

Aus dem Institut für Veterinär-Biochemie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Die Rolle intestinaler microRNAs und ihrer Zielgene in der postnatalen Darmentwicklung von Ferkeln insbesondere während der Absetzphase und nach Pathogen- sowie Probiotika-Pathogen-Exposition

Inaugural Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Lena Hoeke
Tierärztin
aus Berlin

Berlin, 2013

Journal-Nr.:3643

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

microRNAs (MeSH), Microarray Analysis (MeSH), pigs, gene expression,
Salmonella, salmonellosis, neonatal development, cytoskeleton, ileum, colon

Tag der Promotion: 22.11.2013

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-415-5

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written
authorization of the publisher.

Coverbild vorne © Lonely - Fotolia.com

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für meine Familie
Dla mojej rodziny

Inhaltsverzeichnis

0. Abkürzungsverzeichnis	9
1. Einleitung	
Die Rolle von microRNAs während der postnatalen Darmentwicklung sowie im Zusammenspiel von Pathogen-Probiotika-Wirt-Interaktionen	11
1.1 microRNA	11
1.2 Postnatale Darmentwicklung	13
1.3 Selektin-P-Ligand (SELPLG)	14
1.4 Salmonellen	15
1.5 Caveoline	18
1.6 Zielsetzung der Arbeit	20
2. Material und Methoden	21
2.1. Reagenzien	21
2.2. Enzyme	22
2.3. Kits	22
2.4. Antikörper	23
2.5. Rezepte	23
2.6. Tierexperimente	24
2.7. Probenentnahme	25
2.8. Zellen	25
2.9. Bakterienstämme	26
2.10. Molekularbiologische Techniken	26
2.11. Gesamt-RNA Isolierung, Quantität und Integrität	26
2.11.1 Darmgewebe	26
2.11.2 Zellen	27
2.12. cDNA Synthese	28
2.13. Oligonucleotid-Microarray	28
2.14. Gradienten RT-qPCR mittels SYBR Green	29
2.15. Agarosegelelektrophorese	29
2.16. DNA Gelextraktion	30
2.17. Sequenzierung	30
2.18. RT-qPCR mittels SYBR Green	30
2.19. Mikrofluide microRNA Microarrays	31
2.20. miR-Q	34

2.21	miR-Q Array	35
2.22	Proteinisolierung, Quantifizierung	36
2.22.1	Darmgewebe	36
2.22.2	Zellen	36
2.22.3	Proteinquantifizierung mittels 2-D Quant Kit	37
2.23	Western Blot	37
2.23.1	Gelelektrophorese-SDS PAGE	37
2.23.2	Blotten und Proteindetektion	38
2.24	Immunhistochemie	39
2.25	Immunzytologie	40
2.26	<i>In-vitro</i> Salmonelleninvasionsstudien	40
2.27	Generierung eines CAV2 Expressionsplasmids	41
2.28	Transfektionen	41
2.28.1	Allgemeine Transfektionsbedingungen	41
2.28.2	miR-29a Transfektion	41
2.29	Reporterassays	42
2.29.1	Reporterplasmide	42
2.29.1.1	CAV2 Reporterplasmid	42
2.29.1.2	SELPLG Reporterplasmid	44
2.29.2	Transfektion	44
2.29.2.1	CAV2 Reporterassay	44
2.29.2.2	SELPLG Reporterassay	45
2.30	Proliferationsassay	46
2.31	G-LISA Cdc42 und Rac1 Aktivierungs-Assay	46
3.	Ergebnisse	47
3.1	Microarray Validierung	47
3.1.1	mRNA-Microarray	47
3.1.2	miRNA-Microarray	47
3.2	Postnatale Darmentwicklung im Ileum und Colon ascendens	48
3.2.1	mRNA-Microarrayanalyse	48
3.2.1.1	Entwicklungs- und Absetzeffekte bei CAL1L und GPX2	49
3.2.1.2	Entwicklungseffekte bei APOA1 und COL26A1	50
3.2.1.3	Entwicklungs- und Absetzeffekte bei Genen der adaptiven Immunantwort	51
3.2.2	miRNA-Microarrayanalyse	51

3.2.3	Integrative Analyse der generierten mRNA und miRNA Expressionsprofile	53
3.3.	Experimentelle Salmonelleninfektion-Colon ascendens	54
3.3.1.	mRNA-Microarrayanalyse.....	54
3.3.2.	miRNA-Microarrayanalyse	57
3.3.3.	Integrative Analyse der generierten mRNA und miRNA Expressionsprofile	58
3.3.4.	Veränderte Expression von Genen des KEGG Pathways „Cell adhesion molecules“	59
3.3.5.	SELPLG und MadCAM-1 Expression im Verlaufe einer Salmonelleninfektion	60
3.3.6.	SELPLG ist ein direktes Zielgen der miR-34a	62
3.3.7.	miR-34a Expression im Verlaufe einer Salmonelleninfektion im Colon ascendens	63
3.4.	Experimentelle Salmonelleninfektion-Ileum	64
3.4.1.	mRNA-Microarrayanalyse.....	64
3.4.2.	miRNA-Microarrayanalyse	67
3.4.3.	Integrative Analyse der generierten mRNA und miRNA Expressionsprofile	68
3.4.4.	CAV2 ist ein direktes Zielgen der miR-29a.....	69
3.4.5.	miR-29a und CAV2 Expression im Verlaufe der Salmonelleninfektion im Ileum ..	73
3.4.6.	miR-29a-CAV2 Interaktion in intestinalen Zellen	75
3.4.6.1	Proliferationshemmung	75
3.4.6.2	Salmonelleninvasion.....	76
3.4.6.3	Aktivierungszustand von CDC42 und Rac1	77
4.	Diskussion	79
4.1.	Postnatale Darmentwicklung	79
4.1.1.	Microarraystudien belegen kritische Phasen innerhalb der postnatalen Darmentwicklung	79
4.1.2.	miRNAs als Regulatoren der postnatalen Darmentwicklung	81
4.2.	Salmonelleninfektion	83
4.2.1	Darmabschnittsspezifische miRNA Expression während einer S. Typhimurium Infektion	83
4.2.2.	Eine Salmonelleninfektion führt zu einer veränderten SELPLG und miR-34a Expression im Colon ascendens	86
4.2.3	Eine Salmonelleninfektion führt zu einer miR-29a induzierten CAV2 Regulation im Ileum	90
5.	Zusammenfassung	94
6.	Summary	96
7.	Literaturverzeichnis	98

8.	Anhang	107
9.	Publikationsliste	117
9.1.	Publikationen	117
9.2.	Vorträge	117
9.3.	Posterbeiträge.....	117
10.	Danksagung	118
11.	Selbständigkeitserklärung	119

0. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	FAO	Food and Agriculture Organization
ACTB	Actin, beta	FBS	fetales bovines Serum
ACTG1	Actin, gamma 1	FLT1	fms-related tyrosine kinase 1
AG	Aktiengesellschaft	FOM	figure of merit
Arp2/3	Actin-related Protein 2/3	fw	forward
AP-1	Activator Protein 1	g	Gramm
APOA1	Apolipoprotein A1	GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
APS	Ammoniumpersulfat	GDF5	growth differentiation factor 5
AvrA	Type III effector protein AvrA	GDI	Guanin-Nukleotid-Dissoziations-Inhibitor
B2M	β2 Microglobulin	G-LISA	G-Protein linked enzyme assay
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung	GLuc	Gaussia Luciferase
Bp	Basenpaare	GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
BSA	bovines Serumalbumin	GPI	Glycosylphosphatidylinositol
CAL1L	Calpactin 1	GPX2	glutathione peroxidase 2
CASP7	Caspase 7	GR	glutathione reductase
CAV1-3	Caveolin 1-3	GSH	glutathione synthetase
CD8b	T lymphocyte surface glycoprotein beta chain	GST	glutathione S-transferase
CDC42	Cell division control protein 42	GTP	Guanosintriphosphat
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid	h	Stunde
CER1	cerberus 1 homolog	H₂O	Wasser
CFU	colony forming units	HBD	Hemoglobin, delta
C-Gruppe	Kontrollgruppe	HCL	Salzsäure
CLuc	Cypridinia Luciferase	HeLa	humane Zervixkarzinomzelllinie
cm	Zentimeter	HLA-F	major histocompatibility complex, class I, F
COL4A1	Collagen 4A1	HRP	Horseradish Peroxidase
CR	common reference	hsa	Homo sapiens
Cq	cycle threshold	HSP	heat shock protein
d	Tag	HT-29	Kolonkarzinomzelllinie
DE	Deutschland	IBD	inflammatory bowel disease
Da	Dalton	ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
DAB	3,3'-Diaminobenzidin	IFNγ	Interferon gamma
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery	Ig	Immunglobulin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient	IGF1	Insulin-like growth factor 1
HAM's F12	Mixture F-12	IL	Interleukin
DNA	deoxyribonucleic acid	IPEC-J2	porcine intestinale Epithelzelllinie
DNase	Desoxyribonuklease	ITGA	Integrin alpha
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate	ITGB	Integrin beta
ECL	enhanced chemiluminescence	KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
ECM	Extrazelluläre Matrix	KG	Kommanditgesellschaft
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	KMC	K-Means Clustering
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	LAGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
EFSA	European Food Safety Authority	LPS	Lipopolysaccharid
ELK1	member of ETS oncogene family	L-Selektin	Lymphozyten Selektin
ENAH	enabled homolog	m	Milli
Ets-1/2	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog ½	mA	Milliampere
EU	Europäische Union	MAcCAM-1	Mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1
FAK	focal adhesion kinase		

MAGIA	MiRNA and Genes Integrated Analysis	RNApol	RNA Polymerase
MAMPs	microorganism associated molecular patterns	RNase	Ribonuklease
MAPK	mitogen-activated protein	RNU6	U6 small nuclear RNA
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1	rpm	revolutions per minute
MeV	Multi experiment viewer	rRNA	ribosomale RNA
MgCL2	Magnesiumchlorid	RT	Reverse Transkriptase
MHCII	major histocompatibility complex, class II	RT-qPCR	quantitative RT-PCR
MHCI	major histocompatibility complex, class I	RUNX1T1	runt-related transcription factor 1; translocated to, 1
min	Minute	SD	Standard Deviation
miRNA	microRNA	SDS	Sodiumdodecylsulfat
mJ	Millijoule	sec	Sekunden
ml	Milliliter	SELE	Selektin E
mM	Millimolar	SELL	Selektin L
mm	Millimeter	SELP	Selektin P
MOI	Multiplicity of infection	SELPLG	Selectin P-ligand
mol	mol	S-Gruppe	Salmonellengruppe
mRNA	messenger RNA	siRNA	Small interfering RNA
MSC	multiple cloning site	SNORD47	small nucleolar RNA, C/D box 47
MYLK	myosin light chain kinase	SOD	superoxide dismutase 1
M Zellen	microfold Zellen	Sop	Type III effector protein
n	Nano	SP-Gruppe	Salmonellen /Probiotikum- Gruppe
Naf	Nef Aktivierungsfaktor	SptP	Type III effector protein SptP
NFkB	Nuclear Factor kappaB	SSC	Saline Sodium Citrate
NKD1	naked cuticle 1 homolog	ssc	Sus scrofa
NO	Stickoxid	SspH1	Type III effector protein SspH1
nt	Nukleotide	<i>S.</i>	<i>Salmonella enterica subspezies enterica</i>
OD	optische Dichte	Typhimurium	serovar Typhimurium
Oligos	Oligonucleotide	Syk	Spleen-Tyrosinkinase
p	Piko	Tab.	Tabelle
PAK4	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 4	TAE	Tris-Acetat-EDTA
P-bodies	processing bodies	TBST	Tris-Buffered Saline
PBS	phosphate buffered saline	Tcf3	transcription factor 3
PCR	polymerase chain reaction	TCR	T-cell receptor beta chain C region
PDGF-BB	platelet-derived growth factor beta polypeptide	TEMED	Tetramethylethylenediamine
p.i.	<i>post infectionem</i>	TGF	Transforming Growth Factor
PMN	polymorphkernigen Neutrophilen	TNFa	Tumor Necrosis Factor-alpha
p.n.	<i>Post natum</i>	U	units
pre-miRNA	precursor miRNA	UBC	Ubiquitin C
pri-miRNA	primary miRNA	UC	Ulcerative Colitis
PRRs	Pattern-Recognition Receptors	UTR	Untranslatierte Region
PTK2B1	protein tyrosine kinase 2 beta	UV	Ultraviolett
PVDF	Polyvinylidenfluorid	V	Volt
Rac1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1	VAV2	guanine nucleotide exchange factor
RALBP1	ralA binding protein 1	VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
rev	reverse	VLA-4	Very Late Antigen-4
Rho	ras homolog family member	W	Watt
RIN	RNA Integritätsnummer	WAP-1	Elafin
RISC	RNA induced silencing complex	WHO	World Health Organization
RNA	ribonucleic acid	µ	Mikro
RNAi	RNA interference		

1. Einleitung

Die Rolle von microRNAs während der postnatalen Darmentwicklung sowie im Zusammenspiel von Pathogen-Probiotika-Wirt-Interaktionen

1.1 microRNA

Die Regulierung der Genexpression beeinflusst in eukaryotischen Organismen vor allem die zelluläre Entwicklung und das Wachstum. Es gibt viele bekannte Mechanismen der Genregulation auf transkriptioneller, post-transkriptioneller und post-translationeller Ebene. Ein sehr bedeutender Mechanismus auf post-transkriptioneller Ebene ist erst in den letzten Jahren entdeckt worden. Im Jahre 1993 ist es Lee *et al.* gelungen das Gen *lin-4* zu klonieren, welches für zwei kleine Ribonukleinsäure (RNA) Moleküle kodiert, mit Komplementarität zu *lin-14*. Im Jahre 2000 wurde ein weiteres kleines RNA Molekül beschrieben, die phylogenetisch konservierte *let-7* microRNA (miRNA) (Pasquinelli *et al.* 2000). Im Laufe der folgenden Jahre konnten viele weitere solcher kleinen RNA Moleküle, sog. miRNAs identifiziert werden. MiRNA's sind 20-25 Nukleotid (nt) lange einzelsträngige, zumeist hoch konservierte RNA Moleküle, die in allen bisher untersuchten Metazoen nachgewiesen werden konnten. Ihre Rolle während der post-transkriptionellen Regulierung beruht auf der Bindung der Nukleotide 2-7 der 5' Region (sog. seed Sequenz), an die 3' untranslatierte Region (UTR) einer messenger RNA (mRNA), ihr sog. Zielgen sowie der daraus folgenden Repression der Proteinbiosynthese durch mRNA Degradation oder Hemmung der Translation (Mishra *et al.* 2009).

In Abb. 1 ist die Biosynthese von miRNAs schematisch dargestellt. Die Transkription der miRNA wie auch aller mRNAs findet im Zellkern mittels der RNA Polymerase II statt. Initial entsteht dabei eine primäre miRNA (Abb. 1-1) (Lee *et al.* 2004), diese pri-miRNA ist gekennzeichnet durch eine lange Haarnadelstruktur. Mittels der RNase III Endonuklease Drosha und dem Doppelstrang RNA Bindungsprotein findet die Prozessierung statt, wodurch eine precursor miRNA entsteht (Lee *et al.* 2003). Diese pre-miRNA weist eine nur noch 60-70 nt lange Haarnadelstruktur auf (Abb. 1-2). Durch den Exportin-5-Komplex wird die pre-miRNA in das Cytoplasma transportiert (Abb. 1-3) (Yi *et al.* 2003). Eine weitere RNase III Endonuklease (Dicer) prozessiert daraufhin die pre-miRNA zum miRNA Duplex (Abb. 1-4) (Ketting *et al.* 2001). Ein Strang des Duplex, die sog. mature oder reife miRNA, wird nach Entwinden der Doppelhelix in den Multiprotein RNA induzierten Silencing Komplex (RISC) geladen (Abb. 1-5) (Hutvagner *et al.* 2005). Mittels des RISC Komplex ist die miRNA in der Lage, ihr Zielgen zu binden. In Pflanzen kommt in der Regel eine perfekte komplementäre Bindung zwischen der miRNA und ihrem Zielgen zustande, welches zur vollständigen Degradation der mRNA führt (Abb. 1-6a). Das Zielgen wird dabei, vermittelt durch Agronomen Proteine des RISC Komplex, zwischen den Nukleotiden 10-11 der miRNA gespalten (Huntzinger *et al.* 2011). In den meisten Säugetieren tritt dem hingegen eine unvollständige Komplementarität auf, was über einen noch unbekanntenen Mechanismus zu einer Hemmung der Translation führt (Abb. 1-6b), sowie zur Speicherung oder Abbau des miRNA gebundenen Zielgens in cytoplasmatischen P-bodies (Saxena *et al.* 2003). Jedoch weist eine Studie auch bei Tieren auf eine direkte durch miRNA hervorgerufene Degradation der mRNA hin. MiR-124 transfizierte humane Zellen weisen in Microarrayanalysen eine Herabregulierung von über 100 mRNA Zielgenen auf (Lim *et al.* 2005).

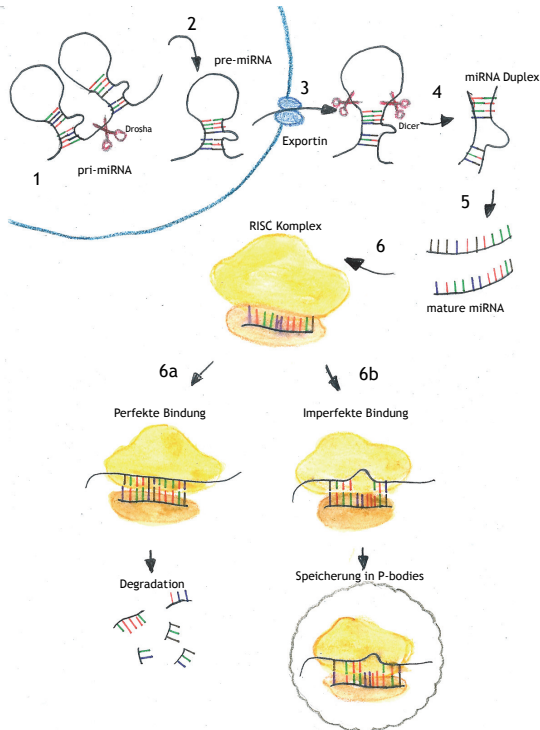


Abb. 1: miRNA Biosynthese: Übersicht über die Biosynthese der miRNAs sowie die post-transkriptionelle Regulierung ihrer Zielgene; pri-miRNA (primäre miRNA); pre-miRNA (Vorläufer miRNA), RISC (Multiprotein RNA induzierten Silencing Komplex)

In der Datenbank miRBase 19 (August 2012) sind derzeit 25141 reife miRNA Sequenzen hinterlegt. Die größte Anzahl bereits bekannter miRNAs findet sich im humanen Genom (2042 reife miRNA). Lewis *et al.* (2005) gehen davon aus, dass bis zu 30 % der proteinkodierenden Gene konservierte miRNA Zielgene darstellen. Die biologische Funktion der meisten miRNAs ist jedoch unbekannt. Zwar gibt es auf Sequenzanalysen basierende, computergestützte Vorhersagemöglichkeiten für theoretische miRNA-Zielgen-Interaktionen wie TargetScan (Lewis *et al.* 2005) oder RNAhybrid (Rehmsmeier *et al.* 2004), doch muss die funktionale Bestätigung dieser Interaktionen im *in vivo* bzw. *in vitro* System erfolgen.

Die Rolle der miRNAs ist im Zusammenhang mit vielen wichtigen zellulären Prozessen beschrieben. Die Beteiligung bei Zelldifferenzierung, Organentwicklung und Homeostase ist schon seit langem bekannt. In multizellulären Organismen scheinen miRNAs die Differenzierung und Aufrechterhaltung von Zell- und Gewebetypen zu regulieren (Wienholds *et al.* 2005). Dies legt die Vermutung nahe, dass miRNAs ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der postnatalen Darmentwicklung spielen, während dessen es zu komplexen Vorgängen kommt, die unter anderem durch Regulation der Genexpression kontrolliert werden.

1.2 Postnatale Darmentwicklung

Die postnatale Darmentwicklung stellt einen komplexen Prozess dar, während dessen essentielle morphologische und funktionelle Veränderungen der Darmmukosa stattfinden. Dieser Zeitraum, insbesondere direkt nach der Geburt sowie dem Absetzen vom Muttertier, stellt eine besonders belastende Phase für die Jungtiere dar. In dieser Zeit werden die Tiere großen Mengen neuer Nahrungs- und mikrobieller-Antigene ausgesetzt. Eine hohe Infektanfälligkeit sowie verringerte Lebendgewichtszunahme sind die Folge und vor allem bei Ferkeln zu beobachten. Das in der Europäischen Union (EU) verbreitete frühe Absetzen der Ferkel unterstützt diesen Effekt zusätzlich. Zu diesem Zeitpunkt ist die Entwicklung der Darmmukosa sowie des Darmimmunsystems nicht ausreichend abgeschlossen. Studien zeigen beispielsweise, dass Ferkel nach dem Absetzen eine signifikant erhöhte Kryptentiefe und Komplexität der Villusmorphologie, einhergehend mit einer dramatischen Verringerung der Villushöhe, aufweisen (Hampson 1986). Des Weiteren ist die Aktivität vieler, im Bürstensaum der Darmmukosa enthaltenden, Verdauungsenzyme beeinträchtigt (Lallés *et al.* 2007). Kurz nach der Geburt sind Ferkel nur in der Lage eine limitierte T- und B-Zell Antwort zu generieren (Butler *et al.* 2000). Linberg und Ogle (2001) beschreiben zudem einen direkten Zusammenhang zwischen dem frühen Absetzen und einer verminderten Reaktionsfähigkeit von intraepithelialen Lymphozyten auf Mitogene sowie eine Reduktion der IL-2 Sekretion von Milz-T-Lymphozyten.

Die mikrobielle Besiedlung des Darms beginnt kurz nach der Geburt mit rapidem Fortschreiten während der postnatalen Entwicklung und der Absetzphase. In dieser kurzen Phase muss sich die intestinale Mikrobiota von einer einfachen instabilen hin zu einer komplexen stabilen Gemeinschaft entwickeln (Lallés *et al.* 2007).

Im Schwein gibt es bis jetzt keine Studie, die sich mit der miRNA Expression im Verlauf der postnatalen Darmentwicklung beschäftigt. Hinweise auf die Beteiligung von miRNAs während dieser kritischen Phase liefert jedoch eine Studie von Monzo *et al.* (2008). Hier wird ein übereinstimmendes miRNA Profil zwischen humanem embryonalem Colon und colorektalem Krebs mit Regulation der Zellproliferation beschrieben. Die Autoren schlussfolgern daraus, dass den miRNAs nicht nur bei der Entartung des Colonepithels eine entscheidende Rolle zukommt, sondern auch während der embryonalen Darmentwicklung. Einen weiteren Hinweis liefert eine Studie von Park *et al.* (2011), in der glatte Muskelfasern des Gastrointestinaltraktes mit gestörter miRNA Biogenese in einem Mausmodell eine verstärkte Zerstörung und Dilatation aufweisen, einhergehend mit verminderter Kontraktilität. Sharbati *et al.* (2010) beschreiben die Expression von 332 miRNAs im porcinen Darm. Dies gibt Anlass zu der Vermutung, dass miRNAs auch im porcinen Gastrointestinaltrakt eine große Bedeutung bei der Regulierung vielfältiger Darmfunktionen zukommt. Da auch die Phase des Absetzens vom Muttertier mit deutlichen morphologischen Veränderungen der Darmmukosa sowie einem veränderten immunologischen Status einhergeht (Hampson *et al.* 1986, Bailey *et al.* 2005) sind miRNAs auch hier als potentielle Regulatoren anzusehen. Die Rolle von miRNAs während der adaptiven sowie angeborenen Immunantwort ist erst in den letzten Jahren näher charakterisiert worden. Beispielsweise ist hier bekannt, dass miR-223 für die Funktion von Neutrophilen von enormer Bedeutung ist. MiR-223 defiziente Mäuse weisen erhöhte inflammatorische Lungenläsionen nach Endotoxinbelastung aufgrund einer Hyperfunktionalität der Neutrophilen auf (Johnnidis *et al.* 2008). Des Weiteren ist für die miR-

29a beschrieben, dass sie die IFN γ -Produktion direkt durch Degradation der IFN γ -mRNA hemmt (Ma *et al.* 2012). Viele miRNAs, wie beispielsweise miR-155 und miR-146a, regulieren die akute Immunantwort nach Erkennung der Pathogene durch Toll-Like Rezeptoren (Quinn & Neill 2011). In einer Studie von Guenin-Mace *et al.* (2011) wird beschrieben, dass Mycolacton, ein Macrolid produziert von *Mycobacterium ulcerans*, die Expression von L-Selektin auf primären humanen T-Zellen supprimiert sowie zu einer verringerten Expression von *let-7b* führt. Eine Inhibierung von *let-7b* geht mit einer Inhibierung von L-Selektin einher, eine Überexpression von *let-7b* mit einer Heraufregulierung von L-Selektin. Eine Sequenzkomplementarität zwischen *let-7b* und L-Selektin konnte nicht nachgewiesen werden. Guenin-Mace *et al.* (2011) gehen deshalb von einer *let-7b* abhängigen Aktivierung einer Kaskade aus, die in ihrem Verlaufe die L-Selektin Expression moduliert. Den am besten charakterisierten Selektin-Liganden stellt der Selektin-P-Ligand (SELPLG) dar. Dies gibt Anlass zu der Vermutung, dass auch SELPLG unter der Kontrolle von miRNAs stehen könnte und dahingehende Untersuchungen sinnvoll erscheinen. Bis heute ist jedoch keine Studie über eine post-transkriptionelle Regulierung von SELPLG durch miRNAs bekannt.

