

Aus der medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und
Gastroenterologie der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

**Intestinale bakterielle Überwucherung und bakterielle
Translokation bei alkoholinduzierter Lebererkrankung im
Mausmodell**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae
(Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Johannes Brandl
aus Regensburg

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. E. Schott
2. Priv.-Doz. Dr. med. B. Siegmund
3. Priv.-Doz. Dr. med. R. Wiest

Datum der Promotion: 24.02.2012

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis	Seite
1 Inhaltsverzeichnis	4
2 Einleitung	6
2.1 Die Auswirkung des Alkohols auf die Leber	6
2.1.1 Alkoholische Fettleber	6
2.1.2 Alkoholische Steatohepatitis	8
2.1.3 Leberfibrose und Leberzirrhose	9
2.2 Die Auswirkungen des Alkohols auf den Darm	9
2.2.1 Alkohol und die bakterielle Überwucherung	10
2.2.2 Alkohol und die intestinale Permeabilität	11
2.2.3 Alkohol und die Schädigung der Darmmukosa	12
2.2.3.1 Akute Mukosaschädigung	12
2.2.3.2 Chronische Mukosaschädigung	13
2.2.4 Alkohol und der Endotoxin-Plasmaspiegel	13
2.2.5 Die Rolle der Endotoxine bei alkoholischer Leberschädigung	14
2.3 Bakterielle Translokation	16
2.3.1 Einfluss der Darmflora	16
2.3.2 Störung der intestinalen Mukosabarriere	18
2.4 Ziele der Arbeit	20
3 Material und Methoden	21
3.1 Material und Geräte	21
3.1.1 Material	21
3.1.2 Geräte	21
3.1.3 Lösungen und Reagenzien	22
3.1.4 Platten	22
3.1.5 Antikörper	23
3.1.5.1 Polyklonale Antikörper	23
3.1.5.2 Monoklonale Antikörper	23
3.1.5.3 Sekundärantikörper	23
3.1.6 Primersequenzen	23
3.2 Methoden	25

3.2.1	Herstellung der Agar-Platten	25
3.2.1	Tsukamoto-French-Maus-Modell	25
3.2.1.1	Tiere	25
3.2.1.2	Operation	25
3.2.2	Ernährung	26
3.2.3	Organentnahme	27
3.2.3.1	Anästhesie	27
3.2.3.2	Präparation	27
3.2.3.3	Entnahme des Serums	27
3.2.3.4	Entnahme der mesenterialen Lymphknoten	27
3.2.3.5	Entnahme der Leber	28
3.2.3.6	Entnahme des Darms	28
3.2.3.7	Zählung der Kolonien	29
3.2.4	Isolation der RNA	30
3.2.5	DNase-Verdau der RNA	30
3.2.6	Reverse Transkription	31
3.2.7	Real-Time-quantitative-PCR	31
3.2.8	Western Blot	32
3.2.9	Immunhistologie und HE-Färbung	33
3.2.10	ALT-Messung	33
3.2.11	Statistische Analyse	34
4	Ergebnisse	35
5	Diskussion	50
6	Zusammenfassung	58
7	Abkürzungen	60
8	Literaturverzeichnis	62
9	Anhang	69
9.1	Curriculum Vitae	69
9.2	Publikationen	72
9.3	Danksagungen	73
9.4	Eidesstattliche Erklärung	74

2 Einleitung

2.1 Die Auswirkung des Alkohols auf die Leber

Die Leberfibrose kann durch unterschiedliche Ursachen chronischer Leberschädigungen hervorgerufen werden und ist als eine Art Wundheilungsprozess anzusehen. Die wichtigste Ursache in den westlichen Ländern ist chronischer Alkoholmissbrauch, der im Übrigen für mehr als 50% aller Leberzirrhosen verantwortlich gemacht wird [1, 2]. Typischerweise besteht eine Leberschädigung jahrelang, bevor es zu einer Vernarbung des Organs kommt. Die alkoholische Lebererkrankung ist durch eine Fettleber (Steatose) charakterisiert, die bei Fortschreiten zu einer alkoholischen Hepatitis (Steatohepatitis) und schließlich zu einer Fibrose führt. Die Leberfibrose ist ein Zeichen einer Leberschädigung und führt letztendlich bei Progredienz zu einer Zirrhose.

In frühen Stadien der Fibrose, die reversibel sind, arbeitet die Leber noch relativ normal und nur wenige Patienten haben Symptome [3]. Wenn jedoch die Entzündung und die Leberschädigung andauern, bildet sich Narbengewebe, das eventuell die metabolischen Funktionen der Leber beeinflusst. Die chronische alkoholische Lebererkrankung geht in 15-40 % in eine Leberzirrhose über, die in der Regel irreversibel ist und eine häufige Ursache für Morbidität und Mortalität darstellt [4]. Bisher existiert noch keine adäquate Behandlung der Leberfibrose. Patienten, die eine Leberzirrhose bekommen, haben eine schlechte Prognose und oft ist eine Lebertransplantation indiziert. In Deutschland sterben jährlich mehr als 20.000 Menschen an den Folgen einer Leberzirrhose [5]. Selbst diejenigen, die eine Zirrhose überleben, haben ein hohes Risiko, ein hepatozelluläres Karzinom und andere Folgeerkrankungen zu entwickeln.

2.1.1 Alkoholische Fettleber

Die Fettleber ist die erste erkennbare durch Alkohol hervorgerufene Veränderung in der Leber und wird durch die Akkumulation von Fett definiert. Man fand heraus, dass die Fettleber nicht nur als harmlose Folgeerscheinung von Alkoholabusus zu werten ist [6]. Vielmehr ist die Fettleber gleichzeitig anfälliger für die fibrogenen Eigenschaften des Alkohols, seinen toxischen Abbauprodukten und zudem gegenüber den aus dem Dünndarm stammenden

Endotoxinen, die ebenfalls in der Pathogenese der Leberfibrose eine wichtige Rolle spielen. Es wurde außerdem beschrieben, dass schon eine akute Alkoholintoxikation zur signifikanten Akkumulation von Fett in den Hepatozyten führt [7]. Die genauen Mechanismen, wodurch Alkohol eine Fettleber verursacht, sind noch nicht vollständig verstanden. Es ist jedoch bekannt, dass Alkohol stark mit dem Fettstoffwechsel korreliert. Studien konnten zeigen, dass der Alkoholmetabolismus das intramitochondriale Redoxpotential der Leber durch Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd unter Bildung von NADH verändert. NADH hemmt die β -Oxidation freier Fettsäuren in den Mitochondrien und stimuliert die Produktion freier Fettsäuren aus Acetyl-CoA [8]. Ethanol fördert außerdem die Produktion von Fettsäuren durch Hochregulation fettbildender Enzyme, wie zum Beispiel der hepatischen L- α -Glycerinphosphatacyltransferase oder der Fettsäuresynthase. Die Folge ist eine vermehrte Synthese und Anhäufung von Triglyzeriden. Diese lagern sich in der Leber ab oder werden in „very low density“-Lipoproteinen (VLDL) umgewandelt [9]. Acetaldehyd hemmt das mikrotubuläre System der Leber, was zu einer Sekretionsstörung von VLDL führt. Durch die Überflutung der Leber mit freien Fettsäuren kommt es zur Stimulation anderer Stoffwechselwege, wie zum Beispiel der peroxisomalen β -Oxidation und der mikrosomalen ω -Oxidation. Die Kapazität dieser Stoffwechselvorgänge ist durch die Aktivierung des peroxisomalen proliferativen nukleären Rezeptors (PPAR) durch Dicarboxysäuren (Produkte der ω -Oxidation) gesteigert [9]. Die Aktivierung dieses Rezeptors führt zu einer Erhöhung der Transkription von Fettsäure bindendem Protein, von Acyl-CoA-Oxidase und Cytochrom P450 4A1, durch Bindung an das Response-Element in der Promoterregion der korrespondierenden Gene [9]. Das Ergebnis des Einflusses von Alkohol auf den Fettstoffwechsel der Leber ist die Produktion einer Fettleber, vorwiegend durch Triglyzeridakkumulation. Neben dieser Akkumulation von freien Fettsäuren und Triglyzeriden werden durch chronischen Alkoholkonsum vermehrt Fette und VLDL aus der Leber ins Blut sezerniert, was eine Erhöhung des Lipidspiegels im Plasma zur Folge hat. Dieser Kompensationsmechanismus nimmt jedoch bei fortschreitender alkoholbedingter Leberschädigung wegen der gesteigerten Produktion toxischer Metabolite immer mehr ab. Chronischer Alkoholkonsum führt zur weiteren Verschlechterung der Leberschädigung und fördert die Fibrogenese [10]. Vor allem bei gleichzeitiger fettreicher Ernährung wird die Leberfibrosierung potenziert und beschleunigt [11]. Durch strikte Restriktion des Alkohols kann sich eine alkoholische Fettleber wieder zurückbilden. Dieser Prozess dauert in etwa drei bis vier Wochen [11].

2.1.2 Alkoholische Steatohepatitis

Durch fortwährenden Alkoholkonsum kann sich aus der alkoholischen Lebersteatose eine alkoholische Steatohepatitis (ASH) entwickeln. Die Steatohepatitis ist die zweite Stufe der alkoholbedingten Lebererkrankung, die im weiteren Verlauf zur Leberfibrose führt. Histomorphologisch ist dieses Stadium nicht von einer nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH) zu unterscheiden. Eine Diagnose kann deshalb nur anhand von klinischen Hinweisen auf Alkoholmissbrauch gestellt werden [12].

Auch die alkoholische Steatohepatitis ist in der Frühphase reversibel. Verschiedene Mechanismen tragen zur deren Entstehung bei. Vor allem besteht eine vermehrte Rekrutierung und Aktivierung inflammatorischer Zellen. Bei der Oxidation von Alkohol über die Alkoholdehydrogenase entsteht NADH, welches zu metabolischen Veränderungen in der Leber führt und vor allem für die Entwicklung einer Fettleber verantwortlich ist [13]. Des Weiteren wird die toxische Substanz Acetaldehyd gebildet, die sowohl durch eine Mitochondrienschädigung zur Pathogenese der Fettleber beiträgt, als auch die Fibrogenese steigert. Chronischer Alkoholkonsum induziert verschiedene Enzymsysteme, wie zum Beispiel das Zytochrom P450 2E1 (CYP2E1)-abhängige mikrosomale Ethanol-oxidierende System (MEOS), die Alkoholdehydrogenase und die peroxisomale Katalase. Wichtig scheint hier vor allem die Induktion des Zytochrom P450 2E1. Bei fortwährendem Alkoholkonsum werden über dieses Zytochromsystem reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Hydroxyethyl-Radikale in einem Übermaß gebildet und nur unzureichend abgebaut, so dass die Leber dadurch erheblich geschädigt wird [13].

Ein weiterer wichtiger Faktor für das Auftreten einer alkoholischen Steatohepatitis ist die Freisetzung von Zytokinen aus Kupfferzellen der Leber. Diese Zellen werden vor allem durch das Eindringen von Endotoxinen aus dem Darm aktiviert. Die Endotoxämie entsteht durch eine alkoholbedingte bakterielle Überwucherung mit nachfolgend gesteigerter Durchlässigkeit der Darmmukosa gegenüber Bakterien und deren Spaltprodukten, sowie durch eine abgeschwächte Phagozytoseleistung der Kupfferzellen [14]. Schon kleinste Mengen in den Blutkreislauf gelangter Endotoxine reagieren mit dem Glykoprotein CD-14 auf Kupfferzellen, sofern ein Lipopolysaccharid-bindendes Protein (LBP) vorhanden ist. Das Lipopolysaccharid-bindende Protein ist ein Akutphaseprotein, das von den Hepatozyten gebildet wird und Kupfferzellen für Endotoxine sensibilisiert. Über verschiedene Aktivierungswege kommt es zur vermehrten Produktion von Zytokinen und Chemokinen. Chemokine tragen dazu bei, dass periphere Immunzellen in die Leber einwandern und dadurch der Entzündungsvorgang der

Leber noch verstärkt wird. Zytokine wie zum Beispiel Interleukin (IL)-1, IL-6 und Tumornekrosefaktor (TNF) werden vor allem von aktivierten Kupfferzellen freigesetzt und weisen zytotoxische Effekte gegen Hepatozyten auf, was zu einer Nekrose führen kann. Das wichtigste Zytokin bei der alkoholischen Lebererkrankung ist TNF, das in der Leber von aktivierten Kupfferzellen gebildet wird und maßgeblich für die Apoptose und Nekrose von Hepatozyten verantwortlich ist [3]

2.1.3 Leberfibrose und Leberzirrhose

Die hepatische Fibrose und Zirrhose ist durch eine exzessive Ablagerung von Bindegewebe im extrazellulären Raum gekennzeichnet, das sich aus extrazellulären Matrixproteinen zusammensetzt. Für die gesteigerte Synthese und Ablagerung des narbigen Bindegewebes in der Leber sind vor allem aktivierte hepatische Sternzellen verantwortlich. Diese sind auch bekannt als Ito-Zellen, perisinusoidale Fettspeicherzellen oder hepatische Lipozyten [7]. Die hepatischen Sternzellen sind normalerweise in einem ruhenden Zustand. Ihre Aufgabe ist es, Vitamin A zu speichern. Nach einer Leberschädigung kommt es zu einer Aktivierung dieser Zellen, die sich hierauf in einen Myofibroblasten-ähnlichen Zelltyp umwandeln, der durch Expression von „alpha smooth muscle actin“ (α SMA), Verlust der zellulären Vitamin A-Speicher, erhöhtem fibrogenen und proinflammatorischen Potential und vermehrter zellulärer Proliferation gekennzeichnet ist [15]. Diese Aktivierung gilt als entscheidender Faktor bei der Entstehung der Leberfibrose. Die Konsequenz der Aktivierung und Proliferation ist eine drastisch erhöhte interstitielle Ablagerung des Kollagens Typ I, Typ III und Typ IV [1, 7]. Diese Akkumulation extrazellulärer Matrix führt zu einer Zerstörung der normalen Leberarchitektur und zur Ausbildung fibrotischer Bänder. Die sich anschließende Entwicklung von Regeneratknoten definiert das Stadium der Zirrhose und bedeutet eine Einschränkung der Leberfunktion [3].

2.2 Die Auswirkung des Alkohols auf den Darm

Chronischer Alkoholkonsum ist mit einer Reihe von Krankheiten wie der alkoholischen Lebererkrankung, der Pankreatitis, der Kardiomyopathie, dem akuten Lungenversagen und bei

einigen Menschen mit Hirnschäden assoziiert. Es scheint, dass Endotoxine eine wichtige Rolle bei der Entstehung alkoholinduzierter Gewebe- und Organschäden, insbesondere der Leberschädigung, spielen [16].

Endotoxine sind Lipopolysaccharide (LPS), welche von der Zellwand im Darm angesiedelter gramnegativer Bakterien stammen und bei deren Zerfall freigesetzt werden. Der Zusammenhang zwischen Alkohol, Endotoxinen und Leberschädigung wird vor allem dadurch deutlich, dass Forscher bei Patienten mit alkoholischer Lebererkrankung erhöhte Plasmaendotoxinwerte beobachteten [16, 17]. Dieser Zusammenhang wurde ferner in einem Rettenmodell bestätigt. Dabei führte die Gabe von LPS dazu, dass die Fettleber bei alkoholischer Lebererkrankung in eine nekrotisierende Entzündung überging [18]. Nach Elimination oder Suppression der intestinalen Bakterien wurde außerdem bei Ratten mit alkoholischer Lebererkrankung reduzierte Plasmaendotoxinwerte festgestellt [19]. Unter physiologischen Umständen wird nur ein sehr geringer Teil der Endotoxine vom Darm durch das intestinale Epithel aufgenommen. Diese werden zur Leber transportiert und dort von Kupfferzellen beseitigt. Die Menge der Endotoxine, die die Leber erreichen, können Kupfferzellen aktivieren, um hierauf eine Hepatitis zu initiieren [20]. Üblicherweise besteht in der Leber jedoch eine Toleranz gegenüber Endotoxin. Außerdem führen die im Blutkreislauf zirkulierenden Endotoxine wahrscheinlich zu Schädigungen anderer Organe. Erhöhte Plasmaendotoxinwerte bei chronischem Alkoholkonsum sind das Ergebnis exzessiver Produktion von Endotoxinen im Darm durch Bakterienüberwucherung, vermehrter Durchlässigkeit des Darms gegenüber der Endotoxine und verzögerter Elimination der Endotoxine durch die Kupfferzellen [14].

2.2.1 Alkohol und die bakterielle Überwucherung

Der Darm des gesunden Menschen ist ein Lebensraum für verschiedene Bakterientypen. Eine Überwucherung mit Bakterien hat eine vermehrte Produktion von Endotoxinen zur Folge, die in den portalen Blutkreislauf gelangen und für eine Erhöhung des Plasmaendotoxinlevels sorgen können. Es existieren nur wenige Studien, die den Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum und der bakterielle Überwucherung des Dünndarms untersucht haben. Eine Erhöhung von Mikroorganismen, einschließlich gramnegativer Kolibakterien wurde im proximalen Dünndarm chronisch Alkoholabhängiger beschrieben. Jedoch wurde keine Korrelation zwischen der Anzahl oder Typen der Mikroorganismen im Jejunum und dem Typ

oder Grad der Lebererkrankungen bei Alkoholkranken gefunden. [21]. Hauge et al, 1997 beschrieben ebenfalls die bakterielle Überwucherung im Duodenum von Alkoholikern [22]. Diese Studien zeigen, dass chronischer Alkoholabusus bakterielles Wachstum im Darm begünstigt. Neben diesen Studien, die die quantitativen Unterschiede untersuchen, existiert nun auch eine Studie über die qualitativen Unterschiede der Darmflora bei Ratten nach Alkoholgabe. Bakterien des Ileums und Kolons wurden mit Length Heterogeneity (LH)-PCR untersucht. Die Bakterienzusammensetzung im Kolon alkoholgefütterter Tiere war nach zehn Wochen verändert. Diese Daten zeigen zum ersten Mal, dass täglicher Alkoholkonsum die Zusammensetzung der normalen Darmflora verändert und dass diese Dysbiose wahrscheinlich ein wichtiger Mechanismus der alkoholinduzierten Endotoxämie darstellt [23].

2.2.2 Alkohol und die intestinale Permeabilität

Seit langem ist bekannt, dass die Mukosabarriere des Dünndarms für Makromoleküle nicht absolut dicht ist, sondern sehr kleine Mengen von normalerweise nicht absorbierten Makromolekülen in die Mukosa aufgenommen werden und im Blut nachweisbar sind. Akuter und chronischer Alkoholkonsum erhöhen die Permeabilität der Mukosa für solche Substanzen. Mehrere Studien haben den Effekt von Alkohol auf die intestinale Permeabilität, vor allem in Bezug auf Endotoxine untersucht. Bei Ratten, die Alkohol über Sondenernährung bekamen, stieg die Durchlässigkeit der Darmmukosa gegenüber Makromolekülen wie Hämoglobin, Meerrettichperoxidase und ⁵¹Cr-markiertes EDTA [24, 25]. Auch bei Menschen wurde ein alkoholinduzierter Anstieg der intestinalen Permeabilität beschrieben. Eine Steigerung der Permeabilität für ⁵¹Cr-markiertes EDTA fand sich auch bei Alkoholikern ohne Zirrhose [26].

Um zu ermitteln, ob Alkohol die intestinale Permeabilität für Makromoleküle steigert, wurde die Durchlässigkeit für Polyethylenglykol mit verschiedenen Molekulargewichten (MG 400, MG 1500, MG 4000 und MG 10000) bei Alkoholikern mit verschiedenen Stadien alkoholischer Lebererkrankung gemessen. Es stellte sich heraus, dass die Permeabilität für Polyethylenglykol MG 400 unverändert im Vergleich zu gesunden Kontrollen war. Hingegen war die Durchlässigkeit für Polyethylenglykol MG 1500 und MG 4000 bei Alkoholikern deutlich erhöht und für Polyethylenglykol MG 10000 sogar mehr als zehnfach so hoch wie bei Gesunden [27]. Den direkten Beweis für eine erhöhte Darmdurchlässigkeit für Endotoxine

bei Alkohol lieferte eine Studie mit Ratten, bei der die intragastrale Gabe von LPS (5 mg/kg) bei alkoholgefütterten Ratten nach zwei Stunden eine signifikante Erhöhung des portalvenösen Endotoxinspiegels zeigte [28]. Eine solche Erhöhung ließ sich nicht bei den Kontrolltieren feststellen. In einer anderen Studie waren die Plasmaendotoxinspiegel bei über längere Zeit mit Alkohol gefütterten Ratten höher als in den Kontrollen nach intragastraler Gabe von hochdosierten Endotoxinen (20 mg/kg). Zudem war die Darmpermeabilität für Dextrane, die mit fluoreszierten Isothiozyanaten markiert wurden, mit einem mittleren Molekulargewicht von 4000 Dalton erhöht [29]. Ähnliche Ergebnisse wurden in einer Studie mit Mäusen festgestellt, die 1 mg/kg bakterielles LPS mittels Magensonde eine Stunde nach Fütterung mit Alkohol bekamen [30]. Alkohol alleine aber nicht LPS alleine läßt den Plasmaendotoxinspiegel signifikant ansteigen, und Alkohol zusammen mit LPS verursachen ferner auch einen signifikanten Anstieg des Plasmaendotoxinspiegels [30].

