physiologischer Zustand

Die Resultate legen nahe, dass in gesunden Mäusen GFP-*E. coli* von CD11b⁺/CD11c⁺ Zellen phagozytiert und in die mesenterialen Lymphknoten transportiert werden. Die Menge dieser Translokation ist gering. In gesunden Mäusen phagozytieren und transportieren CD11b⁺/CD11c⁻ Zellen keine GFP-*E. coli*. In den Peyer-Patches konnten in gesunden Mäusen keine Zellen nachgewiesen werden, welche GFP internalisiert haben. Somit stellt sich die Frage, ob in gesunden Mäusen schlichtweg nur wenige *E. coli* über die Peyer-Patches aufgenommen werden, weshalb sie in dieser Untersuchung nicht darstellbar sind oder ob das Sampling von *E. coli* hier in der normalen Lamina propria stattfindet. Es zeigt sich jedoch eine Population von CD11b⁺/CD11c⁺ Zellen in den Peyer-Patches, welche geringe Mengen an GFP-*E. coli* an ihrer Plasmamembran angehängt haben. Möglicherweise sind diese Zellen gerade dabei, die GFP-*E. coli* zu phagozytieren, wurden in diesem Prozess jedoch durch die Gewebeaufarbeitung unterbrochen. Dies wäre hinweisend darauf, dass das Sampling und die Phagozytose luminaler *E. coli* im Gesunden ein langsamer Prozess ist, wie bestehende Experimente bereits zeigen.^{27,72}

2. Chronische portalvenöse Hypertension

In Mäusen mit chronischer portalvenöser Hypertension (PPVL-Gruppe) zeigt sich ein sehr ähnliches Bild wie bei den gesunden Mäusen, es ist keine pathologisch gesteigerte Translokation messbar. Die GFP-*E. coli* werden durch CD11b⁺/CD11c⁺ Zellen phagozytiert und in die mesenterialen Lymphknoten transportiert. Die Menge dieser Translokation ist nicht signifikant höher als bei gesunden Mäusen. In den Peyer-Patches zeigen sich keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der PPVL-Gruppe. Auch hier zeigt sich eine Population von CD11b⁺/CD11c⁺ Zellen in den Peyer-Patches, welche geringe Mengen GFP-*E. coli* an ihrer Plasmamembran angehängt haben. Die relativen Zellzahlen der Zellen ohne GFP-*E. coli* sind bei gesunden Mäusen sowie bei chronischer portalvenöser Hypertension nahezu identisch.

3. Leberzirrhose

Die Resultate zeigen, dass bei biliärer Leberzirrhose (BDL-Gruppe) signifikant mehr GFP-*E. coli* aus dem intestinalen Loop in die mesenterialen Lymphknoten gelangen als in der Kontroll- und der PPVL-Gruppe. Diese *E. coli* sind hauptsächlich in CD11b⁺/CD11c⁺ Zellen internalisiert, jedoch in geringerer Masse auch in CD11b⁺/CD11c⁻/Gr-1⁺ Zellen. Ein ebenfalls kleiner Anteil an GFP-*E. coli* ist an CD11b⁺/CD11c⁺ Zellen angehängt, eventuell

hinweisend auf einen noch nicht abgeschlossenen Internalisationsprozess. In den Peyer-Patches zeigt sich, dass bei Leberzirrhose deutlich mehr GFP-*E. coli* in CD11b⁺/CD11c⁺ Zellen internalisiert sind sowie auch mehr GFP-*E. coli* an CD11b⁺/CD11c⁺ Zellen angehängt sind.

Es kommen in den Peyer-Patches bei Leberzirrhose deutlich mehr CD11b⁺/CD11c⁺ Zellen, sowie CD11c⁺/CD11b⁻ Zellen vor, verglichen mit dem gesunden Zustand. Ersteres erscheint nachvollziehbar, da diese die eingedrungenen GFP-*E. coli* phagozytieren und in die mesenterialen Lymphknoten transportieren, Letzteres deutet darauf hin, dass auch CD11c⁺/CD11b⁻ Zellen in die Peyer-Patches rekrutiert werden. Da diese Zellpopulation jedoch keine GFP-*E. coli* in die mesenterialen Lymphknoten transportiert, könnte sie eine lokale Abwehrfunktion innerhalb der Peyer-Patches übernehmen. Die Funktion dieser CD11c⁺/CD11b⁻ Zellen im Zustand der Leberzirrhose ist noch näher zu untersuchen. Weitere durchflusszytometrische Untersuchungen der Peyer-Patches können diese CD11c⁺/CD11b⁻ Zellpopulation weiter differenzieren und deren Einfluss auf die bakterielle Translokation genauer untersuchen. Ebenfalls kommen in den Peyer-Patches bei Leberzirrhose mehr CD11b⁺/CD11c⁻/Gr-1⁺ Zellen vor. Dies deutet auf eine lokale Infiltration mit Granulozyten hin, welche im Rahmen der Entzündungsreaktion in die Peyer-Patches rekrutiert werden.

Bei Leberzirrhose konnten in den Peyer-Patches freie GFP-*E. coli* nachgewiesen werden. Dies war im Gesunden sowie bei chronischer portalvenöser Hypertension nicht der Fall. In der Tat zeigen sich etwa 10-fach mehr GFP-*E. coli* im Überstand (unabhängig von zellulärem Transport) als beispielsweise gesamthaft in mLN detektierbar waren. Es ist anzunehmen, dass durch eventuell verminderte phagozytotische Kapazität der mononukleären Zellen bei Leberzirrhose eine gewisse Menge *E. coli* trans- oder gar parazellulär in die Peyer-Patches einzudringen vermag, welche nicht sofort phagozytiert werden können.^{66,67,99} Über welche Wege und Mechanismen *E. coli* bei Leberzirrhose in die Peyer-Patches gelangen, ist aktuell noch offen. Ein bekannter Faktor ist die Entzündungsreaktion, welche die Integrität des intestinalen Epithels beeinträchtigen kann.⁶² Es konnte gezeigt werden, dass die Peyer-Patches bei Leberzirrhose ein wichtiger Einfallstor für translozierende *E. coli* darstellen. Weitere Experimente sollten untersuchen, ob diese *E. coli* von den Peyer-Patches aus in das portalvenöse Blut oder in die Lymphe gelangen können und so ein Transport freier *E. coli*, welche nicht phagozytiert worden sind, vorhanden sein könnte.