1.3 Selektin-P-Ligand (SELPLG)

SELPLG interagiert mit allen bisher bekannten Selektinen, dem Lymphozyten (L)-, Endotheliale (E)- sowie mit der höchsten Affinität mit Thrombozyten (P)-Selektin. Für die Bindung an Selektine ist eine Sulfatierung von mindestens einem Tyrosinrest in der Nähe des N-Terminus von SELPLG nötig (Moore 2003). SELPLG ist vorwiegend auf allen Myeloid- und Lymphatischen Zellen exprimiert, eingeschlossen den Dendritischen Zellen. Nach Eintritt in sekundär lymphatische Organe findet eine Herabregulierung des Selektin-P-Liganden statt (Laszik *et al.* 1996). Auch in nicht hämatopoetischen Zellen konnte eine Expression von SELPLG nachgewiesen werden. In einem Mausmodell mit chronischer Ileitis wurde SELPLG beispielsweise auf Endothelzellen des Dünndarms und Mesenteriallymphknoten identifiziert (Rivera-Nieves *et al.* 2006). Exprimiert wird SELPLG als disulfid-verlinkter Homodimer mit zwei 120 kDa Untereinheiten (Moore *et al.* 1992).

SELPLG spielt eine herausragende Rolle in der Leukozyten-Adhäsionskaskade. Nach dem „Einfangen“ von Leukozyten an Endothelzellen, vermittelt durch eine Bindung von SELPLG an Selektine, kommt es zu einem „Rollen“ der Leukozyten über die Endothelzelloberfläche. Dies ermöglicht einen engen Kontakt zur Zelloberfläche und somit eine Interaktion von Chemokinen, die am Endothel gebunden sind, mit Chemokinrezeptoren der Leukozyten. Die Bindung zu Chemokinen und Selektinen führt daraufhin zu einer Aktivierung der von Leukozyten exprimierten Integrinen (Alon & Ley 2008), die daraufhin mit Zelladhäsionsmolekülen wechselwirken. Das Integrin $\alpha_4\beta_7$ interagiert mit dem mukosalen vaskulären Adhäsionsmolekül (MAdCAM-1), das Lymphozyten-Funktionsassoziierte Antigen-1 (LFA-1) mit dem interzellulären Adhäsionsmolekül (ICAM-1) und das $\alpha_4\beta_1$ Integrin (VLA-4) mit dem vaskulären Zelladhäsionsmolekül (VCAM-1), was zu einer Verminderung des „Rollen“, sowie einer festen Bindung am Endothel führt (Ley *et al.* 2007). Gefolgt wird dies durch ein parazelluläres oder transzelluläres Übertreten ins Gewebe am Ort der Entzündung. Eine weitere Funktion von SELPLG neben der Anheftung von Leukozyten an Endothelzellen stellt die Aktivierung von Signalkaskaden dar. Beispielsweise führt eine Selektin-P Bindung

an SELPLG zu einer Aktivierung der p85-Phosphatidylinositol-3-kinase abhängigen Phosphorylierung des Nef Aktivierungsfaktors (naf) (Wang *et al.* 2007). Lipid raft gebundenes SELPLG induziert Tyrosin Phosphorylierung von Ezrin und Moesin sowie Rekrutierung und Aktivierung der Milz-Tyrosinkinase (Syk). Naf und Syk Aktivierung führt wiederum zu einer partiellen Aktivierung von LFA-1 und VLA-4 Integrinen (Atarashi *et al.* 2005, Ma *et al.* 2004).

2009 wurde von Kum *et al.* in SELPLG defizienten Mäusen eine verstärkte *Salmonella* Typhimurium Infektion nachgewiesen. Die SELPLG defizienten Mäuse wiesen dabei eine erhöhte Morbidität sowie Mortalität verbunden mit einer höheren Bakterienlast und Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF α , MCP-1 und IL-6 auf. Des Weiteren wurde eine höhere Neutrophileninfiltration im Caecum beobachtet, sowie eine erhöhte $\alpha_4\beta_7$ -Integrin- und MAdCAM-1-Expression. Folgend wurde postuliert, dass die erhöhte MAdCAM-1 Expression zu der überschießenden Neutrophilen-Rekrutierung bei gleichzeitigem Fehlen von SELPLG führt und damit die Salmonelleninfektion triggert. Diese Studie deutet darauf hin, dass SELPLG eine bedeutende Rolle bei der Wirtsantwort gegenüber Salmonellen zukommt. Dies muss jedoch noch weitergehend untersucht werden.

1.4 Salmonellen

Salmonellen sind gram-negative Stäbchenbakterien, die zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehören. *Salmonella enterica subspecies enterica* serovar Typhimurium (S. Typhimurium) gehört zu den Serovaren der *Salmonella enterica*. Wie alle Vertreter der Subspezies enterica besitzt es das O-Antigen. S. Typhimurium ist ein zoonotischer Erreger und stellt eine Hauptursache für Lebensmittelvergiftungen beim Menschen dar (WHO Fact sheet No. [139] 2013). Die Hauptansteckungsquelle liegt bei Produkten aus der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung. Insbesondere ist hier die Kontaminierung von Schweinefleisch zu nennen. Neuere Studien geben den Anteil an lebensmittelbedingten Salmonellosen aufgrund des Verzehrs von Schweinefleisch auf 20 % an (Meyer *et al.* 2004). Die Prävalenz von *Salmonella* in Schweinezuchtbetrieben in der EU im Jahr 2008 lag laut Angaben der European Food Safety Authority (EFSA) bei 31,8 % (EFSA 2009). Der Erreger persistiert häufig jahrelang in den Schweinebetrieben, ohne dass die Tiere selbst erkranken. Erst mit Eintritt in die Lebensmittelkette stellt es eine Gefahr für die menschliche Gesundheit dar. In den letzten Jahren werden deshalb große Anstrengungen unternommen, die Prävalenz der Salmonellen in den Schweinebetrieben zu senken.

Seit dem EU-weiten Verbot von Fütterungsantibiotika im Jahr 2006 (Soulsby 2008) sowie der stetig wachsenden Resistenz von Bakterien gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika (Soulsby 2008) werden dringend Alternativen gesucht, die Salmonellose in Schweinebetrieben erfolgreich zu bekämpfen. Als viel versprechende Möglichkeit wird hierfür die Anwendung von Probiotika gesehen (Stein & Kil 2006). Probiotika, abgeleitet aus dem Griechischen *pro bios* = „für das Leben“, sind lebende Mikroorganismen, die, wenn sie in ausreichender Menge verabreicht werden, dem Wirtsorganismus einen gesundheitlichen Nutzen bringen (Expertenkommission zur Anwendung von Milchsäurebakterien der Food and Agriculture Organisation (FAO) und der WHO, 2001). Schon seit längerer Zeit werden Aufzuchtferkeln Bakterien, wie *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) als probiotischer Futterzusatzstoff verabreicht, um die Durchfallhäufigkeit, Lebendmassezunahme und

Futteraufnahme positiv zu beeinflussen (Taras *et al.* 2006). Der als Hauptmechanismus angesehene Weg, über den Probiotika ihre Wirkung entfalten, ist die positive Beeinflussung der mikrobiotischen Homeostase. Erreicht wird dies unter anderem durch eine Beeinflussung von Anzahl und Viabilität von Pathogenen durch Produktion inhibitorischer Substanzen (Corr *et al.* 2009). Zum anderen können Probiotika eine kompetitive Hemmung der bakteriellen Adhäsion hervorrufen sowie Nahrungskonkurrenten darstellen (Szabó *et al.* 2009). Nach Gabe des Probiotikastammes *E. faecium* wurde eine Zunahme der Propion- und Milchsäure beschrieben, die eine wirksame Barriere gegenüber der Adhärenz von Pathogenen an die Darmmukosa darstellen (Stropčová *et al.* 2006). Ein weiterer Mechanismus besteht in der Stimulation der Immunantwort durch Interaktion von Mikroorganismen assoziierten molekularen Mustern (MAMPs) der Probiotika mit Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) des Wirtes (Rolfe *et al.* 2000). Die diesen Prinzipien zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind noch nicht ausreichend beschrieben. Besonders über die molekularen Mechanismen während einer Infektion mit spezifischen Pathogenen wie *Salmonella* ist wenig bekannt. Ein positiver Effekt von Probiotika während einer Infektion mit *S. Typhimurium* in Absetzferkeln ist bereits beschrieben. Die Gabe einer Probiotikamixtur aus fünf verschiedenen Stämmen (*Laktobazillen* und *Pediokokken*) führt hier zu einer deutlich verringerten Schwere, Inzidenz sowie Dauer einer Salmonellen induzierten Diarrhoe (Casey *et al.* 2007). In einigen Studien wurde der positive Effekt des Probiotikums *E. faecium* während einer *Salmonella enteritidis*-, *Campylobacter jejuni*- sowie Chlamydieninfektion in verschiedenen Wirten beschrieben (Theppangna *et al.* 2006, Rinkinen *et al.* 2003, Pollmann *et al.* 2005). *In vitro* Studien zeigen eine verringerte Invasion von *S. Typhimurium* in die porcine intestinale Epithelzelllinie IPEC-J2 nach Gabe von *E. faecium* (Szabó *et al.* 2009). In einer Studie von Szabó *et al.* (2009) ist ein verstärkter Infektionsverlauf nach Gabe von *E. faecium* an *S. Typhimurium* infizierte Ferkeln mit gleichzeitig verstärkter Produktion von Salmonellen-spezifischen Antikörpern beobachtet worden. Die Studien deuten auf einen stark Pathogen- und Wirts-abhängigen Effekt von *E. faecium* hin. Hier müssen genauere molekulare Wirkmechanismen noch beschrieben werden, um ein besseres Verständnis der Interaktion zwischen Wirt-Pathogen und Probiotikum zu erhalten.

Eine weitere Methode der erfolgreichen Bekämpfung von Pathogenen stellt die genauere Erforschung des Pathogens und seiner Interaktion mit dem Wirt dar, um daraus folgend therapeutische Ansätze entwickeln zu können. Zu diesen Interaktionen gehört zum Beispiel auch die genauere Charakterisierung der veränderten miRNA Expression während einer Pathogeninfektion und die daraus resultierende veränderte Kontrolle der Genregulation. Die Beteiligung von miRNAs an einer spezifischen Wirtsantwort auf bakterielle Pathogene ist erst in neuesten Studien beschrieben worden. Dabei ist eine Charakterisierung des Einflusses auf die Pathogenese von Salmonellen nur in wenigen Studien erfolgt. Schulte *et al.* (2011) beschreiben eine signifikant verringerte Expression der let-7 Familie nach Salmonelleninfektion in murinen Makrophagen und HeLa Zellen, was wiederum zu einem verstärkten mRNA Level von IL6 und IL10 durch Wegfall der negativen post-transkriptionellen Regulierung führt. In murinen Makrophagen findet zusätzlich eine verstärkte Expression von den NF- κ B assoziierten miRNAs mir-21, miR-146a/b und miR-155 statt. Eine verstärkte Expression von miR-146a/b sowie eine verringerte Expression von miR-23b ist im Verlaufe einer Salmonelleninfektion in humanen Monozyten von Sharbati *et*

al. (2012) beschrieben, des Weiteren wurde hier eine verstärkte Expression von miR-155, miR-21, miR-23b, miR-24, miR-27a und miR-29a im Laufe einer Monozytenaktivierung nachgewiesen.

Die Pathogenitätsstrategie der Salmonellen beruht auf der Penetration von nicht-phagozytierenden Enterozyten durch induzierte Endozytose (Hardt *et al.* 1998). In Abb. 2 ist die Interaktion von Salmonellen mit Enterozyten dargestellt.

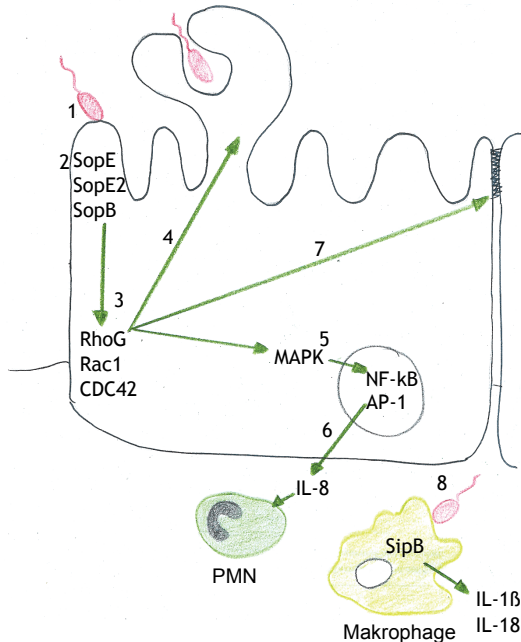


Abb. 2: Salmonelleninteraktion mit Enterozyten: Darstellung der Internalisierung von Salmonellen mittels Makropinozytose und beteiligte zelluläre Pathways, provoziert durch Effektorproteine des Typ III Sekretionsapparates der Salmonellen nach Haraga *et al.* 2008

Die Adhäsion der Salmonellen an Enterozyten geschieht durch Kontaktaufnahme mit Fimbrien an der apikalen Seite (Abb. 2-1). Salmonellen sind daraufhin in der Lage mittels ihres Typ III Sekretionsapparates Effektorproteine in das Cytoplasma zu schleusen (Abb. 2-2) (Hansen-Wester & Hensel 2001). Die Effektorproteine SopE, SopE2, SopB aktivieren RhoGTPasen (CDC42, Rac1 und RhoG) (Abb. 2-3), woraus eine Rekrutierung des Aktin-related Protein 2/3 (Arp2/3) und damit verbundener Umbau des Aktin-Zytoskeletts resultiert. Als Folge werden sog. Membranruffles gebildet, die das Bakterium mittels Makropinozytose internalisieren (Abb. 2-4) (Hardt *et al.* 1998). Weitere Effekte sind die Aktivierung des MAPK Signalwegs mit resultierender Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Activator Protein 1 (AP-1) und nuclear factor-κB (NF-κB) (Abb. 2-5), was zu einer erhöhten Produktion von pro-

inflammatorischen Zytokinen wie IL-8 mit Stimulierung von polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) führt (Abb. 2-6) (Hobbie *et al.* 1997). Die aktivierten RhoGTPasen führen des Weiteren zur Zerstörung von Tight Junction Proteinen (Abb. 2-7), dies ermöglicht den PMNs ins Darmlumen zu migrieren, den Salmonellen Kontakt zur basolateralen Seite aufzunehmen und erhöht den parazellulären Flüssigkeitsstrom. SopB erhöht die Chlorid Sekretion von Enterozyten. Direkte Interaktion der Salmonellen mit Makrophagen führt über das Effektorprotein SipB zu einer vermehrten Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine wie IL-1 β und IL-18 (Abb. 2-8). Kurze Zeit nach Invasion der Bakterien liegt das Aktinnetzwerk wieder in der normalen Architektur vor. Hierfür scheint das Effektorprotein SptP verantwortlich zu sein, welches die RhoGTPasen, sowie den MAPK Signalweg inaktiviert (Fu *et al.* 1999). Die Effektorproteine AvrA und SspH1 führen dabei zu einer Inhibierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Haraga *et al.* 2003).

Neben den Virulenzfaktoren der Salmonellen scheinen Wirtseinflüsse wie Cholesterol und Lipid rafts eine entscheidende Rolle bei der Aufnahme von Salmonellen zu spielen. Hayward (2005) zeigt, dass eine Interaktion zwischen Cholesterol und dem Typ III Sekretionsapparat essentiell ist für die Bindung an Wirtszellmembranen und der Einschleusung von Virulenzfaktoren in das Cytoplasma. Lim *et al.* (2009) beschreiben eine Caveolin 1 (CAV1) abhängige Salmonelleninvasion in humane M-Zellen.

1.5 Caveoline

Caveoline sind integrale Proteine, die zusammen mit Cholesterol, Glycosphingolipiden und GPI verankerten Proteinen spezialisierte Lipid raft Domänen, die sog. Caveolae bilden. Es sind drei Caveolinproteine beschrieben, CAV1, 2 und 3. CAV1 und 2 werden gemeinsam als hetero-oligomer in der Plasmamembran vieler Zelltypen exprimiert (Smart *et al.* 1999), wobei die CAV2 Expression CAV1 abhängig zu sein scheint. CAV1 fungiert hierbei als Chaperon für CAV2 und transportiert dieses zur Zelloberfläche. In Abwesenheit von CAV1 wird CAV2 im Golgi Apparat abgebaut (Parolini *et al.* 1999). Die CAV3 Expression ist bis heute nur in Muskelgewebe nachgewiesen (Tang *et al.* 1996). Caveolinproteine sind vorwiegend in der Zellmembran zu finden, aber auch im Cytosol und in Vesikeln. Die vielfältigen Funktionen von Caveolinproteinen reichen von der Lipid raft vermittelten Endocytose über die Beeinflussung der Wirtsimmunität gegenüber Pathogenen bis hin zur Regulation von vielen Signalkaskaden durch Interaktionen mit Signalproteinen wie beispielsweise G-Proteinen, Integrinen oder Proteinkinase C (Goetz *et al.* 2009, Nethe *et al.* 2011). CAV1 ist in Blasenepithelkarzinomzellen in direkter Co-Lokalisation mit der GTPase RhoA, jedoch nicht mit CDC42 nachgewiesen, was auf einen direkten Zusammenhang der Signaltransduktion von CAV1 und GTPasen hindeutet (Gingras *et al.* 1998).

Bei der Aufnahme von Viren, Parasiten und Bakterien ist ebenfalls die Beteiligung von Caveolinproteinen beschrieben, die genaue Rolle von CAV2 bei der Endocytose ist bis jetzt jedoch noch unbekannt. *E. coli* ist beispielsweise in der Lage, über Lipid raft vermittelte Endocytose in Blasenepithelzellen einzudringen, eine verringerte CAV1 Expression führt dabei zu einer verminderten Aufnahme (Duncan *et al.* 2004). Eine *Pseudomonas aeruginosa* Invasion in alveoläre Epithelzellen ist deutlich verringert nach verminderter CAV1 sowie CAV2 Expression. Des Weiteren scheint die Aufnahme vom Phosphorylierungszustand von CAV2 beeinflusst zu sein (Zaas *et al.* 2005). Die Rolle von CAV1 bei der Invasion von S.

Typhimurium in M-Zellen ist 2009 von Lim *et al.* beschrieben worden. Hier führt eine durch siRNA vermittelte Herabregulierung von CAV1 zu einer signifikant verringerten Invasion von *S. Typhimurium* in M-Zellen. In nicht phagozytierende Zellen erfolgt eine erhöhte Invasion von *S. Typhimurium* nach Überexpression von CAV1. Dies setzen die Autoren in Bezug zu einer erhöhten Infektanfälligkeit älterer Mäuse, bei denen eine erhöhte CAV1 Expression in Peyerschen Platten sowie der Milz nachgewiesen werden konnte (Lim *et al.* 2010). Interessanterweise ist ebenfalls beschrieben, dass die Aufnahme von Bakterien geblockt werden kann durch eine Interaktion von phosphoryliertem CAV1 mit dem Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor VAV2 und damit einhergehender Aktivierung ihres Substrates der GTPase RhoA (Boettcher *et al.* 2010). Die Rolle von Caveolinen und der Wirt-Pathogeninteraktion scheint somit Pathogen-abhängig zu sein und muss dahingehend noch weiter untersucht werden.

Caveoline spielen neben der Aufnahme von Pathogenen auch eine bedeutende Rolle während der Wirtsimmunantwort. CAV1 agiert beispielsweise als inhibierender Regulator der endothelialen Stickoxidsynthetase und reguliert damit inflammatorische Signalkaskaden. CAV1 defiziente Mäuse zeigen sich bei einem Sepsisgeschehen resistent gegenüber einer Lungeninfektion und weisen eine signifikant verringerte Mortalität auf (Garrean *et al.* 2006). In Mausmodellen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass CAV1 defiziente Mäuse eine verstärkte Belastung von *S. Typhimurium* in der Milz und anderen Geweben besitzen, eine verstärkte Produktion von inflammatorischen Zytokinen im Vergleich zum Wildtyp aufweisen und damit einhergehend eine erhöhte Mortalitätsrate. Eine verringerte Aufnahme von *S. Typhimurium* konnte in dieser Studie nicht beobachtet werden (Medina *et al.* 2006).

Kürzlich veröffentlichte Studien beschreiben eine post-transkriptionelle Regulierung von CAV1 und CAV2 durch miRNAs, beispielsweise durch miR-199a-3p oder miR-203 (Shatseva *et al.* 2011, Ørom *et al.* 2012). Shatseva *et al.* 2011 beschreiben dabei eine erhöhte Proliferationsrate von Virus immortalisierten Rattenendothelzellen sowie Gehirntumorzellen, verursacht durch eine miR-199a-3p vermittelte Herabregulierung von CAV2. Eine verstärkte Migrationsfähigkeit konnte in den Gehirntumorzellen nachgewiesen werden jedoch nicht in Rattenendothelzellen. Die Überexpression von CAV2 führt hingegen zu einer verringerten Proliferationsrate. Gleichzeitig wurde eine Überexpression von CDC42 beschrieben und die Vermutung aufgestellt, dass die Regulation der Proliferation und Migration zurückzuführen ist auf eine direkte Verbindung zwischen miR-199a-3p, CAV2 und CDC42. Ein direkter Zusammenhang zwischen CAV1 und CDC42 ist bereits in Pankreaszellen nachgewiesen worden, bei denen CAV1 als CDC42 Guanin-Nukleotid-Dissoziations-Inhibitor (GDI) wirkt (Nevins *et al.* 2006). Die Autoren identifizierten eine 10 AS lange Sequenz (FTVTKYWFYR; AS 92-101) mit hoher Übereinstimmung zu anderen Säugetier GDI's mit bekannter Interaktion zu CDC42.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle intestinaler miRNAs und der durch sie regulierten Gene bei der postnatalen Darmentwicklung während einer experimentellen Salmonelleninfektion sowie bei gleichzeitiger Applikation des Probiotikums *E. faecium* in Ferkeln zu charakterisieren.

Im ersten Schritt erfolgte eine entwicklungsspezifische Expressionsanalyse, die zum besseren Verständnis der postnatalen Darmentwicklung bei Ferkeln, insbesondere während der Absetzphase, beiträgt. Anhand einer korrelativen Analyse von mRNA und miRNA Expressionsprofilen wurden potentielle Regulatoren der postnatalen Darmentwicklung und ihre spezifischen Signalwege identifiziert. Dies bietet die Möglichkeit, generelle Regulatoren zellulärer Vorgänge im Darmgewebe studieren zu können.

Im zweiten Schritt erfolgte eine Charakterisierung des Einflusses einer Salmonelleninfektion auf Änderungen der Expressionsprofile während der Absetzphase, um Pathogen-assoziierte Reaktionen der Tiere studieren zu können. Nachfolgend wurden miRNAs und ihre Zielgene mit entsprechenden Signaltransduktions- und Stoffwechselwegen, die während einer Salmonelleninfektion eine Rolle spielen, identifiziert. Hierbei wurden generelle Regulatoren einer *S. Typhimurium* Infektion im Darmgewebe charakterisiert, um damit die Grundlage für neue therapeutische Ansätze bei Pathogen-assoziierten Entzündungen während der Absetzphase legen zu können.

Zusätzlich wurde der protektive Einfluss des kommerziell eingesetzten Probiotikums *E. faecium* während einer Salmonelleninfektion untersucht.

Anschließend an diese Vorstudien erfolgte eine Identifizierung ausgewählter Regulatoren und ihrer Zielgene sowie eine Charakterisierung hinsichtlich ihrer Funktionalität *in vivo* sowie *in vitro*.

Die Analyse wurde auf die Darmabschnitte Ileum und Colon ascendens beschränkt, da Vorstudien vor allem in diesen beiden Abschnitten auf entwicklungsspezifische Genexpressionsunterschiede hindeuteten (Scholven *et al.* 2009) und eine Manifestation einer Salmonelleninfektion vor allem in diesen Darmabschnitten auftritt (Waldmann & Wendt 2001).