Diese Studien zeigen ganz deutlich, dass Alkohol die intestinale Permeabilität für verschiedene Makromoleküle, einschließlich der Endotoxine, erhöhen kann.

2.2.3 Alkohol und die Schädigung der Darmmukosa

2.2.3.1 Akute Mukosaschädigung

Die orale oder enterale Gabe von alkoholischen Lösungen an Nagetiere oder Hunde in Konzentrationen, die in gewöhnlichen Supermärkten frei erhältlich sind ($\geq 4\%$ vol/vol), führen zu Mukosaschäden im oberen Dünndarm bis hin zum Untergang des Epithels an der Spitze der Zotten, hämorrhagischen Erosionen und auch Blutungen in der Lamina propria [24]. Ähnliche Läsionen wurden auch bei Freiwilligen zwei bis drei Stunden nach Alkoholkonsum (15-20 %, vol/vol) und bei Probanden, die erst seit kurzem Alkoholabusus betrieben, nachgewiesen [24]. Bei Ratten, die mittels Sonde mit 20-prozentigem Ethanol für vier Stunden ernährt wurden, ergaben sich blutige Erosionen des proximalen Dünndarms mit Untergang von Epithelzellen [31]. Die derzeitigen Vorstellungen zur Pathogenese dieser Mukosaschäden basieren vor allem auf tierexperimentellen Untersuchungen. Neben einem direkten toxischen Effekt von Alkohol auf die Epithelschicht der Mukosa weisen einige experimentelle Studien darauf hin, dass Alkohol eine Störung der Mikrozirkulation in der Mukosa erzeugt. Hierdurch kommt es zu einem verstärkten Flüssigkeitsaustritt mit interstitiellem Ödem, welches in der Folge die interepitheliale Verbindung zerstört. Zusätzlich kommt es zu einer Abflussbehinderung im Bereich der Lymphbahnen, zur Blasenbildung im

Bereich der Submukosa und schließlich zur Abschilferung der Zottenspitze [30]. Eine alkoholinduzierte, lokale Freisetzung toxischer Metabolite wie Histamin, Leukotriene und reaktiver Sauerstoffverbindungen wird für die Membranschädigung verantwortlich gemacht, die zu einer erhöhten Permeabilität der Mukosa führt. In einer Studie an Hasen wurde festgestellt, dass Alkohol initial zu einer gesteigerten Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies führt, die ein verstärktes Einwandern neutrophiler Granulozyten begünstigt [32]. Toxische Mediatoren der Granulozyten und eine gesteigerte Histaminfreisetzung aus Mastzellen führen daraufhin zu Membranschädigungen und Störungen der Mikrozirkulation. Eine akute Alkoholaufnahme (orale Einmaldosis von 6g/kg) führte zu einem schwerwiegenden Schaden an der Schleimhautbarriere des Ileums bei Mäusen [30]. Dies beinhaltete kleine Schädigungen der Epithelschicht der Mikrovilli, submuköse Blasenbildung und Ulzerationen der Mikrovilli [30].

2.2.3.2 Chronische Mukosaschädigung

Nach mehrwöchiger Alkoholgabe konnte man in tierexperimentellen Studien eine deutliche Höhenabnahme der Zotten verbunden mit einer Zunahme der Kryptenzahl und Veränderungen im Bereich der Mitochondrien finden [33]. Eine signifikante Mukosaschädigung des Ileums mit subepithelialen Ödemen der Zottenspitzen, zelluläre Infiltration der Spitzen und Abschilferung wurde ebenfalls bei Ratten festgestellt, die 14 Tage lang mit 20-prozentigem Alkohol mittels Sonde ernährt wurden [34]. Bei Untersuchungen am Menschen waren die Ergebnisse nicht eindeutig. Hier wurde bei chronischem Alkoholkonsum nur inkonstant morphologische Veränderungen der Dünndarmschleimhaut gesehen [33].

2.2.4 Alkohol und der Endotoxin-Plasmaspiegel

Eine Folge der chronischen Mukosaschädigung durch Alkohol ist eine deutliche Permeabilitätssteigerung des Darmes für Makromoleküle. Die häufig nachweisbare Endotoxämie bei Alkoholikern ist die logische Auswirkung der gesteigerten Permeabilität der Darmschleimhaut. Eine Assoziation zwischen Alkoholkonsum und dem Plasmaendotoxinspiegel wurde beim Menschen ebenso wie bei Tieren erforscht. Der Plasmaendotoxinspiegel war bei Patienten mit verschiedenen Stadien der alkoholischen Lebererkrankung (Fettleber, Hepatitis und Zirrhose) signifikant höher als bei gesunden

Kontrollen [17, 27, 35]. Die Menge des Alkohols schien außerdem einen bedeutenden Einfluss auf den Endotoxinspiegel und die Lebererkrankung zu haben. In diesen Studien konsumierten gesunde Kontrollpersonen weniger als 20 g/Tag Alkohol im Vergleich zu Patienten mit alkoholischer Lebererkrankung, die mehr als 60 g/Tag zu sich nahmen. Ferner war der Plasmaendotoxinspiegel auch signifikant erhöht bei aktiv trinkenden Alkoholikern, bei denen noch keine Lebererkrankung diagnostiziert wurde [16]. Die Endotoxämie war bei der Mehrheit der Patienten mit alkoholischer Fettleber und in 50 % der Patienten mit milder alkoholischer Hepatitis innerhalb einer Woche der Alkoholabstinenz reversibel [17]. Der Plasmaendotoxinspiegel war signifikant höher bei Patienten mit alkoholischer Leberzirrhose als bei Patienten mit nicht-alkoholischer Leberzirrhose [16, 17]. Dies impliziert wiederum, dass Alkohol selbst auch die Darmbarriere stören kann und den Endotoxinspiegel erhöht.

Die Beziehung zwischen Alkoholkonsum und dem Plasmaendotoxinspiegel wurde ebenso bei Tieren mit alkoholischer Leberschädigung gezeigt. Hier war der Serumendotoxinspiegel bei Ratten mit alkoholischer Leberschädigung nach Sondenernährung mit Alkohol für zehn Wochen deutlich erhöht [36]. In einer ähnlich angelegten Studie war der Plasmaendotoxinspiegel bei Ratten mit alkoholischer Leberschädigung erhöht, die nach 3-4-wöchiger alkoholischer Magensondenernährung entstand [19, 37]. Bei Mäusen war der Plasmaendotoxinspiegel ebenfalls nach eineinhalb-stündiger intragastraler Fütterung mit 6 g/kg Ethanol signifikant erhöht [30]. Angeführte Studien sowohl an Menschen als auch an Tieren legen dar, dass Alkohol durch Erhöhung der intestinalen Permeabilität für den Übertritt der Endotoxine vom Darm in den Pfortaderkreislauf zur Leber verantwortlich ist und dass daraus ein erhöhter Plasmaendotoxinspiegel resultiert.

2.2.5 Die Rolle der Endotoxine bei alkoholischer Leberschädigung

Viele Hinweise legen nahe, dass die vom Darm stammenden Endotoxine eine zentrale Rolle für den Beginn und vielleicht auch den Verlauf der Leberschädigung spielen. Den Beweis hierfür lieferten vor allem Studien an Tieren. Ratten, die einem chronischen Ethanolkonsum ausgeliefert waren, zeigten nach Gabe von Endotoxinen eine Progression von der Fettleber hin zur Entzündung mit Zelluntergang [18, 38]. Die Entkeimung des Darms durch Antibiotika reduzierte die durch intragastrale Alkoholgabe erzeugte alkoholische Lebererkrankung bei Ratten. Dies ging mit einer reduzierten Konzentration an Plasmaendotoxinen einher [19]. Im

gleichen Modell wurden ähnliche Ergebnisse durch simultane Fütterung von probiotischen Laktobazillus-Bakterien gezeigt [37].

Endotoxine initiieren eine Lebererkrankung über die Aktivierung der hepatischen Kupfferzellen. Eine Studie zeigte, dass die Inaktivierung der Kupfferzellen mittels Gadoliniumchlorid die Leberschädigung bei chronischer Alkoholexposition signifikant abmilderte [39]. Endotoxine aktivieren nach Bindung an das Lipopolysaccharid-bindende Protein Kupfferzellen durch zwei Typen von Rezeptoren - zum einen durch CD-14 und zum anderen durch Toll-like-Rezeptor -4 (TLR-4). CD14 ist ein Glykoprotein, das mit seiner Glykosylphosphatidylinositol-Gruppe außen an der Zellmembran verankert ist. Es ist somit ein Oberflächenrezeptor ohne zytoplasmatische Domäne, und daher fehlt ihm die Fähigkeit, LPS-induzierte zytoplasmatische Signale über eine Zellmembran weiterzuleiten. TLR-4 ist ein Transmembranprotein mit einer zytoplasmatischen Domäne. Es besteht Grund zu der Annahme, dass TLR-4 für die transmembranöse Signalübermittlung nach der Bindung von LPS an CD-14 zuständig ist. Die Erkenntnis, dass die alkoholische Lebererkrankung sowohl in der CD-14- [40], als auch in der TLR-4-defizienten Maus [41] verhindert werden konnte, legt nahe, dass beide dieser Rezeptoren notwendig sind, damit eine durch Alkohol verursachte Lebererkrankung eintritt. Die Bindung von LPS an diese Rezeptoren auf den Kupfferzellen initiiert eine Kaskade, die zur Aktivierung des nukleären Faktors Kappa-B (NF- κ B) und zur Produktion inflammatorischer Mediatoren wie zum Beispiel von Zytokinen (z.B. TNF- α), Chemokinen oder Adäsionsmolekülen führt [13, 14, 20, 42]. Diese Mediatoren lösen wahrscheinlich eine Entzündung mit Zelluntergang und fibrosierende Prozesse in der Leber aus. Studien zeigten, dass LPS auch die hepatischen Sternzellen aktivieren kann, welche der Zelltyp ist, der hauptsächlich an der Entstehung der Leberfibrose beteiligt ist. In vitro gezüchtete aktivierte menschliche hepatische Sternzellen exprimieren CD-14- und TLR-4-Rezeptoren. Die Stimulation dieser Zellen mit LPS induzierte die Aktivierung des nukleären Faktors Kappa-B und regulierte die Genexpression von IL-8, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) und verschiedener Adhäsionsmoleküle herauf [43]. Aktivierte hepatische Sternzellen der Maus exprimierten TLR-4 und CD-14 und reagierten auf LPS mit einer Hochregulierung von IL-6, MCP-1 und dem transforming growth factor (TGF) – beta 1 [44]. Bei Ratten produzierten die hepatischen Sternzellen, durch LPS stimuliert, die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF, IL-6 und IL-1 [45].

Diese Ergebnisse zeigen, dass LPS direkt hepatische Sternzellen aktivieren und dadurch zur Leberfibrose beisteuern kann. Endotoxine können auch zur Entwicklung anderer Alkohol-

assoziierter Gewebe- und Organschäden, wie z.B. der Pankreatitis, des akuten Lungenversagens (ARDS) und von Hirnschäden beitragen [46].

2.3 Bakterielle Translokation

Die bakterielle Translokation ist definiert als die Wanderung von Bakterien oder bakterieller Produkte aus dem intestinalen Lumen in die mesenterialen Lymphknoten und von dort aus zu anderen extraintestinalen Organen [47]. Die bakterielle Translokation stellt einen Bruch des natürlichen Gleichgewichts der Darmflora dar und kann zu einer Entzündungsantwort und letztendlich zu einer Infektion führen. Die bakterielle Translokation wurde als ein Hauptmechanismus bei der Entstehung spontaner Infektionen im Rahmen einer Leberzirrhose erkannt, zugleich auch als Schlüssel bei der Entstehung der portalen Hypertension, der Entwicklung eines Aszites und des hepatorenenalen Syndroms [48]. Wenn man die Physiologie, die Interaktionen der Darmbakterien untereinander, sowie die Pathogenese der bakteriellen Translokation verstehen würde, könnte dies zu neuen therapeutischen Ansätzen zur Prävention der Infektionen und anderer Komplikationen der Zirrhose führen. Klinische Studien über die bakterielle Translokation der Leberzirrhose sind erschwert mangels nicht invasiver und sensitiver Methoden, um die bakterielle Translokation näher zu untersuchen. Deshalb wurden die meisten Studien der bakteriellen Translokation bei alkoholischer Leberzirrhose an Tierexperimenten durchgeführt, in welchen die bakterielle Translokation durch das Vorhandensein positiver Bakterienkulturen der mesenterialen Lymphknoten definiert wurde.

2.3.1 Einfluss der Darmflora

Die Darmflora spielt für die Gesundheit des Menschen eine äußerst wichtige Rolle. Der Gastrointestinaltrakt, die größte Oberfläche des Körpers, ist konstant mit Mikroorganismen besiedelt. Im Normalzustand handelt es sich um ein stabiles Ökosystem zwischen Darmflora und Wirt. Ihre friedliche Koexistenz setzt das Vorhandensein klar definierter Regeln beziehungsweise eine gute Kommunikation voraus. Die Darmflora besteht aus einer

dynamischen Mixtur verschiedener Mikroorganismen, einer unterschiedlichen Zusammensetzung im Verlauf des Gastrointestinaltrakts, sowie bedeutender quantitativer und qualitativer Unterschiede zwischen Individuen und vor allem innerhalb verschiedener Spezies. Der obere Gastrointestinaltrakt ist am spärlichsten mit Bakterien besiedelt. Vom Ileum an ist ein konstanter Anstieg der mikrobiellen Besiedlung mit 10^5 CFU im Jejunum, zu 10^8 im distalen Ileum und Coecum, bis hin zu 10^{12} CFU im Colon zu verzeichnen [49]. Bakterien, die sehr leicht translozieren sind fakultativ intrazelluläre Erreger (z.B. Salmonellen oder Listerien), die dem Tod durch Phagozyten bis zu einem gewissen Grad widerstehen. Im Gegensatz dazu werden Bakterien der normalen Darmflora leicht durch Phagozytose getötet und überleben nur, wenn die feindliche Abwehr beeinträchtigt ist. Gramnegative Bakterien (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* und andere *Enterobacteriaceae*), Enterokokken und andere Streptokokken wurden als jene Bakterien identifiziert, die am meisten in die mesenterialen Lymphknoten translozieren [50]. Interessanterweise sind diese Bakterien der häufigste Grund für Infektionen bei einer Leberzirrhose [51]. Spezielle Stämme der *Escherichia coli* translozieren effizienter. Der Grund hierfür könnte eine bessere Haftfähigkeit an der Darmmukosa sein [52]. Unterschiede in Bezug auf die Virulenz verschiedener Stämme können außerdem zu einer größeren Resistenz gegen Abwehrmechanismen des Wirtes führen, was folglich ein effizienteres Überleben und eine effizientere Ausbreitung ermöglicht [53]. Anaerobe Darmbakterien übertreffen aerobe Bakterien in ihrer Anzahl 100-1000-fach, obwohl anaerobe Bakterien selten translozieren [50]. Im Gegensatz dazu translozieren aerobe gramnegative Bakterien leicht und auch dazu durch ein histologisch intaktes intestinales Epithel [50]. Anaerobe Bakterien scheinen hingegen nur zu translozieren, wenn das Epithel vorgeschädigt ist [54]. Sie begrenzen außerdem die Kolonisation und Überwucherung anderer potentiell invasiver Bakterien. Dadurch dämmen sie potentiell pathogene Bakterien ein. Die selektive Entfernung anaerober Bakterien erleichtert die bakterielle Überwucherung und die Translokation fakultativ pathogener Bakterien. Die bakterielle Überwucherung ist einer der Hauptfaktoren, die eine bakterielle Translokation begünstigt. Eine direkte Beziehung zwischen der Bakterienzahl eines spezifischen Stammes, der ein Segment des Darms bevölkert, und der Anzahl überlebensfähiger Bakterien dieses Stammes in den mesenterialen Lymphknoten wurde bei Mäusen gezeigt, insbesondere wenn adhärenente Bakterien involviert waren [55]. Bei der Leberzirrhose findet solch eine bakterielle Überwucherung statt und steht in direktem Zusammenhang mit der bakteriellen Translokation, der spontanen bakteriellen Peritonitis und der Endotoxämie. Die Überwucherung wurde teilweise auf eine Abnahme der Motilität und der intestinalen Transitzeit zurückgeführt [56-59].

2.3.2 Störung der intestinalen Mukosabariere

Die intestinale Mukosabariere setzt sich aus sekretorischen und physikalischen Präventivmaßnahmen gegen die Penetration von Mikroorganismen zusammen. Muzine, die von epithelialen Becherzellen in großen Mengen (3 l/Tag) sezerniert werden, erzeugen eine dicke Schicht (400-500 nm) membran-verankerter, negativ geladener Glykoproteine, die den direkten Kontakt der Bakterien mit der Membran der Mikrovilli verhindern [60]. Das Mukosasekret ist reich an Immunglobulin A (IgA)- Antikörpern, die effektiv an Bakterien binden, aggregieren und somit ein Anheften und die Kolonisation verhindern. IgA macht mehr als 70% der gesamten Antikörperproduktion aus (>5g/Tag). Das mukös sezernierte IgA verhindert nicht nur das Eindringen verschiedener Mikroorganismen, sondern neutralisiert außerdem Toxine und infektiöse Mikroorganismen und kann aktiv IgA-gebundene Antigene von der Lamina propria ins Lumen zurück transportieren [61].

Die Galle wirkt der bakteriellen Überwucherung auch entgegen. Sie hat einen trophischen Effekt auf die Darmwand, reduziert das epitheliale Eindringen von Darmbakterien, hat anti-adhärenz Effekte und bindet und neutralisiert Endotoxine [62]. Bei Fehlen von Galle im Darm zeigte sich folglich eine erleichterte bakterielle Translokation und eine Endotoxin-induzierte bakterielle Translokation wurde gefördert [63]. Bei der Leberzirrhose wurde die Abnahme der intestinalen intraluminalen Gallensäurekonzentration auf die verminderte Sekretion und die erhöhte Dekonjugation der Darmbakterien zurückgeführt.

Die wichtigste Bariere ist das Epithel an sich. Die Wirkung kommt durch die nicht vorhandene Permeabilität und aktive Produktion antimikrobieller Peptide und Proteine zustande. Spezialisierte Zell-Zell-Verbindungen ermöglichen selektiv parazellulär durchlässige Wege (tight junctions), obwohl interzelluläre Kontakte aufrechterhalten werden (intermediate junctions und Desmosomen) und interzelluläre Kommunikation (gap junctions) zugelassen wird. Am apikolateralen Epithel schränken hauptsächlich tight junctions die Permeabilität ein und lassen nur sehr kleine Moleküle (2 kD) passieren. Dadurch verhindern sie nicht nur den transepithelialen Transport von Bakterien, sondern auch den von Makromolekülen sowie von LPS. Bei der Leberzirrhose wurden strukturelle Veränderungen der Darmmukosa, einschließlich Erweiterungen interzellulärer Räume, vaskulärer Blutstrom, Ödeme, fibromuskuläre Proliferation, ein vermindertes Zotten/Krypten – Verhältnis, eine verdickte Muscularis mucosa und Entzündungen beschrieben [64]. Ultrastrukturell wurden erweiterte Extrazellulärräume zwischen benachbarten Enterozyten und eine reduzierte Anzahl Mikrovilli beobachtet, obwohl die tight junctions im distalen Duodenum bei Patienten mit

Zirrhose unverändert waren [65]. Klinische Studien stellten einen Anstieg der Darmpermeabilität bei Patienten mit Leberzirrhose fest, vor allem bei solchen mit zusätzlicher Sepsis [66]. Der oxidative Darmmukosaschaden, der durch eine erhöhte Lipidperoxidation, eine veränderte Mitochondrienfunktion der Enterozyten, einer Endotoxämie sowie den Anstieg proinflammatorischer Zytokine und des Stickstoffmonoxids als bewiesen gilt, dürfte eine Rolle bei diesem Permeabilitätsanstieg spielen [66].