Die erhöhte Anzahl Zellen ohne GFP der Subgruppe CD11b⁺/CD11c⁻/Gr-1⁺ im peripheren Blut von BDL-Mäusen könnte hinweisend auf eine systemische Aktivierung und Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten sein (siehe Abbildung 45). Es ist bekannt, dass BDL-Mäuse eine systemische Aktivierung von neutrophilen Granulozyten innerhalb der ersten drei Tage nach der Operation entwickeln.¹⁰⁰

Im peripheren Blut sowie den mesenterialen Lymphknoten konnten keine freien GFP-*E. coli* nachgewiesen werden. Somit muss angenommen werden, dass die Translokation von *E. coli* in allen hier untersuchten Fällen zellgebunden geschieht oder dass die *E. coli* in der Leber beziehungsweise den mesenterialen Lymphknoten vollständig aus dem Blutstrom beziehungsweise der Lymphe gefiltert werden. Hier wäre es interessant, bei Experimenten mit Injektion von fluoreszenzmarkierten *E. coli* in den intestinalen Loop nach abdominaler Lymphadenektomie Proben direkt aus dem Ductus thoracicus zu entnehmen und allfällige Bakterien mittels ImageStream® nachzuweisen. Aufgrund der hohen Sensitivität dieser Methode bei nur wenig benötigtem Material könnte genau differenziert werden, ob die Bakterien nur intrazellulär oder auch frei in der Lymphe transportiert werden. Problematisch ist hierbei die Kanülierung des Ductus thoracicus, welcher bei Mäusen sehr fein ist. Im gleichen experimentellen Setting könnte auch eine allfällige Translokation von fluoreszenzmarkierten *E. coli* über die Portalvene untersucht werden, indem die Portalvene kanüliert wird und Proben direkt entnommen werden. Auf diese Weise wäre es möglich, direkt die Menge an translozierenden *E. coli* im Lymphsystem und Blutsystem zu messen und dasjenige System zu identifizieren, über welches der grösste Teil der pathologischen bakteriellen Translokation geschieht.

Key-Findings

- A) Route der Translokation aus dem Ileum bei gesunden, portal-hypertensiven und zirrhotischen Mäusen:
1. Im gesunden Zustand findet sich für 4 kDA FITC-Dextran wie auch GFP-*E. coli* keine Translokation aus dem Ileum in die Leber, gering aber nachweisbar dagegen in die mesenterialen Lymphknoten. Dies unterstreicht die für diese Agentien physiologisch relevante lymphatische Route der Translokation entgegen einer dahingehend restriktiv regulierten portalvenösen Route zur Leber.
 2. Die Translokation von *E. coli* sowie von 4 kDA FITC-Dextran aus dem terminalen Ileum in die mesenterialen Lymphknoten wie auch in die Leber ist bei isolierter chronischer portalvenöser Hypertension gegenüber gesunden Kontrollen nicht erhöht. Damit ist bei chronischer Erhöhung die portale Hypertension kein wesentlicher pathogenetisch beitragender Faktor zur Veränderung der Translokation bei Leberzirrhose (s. unten).
 3. Bei Leberzirrhose ist die Translokation von 4 kDA FITC-Dextran wie auch GFP-*E. coli* in die mesenterialen Lymphknoten gegenüber gesunden Kontrollen deutlich erhöht und auch in die Leber nachweisbar. Für *E. coli* ist hierbei die dominante Route die portal-venöse, da sich signifikant mehr GFP-*E. coli* intrahepatisch als in den mesenterialen Lymphknoten finden.
- B) Transport translozierender *E. coli* aus dem Ileum und involvierte Zellen bei gesunden, portal-hypertensiven und zirrhotischen Mäusen:
1. Mittels ImageStream® kann die Internalisation von GFP-*E. coli* in Zellen verschiedener Gewebe untersucht werden. Ebenfalls ist die Detektion weniger bis einzelner GFP-*E. coli* in Flüssigkeiten möglich.
 2. Im physiologischen Zustand sowie bei isolierter chronischer portalvenöser Hypertension werden *E. coli* in den Peyer-Patches vornehmlich von CD11b⁺/CD11c⁺ Zellen phagozytiert und vermutlich hierüber in die mesenterialen Lymphknoten transportiert.
 3. Bei biliärer Leberzirrhose findet sich für translozierende *E. coli* aus dem Ileum in die mLN eine gesteigerte Bindung an und Aufnahme in CD11b⁺/CD11c⁺ Zellen, in geringerer Masse auch CD11b⁺/CD11c⁻/Gr-1⁺ Zellen. Da sich in den Peyer-Patches dieselbe gesteigerte Bindung an und Aufnahme in CD11b⁺/CD11c⁺

Zellen, in geringerer Masse auch CD11b⁺/CD11c⁻/Gr-1⁺ Zellen zeigt, welche den entsprechenden Phagozytose-Prozess widerspiegeln dürfte, ist vom Transport der *E. coli* (wenigstens teilweise) via dieser Zellpopulation vom ilealen Lumen in die mLN auszugehen.