2. Material und Methoden

2.1. Reagenzien

Substanz	Bezugsquelle
2-Propanol	Carl Roth, Berlin, DE
5x RT Puffer	Fermentas, St.Leon Rot, DE
Accutase	PAA, Cölbe, DE
Acid-Phenol:CHCl ₃ 5:1 Lösung pH 4,5	Ambion, Darmstadt, DE
Albumin Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, DE
Calcein-AM	Sigma Aldrich, Hamburg, DE
DAPI 2,5 mg/ml	Roche, Mannheim, DE
DEPC	Sigma Aldrich, Hamburg, DE
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat ≥ 99,5 %	Carl Roth, Karlsruhe, DE
DMEM HAM's F12 1:1; w stable Glutamine, low endotoxine	Biochrom AG, Berlin, DE
dNTP Mix, 10 mM	Bioline, Luckenwalde, DE
Dulbecco's PBS (1x)	PAA, Cölbe, DE
EDTA, 50 mM	Fermentas
Ethanol Rotisolv HPLC Gradient Grade	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethanol, konzentriert	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethidiumbromidlösung 1 % 10 mg/ml	Carl Roth, Karlsruhe, DE
FBS Superior	Biochrom AG, Berlin, DE
Formaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Gentamicin 10 mg/ml	Biochrom AG, Berlin, DE
Glutardialdehyd	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Glycerin Rotipuran ≥ 99,5 %	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Glycin ≥ 99 % zur Synthese	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Gryomaxx	PAA, Cölbe, DE
Hämalaunlösung sauer nach Meyer	Carl Roth, Karlsruhe, DE
HCl 1 mol/l	Carl Roth, Karlsruhe, DE
HCl 32 %	Merck, Darmstadt, DE
KCl (max. 0,005 % Br)	Merck, Darmstadt, DE
LB Medium	Carl Roth, Karlsruhe, DE
LE Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf, DE
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
MOPS	Carl Roth, Karlsruhe, DE
N,N-Dimethylformamid Rotipuran ≥ 99,8 %	Carl Roth, Karlsruhe, DE
NaOH	Carl Roth, Karlsruhe, DE
NGS	Cell Signaling Technology

Protease Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich, Hamburg, DE
Random Hexamer Primer 0,2 µg/ µl	Fermentas, Schwerte, DE
Reaktionspuffer für DNase I mit MgCl ₂	Fermentas, Schwerte, DE
RNAse Away	Thermo Scientific5
Roti [®] Mount	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Roticlear [®]	Carl Roth, Karlsruhe, DE
RotiLoad I 4x konz.	Carl Roth, Karlsruhe, DE
RotiLoad II 4x konz. Nicht reduzierend	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Rotiphorese Gel 40 (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
RPMI Medium; w 2,0 g/l NaHCO ₃ w/o L-Glutamine, low endotoxin	Biochrom AG, Berlin, DE
Salmonellen/Shigellen Agar	Carl Roth, Karlsruhe, DE
SDS Pellets	Carl Roth, Karlsruhe, DE
SSC Puffer 20x concentrate, 0,2 µm filtered	Sigma Aldrich, Hamburg, DE
TAE Puffer 50x Rotiphorese	Carl Roth, Karlsruhe, DE
TEMED	Merck, Darmstadt, DE
TRIS Pufferan [®] ≥ 99,9 %	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Triton-X-100	Sigma Aldrich, Hamburg, DE
Tween 20	Sigma Aldrich, Hamburg, DE
Wasser Rotisolv [®] HPLC Gradient Grade	Carl Roth, Karlsruhe, DE

2.2. Enzyme

Method	Produktname	Bezugsquelle
DNA-Verdau	DNase I RNAse free 1 U/µl	Fermentas, Schwerte, DE
Proteinextraktion	Benzonase 250 U/µl	Sigma Aldrich, Hamburg, DE
Real-Time-PCR	2x SensiMix SYBR Hi-Rox	Bioline, Luckenwalde, DE
Reverse Transkription	Revert Aid [™] Reverse Transcriptase 200 U/µl	Fermentas, Schwerte, DE

2.3. Kits

Method	Produktname	Bezugsquelle
cDNA Labeling	Super Script Plus Indirect cDNA Labeling System	Invitrogen, Darmstadt, DE
DNA-Aufreinigung	Invisorb Spin DNA Extraction Kit	Invitek, Berlin, DE
G-LISA Cdc42	G-LISA [®] Cdc42 Activation Assay Biochem Kit [™] (Colorimetric Based)	Cytoskeleton, Dever, USA
G-LISA Rac1	G-LISA [®] Rac1 Activation Assay Biochem Kit [™] (Absorbance Based)	Cytoskeleton, Dever, USA
Immunhistologie	DAKO EnVisio [™] Detection Systems Peroxidase/DAB, Mouse/Rabbit	DAKO, Hamburg, DE
Plasmid-DNA Extraktion	NucleoBond Xtra Midi Plus EF Kits	Macherey-Nagel, Düren, DE
Proteinquantifizierung	2-D Quant Kit	GE Healthcare, Solingen, DE

Reporterassay	Bio Lux Assay Kits	NEB GmbH, Frankfurt am Main, DE
RNA-Extraktion	mirVana miRNA Isolation Kit	Ambion, Kaufungen, DE
Transfektion	Nucleofactor™ Kit R + L	Lonza, Köln, DE
Western Blot Detektion	ECL Advance Western Blotting Detection Kit	Amersham Biosciences, Solingen, DE

2.4. Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle	Bestellnummer
Rabbit-CAV2	Abcam, Cambridge, UK	ab2911
Rabbit-CDC42	Abcam, Cambridge, UK	ab64533
Rabbit-SELPLG	SantaCruz, Heidelberg, DE	ssc-71940
Rabbit-MADCAM-1	Abbiotec, San Diego, USA	250743
Mouse-GAPDH	Abcam, Cambridge, UK	ab8245
Mouse-ACTB	SantaCruz, Heidelberg, DE	sc-47778
ECL Rabbit IgG, HRP	GE Healthcare, Solingen, DE	NA934VS
ECL Mouse IgG, HRP	GE Healthcare, Solingen, DE	NA931VS
Goat Anti-Rabbit IgG Dylight 594	AbDSerotec, Erlangen, DE	35561
Goat Anti-Mouse IgG Dylight 488	AbDSerotec, Erlangen, DE	STAR117D488GA

2.5. Rezepte

Reinstwasser wurde durch Umkehrosiose und Ionenaustausch gewonnen, im Folgenden als ddH₂O bezeichnet. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Puffer und Lösungen mit ddH₂O angesetzt.

Puffer / Lösungen	Zusammensetzung
Agarose Gel (1,5 %):	6 g Agarose + 400 ml 1x TAE
Anodenpuffer	0,2 M Tris, pH 8,9
APS 10%	10 % in ddH ₂ O
Bouinsche Lösung	4 % Pikrinsäure (w/v), 2,5 % Kupferacetat (w/v), 3,5 % Formaldehyd
Citratpuffer 10 mM	Lösung A: 21 g Zitronensäure in 1000 ml ddH ₂ O Lösung B: 29,4 g Na-Citrat in 1000 ml ddH ₂ O 10 ml Lösung A + 40 ml Lösung B, pH 6,0
DEPC-H ₂ O	1 % DEPC in ddH ₂ O
SDS- Elektrodenpuffer	25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3
Entfärben Acrylamidgele	10% Essigsäure, 1% Ethanol
Färben Acrylamidgele	0,1 % Coomassie G250
Fixierlösung Acrylamidgele	40% Isopropanol, 10% Essigsäure
Kathodenpuffer	0,1 M Tris, 0,1 M Tricin, 0,1 % SDS, pH 8,25
Microarray-Waschpuffer 1	2x SSC, 0,5 % SDS
Microarray-Waschpuffer 2	1x SSC, 0,5 % SDS

Microarray-Waschpuffer 3	0,5% SSC, 0,5 %SDS
Microarray-Waschpuffer 4	0,1% SSC, 0,2 % SDS
Mild stripping buffer	200 mM Glycin, 3,5 mM SDS, 1 % Tween 20, pH 2,2
Nukleinsäure- Ladepuffer	25 mg Orange G, 5 mL 100 % Glycerin, 40 µl EDTA (0,5 M), 1 ml 10x TAE, 3,96 ml ddH ₂ O
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
PBS-T	1x PBS, 0,1 % Tween 20 pH 7,4
Pre-hybridisierungspuffer	5x SSC, 0,1 % SDS, 1 % BSA
Proteinlysispuffer	50 mM Tris/HCl pH 6,8, 2% (w/v) SDS
Puffer für Primer	10 mM TRIS, 1 mM EDTA pH 8,0; Primer Stammlösung: 100 pmol; working solution: 10 pmol
Sammelgelpuffer	1 M TRIS pH 6,8
TBS	150 mM NaCl, 50 mM TRIS, pH 7,5
TBS-T	1x TBS, 0,1 % Tween 20 pH 7,5
Towbin Puffer	25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20 % MeOH, pH 8,3
Trenngelpuffer	1,5 M TRIS pH 8,8
TRIS-HCL-SDS Puffer	36,4 g TRIS, 0,3 g SDS in 100 ml ddH ₂ O; pH 8,45
Zellyse Salmonelleninvasion	0,1 % Triton X-100

2.6 Tierexperimente

Die Tierexperimente wurden nach international anerkannten Richtlinien durchgeführt und vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGESo) überwacht (No. G0037/02).

15 Würfe mit Ferkeln der Hybridrasse (EUROC x Pietrain) wurden in drei Gruppen eingeteilt: Kontroll- (C), Salmonellen- (S) und Salmonellen/Probiotikagruppe (SP). Die Versuche der Kontrollgruppe erfolgten im Institut für Tierernährung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin. Die Salmonelleninfektion wurde im Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR, Berlin) durchgeführt. Ferkel aller Gruppen hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Vom Tag 14 bis 28 *post natum* (p.n.) erhielten die Ferkel Saugferkel-Starterfutter (Mischung aus Weizen, Sojaextraktionsschrot und Milchpulver) sowie anschließend von Tag 29 bis 56 p.n. Alleinfutter für Absatzferkel (Mischung aus Weizen und Sojaextraktionsschrot). Das Futter wurde am Institut für Tierernährung gemischt. Das Futter der SP-Gruppe wurde zusätzlich mit dem probiotischen Keim *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (Cylactin, Charge: ED0231, Cerbios-Pharma, Barbengo, Switzerland) angereichert (Saugferkelfutter: $7,5 \times 10^6$ probiotische Zellen/g, Absatzferkelfutter: $4,4 \times 10^6$ probiotische Zellen/g Futter). Alle Ferkel wurden am 28 d p.n. abgesetzt. Direkt nach dem Absetzen erfolgte mittels intragastraler Applikation nach Sedation mit 1,0 mg/kg Azaperon intramuskulär in der S- und SP-Gruppe die Infektion mit Salmonellen (*Salmonella enterica* *subspezies enterica* serovar Typhimurium DT104, $5-10 \times 10^9$ CFU/Ferkel). Ein Ferkel je Wurf der C-Gruppe wurde am Tag 7, 14, 28, 31, 35 und 56 p.n. getötet. In der S- und SP-Gruppe

wurden zum Zeitpunkt 28, 29, 31 und 56 Tage p.n. je zwei Tiere getötet. Tab. 1 gibt einen Überblick über die Anzahl der getöteten Tiere. Die Versuche wurden im Rahmen der DFG Forschergruppe 438 durchgeführt.

Tab. 1: Wurfanzahl und Anzahl getöteter Tiere je Zeitpunkt und Gruppe

Versuchsgruppe		C	S	SP
Anzahl der Würfe/Versuchsgruppe		5	5	5

Tötung		Anzahl getötete Tiere/Wurf		
post natum (p.n.)	post infectionem (p.i.)	C	S	SP
7 d	-	1	-	-
14 d	-	1	-	-
28 d	3 h	1	2	2
-	1 d	-	2	2
31 d	3 d	1	2	2
35 d	-	1	-	-
56 d	28 d	1	2	2*
Σ aller Tiere		30	40	38

*nur 4 Würfe

2.7 Probenentnahme

Die Tötung der Ferkel erfolgte nach Narkose mit Ursotamin® (Wirkstoff: Ketamin-Hydrochlorid, 150 mg/ml, Serumwerk, Bernburg) und Stresnil® (Wirkstoff: Azaperon, 40 mg/ml, Janssen-Cilag) mittels intraperitonealer Verabreichung von Eutha® 77 (Wirkstoff: Pentobarbitalum natricum, 400 mg/ml, Essex). Nach Öffnung des Abdomens wurden ungefähr 5 cm lange Darmstücke entnommen. Das Ileum direkt am Übergang vom Jejunum am Ende der Plica ileocaecales sowie das Colon ascendens 10 cm nach Beginn der ersten zentrifugalen Windung. Entnommene Darmgewebe wurden sofort in flüssigem Stickstoff schock-gefroren und bei -80 °C langfristig gelagert. Die Probenentnahme erfolgte im Rahmen der Doktorarbeit von Jutta Sharbati (2010) innerhalb der DFG Forschergruppe 438.

2.8 Zellen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete porcine intestinale Epithelzelllinie (IPEC-J2) wurde vom Friedrich-Loeffler-Institut der Insel Riems zur Verfügung gestellt. Die humane Kolonkarzinomzelllinie (HT-29) stammt aus dem Institut für klinische Physiologie der Charité Berlin AG Fromm sowie die humane Zervixkarzinomzelllinie von ATCC (ATCC Number: CCL-2™). Alle Zelllinien (IPEC-J2, HT-29 und HeLa) wurden bei 37 °C und einem CO₂ Gehalt von 5 % in 25 oder 75 cm² Kulturflaschen (Sarstedt) kultiviert. Die IPEC-J2 Zellen wurden in DMEM HAM's F12 mit 10 % FBS Superior (Biochrom), die HT-29 sowie die HeLa Zellen in RPMI Medium mit 10 % FBS Superior (Biochrom) kultiviert. Gentamicin (Biochrom) wurde in einer Endkonzentration von 10 µg/ml zum Medium hinzugefügt. Ein Medienwechsel erfolgte bei allen Zellen alle drei Tage. Eine Passagierung der Zellen erfolgte mittels Accutase (PAA) (0,04 ml/cm² Kulturflasche), bei den IPEC-J2 und HeLa Zellen alle fünf Tage, die HT-29 Zellen wurden alle neun Tage passagiert.

2.9 Bakterienstämme

Der verwendete Salmonellenstamm (*Salmonella enterica subspecies enterica* serovar Typhimurium DT104) wurde von Dr. Pawel Janczyk vom BfR zur Verfügung gestellt. Die Salmonellen wurden auf Salmonellen/Shigellen Agar (Carl Roth) angezogen (24 h, 37 °C), eine Kolonie in LB Medium bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 1,5 kultiviert. Das nach Zentrifugation (3000 g, 10 min) erhaltene und mittels PBS gewaschene Bakterienpellet wurde in Glycerin/PBS im Verhältnis 2/8 aufgenommen. Die CFU der Bakteriensuspension wurde mittels einer Verdünnungsreihe von 10⁻⁵ bis 10⁻⁷ bestimmt. Die Salmonellensuspension wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Das verwendete Probiotikum *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 wurde in mikroverkapselter Form als kommerzieller Futterzusatzstoff Cylactin LBC ME10 (Cerbios-Pharma, Barbengo, Schweiz) verabreicht.

2.10 Molekularbiologische Techniken

Allgemeine molekularbiologische Techniken wurden anhand der Standardtechnikprotokolle von Green & Sambrook (2012) durchgeführt oder gemäß der Angaben des Herstellerprotokolls der verwendeten Kits und Enzyme.

2.11 Gesamt-RNA Isolierung, Quantität und Integrität

2.11.1 Darmgewebe

Um repräsentative Expressionsergebnisse zu erhalten, wurden aus jedem Darmabschnitt drei ca. 2 mm breite Scheiben, wie in Abb. 3 dargestellt, entnommen und zu einer Probe vereinigt (Scholven *et al.* 2009). Das Darmgewebe wurde anschließend mittels eines automatisierten Homogenisierers (FastPrep Homogenisierer, Qbiogene/MPBiomedicals) lysiert.

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit dem mirVana Isolation Kit (Applied Biosystems, Ambion) gemäß dem Herstellerprotokoll. Die finale RNA Elution erfolgte in 100 µl Elutionspuffer. Der mirVana Kit ermöglichte die gleichzeitige Extraktion kleiner RNA Moleküle (<30 Nukleotide).

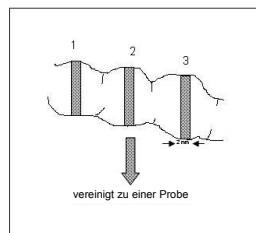


Abb. 3 Poolgenerierung für die RNA Isolierung: Um repräsentative Expressionsergebnisse zu erhalten, wurden aus jedem Darmabschnitt drei ca. 2 mm breite, nahe beieinander liegende Scheibe zu einer Probe vereinigt (Scholven *et al.* 2009).

Die Quantitätsmessung der Gesamt-RNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mittels eines NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spektralphotometer (NanoDrop

Technologies) durchgeführt. Nukleinsäuren absorbieren bei einer Wellenlänge von 260 nm, die aromatischen Reste der Aminosäuren hingegen bei 280 nm. Der Quotient aus 260/280 stellt somit ein Maß für die Reinheit der RNA dar und sollte ungefähr bei zwei liegen. Die Bestimmung der RNA Integrität erfolgte mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyser und dem RNA 6000 Nano Kit gemäß dem Herstellerprotokoll. Anhand eines internen Standards konnte die Größe der enthaltenen RNA Moleküle bestimmt werden, sowie das Verhältnis von 18S zu 28S rRNA. Mittels der RNA Integritätsnummer (RIN) ließ sich eine Aussage über die Integrität treffen, wobei eine RIN von 10 die höchste Integrität darstellte. Für die Tauglichkeit der RNA wurde in der vorliegenden Arbeit eine RIN Untergrenze von 8 definiert. Aus allen RNA Proben wurden Poole für die Microarrayversuche generiert, um die Anzahl der zu untersuchenden Proben zu minimieren (Tab. 2). Hierzu wurden je 6 µg Gesamt-RNA je Zeitpunkt jeder Gruppe und jedes Darmabschnittes vereinigt.

Tab. 2: RNA Poole

Pool	Gruppe	Darm- abschnitt	Zeitpunkt		Pool	Gruppe	Darmabschnitt	Zeitpunkt	
			p.n.	p.i.				p.n.	p.i.
1	C	Ileum	7d	-	15	C	Colon ascendens	7d	-
2	C	Ileum	14d	-	16	C	Colon ascendens	14d	-
3	C	Ileum	28d *	-	17	C	Colon ascendens	28d *	-
4	C	Ileum	31d	-	18	C	Colon ascendens	31d	-
5	C	Ileum	35d	-	19	C	Colon ascendens	35d	-
6	C	Ileum	56d	-	20	C	Colon ascendens	56d	-
7	S	Ileum	28d **	3h	21	S	Colon ascendens	28d **	3h
8	S	Ileum	29d	1d	22	S	Colon ascendens	29d	1d
9	S	Ileum	31d	3d	23	S	Colon ascendens	31d	3d
10	S	Ileum	56d	28d	24	S	Colon ascendens	56d	28d
11	SP	Ileum	28d **	3h	25	SP	Colon ascendens	28d **	3h
12	SP	Ileum	29d	1d	26	SP	Colon ascendens	29d	1d
13	SP	Ileum	31d	3d	27	SP	Colon ascendens	31d	3d
14	SP	Ileum	56d	28d	28	SP	Colon ascendens	56d	28d

* Ferkel wurden vom Muttertier abgesetzt

** Ferkel wurden vom Muttertier abgesetzt und mit *S. Typhimurium* infiziert

Eine gemeinsame Referenz (CR) wurde aus Vereinigung je 30 µg jeder isolierten Gesamt-RNA gebildet. Eine CR wurde gewählt, um alle Poolproben untereinander vergleichen zu können.

2.11.2 Zellen

Die RNA Extraktion aus Zellen sowie die Quantitätsbestimmung erfolgte wie unter 2.11.1 beschrieben. Im Gegensatz zum Darmgewebe wurde die Lyse der Zellen direkt im Kulturgefäß durchgeführt. Die Integrität der RNA wurde mit Hilfe eines 1 %igen denaturierenden RNA-Agarosegels bestimmt. 2 µg Gesamt-RNA wurden mit RNA-Probenpuffer versetzt, 10 min bei 70 °C denaturiert und für 2 h bei 70 V elektrophoretisch aufgetrennt. Das Ethidiumbromid interkalierte mit der RNA und konnte mittels eines

Transiluminators sichtbar gemacht werden. Qualitativ hochwertige RNA zeichnet sich durch gut sichtbare 18S rRNA und 28S rRNA Banden aus, wobei Letztere doppelt so intensiv sein sollte wie Erstere.

2.12 cDNA Synthese

Im initialen Schritt der cDNA Synthese wurde noch verbliebene genomische DNA verdaut. Hierzu wurden 2 µg Gesamt-RNA in einem Gesamtvolumen von 60 µl mit 3 U RNase freie DNase und dem mitgelieferten 10x Reaktionspuffer mit MgCl₂ (Fermentas) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA mit einer Endkonzentration von 2,5 nmol/µl und Inkubation bei 65 °C für 10 min gestoppt. Im Weiteren fand die Reverse Transkription statt, bei der im ersten Schritt die Gesamt-RNA mit 0,6 µg random hexamer Primer (Fermentas) für 5 min bei 70 °C versetzt wurde. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 400 U RevertAid Reverse Transcriptase (Fermentas), 60 nmol dNTPs (Fermentas) und dem mitgelieferten 5x RT Puffer für 10 min bei 25 °C, gefolgt von 60 min bei 42 °C und 10 min bei 70 °C. RT-Negativkontrollen bildeten Ansätze, zu denen bei der reversen Transkription kein RT Enzym zugesetzt wurde, sie dienten somit als Kontrolle des initialen Verdauens genomischer DNA. Synthetisierte cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.13 Oligonucleotid-Microarray

Genexpressionsstudien wurden mit Hilfe des Oligonucleotid Microarrays *Pigoligoarray* (www.pigoligoarray.org) durchgeführt. Der *Pigoligoarray* ist ein Gesamt-Genom Microarray bestehend aus 20400 porcinen 70 mer Oligonukleotiden. Als Negativkontrollen beinhaltet die Microarray sechs Mismatchproben sowie 60 Oligos, die weder im bovinen noch im porcinen Genom enthalten sind. 214 Oligos gerichtet gegen das porcine Genom mit 100 %iger Übereinstimmung zum bovinen Genom dienten als Kontrolle für Spezies-Kreuzreaktionen.

15 µg Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des Super Script PlusTM Indirect cDNA Labelling System (Life technologies) nach Angaben des Herstellerprotokolls mittels aminomodifizierter Basen in cDNA konvertiert, an die anschließend die Ankopplung von Alexa Fluor® Dyes (Life technologies) erfolgte. Die Hybridisierung wurde als Zwei-Farben-Experiment durchgeführt, in dem die jeweilige Probe (Pool 1-28, Tab. 2, Seite 27) mit dem *Alexa Fluor 647*® (rote Emission) und die CR mit dem *Alexa Fluor 555*® (grüne Emission) gekoppelt wurde und beide gleichzeitig auf demselben Objektträger hybridisiert wurden. Vor der eigentlichen Hybridisierung wurden die Objektträger zuerst re-hydratisiert, in dem diese für ca. 10 sec über ein 50 °C Wasserbad geschwenkt und sofort auf einem Heizblock bei 65 °C für 5 sec getrocknet wurden. Anschließend erfolgte das UV-Quervernetzen in einem Stratalinker bei 180 mJ. Abschließend wurden die Objektträger in 0,1 % SDS für 5 min gewaschen, in bidestilliertes Wasser getaucht und sofort für 3 min in 100 % Ethanol transferiert. Die abschließende Trocknung erfolgte durch Zentrifugieren bei 500 rpm für 3 min. Die fluoreszenzgekoppelten Proben wurden vor der Hybridisierung bei 95 °C für 5 min denaturiert und mit dem *SlideHyb buffer #1* (Ambion) vereinigt. Die Pre-hybridisierung, Hybridisierung und die Waschschrte wurden automatisiert in der *aHybTM Hybridisation station* (Miltenyi Biotec) durchgeführt. Die Pre-hybridisierung erfolgte bei 45 °C für 5 min mit dem Pre-hybridisierungspuffer (5x SSC, 0,1% SDS, 1% BSA). Anschließend erfolgte die

Hybridisierung für 16 h bei 50 °C mit einer Pumpgeschwindigkeit von 1 ml/min. Die abschließenden Waschschrte wurden mit Puffern in aufsteigender Stringenz durchgeführt. Der erste Waschschrte mit Waschpuffer 1 (2x SSC, 0,5% SDS) erfolgte für 1 min bei 50 °C, gefolgt von Puffer 2 (1x SSC, 0,5% SDS), Puffer 3 (0,5% SSC, 0,5% SDS) sowie Puffer 4 (0,1% SSC, 0,2% SDS) für jeweils 1 min bei Raumtemperatur. Im Anschluss an die Hybridisierung wurden die Objektträger sofort aus der Hybridisierungsstation entfernt und mehrere Male in bi-destilliertes Wasser getaucht sowie getrocknet durch eine kurze Zentrifugation. Um farbstoffspezifische Hybridisierungseffekte auszuschließen, wurden Überkreuzmarkierungsexperimente durchgeführt, bei denen die Probe mit dem *Alexa Fluor 555*[®] und die CR mit dem *Alexa Fluor 647*[®] gekoppelt wurde. Das Scannen der Microarray Objektträger erfolgte mit Hilfe des GenePix 4000B Scanner (Molecular Devices) mit einer Auflösung von 10 µm.

Die Auswertung des gescannten Bildes erfolgte mittels dem GenePix Pro 6.1 Programm (Molecular Devices). Um schwache und unregulierte Gene auszuschließen, wurden Kriterien definiert, durch die nur Signale mit in die Auswertung gelangten, bei denen > 70 % der Pixel eine Intensität in einem Kanal aufwiesen, die größer als 2x SD der Intensität des jeweiligen Hintergrundes waren. Des Weiteren wurden nur Signale einbezogen, die ein Signal zu Rauschverhältnis von > 3 aufwiesen, das Signal zu Rauschverhältnis gab die Zuverlässigkeit an, mit der ein Signal quantifizierbar war. Anschließend erfolgte eine ratio-based normalisation. Erhaltene log₂ Ratios wurden mittels dem Multi experiment viewer (MEV; <http://www.tm4.org/mev/>) ausgewertet.

2.14 Gradienten RT-qPCR mittels SYBR Green

Um die beste Anlagerungstemperatur für jedes Primerpaar zu ermitteln, wurde eine Gradienten PCR im StepOnePlus qPCR Gerät (Applied Biosystems) durchgeführt. Hierbei wurde eine Temperaturdifferenz zwischen 57 °C bis 62 °C in 1 °C Schritten gewählt. Die Matrize wurde unverdünnt sowie in einer 1:5 Verdünnung eingesetzt. Die Durchführung der PCR erfolgt wie unter 2.18 beschrieben. Die so erhaltenden Amplifikationsprodukte wurden mittels Agarosegelelektrophorese (2.15) weiter untersucht. Mit Hilfe der in der RT-qPCR erhaltenden Amplifikationskurven konnten Aussagen über die Brauchbarkeit des Primerpaares sowie die optimale Anlagerungstemperatur getroffen werden. Die C_q-Werte sollten < 25 sein, es wurde die Temperatur als optimal angesehen, die den geringsten C_q-Wert aufwies. Die Schmelzkurve dieser Temperatur sollte nur einen einzelnen Peak aufweisen, ansonsten lag die Vermutung von Mehrfachamplifikaten vor. Bei allen Primerpaaren ergab die 1:5 Verdünnung Amplifikationskurven, bei denen die logarithmische Phase deutlich ausgeprägter war, so dass diese Verdünnung für die späteren RT-qPCR Versuche beibehalten wurde.