Als Teil des angeborenen Immunsystems wurden verschiedene antimikrobielle Moleküle identifiziert, die wie natürliche Antibiotika wirken. Unter Laborbedingungen hat man ihre Fähigkeiten untersucht, eine Vielzahl Mikroben zu eliminieren [67]. Paneth-Zellen befinden sich am Grund jeder Darmkrypte und kommen vor allem im Jejunum und im Ileum vor. Diese Zellen sezernieren α -Defensine, LPS sowie andere größere Proteine wie zum Beispiel Lysozyme und Phospholipase A2, die wahrscheinlich bei der lokalen Abwehr gegen symbiotische Bakterien beteiligt ist [68]. Zusätzliche antimikrobielle Moleküle wie zum Beispiel das menschliche β -Defensin 1 scheinen von den meisten Epithelzellen des Dün- und Dickdarms exprimiert zu sein [69]. Bisher gibt es keine klinischen Studien, die die Sekretion der antimikrobiellen Moleküle bei der Leberzirrhose, insbesondere bei der bakteriellen Translokation untersucht haben. Es wurden jedoch in der experimentellen Leberzirrhose und der nachfolgenden bakteriellen Translokation histologische Veränderungen am deutlichsten im Coecum beobachtet, wo Bakterien wie zum Beispiel *Escherichia coli* oder *Enterococcus*, die in großer Anzahl vorhanden sind, bekanntermaßen translozieren [70]. Obwohl dies suggeriert, dass die bakterielle Translokation bevorzugt im Coecum oder Colon auftritt, wurde auch angedeutet, dass das Colon, wegen seiner immerwährend hohen Exposition mit Bakterien, translozierte Bakterien effizienter eliminieren kann. Eine experimentelle Studie beimpfte gleiche Konzentrationen von *Escherichia coli* sowohl in den Dün-, als auch in den Dickdarm. Es zeigte sich, dass vorzugsweise Bakterien aus dem Dünndarm translozieren [71]. Dies wird von Studien unterstützt, die zeigten, dass die Kolonisation des proximalen Dünndarms mit einer erhöhten Rate bakterieller Translokation und Sepsis bei chirurgischen Intensivpatienten assoziiert ist [72].

2.4 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Dynamik der bakteriellen Translokation und die Veränderungen der Darmflora zu untersuchen. Zudem stellten wir uns die Frage, ob die mukosale angeborene Darmimmunität nach Alkoholgabe Veränderungen aufweist. Hierzu wurde das Fütterungsmodell einer kontinuierlichen intragastralen Alkoholgabe bei Mäusen benutzt.

Als Maß der bakteriellen Translokation wurden Bakterien quantitativ aus den mesenterialen Lymphknoten kultiviert. Auch das Blut der Mäuse wurde entnommen und kultiviert.

Der Effekt des Alkohols auf den Darm wurde ebenfalls mit konventionellen Nährmedien untersucht. Hierzu wurde der gesamte Darm entnommen, in verschiedene Abschnitte geteilt und auf Agarplatten kultiviert.

Der nächste Schritt war die Untersuchung der Expression verschiedener antimikrobieller Peptide und Proteine des Darmes - vor allem des regenerating islet derived (Reg)-3b und Reg3g - mittels Real-Time-quantitative-PCR (RTq-PCR). Die Proteinexpression des Reg3b und Reg3g wurde mittels Western Blot und Immunohistochemie gemessen.

3 Material und Methoden

3.1 Material und Geräte

3.1.1 Material

Conical Tube, 50 ml	Becton Dickinson, USA
Formalinbox	Moldex, USA
Gas Pack Anaerober Container System mit Indikator	Becton Dickinson, USA
Glasperlen Durchmesser 3mm	Fisher, USA
Kassette für Gewebestücke	Fisher, USA
Microcentrifuge Tubes, 1,5 ml	Fisher, USA
Pellet Pestle, 1,5 ml	Becton Dickinson, USA
Pipettenspitzen 100 µl	Neptune, Schweden
Pipettenspitzen 1000 µl	Neptune, Schweden
Pipettenspitzen 20 µl	Neptune, Schweden
Pipettenspitzen 200 µl	Neptune, Schweden
Repeater Plus	Eppendorf, USA
Rundbodenröhrchen, 14 ml	Becton Dickinson, USA
Syringe Slip Tip, 10 ml	Becton Dickinson, USA
Tubes, 1,5 ml	Eppendorf, USA
Wischtücher	Kimberly-Clark Professional, USA
Zellkulturschale 60 x 15 mm	Becton Dickinson, USA
Zellkulturschale mit 20mm-Raster	Becton Dickinson, USA

3.1.2 Geräte

Autoklavikulator	Steris, USA
OP-Besteck	Henry Shine, USA
Pipetten	Gilson, USA
Pipetten, 50 ml	Becton Dickinson, USA

Pipettenboy Easyjet	Eppendorf, USA
Power Gen 125	Fisher, USA
Precision Glide Needle 2161	Becton Dickinson, USA
Serielle Pipette	Fisher, USA
Serielle Pipette, 10 ml	Becton Dickinson, USA
Serielle Pipette, 50 ml	Becton Dickinson, USA
Spritze, 1 ml 27 G1/2	Becton Dickinson, USA
Steel Black Single Edge Industrial Blades	U.S. Blade, USA
Sterile Thumb Forceps, Posi-Grip	Busse, USA
Vortex	Scientific Industries, USA

3.1.3 Lösungen und Reagenzien

Bacto TM Agar	Becton Dickinson, USA
Bacto TM Tryptic Soy Broth 500g	Becton Dickinson, USA
Blutagar	Becton Dickinson, USA
Brucella Agar mit 5 % Schafsblut, Hemin und Vitamin K1	Becton Dickinson, USA
DEPC	Sigma, USA
DEPC-H ₂ O	Becton Dickinson, USA
Difco TM Fluid Thioglycollate Medium:	Becton Dickinson, USA
EDTA	Sigma, USA
Ethanol 70%	Becton Dickinson, USA
Formalinlösung, 10% Formaldehyd	Sigma, USA
Ketaset 600 µl	Fort Dodge Animal Health, USA
PBS	Fisher, USA
Xylazine 100 mg	Lloyd Inc., USA

3.1.4 Platten

Stapelbare, leere Platten	Fisher, USA
---------------------------	-------------

3.1.5 Antikörper

3.2.5.1 Polyklonale Antikörper

Hase-anti-Maus-Reg3g

Lora Hooper, Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, USA

3.2.5.1 Monoklonale Antikörper

Ratte-anti-Maus-Reg3b

R&D, Minneapolis, MN USA

3.2.5.3 Sekundärantikörper

Anti-Hase IgG-HRP

Cell Signaling Technology, USA

3.1.6 Primersequenzen

Oligonukleotide wurden von den Firmen IDT (San Diego) synthetisiert.

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
Angiogenin-1	GAAGATCAAGAACAACGGGC	ACGCAGCTAGACACATTCCC
Angiogenin-4	ACAACAAAGGACATGGGCTC	TCTCCAGGAGCACACAGCTA
Defensin beta 1	GAGCGGAGACAGAATCCTCC	TCTTTTCTCCAGATGGAGC
Defensin beta 2	GGCAGTGGTCAAGTTCTGCT	CTCTCTGCTCTCTGCTGCTG
Defensin beta 3	CATCTGCCTCCTTTCCTCAA	CTTTGCATTTCTCCTGGTGC
Defensin beta 6	GTCGAAAACCTCCATTGCAT	TGGTGATGCTGTCTCCACTT
Defensin alpha 3	AGAGCCTTCTGGGTCTCCA	GTCCAGGCTGATCCTATCCA
Defensin alpha 5	TGGCCTCCAAAGGAGATAGA	TCCAGGCTGATCCTATCCAC
Bactericidal permeability increasing protein	AGTAGCGGATCTGGGACTCA	ACAAGCTGTGCTTGCATGTC
Cathelicidin antimicrobial peptide	AATCTTCTCCCCACCTTTGC	GCCGCTGATTCTTTTGACAT

C-Type lectin domain family 7, member a	GTGCAGTAAGCTTTCCTGGG	TCCCGCAATCAGAGTGAAG
Resistin-like molecule beta	TGCAGGAGATCGTCTTAGGC	TTCCCACTGATAGTCCCAGG
Ribonuclease gamma	CAGCAGGACAAACAATGGAA	CCAATTCGTCTTGGAGTTCA
Regenerating islet-derived beta 3	TACTGCCTTAGACCGTGCTTTC TG	GACATAGGGCAACTTCACCT CACA
Regenerating islet-derived gamma 3	TCCACCTCTGTTGGGTTTCAT	AAGCTTCCTTCCTGTCCTCC

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung der verschiedenen Agar-Platten

Als erster Schritt wird der Agar für die verschiedenen Platten fertig gestellt. Dazu gibt man das Agar-Pulver in einen Erlenmeyer-Kolben. Daraufhin wird zweifach destilliertes Wasser dazugeben und verrührt. Anschließend werden die Erlenmeyer-Kolben mit Alufolie abgedeckt und für 15 Minuten bei 121 Grad Celsius in einen Autoklav gegeben. Nach einer Stunde werden die Erlenmeyer-Kolben herausgenommen und für eine weitere Stunde in einem Kühlraum bei vier Grad belassen. Jede 15 Minuten werden die Kolben geschüttelt, damit sich die Kälte, beziehungsweise Wärme verteilt und die Masse gleichmäßig fest wird. Mit einem Pipettenboy/50 Milliliter-Pipetten werden jeweils 15 Milliliter der Flüssigkeit auf leere Platten gegossen. Anschließend werden die Platten bei vier Grad Celsius in einem Kühlraum gelagert, um fest zu werden.

3.2.2 Tsukamoto French-Maus-Modell

Tiere

Männliche Wildtyp-Mäuse (C57/B6; 8 Wochen alt) werden von dem Jackson-Labor gekauft. Alle Tiere werden unter Befolgung der institutionellen Richtlinien nach Genehmigung eines Tierprotokolles gehalten. Die Mäuse haben ad libitum Zugang zu Wasser.

Operation

24 Stunden vor der Operation bekommen die Mäuse nichts zu essen. Prinzipiell sind die chirurgischen Methoden identisch mit denen, die Tsukamoto et al. [73] bei Ratten ausführlich beschrieben. Aufgrund der Größe der Mäuse werden jedoch einige Modifikationen vorgenommen.

Die Mäuse werden zunächst durch eine Injektion (0,3 ml) mit Ketamin und Xylazin betäubt und einer Laparotomie unter sterilen Bedingungen mit Implantation eines Langzeit-Magensonde unterzogen. Ein 40 cm langes PE-90 Röhrchen aus Polyethylen mit einem inneren Durchmesser von 0,86 mm wird in den Magen gelegt. Das Röhrchen wird anschließend in der Magenwand mit einem Faden verankert und an der Bauchwand fixiert.

Daraufhin wird es unter der Haut zur dorsalen Seite des Halses verlegt und die Bauchwand mit einer Prolene-Naht verschlossen.

Danach wird das Röhrchen durch einen 250P Mausknopf aus Polysulfon (Instech Laboratories, Plymouth Meeting, PA) und einer Springfeder durchgezogen. Der Knopf wird unter dem Fell mit dieser Springfeder außerhalb des Körpers befestigt, um das Röhrchen zu schützen. Anschließend wird das Fütterungsröhrchen an eine Infusionspumpe angeschlossen, die eine komplette Mobilität in dem Käfig erlaubt.

Diese Operation und die nachfolgende Ernährung wird freundlicherweise von dem Department of Pathology, Southern California Research Center for Alcoholic Liver and Pancreatic Diseases and Cirrhosis, Keck School of Medicine of the University of Southern California, Los Angeles, California, durchgeführt.

3.2.2 Ernährung

Nach einer Akklimatisierungswoche mit einer kontrollierten „high fat diet“ wird mit einer Alkoholinfusion von 18 g/kg/Tag begonnen, die kontinuierlich alle zwei Tage um 1,5 g erhöht, bis am 13. und 14. Tag eine Dosis von 27 g/kg/Tag erreicht wird.

Zwischen dem 15. und 18. Tag bekommen die Mäuse 27,8 g, zwischen dem 19. und 22. Tag 28,6 g und zwischen dem 23. und 28. Tag 29,4 g eingeflößt. Ab der initialen Alkoholdosis leitet sich die gesamte Kalorienzufuhr von einer Diät ab, die auf 533 Cal/kg festgelegt ist. Die kalorischen Prozente des Alkohols, der diätetische Kohlenhydrate (Dextrose), der Proteine (Lactalbuminhydrolysat) und des Fetts (Maiskeimöl) entsprechen 24,3 %, 15,7 %, 25 % und 35 %. Die höchste Alkoholdosis am Ende der vier Wochen beträgt 34,4 % der Gesamtkalorien. Vitamine und Mineralstoffe sind gemäß der empfohlenen Dosis des „Committee on Animal Nutrition of the National Research Council“ (AIN-76A, 4,42 g/l und 15,4 g/l, bzw. Dyets Inc, PA) ebenfalls enthalten.

Anschließend werden die Mäuse nach eintägiger, einwöchiger und dreiwöchiger Alkoholzufuhr für die Analyse verwendet.

3.2.3 Organentnahme

Anästhesie

Zuerst wird der Maus die Sonde abgeschnitten und das Gewicht der Maus festgestellt. Anschließend bekommt die Maus eine intraperitoneale Anästhesie mit 400 Mikroliter eines Gemischs aus zehn Milliliter sterilem Natriumchlorid, 600 Mikroliter Ketamin und 100 Mikroliter Xylazin. Sobald die Maus keine Eigenreflexe mehr hat, wird sie auf dem Rücken gelagert.

Präparation

Das Bauchfell wird mit Alkohol desinfiziert, mit einer Pinzette angehoben und schließlich mit einer sterilen chirurgischen Schere breitflächig von der muskulären Abdominalwand abgetrennt. Danach wird noch einmal das eröffnete Bauchfell mit Alkohol desinfiziert und mit einem zweiten sterilen chirurgischen Besteck die Peritonealhöhle eröffnet.

Entnahme des Serums

Mit einer sterilen Einwegpinzette wird das Coecum und der Dünndarm nach links verlagert und die Vena cava inferior mit einer sterilen Ein-Milliliter-Spritze mit 27er-Nadel punktiert und daraus das gesamte Blut abgenommen (ca. 500-700 Mikroliter). Davon werden jeweils 100 Mikroliter auf aerobe und anaerobe Platten gegeben und mit sterilen Glasperlen durch horizontales Schütteln gleichmäßig auf den Platten verteilt. Die Kügelchen werden daraufhin verworfen und die Platten unter anaeroben und aeroben Bedingungen (siehe unten) inkubiert. Der verbleibende Rest des Blutes wird in sterile Eppendorf-Röhrchen gegeben, die fünf Mikroliter EDTA (0,5 Molar) enthalten. Bei vier Grad Celsius wird dieses für fünf Minuten bei 10000 G zentrifugiert. Anschließend wird das Plasma abgenommen und in Aliquots in flüssigem Stickstoff gefroren und bei minus 80 Grad gelagert.

Entnahme der mesenterialen Lymphknoten

Sodann werden die mesenterialen Lymphknoten entnommen. Hierzu wird sorgfältig mit zwei sterilen Plastikpinzetten das Areal zwischen Coecum, Colon und Ileum präpariert, so dass die mesenterialen Lymphknoten deutlich sichtbar werden. Daraufhin werden die mesenterialen Lymphknoten mit zwei Pinzetten entnommen und in ein steriles Eppendorf-Röhrchen, das 50 Mikroliter sterile phosphatgepufferte Kochsalzlösung enthält, transferiert. Diese werden dann mit einem sterilen Einmal-Mörser aus Plastik, der die gleiche Form wie ein Eppendorf-Röhrchen besitzt, durch Hoch- und Niederbewegung so lange homogenisiert, bis keine

Gewebestücke mehr sichtbar sind. Es werden weiterhin 50 Mikroliter sterile phosphatgepufferte Kochsalzlösung hinzugefügt und das gesamte Homogenat unter sterilen Bedingungen mit sterilen 200 Mikroliter-Handpipetten (nur Filterpipetten werden verwendet) auf eine aerobe Blutagar-Platte transferiert. Darauf folgend werden sterile Glasperlen (ca. 20 Stück je Platte) hinzugegeben und durch horizontales Schütteln gleichmäßig auf der Platte verteilt. Die Kügelchen werden daraufhin verworfen und die Platten unter aeroben Bedingungen inkubiert.

Entnahme der Leber

Als nächster Schritt wird die Leber entnommen. Dazu wird mit einer Pinzette der Hilus der Leber gegriffen und diese sorgfältig mit einer Schere von den umliegenden Organen herausgetrennt. Auf einer mit Eis unterlegten Glasplatte wird die Leber ausgebreitet und in einzelne Lappen unterteilt. Der linke Leberlappen wird in eine histologische Kassette gegeben und anschließend in ein Behältnis gelegt, das zehnprozentiges Formalin enthält. Die Gallenblase wird entfernt. Der mediane Leberlappen wird in sechs kleinere Stücke zerteilt, welche einzeln in Eppendorf-Röhrchen in flüssigem Stickstoff zunächst schockgefroren und dann bei minus 80 Grad eingefroren werden. Das verbleibende Gewebe wird ebenfalls in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei minus 80 Grad eingefroren.

Entnahme des Darms

Als nächstes wird der gesamte Dün- und Dickdarm entnommen. Hierzu wird mit einer Pinzette das Duodenum ergriffen und das bulbäre Duodenum mit einer Schere vom verbleibenden Dünndarm abgetrennt. Ebenso wird das Rektum mit einer Pinzette ergriffen und mit einer Schere durchtrennt. Anschließend wird der gesamte Gastrointestinaltrakt mit zwei Pinzetten an einem Stück von den mesenterialen Strukturen herausgetrennt und auf eine Glasplatte (eisgekühlte Kulturschale) gegeben.

Um später RNA und Proteine zu isolieren, werden von dem Duodenum, von der ileojejunalen Grenze, von dem distalen Ileum und von dem proximalen Colon Gewebestücke mit einer Rasierklinge entnommen, kurz in kalter steriler phosphatgepufferter Kochsalzlösung gewaschen, in Eppendorf-Röhrchen einzeln in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei minus 80 Grad eingelagert.

Bei anderen Tieren wird der Dünndarm in drei gleich lange Stücke geteilt und das Coecum von dem Colon abgetrennt. Das proximale, mittlere und distale Stück des Dünndarms, das Coecum und das Colon werden jeweils einzeln in 15 Milliliter Kulturröhrchen, welche zehn

Milliliter steriles und gekühltes Thioglykolat enthalten und außerdem gekühlt in Eis stecken, transferiert. Im nächsten Schritt wird jedes Kulturröhrchen, das ein Stück des Gastrointestinaltraktes enthält, mit einem elektrischen Homogenisator zehn Sekunden lang homogenisiert. Zwischen den Homogenisierungsschritten wird der Homogenisator mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung und Alkohol säuberlichst gereinigt. Es werden sodann verschiedene Verdünnungen von den Homogenisaten vorbereitet. Für anaerobe Kulturen werden 10^7 -, 10^9 - und 10^{11} -Verdünnungen angefertigt und für die aeroben 10^5 -, 10^7 - und 10^9 beziehungsweise 10^7 -, 10^9 - und 10^{11} -Verdünnungen für das dritte Drittel des Dünndarms, für das Coecum und für das Colon mit Alkohol gefütterten Tieren.

Für die 10^5 -Verdünnungen werden 100 Mikroliter des jeweiligen Homogenisats zusammen mit 900 Mikroliter Thioglykolat zusammengegeben und anschließend fünf Sekunden lang mit einem Vortex geschüttelt. Infolge dessen werden zehn Mikroliter von der 10^5 -Verdünnung mit 990 Mikroliter Thioglykolat in ein neues Eppendorf-Röhrchen gegeben, gemischt und fünf Sekunden lang mit einem Vortex geschüttelt. Analog werden für die 10^9 -Verdünnungen zehn Mikroliter von der 10^7 -Verdünnung zusammen mit 990 Mikroliter von dem Thioglykolat gemixt und fünf Sekunden mit einem Vortex geschüttelt. Schließlich ergibt sich die 10^{11} -Verdünnung aus einer Mischung von zehn Mikrolitern von der 10^9 -Verdünnung zusammen mit 990 Mikroliter Thioglykolat. Jeweils 100 Mikroliter von den Verdünnungen werden dann auf die drei verschiedene Platten pipettiert, ca. 20 sterile Glasperlen hinzugefügt und horizontal geschüttelt um eine gleichmäßige Verteilung des Homogenisats zu erreichen. Dann werden die Glasperlen verworfen und die gramnegativen und aeroben Platten bei 37 Grad Celsius inkubiert.

Die anaeroben Platten werden in speziell luftdicht abgeschlossene Behältnisse mit jeweils drei Pads gegeben um den vorhandenen Sauerstoff zu absorbieren. Diese Pads enthalten Indikatoren, die bei aeroben Bedingungen blau sind und sich bei anaeroben Bedingungen weiß verfärben. Durch diese Indikatoren lässt sich eine stetige Kontrolle der anaeroben Kulturbedingungen gewährleisten. Diese Behältnisse werden luftdicht verschlossen und ebenfalls bei 37 Grad Celsius inkubiert.

Zählung der Kolonien

Nach 72 Stunden werden die vorhandenen Kolonien auf allen Platten einzeln ausgezählt. Unter Einkalkulierung der Verdünnungen wird der Mittelwert aus jeweils zwei Verdünnungen ermittelt und als CFU (Colony Forming Unit = Koloniebildende Einheit) angegeben. Pro gastrointestinales Segment werden die CFUs ermittelt.