4. Die Gesamtzahl an CD11b⁺/CD11c⁺ sowie CD11b⁺/CD11c⁻/Gr-1⁺ Zellen ist in mLN wie auch in Peyer-Patches bei biliärer Leberzirrhose signifikant erhöht gegenüber gesunden Kontrolltieren. Dies dürfte eine kompensatorische Steigerung der innate-basierten Immunantwort als Reaktion auf die pathologisch gesteigerte bakterielle Translokation widerspiegeln.
5. *E. coli* können bei biliärer Leberzirrhose, nicht jedoch bei chronischer portaler Hypertension oder gesunden Kontrollen in Peyer-Patches auch zellungebunden, dh. «frei», nicht phagozytiert, nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung der gezeigten Zahl an *E. coli* in diesem «freien» Kompartiment lässt dies zum einen eine im Bereich der Peyer-Patches bekanntermassen erleichterte, frühzeitige und daher bei biliärer Zirrhose dominant gesteigerte Route der Translokation annehmen, sowie zum anderen eine trotz kompensatorisch gesteigerter Zahl an phagozytierenden Zellen (s. oben) in den Peyer-Patches bei biliärer Zirrhose ungenügende Fähigkeit, die translozierenden Keime zellulär zu bekämpfen und zu transportieren. Dies deckt sich auch mit der bekanntermassen bei Leberzirrhose reduzierten und eingeschränkten phagozytotischen Funktion der mononukleären Zellen.
6. Im peripheren Blut sowie den mesenterialen Lymphknoten konnten keine solchen «freien» *E. coli* nachgewiesen werden. Dies unterstreicht die effiziente antibakterielle Immunantwort, die auch bei biliärer Zirrhose in dem hier gewählten Modell ausreichend erscheint, um eine zell-unabhängige Bakteriämie zu verhindern.

Abkürzungsverzeichnis

Die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen werden hier in alphabetischer Abfolge näher erläutert.

Abkürzung	
µm	Mikrometer
ACLF	Acute-on-chronic liver failure, akut-auf-chronisches Leberversagen
ANOVA	Analysis of variance
att	attached, angehängt
BDL	Bile duct ligation, Gallengangligatur
CCL₃	Trichlormethyl
CCL₄	Carbon tetrachloride, Tetrachlormethan bzw. Tetrachlormethan-induzierte Leberzirrhose
CD	Cluster of Differentiation
CD103	Cluster of Differentiation 103, Integrin alpha E
CD11b	Integrin α-M
CD11c	Integrin α-X
CD8α	Cluster of differentiation 8α
CFU	Colony forming unit, koloniebildende Einheit
Ctrl	Kontrolle
CX3CR1	CX3C chemokine receptor 1, fractalkine receptor oder G-protein coupled receptor 13
Cy7	Cyanin 7
DAMPs	Damage-associated molecular patterns (Schädigungsassoziierte molekulare Muster)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCs	Dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline, Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
Fc	Fragment crystallisable

FCS	Fetal Calf Serum, fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GALT	Gut associated lymphatic tissue (darmassoziiertes Immunsystem)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GVB	Gut-vascular barrier (Darm-Gefäß-Schranke)
HCS	Hyperdynamic circulatory state, hyperdynamischer zirkulatorischer Zustand
IgA	Immunglobulin A
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IMDM	Isocove's Modified Dulbecco's Medium
int	internalized, internalisiert
kDa	Kilodalton
LB	Lysogeny <u>b</u> roth Nährmedium
Ly6C	Lymphocyte antigen 6 complex locus C
Ly6G	Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D
MLCK	Myosin-leichte-Ketten-Kinase
mLN / mLNs	Mesenteriale Lymphknoten
MRXS	MIRAX Virtual Slide File
MUC2	Mucin 2
mW	Milliwatt
NaCl	Natriumchlorid-Lösung
NAFLD	Nichtalkoholische Fettlebererkrankung
NaN₃	Natriumazid
NASH	Nichtalkoholische Steatohepatitis
nm	Nanometer
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns (Pathogen-assoziierte molekulare Muster)
PBS	Phosphate-buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PP	Peyer-Patches
PPVL	Partial portal vein ligation, partielle Portalvenenligatur

PRRs	Pattern-recognition receptors
RMS	Root mean square, quadratisches Mittel
rpm	Revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
SPF	Specific pathogen-free, spezifisch pathogenfrei
Spi2	Salmonella pathogenicity island 2, Salmonella Pathogenitätsinsel 2
TBS	Tris-buffered saline, Trisaminomethan-gepufferte Salzlösung
Th-Zellen	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
TRITC	Tetramethylrhodamin

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei folgenden Personen und Institutionen bedanken, welche mich während der Arbeit an diesem Experiment mit Rat und Tat unterstützt haben. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

- Prof. Dr. med. Reiner Wiest
- Dr. Marcel Sorribas
- Prof. Dr. med. Andrew Macpherson
- Prof. Dr. Siegfried Hapfelmeier-Balmer
- Dr. Mercedes Gomez de Agüero
- Forschungsgruppe Gastroenterologie / Mukosale Immunologie
 - Dr. rer. nat. Stephanie Ganai-Vonarburg
 - 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
- Forschungsgruppe Hepatologie
 - Prof. Dr. med. Jean-François Dufour
 - Dr. Sheida Moghadamrad
 - Mohsin Hassan
 - Olivier Maurhofer
- FACS-Lab der Universität Bern, besonders Dr. phil. nat. Stefan Müller
- Central Animal Facilities der Universität Bern
- Histologiellabors DBMR, besonders Claudia Güttinger