2.15 Agarosegelelektrophorese

PCR-Reaktionsprodukte wurden mit einem 5x Nukleinsäure-Ladepuffer versetzt und in einem 1,5 %igen Agarosegel (0,9 g Agarose in 60 ml 1x TAE Puffer + 6 µl Ethidiumbromid) für 1 h bei einer Spannung von 80 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA wurde mittels eines Transiluminators sichtbar gemacht und die spezifischen Banden aus dem Gel ausgeschnitten, um die DNA aufzureinigen.

2.16 DNA Gelextraktion

Die Aufreinigung der aus dem Gel ausgeschnittenen PCR Produkte erfolgte mittels Invisorb Spin DNA Extraction Kit (Invisorb) laut Herstellerprotokoll. Die DNA Elution erfolgte in 50 μ l Elutionspuffer. Die Quantitätsmessung wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mittels eines NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spektralphotometer (NanoDrop Technologies) durchgeführt. Der Quotient aus 260/280 sollte bei reiner DNA über 1,8 liegen. Die aufgereinigten PCR Produkte wurden in der Sequenzierung und als Quantifizierungsstandard in der RT-qPCR eingesetzt.

2.17 Sequenzierung

Die Sequenzierung der PCR-Produkte (2.16) bzw. Plasmid DNA (2.29.1) erfolgte mittels des Kettenabbruchverfahrens nach Sanger *et al.* (1977). Die enzymatische Reaktion sowie die Kapillar-Elektrophorese wurden von der Firma GATC (Konstanz) durchgeführt. Hierzu wurden 10-50 ng/ μ l der PCR Produkte oder 30-100 ng/ μ l Plasmid DNA mit 10 pmol/ μ l des spezifischen Primers eingesandt. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen erfolgte mittels DNASTAR Lasergene (DNASTAR).

2.18 RT-qPCR mittels SYBR Green

Synthetisierte cDNA wurde mittels der RT-qPCR mit Hilfe der SYBR Green Methode (2x SensiMix SYBR Hi-Rox, Biorline) quantifiziert. SYBR Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der nach Interkalierung mit doppelsträngiger DNA Licht bei einer Wellenlänge von 494 nm absorbiert sowie bei 521 nm emittiert. Dies ermöglichte die Messung des Fluoreszenzsignals in jedem Zyklus, das proportional zur Amplifizierung der DNA anstieg. Durch Mitführung einer Verdünnungsreihe von 10^{-3} - 10^{-11} eines aufgereinigten spezifischen PCR Produktes (Standard) konnte im Anschluss eine Kalibrierungskurve erstellt werden.

1 μ l cDNA Probe bzw. Negativkontrolle 1:5 verdünnt (0,1 ng), H₂O oder Standard wurden mit dem RT-qPCR Reaktionsansatz (1x SensiMix, 250 nM Primer fw sowie rev im Gesamtvolumen von 10 μ l) in einer 96 PCR-Mikrotiterplatte (MicroAmp[®] Fast 96-Well Reaction Plate; Applied Biosystems) vereinigt. Alle Proben wurden als Duplikat, wenn möglich als Triplikat, gemessen. Die PCR Platte wurde mit einer durchsichtigen selbstklebenden Folie (MicroAmp[®] Optical Adhesive Film; Applied Biosystems) versiegelt. Die Messung erfolgte im StepOnePlus RT-qPCR Gerät (Applied Biosystems). Nach einer initialen Aktivierung der DNA Polymerase bei 95 °C für 10 min erfolgte die Denaturierung bei 95 °C für 15 sec, sowie die Anlagerung für 20 sec bei einer Temperatur, die für jedes Primerpaar individuell ermittelt wurde (Tab. 3). Die Elongation erfolgte für 30 sec bei 72 °C, während dessen das Fluoreszenzsignal detektiert wurde. Denaturierung, Anlagerung und Elongation wurden 40 Mal wiederholt. Um die Spezifität der Amplifikate zu bestimmen, wurde im Anschluss die Schmelzkurve der DNA ermittelt. Hierzu erfolgte eine Denaturierung für 15 sec bei 95 °C, gefolgt von der Anlagerung für 1 min bei 60 °C und einer schrittweisen Erhöhung der Temperatur von 0,5 °C/15 sec bis auf 95 °C, während dessen das Fluoreszenzsignal gemessen wurde. Der H₂O-Ansatz diente als RT-qPCR Negativkontrolle und durfte wie die RT-Negativkontrolle (cDNA Negativkontrolle) keine spezifischen Amplifikate erzeugen, damit die RT-qPCR mit in die vorliegende Arbeit einging. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der StepOnePlus Software. Diese kalkulierte für jede Probe

den C_q-Wert, welcher angab, ab wann das Fluoreszenzsignal erstmalig über das Hintergrundfluoreszenzrauschen hinaus trat und sich in der exponentiellen Phase befand. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer Kalibrierungskurve, die durch Auftragung des Logarithmus der Standardverdünnungen (10^{-3} - 10^{-11}) gegen dessen C_q-Wert erhalten wurde. Durch Einsetzen des C_q-Wertes jeder unbekanntenen Probe in die Geradengleichung $x = (C_q - b)/m$ konnte die Ausgangsmenge ermittelt werden. Der ermittelte Korrelationskoeffizient lag bei allen in der vorliegenden Arbeit einbezogenen RT-qPCR >0,98 und die Effizienz bei > 85 %. Die Normalisierung der Quantitätswerte der Zielgene erfolgte mit Hilfe der Referenzgene ACTB, GAPDH, UBC sowie 18S rRNA. Mittels des Programmes geNorm (Vandesompele *et al.* 2002) wurde die Expressionsstabilität der Referenzgene (M-Wert) ermittelt und nur solche für die Kalkulierung von Normalisierungsfaktoren herangezogen, die einen M-Wert < 1,5 aufwiesen.

2.19 Mikrofluide microRNA Microarrays

Die mikrofluiden Microarrays wurden durch die Firma febit biotech GmbH (Heidelberg) durchgeführt. Kommerzielle Microarrays wurden mittels des Geniom One Device und des Standard shortmer Kits für Oligonukleotid Synthese (febit biotech GmbH) produziert. Die Licht-aktivierte *in situ* Oligonukleotid Synthese erfolgte mittels eines digitalen Flächenlichtmodulators Micromirror Device (Texas Instrument) im Geniom One Instrument (Baum *et al.* 2003). Das verwendete Microarray Design beinhaltete 489 im Vorhinein beschriebene und validierte porcine miRNAs (Sharbati *et al.* 2010). Jede miRNA wurde in 12 Replikaten *in situ* synthetisiert, wodurch eine Gesamtanzahl von 5868 Features resultierte. Für jeden Microarray wurden 250 ng der Gesamt-RNA des jeweiligen Pools in miRNA Hybridisierungspuffer (febit biotech GmbH) suspendiert. Die Hybridisierung erfolgte automatisiert für 16 h bei 42 °C im Geniom RT-Analyzer (febit biotech GmbH). Im Anschluss an stringente Waschschrte wurde die miRNA mittels biotinylierter Nukleotide durch einen mikrofluid basierten Assay gekennzeichnet. (Vorwerk *et al.* 2008) Nach weiteren Waschschrten wurden die biotinylierten Nukleotide mittels Streptavidin-Phycoerythrin detektiert. Der Hintergrund wurde durch eine globale Hintergrundsubtraktion sowie Intraarray Effekte mittels Varianz Stabilisierungsnormalisierung korrigiert (Huber *et al.* 2002).

Tab. 3: Übersicht über die in der RT-qPCR verwendeten Primerpaare und deren optimale Anlagerungstemperatur

Gen	Spezies	Sequenz 5'-3' Ende	Größe PCR Produkt [bp]	EMBL Acc. No.	Anlagerungstemperatur [°C]
5s rRNA	ssc/hsa	fw GCCCGATCTCGTCTGATCT rev AGCCTACAGCACCCGGTATT	93		60
18s rRNA	ssc	fw AATCGGTAGTAGCGACGG rev AGAGGGACAAGTGGCGTTC	276	AY265350	60
ACTB	ssc	fw CAACTGGGACGACATGGAG rev GAGTCCATCACGATGCCAG	234	AY550069	60
APOA1	ssc	fw CCGATCAAAGACAGTGGCAGA rev TTTCCAGGTTGTCCCAGAAC	168	L00626.1	62
CAL1L	ssc	fw ACTGGTCCAGGTCCTTCATT rev AATGCCGTCTCAAATGGAACA	188	XM_001929618.1	60
CAV2	ssc	fw CCTAACGGTGTTCCTGGCTA rev GTACACAAGGGGCAATGAC	177	NM_001123091.1	59
CAV2	hsa	fw AGTTCCTGACGGTGTTCCTG rev CGTCTACGCTCGTACACAA	193	NM_001233.3	60
CDC42	ssc/hsa	fw ACGACCGCTGAGTTATCCAC rev GCCAGCTTTTCAGCAGTCTC	237	NM_001039802.1 NM_001078680.1	60
COL4A1	ssc	fw ACCTCAAGATGAAGCGTGGT rev GGAGCCAGTGTCCCTAATCA	239	pigoligoarray: 3116_CL1Contig1	60
GAPDH	ssc	fw ATTCCACCACGGCAAGTTC rev AAGGGCAGAGATGATGACC	225	NC_010447.4	60
GPX2	ssc	fw TCAACATCGAGCCTGACATC rev CTCAGTGTCTGAGGGCACA	135	DQ898282	62
HBD	ssc	fw GGCTCAGACTTGGGATGAGA rev GGCTCCTCCTGGAATCAG	246	pigoligoarray: 13883:1123_CL1Contig1:r	60
HLA-F	ssc	fw ACGGCTTTCGGAGTCATAGA rev GTCTGTTTGCTTGTGCTCCA	234	pigoligoarray: 1138_CL1Contig26	60
Iga2C	ssc	fw TGAGGAGAAGCTGGTGGAGT rev CCGTGTCTGGGAGTTGTCT	242	pigoligoarray: 15889_CL1Contig104	60
IL6	ssc	fw AAGGTGATGCCACCTCAGAC rev TCTGCCAGTACCTCCTTGCT	151	M80258.1	62
IL8	ssc	fw GGCAGTTTTCTGCTTTCTG rev CAGTGGGTCCACTCTCAAT	153	NM_213867.1	60

ITGAL (CD11a)	ssc	fw rev	TTTCCGCTTTTACCCTGTG ATTTCCAACCTGCAGGACAC	246	NM_001044608.1	61
ITGA4 (CD49d)	ssc	fw rev	TGGTCGTTTTGGTGTGAATG GTAGCCGAACAAGGTTTTGG	199	pigoligoarray: 1798_CL4Contig1	61
ITGB1 (CD29)	ssc	fw rev	GGGGATGAGGTTCAAGTTGA CACACTCAAACGTCCCATG	199	NM_213968.1	62
ITGB2 (CD18)	ssc	fw rev	GCAGAAGGCCTGTCTTCAC CTGACCCACCTGAGTGACCT	164	NM_213908.1	61
ITGB7	ssc	fw rev	TCGGCTCTCAGTGGAAATCT TCTCCATCCCAGAGAAGAGC	203	pigoligoarray: 3518_CL3Contig1	62
MadCAM-1	ssc	fw rev	CCCTGTGTACAACTCCTT CCTCACACAGCAACTCCAGA	178	NM_001037998.1	61
MCP1 (CCL2)	ssc	fw rev	TCTCCAGTCACCTGCTGCTA TCCAGGTGGCTTATGGAGTC	185	NM_214214.1	61
RNU6	ssc/hsa	Fw rev	CGCTTCGGCAGCACATATAC GCTTCACGAATTTGCCTGTC	89		58
SELE	ssc	fw rev	CTGGGAACCTCCAACTTGA ATTCCCCGACTGGAGAGTTT	166	NM_214268.1	61
SELL	ssc	fw rev	AAGACTCCGGGAAGTGGAAAT GGCTCACACTGATCACGAA	187	NM_001112678.1	60
SELP	ssc	fw rev	ATCAGCCCTCCCGATAGACT AAGGGCAGTGGGTAGAGTT	156	NM_214078.1	60
SELPLG	ssc	fw rev	TACTGCAGGACTGCAACAC TCTTTGGTCAGAGGTCAG	153	NM_001105307.1	61
SNORD47	ssc/hsa	Fw rev	TGATGTRATGATTCTGCCAAATG CCTCAGAATCAAATGGAACG	69	NR_002746.1	56
TCR	ssc	fw rev	ATCCATCAATGCCAGCTAC GAGGCCTTGAAGTTCTGGAG	194	AB079521.1	60
UBC	ssc	fw rev	CAGTCGCTTCTGAACACTGC AGGAGCAGAACAACCTGGAA	228	pigoligoarray: 629_15179314	60
VCAM1	ssc	fw rev	AAGCTGAGGGATGGGAATCT GATCTTTTGGAGCAGCTTGG	163	NM_213891.1	60
WAP-1	ssc	fw rev	ATTGGAAGCCGATGAGAGAG CGCTGAGCAATCCCTCTAAC	243	NM_001123215.1	60

2.20 miR-Q

Das Expressionslevel von miRNAs wurde mittels RT-qPCR (miR-Q) (Sharbati *et al.* 2008) ermittelt (Abb. 4). Die Quantifizierung der miRNAs wurde durch Kalkulierung einer Standardkurve aus 50 ng *E. coli* Gesamt-RNA als Hintergrund, versehen mit synthetischer miRNA, in Verdünnungen von 100 fmol bis 0,1 amol in 10^{-1} Schritten, ermöglicht. Hierzu wurde die miRNA zuerst mit Hilfe eines spezifischen Primers (RT6-Primer; Endkonzentration: 25nM) in cDNA konvertiert und dabei gleichzeitig mit einem 5' Überhang versehen (Abb. 4a). Als Negativkontrolle diente *E. coli* Gesamt-RNA. Während einer Inkubation bei 70 °C für 5 min fand hierbei die Primerhybridisierung statt. Die Elongation folgte nach Zugabe von 5x RT Puffer (Fermentas), 100 U RT MMuLV Enzym (Fermentas) sowie dNTPs (Endkonzentration von 1 mM) bei Inkubationen von 37 °C für 5 min, gefolgt von 42 °C für 60 min. Anschließend erfolgte die Enzyminaktivierung für 10 min bei 70 °C (Abb. 4b). Die finale Quantifizierung wurde durch real-time PCR Messungen mit SYBRGreen ermöglicht. Mittels miRNA spezifischer Primer (short-miR-X-rev Primer; 4nM), die ebenfalls mit einem 5'Überhang versehen waren, erfolgte dabei die Elongation (Abb. 4c). Die finale Amplifizierung wurde mittels universeller Primer (Mp fw und Mp rev; 100nM), die in den beiden eingeführten Überhängen banden, ermöglicht (Abb. 4c). Die real-time PCR Messungen wurden im StepOne Plus (Applied Biosystems) durchgeführt. Die einzelnen Reaktionsschritte waren wie folgt: 95 °C für 10 min, gefolgt von 40 Zyklen mit 15 sec bei 95 °C, 10 sec bei der miRNA spezifischen Anlagerungstemperatur und 20 sec bei 72 °C. Das Fluoreszenzsignal wurde bei 72 °C aufgenommen. Die optimale Anlagerungstemperatur für jede miRNA (Tab. 4) wurde durch eine vorgeschaltete Gradienten RT-qPCR (53-65 °C) ermittelt. Jede Verdünnung der synthetischen miRNA sowie die Proben wurden als Triplikat gemessen. Die ermittelten Cq-Werte wurden mittels der miRNA spezifischen Kalibrierungskurve in fM umgewandelt. Die Normalisierung der erhaltenen Quantitätswerte erfolgte mittels der Referenzgene RNU6, SNORD47 sowie 5s rRNA mit geNorm wie unter 2.18 bereits beschrieben.

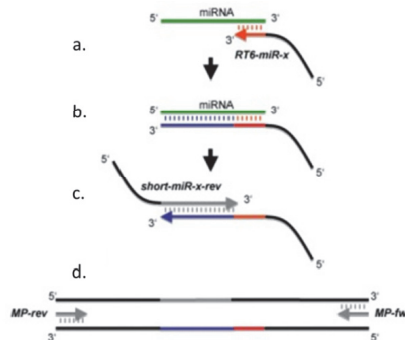


Abb. 4: miR-Q (Sharbati *et al.* 2008): (a-c) Reverse Transkription mittels miRNA spezifischer Hexamere mit 5'Überhang (d) SYBR Green qPCR

Tab. 4: Übersicht über die in der miR-Q verwendeten Primer und deren optimale Anlagerungstemperatur

miR-29a	
RT6 Primer Sequenz 5' - 3' Ende	TGTCAGGCAACCGTTCACCGTGAGTGGTTAACCG
short-miR-X-rev Primer Sequenz 5' - 3' Ende	CGTCAGATGTCCGAGTAGAGGGGGAACGGCGTAG CACCATCTGAAAT
Anlagerungstemperatur [°C]	55
miR-34a	
RT6 Primer Sequenz 5' - 3' Ende	TGTCAGGCAACCGTATTACCGTGAGTGGTACAACC
short-miR-X-rev Primer Sequenz 5' - 3' Ende	CGTCAGATGTCCGAGTAGAGGGGGAACGGCGTGGC AGTGTCTTAGCTGGT
Anlagerungstemperatur [°C]	60
universal miR-Q oligos	
Mp fw	TGTCAGGCAACCGTATTACCG
Mp rev	CGTCAGATGTCCGAGTAGAGG

2.21 miR-Q Array

Für die Multiplex RT (miR-Q Array, Sharbati *et al.* 2012) wurde ein Pool aus RT-6 Primern von allen miRNAs und den Referenz-miRNAs (Tab. 5) gebildet, zu einer Endkonzentration von 100 µM. 1 µg Gesamt-RNA wurde mit 1 µM des RT-6 Pools bei 70 °C für 5 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Elongation nach Zugabe von 5x RT Puffer (Fermentas), 200 U RT MMuLV Enzym (Fermentas) sowie dNTPs (Endkonzentration von 10 mM) bei Inkubationen von 42 °C für 120 min. Anschließend erfolgte die Enzyminaktivierung für 5 min bei 95 °C. Die cDNA wurde mit ddH₂O 1:5 verdünnt.

Die finale Quantifizierung wurde durch qPCR Messungen mit SYBRGreen ermöglicht. Ein Mastermix aus je 100 nM universellen Primern (Mp fw und Mp rev), 2x SensiMix SYBR Hi-Rox (Bioline) und verdünnter cDNA wurde zu je 9 µl in eine MicroAmp® Fast 96-Mikrotiterplatte (Life Technologies) vorgelegt und 1 µl jedes 50 nM short-miR-X-rev Primers (Tab. 5) im Triplikat hinzugegeben. Die real-time PCR Messungen wurden im StepOne Plus (Applied Biosystems) durchgeführt. Die einzelnen Reaktionsschritte waren wie folgt: 95 °C für 10 min, gefolgt von 40 Zyklen mit 15 sec bei 95 °C, 20 sec bei 60 °C und 20 sec bei 72 °C. Das Fluoreszenzsignal wurde bei 72 °C aufgenommen. Die Normalisierung erfolgte mit Hilfe der miR-191 und miR-16. Nach Berechnung des C_q Mittelwerts jeder Referenz-miRNA wurde das geometrische Mittel der C_q Mittelwerte aller Referenz-miRNAs gebildet. Der $\Delta C_{q\text{Probe}}$ oder $\Delta C_{q\text{Calibrator}}$ wurde wie folgt berechnet $C_{q\text{Probe}} - C_{q\text{geometrisches Mittel Referenz}}$. Anschließend erfolgte die Bestimmung des $\Delta\Delta C_{q}$ ($\Delta C_{q\text{Probe}} - \Delta C_{q\text{Calibrator}}$). Die Darstellung der Werte erfolgte als Fold difference ($2^{-\Delta\Delta C_{q}}$).

Tab. 5: Übersicht über die im miR-Q Array verwendeten Primer

miR-21	
RT6 Primer Sequenz 5' - 3' Ende	TGTCAGGCAACCGTATTACCGTGAGTGGTTCAACA
short-miR-X-rev Primer Sequenz 5' - 3' Ende	CGTCAGATGTCCGAGTAGAGGGGGAACGGCGTAGCT TATCAGACTGA
miR-23b	
RT6 Primer Sequenz 5' - 3' Ende	TGTCAGGCAACCGTATTACCGTGAGTGTGGTAAT
short-miR-X-rev Primer Sequenz 5' - 3' Ende	CGTCAGATGTCCGAGTAGAGGGGGAACGGCGATCAC ATTGCCAGGG

miR-29a	
RT6 Primer Sequenz 5'- 3' Ende	TGTCAGGCAACCGTTACCGTGAGTGGTTAACCG
short-miR-X-rev Primer Sequenz 5'- 3' Ende	CGTCAGATGTCCGAGTAGAGGGGGAACGGCGTAGCAC CATCTGAAAT
miR-143	
RT6 Primer Sequenz 5'- 3' Ende	TGTCAGGCAACCGTATTACCGTGAGTGGTTGAGCT
short-miR-X-rev Primer Sequenz 5'- 3' Ende	CGTCAGATGTCCGAGTAGAGGGGGAACGGCGTGAGA TGAAGCACTGT
miR-146a	
RT6 Primer Sequenz 5'- 3' Ende	TGTCAGGCAACCGTATTACCGTGAGTGGTAACCCA
short-miR-X-rev Primer Sequenz 5'- 3' Ende	CGTCAGATGTCCGAGTAGAGGGGGAACGGCGTGAG AACTGAATTCCA
miR-296-3p	
RT6 Primer Sequenz 5'- 3' Ende	TGTCAGGCAACCGTATTACCGTGAGTGGTAGGARAG
short-miR-X-rev Primer Sequenz 5'- 3' Ende	CGTCAGATGTCCGAGTAGAGGGGGAACGGCGGAGGGTT GGGYGGAGGC
miR-423-3p	
RT6 Primer Sequenz 5'- 3' Ende	TGTCAGGCAACCGTATTACCGTGAGTGGTTGAGGG
short-miR-X-rev Primer Sequenz 5'- 3' Ende	CGTCAGATGTCCGAGTAGAGGGGGAACGGCGAGCTC GGTCTGAGGC
let-7e	
RT6 Primer Sequenz 5'- 3' Ende	TGTCAGGCAACCGTATTACCGTGAGTGGTAACTAT
short-miR-X-rev Primer Sequenz 5'- 3' Ende	CGTCAGATGTCCGAGTAGAGGGGGAACGGCGTGAGG TAGGAGGTTGT
miR-16	
RT6 Primer Sequenz 5'- 3' Ende	TGTCAGGCAACCGTATTACCGTGAGTGGTCGCCAA
short-miR-X-rev Primer Sequenz 5'- 3' Ende	CAGATGTCCGAGTAGAGGGGGAACGGCGTAGCAGCA CGTAAATA
miR-191	
RT6 Primer Sequenz 5'- 3' Ende	CAGGCAACCGTATTACCGTGAGTGGTAGCTGC
short-miR-X-rev Primer Sequenz 5'- 3' Ende	CAGATGTCCGAGTAGAGGGGGAACGGCGCAACGGAA TCCCAAAA

2.22 Proteinisolierung, Quantifizierung

2.22.1 Darmgewebe

Um repräsentative Expressionslevel zu erhalten, wurden aus dem Darmgewebe Poole generiert (Abb. 3, Seite 26). Auch die Homogenisierung des Gewebes erfolgte wie unter 2.11 bereits beschrieben. Der Proteinlysispuffer wurde 1:100 mit Protease Inhibitor Cocktail (Sigma Aldrich) und Benzonase (Endkonzentration 384 U/µl; Sigma Aldrich) versehen. Im Anschluss an die Homogenisierung und eine 30 minütige Inkubation auf Eis erfolgte eine Zentrifugation (5 min bei 13000 rpm). Der Überstand wurde erneut für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert und bei -20 °C gelagert. Wie unter 2.11.1 beschrieben wurden im Anschluss Poolproben generiert (Tab. 2, Seite 27), bei denen je 200 µg jeder Proteinprobe vereinigt wurden.

2.22.2 Zellen

Adhärente Zellen wurden direkt im Kulturgefäß lysiert. Die Inkubation auf Eis und die Zentrifugation erfolgte wie unter 2.22.1 beschrieben.

2.22.3 Proteinquantifizierung mittels 2-D Quant Kit

Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellerprotokolls, das Probenvolumen betrug 2 µl. Alle Proben sowie die Standardreihe wurden als Duplikat gemessen.

2.23 Western Blot

Western Blot ist eine Methode, bei der ein Proteingemisch elektrophoretisch der Größe entsprechend aufgetrennt, auf eine PVDF- bzw. Nitrocellulosemembran übertragen und mittels Antikörper ein spezifisches Protein detektiert wird.