3.2.4 Isolation der RNA

Für die RNA-Gewinnung wird zu den bei minus 80 Grad Celsius tiefgefrorenen gastrointestinalen Gewebestücken ein Milliliter Trizol bei Raumtemperatur hinzugefügt. Das Gewebestückchen wird mit einem elektrischen Homogenisator zehn Sekunden lang homogenisiert, so dass keine größeren Gewebestückchen mehr sichtbar sind. Analog wird jedes gastrointestinale Segment so behandelt. Zwischen den Homogenisierungsschritten wird der Homogenisator zweimal mit DEPC-H₂O und einmal mit Trizol gereinigt. Anschließend wird das in Trizol aufgenommene Gewebe homogenisiert in sterile RNase-freie Eppendorf-Röhrchen transferiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Folgenden wird 200 Mikroliter Chloroform mit einer 200 Mikroliter-Pipette hinzugefügt, das Eppendorf-Röhrchen verschlossen und 15 Sekunden lang mit der Hand geschüttelt. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wird das Eppendorf-Röhrchen in einer vier Grad Celsius gekühlten Tischzentrifuge zehn Minuten lang bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die klare obere organische Phase wird sorgfältig mit einer 200 Mikroliter Pipette in ein neues steriles Eppendorf-Röhrchen transferiert. Anschließend werden 500 Milliliter Isopropanol zu der organischen Phase gegeben, das Eppendorf-Röhrchen verschlossen und fünfmal hin- und hergeschwenkt. Es folgt eine 15-minütige Zentrifugation mit einer vier Grad Celsius kalten Tischzentrifuge bei maximaler Umdrehungsgeschwindigkeit. Nach diesem RNA-Präzipitationsschritt wird die RNA als kleines Pellet am Boden des Eppendorf-Röhrchens sichtbar. Anschließend wird das Isopropanol unter großer Sorgfalt abgenommen und verworfen. Die RNA wird schließlich mit einem Milliliter 70-prozentigem Ethanol gewaschen und hierfür fünf Minuten lang bei maximaler Umdrehungsgeschwindigkeit in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Alkohol wird sorgfältig von dem RNA-Pellet abgenommen und verworfen. Die RNA wird daraufhin zehn Minuten lang im verschlossenen Eppendorf-Röhrchen bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wird die RNA in 100 Mikroliter Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser resuspendiert und auf Eis transferiert. Die RNA-Konzentration wird mit einem Nanodrop-Gerät im Duplikat bestimmt.

3.2.5 DNase-Verdau der RNA

Eventuell vorhandene genomische DNA wird mit DNase verdaut. Hierfür wird das „DNase-Kit“ von Ambion verwendet. Es werden in einem sterilen RNase-freien

Eppendorf-Röhrchen folgende Chemikalien zusammenpipettiert: 44 Mikroliter RNA, fünf Mikroliter DNase-Puffer (zehnfach konzentriert) und ein Mikroliter der DNase (x unit pro Mikroliter). Dieses Gemisch wird bei 37 Grad Celsius für 20 Minuten inkubiert. Sodann werden fünf Mikroliter DNase-inaktivierendes Gemisch hinzugefügt und unter stetigem Schütteln zwei Minuten lang inkubiert. Das Eppendorf-Röhrchen wird daraufhin zwei Minuten lang bei vier Grad Celsius in einer Tischzentrifuge bei 300 G zentrifugiert. 45 Mikroliter des Überstandes werden anschließend in ein steriles RNase-freies Eppendorf-Röhrchen transferiert. Als nächstes wird die RNA-Konzentration wiederum mit dem Nanodrop bestimmt.

3.2.6 Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription wird das „high capacity reverse transkriptase kit“ von Invitrogen verwendet.

Fünf Mikroliter RNA werden in einem Gesamtvolumen von 20 µl zusammen mit 10 µl „mastermix“ in ein PCR-Röhrchen pipettiert. Zunächst erfolgt das Umschreiben von RNA in cDNA. Dazu werden die Proben bei 37 Grad Celsius für 120 Minuten inkubiert. Zur Denaturierung der Reversen Transkriptase erfolgt eine 10-minütige Inkubation bei 72 Grad. Nach dem Abkühlen auf 4°C wird die cDNA direkt für die quantitative Real-Time-PCR eingesetzt.

3.2.7 Quantitative Real-Time -PCR

Zur Quantifizierung der cDNA wurde eine Real-time-PCR verwendet. Die Reaktionen wurden mit dem SYBR Green Kit von Bio-Rad angesetzt und auf dem 7300 ABI System durchgeführt. Als Standard Real-time-Programm wurden folgende Schritte gewählt:

Schritte	Temperatur, Zeit
Aufschmelzen	95°C, 15 min.
Aufschmelzen	94°C, 15 sec
Hybridisierung und Elongation	60°C, 60 sec

Schmelzkurve	95°C, 15 sec 65°C, 15 sec 65-95°C, 20 min
Abkühlen	30°C, 10 min

Die Reaktion wurde in einem Volumen von 25 µl ausgeführt:

12,5 µl SYBR Green Mix (2X)
0,25 µl Forward Primer (100µM)
0,25 µl Reverse Primer (100µM)
2 µl H₂O
10 µl cDNA (50 ng pro Reaktion)

Für das jeweilige Primerpaar wurden zunächst eine Standardkurve aus einer Verdünnungsreihe einer Probe (1, 1:3, 1:9, 1:27, 1:81, 1:243, 1:729, 1:2187) generiert, um die Effizienz der Amplifikation zu erhalten. Die cDNA-Menge wurde dann aus dem erhaltenen *slope*- und *intercept*- Wert errechnet. Zur Normalisierung der einzelnen Proben wurde das Haushaltsgen 18s verwendet.

3.2.8 Western Blot

Der zuvor entnommene Darm wird in seine Teilabschnitte (proximaler, mittlerer und distaler Dünndarm, Coecum, Colon) unterteilt und jeweils eine Gewebeprobe entnommen. Anschließend werden die einzelnen Abschnitte schockgefroren und in RIPA Puffer homogenisiert. Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine werden 4-12% SDS-PAGE (Nupage Bis-Tris-Gel) der Firma Invitrogen verwendet. Hierfür werden die Proben mit 2X Lämmli Puffer gemischt und zehn Minuten bei 80 Grad aufgekocht. Nach Abkühlung werden die Proben auf das Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgt bei 100V für 1-2 Stunden. Zur Immobilisierung der Proteine wird die so genannte „Tank-Blot“ Technik bei konstanter Stromstärke (200 mA) verwendet. Dies wird nach Anleitung des Herstellers in einer „Novex“-Kammer durchgeführt. Zum Nachweis von Proteinen wird die Nitrocellulose Membran zunächst mit einer Blockierlösung eine Stunde inkubiert, um unspezifische Proteinbindungen

zu blockieren. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem verdünnten Primärantikörper (polyklonales Reg3g Antiserum, ein Geschenk von Lora Hoope, UT Southwestern Dallas, Texas, USA bzw. Anti-Reg3b-Antikörper wurden von R&D Systems gekauft) in einer Verdünnung von 1:1000 in der Blockierlösung. Hierauf wird die Membran mit dem Primärantikörper für 1,5 Stunden inkubiert. Danach wird die Membran dreimal für zehn Minuten mit Waschlösung gewaschen und eine weitere Stunde mit Enzym-gekoppelten, sekundären Antikörper (Verdünnung 1:1000), der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, inkubiert. Nach fünf weiteren Waschschritten wird das ECL-Färbeprotokoll nach Anleitung des Herstellers (Amersham ECL detection) durchgeführt. Dabei katalysiert die am Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase die Oxidation von Luminol. Die entstehende Chemolumineszenz wird von einem sensitiven Hyperfilm detektiert.

3.2.9 Immunhistologie und HE-Färbung

Frisch isolierter Dünndarm wird in vier Stücke zerteilt. Der vierte distale Part wird in Formalin fixiert und in Paraffin eingelagert. Für die immunhistologische Färbung des Reg3g und Reg3b wird das Envision System (DakoCytomation) mit Hasen-Antikörpern gemäß dem Protokoll des Herstellers verwendet. Das polyklonale Antiserum des Reg3b und Reg3g wird 1:1000 mit 1 % BSA-haltigem PBS verdünnt. Kontrollschnitte sind mit Präimmunserum oder Hasen-IgG eingefärbt, die im Gegensatz zu den Primärantikörpern keinerlei positive Färbung zeigen. Für die Hämatoxylin- und Eosin-Färbung wird ein Standardprotokoll verwendet. Hämatoxylin färbt Zellkerne und Zytoplasmaanteile blau-violett. Eosin hingegen färbt andere Zytoplasmaanteile sowie viele faserige extrazelluläre Komponenten rot. Nach Rehydrierung wurden die Schnitte fünf Minuten in Mayer's Hämatoxylin-Lösung gefärbt und dann für zwei Minuten in fließendem, warmem Wasser gewaschen. Anschließend erfolgt eine 25 Sekunden lang dauernde Färbung in einprozentigem Eosin.

3.2.10 ALT-Messung

Die Messung der Alanin Aminotransferase (ALT) erfolgt gemäß Standardprotokollen.

3.2.11 Statistische Analyse

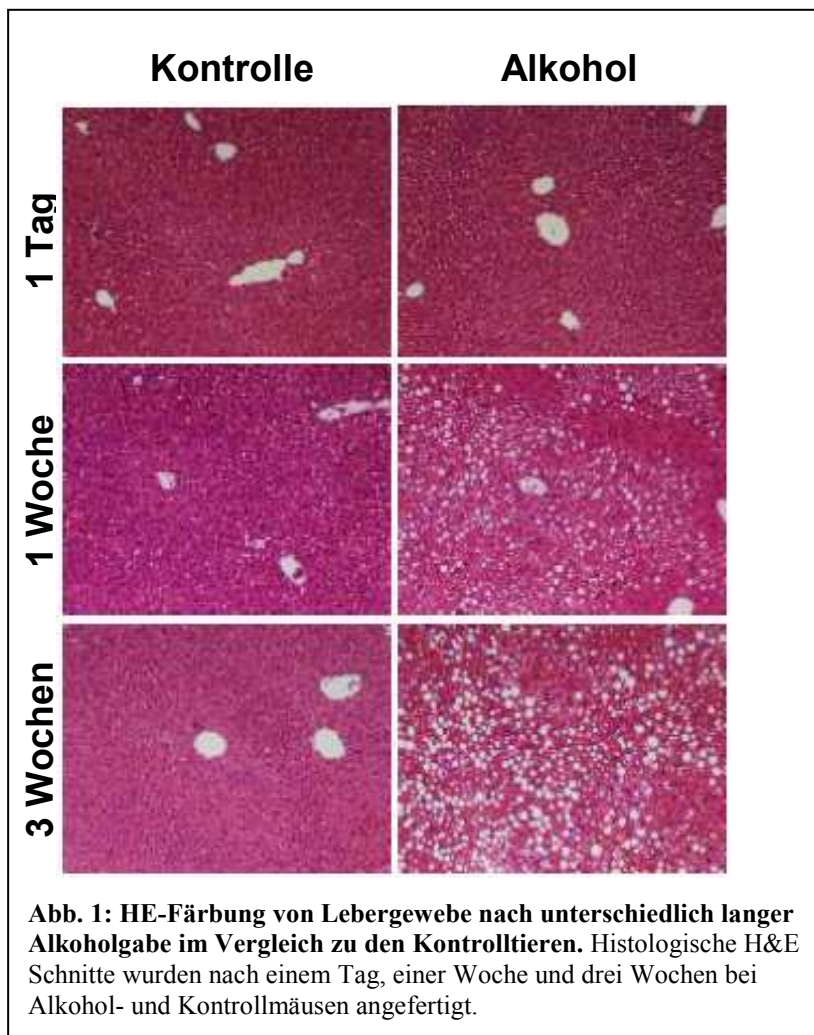
Der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test wird für die statistische Analyse benutzt. Die Daten sind präsentiert als Mittelwert +/- Standardabweichung vom Mittelwert. Als Signifikanzlevel wurde $p < 0.05$ gewählt.

4 Ergebnisse

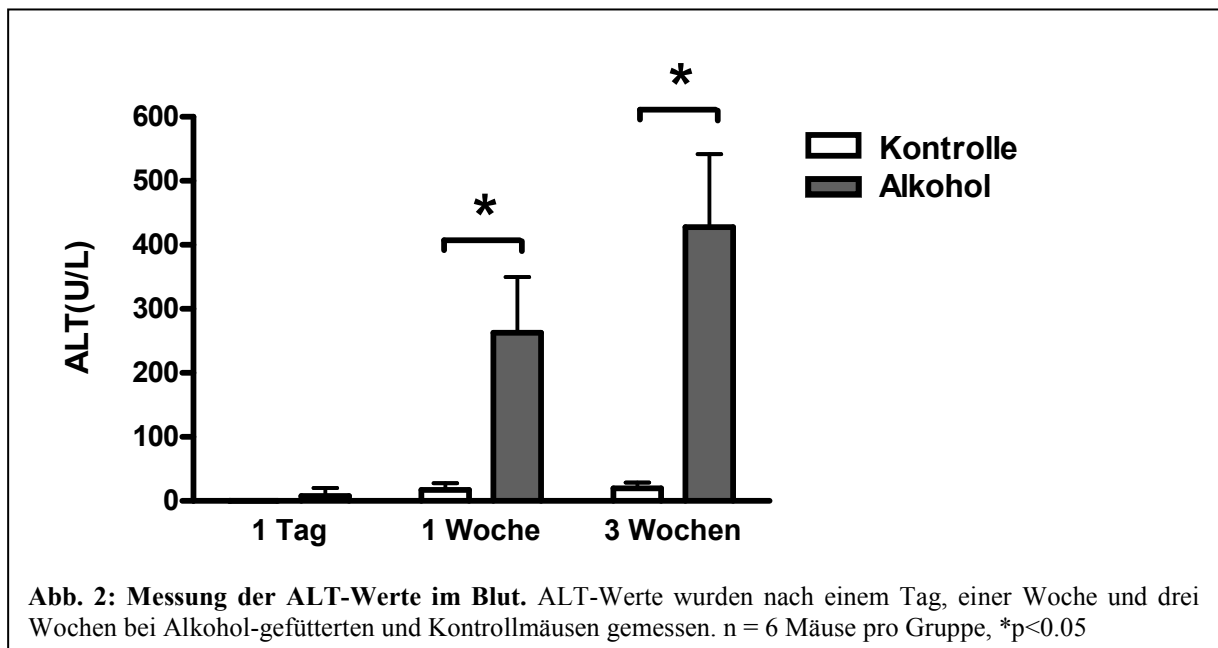
Kontinuierliche Alkoholgabe führt zur Steatohepatitis

Um die Dynamik der bakteriellen Translokation und die Veränderungen der Darmflora zu charakterisieren, wurde das Fütterungsmodell einer kontinuierlichen intragastralen Alkoholgabe bei C57BL/6J Mäusen für einen Tag, eine Woche und drei Wochen verwendet. Als Kontrolle wurden Mäuse mit einer isokalorischen Diät gefüttert.

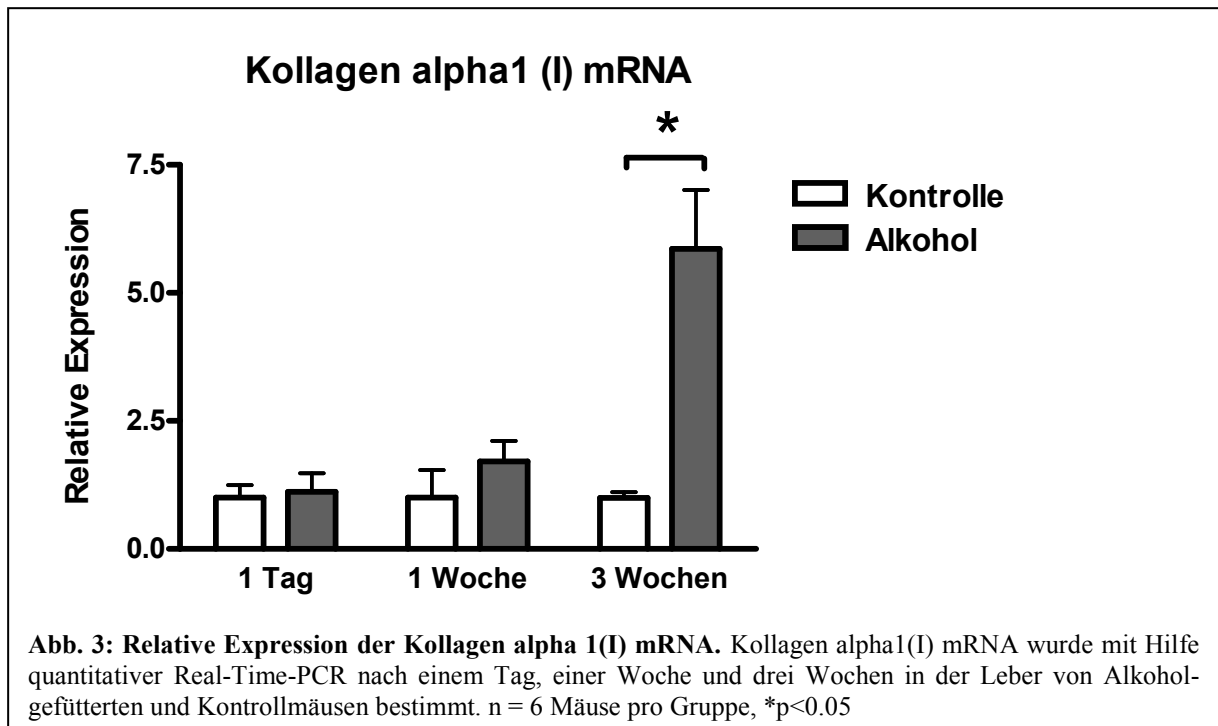
Nach einwöchiger, kontinuierlicher Alkoholgabe wurde man im Vergleich zu den Kontrollen eine mikro- und makrovesikuläre Steatose festgestellt. Eine Akkumulation von Fett in der Leber war nach dreiwöchiger Alkoholgabe deutlich sichtbar (Abb. 1).



Als weiterer Marker einer Leberschädigung wurde die Alanin-Aminotransferase (ALT) im Plasma bestimmt. Obwohl sich nach einem Tag noch kein Unterschied zwischen alkohol- und kontrollgefütterten Mäusen ergab, stiegen die ALT-Werte nach ein bzw. drei Wochen intragastraler Alkoholgabe signifikant an (Abb. 2). Dieser Anstieg der ALT-Werte ist als Zeichen eines akuten Leberschadens zu werten.



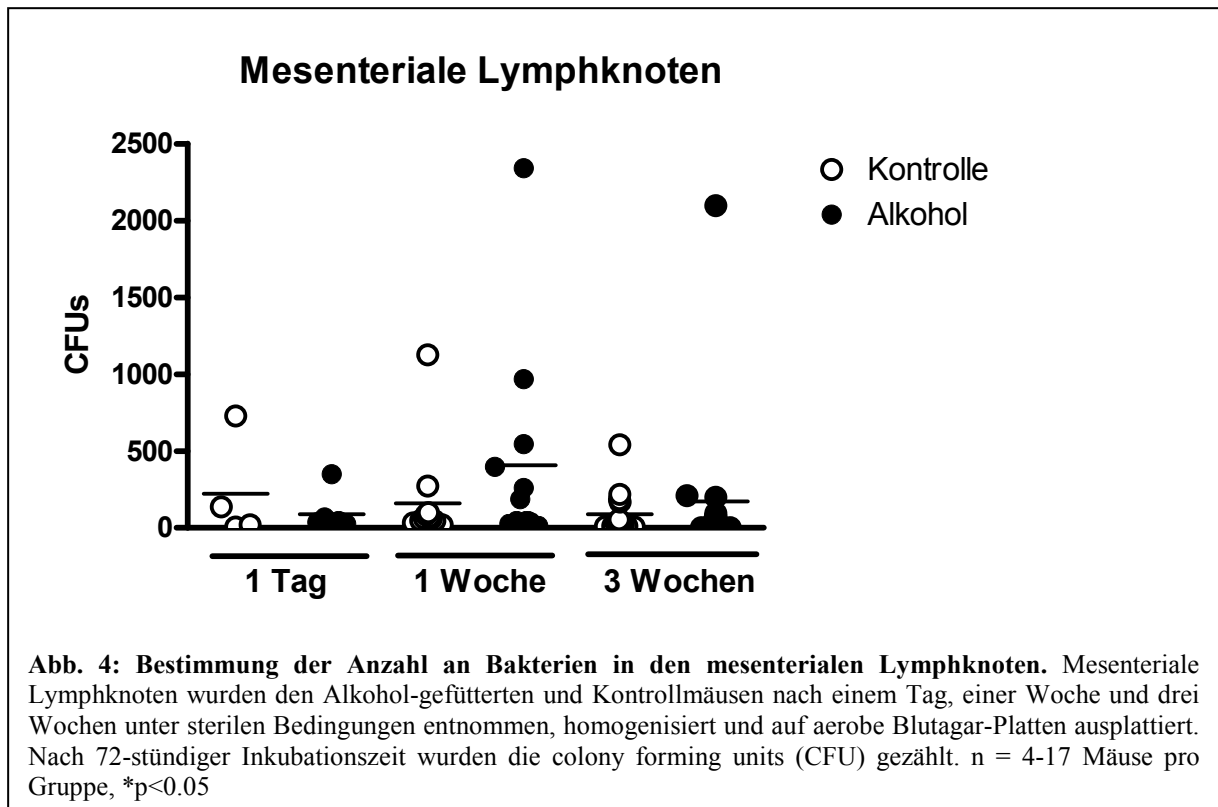
Um zu eruieren, ob eine chronische Alkoholgabe eine Fibrogenese zur Folge hat, wurde als Marker die hepatische Kollagen $\alpha 1(I)$ mRNA gemessen. Die Kollagen $\alpha 1(I)$ mRNA war nach drei Wochen im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht (Abb. 3). Bei chronischer Lebererkrankung wird extrazelluläre Matrix von aktivierten Sternzellen produziert.