Literaturverzeichnis

1. Savage DC. Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract. *Annu Rev Microbiol* 1977;31(1):107–33.
2. Bohnhoff M, Drake BL, Miller CP. The effect of an antibiotic on the susceptibility of the mouse's intestinal tract to Salmonella infection. *Antibiot Annu* 1955;3:453–5.
3. Lawley TD, Walker AW. Intestinal colonization resistance. *Immunology* 2013;138(1):1–11.
4. Yamanaka M, Nomura T, Kametaka M. Influence of intestinal microbes on heat production in germ-free, gnotobiotic and conventional mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1977;23(3):221–6.
5. Gill SR, Pop M, DeBoy RT, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* (80-) 2006;312(5778):1355–9.
6. Ursell LK, Haiser HJ, Van Treuren W, et al. The intestinal metabolome: An intersection between microbiota and host. *Gastroenterology* 2014;146(6):1470–6.
7. Krajmalnik-Brown R, Ilhan ZE, Kang DW, DiBaise JK. Effects of gut microbes on nutrient absorption and energy regulation. *Nutr Clin Pract* 2012;27(2):201–14.
8. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009;457(7228):480–4.
9. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med* 2009;1(6):6ra14.
10. Renz H, Brandtzaeg P, Hornef M. The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation. *Nat Rev Immunol* 2012;12(1):9–23.
11. Eckburg PB, Relman DA. The Role of Microbes in Crohn's Disease. *Clin Infect Dis* 2007;44(2):256–62.
12. Huttenhower C, Gevers D, Knight R, et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012;486(7402):207–14.
13. Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, Knight R, Gordon JI. Worlds within worlds: Evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat Rev Microbiol* 2008;6(10):776–88.
14. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* (80-). 2005;307(5717):1915–20.
15. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Microbiology: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* (80-) 2005;308(5728):1635–8.
16. Wiest R. The Intestinal Microbiota. In: *Handbook of Gastroenterology and liver diseases*. Turin – Rome, Italy: Edizioni Minerva Medica - EGI; 2016. p. 15–24.
17. Buffie CG, Jarchum I, Equinda M, et al. Profound alterations of intestinal microbiota following a single dose of clindamycin results in sustained susceptibility to *Clostridium difficile*-induced colitis. *Infect Immun* 2012;80(1):62–73.
18. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*. 2012;489(7415):220–30.

19. Wiest R, Albillos A, Trauner M, Bajaj JS, Jalan R. Targeting the gut-liver axis in liver disease. *J. Hepatol.* 2017;67(5):1084–103.
20. Aschoff L. Das reticulo-endotheliale System. In: Kraus F, Meyer E, Minkowski O, et al., editors. *Ergebnisse der Inneren Medizin und Kinderheilkunde*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1924. p. 1–118.
21. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115(2):209–18.
22. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: Critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2001;2(8):675–80.
23. Areschoug T, Gordon S. Pattern recognition receptors and their role in innate immunity: focus on microbial protein ligands. *Contrib Microbiol* 2008;15:45–60.
24. Sipeki N, Antal-Szalmas P, Lakatos PL, Papp M. Immune dysfunction in cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2014;20(10):2564–77.
25. Seong SY, Matzinger P. Hydrophobicity: An ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2004;4(6):469–78.
26. 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.
27. Wiest R, Lawson M, Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *J Hepatol* 2014;60(1):197–209.
28. Seki E, De Minicis S, Österreicher CH, et al. TLR4 enhances TGF- β signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med* 2007;13(11):1324–32.
29. Spadoni I, Zagato E, Bertocchi A, et al. A gut-vascular barrier controls the systemic dissemination of bacteria. *Science* (80-) 2015;350(6262):830–4.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. Tollin M, Bergman P, Svenberg T, Jörnvall H, Gudmundsson GH, Agerberth B. Antimicrobial peptides in the first line defence of human colon mucosa. *Peptides* 2003;24(4):523–30.
36. Howell SJ, Wilk D, Yadav SP, Bevins CL. Antimicrobial polypeptides of the human colonic epithelium. *Peptides* 2003;24(11):1763–70.

37. Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME, Ouellette AJ. Secretion of microbicidal α -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol* 2000;1(2):113–8.
38. Schroeder BO, Wu Z, Nuding S, et al. Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human β 2-defensin 1. *Nature* 2011;469(7330):419–23.
39. Hassan M, Moghadamrad S, Sorribas M, et al. Paneth cells promote angiogenesis and regulate portal hypertension in response to microbial signals. *J Hepatol* 2020;73(3):628–39.
40. Randal Bollinger R, Everett M Lou, Palestrant D, Love SD, Lin SS, Parker W. Human secretory immunoglobulin A may contribute to biofilm formation in the gut. *Immunology* 2003;109(4):580–7.
41. Macpherson AJ, Gatto D, Sainsbury E, Harriman GR, Hengartner H, Zinkernagel RM. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* (80-) 2000;
42. Faderl M, Noti M, Corazza N, Mueller C. Keeping bugs in check: The mucus layer as a critical component in maintaining intestinal homeostasis. *IUBMB Life* 2015;67(4):275–85.
43. Lüllmann-Rauch R, Asan E. Taschenlehrbuch Histologie. 4. Auflage. Thieme; 2019.
44. Wiest R, Rath HC. 6 Bacterial translocation in the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17(3):397–425.
45. Macpherson AJ, Uhr T. Induction of Protective IgA by Intestinal Dendritic Cells Carrying Commensal Bacteria. *Science* (80-) 2004;303(5664):1662–5.
46. Rivollier A, He J, Kole A, Valatas V, Kelsall BL. Inflammation switches the differentiation program of Ly6chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *J Exp Med* 2012;209(1):139–55.
47. Johansson-Lindbom B, Svensson M, Pabst O, et al. Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *J Exp Med* 2005;202(8):1063–73.
48. Chirido FG, Millington OR, Beacock-Sharp H, Mowat AMI. Immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria. *Eur J Immunol* 2005;35(6):1831–40.
49. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2001;2(4):361–7.
50. Iwasaki A, Kelsall BL. Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3 α , MIP-3 β , and secondary lymphoid organ chemokine. *J Exp Med* 2000;191(8):1381–93.
51. Anjuère F, Luci C, Lebens M, et al. In Vivo Adjuvant-Induced Mobilization and Maturation of Gut Dendritic Cells after Oral Administration of Cholera Toxin. *J Immunol* 2004;173(8):5103–11.
52. Jaensson E, Uronen-Hansson H, Pabst O, et al. Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *J Exp Med* 2008;205(9):2139–49.
53. Milling S, Yrlid U, Cerovic V, Macpherson G. Subsets of migrating intestinal dendritic