2.23.1 Gelelektrophorese-SDS PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS PAGE), abhängig von der Größe der zu detektierenden Proteine mit Tricingelen (Proteine ≤ 19 kDa) oder 12 %igen Polyacrylamidgelen (Proteine > 19 kDa). (Tab. 6)

Tab. 6: Rezepte für 12 %iges Polyacrylamidgel und Tricingel

12 %iges Polyacrylamidgel			Tricingel		
Lösungen in ml	Trenngel 12%	Sammelgel 5%	Lösungen in ml	Trenngel Tricingel	Sammelgel
Acrylamid 37,5:1; 40 %	2,25	0,63	Acrylamid 37,5:1; 30 %	2,5	0,243
ddH ₂ O	3,23	3,63	Tris/HCL-SDS-Puffer	1,67	0,47
Trenngelpuffer	1,88	-	ddH ₂ O	0,3	1,17
Sammelgelpuffer	-	0,63	Glycerol 100 %	0,53	-
SDS 10 %	0,075	0,05	APS 10 %	0,025	0,01
APS 10 %	0,03	0,03	TEMED	0,023	0,011
TEMED	0,01	0,01			

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit der SE 250-Apparatur (GE Amersham) unter Kühlung (10 °C). Bei Verwendung der 12 %igen Polyacrylamidgele wurde mit einem Einpuffersystem (Elektrodenpuffer) gearbeitet. Bei Verwendung der Tricingele wurde mit einem Zweipuffersystem (Kathoden- sowie Anodenpuffer) gearbeitet. Die Proteinproben wurden auf 20 µg/µl mit dem Proteinlysispuffer verdünnt, mit dem 4-fach konzentrierten Probenpuffer versehen und bei 95° C denaturiert. Reduzierende Bedingungen lieferte der Probenpuffer RotiLoad I (Carl Roth) sowie nicht reduzierende der RotiLoad II (Carl Roth). Als Größenkontrolle diente der Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Die Auftrennung erfolgte für 20 min bei 50 V, 150 mA und 10 W gefolgt von 150 V, 150 mA und 10 W, so lange bis die Lauffront am Ende des Gels angekommen war. Die Gesamtlauzeit für die Tricingele betrug 3 h, für die 12 %igen Acrylamidgele 1,5 h.

2.23.2 Blotten und Proteindetektion

Der Western Blot wurde mit Hilfe des Amersham TE 77 Semi-dry Transfersystems durchgeführt. Die verwendete PVDF Membran (Amersham Hybond ECL PVDF Transfer Membran 0,45 µm, GE Healthcare) wurde in 100 % Methanol und Towbin Puffer aktiviert, die Nitrocellulosemembran (Amersham Hybond ECL 0,2 µm Nitrocellulose, GE Healthcare) hingegen nur in ddH₂O und Towbin Puffer. Blotpapier (1,5 mm; Whatman) wurde in Towbin Puffer bei 4 °C equilibriert. Der Aufbau der Blottingapparatur ist in Abb. 5 dargestellt.

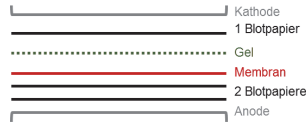


Abb. 5: Western Blot: Übersicht über den Aufbau der Blottingapparatur

Das Blotten erfolgte für 15 min bei Nitrocellulose- sowie 45 min bei PVDF Membranen bei 100 V, 150 mA und 10 W. Eine Ausnahme bildete das Blotten für den Selektin-P-Liganden (SELPLG), das aufgrund der Proteingröße von 270 kDa für 2 h durchgeführt wurde. Im Anschluss wurde das Gel mit Coomassie G250 gegengefärbt, bis die einzelnen Proteinbanden deutlich sichtbar hervortraten.

Bei der Nitrocellulosemembran wurden die kleinen Proteine mit 0,25 % Glutaraldehyd in PBST für 30 min fixiert und anschließend mit PBST gewaschen. Die weiteren Schritte (Blockierung, Antikörperinkubation sowie Detektion) erfolgten mit Hilfe des Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Kit (GE Amersham) nach Angaben des Herstellerprotokolls. Die Blockierung erfolgte in 2 %iger Milchpulverlösung (ECL Blockierlösung) in TBST für 2 h. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht. Der Sekundärantikörper wurde für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. In Tab. 7 sind die verwendeten Antikörper und die entsprechenden Verdünnungen aufgeführt. Die Detektion der Signale erfolgte nach 5 minütiger Inkubation in der ECL Detektion Lösung und Einschlagen der Membran zwischen zwei durchsichtige Folien im Chemilumineszenzimager SL4 -4000 (Vilber Lourmat).

Tab. 7: Im Western Blot verwendete Antikörper und deren eingesetzte Verdünnungen

Primärantikörper			Sekundärantikörper		
Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Bezeichnung	Verdünnung	Produktgröße
Rabbit-CAV2 (Abcam)	Schwein	1:250	ECL Rabbit IgG, HRP (GE Healthcare)	1:3000	19kDa
	Mensch	1:500		1:4000	
Rabbit-CDC42 (Abcam)	Schwein	1:750	ECL Rabbit IgG, HRP (GE Healthcare)	1:5000	21kDa
Mouse-GAPDH (Abcam)	Schwein	1:20000	ECL Mouse IgG, HRP (GE Healthcare)	1:10000	40 kDa
	Mensch	1:10000		1:5000	
Mouse-SELPLG (Santa Cruz)	Schwein	1:200	ECL Mouse IgG, HRP (GE Healthcare)	1:1000	270 kDa
Mouse-ACTB (Santa Cruz)	Schwein	1:500	ECL Mouse IgG, HRP (GE Healthcare)	1:1000	43 kDa
Mouse-MADCAM-1 (Abbiotec)	Schwein	1:300	ECL Mouse IgG, HRP (GE Healthcare)	1:6500	56 kDa

Die Membranen wurden im Anschluss an die Detektion in TBST gewaschen, getrocknet und bei 4 °C aufbewahrt. Zum erneuten Inkubieren mit dem Referenzantikörper (GAPDH bzw. ACTB) wurden die Membranen aktiviert sowie zur Entfernung der Antikörper 2x je 15 min in einem milden Stripping Puffer nach Abcam (200 mM Glycin, 3,5 mM SDS, 1 % Tween 20, pH 2,2) bei 37 °C inkubiert. Zur Entfernung von Pufferresten erfolgten zwei Waschungen in PBS für 10 min sowie in TBST für 15 min. Die folgende Blockierung sowie die Inkubation im Primär- und Sekundärantikörper erfolgten wie oben beschrieben.

2.24 Immunhistochemie

Die für die Immunhistochemie verwendeten Gewebeschnitte wurden vom Institut für Veterinär-Anatomie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin hergestellt. Die Fixierung der Gewebeschnitte erfolgte hierfür in modifizierter Bouin'scher Lösung bei Raumtemperatur über Nacht. Das Gewebe wurde in 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, dehydratisiert und in Paraffin eingebettet. Paraffinschnitte mit einer Dicke von 5 µm wurden auf silaniserten Objektträgern fixiert.

Zum Entparaffinieren wurden die Objektträger für 45 min bei 60 °C im Trockenschrank und anschließend in Xylol (RotiClear) inkubiert. Es folgte die Rehydratisierung in einer absteigenden Alkoholreihe (99 %, 96 %, 80 %, 70 %, 50 %) und zweimaligem Waschen in ddH₂O sowie PBS (pH 7,0) für je 10 min. Alle Waschschritte wurden unter ständigem Schwenken durchgeführt. Zur Demaskierung der Antigene wurden die Objektträger 2 min in Citratpuffer (pH 6,0) gekocht und 20 min im Puffer stehen gelassen, gefolgt von dreimaligem Waschen in PBS. Endogene Peroxidasen wurden mit Hilfe des Peroxidase Blocks (DAKO EnVision™ Detection Systems Peroxidase/DAB, Mouse/Rabbit) blockiert, je Schnitt wurden 20 µl Blockierlösung für 10 min verwendet, gefolgt von drei weiteren Waschschritten in PBS. Die Blockierung von unspezifischen Antikörperbindungsstellen erfolgte mittels 10 % Ziegen Normalserum (NGS) in 5 % PBS/BSA für 60 min bei 37 °C. Der Primärantikörper wurde in der Blockierlösung verdünnt und die Gewebsschnitte über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper inkubiert. Eine Übersicht über die verwendeten Primärantikörper und deren Verdünnungen zeigt Tab. 8. Die Negativkontrolle erfolgte mit einem monoklonalem IgG Antikörper von Mäusen (SantaCruz). Vor der Inkubation mit dem Horseradish Peroxidase (HRP) gekoppelten Sekundärantikörpers wurden die Schnitte in PBS-T bzw. PBS gewaschen. Zwei Tropfen des Sekundärantikörper (DAKO EnVision™ Detection Systems) wurden für 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schnitt inkubiert, gefolgt von Waschschritten in PBS-T bzw. PBS. Diaminobenzidin (DAB) diente als Substrat, welches durch Reaktion mit dem HRP zu einer braunen Färbung führte. Nach weiteren Waschschritten in PBS-T bzw. PBS erfolgte die Gegenfärbung mit Hämalaun nach Mayer (Mayer 1891). Nach einer initialen Inkubation für 4 min wurde unter fließendem Leitungswasser für 5 min gebläut und in ddH₂O für 5 min inkubiert. Vor dem finalen Eindecken mit Roti®Mount (Carl Roth) erfolgte die Entwässerung mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 70 %, 80 %, 96 %, 99 %) sowie Xylol. Die Mikroskopierung der Schnitte erfolgte im Axioskop Mikroskop (Zeiss).

Tab. 8: Übersicht über die in der Immunhistochemie verwendeten Primärantikörper und deren Verdünnungen

Bezeichnung	Primärspezies	Verdünnung
Rabbit-CAV2 (Abcam)	Schwein	1:1500
Rabbit-CDC42 (Abcam)	Schwein	1:250

2.25 Immunzytologie

Zellen wurden auf Deckgläschen (Durchmesser: 10 mm) in einer 24er Mikrotiterplatte angezogen, abhängig von der Zelllinie und der Vorbehandlung der Zellen für 24-72 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, für 15 min in 4 % Formaldehyd fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Die Blockierung von unpezifischen Bindungsstellen erfolgte mittels 1 % BSA in PBS für 30 min. Der primäre Antikörper wurde in der Blockierungslösung verdünnt und die Inkubation erfolgte für 60 min bei Raumtemperatur, gefolgt von Waschschritten in PBS. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der ebenfalls in der Blockierungslösung verdünnt wurde, erfolgte für 60 min bei Raumtemperatur. Eine Übersicht über die hier verwendeten Antikörper und Verdünnungen gibt Tab. 9. Nach weiteren Waschschritten erfolgte die Anfärbung der Zellkerne mit 200 ng/ml DAPI (Roche) in 1x PBS für 3 min, gefolgt von weiteren Waschschritten. Die Deckgläschen wurden auf Objektträgern mit 50 % Glycerol in PBS fixiert und im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt.

Tab. 9: Übersicht über die in der Immunzytologie verwendeten Antikörper sowie deren Verdünnungen

Primärantikörper			Sekundärantikörper	
Bezeichnung	Primärspezies	Verdünnung	Bezeichnung	Verdünnung
Rabbit-CAV2 (Abcam)	Schwein	1:50	Goat Anti-Rabbit IgG DyLight 594	1:400
	Mensch	1:100	Goat Anti-Rabbit IgG DyLight 594	1:400
Rabbit-CDC42 (Abcam)	Schwein	1:200	Goat Anti-Rabbit IgG DyLight 594	1:400
	Mensch	1:200	Goat Anti-Rabbit IgG DyLight 594	1:400

2.26 *In-vitro* Salmonelleninvasionsstudien

HT-29 Zellen wurden mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen pro Kavität in einer 24er Mikrotiterplatte ausgesät. Nach einer 24 stündigen Gentamicin-freien Kultivierung bei 37 °C und einer CO₂ Konzentration von 5 % erfolgte die Salmonelleninfektion. Die Inkubation mit den Salmonellen erfolgte für 2 h bei 37 °C, CO₂ 5 % mit einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 5. Im Anschluss wurden die Zellen mit RPMI Medium gewaschen und für 1 h mit RPMI Medium mit 10 % FBS und 50 µg/ml Gentamicin inkubiert, um extrazelluläre Salmonellen abzutöten. Daraufhin erfolgten drei Waschschrritte mit RPMI Medium, der letzte Waschschriftüberstand wurde auf Salmonellen/Shigellen Agar ausplattiert, um die Abtötung der extrazellulären Salmonellen sicherzustellen. Um eine Normalisierung der intrazellulären Salmonellen bezüglich der Zellzahl zu ermöglichen, wurden die Zellen mit Accutase abgelöst und die Zellkonzentration bestimmt. Die Zellsuspension wurde bei 10000 rpm für 15 min zentrifugiert und das verbleibende Zellpellet mit 0,1 % Triton X-100/ddH₂O lysiert. Je 100 µl dieser Lösung wurden im Triplikat auf Salmonellen/Shigellen Agar ausplattiert und bei 37 °C 20 h inkubiert. Die CFU wurde bestimmt, in dem alle schwarzen Kolonien einer Platte ausgezählt wurden, und mit Hilfe der Zellzahl normalisiert.

2.27 Generierung eines CAV2 Expressionsplasmids

Humanes CAV2 wurde von der Firma Invitrogen (GeneArt Synthesis) mit einer Optimierung der Codon Usage synthetisiert und in den Gateway® Vektor pDONR™221 kloniert.

Mittels der Restriktionsenzyme ClaI (Promega) und HindIII-HF (NEB GmbH) wurden 500 µg Plasmid sowie humanes CAV2 linearisiert. Anschließend wurde das humane CAV2 in das Expressionsplasmid pMIREX0 (Bohmer *et al.*, unpublizierte Daten) bei 20 °C für 45 min, gefolgt von einer Hitzeinaktivierung bei 65 °C für 10 min, ligiert. Die Transformierung erfolgte anhand der Methode von Hanahan (Hanahan 1983) in *E. coli* K12. Anhand der Ampicillin-Resistenz des Plasmids konnten positive Klone selektiert und mittels eines Verdau mit ClaI und HindIII-HF die erfolgreiche Ligation überprüft werden. Die Sequenzierung erfolgte wie unter 2.17 beschrieben. Endotoxin-freies Reporterplasmid (pMIREXCAV2) wurde mittels des NucleoBond Xtra Midi Plus EF Kits (Macherey Nagel GmbH & Co. KG) gemäß dem Herstellerprotokoll gewonnen.

2.28 Transfektionen

2.28.1 Allgemeine Transfektionsbedingungen

Die Transfektionen erfolgten mittels Elektroporation, mit Hilfe der Amaxa Nucleofactor Technologie (Lonza), bei der die Zellmembran durch Spannungsimpulse für Nukleinsäuren permeabel gemacht wurde. Die zu transfizierenden Zellen wurden drei Tage vor der Transfektion so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von ca. 80 % aufwiesen. Die Transfektion erfolgte nach Angaben des Herstellerprotokolls. Um die Zellen zu regenerieren, wurde im Anschluss an die Transfektion in jede Küvette RPMI Medium ohne FBS gegeben und anschließend in Eppendorfgefäße überführt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Erst danach wurden die Zellen in ihrem normalen Medium + FBS aufgenommen. Eine Übersicht über die speziellen Transfektionsbedingungen gibt Tab. 10.

Tab. 10: Spezielle Transfektionsbedingungen der einzelnen Zelllinien

Zelllinie	Zellzahl 3 Tage vor Transfektion	Zellzahl/Transfektion	Programm Nucleofactor Gerät	Lösung in der Zellen transfiziert wurden
HeLa	3x10 ⁵ Zellen/cm ²	5x10 ⁵	I-013	R
HT-29	3x10 ⁴ Zellen/cm ²	1x10 ⁶	W-017	R
IPEC-J2	2x10 ³ Zellen/cm ²	5x10 ⁵	A-020	L

2.28.2 miR-29a Transfektion

HT-29 Zellen sowie IPEC-J2 Zellen wurden wie unter 2.28.1 beschrieben transfiziert. Die einzelnen Transfektionsansätze sind in Tab. 11 dargestellt.

Tab. 11: miR-29a Transfektionsansätze

Ansatz	Transfektionsreagenz	Konzentration
1	miR-29a	100 pmol
2	Anti-miR-29a	100 pmol
3	nonsense	100 pmol
4	siRNA CAV2	100 pmol
5	pMIREXCAV2	1 µg
6	pMIREX0	1 µg

Um endogenes miR-29a zu binden und damit zu inhibieren, wurde im Ansatz #2 mit einem Anti-miR™ miRNA Inhibitor (Ambion) gegen miR-29a transfiziert. Um unspezifische Reaktionen ausschließen zu können, wurde im Ansatz #3 mit einer nonsense miRNA (Pre-miR miRNA Precursor Negative Control #1, Life technologies) transfiziert, die kein Zielgen besitzt. Mittels des Ansatzes #4 wurde die Translation von endogenem CAV2 inhibiert. Durch Transfektion mit dem Plasmid pMIREXCAV2, welches humanes CAV2 enthält, wurde CAV2 in der Zelle angereichert. Das Plasmid pMIREX0 diente ebenfalls als Kontrolle unspezifischer Reaktionen.

2.29 Reporterassays

2.29.1 Reporterplasmide

2.29.1.1 CAV2 Reporterplasmid

Zur Generierung von Reporterplasmiden wurden 100 pmol synthetische einzelsträngig-komplementäre Oligonukleotide, die die miR-29a Bindungsstelle des humanen bzw. porcinen CAV2 enthielten (sCAV2-as, sCAV2-s bzw. hCAV2-as, hCAV2-s, Abb. 6) für 1 min bei 90 °C denaturiert. Durch eine schrittweise Verringerung der Temperatur auf 22 °C in 1 °C Schritten im 10x NEB Ligationspuffer, folgte die Hybridisierung der Oligonukleotide. In einem weiteren Ansatz wurden Oligonukleotide hybridisiert, die mutagenisierte Nukleotide in der miR-29a Bindungsstelle enthielten (sCAV2m-as, sCAV2m-s bzw. hCAV2m-as, hCAV2m-s, Abb. 6). Die hybridisierten Nukleotide wurden anschließend in pTK-Gluc (NEB GmbH) mittels der Restriktionsenzyme NotI und XhoI (NEB GmbH) kloniert. Das Plasmid pTK-Gluc enthält die kodierende Sequenz für die sekretierende *Gaussia luciferase* unter der Kontrolle des Herpes Simplex Virus Thymidinkinase Promoters zur konstitutiven Expression in Säugetierzellen. Die G-Luc Sequenz wird gefolgt von einer multiplen Klonierungsstelle (MCS) mit Ansatz für mehrere Restriktionsenzyme (Abb. 7A). Mittels NotI und XhoI wurde das Plasmid linearisiert (Abb. 7B), in die MCS konnte im Anschluss die miR-29a Bindungsstelle von CAV2 ligiert werden. Die Ligation erfolgte mittels 200 ng des linearisierten pTK-Gluc und 150 ng der hybridisierten miR-29a Bindungsstelle in einem Gesamtvolumen von 20 µl mittels der T4 DNA Ligase (NEB GmbH) für 30 min bei 22 °C, gefolgt von einer Hitzeinaktivierung bei 65 °C für 10 min. Die Transformierung erfolgte anhand der Methode von Hanahan (Hanahan 1983) in *E. coli* K12. Positive Klone, die die miR-29a Bindungsstelle von CAV2 beinhalteten, wurden anhand der Ampicillin Resistenz des pTK-GLuc Vektors selektiert und sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte wie unter 2.17 beschrieben. Endotoxin-freie Reporterplasmide (pTKGhCAV2, pTKGhCAV2m bzw. pTKGsCAV2, pTKGsCAV2m) wurden mittels des NucleoBond Xtra Midi Plus EF Kits (Macherey Nagel GmbH & Co. KG), gemäß dem Herstellerprotokoll, gewonnen.

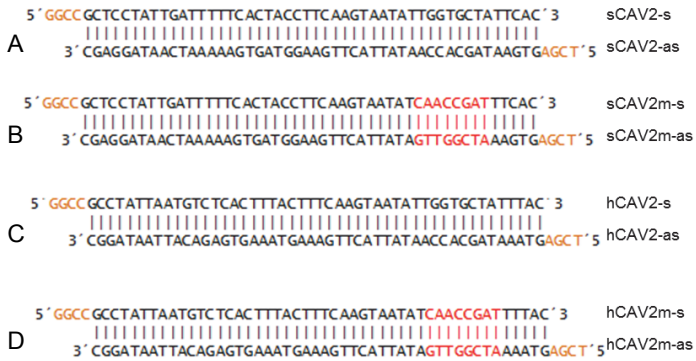


Abb. 6: Hybridisierung der miR-29a-Bindungsstelle enthaltenden Oligonukleotide porcin (**A**) bzw. human (**C**), Hybridisierung der mutagenisierten miR-29a Bindungsstelle (rote Nukleotide) porcin (**B**) bzw. human (**D**), gelbe Überhangnukleotide komplementär zur Klonierungsregion in pTKGLuc (**A-D**)

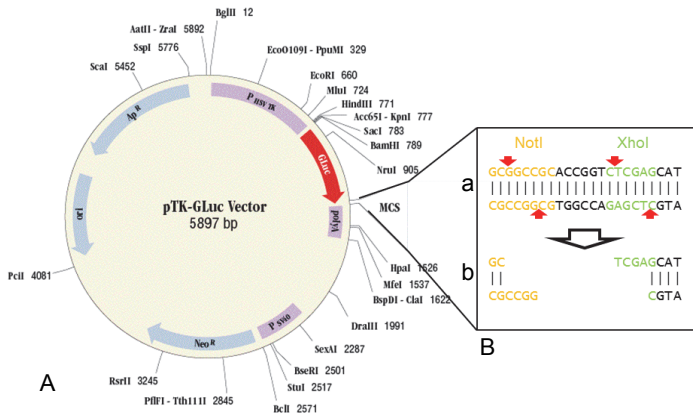


Abb. 7: (A) pTK-GLuc Vektor (NEB GmbH) mit enthaltener kodierender Sequenz für *Gaussia Luciferase* und der multiplen Klonierungsstelle (MCS) (B) Ausschnitt aus der MSC mit enthaltener Schnittstelle für die Restriktionsenzyme NotI sowie XhoI, gelbe Nukleotide: Erkennungssequenz für NotI, grüne Sequenz für XhoI; rote Pfeile die jeweilige Position der Schnittstelle (Ba), linearisiertes Plasmid mit 3' sowie 5'Überhang komplementär zu Hybridisierungsprodukten der Oligonukleotide mit enthaltener miR-29a Bindungsstelle von CAV2 (Bb)

2.29.1.2 SELPLG Reporterplasmid

Die Generierung der SELPLG Reporterplasmide (pTKGhSELPLG, pTKGhSELPLGm, pTKGsSELPLG, pTKGsSELPLGm) erfolgte wie unter 2.29.1.1 bereits für pTKGCAV2 beschrieben wurde. Eine Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide gibt Abb. 8.

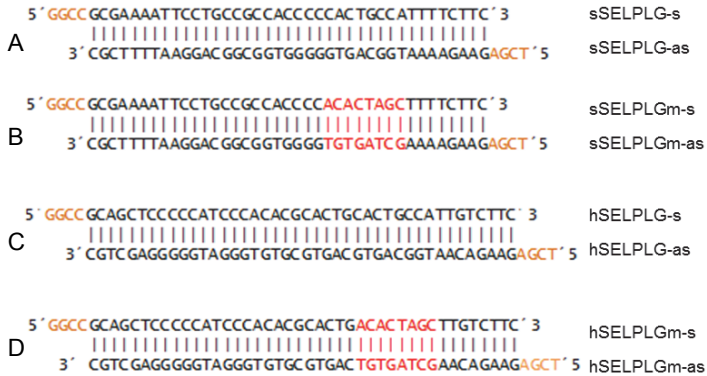


Abb. 8: Hybridisierung der miR-34a Bindungsstelle von SELPLG enthaltenden Oligonukleotide porcine (**A**) bzw. human (**C**), Hybridisierung der mutagenisierten miR-34a Bindungsstelle (rote Nukleotide) porcine (**B**) bzw. human (**D**), gelbe Überhangsnukleotide komplementär zur Klonierungsregion in pTKGLuc (**A-D**)

2.29.2 Transfektion

2.29.2.1 CAV2 Reporterassay

Die Reporterplasmide pTKGhCAV2, pTKGsCAV2 bzw. pTKGhCAV2m, pTKGsCAV2m wurden co-transfiziert mit dem Pre-miR miRNA Precursor hsa-miR-29a bzw. nonsense miRNA Pre-miR miRNA Precursor Negative Control #1 (Life technologies) und dem pTK-CLuc Plasmid (NEB GmbH). Die Transfektion der HeLa bzw. IPEC-J2 Zellen erfolgte wie unter 2.28.1 beschrieben. Die Transfektion mit der nonsense miRNA bzw. dem pTK-Gluc mit der mutagenisierten miR-29a Bindungsstelle von CAV2 diente als Kontrolle der Spezifität der Interaktion. Tab. 12 gibt einen Überblick über die Bedingungen (Zelllinien, eingesetzte Konzentrationen) der einzelnen Transfektionsansätze.

Tab. 12: Transfektionsansätze CAV2- miR-29a Reporterassay

	Transfektion # 1	Transfektion # 2	Transfektion # 3	Transfektion # 4	Zelllinie
hCAV2-hsa-miR29a					HeLa
hsa-miR29a	100 pmol	100pmol	-	-	
nonsense	-	-	100pmol	100pmol	
pTKGhCAV2	1800 ng	-	1800 ng	-	
pTKGhCAV2m	-	1800 ng	-	1800 ng	
pTKCLuc	86ng	86ng	86ng	86ng	
sCAV2-hsa-miR29a					IPEC-J2
hsa-miR29a	100 pmol	100pmol	-	-	
nonsense	-	-	100pmol	100pmol	
pTKGsCAV2	1800 ng	-	1800 ng	-	
pTKGsCAV2m	-	1800 ng	-	1800 ng	
pTKCLuc	86ng	86ng	86ng	86ng	

Nach einer 24 stündigen Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde der Überstand der adhären Zellen abgenommen. Die Messung der Gaussia und Cypridina Luciferase Aktivität erfolgte mit Hilfe des Bio Lux Assay Kits (NEB GmbH) nach Angaben des Herstellerprotokolls. Je 15 µl Überstand wurden als Triplikat in einer weißen 96er Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One GmbH) im automatisierten Luminometer FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech) gemessen. Von allen Messwerten wurde die Eigenlumineszenz des Mediums subtrahiert und mittels der CLuc-Aktivität, die ein Maß für die Transfektionseffizienz darstellt, normalisiert.