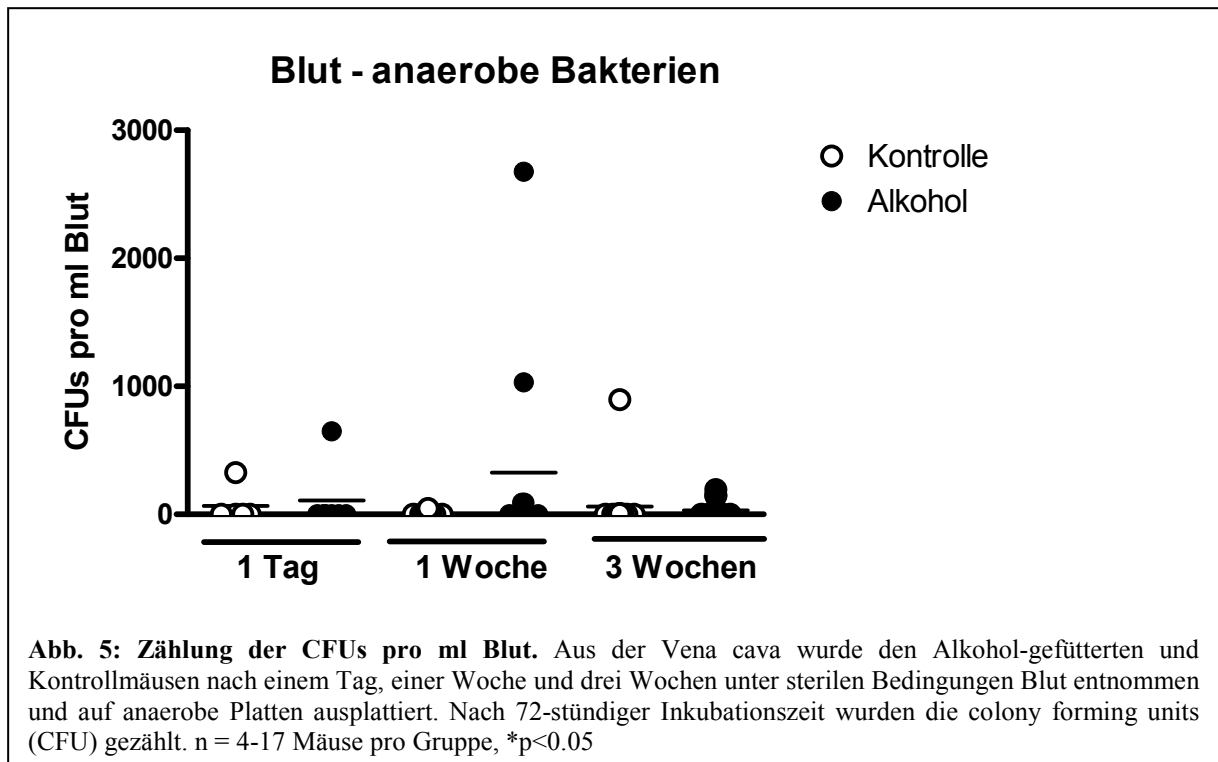
Bakterielle Translokation nach chronischer Alkoholgabe

Als Maß der bakteriellen Translokation wurden Bakterien quantitativ aus den mesenterialen Lymphknoten kultiviert, die als erstes Organ der „Translokations-Route“ vom Gastrointestinaltrakt in die Blutzirkulation gelten. Hierzu wurden die mesenterialen Lymphknoten unter sterilen Bedingungen entnommen, homogenisiert und daraufhin mit verschiedenen Verdünnungen auf aerobe Blutagar-Platten transferiert.

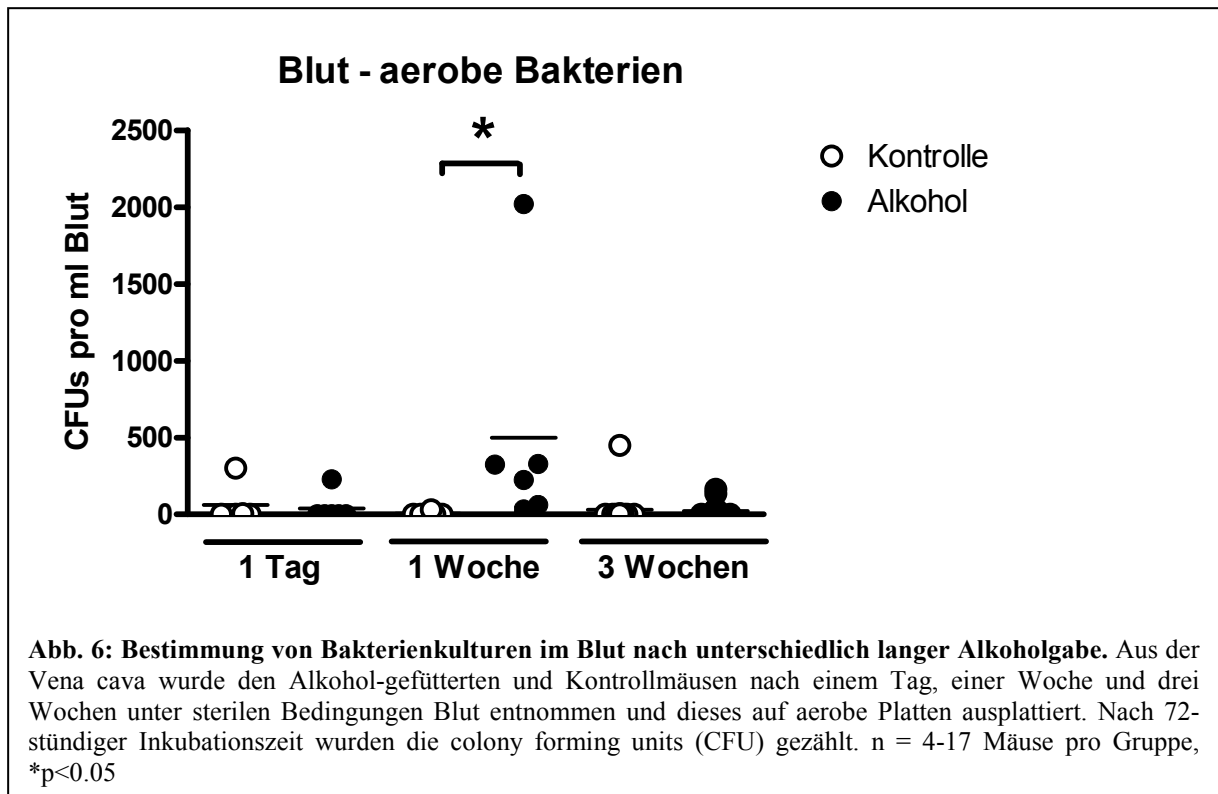
Nach eintägiger, einwöchiger und dreiwöchiger Alkoholexposition zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied positiver Kulturen der mesenterialen Lymphknoten im Vergleich zu den isokalorisch gefütterten Kontroll-Mäusen (Abb. 4).



Ebenfalls unter sterilen Bedingungen wurde das Blut aus der Vena cava inferior entnommen und auf aerobe und anaerobe Platten ausplattiert. Die anaeroben Kulturen der Alkohol- und Kontrollmäuse zeigten zu allen drei Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede. (Abb. 5)



Bei den aeroben Blutkulturen konnte man nach eintägiger Alkoholgabe keinen Unterschied im Vergleich zu den Kontrolltieren feststellen. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach einer Woche jedoch bei mit Alkohol gefütterten Mäusen im Vergleich zu Kontroll-Mäusen ein deutlicher Anstieg der Keimzahl in den Blutkulturen. Diese Tendenz konnte nach dreiwöchiger Alkoholgabe allerdings nicht bestätigt werden (Abb. 6).



Nach Alkoholfütterung ist die bakterielle Überwucherung v.a. im Dünndarm ausgeprägt

Der Effekt von Alkohol oder isokalorischer Kontrolldiät auf die Menge der Bakterien im Dünndarm (proximales, mittleres und distales Drittel) und Dickdarm (Coecum und Colon) wurde mit Hilfe konventioneller Nährmedien gemessen. Hierzu wurde der gesamte Dünndarm und Dickdarm entnommen. Der Dünndarm wurde in drei gleich lange Stücke geteilt und das Coecum vom übrigen Colon abgetrennt. Danach wurde jedes einzelne Stück homogenisiert, verschiedene Verdünnungen wurden angefertigt, und die Suspension wurde auf unterschiedliche Platten verteilt und inkubiert.

Aerobe Bakterien wurden auf 5%igen Blutagar-Platten kultiviert. Hier zeigte sich nach eintägiger und einwöchiger Alkoholfütterung kein signifikanter Anstieg der Zahl der Kolonien. Nach dreiwöchiger Alkoholfütterung stieg die Anzahl von Kolonien aerober Bakterien aus allen Darmabschnitten an signifikant an (Abb.7 A-C).

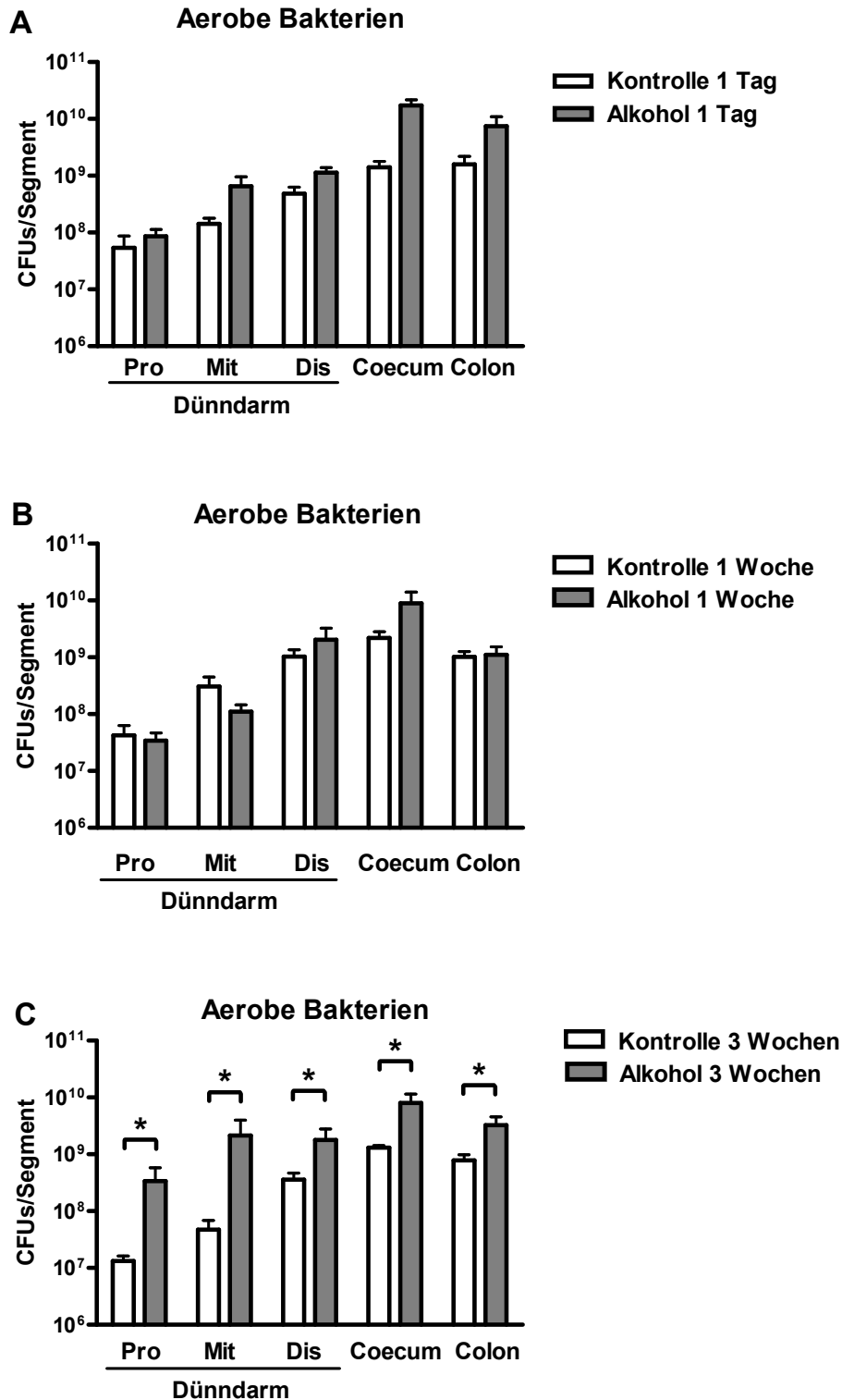


Abb.7: Bestimmung der Anzahl der aeroben Bakterien in verschiedenen Darmabschnitten: Drei gleich lange Stücke des Dünndarms (proximales Drittel, Pro; mittleres Drittel, Mit; distales Drittel, Dis), das Coecum und das Colon wurden nach eintägiger (A), einwöchiger (B), bzw. dreiwöchiger (C) Alkoholgabe homogenisiert und auf 5%igen Blutagar-Platten ausplattiert. Nach 72-stündiger Inkubationszeit wurden die colony forming units (CFU) gezählt. n = 4-17 Mäuse pro Gruppe, *p<0.05

Anaerobe Bakterien wurden auf Brucella-Agar-Platten unter anaeroben Bedingungen kultiviert. Nach eintägiger und einwöchiger Alkoholgabe zeigte sich kein signifikanter Unterschiede (Abb.8 A-B). Nach dreiwöchiger Alkoholfütterung stieg die Anzahl der Kolonien, die aus mittlerem und distalem Dünndarm sowie Coecum isoliert werden konnten, signifikant an (Abb.8 C).

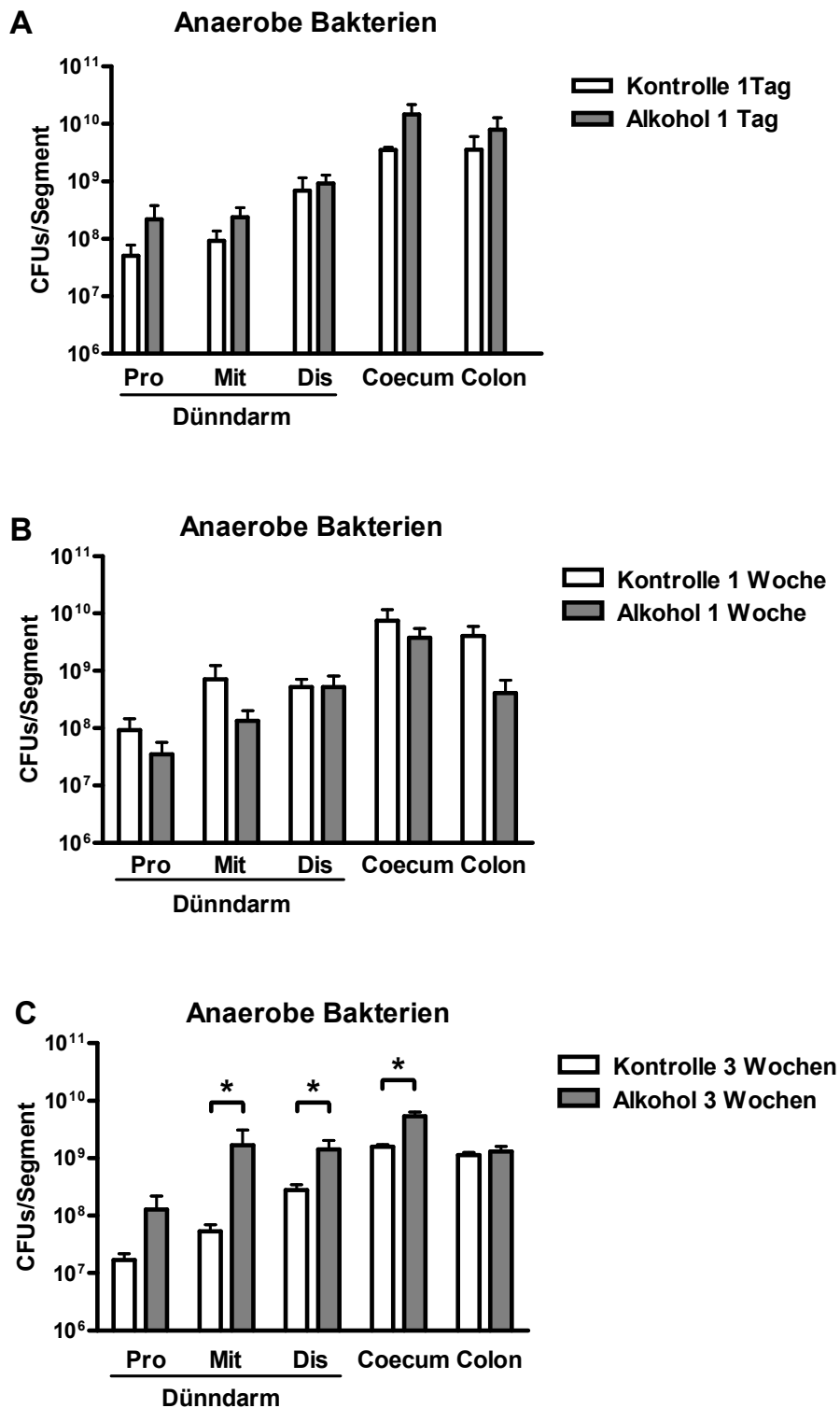
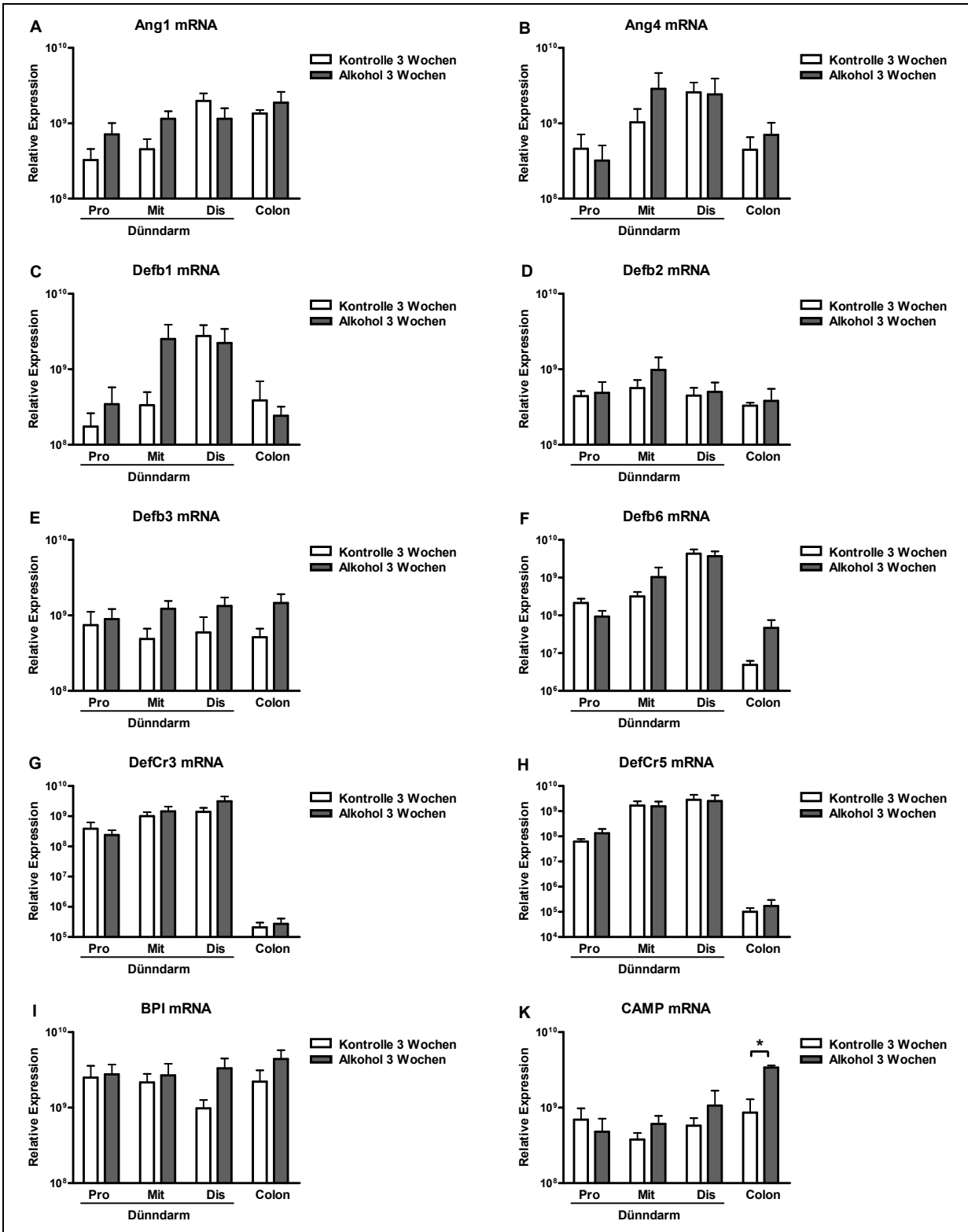


Abb. 8: Bestimmung der Anzahl der anaeroben Bakterien in verschiedenen Darmabschnitten: Drei gleich lange Stücke des Dünndarms (proximales Drittel, Pro; mittleres Drittel, Mit; distales Drittel, Dis), das Coecum und das Colon wurden nach eintägiger (A), einwöchiger (B), bzw. dreiwöchiger (C) Alkoholgabe homogenisiert und auf 5%igen Blutagar-Platten ausplattiert. Nach 72-stündiger Inkubationszeit wurden die colony forming units (CFU) gezählt. n = 4-17 Mäuse pro Gruppe, *p<0.05

Expression antimikrobieller Moleküle nach Alkoholfütterung

Die Bakterien im Dün- und Dickdarm werden von vielen Faktoren kontrolliert. Hier zählen zum Beispiel die antimikrobiellen Peptide und Proteine, welche von Epithel- bzw. Paneth-Zellen sezerniert werden. Um die Expression und Regulation antimikrobieller Moleküle zu untersuchen, wurde deren Genexpression in verschiedenen Darmabschnitten mittels RT-qPCR ausgewertet.