- cells. *Immunol Rev* 2010;234:259–67.
54. Lagasse E, Weissman IL. Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. *J Immunol Methods* 1996;197(1–2):139–50.
 55. Yu YRA, O’Koren EG, Hotten DF, et al. A protocol for the comprehensive flow cytometric analysis of immune cells in normal and inflamed murine non-lymphoid tissues. *PLoS One* 2016;11(3).
 56. Wiest R, Das S, Cadelina G, Garcia-Tsao G, Milstien S, Groszmann RJ. Bacterial translocation in cirrhotic rats stimulates eNOS-derived NO production and impairs mesenteric vascular contractility. *J Clin Invest* 1999;104(9):1223–33.
 57. Heller J, Schepke M, Gehnen N, et al. Altered adrenergic responsiveness of endothelium-denuded hepatic arteries and portal veins in patients with cirrhosis. *Gastroenterology* 1999;116(2):387–93.
 58. Gustot T, Moreau R. Renal failure in cirrhosis. In: *Ascites, Hyponatremia and Hepatorenal Syndrome: Progress in Treatment*. S. Karger AG; 2010. p. 112–21.
 59. Jia W, Xie G, Jia W. Bile acid–microbiota crosstalk in gastrointestinal inflammation and carcinogenesis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2018;15(2):111–28.
 60. Simbrunner B, Schwabl P, Scheiner B, et al. Bacterial translocation-induced inflammation promotes liver fibrogenesis in patients with advanced chronic liver disease. *J Hepatol* 2020;73:S696–7.
 61. Marchiando AM, Graham WV, Turner JR. Epithelial barriers in homeostasis and disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2010;5:119–44.
 62. Hartmann P, Haimerl M, Mazagova M, Brenner DA, Schnabl B. Toll-like receptor 2-mediated intestinal injury and enteric tumor necrosis factor receptor i contribute to liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 2012;143(5):1330-1340.e1.
 63. Macutkiewicz C, Carlson G, Clark E, Dobrindt U, Roberts I, Warhurst G. Characterisation of *Escherichia coli* strains involved in transcytosis across gut epithelial cells exposed to metabolic and inflammatory stress. *Microbes Infect* 2008;10(4):424–31.
 64. Lewis K, Lutgendorff F, Phan V, Söderholm JD, Sherman PM, McKay DM. Enhanced translocation of bacteria across metabolically stressed epithelia is reduced by butyrate. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16(7):1138–48.
 65. Mahida YR, Johal S. NF- κ B may determine whether epithelial cell-microbial interactions in the intestine are hostile or friendly. *Clin. Exp. Immunol.* 2001;123(3):347–9.
 66. Wiest R, Garcia-Tsao G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology*. 2005;41(3):422–33.
 67. Holdstock G, Leslie B, Hill S, Tanner AR, Wright R. Monocyte function in cirrhosis. *J Clin Pathol* 1982;35(9):972–9.
 68. Mouries J, Brescia P, Silvestri A, et al. Microbiota-driven gut vascular barrier disruption is a prerequisite for non-alcoholic steatohepatitis development. *J Hepatol* 2019;71(6):1216–28.
 69. Garcia-Tsao G, Albillos A, Barden GE, West AB. Bacterial translocation in acute and chronic portal hypertension. *Hepatology* 1993;17(6):1081–5.