2.29.2.2 SELPLG Reporterassay

Die Co-Transfektion der Reporterplasmide pTKGhSELPLG, pTKGsSELPLG bzw. pTKGhSELPLGm, pTKGsSELPLGm mit dem Pre-miR miRNA Precursor hsa-miR-34a bzw. nonsense miRNA Pre-miR miRNA Precursor Negative Control #1 (Life technologies) und dem pTK-CLuc Plasmid (NEB GmbH) erfolgte wie unter 2.29.2.1 beschrieben. Tab. 13 gibt einen Überblick über die Transfektionsbedingungen.

Tab. 13: Transfektionsansätze SELPLG-miR-34a Reportersassay

	Transfektion # 1	Transfektion # 2	Transfektion # 3	Transfektion # 4	Zelllinie
hSELPLG-hsa-miR34a					HeLa
hsa-miR34a	100 pmol	100pmol	-	-	
nonsense	-	-	100pmol	100pmol	
pTKGhSELPLG	1000 ng	-	1000 ng	-	
pTKGhSELPLGm	-	1000 ng	-	1000 ng	
pTKCLuc	86ng	86ng	86ng	86ng	
sSELPLG-hsa-miR34a					IPEC-J2
hsa-miR29a	100 pmol	100pmol	-	-	
nonsense	-	-	100pmol	100pmol	
pTKGsSELPLG	1000 ng	-	1000 ng	-	
pTKGsSELPLGm	-	1000 ng	-	1000 ng	
pTKCLuc	86ng	86ng	86ng	86ng	

2.30 Proliferationsassay

Das Xcelligence RTCA System (Roche) ermöglichte Echtzeitmessungen von proliferierenden Zellen. Mit Hilfe von speziellen E-Plates, deren Boden mit Goldelektroden beschichtet waren, ließen sich Impedanzmessungen vornehmen. Über den sogenannten Zellindex, der einen dimensionslosen Parameter darstellt und sich aus der relativen Änderung der Impedanz ergab, ließen sich Aussagen über den Zellstatus treffen. Die Impedanz und damit auch der Zellindex waren abhängig von der Zellkonzentration, der Zellgröße sowie der Stärke der Interaktion zwischen Zellen und Boden.

Zu Beginn jedes Versuches wurde eine Hintergrundmessung mit jeweils 50 µl Medium + FBS/Kavität durchgeführt, um die Qualität der E-Plate zu messen. Nach jeder Zugabe von Medium oder Zellen wurde die Platte zunächst für 20 min bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert, um die Einstellung des pH Wertes des Mediums zu gewährleisten. Je Kavität wurde eine, in Vorversuchen ermittelte, optimale Zellkonzentration von 2×10^4 Zellen ausgesät. Als Kontrolle diente Medium + FBS ohne Zellen. Die Impedanzmessung erfolgte für 120 h alle 10 min, nach 24 h sowie 48 h wurde das Medium erneuert. Mittels dieses Proliferationsassays sollte der Einfluss der miR-29a, Anti-miR-29a, nonsense miRNA, CAV2 siRNA sowie einer Überexpression von CAV2 auf das Proliferationsverhalten von HT-29 und IPEC-J2 Zellen untersucht werden. Hierzu wurden die Zellen wie unter 2.28.2 beschrieben transfiziert. Jeder Transfektionansatz wurde als 6-fach Ansatz gemessen. Die Messung erfolgte für 120 h bis der Zellindex die Plateauphase erreicht hatte.

2.31 G-LISA Cdc42 und Rac1 Aktivierungs-Assay

CDC42 und Rac1 sind Rho GTPasen und können in einer GTP gebunden aktiven Form sowie in einer GDP gekoppelt inaktiven vorliegen. Im Western Blot wurde lediglich die Gesamtmenge an CDC42 nachgewiesen. Um jedoch eine Aussage über die Menge des aktiven CDC42 und Rac1 treffen zu können, wurde ein G-LISA durchgeführt. Dieser ermöglichte den spezifischen Nachweis der GTP gebundenen Form von CDC42 bzw. Rac1. Hierzu wurden HT-29 Zellen, wie unter 2.28.2 beschrieben, mit der miR-29a, Anti-miR-29a, nonsense miRNA, siRNACAV2, pMIREXCAV2 und pMIREX0 transfiziert. Im Anschluss an die Transfektion wurden die Zellen in einer Konzentration von 6×10^5 Zellen/Kavität in einer 6er Mikrotiterplatte ausgesät und für 48 h kultiviert (37 °C, 5 % CO₂). Die Zellen wurden anschließend mit je 100 µl Lysispuffer/Kavität lysiert. Die Durchführung des G-LISA erfolgte mit dem G-LISA[®] Cdc42 Activation Assay sowie des G-LISA[®] Rac1 Activation Assay (Cytoskeleton) gemäß dem Herstellerprotokoll. Für den CDC42 G-LISA wurden je 0,5 mg/ml und für den Rac1 G-LISA je 1 mg/mL Gesamtprotein eingesetzt. Die Absorption bei 490 nm wurde mit Hilfe des FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech) gemessen. Von der gemessenen Absorption jeder Probe wurde die Absorption der Hintergrundkontrolle subtrahiert.

3. Ergebnisse

3.1 Microarray Validierung

3.1.1 mRNA-Microarray

Die mittels Microarray erhaltenen Genexpressionsdaten wurden mit Hilfe von RT-qPCR Analysen verifiziert. Hierzu wurden 2 Referenzgene (GAPDH, UBC), 3 prominent exprimierte Gene (WAP-1, GPX2, HBD) in 5 Poolproben sowie die Common reference (CR) mittels RT-qPCR quantifiziert. Die Korrelation zwischen der Ratio Quantity (Quantity Poolprobe/Quantity CR) gegenüber der Ratio Fluoreszenz, welche aus der Microarrayanalyse erhalten wurde, wird in Abb. 9 gezeigt. Eine Korrelationsanalyse ergab einen Regressionskoeffizienten von 0,7969 (Pearson) und wies damit eine Linearität zwischen beiden Analysemethoden auf.

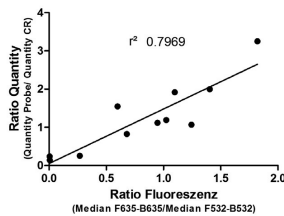


Abb. 9 Validierung der Microarrayanalyse: Korrelationsanalyse zwischen der Ratio Quantity, erhalten mittels RT-qPCR, gegenüber der Ratio Fluoreszenz erhalten aus der Microarrayanalyse.

3.1.2 miRNA-Microarray

Die mittels Microarray generierten miRNA Expressionsdaten wurden mit Hilfe eines RT-qPCR Arrays validiert. Die Quantifizierung erfolgte anhand von acht miRNAs (miR-21, miR-23b, miR-29a, miR-143, miR-146a, miR-296-3p, miR-423-3p sowie let-7e). Die Korrelation der fold change des RT-qPCR Arrays gegenüber der fold change der Microarrayanalyse wird in Abb. 10 gezeigt. Eine Korrelationsanalyse ergab einen Regressionskoeffizienten von 0,8511 (Pearson) und wies damit eine Linearität zwischen beiden Analysemethoden auf.

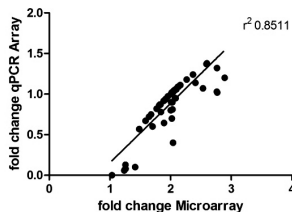


Abb. 10: Validierung der miRNA Microarrayanalyse: Korrelationsanalyse zwischen der fold change der RT-qPCR Arrays gegenüber der fold change der Microarrayanalyse.

Im Folgenden werden die Ergebnisse aus den Microarrayversuchen dargelegt. Hierbei wurde auf die postnatale Darmentwicklung im Ileum und Colon ascendens gemeinsam eingegangen. Ebenfalls wurden die Expressionsänderungen im Verlaufe einer Salmonelleninfektion betrachtet, wobei die Darmabschnitte Ileum und Colon ascendens getrennt voneinander untersucht wurden.

3.2 Postnatale Darmentwicklung im Ileum und Colon ascendens

3.2.1 mRNA-Microarrayanalyse

Zur besseren Verdeutlichung der zeitlich unterschiedlichen Genexpression in den Darmabschnitten Ileum und Colon ascendens wurden hier beide Darmabschnitte gemeinsam betrachtet. Eine getrennte Auswertung vom Ileum und Colon ascendens ergab die gleichen hier dargelegten Ergebnisse. In die Auswertung wurden die Zeitpunkte 7 d, 14 d, 28 d, 31 d, 35 d und 56 d *post natum* (p.n.) einbezogen. Insgesamt waren 278 Gene bei diesen Zeitpunkten differentiell reguliert, mit einer log₂ Ratio zwischen -3,1 bis +2,93 (fold change 0,12 bis 7,62). Die optimale Clusteranzahl, ermittelt anhand des Figure of Merit (FOM) Algorithmus, lag bei 6. Die mittels der anschließenden K-Means Clusteranalyse (KMC) erhaltenen 6 Cluster beinhalteten zwischen 17-103 Gene. Im Ileum zeigten sich in vier Clustern entwicklungsabhängige Expressionsunterschiede, absetzspezifische Unterschiede konnten in drei Clustern nachgewiesen werden. Im Colon ascendens wurden in allen Clustern entwicklungs- sowie absetzspezifische Expressionsunterschiede nachgewiesen.

Eine Pathwayanalyse mittels DAVID (Huang *et al.* 2009) wurde mit allen Clustern durchgeführt, um eine Akkumulation von Genen der jeweiligen Cluster in Pathways nachweisen zu können. Eine Übersicht über alle 6 Cluster und die Beteiligung der Clustergene an KEGG Pathways gibt Tab. 14.

Tab. 14: Übersicht über generierte Cluster und die Beteiligung an KEGG Pathways während der postnatalen Darmentwicklung

Cluster	Anzahl Cluster-gene	KEGG Pathway, p-value	Gene
1	34	Antigen processing and presentation p<0,08	Hsp90ab1, CD74
2	32	Ribosome p<0,0001 pathogenic <i>E. coli</i> Infection p<0,002 oxidative Phosphorylation p<0,02	RPL10, RPL18a, RPL28a, RPL8, RPS16, RPS19, RPS27a, RPSA9, RPLP0, RPLP2 ACTB, ACTG1, TUBA1B, TUBA1C ATP5G2, ATP5B, ATP6V0C, PPA2
3	17	Glutathione metabolism p<0,085	GSTP1, MGST3
4	58	Ribosome p<0,0001 oxidative Phosphorylation p<0,0001	RPL12, RPL14, RPL23, RPL23a, RPL24, RPL27, RPL30, RPL36, RPL36a, RPL37, RPL38, RPL6, RPL7, RPL9, RPS11, RPS12, RPS13, RPS15a, RPS23, RPS24, RPS25, RPS29, RPS3A, RPS4X ATP5E, CYTB, NDUFB1, NDUFS1, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS5, NDUFS6, COX7B, COX7C, COX6B1
5	102	Lysine degradation p<0,03 ECM receptor interaction p<0,09	WHSC1L1, EHMT2, HADH COL1A1, COL4A1, DAG1
6	35	-	

Gene des Clusters 1 zeigten beispielsweise eine Beteiligung im KEGG Pathway „Antigen processing and presentation“ (p<0,08), wie zum Beispiel Iga2C. In Cluster 1 befanden sich Gene, die über den Zeitverlauf in beiden Darmabschnitten gleich reguliert waren, jedoch mit unterschiedlicher Expressionshöhe. Bei frühen Entwicklungszeitpunkten stieg die Expression signifikant 1,4-fach an, fiel zum Absetzen 0,57-fach ab und stieg anschließend wieder an. Der Cluster 2 beinhaltete Gene, die kurz nach dem Absetzen vom Muttertier (31 d p.n.) einen

signifikanten 1,3-fachen Anstieg in der Expression zeigten. Im Zeitraum vor dem Absetzen waren die Gene zum Zeitpunkt 7 d p.n. 2-fach höher exprimiert als 14 d p.n. Gene des Clusters 2 waren in folgenden KEGG Pathways akkumuliert: „pathogenic *E. coli* Infektion“ ($p < 0,002$), „Ribosome“ ($p < 0,0001$) und „oxidative Phosphorylation“ ($p < 0,02$). In Abb. 11 sind Heat maps der Cluster 1 und 2 dargestellt. Ein Überblick über die log2 Ratio aller Cluster bietet Abb. 41 im Anhang (Seite 107).

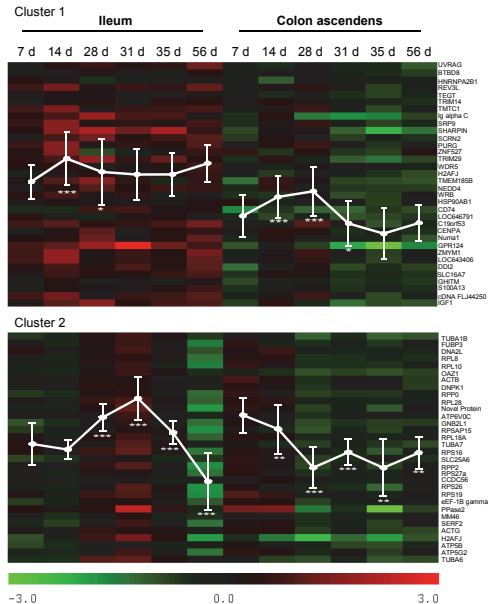


Abb. 11: Heat maps mit integriertem Centroid Graphen: Heatmaps von zwei mRNA Clustern (**Cluster 1 + 2**). Farbskala von log2 Ratio -3 bis +3; grün: verringerte Genexpression; rot: erhöhte Genexpression. Jede Spalte eines Heat maps symbolisiert die einzelne Hybridisierung (Gruppe je Zeitpunkt), sowie die Zeilen die einzelnen Gene. Signifikanzen jeweils zum vorhergehenden Zeitpunkt berechnet mittels Mann-Whitney U-Test * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Ausgewählte Kandidatengene (CAL1L, GPX2, APOA1, COL26A1; Iga2C, TCR und HLA-F), die mittels der Microarrayanalyse identifiziert wurden und während der postnatalen Darmentwicklung eine entscheidende Rolle spielen könnten, wurden mittels RT-qPCR quantifiziert und bestätigten entwicklungs- und absetzspezifische Expressionsunterschiede während der postnatalen Darmentwicklung (3.2.1.1-3.2.1.3).

3.2.1.1 Entwicklungs- und Absetzeffekte bei CAL1L und GPX2

Im Colon ascendens zeigte CAL1L eine stetige Abnahme der Expression über den Verlauf der Entwicklung bis diese 31 d p.n. stagnierte (Abb. 12D). Im Ileum war die Expression 7 d p.n. am höchsten, fiel zum Zeitpunkt 14 d p.n. signifikant 1,9-fach ab und zeigte direkt zum Absetzen eine weitere 1,3-fache Abnahme der Expression (Abb. 12C). Das Expressionsniveau lag im Colon ascendens 4-fach höher im Vergleich zum Ileum. GPX2

zeigte in beiden Darmabschnitten einen Effekt während des Absetzens. Im Ileum stieg die Expression 35 d p.n. 1,7-fach an (Abb. 12A). Im Colon ascendens fiel sie hingegen 31 d p.n. 1,5-fach ab und stieg im Anschluss wieder auf das Ausgangsexpressionsniveau an, welches 10-fach höher lag als im Ileum (Abb. 12B). Das mittels Microarray erhaltene Expressionsprofil konnte hier bestätigt werden.

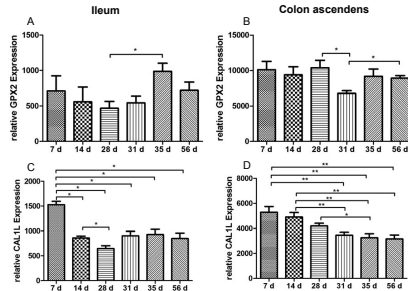


Abb. 12: RT-qPCR Expressionsdaten von GPX2 (A,B) und CAL1L (C,D) im Ileum und Colon ascendens während der postnatalen Darmentwicklung (7 d bis 56 d p.n.). Statistische Analysen wurden mittels Mann-Whitney U-Test durchgeführt * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

3.2.1.2 Entwicklungseffekte bei APOA1 und COL26A1

Das Apolipoprotein A1 (APOA1) und Collagen 26A1 (COL26A1) zeigten ein ähnliches Expressionsmuster. In beiden Darmabschnitten sank die APOA1 Expression im Verlauf der postnatalen Darmentwicklung 57- bzw. 4-fach ab. Im Ileum blieb sie bereits ab 14 d p.n. konstant, im Colon ascendens erst ab 31 d p.n. (Abb. 13A/B). Das Expressionsniveau war im Ileum 7 d p.n. 100-fach höher, zu späteren Zeitpunkten 5-fach höher als im Colon ascendens. Die COL26A1 Expression sank im Ileum 14 d und 28 d p.n. signifikant 10-fach ab (Abb. 13C). Im Colon ascendens verringerte sich die Expression stetig bis 56 d p.n. (Abb. 13D). Das Expressionsniveau lag im Ileum 7 d und 14 d p.n. 100-fach höher im Gegensatz zum Colon ascendens.

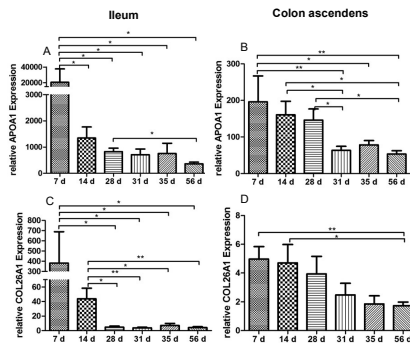


Abb. 13: RT-qPCR Expressionsdaten von APOA1 (A,B) und COL26A1 (C,D) im Ileum und Colon ascendens während der postnatalen Darmentwicklung (7 d bis 56 d p.n.). Statistische Analysen wurden mittels Mann-Whitney U-Test durchgeführt * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

3.2.1.3 Entwicklungs- und Absetzeffekte bei Genen der adaptiven Immunantwort

Das Immunglobulin A (Iga2C), welches auf Schleimhäuten sezerniert wird, zeigte in beiden Darmabschnitten einen signifikanten Anstieg im Expressionsniveau im Verlaufe der Entwicklung. Im Ileum lag dieser bei einer 9-fachen Erhöhung und stagnierte ab 28 d p.n. (Abb. 14A). Im Colon ascendens konnte eine 166-fach verstärkte Expression bis 56 d p.n. nachgewiesen werden (Abb. 14B). Der T Zellrezeptor (TCR) war im Ileum bis 35 d p.n. konstant exprimiert und stieg 56 d p.n. 2-fach an (Abb. 14C). Im Colon ascendens hingegen war 7 d p.n. die Expression am geringsten und blieb ab 14 d p.n. konstant (Abb. 14D). Auch hier konnte ein entwicklungsbedingter Einfluss nachgewiesen werden. In beiden Genen wurden jedoch keine Absetzeffekte nachgewiesen. HLA-F, das zum Majorhistokompatibilitätskomplex Klasse I gerechnet wird, wies im Ileum kein differentielles Expressionsmuster auf (Abb. 14E), im Colon ascendens wurde ein Absetzeffekt beobachtet. 28 d p.n. stieg die Expression 3-fach an und fiel danach auf Anfangsniveau zurück (Abb. 14F). Das mittels Microarray ermittelte Expressionsprofil von Cluster 1 (Abb. 11, Seite 49) konnte somit ebenfalls bestätigt werden.

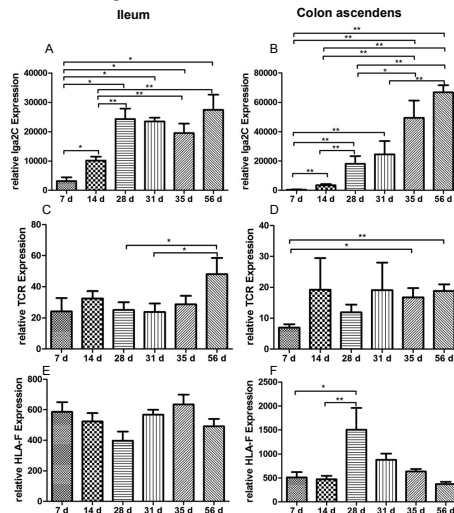


Abb. 14: RT-qPCR Expressionsdaten von Kandidatengenen der adaptiven Immunantwort: Iga2C (A,B), TCR (C,D), HLA-F (E,F) im Ileum und Colon ascendens während der postnatalen Darmentwicklung (7 d bis 56 d p.n.). Statistische Analysen wurden mittels Mann-Whitney U-Test durchgeführt * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

3.2.2 miRNA-Microarrayanalyse

In die Auswertung wurden analog zur mRNA Microarrayauswertung die Zeitpunkte 7 d, 14 d, 28 d, 31 d, 35 d und 56 d p.n. beider Darmabschnitte einbezogen. Insgesamt waren 105 miRNAs exprimiert, mit einer \log_2 Ratio zwischen -3,23 und +3,5 (fold change 0,11 bis 11,3). Die FOM Analyse ergab eine optimale Clusteranzahl von 5. Die anhand der KMC Analyse erhaltenen 5 Cluster enthielten zwischen 9-27 miRNAs. Auffallend ist hier, dass die miRNAs über den Verlauf der postnatalen Darmentwicklung sowie zum Zeitpunkt des Absetzens wenig differentiellement reguliert waren. Nur in Cluster 2, 3 und 5 konnten signifikante

Expressionsunterschiede beschrieben werden (Abb. 15). In Cluster 2 befanden sich miRNAs, die zum Zeitpunkt des Absetzens im Ileum signifikant 1,5-fach höher exprimiert waren. MiRNAs aus Cluster 3 zeigten zu frühen Zeitpunkten (7 d und 14 d p.n.) eine differentielle Regulierung in beiden Darmabschnitten. Im Ileum zeigte sich ein Anstieg, im Colon ascendens ein Abfall der Expression. Zum Zeitpunkt des Absetzens stieg die Expression 1,2-fach im Colon ascendens an. In Cluster 5 befanden sich miRNAs, die im Ileum zum Absetzen 1,3-fach verstärkt exprimiert waren. Cluster 1 und 4 zeigten keine differentielle Expression (Daten nicht gezeigt).

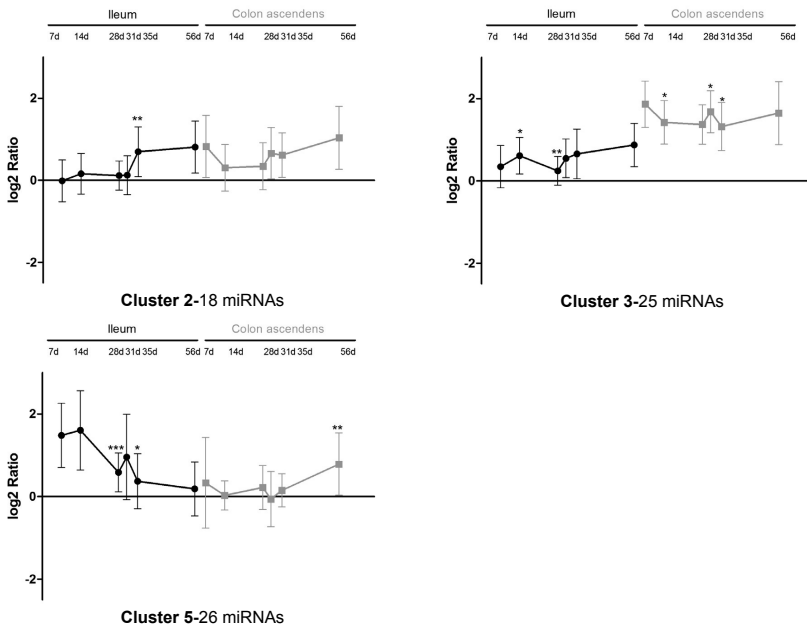


Abb. 15: miRNA Centroid Graphen: Übersicht über die durchschnittlichen log₂ Ratios der Cluster 2, 3 und 5, generiert aus den miRNA-Expressionsdaten, im Verlauf der postnatalen Darmentwicklung (7 d bis 56 d p.n.). Violette Kurve: Ileum; grüne Kurve: Colon ascendens. Signifikanzen jeweils zum vorhergehenden Zeitpunkt berechnet mittels Mann-Whitney U-Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Um den Einfluss der miRNAs, die zum Zeitpunkt des Absetzens differentiellement reguliert waren, besser zu charakterisieren, wurden diejenigen miRNAs ermittelt, die im Bereich des Absetzens (28 d – 35 d p.n.) ein differentielles Expressionsprofil aufwiesen. Mittels MAGIA Query (Sales *et al.* 2010) erfolgte mit diesen 17 miRNAs eine Targetanalyse, mit Hilfe der Algorithmen TargetScan und miRanda. Dies führte zur Ermittlung von 548 potentiellen Zielgenen. Eine Pathwayanalyse dieser 548 potentiellen Zielgene mittels DAVID ergab Pathways, die ebenfalls während der Absetzphase durch mRNA angesprochen wurden. Hierbei handelte es sich um den „Pathway in cancer“ ($p < 0,0001$), „Regulation of actin cytoskeleton“ ($p < 0,0006$), „focal adhesion“ ($p < 0,0009$), „Fc gamma R-mediated phagocytosis“ ($p < 0,004$), „Endocytosis“ ($p < 0,01$) und „MAPK signaling pathway“ ($p < 0,005$).

Des Weiteren wurden die Pathways „Calcium signaling pathway“ ($p < 0,003$), sowie „Adherens junction“ ($p < 0,004$) angesprochen.