Es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der Expression von Angiogenin-1 (Ang1) (Abb.9 A), Angiogenin-4 (Ang4) (Abb.9 B), Defensin beta 1 (Defb1) (Abb.9 C), Defensin beta 2 (Defb2) (Abb.9 D), Defensin beta 3 (Defb3) (Abb.9 E), Defensin beta 6 (Defb6) (Abb.9 F), Defensin alpha 3 (DefCr3) (Abb.9 G), Defensin alpha 5 (DefCr5) (Abb.9 H), Bactericidal permeability increasing protein (BPI) (Abb.9 I), Cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) (Abb.9 K), C-Type lectin domain family 7, member a (Clec7a) (Abb.9 L), Resistin-like molecule beta (RELM beta) (Abb.9 M) und Ribonuclease gamma (RNase gamma) (Abb.9 N) bei mit Alkohol gefütterten Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen.



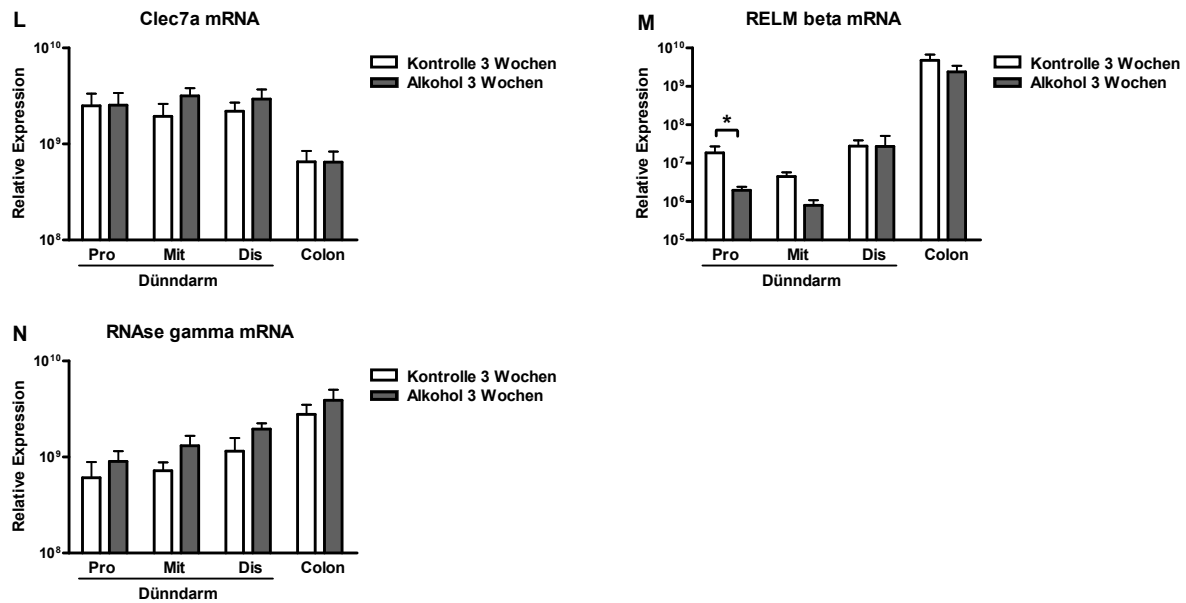
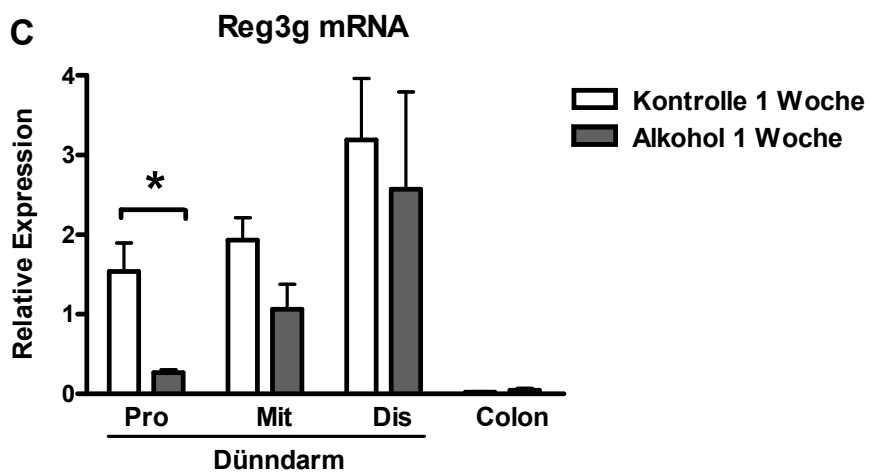
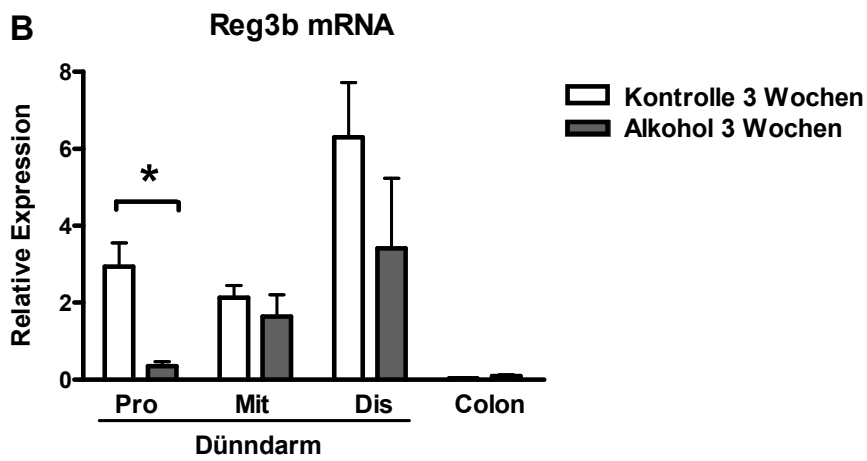
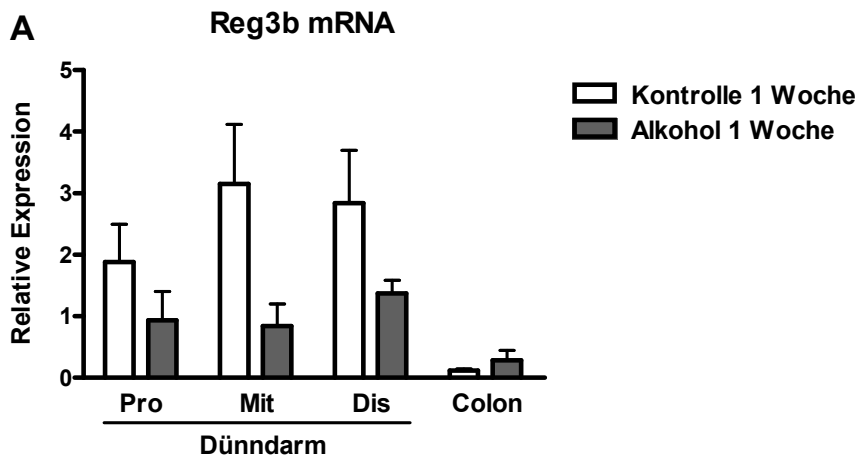


Abb. 9: Relative Expression verschiedener antimikrobieller Moleküle bei Alkohol-gefütterten und Kontrollmäusen nach 3 Wochen. Mittels Real-Time-PCR wurde die Expression von Angiogenin-1 (Ang1) (A), Angiogenin-4 (Ang4) (B), Defensin beta 1 (Defb1) (C), Defensin beta 2 (Defb2) (D), Defensin beta 3 (Defb3) (E), Defensin beta 6 (Defb6) (F), Defensin alpha 3 (DefCr3) (G), Defensin alpha 5 (DefCr5) (H), Bactericidal permeability increasing protein (BPI) (I), Cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) (K), C-Type lectin domain family 7, member a (Clec7a) (L), Resistin-like molecule beta (RELM beta) (M) und Ribonuclease gamma (RNase gamma) (N) im Dünndarm (proximales Drittel, Pro; mittleres Drittel, Mit; distales Drittel, Dis), im Coecum und im Colon bestimmt. 18s diente als „housekeeping gene“. n = 4-6 Mäuse pro Gruppe, *p<0.05

Die Expression von regenerating islet-derived 3 beta (Reg3b) und regenerating islet-derived 3 gamma (Reg3g) war in jedem Segment des Dünndarms von alkoholgefütterten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen nach einer Woche und drei Wochen reduziert (Abb.10 A-D). Reg3g war im proximalen Dünndarm eine Woche und drei Wochen nach Alkoholgabe signifikant supprimiert (Abb.10 C-D). Die Expression von Reg3b war ähnlich im proximalen Dünndarm nach dreiwöchiger Alkoholgabe unterdrückt (Abb.10 B).



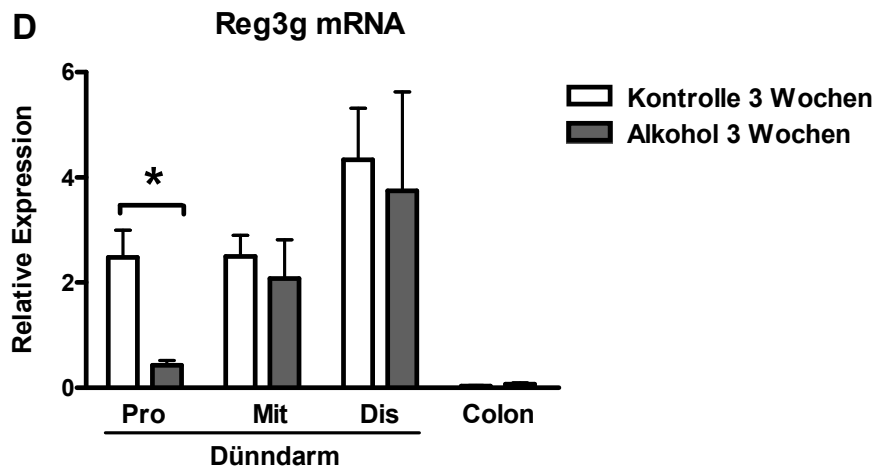
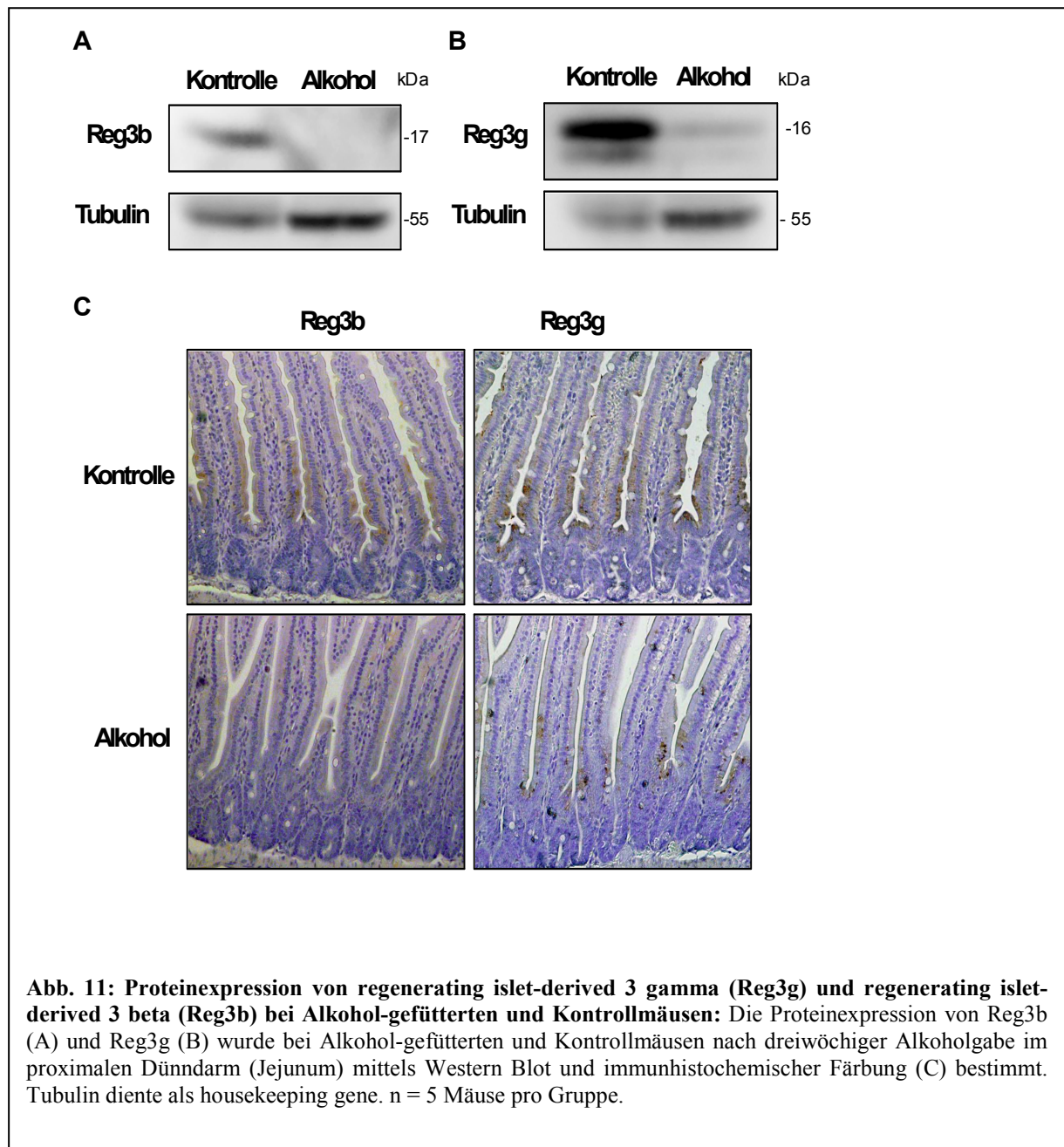


Abb. 10: Relative Expression von regenerating islet-derived 3 beta (Reg3b) und von regenerating islet-derived 3 gamma (Reg3g) bei Alkohol- und Kontrollmäusen: Die Expression von Reg3b (A, B) und Reg3g (C, D) wurde bei Alkohol-gefütterten und Kontrollmäusen nach einwöchiger (A, C) und dreiwöchiger (B, D) Alkoholgabe im Dünndarm (proximales Drittel, Pro; mittleres Drittel, Mit; distales Drittel, Dis), im Coecum und im Colon bestimmt. 18s diente als „housekeeping gene“. n = 5 Mäuse pro Gruppe, *p<0.05

Die Unterdrückung der Genexpression von Reg3b und Reg3g war nicht auf einen unspezifisch toxischen Effekt des Alkohols auf die Epithelzellen zurückzuführen, weil sich hinsichtlich der Expression anderer antimikrobiellen Moleküle (wie oben in Abb.9 A-N gezeigt) keine Unterschiede zeigten.

Entsprechend der Transkription von RNA war nach 3-wöchiger Alkoholgabe auch die Proteinsynthese von Reg3b und Reg3g im proximalen Dünndarm (Jejunum) der Mäuse reduziert, was mittels Western Blot (Abb.11 A-B) und immunhistochemischer Färbung (Abb.11 C) nachgewiesen wurde. Reg3b und Reg3g wurden dabei hauptsächlich von Epithelzellen exprimiert (Abb.11 C).



5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden die Veränderungen der Darmflora und die Dynamik der bakteriellen Translokation nach Alkoholgabe untersucht. Außerdem wurde untersucht, ob bestimmte Aspekte der mukosalen angeborenen Immunität nach Alkoholgabe Veränderungen aufweist.

Zunächst wurde bestätigt, dass die Alkoholfütterung der Mäuse eine Steatohepatitis zur Folge hat. Nach einwöchiger Alkoholgabe war eine mikro- und makrovesikuläre Steatose, nach dreiwöchiger Alkoholgabe eine deutliche Akkumulation von Fett in der Leber sichtbar.

Zugleich wurde als Marker für eine Leberschädigung die Alanin-Aminotransferase (ALT) herangezogen. Eine Woche und drei Wochen nach kontinuierlicher Alkoholgabe stieg die ALT als Zeichen eines akuten Leberschadens signifikant an.

Außerdem wurde mittels hepatischer Kollagen alpha1(I) mRNA gezeigt, dass eine dreiwöchige Alkoholgabe eine Fibrogenese zur Folge hat. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das Modell der kontinuierlichen Alkoholinfusion zur Steatose führt und auch ein Modell der alkoholbedingten Leberfibrose darstellt.

Die bakterielle Translokation ist definiert als eine Wanderung von Bakterien oder bakterieller Produkte vom intestinalen Lumen in die mesenterialen Lymphknoten und von dort aus zu anderen extraintestinalen Organen [47]. Gemäß dieser Definition wurden Bakterien aus den mesenterialen Lymphknoten kultiviert, um eine Translokation in unserem Modell nachzuweisen. Zwar konnte eine Tendenz zu einer vermehrten Translokation bei den mit Alkohol gefütterten Mäusen nach einer Woche und nach drei Wochen festgestellt werden, die jedoch statistisch nicht signifikant war.

Die anaeroben Kulturen des entnommenen Blutes zeigten zu allen drei Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Alkohol-gefütterten und den Kontrollmäusen.

Bei den aeroben Kulturen hingegen konnte nach einwöchiger Alkoholfütterung ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden, jedoch nicht nach eintägiger und dreiwöchiger Alkoholfütterung. Möglicherweise ist diese Beobachtung durch die geringe Anzahl der Mäuse oder andere Störgrößen bedingt, die dazu führten, dass nicht auch nach dreiwöchiger Alkoholfütterung eine signifikante Differenz zu den Kontrolltieren bestand.

Die Translokation lebender Bakterien in die systemische Blutzirkulation trat ebenso wie die Steatose beziehungsweise die Steatohepatitis nach einer Woche auf. Folglich könnte hier ein direkter zeitlicher Bezug zwischen der bakteriellen Translokation und der Lebersteatose

diskutiert werden. Weitere Untersuchungen wie zum Beispiel die Bestimmung der Plasmaendotoxinkonzentration sind notwendig, um die Mechanismen dieser Veränderung zu beleuchten.

Des Weiteren wurde die Menge der Bakterien in den verschiedenen Darmabschnitten untersucht. Die Bakterienlast aerober Bakterien zeigte nach eintägiger und einwöchiger Alkoholfütterung keine signifikante Veränderung. Nach dreiwöchiger Alkoholfütterung stieg die Anzahl aerober Bakterien in allen Darmabschnitten signifikant an, am stärksten ausgeprägt fand sich dieser Effekt im Dünndarm. Genauso verhielt es sich mit den anaeroben Bakterien. Dort waren signifikante Unterschiede ebenfalls erst nach dreiwöchiger Alkoholgabe ersichtlich.

Um eine mögliche Erklärung für die bakterielle Überwucherung und die nachfolgende bakteriellen Translokation zu finden, wurde die Genexpression verschiedener antimikrobieller Peptide und Proteine des Darms mittels Real-Time-PCR bestimmt. Die Genexpression von Reg3b und Reg3g war in jedem Segment des Dünndarms nach ein- und dreiwöchiger Alkoholgabe reduziert. Die Proteinexpression wurde nur nach dreiwöchiger Alkoholgabe untersucht und fand sich im proximalen Dünndarm reduziert.

Die Expression von Ang1, Ang4, Defb1, Defb2, Defb3, Defb6, DefCr3, DefCr5, BPI, CAMP, Clec7a, RELM beta und RNase gamma bei mit Alkohol behandelten Mäusen unterschied sich hingegen nicht von den Kontroll-Mäusen.