70. Caly WR, Strauss E. A prospective study of bacterial infections in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1993;18(3):353–8.
71. Fernández J, Navasa M, Gómez J, et al. Bacterial infections in cirrhosis: Epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis. *Hepatology* 2002;35(1):140–8.
72. Jalan R, Fernandez J, Wiest R, et al. Bacterial infections in cirrhosis: A position statement based on the EASL Special Conference 2013. *J Hepatol* 2014;60(6):1310–24.
73. Arvaniti V, D’Amico G, Fede G, et al. Infections in patients with cirrhosis increase mortality four-fold and should be used in determining prognosis. *Gastroenterology* 2010;139(4).
74. Fernández J, Acevedo J, Castro M, et al. Prevalence and risk factors of infections by multiresistant bacteria in cirrhosis: A prospective study. *Hepatology* 2012;55(5):1551–61.
75. Jalan R, Gines P, Olson JC, et al. Acute-on chronic liver failure. *J Hepatol* 2012;57(6):1336–48.
76. Merli M, Lucidi C, Pentassuglio I, et al. Increased risk of cognitive impairment in cirrhotic patients with bacterial infections. *J Hepatol* 2013;59(2):243–50.
77. Mainous MR, Tso P, Berg RD, Deitch EA. Studies of the Route, Magnitude, and Time Course of Bacterial Translocation in a Model of Systemic Inflammation. *Arch Surg* 1991;126(1):33–7.
78. The Jackson Laboratory. C57BL/6J strain [Internet]. [cited 2020 Oct 8]; Available from: <https://www.jax.org/strain/000664>
79. 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.
80. 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.
81. 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.
82. Fernandez M, Vizzutti F, Garcia-Pagan JC, Rodes J, Bosch J. Anti-VEGF Receptor-2 Monoclonal Antibody Prevents Portal-Systemic Collateral Vessel Formation in Portal Hypertensive Mice. *Gastroenterology* 2004;126(3):886–94.
83. Wiest R. Splanchnic and Systemic Vasodilation. *J Clin Gastroenterol* 2007;41(Supplement 3):S272–87.
84. JIMÉNEZ W, CLÀRIA J, ARROYO V, RODÉS J. Carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats: A useful tool for investigating the pathogenesis of ascites in chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1992;7(1):90–7.
85. Domenicali M, Caraceni P, Giannone F, et al. A novel model of CCl₄-induced cirrhosis with ascites in the mouse. *J Hepatol* 2009;51(6):991–9.
86. 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.
87. Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* (80-.). 1997;277(5331):1453–62.
 88. E.Coli Genome Project. Strain Information of *E. coli* K12 MG1655. Univ Wisconsin [Internet] [cited 2020 Oct 13]; Available from: <https://www.genome.wisc.edu/resources/strains.htm>
 89. Soupene E, Heeswijk WC Van, Stewart V, et al. Physiological Studies of *Escherichia coli* Strain MG1655 : Growth Defects and Apparent Cross-Regulation of Gene Expression. *J Bacteriol* 2003;185(18):5611–26.
 90. Wilson WD, Tanious FA, Barton HJ, et al. DNA Sequence Dependent Binding Modes of 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI). *Biochemistry* 1990;29(36):8452–61.
 91. Shapiro HM. 4 . How Flow Cytometers Work. In: *Practical Flow Cytometry*. 2003. p. 101–223.
 92. Laerd Statistics. One-way ANOVA - Introduction [Internet]. [cited 2020 Feb 21]; Available from: <https://statistics.laerd.com/statistical-guides/one-way-anova-statistical-guide.php>
 93. Motulsky HJ. GraphPad Statistics Guide [Internet]. [cited 2019 Jan 28]; Available from: www.graphpad.com/guides/prism/7/statistics/index.htm
 94. 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.
 95. Alipour M, Zaidi D, Valcheva R, et al. Mucosal barrier depletion and loss of bacterial diversity are primary abnormalities in paediatric ulcerative colitis. *J Crohn's Colitis* 2016;10(4):462–71.
 96. Saitou T, Takanezawa S, Ninomiya H, et al. Tissue intrinsic fluorescence spectra-based digital pathology of liver fibrosis by marker-controlled segmentation. *Front Med* 2018;5(DEC):1–14.
 97. Croce AC, De Simone U, Vairetti M, Ferrigno A, Bottiroli G. Autofluorescence properties of rat liver under hypermetabolic conditions. *Photochem Photobiol Sci* 2007;6(11):1202–9.
 98. Knop M, Barr F, Riedel CG, Heckel T, Reichel C. Improved version of the red fluorescent protein (drFP583/DsRed/RFP). *Biotechniques* 2002;33(3):592–602.
 99. Salzman AL, Menconi MJ, Unno N, et al. Nitric oxide dilates tight junctions and depletes ATP in cultured Caco- 2BBE intestinal epithelial monolayers. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* 1995;268(2 31-2).
 100. Gujral JS, Farhood A, Bajt ML, Jaeschke H. Neutrophils aggravate acute liver injury during obstructive cholestasis in bile duct-ligated mice. *Hepatology* 2003;38(2):355–63.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Lebergewebe, bei welchem grosse Blutgefässe sowie Gewebedefekte durch die Markierung (rot) ausgeschlossen sind. Blau DAPI, Grün FITC, Skala 500 μm	28
Abbildung 2 – Graustufen TIFF-Datei des FITC-Kanals des ungefähren Bereiches von Abbildung 1. Die schwarzen Bereiche sind nicht als Pixel gespeichert, die grauen Bereiche zeigen die Intensität des grünen Bildkanals (je heller, desto intensiver ist das Signal). Der schwarze Bereich in der Mitte entspricht den ausgeschnittenen Blutgefässen. Grau FITC, Skala 500 μm	28
Abbildung 3 – Gleiche Region wie in Abbildung 2 nach Anwenden des Grenzwertes. Weiss: Pixel, deren Wert grösser oder gleich gross wie der Grenzwert ist, Schwarz: Pixel, deren Wert kleiner als der Grenzwert ist. Skala 500 μm	29
Abbildung 4 - Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers mit einem 488 nm Laser und vier Fluoreszenzkanälen. nm: Nanometer. Mit freundlicher Genehmigung von Fabian K. (https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Durchflusszytometer.png)	31
Abbildung 5 – Exzitationsspektrum (gestrichelte Linie) und Emissionsspektrum (durchgezogene Linie) von DAPI. Senkrechte schwarze Linie: Laser mit 355 nm Wellenlänge, violettes Rechteck: Emissionsfilter. (Fluorescence SpectraViwer, Thermo Fisher).....	32
Abbildung 6 – Exzitations- und Emissionsspektren von DAPI (blau) und PE (gelb). Violettes Rechteck: Exzitationsfilter für DAPI, gelbes Rechteck: Exzitationsfilter für PE. PE: Phycoerythrin. (Fluorescence SpectraViwer, Thermo Fisher).....	33
Abbildung 7 – Schematische Darstellung des ImageStream Mark II Imaging Flow Cytometers [®] von Amnis [®] , graue Bereiche sind im verwendeten Gerät nicht eingebaut, Copyright by Amnis [®]	35
Abbildung 8 – ImageStream [®] Aufnahme eines GFP- <i>E. coli</i> -Bakteriums. Kanal 1-4 sowie 6 sind die Fluoreszenzkanäle, Kanal 5 ist der Hellfeldkanal. Rot markiert sind gesättigte Pixel im GFP-Kanal (Ch02).	37
Abbildung 9 - ImageStream [®] Aufnahme eines GFP- <i>E. coli</i> -Bakteriums. Kanal 1-4 sowie 6 sind die Fluoreszenzkanäle, Kanal 5 ist der Hellfeldkanal. Im GFP-Kanal (Kanal 2) ist ein GFP- <i>E. coli</i> sichtbar, ebenso im Hellfeldkanal.....	37
Abbildung 10 – Überblick über die Gating-Strategie der am ImageStream [®] aufgenommenen Daten. Die einzelnen Diagramme werden nachfolgend genauer erläutert.	42
Abbildung 11 - Dargestellt sind alle vom ImageStream [®] aufgenommenen Daten als Histogramm mit dem Gradient RMS als x-Achse und der relativen Häufigkeit als y-Achse. Die gelbe Linie stellt das Gate dar, mit welchem die scharf abgebildeten Zellen weiterverwendet werden. Der Rest wird verworfen.....	43
Abbildung 12 - Hoher Gradient RMS, scharfes Bild, Hellfeldaufnahme	44
Abbildung 13 - Niedriger Gradient RMS, unscharfes Bild, Hellfeldaufnahme	44
Abbildung 14 - Streudiagramm der Objekte im Fokus. x-Achse: Fläche des Objektes im Hellfeldkanal, y-Achse: Aspect Ratio des Objektes im Hellfeldkanal. Die Farbe gibt die Dichte der Objekte im Streudiagramm wieder (blau gering, rot hoch). Jeder farbige Punkt entspricht einem Objekt.	44