3.2.3 Integrative Analyse der generierten mRNA und miRNA Expressionsprofile

Eine integrative Analyse der mRNA und miRNA Datensätze wurde mit Hilfe der Internetplattform MAGIA (Sales *et al.* 2010) ermöglicht. MAGIA ermittelt aus generierten mRNA sowie mRNA Expressionsprofilen diejenigen, die negativ zueinander korrelieren. Gleichzeitig integriert MAGIA die theoretischen Vorhersagen über miRNA-Zielgen Interaktionen anhand von TargetScan, PITA sowie miRanda. MAGIA ist bis jetzt nur für humane miRNA Vorhersagen ausgelegt, für porcine miRNAs besteht die Möglichkeit eines solchen Tools nicht. Aus diesem Grund sind in die MAGIA Auswertung nur miRNAs mit einbezogen worden, die Spezies übergreifend konserviert waren. Zur Vorhersage potentieller Interaktionen wurde der Algorithmus TargetScan sowie PITA verwendet. Die Analyse ergab 701 potentielle Interaktionen. Von diesen wurden nur die in die weitere Auswertung mit einbezogen, die einen Regressionskoeffizienten (Pearson r) von $< -0,5$ aufwiesen. Einen Überblick über die potentiellen miRNA-Zielgen Interaktionen gibt Tab. 17 (Seite 108, im Anhang).

Die resultierenden 73 Interaktionen von 27 miRNAs und 34 Zielgenen wurden mittels Cytoscape (Cline *et al.* 2007) in Abb. 16 graphisch dargestellt. Eine Pathwayanalyse mit den 34 Zielgenen ergab eine Beteiligung der Gene FLT1, ACTG1 und IGF1 im KEGG Pathway „focal adhesion“ ($p < 0,037$) sowie der Gene RALBP1, IGF1 und RUNX1T1 im Pathway „Pathway in cancer“ ($p < 0,09$). Die hier angesprochenen Pathways zeigten somit ebenfalls eine Übereinstimmung zu den während der Absetzphase aus mRNA und miRNA erhaltenen. Die miRNAs let-7a/d, miR-30b/c/d, miR-26a, miR-27b, miR-130a, miR-152, miR-148a, miR-215 und miR-361-5p zeigten im Colon ascendens eine absetzspezifische Zunahme der Expression (Abb. 15 Cluster 3, Seite 52), ein potentielles Zielgen stellt der insulinähnliche Wachstumsfaktor (IGF1) dar. IGF1 steuert über den AKT signaling Pathway das Zellwachstum und die Proliferation. Aktin-gamma 1 ist in die Zellmotilität involviert und wurde potentiell über die miR-145 reguliert. Das *ralA* Bindungsprotein (RALBP1) spielt eine Rolle bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose. Ermittelt anhand der integrativen Analyse, stellten die miR-145, miR-130a und miR-152 potentielle Regulatoren von RALBP1 dar (Abb. 16). Hier konnten anhand der integrativen Analyse Vorhersagen über potentielle Regulatoren von zellulären Vorgängen, die insbesondere während der Absetzphase von Bedeutung sind, beschrieben werden.

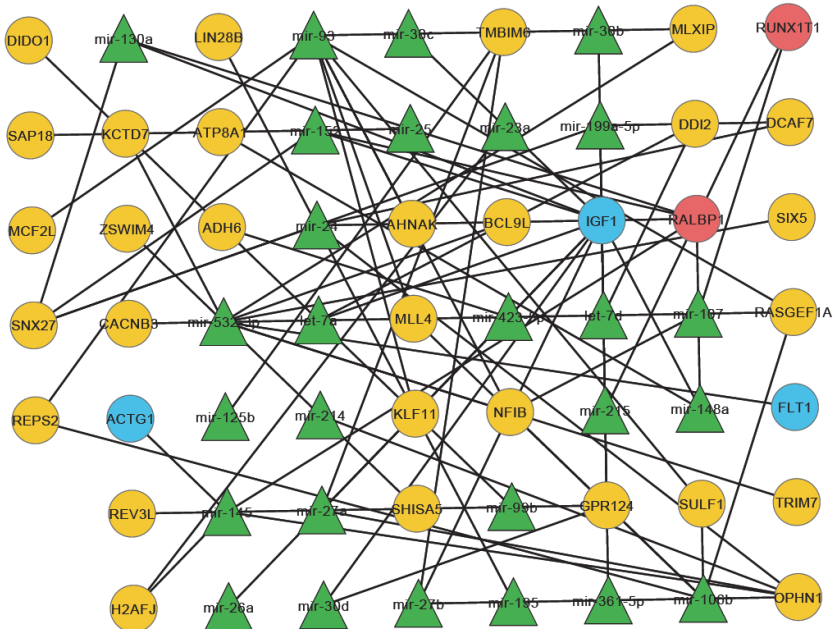


Abb. 16: Cytoscape Netzwerk: graphische Darstellung der Interaktionen erhalten aus der MAGIA Analyse. **Dreiecke:** miRNA; **Kreise:** Zielgene; **türkise Kreise:** Gene aus KEGG Pathway „focal adhesion“, **rote Kreise:** Gene aus KEGG Pathway „Pathway in cancer“. **Schwarze Linien:** Interaktionen durch MAGIA hervorgesagt.

3.3. Experimentelle Salmonelleninfektion-Colon ascendens

3.3.1. mRNA-Microarrayanalyse

In die Auswertung wurden die Zeitpunkte 3 h, 1 d, 3 d sowie 28 d *post infectionem* (p.i.) einbezogen. Zum Zeitpunkt 1 d p.i. waren keine Proben der Kontrollgruppe verfügbar, der Zeitpunkt wurde jedoch in die Colon ascendens Auswertung mit einbezogen, da Analysen der Expressionsprofile besonders zu diesem Zeitpunkt eine differentielle Expression zwischen der Salmonellen (S) und Salmonellen/*E. faecium* Gruppe (SP) zeigten. Insgesamt waren 534 Gene zu diesen Zeitpunkten differentiell reguliert, mit einer log₂ Ratio zwischen -4,0 bis +3,0 (fold change 0,063 bis 8). Die optimale Clusteranzahl, ermittelt anhand des FOM Algorithmus, lag bei 10. Die mittels der anschließenden KMC Analyse erhaltenen 10 Cluster beinhalteten zwischen 21-86 Gene. Einen Überblick über alle 10 Cluster und deren mittlere log₂ Ratios gibt Abb. 42 im Anhang (Seite 110). Besondere Beachtung wurde den Clustern 4,6 und 9 geschenkt, da diese deutliche Expressionsunterschiede im Verlaufe der Samonelleninfektion im Colon ascendens zeigten. Heat maps dieser Cluster sind in Abb. 17 dargestellt.

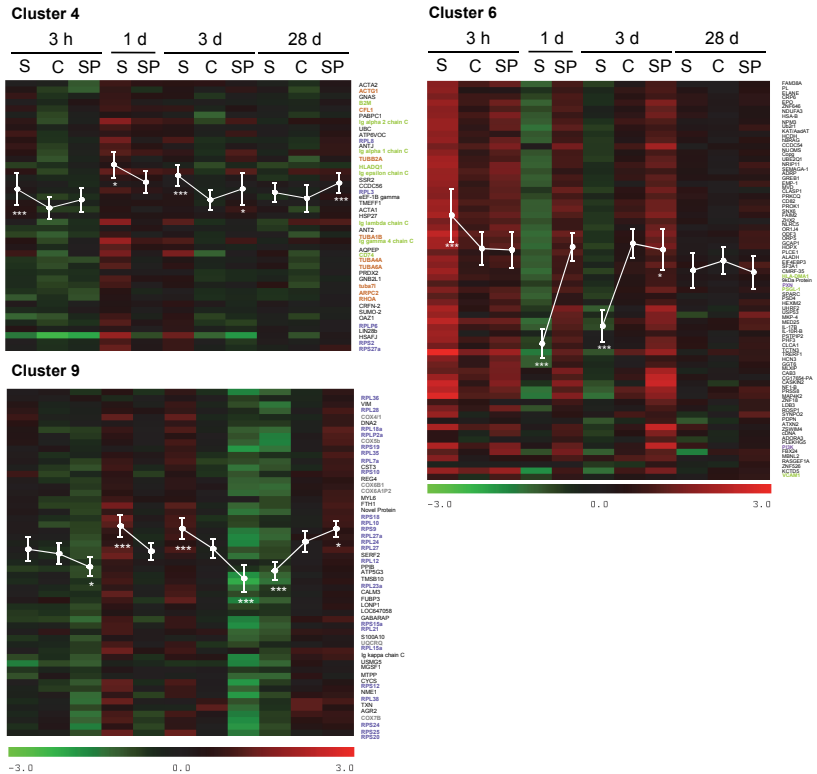


Abb. 17: Heat maps mit integriertem Centroid Graphen: der Cluster 4, 6 und 9. Farbskala von log₂ Ratio -3 bis +3; grün: verringerte Genexpression; rot: erhöhte Genexpression. **Grüne Gene:** Beteiligung in immunologischen Pathways, **orange Gene:** Beteiligung im KEGG Pathway „Regulation of actin cytoskeleton“ und pathogener *E. coli* Infektion, **violette Gene:** KEGG Pathway „Ribosome“, **graue Gene:** KEGG Pathway „oxidative Phosphorylierung“. Signifikanzen gegenüber der Kontrollgruppe mittels Kruskal Wallis Test und Dunns Post Test ermittelt * p≤0,05, ** p≤0,01, *** p≤0,001.

Um eine Akkumulation von Genen der jeweiligen Cluster in Pathways nachzuweisen, wurde eine Pathwayanalyse mittels DAVID mit allen Clustern durchgeführt. Eine Übersicht über alle 10 Cluster und die Beteiligung der Clustergene an KEGG Pathways gibt Tab. 15. Gene des Clusters 4 akkumulierten beispielsweise in den KEGG Pathways „pathogenic *E. coli* Infektion“, „gap junction“, „Ribosome“, „Antigen processing and presentation“ sowie „Regulation of actin cytoskeleton“. Das Expressionsmuster von Cluster 4 zeigte zum Zeitpunkt 1 d p.i. eine signifikante 1,5-fach verstärkte Expression in der S-Gruppe im Vergleich zur SP-Gruppe. Zum Zeitpunkt 3 d p.i. zeigte die S-Gruppe eine 1,7-fach verstärkte sowie die SP-Gruppe eine 1,3-fach erhöhte Expression im Gegensatz zur

Kontrolle. Gene des Clusters 6 waren über den gesamten Verlauf in der S-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle differentiell exprimiert, die SP-Gruppe hingegen zeigte kein verändertes Expressionsmuster. Zum Zeitpunkt 1 d p.i war die Expression in der S-Gruppe im Vergleich zur SP-Gruppe signifikant (0,27-fach) verringert und 3 d p.i. im Vergleich zur Kontrolle (0,32-fach). Eine Pathwayanalyse ergab hierbei eine Beteiligung im KEGG Pathway „Cell adhesion molecules“ ($p < 0,02$). Gene des Clusters 9 akkumulierten in den KEGG Pathways „Ribosome“ und „oxidative Phosphorylation“ und waren in der S-Gruppe zu frühen Infektionszeitpunkten (1 d und 3 d p.i.) signifikant verstärkt exprimiert, im Gegensatz zur Kontrolle bzw. SP-Gruppe (1,8-fach sowie 1,6-fach). Die Expression in der SP-Gruppe war dem hingegen ebenfalls 3 d p.i. signifikant zur Kontrolle verringert (0,45-fach). Zum späten Zeitpunkt war die Expression im Vergleich zur Kontrolle in der S-Gruppe 0,5-fach verringert und in der SP-Gruppe 1,4-fach verstärkt.

Tab. 15: Übersicht über generierte Cluster und die Beteiligung an KEGG Pathways während einer Salmonelleninfektion im Colon ascendens

Cluster	Anzahl Clustergene	KEGG Pathway; p-value	Gene
1	59	focal adhesion ($p < 0,005$)	IGF1, TLN1, THBS4, VAV1
2	21	-	-
3	64	Ribosome ($p < 0,0001$) oxidative Phosphorylation ($p < 0,0001$)	RPL10a, RPL11, RPL23, RPL34, RPL36a, RPL37, RPL37a, RPL4, RPL9, RPL6, RPL7, RPS11, RPS13, RPS16, RPS17, RPS23, RPS29, RPS3a, RPS4x, RPS6, RPS8, RPS5, RPSA ATP5L, CYTB, CYTC, NDUFB1, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS4L, NDUFS5, NDUFS6, COX7C, COX6C
4	43	pathogenic <i>E. coli</i> Infection ($p < 0,0001$) gap junction ($p < 0,0005$) Ribosome ($p < 0,006$) Antigen processing and presentation ($p < 0,05$) Regulation of actin cytoskeleton ($p < 0,06$)	ACTG1, TUBA1B, ARPC2/3, RHOA, TUBA4A, TUBA1C, TUBB2A GNAS, TUBA4A, TUBA1C, TUBB2A, TUBA1B RPL3, RPL8, RPS27a, RPLP0 CD74, B2M, HLA-DQA1 ACTG1, ARPC2/3, CFL1, RAC2
5	46	Glutathione metabolism ($p < 0,02$)	GSTP1, GPX2, MGST3
6	86	cell adhesion molecules ($p < 0,02$)	HLA-DMA1, SELPLG, VCAM1
7	81	Antigen processing and presentation ($p < 0,0001$) cell adhesion molecules ($p < 0,02$) Endocytosis ($p < 0,05$) focal adhesion ($p < 0,06$)	CTSB, HLA-B, HLA-E, HLA-F, HLA-G HLA-B, HLA-E, HLA-F, HLA-G HLA-B, HLA-E, HLA-F, HLA-G ELK1, ACTB, COL1A1, COL4A1
8	64	ECM-receptor interaction ($p < 0,02$)	COL3A1, DAG1
9	46	Ribosome ($p < 0,0001$) oxidative Phosphorylation ($p < 0,001$)	RPL10, RPL12, RPL15, RPL18a, RPL23a, RPL24, RPL27, RPL27a, RPL28, RPL36, RPL38, RPL7a, RPS10, RPS12, RPS15a, RPS19, RPS24, RPS25, RPS9, RPS2 ATP5G3, COX4/1, COX7B, COX5B, COX6B1, UQCQRQ
10	70	cell adhesion molecules ($p < 0,05$) Wnt signaling pathway ($p < 0,07$)	CD8b, L1CAM CER1, NKD1, PPP2R5D

3.3.2. miRNA-Microarrayanalyse

In die Auswertung wurden die Zeitpunkte 3 h, 1 d, 3 d sowie 28 d p.i. einbezogen. Insgesamt waren 113 miRNAs exprimiert, mit einer log₂ Ratio zwischen -3 und +3 (fold change 0,13 bis 8,57). Die FOM Analyse ergab eine optimale Clusteranzahl von 5. Die anhand der KMC Analyse erhaltenen 5 Cluster enthielten zwischen 18-29 miRNAs. Generell war festzustellen, dass vor allem miRNAs in der SP-Gruppe zum Zeitpunkt 3 d und 28 d p.i. differentiell reguliert waren im Vergleich zur S- und C-Gruppe. Der Anteil von unregulierten miRNAs im Verlaufe der Infektion in der SP-Gruppe lag bei 35 %, in der S-Gruppe sogar bei 61 %. Nur Cluster 1 und 2 zeigten Gene die in SP-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle signifikant reguliert waren (Abb. 18). In der S-Gruppe konnte im Vergleich zur Kontrolle in keinem Cluster signifikante Expressionsunterschiede nachgewiesen werden. Cluster 2 zeigte miRNAs, die über den Verlauf der Infektion in der SP-Gruppe signifikant verringert exprimiert waren, in der S-Gruppe war eine verringerte Expression zum Zeitpunkt 3 d p.n. nachweisbar. Cluster 1 beinhaltete miRNAs, die im Vergleich zur Kontrolle in der SP-Gruppe zum Zeitpunkt 3 d und 28 d p.i. verringert (0,5-fach) exprimiert waren. Die S-Gruppe zeigte keinen Unterschied zur C-Gruppe.

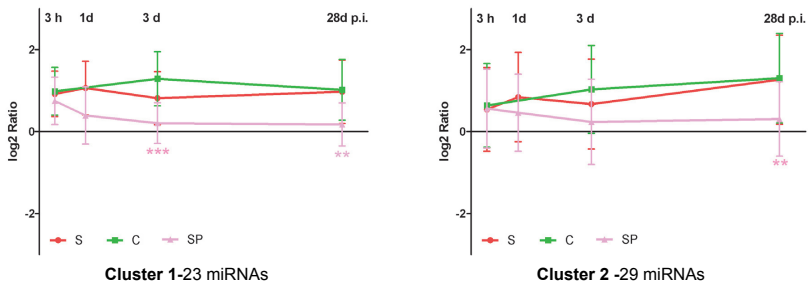


Abb. 18 miRNA Centroid Graphen im Colon ascendens: Übersicht über die durchschnittlichen log₂ Ratios von Cluster 1 und 2, generiert aus den miRNA-Expressionsdaten, im Verlaufe der Salmonelleninfektion (rot), der Kontrollgruppe (grün) sowie der Salmonellen-Probiotikum Gruppe (blassrosa) (3 h bis 28 d p.i.). Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe zu 3 h, 3 d und 28 d p.i., zum Zeitpunkt 1 d p.i. im Vergleich zur SP-Gruppe mittels Kruskal Wallis Test und Dunns Post Test ermittelt, * p≤0,05, ** p≤0,01, *** p≤0,001.

Um die Bedeutung der unterschiedlichen miRNA Regulierung zu späten Zeitpunkten in der SP-Gruppe deuten zu können, wurden Targetanalysen der miRNAs mit differentiellem Expressionsmuster im Gegensatz zur S- und C-Gruppe durchgeführt. Die Analyse erfolgte dabei mittels MAGIA Query mit 42 miRNAs, die zwischen Mensch und Schwein konserviert waren, wobei mit einer Übereinstimmung von TargetScan und miRanda gearbeitet wurde. Hierbei konnten 20 miRNAs und 492 potentiell von ihnen regulierte Zielgene identifiziert werden. Anhand einer Pathwayanalyse mittels DAVID konnten die Zielgene folgenden Pathways zugeordnet werden „Pathways in cancer“ (p<0,0001), „Endocytosis“ (p<0,005), „Regulation of actin cytoskeleton“ (p<0,005) sowie „focal adhesion“ (p<0,01).

3.3.3. Integrative Analyse der generierten mRNA und miRNA Expressionsprofile

Die Integrative Analyse wurde, wie bereits unter 3.2.3, beschrieben, durchgeführt. Die Gesamtheit der mRNA und miRNA Expressionsprofile wurde in die Auswertung einbezogen. Die Analyse ergab 1015 potentielle Interaktionen. Von diesen wurden nur die in die weitere Auswertung einbezogen, die einen Regressionskoeffizienten (Pearson r) von $< -0,5$ aufwiesen. Tab. 18 (Seite 110, im Anhang) gibt einen Überblick über die potentiellen miRNA-Zielgen Interaktionen.

Die resultierenden 55 Interaktionen von 24 miRNAs und 25 Zielgenen wurden mittels Cytoscape graphisch dargestellt (Abb. 19). Eine Pathwayanalyse mit den 25 Zielgenen ergab eine Beteiligung der Gene COL4A1, ELK1 und IGF1 im KEGG Pathway „focal adhesion“ ($p < 0,01$) sowie der Gene COL4A1, IGF1 und RUNX1T1 im „Pathway in cancer“ ($p < 0,05$). COL4A1 ist Bestandteil der Basalmembran und wurde potentiell durch die miR-21, miR-23a/b, miR-29a und let-7a/d reguliert. Die Transkriptionsfaktoren ELK1 und RUNX1T1 wurden potentiell durch miR-185 bzw. miR-23b/c reguliert. Die miR-152 stellte einen potentiellen Regulator für IGF1 dar.

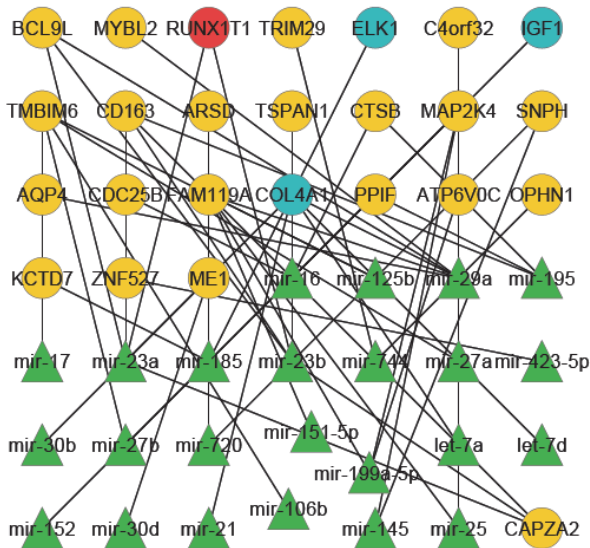


Abb. 19 Cytoscape Netzwerk *Colon ascendens*: graphische Darstellung der Interaktionen erhalten aus der MAGIA Analyse. **Dreiecke:** miRNA; **Kreise:** Zielgene; **türkise Kreise:** Gene aus KEGG Pathway „focal adhesion“; **rote Kreise:** Gene aus KEGG Pathway „Pathway in cancer“. **Schwarze Linien:** Interaktionen durch MAGIA hervorgesagt.

Eine Quantifizierung einiger hier dargestellter miRNAs (miR-21, miR-23b und miR-29a) mittels eines miRNA spezifischen RT-qPCR Arrays (Abb. 20) ergab für die miR-29a eine signifikant verringerte Expression in der S- und SP-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle (3 h p.i.

0,46 bzw. 0,4 fach sowie 3 d p.i. 0,66 fach). Das mittels Microarray erhaltene Expressionsprofil konnte somit bestätigt werden.

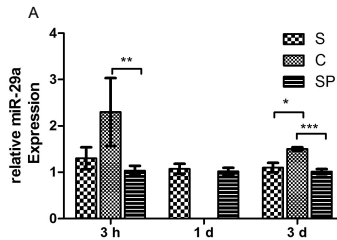


Abb. 20: miR-Q-Array: relative miRNA Expression im Verlauf einer Salmonelleninfektion (3 h bis 3 d p.i.). Expression mittels der miR-16 und miR-191 normalisiert. (A): miR-29a. Statistische Analysen wurden mittels Mann-Whitney U-Test durchgeführt * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

3.3.4. Veränderte Expression von Genen des KEGG Pathways „Cell adhesion molecules“

Um eine nähere Charakterisierung der anhand der Microarrayversuche festgestellten verringerten Expression in der S-Gruppe sowie der Restitution in der SP-Gruppe von Vertretern des KEGG Pathways „Cell adhesion molecules“ vorzunehmen (siehe Abb. 17 Seite 55, Cluster 6), wurden Gene dieses Pathways quantifiziert (Abb. 21). Das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül (VCAM-1) zeigte zu allen Zeitpunkten eine signifikant 1,6 bis 1,8-fach verstärkte Expression in der SP-Gruppe im Vergleich zur S- und C-Gruppe (Abb. 21A). Das Integrin beta-1 (CD29), welches zusammen mit dem Integrin alpha 4 (CD49d) das Very late Antigen (VLA-4) auf Leukozyten bildet und an VCAM-1 bindet, zeigte das gleiche Expressionsprofil wie VCAM-1 (Daten nicht gezeigt). Der Selektin P Ligand (SELPLG) war 3 h und 1 d p.i. in der SP-Gruppe signifikant 1,4 bis 1,75-fach verstärkt exprimiert. Die Expression in der S-Gruppe war 3 d p.i. 0,5-fach verringert im Vergleich zur C- und SP-Gruppe (Abb. 21B). Die Zelladhäsionsmoleküle SELP, SELE und SELL, an die der SELPLG bindet, wiesen keine differentiellen Expressionsunterschiede auf (Daten nicht gezeigt). Das interzelluläre Zelladhäsionsmolekül (ICAM-1) zeigte 3 h p.i. eine signifikant 1,7-fach verstärkte Expression in der SP-Gruppe. 28 d p.i. war die Expression in der S-Gruppe signifikant 0,74-fach zur C-Gruppe und 0,47-fach zur SP-Gruppe verringert. Die Expression in der SP-Gruppe war zu diesem Zeitpunkt 1,6-fach verstärkt im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 21C). Das Integrin alpha L (CD11a) und das Integrin beta-2 (CD18) bilden zusammen das Lymphocyte function associated Antigen 1 (LFA-1), welches an ICAM-1 bindet. Das Expressionsprofil beider Integrine war das gleiche wie von ICAM-1 (Daten nicht gezeigt).

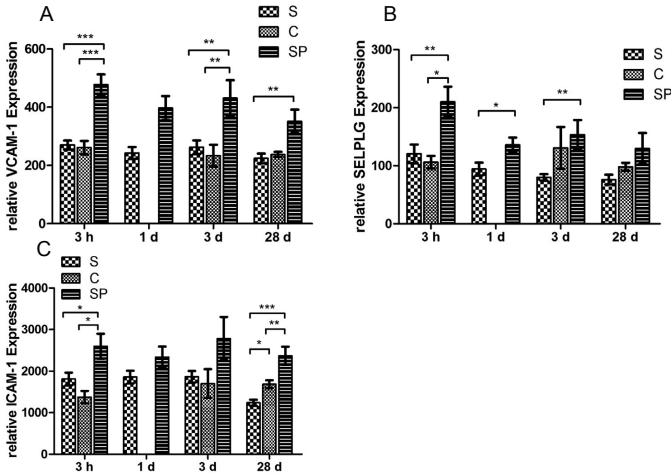


Abb. 21: RT-qPCR Expressionsdaten von Kandidatengenen des KEGG Pathways „cell adhesion molecules“ im Verlaufe einer Salmonelleninfektion (3 h bis 28 d p.i.). (A) VCAM-1, (B) SELPLG, (C) ICAM-1. Statistische Analysen wurden mittels Mann-Whitney U-Test durchgeführt * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Die anhand der Microarrayversuche ermittelte verstärkte Expression in der SP-Gruppe im Vergleich zur S-Gruppe zum Zeitpunkt 1 d p.i. konnte in allen untersuchten Kandidatengenen nachvollzogen werden. Zum Zeitpunkt 3 d p.i. konnte nur beim SELPLG die verringerte Expression im Vergleich zur Kontrolle sowie eine Restitution in der SP-Gruppe bestätigt werden. Der Effekt der verringerten Expression in der S-Gruppe mit gleichzeitiger Restitution in der SP-Gruppe konnte zum späten Zeitpunkt (28 d p.i.) bei ICAM-1 beobachtet werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im Folgenden die SELPLG Expression im Verlaufe einer Salmonelleninfektion näher charakterisiert (3.3.5.-3.3.7.)