Somit wurde eine durch Alkohol induzierte verminderte Expression der antimikrobiellen Moleküle Reg3b und Reg3g beobachtet, welche zu der festgestellten bakteriellen Überwucherung beitragen könnte.

Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass aus dem Darm stammendes Endotoxin (als Marker für die bakterielle Translokation) eine wichtige Rolle bei der Initiierung und Progression der alkoholinduzierten Lebererkrankung spielt.

Erstens sind die Endotoxinplasmakonzentrationen bei Patienten mit alkoholischer Lebererkrankung verglichen mit gesunden Kontrollen um mehr als das fünffache erhöht [27]. Zudem wurde auch die intestinale Permeabilität für Makromoleküle bei Patienten mit chronischem Alkoholabusus und verschiedenen Stadien der alkoholischen Lebererkrankung bestimmt. Oral gegebenes Polyethylenglycol (Mr 1500, 4000, 10000) war häufiger im Urin von Patienten mit alkoholischer Lebererkrankung vorhanden als im Urin von gesunden Kontrollen, was für eine Störung der intestinalen Barriere spricht. Diese Ergebnisse zeigen,

dass Alkoholabusus die Funktion der Darmbarriere schädigt, die Translokation bakterieller Toxine fördert und dadurch zu Entzündungsprozessen bei alkoholischer Lebererkrankung beitragen könnten [27].

Auch im Tiermodell der alkoholinduzierten Lebererkrankung belegen drei Studien eine Korrelation zwischen Alkoholzufuhr und erhöhtem Endotoxinspiegel:

Mit Alkohol gefütterte Ratten zeigten im Blut höhere Endotoxinspiegel als Kontrolltiere [19]. Des Weiteren wurden in einer Studie von Nanij et al. Ratten über verschieden lange Zeiträume (eine Woche, zwei Wochen, einen Monat und zwei Monate) mit Alkohol gefüttert. Dabei wurde ein kontinuierlicher Anstieg des Plasmaendotoxinspiegels festgestellt, der auch mit der Schwere der Lebererkrankung korrelierte [74]. Bei akuter Alkoholgabe zeigte sich ebenfalls ein dosisabhängiger Anstieg des Endotoxinspiegels, wenn Ratten mit LPS und verschiedenen Alkohol-Konzentrationen gefüttert wurden. Sechzig Minuten nach Ethanolfütterung war der stärkste Anstieg des Endotoxinspiegels zu messen [31].

Zweitens verhindert eine selektive intestinale Dekontamination durch Antibiotika eine experimentelle alkoholische Lebererkrankung. Alkoholgefütterte Ratten zeigten weder einen Anstieg des Endotoxinspiegels noch eine Leberschädigung, wenn zuvor in ihrem Darm eine Keimzahlreduktion mit Polymyxin B und Neomycin durchgeführt wurde [19]. Auch zwei weitere Studien von Enomoto et al. bestätigten dies und stellten ebenso nach Antibiotikagabe keinen signifikanten Anstieg des Endotoxinspiegels in der Portalvene bei regelmäßiger Alkoholfütterung bei Ratten fest [75, 76].

Drittens sind Mäuse mit Gendelektionen im LPS-Signalweg resistent gegenüber alkoholinduzierten Leberschäden [40, 41]. Während bei Mäusen mit Alkoholgabe im Vergleich zu Kontrolltieren eine Steatose, eine milde Entzündung und fokale Nekrosen nachzuweisen waren, wurden diese pathologischen Veränderungen bei TLR4-mutierten Mäusen nicht detektiert. Der Endotoxinspiegel war nach 4-wöchiger Alkoholfütterung in allen Gruppen signifikant erhöht [41]. Auch CD14 (das als Kofaktor für die Bindung von LPS an TLR4 notwendig ist) defiziente Mäuse zeigten nach kontinuierlicher Alkoholgabe nur minimale Leberschäden im Gegensatz zu einer deutlichen Lebererkrankung mit Steatose, Entzündung und Nekrose bei mit Alkohol gefütterten Wildtyp-Tieren. Außerdem waren weitere Entzündungsmarker wie NF- κ B, TGF- β und TNF- α bei Wildtyp-Mäusen, die mit Alkohol gefüttert wurden, signifikant erhöht, nicht aber in CD14-defizienten Mäusen. [40].

Es stellt sich nun die Frage, ob die bakterielle Translokation von qualitativen und quantitativen Veränderungen der Darmflora abhängt. Es wurde beschrieben, dass eine erhöhte Darmpermeabilität mit nachfolgender Endotoxämie bei Ratten vor der Entwicklung einer alkoholischen Steatohepatitis auftritt [77]. Desweiteren wurde gezeigt, dass eine experimentell herbeigeführte bakterielle Überwucherung des Dünndarms zu einer Leberschädigung führt, die durch translozierte bakterielle Produkte vermittelt wird [78]. Basierend auf diesen Studien kann es durch eine erhöhte intestinale Durchlässigkeit mit einer darauf folgenden bakteriellen Translokation zu einer Lebererkrankung kommen. Ein möglicher Beschleuniger, der die Darmpermeabilität zu erhöhen scheint, ist Alkohol selbst. Alkohol wird durch die intestinale Flora zu Acetaldehyd oxidiert, das wiederum die Barriere schädigt und zu einer Aktivierung der Mastzellen führt [79]. In unserem Modell konnte eine bakterielle Translokation jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Wie beschrieben findet in unserem Modell nach dreiwöchiger Alkoholgabe eine bakterielle Überwucherung von aerober und anaerober Darmflora statt. Es ist daher anzunehmen, dass die Menge an Endotoxinen im Darmlumen aufgrund dieser bakteriellen Überwucherung ebenfalls zunimmt. Folglich kann es bei vorbestehender Störung der Darmbarriere zu einem vermehrten Übertritt von Endotoxinen in die Blutbahn kommen. Weiterhin kann man darüber spekulieren, dass es durch die Erhöhung des Endotoxinspiegels im Blutplasma zu einer Progression der Lebererkrankung kommt. Um diese Hypothese zu überprüfen, müssen jedoch in Zukunft die Endotoxinspiegel in unserem Modell bestimmt werden.

Ein weiteres Beispiel für eine Form der Leberverfettung, bei der Bakterien und auch die bakterielle Überwucherung eine wichtige Rolle spielen, ist die nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD). Die NAFLD umfasst ein breites Spektrum verschiedener Lebererkrankung von einer leichten Steatose bis hin zu einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis und ist ein Teil des metabolischen Syndroms. Fettleibige Patienten weisen demnach häufig eine nicht-alkoholische Fettlebererkrankung auf [80].

Welche Rolle die Bakterienflora bei der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung spielt, zeigen Experimente an Mäusen mit einer Mutation im Leptin-Gen. Eine Analyse der Darmflora von Leptin-mutierten Mäusen zeigte eine starke Vorherrschaft von *Firmikuten* und *Bakteroidetes* [81]. Wenn nun Wildtyp-Mäuse mit der Flora von Leptin-mutierten Mäusen besiedelt wurden, entwickelten diese auch ein metabolisches Syndrom [82]. Verschiedene Mechanismen sind dafür verantwortlich und wurden mit Hilfe von metagenomischen Techniken identifiziert. Ein Mechanismus ist die Fermentierung von unverdaulichen

Polysacchariden zu Monosacchariden und kurzkettigen Fettsäuren durch die Darmflora. Eine große Menge von Monosacchariden und kurzkettigen Fettsäuren werden anschließend vom Darmlumen absorbiert und zur Leber transportiert, was eine Induktion der Lipogenese zur Folge hat [83]. Zudem wird der zirkulierende Lipoprotein-Lipase-Inhibitor „fasting-induced adipose factor“ (FIAF) im intestinalen Epithel des Wirts unterdrückt. Dies führt zur Ablagerung von Triglyzeriden in den Adipozyten [83]. FIAF induziert auch die Expression des „Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator“ (Pgc-1 α), was zu einem Anstieg der Fettsäure-Oxidation führt [83]. Die Darmflora adipöser Mäuse ist effizienter in der Energiegewinnung aus dem Darm als die Darmflora von Kontrollmäusen. Eine Verbindung zwischen Adipositas und Veränderungen der Darmflora konnte man auch beim Menschen nachweisen [81, 82]. Untersuchungen der Darmflora bei Zwillingen (adipös/nicht adipös) zeigen, dass die menschliche Darmflora unter Familienmitgliedern sehr ähnlich sind, aber dass die Darmflora jeder einzelnen Person in ihren spezifischen Bakterienstämmen variiert [84].

Neben der Zusammensetzung der Darmflora spielt bei der NAFLD auch die bakterielle Überwucherung eine wichtige Rolle. Eine Studie von Wigg et al zeigte, dass bei 50% der Patienten mit nicht-alkoholischer Steatohepatitis eine bakterielle Überwucherung im Dünndarm nachgewiesen werden konnte. Im Vergleich dazu konnte nur bei 22% der gesunden Kontrollen eine bakterielle Überwucherung detektiert werden [85].

Adipositas ist also neben Alkohol ein weiterer wichtiger Faktor, der zur Steatose führen kann. Auch hier spielt sowohl die Zusammensetzung der Darmflora, als auch die bakterielle Überwucherung eine wichtige Rolle.

Der molekulare Mechanismus, der der bakteriellen Überwucherung zugrunde liegt, ist nicht bekannt. Verschiedene Faktoren wie zum Beispiel die Magensäuresekretion oder die Motilität des Dün- und Dickdarms tragen zur Homöostase der Darmflora bei. Darmepithelzellen sind die hauptsächliche Barriere zwischen dem Wirt und der Mikroflora des Darms. Epithelzellen haben viele wichtige Funktionen in der Aufrechterhaltung einer symbiotischen Beziehung zwischen dem Wirt und der Mikroflora. Eine dieser Funktionen ist die Sekretion antimikrobieller Effektormoleküle als Teil des angeborenen Immunsystems [86]. Die Reg-Gen-Familie kodiert eine Gruppe sezernierter Lektine, die spezifisch mit ihren Kohlenhydrat-Erkennungsbereichen (Carbohydrat recognition domains) Peptidoglykan erkennen und deshalb an grampositive Bakterien binden können. Einige Reg3-Familienmitglieder werden bevorzugt im Dünndarm exprimiert, zu ihnen gehört Reg3g [87].

Reg3g wird vom Darmepithel und vor allem von Paneth-Zellen exprimiert. Eine besonders hohe Expression findet sich im Ileum. Durch Stimulation von Toll-like-Rezeptoren, welche unter anderem für die Erkennung von konservierten mikrobiellen Strukturen verantwortlich sind, kann Reg3g induziert werden [88]. Reg3g zeigt potente bakterizide Aktivität und wirkt spezifisch auf grampositive Bakterien (über die Bindung an deren Peptidoglykan) [87]. Ähnlich hierzu hat Reg3b auch eine antimikrobielle Aktivität und wurde in Zusammenhang mit der intestinalen Homöostase gebracht [89].

In der vorliegenden Arbeit wurde demonstriert, dass chronische Alkoholexposition die Protein- und Genexpression von Reg3b und Reg3g vermindert und so zu Veränderungen der Darmflora führen kann. Dies könnte eine Erklärung für die bakterielle Überwucherung bei chronischer Alkoholexposition sein. Interessanterweise wurde die niedrigste Expression von Reg3b und Reg3g im proximalen Dünndarm beobachtet, wo die bakterielle Überwucherung am stärksten ausgeprägt und die luminaire Alkoholkonzentration am höchsten war. Diese Dysregulation des angeborenen Immunsystems weist auf eine neuartige Verbindung zwischen Alkohol und intestinaler bakterieller Überwucherung hin und könnte die Vermehrung der Mikroflora erklären. Sehr wichtig ist auch die Spezifität der niedrigen Reg3g- und Reg3b-Expression. Obwohl eine Vielzahl an antimikrobiellen Molekülen untersucht wurde, konnte bei keinem anderen getesteten Vertreter ein signifikanter Unterschied nach Alkoholgabe festgestellt werden. Deshalb ist auch eine direkte Schädigung des Alkohols auf die Epithelzelle als Ursache der verminderten Expression von Reg3g unwahrscheinlich.

Um festzustellen, ob die verminderte Expression von Reg3g bei alkoholbehandelten Mäusen eine Relevanz für die Klinik besitzt, wurden Studien an Patienten initiiert [87]. Es wurde zunächst untersucht, ob bei Patienten mit chronischem Alkoholabusus die Protein- und Genexpression von Reg3g vermindert ist. Hierzu wurden Biopsien aus dem Duodenum von Alkoholikern mit Biopsien von gesunden Probanden verglichen. Die Protein- und Genexpression von Reg3g waren in den Duodenalbiopsien von Alkoholikern im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant vermindert. Diese Daten zeigen, dass die Regulation von Reg3g auch bei Patienten mit chronischem Alkoholabusus eine entscheidende Rolle spielt und von therapeutischer Relevanz sein könnte [87].

Der molekulare Mechanismus, über den Alkohol Reg3b und Reg3g supprimiert, bleibt zunächst unbekannt. Nachfolgende Arbeiten müssen nun initiiert werden, um diesen

Mechanismus näher zu untersuchen. Dabei würde man idealerweise ein „in vitro“-System wählen. Mit Hilfe einer Dünndarm-Epithelzelllinie könnte man ein System etablieren, in dem man nach Alkoholzugabe den genauen Mechanismus der alkoholinduzierten Reg3g-Suppression untersucht.

Verschiedene Publikationen zeigen, dass Reg3g über Toll-like-Rezeptor-Liganden moduliert werden kann [88, 90]. Deshalb müsste zuerst geklärt werden, ob die Wirkung von Alkohol auf Reg3g ebenfalls durch Toll-like-Rezeptoren vermittelt wird. Man könnte auch darüber spekulieren, dass Alkohol direkt auf die Genregulation der Epithelzelle (z.B. über Acetaldehyd responsive elements) einwirkt. Kürzlich wurde auch gezeigt, dass für die Regulation von Reg3g das Zytokin IL-22 nötig ist, welches im Darm vor allem von NKp46 positiven natürlichen Killerzellen gebildet wird [91]. Deshalb könnte auch eine Wirkung von Alkohol auf NKp46 positive NK-Zellen ein möglicher Mechanismus hinter der alkoholabhängigen Suppression von Reg3g und Reg3b sein.

Weiterführende Arbeiten werden neue Erkenntnisse in Bezug auf die Metagenomik, Transkriptomik und Metabolomik der alkoholischen Lebererkrankung liefern.

Die Analyse des Transkriptoms und des Metaboloms des Darms wird helfen, Schlüsselsubstrate und Signalmediatoren zu identifizieren, die die Interaktionen zwischen Mikrobe und Wirt erklären. Dieses Wissen wird es ermöglichen, auf rationale Weise zu versuchen, die symbiotische Mikroflora zu manipulieren und spezifische Mikroorganismen und Metaboliten durch diätetische Unterstützung von Probiotika, Antibiotika, Präbiotika oder Synbiotika zu treffen.

Obwohl der molekulare Mechanismus, durch den Alkohol die Protein- und Genexpression von Reg3b und Reg3g vermindert, noch nicht bekannt ist, wurden in weiteren Experimenten die therapeutische Relevanz der Reg3g-Regulation untersucht. Da Alkohol die Expression von Reg3g und Reg3b signifikant vermindert und die verminderte Expression von Reg3b und Reg3g bei mit Alkohol gefütterten Mäusen möglicherweise der Grund für die intestinale Dysbiose und bakterielle Überwucherung ist, wurde zunächst versucht, Reg3g therapeutisch zu regulieren. Dabei wurde festgestellt, dass die Expression von Reg3g durch Gabe von *Bacteroides thetaiotaomicron*, einem wichtigen Bestandteil der Darmflora, erhöht werden kann [92]. Außerdem haben verschiedene Studien einen positiven Effekt probiotischer *Lactobacillus*-Stämme auf die alkoholische Lebererkrankung im Tierexperiment demonstriert [23, 37]. Daher wurde zunächst versucht, die Expression von Reg3g mit Präbiotika zu beeinflussen. Präbiotika sind vom Wirt nichtverdaubare Kohlenhydrate, welche probiotische

Bakterien wie zum Beispiel *Lactobacilli* und *Bifidobakterien* stimulieren können. Es wurden nun Mäuse mit Alkohol und Präbiotika behandelt und mit Mäusen verglichen, die lediglich Alkohol zugeführt bekamen. Durch die zusätzliche Gabe von Präbiotika konnte die Expression von Reg3g partiell wieder auf das Ausgangsniveau gebracht werden. Diese partielle Sanierung von Reg3g hatte außerdem eine Reduktion der intestinalen bakteriellen Überwucherung zur Folge sowie eine verminderte Steatohepatitis [93].

Diese Daten zeigen, dass die Regulation der Expression von Reg3g therapeutische Relevanz besitzt. Da Präbiotika schon erfolgreich in der Klinik zum Beispiel bei der Leberzirrhose Einzug gefunden haben [94], ist zu erwarten, dass die Behandlung der alkoholischen Steatohepatitis mit Präbiotika schon bald in klinischen Studien getestet wird.

6 Zusammenfassung

Chronischer Alkoholkonsum begünstigt im Darm eine Vermehrung der Bakterien. Diese bakterielle Überwucherung führt zu einer vermehrten Freisetzung von Endotoxinen, die in der Folge in den portalen Blutkreislauf übertreten und eine Entzündungskaskade in der Leber in Gang setzen können.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Mausmodell der kontinuierlichen intragastralen Alkoholgabe verglichen mit der Gabe einer isokalorischen Kontrolldiät gewählt. Zunächst wurde bestätigt, dass die Alkoholfütterung der Mäuse eine Steatohepatitis zur Folge hat. Nach einwöchiger Alkoholgabe war eine mikro- und makrovesikuläre Steatose und nach dreiwöchiger Alkoholgabe eine deutliche Akkumulation von Fett in der Leber sichtbar.

Zugleich wurde als Marker für eine Leberschädigung die Alanin-Aminotransferase herangezogen. Eine und drei Wochen nach kontinuierlicher Alkoholgabe stieg die ALT als Zeichen eines akuten Leberschadens signifikant an.

Der Effekt von Alkohol oder isokalorischer Kontrolldiät auf die Menge der Bakterien im Darm wurde mit konventionellen Nährmedien gemessen. Die Bakterienlast aerober Bakterien zeigte nach eintägiger und einwöchiger Alkoholfütterung keine signifikante Steigerung. Nach dreiwöchiger Alkoholfütterung stieg die Anzahl aerober Bakterien in allen Darmabschnitten signifikant an, am stärksten ausgeprägt fand sich dieser Effekt im Dünndarm. Genauso verhielt es sich mit den anaeroben Bakterien. Für sie waren signifikante Unterschiede ebenfalls erst nach dreiwöchiger Alkoholgabe ersichtlich.

Als Maß der bakteriellen Translokation wurden Bakterien quantitativ aus den mesenterialen Lymphknoten kultiviert. Zwar wurde ein Trend zu einer vermehrten Translokation bei den mit Alkohol gefütterten Mäusen nach einer und drei Wochen festgestellt, jedoch wurde insgesamt keine Signifikanz beobachtet.

Die anaeroben Kulturen des entnommenen Blutes zeigten zu allen drei Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Alkohol-gefütterten und den Kontrollmäusen.

Bei den aeroben Kulturen hingegen konnte nach einwöchiger Alkoholfütterung ein signifikanter Anstieg nachgewiesen werden, jedoch nicht nach eintägiger und dreiwöchiger Alkoholfütterung.

Um eine mögliche Erklärung der bakteriellen Überwucherung und der nachfolgenden bakteriellen Translokation zu finden, wurde die Genexpression verschiedener antimikrobieller Peptide und Proteine entlang des Darms mittels Real-Time-PCR bestimmt. Die

Genexpression von Reg3b und Reg3g war in jedem Segment des Dünndarms nach ein- und dreiwöchiger Alkoholgabe reduziert. Die Proteinexpression wurde nur nach dreiwöchiger Alkoholgabe untersucht und fand sich im proximalen Dünndarm reduziert. Die Expression von Ang1, Ang4, Defb1, Defb2, Defb3, Defb6, DefCr3, DefCr5, BPI, CAMP, Clec7a, RELM beta und RNase gamma bei mit Alkohol behandelten Mäusen unterschied sich nicht von den Kontroll-Mäusen.

Letztlich wurde also eine durch Alkohol induzierte verminderte Expression der antimikrobiellen Moleküle Reg3b und Reg3g beobachtet, welche zu der festgestellten bakteriellen Überwucherung beitragen könnte.

Der molekulare Mechanismus, über den Alkohol Reg3b und Reg3g supprimiert, bleibt zunächst unbekannt. Nachfolgende Arbeiten müssen nun initiiert werden, um diesen Mechanismus näher zu untersuchen.