Abbildung 15 – In der Mitte das in Abbildung 14 dargestellte Streudiagramm. Die Pfeile zeigen, wo die dargestellten Objekte in diesem Streudiagramm positioniert sind. Aufnahmen im Hellfeldkanal.	45
Abbildung 16 - Histogramm der Intensität der Fluoreszenz von eFluor 450 von allen Einzelzellen. x-Achse: Fluoreszenzintensität von eFluor 450, y-Achse: relative Häufigkeit	46
Abbildung 17 – Streudiagramm der lebenden Zellen. x-Achse: Intensität des GFP-Signals aller Pixel, y-Achse: Intensität des hellsten Pixels im GFP-Kanal. Jeder Punkt entspricht einer Zelle.	47
Abbildung 18 – Darstellung der durch die in Abbildung 17 gezeigten Gate ausgewählten Zellen. Die Spalten entsprechen den bezeichneten Fluoreszenzkanälen sowie dem Hellfeldkanal (Brightfield). Jede Spalte zeigt eine analysierte Zelle.	47
Abbildung 19 – Histogramm des Verhältnisses zwischen intrazellulärem GFP-Signal und GFP-Signal der gesamten Zelle inklusive Plasmamembran als Logarithmus. Dargestellt sind auch die beiden Gates für internalisiert (rechts) und angehängt (links).	48
Abbildung 20 - Die obere Zelle hat GFP internalisiert, die untere Zelle hat GFP ausserhalb der Plasmamembran angeheftet. Links Hellfeldkanal, Mitte GFP-Kanal (grün), Rechts Überlagerung von Hellfeld- und GFP-Kanal.	49
Abbildung 21 – Streudiagramm der Intensität der Färbung von CD11c auf der x-Achse und der Intensität der Färbung von CD11b auf der y-Achse. Dargestellt sind die drei Gates, jeder Punkt entspricht einer Zelle.	49
Abbildung 22 – Oben: Beispiel einer CD11b ⁻ /CD11c ⁺ Zelle. Unten: Beispiel einer CD11b ⁺ /CD11c ⁺ Zelle. Dargestellt sind alle Fluoreszenzkanäle sowie der Hellfeldkanal.	50
Abbildung 23 – Histogramm mit der Intensität der Färbung für Gr-1 auf der x-Achse und der relativen Häufigkeit auf der y-Achse. Dargestellt sind die beiden Gates für Gr-1 ⁺ sowie Gr-1 ⁻ .	50
Abbildung 24 - Oben: Beispiel einer CD11b ⁺ /CD11c ⁻ /Gr-1 ⁺ Zelle. Unten: Beispiel einer CD11b ⁺ /CD11c ⁻ /Gr-1 ⁻ Zelle. Dargestellt sind alle Fluoreszenzkanäle sowie der Hellfeldkanal.	51
Abbildung 25 - Überblick über die Gating-Strategie zur Detektion von GFP- <i>E. coli</i> im Überstand. Die einzelnen Diagramme werden nachfolgend genauer erläutert.	52
Abbildung 26 – Dargestellt sind alle aufgenommenen Daten als Histogramm mit der Intensität im grünen Fluoreszenzkanal als x-Achse und der relativen Häufigkeit als y-Achse. Die blaue Linie stellt das Gate dar, mit welchem GFP+ Objekte selektiert werden.	52
Abbildung 27 – GFP+ Objekte als Histogramm mit der Intensität des hellsten Pixels im Bild als x-Achse und der relativen Häufigkeit als y-Achse. In orange ist das Gate dargestellt, welches nur diejenigen Objekte auswählt, welche ein helles Pixel im GFP-Kanal aufweisen.	53
Abbildung 28 – Streudiagramm der gegateten Objekte aus Abbildung 27. x-Achse: Fläche des Objektes im Hellfeldkanal, y-Achse: Aspect Ratio des Objektes im Hellfeldkanal.	53
Abbildung 29 – Streudiagramm der gegateten Objekte aus Abbildung 28. Die Achsen zeigen die Intensitäten in den Fluoreszenzkanälen 3, 4 und 6 dar. Das rechte Streudiagramm verwendet die Objekte des Gates aus dem linken Streudiagramm.	54
Abbildung 30 – Beispiele von gegateten GFP- <i>E. coli</i> . Dargestellt sind alle Fluoreszenzkanäle und der Hellfeldkanal (Ch05).	54