7 Abkürzungen

Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ALT	Alanin-Aminotransferase
Ang1	Angiogenin-1
Ang4	Angiogenin-4
ASH	Alkoholische Steatohepatitis
BPI	Bactericidal permeability increasing protein
BSA	Bovine serum albumin
CAMP	Cathelicidin antimicrobial peptide
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CFU	Colony forming units
Clec7a	C-Type lectin domain family 7 member a
Cr	Chrom
CYP2E1	Zytochrom P450 2E1
Defb1	Defensin beta 1
Defb2	Defensin beta 2
Defb3	Defensin beta 3
Defb6	Defensin beta 6
DefCr3	Defensin alpha 3
DefCr5	Defensin alpha 5
DEPC	Diethyldicarbonat
Dis	distales Drittel (des Dünndarms)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FIAF	Fasting induced Adipose Factor
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LH	Length Heterogeneity

LPS	Lipopolysaccharide
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MEOS	mikrosomales Ethanol-oxidierendes System
MG	Molekulargewicht
Mit	mittleres Drittel (des Dünndarms)
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis
NF- κ B	nukleäre Faktor Kappa-B
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
PBS	phosphat buffered salt solution
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Pgc-1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator
PPAR	Peroxisimaler proliferativer nukleärer Rezeptor
Pro	proximales Drittel (des Dünndarms)
Reg3b	regenerating islet derived-3b
Reg3g	regenerating islet derived-3g
RELM beta	Resistin-like molecule beta
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNase gamma	Ribonuclease gamma
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RTq-PCR	Real-Time-quantitative-PCR
TGF	transforming growth factor
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
VLDL	Very low density Lipoprotein
vol	Volumenprozent
α SMA	alpha smooth muscle actin

8 Literaturverzeichnis

1. Gressner AM, S.D., *Cellular and molecular pathobiology, pharmacological intervention, and biochemical assessment of liver fibrosis*, in *Oxford textbook of clinical hepatology* (Bircher J, Benhamou J-P, McIntyre N, Rizzetto M, Rodes J eds). Oxford University Press, Oxford; New York, 1999. **vol 1**(2nd ed.): p. 607-627.
2. Salaspuro, M., *Epidemiological aspects of alcoholic liver disease, ethanol metabolism, and pathogenesis of alcoholic liver injury*, in *Oxford textbook of clinical hepatology* (Bircher J, Benhamou J-P, McIntyre N, Rizzetto M, Rodes J eds). Oxford University Press, Oxford; New York, 1999. **vol 2**(2nd ed): p. 1157–1178.
3. Bataller, R. and D.A. Brenner, *Liver fibrosis*. J Clin Invest, 2005. **115**(2): p. 209-18.
4. Bode, C. and J.C. Bode, *Activation of the innate immune system and alcoholic liver disease: effects of ethanol per se or enhanced intestinal translocation of bacterial toxins induced by ethanol?* Alcohol Clin Exp Res, 2005. **29**(11 Suppl): p. 166S-71S.
5. Gines, P., et al., *Management of cirrhosis and ascites*. N Engl J Med, 2004. **350**(16): p. 1646-54.
6. Yang, S., H. Lin, and A.M. Diehl, *Fatty liver vulnerability to endotoxin-induced damage despite NF-kappaB induction and inhibited caspase 3 activation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **281**(2): p. G382-92.
7. Friedman, S.L., *Stellate cell activation in alcoholic fibrosis--an overview*. Alcohol Clin Exp Res, 1999. **23**(5): p. 904-10.
8. Adachi, M. and H. Ishii, *Role of mitochondria in alcoholic liver injury*. Free Radic Biol Med, 2002. **32**(6): p. 487-91.
9. Galli, A., et al., *The transcriptional and DNA binding activity of peroxisome proliferator-activated receptor alpha is inhibited by ethanol metabolism. A novel mechanism for the development of ethanol-induced fatty liver*. J Biol Chem, 2001. **276**(1): p. 68-75.
10. Lieber, C.S., *Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism*. Clin Chim Acta, 1997. **257**(1): p. 59-84.
11. French, S.W., et al., *Ito cell activation induced by chronic ethanol feeding in the presence of different dietary fats*. Alcohol Alcohol Suppl, 1991. **1**: p. 357-61.

12. Rajendram, R. and V.R. Preedy, *Effect of alcohol consumption on the gut*. Dig Dis, 2005. **23**(3-4): p. 214-21.
13. Nagata, K., H. Suzuki, and S. Sakaguchi, *Common pathogenic mechanism in development progression of liver injury caused by non-alcoholic or alcoholic steatohepatitis*. J Toxicol Sci, 2007. **32**(5): p. 453-68.
14. Thurman, R.G., II. *Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin*. Am J Physiol, 1998. **275**(4 Pt 1): p. G605-11.
15. Friedman, S.L., *Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury*. J Biol Chem, 2000. **275**(4): p. 2247-50.
16. Bode, C., V. Kugler, and J.C. Bode, *Endotoxemia in patients with alcoholic and non-alcoholic cirrhosis and in subjects with no evidence of chronic liver disease following acute alcohol excess*. J Hepatol, 1987. **4**(1): p. 8-14.
17. Fukui, H., et al., *Plasma endotoxin concentrations in patients with alcoholic and non-alcoholic liver disease: reevaluation with an improved chromogenic assay*. J Hepatol, 1991. **12**(2): p. 162-9.
18. Pennington, H.L., et al., *Ethanol feeding enhances inflammatory cytokine expression in lipopolysaccharide-induced hepatitis*. J Gastroenterol Hepatol, 1997. **12**(4): p. 305-13.
19. Adachi, Y., et al., *Antibiotics prevent liver injury in rats following long-term exposure to ethanol*. Gastroenterology, 1995. **108**(1): p. 218-24.
20. Wheeler, M.D., et al., *The role of Kupffer cell oxidant production in early ethanol-induced liver disease*. Free Radic Biol Med, 2001. **31**(12): p. 1544-9.
21. Bode, J.C., et al., *Jejunal microflora in patients with chronic alcohol abuse*. Hepatogastroenterology, 1984. **31**(1): p. 30-4.
22. Hauge, T., J. Persson, and D. Danielsson, *Mucosal bacterial growth in the upper gastrointestinal tract in alcoholics (heavy drinkers)*. Digestion, 1997. **58**(6): p. 591-5.
23. Mutlu, E., et al., *Intestinal dysbiosis: a possible mechanism of alcohol-induced endotoxemia and alcoholic steatohepatitis in rats*. Alcohol Clin Exp Res, 2009. **33**(10): p. 1836-46.
24. Bode, U., G. Sparmann, and J. Westermann, *Gut-derived effector T cells circulating in the blood of the rat: preferential re-distribution by TGFbeta-1 and IL-4 maintained proliferation*. Eur J Immunol, 2001. **31**(7): p. 2116-25.
25. Worthington, B.S., L. Meserole, and J.A. Syrotuck, *Effect of daily ethanol ingestion on intestinal permeability to macromolecules*. Am J Dig Dis, 1978. **23**(1): p. 23-32.

26. Bjarnason, I., T.J. Peters, and R.J. Wise, *The leaky gut of alcoholism: possible route of entry for toxic compounds*. Lancet, 1984. **1**(8370): p. 179-82.
27. Parlesak, A., et al., *Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease*. J Hepatol, 2000. **32**(5): p. 742-7.
28. Mathurin, P., et al., *Exacerbation of alcoholic liver injury by enteral endotoxin in rats*. Hepatology, 2000. **32**(5): p. 1008-17.
29. Tamai, H., et al., *Long-term ethanol feeding enhances susceptibility of the liver to orally administered lipopolysaccharides in rats*. Alcohol Clin Exp Res, 2002. **26**(8 Suppl): p. 75S-80S.
30. Lambert, J.C., et al., *Prevention of alterations in intestinal permeability is involved in zinc inhibition of acute ethanol-induced liver damage in mice*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **305**(3): p. 880-6.
31. Tamai, H., et al., *Effect of acute ethanol administration on the intestinal absorption of endotoxin in rats*. Alcohol Clin Exp Res, 2000. **24**(3): p. 390-4.
32. Dinda, P.K., et al., *Role of xanthine oxidase-derived oxidants and leukocytes in ethanol-induced jejunal mucosal injury*. Dig Dis Sci, 1996. **41**(12): p. 2461-70.
33. Bode, C. and J.C. Bode, *Effect of alcohol consumption on the gut*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2003. **17**(4): p. 575-92.
34. Napolitano, L.M., et al., *Chronic ethanol intake and burn injury: evidence for synergistic alteration in gut and immune integrity*. J Trauma, 1995. **38**(2): p. 198-207.
35. Schafer, C., et al., *Concentrations of lipopolysaccharide-binding protein, bactericidal/permeability-increasing protein, soluble CD14 and plasma lipids in relation to endotoxaemia in patients with alcoholic liver disease*. Alcohol Alcohol, 2002. **37**(1): p. 81-6.
36. Keshavarzian, A., et al., *Preventing gut leakiness by oats supplementation ameliorates alcohol-induced liver damage in rats*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **299**(2): p. 442-8.
37. Nanji, A.A., U. Khettry, and S.M. Sadrzadeh, *Lactobacillus feeding reduces endotoxemia and severity of experimental alcoholic liver (disease)*. Proc Soc Exp Biol Med, 1994. **205**(3): p. 243-7.
38. Apte, U.M., et al., *Role of osteopontin in hepatic neutrophil infiltration during alcoholic steatohepatitis*. Toxicol Appl Pharmacol, 2005. **207**(1): p. 25-38.
39. Adachi, Y., et al., *Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury*. Hepatology, 1994. **20**(2): p. 453-60.

40. Yin, M., et al., *Reduced early alcohol-induced liver injury in CD14-deficient mice*. J Immunol, 2001. **166**(7): p. 4737-42.
41. Uesugi, T., et al., *Toll-like receptor 4 is involved in the mechanism of early alcohol-induced liver injury in mice*. Hepatology, 2001. **34**(1): p. 101-8.
42. Park, P.H., et al., *Regulation of Kupffer cell activity during chronic ethanol exposure: role of adiponectin*. J Gastroenterol Hepatol, 2006. **21 Suppl 3**: p. S30-3.
43. Paik, Y.H., et al., *Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells*. Hepatology, 2003. **37**(5): p. 1043-55.
44. Brun, P., et al., *Exposure to bacterial cell wall products triggers an inflammatory phenotype in hepatic stellate cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005. **289**(3): p. G571-8.
45. Thirunavukkarasu, C., et al., *Normal rat hepatic stellate cells respond to endotoxin in LBP-independent manner to produce inhibitor(s) of DNA synthesis in hepatocytes*. J Cell Physiol, 2005. **204**(2): p. 654-65.
46. Wang, X., et al., *Roles of endotoxin-related signaling molecules in the progression of acute necrotizing pancreatitis in mice*. Pancreas, 2005. **31**(3): p. 251-7.
47. Sedman, P.C., et al., *The prevalence of gut translocation in humans*. Gastroenterology, 1994. **107**(3): p. 643-9.
48. Garcia-Tsao, G. and R. Wiest, *Gut microflora in the pathogenesis of the complications of cirrhosis*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2004. **18**(2): p. 353-72.
49. Marteau, P., et al., *Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(10): p. 4939-42.
50. Steffen, E.K., R.D. Berg, and E.A. Deitch, *Comparison of translocation rates of various indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph node*. J Infect Dis, 1988. **157**(5): p. 1032-8.
51. Garcia-Tsao, G., *Spontaneous bacterial peritonitis*. Gastroenterol Clin North Am, 1992. **21**(1): p. 257-75.
52. Ljungdahl, M., et al., *Bacterial translocation in experimental shock is dependent on the strains in the intestinal flora*. Scand J Gastroenterol, 2000. **35**(4): p. 389-97.
53. Alverdy, J., et al., *Gut-derived sepsis occurs when the right pathogen with the right virulence genes meets the right host: evidence for in vivo virulence expression in Pseudomonas aeruginosa*. Ann Surg, 2000. **232**(4): p. 480-9.

54. Wells, C.L., *Relationship between intestinal microecology and the translocation of intestinal bacteria*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1990. **58**(2): p. 87-93.
55. Boedeker, E.C., *Adherent bacteria: breaching the mucosal barrier?* *Gastroenterology*, 1994. **106**(1): p. 255-7.
56. Bauer, T.M., et al., *Small intestinal bacterial overgrowth in patients with cirrhosis: prevalence and relation with spontaneous bacterial peritonitis*. *Am J Gastroenterol*, 2001. **96**(10): p. 2962-7.
57. Chang, C.S., et al., *Small intestine dysmotility and bacterial overgrowth in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis*. *Hepatology*, 1998. **28**(5): p. 1187-90.
58. Chesta, J. and C. Defilippi, *Abnormalities in proximal small bowel motility in patients with cirrhosis*. *Hepatology*, 1993. **17**(5): p. 828-32.
59. Stewart, J.J., et al., *Intestinal myoelectrical activity and transit time in chronic portal hypertension*. *Am J Physiol*, 1992. **263**(4 Pt 1): p. G474-9.
60. Aranow, J.S. and M.P. Fink, *Determinants of intestinal barrier failure in critical illness*. *Br J Anaesth*, 1996. **77**(1): p. 71-81.
61. Spaeth, G., et al., *Secretory immunoglobulin A, intestinal mucin, and mucosal permeability in nutritionally induced bacterial translocation in rats*. *Ann Surg*, 1994. **220**(6): p. 798-808.
62. Van Bossuyt, H., et al., *The role of bile acids in the development of endotoxemia during obstructive jaundice in the rat*. *J Hepatol*, 1990. **10**(3): p. 274-9.
63. Clements, W.D., et al., *Role of the gut in the pathophysiology of extrahepatic biliary obstruction*. *Gut*, 1996. **39**(4): p. 587-93.
64. Norman, D.A., et al., *Water and electrolyte movement and mucosal morphology in the jejunum of patients with portal hypertension*. *Gastroenterology*, 1980. **79**(4): p. 707-15.
65. Such, J., et al., *Ultrastructural characteristics of distal duodenum mucosa in patients with cirrhosis*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2002. **14**(4): p. 371-6.
66. Campillo, B., et al., *Intestinal permeability in liver cirrhosis: relationship with severe septic complications*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 1999. **11**(7): p. 755-9.
67. Zasloff, M., *Antimicrobial peptides of multicellular organisms*. *Nature*, 2002. **415**(6870): p. 389-95.
68. Ayabe, T., et al., *Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(2): p. 113-8.

69. O'Neil, D.A., et al., *Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium*. J Immunol, 1999. **163**(12): p. 6718-24.
70. Garcia-Tsao, G., et al., *Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes is increased in cirrhotic rats with ascites*. Gastroenterology, 1995. **108**(6): p. 1835-41.
71. Koh, I.H., et al., *Where is the site of bacterial translocation--small or large bowel?* Transplant Proc, 1996. **28**(5): p. 2661.
72. Marshall, J.C., et al., *The microbiology of multiple organ failure. The proximal gastrointestinal tract as an occult reservoir of pathogens*. Arch Surg, 1988. **123**(3): p. 309-15.
73. Tsukamoto, H., et al., *Long-term cannulation model for blood sampling and intragastric infusion in the rat*. Am J Physiol, 1984. **247**(3 Pt 2): p. R595-9.
74. Nanji, A.A., et al., *Severity of liver injury in experimental alcoholic liver disease. Correlation with plasma endotoxin, prostaglandin E2, leukotriene B4, and thromboxane B2*. Am J Pathol, 1993. **142**(2): p. 367-73.
75. Enomoto, N., et al., *Kupffer cell sensitization by alcohol involves increased permeability to gut-derived endotoxin*. Alcohol Clin Exp Res, 2001. **25**(6 Suppl): p. 51S-4S.
76. Enomoto, N., et al., *Development of a new, simple rat model of early alcohol-induced liver injury based on sensitization of Kupffer cells*. Hepatology, 1999. **29**(6): p. 1680-9.
77. Keshavarzian, A., et al., *Evidence that chronic alcohol exposure promotes intestinal oxidative stress, intestinal hyperpermeability and endotoxemia prior to development of alcoholic steatohepatitis in rats*. J Hepatol, 2009. **50**(3): p. 538-47.
78. Lichtman, S.N., et al., *Hepatic inflammation in rats with experimental small intestinal bacterial overgrowth*. Gastroenterology, 1990. **98**(2): p. 414-23.
79. Ferrier, L., et al., *Impairment of the intestinal barrier by ethanol involves enteric microflora and mast cell activation in rodents*. Am J Pathol, 2006. **168**(4): p. 1148-54.
80. Schenk, S., M. Saberi, and J.M. Olefsky, *Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation*. J Clin Invest, 2008. **118**(9): p. 2992-3002.
81. Ley, R.E., et al., *Obesity alters gut microbial ecology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(31): p. 11070-5.
82. Turnbaugh, P.J., et al., *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest*. Nature, 2006. **444**(7122): p. 1027-31.

83. Backhed, F., et al., *The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(44): p. 15718-23.
84. Turnbaugh, P.J., et al., *A core gut microbiome in obese and lean twins*. Nature, 2009. **457**(7228): p. 480-4.
85. Wigg, A.J., et al., *The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis*. Gut, 2001. **48**(2): p. 206-11.
86. Frank, D.N., et al., *Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(34): p. 13780-5.
87. Cash, H.L., et al., *Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin*. Science, 2006. **313**(5790): p. 1126-30.
88. Brandl, K., et al., *Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits*. Nature, 2008. **455**(7214): p. 804-7.
89. Dessein, R., et al., *Toll-like receptor 2 is critical for induction of Reg3 beta expression and intestinal clearance of Yersinia pseudotuberculosis*. Gut, 2009. **58**(6): p. 771-6.
90. Brandl, K., et al., *MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII gamma and protect mice against intestinal Listeria monocytogenes infection*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1891-900.
91. Diefenbach, A., et al., *Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages*. Nat Immunol, 2000. **1**(2): p. 119-26.
92. Sonnenburg, J.L., C.T. Chen, and J.I. Gordon, *Genomic and metabolic studies of the impact of probiotics on a model gut symbiont and host*. PLoS Biol, 2006. **4**(12): p. e413.
93. Yan, A.W., et al., *Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease*. Hepatology, 2011. **53**(1): p. 96-105.
94. Malaguarnera, M., et al., *Bifidobacterium combined with fructo-oligosaccharide versus lactulose in the treatment of patients with hepatic encephalopathy*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2010. **22**(2): p. 199-206.

9 Anhang

9.1 Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9.2 Publikationen

Originalarbeiten

Yan A., Fouts D., Brandl J., Stärkel P., Torralba M., Schott E., Tsukamoto H., Nelson K., Brenner D, Schnabl B:

Enteric dysbiosis associated with a mouse model of alcoholic liver disease

Hepatology, 2011. 53(1): p. 96-105

Yan A., Brandl J., Torralba M., Fouts D., Schott E., Tsukamoto H., Nelson K., Brenner D, Schnabl B:

Downregulation of anti-microbial proteins regenerating islet-derived 3 beta (Reg3b) and gamma (Reg3g) contributes to enteric dysbiosis in alcoholic liver disease.

American Association for the Study of Liver Diseases, AASLD Abstract S-773, 3

Posterbeiträge

Brandl J., Schnabl B., Schott E.:

Intestinale bakterielle Überwucherung bei alkoholinduzierter Lebererkrankung im Mausmodell.

1. Berliner Posterkongress „Wissenschaftliches Arbeiten im Reformstudiengang Medizin“, Berlin, 09.07.2010

Yan A., Brandl J., Torralba M., Fouts D., Schott E., Tsukamoto H., Nelson K., Brenner D, Schnabl B:

Downregulation of anti-microbial proteins regenerating islet-derived 3 beta (Reg3b) and gamma (Reg3g) contributes to enteric dysbiosis in alcoholic liver disease.

DDW 2010 Oral Presentations, Ernest N. Morial Convention Center, New Orleans, USA, 02.05.2010

9.3 Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Eckart Schott für die exzellente Betreuung dieser Arbeit. Er stand mir immer bei Fragen und Anliegen zur Seite, gab mir wichtige Denkanstöße und begleitete diese Promotion mit konstruktiv-kritischen Anmerkungen. Ich bedanke mich auch für die Bereitschaft, die fakultätsinterne Betreuung dieser Dissertation zu übernehmen, wodurch diese erst möglich wurde.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Bertram Wiedenmann für die positive Unterstützung an seiner Klinik.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Bernd Schnabl sehr herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und die umfangreiche Unterstützung während des gesamten Zeitraumes meiner Promotion. Er hatte immer ein offenes Ohr für meine Fragen und stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite.

Herrn Prof. Dr. David A. Brenner möchte ich für die Realisierung der Arbeit an seiner Klinik danken.

Prof. Dr. Hide Tsukamoto, seinem Labor und im besonderen Kiki danke ich für die vorbildliche, immer pünktliche Bereitstellung der mit einer Magensonde voroperierten Mäuse.

Meinen Eltern widme ich diese Arbeit. Sie haben mich liebevoll unterstützt und mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht.

Ohne meine Schwester wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ihre Unterstützung in allen Belangen kann man nicht in Worte fassen.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Freundin Julia bedanken, die mein Leben so reich und glücklich macht.

9.4 Eidesstattliche Erklärung

Ich, Johannes Brandl, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Intestinale bakterielle Überwucherung und bakterielle Translokation bei alkoholinduzierter Lebererkrankung im Mausmodell“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 28.03.2011

(Johannes Brandl)