Abbildung 31 - Positiver Pixelanteil von Leber und mLN der BDL-Gruppe	56
Abbildung 32 -Positiver Pixelanteil von Leber und mLN der CCL ₄ -Gruppe. * = p<0,05	57
Abbildung 33 – Positiver Pixelanteil in den mesenterialen Lymphknoten für alle untersuchten experimentellen Gruppen des intestinalen Loops mit Injektion von GFP- <i>E. coli</i> . Ctrl: Kontrolle, PPVL: Partielle Portalvenenligatur, BDL: Gallengangligatur, CCL ₄ : Tetrachlormethan-induzierte Leberzirrhose. * = p<0,05.....	58
Abbildung 34 - Positiver Pixelanteil in den mesenterialen Lymphknoten für alle untersuchten experimentellen Gruppen des intestinalen Loops mit Injektion von GFP- <i>E. coli</i> . Ctrl: Kontrolle, PPVL: Partielle Portalvenenligatur, BDL: Gallengangligatur	59
Abbildung 35 – Relative Häufigkeit GFP positiver Zellen in Proben der mesenterialen Lymphknoten (mLN) für die drei experimentellen Gruppen BDL (Gallengangligatur), PPVL (partielle Portalvenenligatur) und Ctrl (Kontrolle). ** = p<0,01	60
Abbildung 36 – Relative Häufigkeit der Zellen, die GFP internalisiert (int) beziehungsweise angehängt (att) haben für die drei experimentellen Gruppen BDL, PPVL und Ctrl. * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001	61
Abbildung 37 – Relative Häufigkeit der Zellen aus mLN, welche GFP internalisiert haben aufgeteilt in die vier Subgruppen anhand der Marker CD11b, CD11c sowie Gr-1 wie im Kapitel «Analyse der Daten mittels IDEAS®» beschrieben. Für jede der Subgruppen ist die relative Häufigkeit der Zellen in den drei experimentellen Gruppen dargestellt. *** = p<0,001, **** = p<0.0001	62
Abbildung 38 - Relative Häufigkeit der Zellen aus mLN, welche GFP angehängt haben aufgeteilt in die vier Subgruppen anhand der Marker CD11b, CD11c sowie Gr-1 wie im Kapitel «Analyse der Daten mittels IDEAS®» beschrieben. Für jede der Subgruppen ist die relative Häufigkeit der Zellen in den drei experimentellen Gruppen dargestellt. * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001 .	63
Abbildung 39 - Relative Häufigkeit der Zellen aus mLN, welche kein GFP enthalten, aufgeteilt in die vier Subgruppen anhand der Marker CD11b, CD11c sowie Gr-1 wie im Kapitel «Analyse der Daten mittels IDEAS®» beschrieben. Für jede der Subgruppen ist die relative Häufigkeit der Zellen in den drei experimentellen Gruppen dargestellt. * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001 .	64
Abbildung 40 - Relative Häufigkeit GFP positiver Zellen in Proben der Peyer-Patches (PP) für die drei experimentellen Gruppen BDL (Gallengangligatur), PPVL (partielle Portalvenenligatur) und Ctrl (Kontrolle). * = p<0,05	65
Abbildung 41 - Relative Häufigkeit der Zellen aus Peyer-Patches, die GFP internalisiert (int) beziehungsweise angehängt (att) haben für die drei experimentellen Gruppen BDL, PPVL und Ctrl. ** = p<0,01	66
Abbildung 42 - Relative Häufigkeit der Zellen aus Peyer-Patches, welche GFP internalisiert haben aufgeteilt in die vier Subgruppen anhand der Marker CD11b, CD11c sowie Gr-1 wie im Kapitel «Analyse der Daten mittels IDEAS®» beschrieben. Für jede der Subgruppen ist die relative Häufigkeit der Zellen in den drei experimentellen Gruppen dargestellt. ** = p<0,01	67
Abbildung 43 - Relative Häufigkeit der Zellen aus Peyer-Patches, welche GFP angehängt haben aufgeteilt in die vier Subgruppen anhand der Marker CD11b, CD11c sowie Gr-1 wie im Kapitel	

- «Analyse der Daten mittels IDEAS®» beschrieben. Für jede der Subgruppen ist die relative Häufigkeit der Zellen in den drei experimentellen Gruppen dargestellt. * = $p < 0,05$ 68
- Abbildung 44 - Relative Häufigkeit der Zellen aus Peyer-Patches, welche kein GFP enthalten, aufgeteilt in die vier Subgruppen anhand der Marker CD11b, CD11c sowie Gr-1 wie im Kapitel «Analyse der Daten mittels IDEAS®» beschrieben. Für jede der Subgruppen ist die relative Häufigkeit der Zellen in den drei experimentellen Gruppen dargestellt. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$. 69
- Abbildung 45 - Relative Häufigkeit der Zellen aus peripherem Blut, welche kein GFP enthalten, aufgeteilt in die vier Subgruppen anhand der Marker CD11b, CD11c sowie Gr-1 wie im Kapitel «Analyse der Daten mittels IDEAS®» beschrieben. Für jede der Subgruppen ist die relative Häufigkeit der Zellen in den drei experimentellen Gruppen dargestellt. *** = $p < 0,001$, n.s.: nicht signifikant 70
- Abbildung 46 – Relative Häufigkeit von GFP-*E. coli* im Überstand der ersten Zentrifugation aus mLN, PP und Blut für die drei experimentellen Gruppen BDL, PPVL und Ctrl. *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0.0001$, n.s.: nicht signifikant 71
- Abbildung 47 - Autofluoreszenz im Lebergewebe, Ctrl-Gruppe, intestinaler Loop mit Injektion von GFP-*E. coli*, Blau: DAPI-Filter, Grün: FITC-Filter, Skala 50 μm 72