3.3.5. SELPLG und MAdCAM-1 Expression im Verlaufe einer Salmonelleninfektion

Proteinexpressionsstudien zeigten im Vergleich zur Kontrolle zum Zeitpunkt 3 h p.i. eine signifikant 0,45-fach verringerte Expression in der S-Gruppe. Zu späteren Zeitpunkten konnten keine signifikanten Unterschiede beschrieben werden (Abb. 22A/C). Aufgrund einer Studie von Kum *et al.* (2009), in der SELPLG defiziente Mäuse eine verstärkte MAdCAM-1, IL-6, TNF α und MCP-1 Expression verbunden mit einer erhöhten Mortalität und Salmonellenlast aufwiesen, erfolgte eine Charakterisierung von MAdCAM-1 und einiger pro-inflammatorischer Zytokine.

Ein ähnlicher Effekt mit verringerter SELPLG Expression konnte hier, wie oben beschrieben, auf Transkriptomebene zum Zeitpunkt 3 d p.i. und auf Proteinebene 3 h p.i. in der S-Gruppe beschrieben werden. Die Untersuchung der MAdCAM-1 Expression zeigte eine signifikant 1,44 bis 2,8-fach erhöhte Genexpression zu den Zeitpunkten 3 h, 3 d und 28 d p.i. in der S- und SP-Gruppe, im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 23D). Auf Proteinebene konnte 3 d p.i. eine

signifikant 2,5-fach verstärkte Expression in der S- und SP-Gruppe bestätigt werden (Abb. 22B/C).

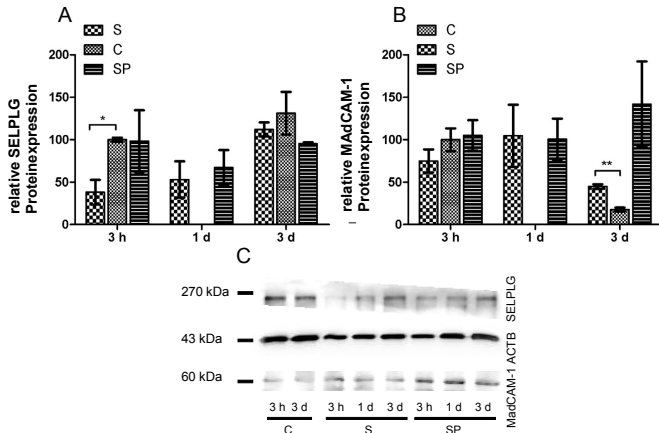


Abb. 22: Western Blot Analysen: Proteinexpression normalisiert mittels ACTB als Referenzprotein. Relative Proteinexpression ermittelt aus dem geometrischen Mittel von drei einzelnen Western Blot Analysen (A) SELPLG; (B) MAdCAM-1, sowie beispielhafte Darstellung jeweils eines Blotes (C). Statistische Analysen wurden mittels Mann-Whitney U-Test durchgeführt * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

Die Integrine alpha-4 und beta-7, die an MAdCAM-1 binden, zeigten über den Verlauf der Infektion keine Expressionsunterschiede (Daten nicht gezeigt). 3 d p.i. konnte hier somit auf Transkriptomebene eine verringerte SELPLG Expression mit gleichzeitig verstärkter MAdCAM-1 Expression in der S-Gruppe bestätigt werden. Auf Proteinebene war dieser Effekt zu verschiedenen Zeitpunkten während der Infektion zu beobachten (3 h p.i. bei SELPLG und 28 d p.i. bei MAdCAM-1). Die hier untersuchten pro-inflammatorischen Zytokine zeigten unterschiedliche Expressionsmuster. IL8 war zu den Zeitpunkten 3 h, 3 d und 28 d p.i. signifikant zwischen 1,6 bis 3,7-fach im Vergleich zur Kontrolle in der S- und SP-Gruppe erhöht (Abb. 23A). Das pro-inflammatorische Zytokin TNF α war während der gesamten Salmonelleninfektion signifikant 1,52 bis 2,3-fach erhöht exprimiert. Gleichzeitig konnte eine Restitution in der SP-Gruppe nachgewiesen werden (Abb. 23B). MCP-1 zeigte zum frühen Infektionszeitpunkt (3 h p.i.) eine 0,35 bzw. 0,6-fach verringerte Expression in der S- und SP-Gruppe im Vergleich zur C-Gruppe. Zu späteren Zeitpunkten war die Expression im Vergleich zur Kontrolle in der S-Gruppe 1,66 bis 2,62-fach verstärkt. In der SP-Gruppe blieb sie über den Verlauf im Vergleich zur Kontrolle 0,5-fach vermindert (Abb. 23C). Das pro-inflammatorische Zytokin IL6 zeigte keine veränderte Expression über den Verlauf der Infektion (Daten nicht gezeigt).

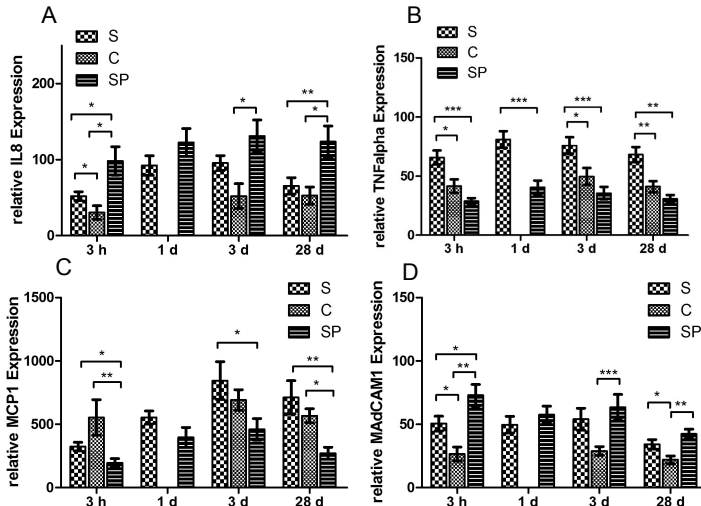


Abb. 23: RT-qPCR Expressionsdaten der pro-inflammatorischen Zytokine IL8 (A), TNF α (B) und MCP-1 (C) sowie des Zelladhäsionsmoleküles MAdCAM-1 (D) im Verlaufe einer Salmonelleninfektion (3 h bis 28 d p.i.). Statistische Analysen wurden mittels Mann-Whitney U-Test durchgeführt * p \leq 0,05, **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001.

Alle hier untersuchten pro-inflammatorischen Zytokine, ausgenommen IL6, zeigten somit eine verstärkte Expression im Verlauf der Salmonelleninfektion einhergehend mit verminderter SELPLG sowie verstärkter MAdCAM-1 Expression.

3.3.6. SELPLG ist ein direktes Zielgen der miR-34a

Um einen potentiellen Regulator von SELPLG zu identifizieren, der Einfluss auf die Expressionsunterschiede während der Salmonelleninfektion nehmen könnte, wurden die mRNA und miRNA Microarrayexpressionsprofile verglichen. Dabei konnte zwischen SELPLG und der miR-34a ein anti-korrelierendes Expressionsmuster nachgewiesen werden. Analysen der humanen und porcinen SELPLG 3'UTR auf potentielle Bindungsstellen für die miR-34a mittels RNAhybrid ergaben bei beiden Spezies Bindungsstellen für die konservierte miR-34a seed Sequenz. Die minimale freie Energie lag bei der humanen Interaktion bei -23,8 kcal/mol, sowie bei der porcinen bei -23,2 kcal/mol. Abb. 24 zeigt die mittels RNAhybrid ermittelte Targetinteraktion.

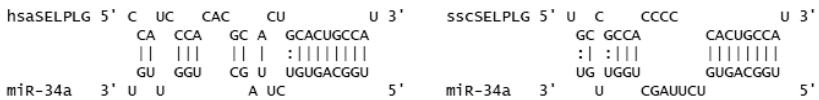


Abb. 24: humane bzw. porcine SELPLG-miR-34a Targetinteraktion ermittelt durch RNAhybrid

Reporterassays wurden durchgeführt, um die Interaktion zwischen der miR-34a und SELPLG zu zeigen. Hierzu wurden HeLa sowie IPEC-J2 Zellen co-transfiziert mit einem Gaussia Luciferase Plasmid, welches mit der miR-34a oder der mutagenisierten Bindungsstelle fusioniert wurde, sowie mit miR-34a mimics oder nonsense miRNA. Ein mitgeführtes Kontrollplasmid kodierte für die Cypridina Luciferase.

Die Transfektion mit der miR-34a und der SELPLG Bindungsstelle für die miR-34a ergab im humanen sowie porcinen System eine signifikante ca. 40 % ige Herabregulierung im Vergleich zur mutagenisierten Bindungsstelle. Die Co-Transfektion der nonsense miRNA und der Bindungsstelle sowie der mutagenisierten Bindungsstelle zeigten keine veränderte Luciferaseaktivität (Abb. 25).

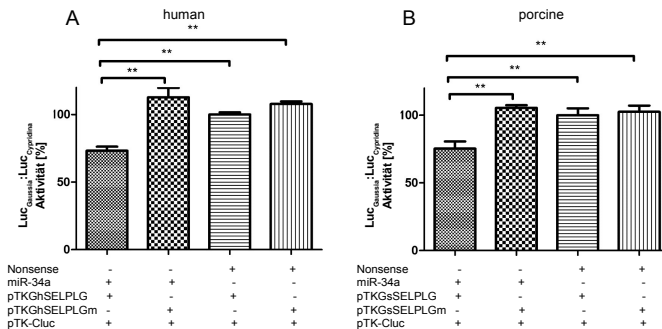


Abb. 25: Reporterassay: relative Luciferase Aktivität nach Co-Transfektion in HeLa Zellen (A) sowie IPEC-J2 Zellen (B). Statistische Analysen wurden mittels paired T-Test durchgeführt; **p<0,01

In beiden Spezies konnte so gezeigt werden, dass SELPLG ein direktes Zielgen der miR-34a darstellt.

3.3.7. miR-34a Expression im Verlaufe einer Salmonelleninfektion im Colon ascendens

Um die Beobachtung, dass die miR-34a die Expression von SELPLG im Zellsystem reguliert, zu bekräftigen und im porcinen Darmgewebe nachzuvollziehen sowie die erhobenen Microarraydaten zu bestätigen, wurden RT-qPCRs zur Quantifizierung von intestinalem miR-34a im Verlauf einer Salmonelleninfektion durchgeführt. Dieses Expressionsmuster wurde mit RT-qPCR Ergebnissen von SELPLG verglichen (Abb. 21B, Seite 60). Wie aus Abb. 26 hervorgeht, war die miR-34a zu frühen Infektionszeitpunkten (3 h p.i.) in der S- und SP-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle 1,9- bzw. 2,5-fach hochreguliert. Zum Zeitpunkt 3 d p.i. zeigte sich eine signifikante 2- bzw. 3-fach verstärkte miR-34a Expression in der S- und SP-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle. 28 d p.i. wurde ebenfalls eine 1,7- bzw. 2,2-fach erhöhte miR-34a Expression im Vergleich zur Kontrolle in der S- und SP-Gruppe nachgewiesen. Die miR-34a Expression war zu den Zeitpunkten 3 d und 28 d p.i. ebenfalls signifikant erhöht im Vergleich zur S-Gruppe.

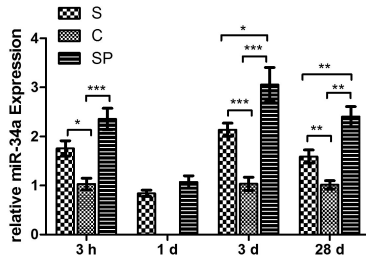


Abb. 26: RT-qPCR Expressionsdaten der miR-34a im Verlaufe einer Salmonelleninfektion (3 h bis 28 d p.i.). Statistische Analysen wurden mittels Mann-Whitney U-Test durchgeführt * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Eine negative Korrelation zwischen den SELPLG und miR-34a Expressionsdaten konnte nur zwischen der C- und S-Gruppe ermittelt werden, jedoch nicht zur SP-Gruppe.

3.4. Experimentelle Salmonelleninfektion-Ileum

3.4.1. mRNA-Microarrayanalyse

In die Auswertung wurden die Zeitpunkte 3 h, 3 d sowie 28 d p.i. einbezogen. Insgesamt waren 835 Gene bei diesen Zeitpunkten differentiell reguliert mit einer \log_2 Ratio zwischen -4,5 bis +3,5 (fold change 0,04 bis 11). Mit Hilfe des FOM Algorithmus konnte gezeigt werden, dass für diese Datensätze eine KMC Analyse mit 12 Clustern zur größten Aussagekraft führte. Die aus der KMC Analyse erhaltenden Cluster beinhalteten zwischen 35-114 Gene. Generell waren vor allem in der frühen Infektionsphase (3 h p.i.) die Gene zwischen der S- und C-Gruppe differentiell exprimiert. Um eine Beteiligung der Clustergene in speziellen Pathways zu ermitteln, wurde eine DAVID Analyse durchgeführt. Eine Übersicht über alle 12 Cluster und die Beteiligung der Clustergene an KEGG Pathways gibt Tab. 16. In Abb. 27 sind Heat Maps der Cluster 5 und 9 dargestellt, die während des frühen Infektionszeitpunktes zwischen den Gruppen differentielle Expressionsmuster zeigten.

Gene des Clusters 5 waren zum Zeitpunkt 3 h p.i. nach Salmonelleninfektion im Vergleich zur Kontrolle 0,4-fach verringert exprimiert, gleichzeitig zeigte die SP-Gruppe eine 1,4-fache Hochregulierung. Zum späten Zeitpunkt (28 d p.i.) waren die Clustergene in der S-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle 3,8-fach sowie in der SP-Gruppe 3-fach geringer exprimiert. Cluster 5 wies eine Beteiligung an den Pathways „Ribosome“ und „Oxidative Phosphorylation“ auf. Cluster 9 enthielt zum Zeitpunkt 3 h p.i. deutlich stärker exprimierte Gene nach Salmonelleninfektion (2,4-fach) im Gegensatz zur C- und SP-Gruppe. Die Expression in der SP-Gruppe war im Vergleich zur Kontrolle 1,4-fach erhöht. Gene des Clusters 9 zeigten dabei eine Beteiligung an folgenden KEGG-Pathways: „Antigen processing and presentation“, „Cell adhesion molecules“, „Regulation of actin cytoskeleton“, „Fc gamma mediated phagocytosis“, „focal adhesion“ sowie „pathogenic *E. coli* Infektion“. Im Pathway „Antigen processing and presentation“ waren vorwiegend Gene des Majorhisto-

Tab. 16: Übersicht über generierte Cluster und deren Beteiligung an KEGG Pathways während einer Salmonelleninfektion im Ileum

Cluster	Anzahl Clustergene	Angesprochene KEGG, p-value	Clustergene des Pathways
1	41	-	-
2	101	Antigen processing and presentation (p<0,06) cell adhesion molecules (p<0,15) signaling in immune response (p<0,39)	CD8b, HSP5, MHCIIIDQb CD8b, MHCIIIDQb, VCAM1 CD8b, MHCIIIDQb, VCAM1, C3, C4A
3	90	colorectal cancer (p<0,08) ECM Receptor interaction (p<0,08) Apoptosis (p<0,087) circadian rhythmus (p<0,07)	Bax, FZD8, Tcf711 COL1A1, COL3A1, COL4A1 Bax, CFLAR, CSF2RB CRY2, Per1
4	95	-	-
5	114	Ribosome (p<0,0001) oxidative Phosphorylation (p<0,0001)	RPS11, RPS12, RPS16, RPS20, RPS21, RPS23, RPS24, RPS25, RPS29, RPS3a, RPS4, RPS8, RPL10a, RPL11, RPL12, RPL14, RPL23, RPL27, RPL30, RPL34, RPL35a, RPL36, RPL37, RPL37a, RPL38, RPL6, RPL7, RPL9, RPL17, RPL21, RPS26L1, RPL35 UBL5, NDUFS3, ATP5G1, ATP5H, MIB2, CYTB, ACP1, NDLFA4, ND5, UQCRCQ
6	57	Antigen processing and presentation (p<0,058)	B2M, HSPA8, MHCIIIDQa
7	35	-	-
8	62	Ribosome (p<0,0001)	RPL10, RPL15, RPL18, RPL28, RPL4, RPL8, RPS10, RPS19, RPS27a, RPS6, RPS9, RPSA, RPLP0
9	53	Antigen processing and presentation (p<0,007) CAM (p<0,05) focal adhesion (p<0,074) pathogenic <i>E. coli</i> infection (p<0,0001), regulation of actin cytoskeleton (p<0,0005) FcγR-mediated phagocytosis (p<0,01)	CD74, HSP90, HLA-A3, HLA-B18, HLA-J, Ig alpha 1 chain C, Ig gamma-4 chain C, Ig kappa chain C PXN, PIP5K1C, ELK1 ACTA1, ACTA2, ACTB, ARP2/3 subunit 1B, ARP2/3 subunit 5, CFL-1, EZR, CAPZB, Hcls1, TUBB2 ARP2/3 subunit 1B, ARP2/3 subunit 5, CFL-1
10	38	Pyruvate metabolism (p<0,09)	GRHPR, PDHB
11	74	gene expression (p<0,02) processing of capped intron containing pre mRNA (p<0,09)	EEF2, FUS, HNRNPF, MED25, RPL21, SNRNP70 FUS, HNRNPF, SNRNP70
12	75	Antigen processing and presentation (p<0,053)	CTSBB, MHCIIIDMb, TAB2

3.4.2. miRNA-Microarrayanalyse

In die Auswertung wurden die Zeitpunkte 3 h, 3 d sowie 28 d p.i. einbezogen. Insgesamt waren 131 miRNAs exprimiert, mit einer log₂ Ratio zwischen -3 und +3 (fold change 0,13 bis 8,57). Anhand der FOM Analyse wurde eine optimale Clusteranzahl von 8 ermittelt. Die mittels der anschließenden KMC Analyse erhaltenen 8 Cluster enthielten zwischen 9-25 miRNAs. Generell zeigten miRNAs vor allem zu den Zeitpunkten 3 h und 3 d p.i. in der S- und SP-Gruppe ein differentielles Expressionsmuster im Vergleich zur Kontrolle. Der Anteil der unregulierten miRNAs über den Verlauf der Salmonelleninfektion lag in der S- und SP-Gruppe bei 17 %. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen konnten nur in den Clustern 1, 2 und 8 beschrieben werden (Abb. 28). Cluster 1 zeigte miRNAs mit einer 2-fach erhöhten Expression zum Zeitpunkt 3 h p.i. sowie 3 d p.i. in der S- und SP-Gruppe. Zum Zeitpunkt 28 d p.i. waren keine Expressionsunterschiede zwischen den miRNAs nachweisbar. In Cluster 2 und 8 befanden sich miRNAs, die zu frühen Infektionszeitpunkten (3 h und 3 d p.i.) in der S- und SP-Gruppe verstärkt exprimiert waren, zum späten Zeitpunkt (28 d p.i.) war die Expression im Vergleich zur Kontrolle verringert.

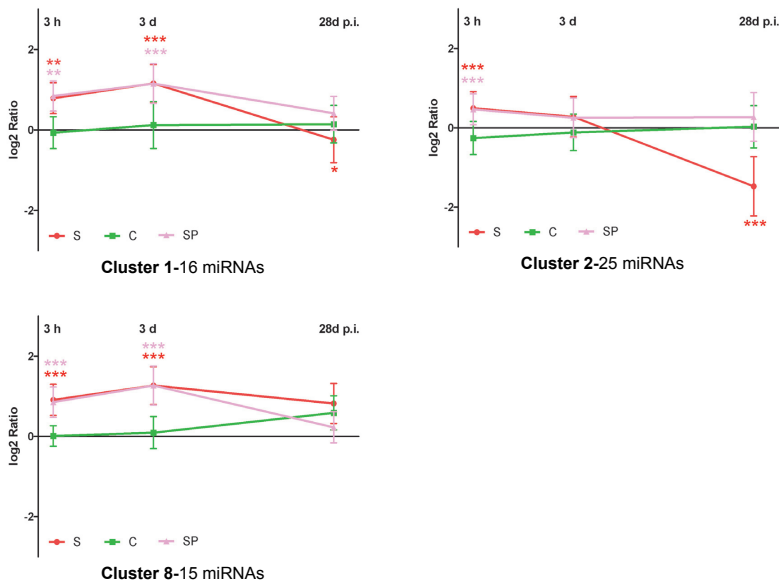


Abb. 28 miRNA Centroid Graphen im Ileum: Übersicht über die durchschnittlichen log₂ Ratios der Cluster 1, 2 und 8, generiert aus den miRNA-Expressionsdaten, im Verlauf der Salmonelleninfektion (rot), der Kontrollgruppe (grün) sowie der Salmonellen-Probiotikum Gruppe (blassrosa) (3 h bis 28 d p.i.) Signifikanzen gegenüber der Kontrollgruppe mittels Kruskal Wallis Test und Dunns Post Test ermittelt, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

Um Pathways zu identifizieren, die von miRNAs beeinflusst wurden, welche während der Salmonelleninfektion differentiell reguliert waren, wurden Targetanalysen durchgeführt. Hierzu wurden 49 miRNA ausgewählt, die zwischen Mensch und Schwein konserviert waren

sowie mittlere \log_2 Ratios von $\leq -0,5$ und $\geq 0,5$ zwischen der C-Gruppe und der S- bzw. SP-Gruppe zu frühen Infektionszeitpunkten (3 h und 3 d p.i.) aufwiesen. Die Targetanalyse wurde mittels MAGIA Query durchgeführt, hierbei wurde eine Übereinstimmung zwischen TargetScan und miRanda ausgewählt. Dies resultierte in 24 miRNAs mit 695 von ihnen potentiell regulierten Zielgenen. Die erhaltenden Zielgene wurden mittels DAVID einer Pathwayanalyse unterzogen. Die meisten Zielgene sind in KEGG-Pathway beteiligt, die ebenfalls anhand der mRNA Microarrays identifiziert wurden. 29 Zielgene spielten eine Rolle im „Pathway in cancer“, 20 Zielgene im „MAPK signaling Pathway“ und 19 Gene im „focal adhesion“ ($p < 0,0001$) Pathway sowie „Regulation of actin cytoskeleton“ ($p < 0,0003$).

3.4.3. Integrative Analyse der generierten mRNA und miRNA Expressionsprofile

Die integrative Analyse wurde, wie bereits unter 3.2.3, beschrieben, durchgeführt. Die Gesamtheit der mRNA und miRNA Expressionsprofile wurde in die Auswertung einbezogen. Die Analyse führte zu 842 potentiellen Interaktionen. Aus den Interaktionen wurden diejenigen herausgesucht, die einen Korrelationskoeffizienten (Pearson r) von unter $-0,5$ aufwiesen. Tab. 19 (Seite 112, im Anhang) gibt einen Überblick über die hervorgesagten miRNA-Zielgen Interaktionen. Eine Pathwayanalyse der 89 Gene ergab für 4 Gene (COL4A1, IGF1, MYLK und PAK4) eine Beteiligung im „focal adhesion“ KEGG Pathway. Die Gene ENAH, PAK4 und MYLK waren Bestandteil des Pathways „Regulation of actin cytoskeleton“. Die miR-29a wies hierbei Interaktionen mit sieben Zielgenen auf, beispielsweise ENAH. Um die identifizierten Interaktionen, die in den Pathways „focal adhesion“ und „Regulation of actin cytoskeleton“ eine Rolle spielten, besser charakterisieren zu können wurden alle ersten Netzwerkknachbarn (miRNAs) von COL4A1, ENAH, IGF1, MYLK und PAK4 ausgewählt. Des Weiteren wurden potentielle, durch TargetScan hervorgesagte miR-29a Zielgene, die in den beiden Pathways eine Rolle spielten, ergänzt. Das resultierende Netzwerk bestand aus 45 Zielgenen, die in fokaler Adhäsion und Regulation des Aktin-Zytoskeletts involviert waren, sowie 26 regulierenden miRNAs (Abb. 29). Um davon die wahrscheinlichsten Interaktionen zu bestimmen, wurden jeweils miRNA-mRNA Hybridisierungen mittels RNAhybrid (Krüger *et al.* 2006) durchgeführt. Die resultierten Interaktionen wurden visualisiert mittels PathVisio 2 (van Iersel *et al.* 2008). Der KEGG Pathway „focal adhesion“ wurde dabei als Grundgerüst gewählt (Abb. 44, Seite 115 im Anhang). Es wurden 36 signifikante Interaktionen zwischen fokalen Adhäsionsproteinen und den miRNAs (miR-29a, miR-152, miR-744 und miR-15b) identifiziert. Die meisten Interaktionen konnten mit der miR-29a nachgewiesen werden, beispielsweise interagiert miR-29a mit Vinculin ($mfe = -20$ kcal/mol, $p < 0,05$) und CAV2 ($mfe = -19,4$ kcal/mol, $p < 0,05$). Die miR-29a stellte hier somit einen potentiellen Hauptregulator der Pathways „focal adhesion“ und „Regulation of actin cytoskeleton“ während einer Salmonelleninfektion dar. Die meisten miR-29a Zielgene im Pathway „focal adhesion“, wie beispielsweise CAV2, waren hierbei in extrazellulären Matrix Rezeptor Interaktionen involviert. Aus diesem Grund wurde die Interaktion zwischen miR-29a und CAV2 während einer Salmonelleninfektion in den folgenden Analysen näher betrachtet und charakterisiert (3.4.4.-3.4.6.)

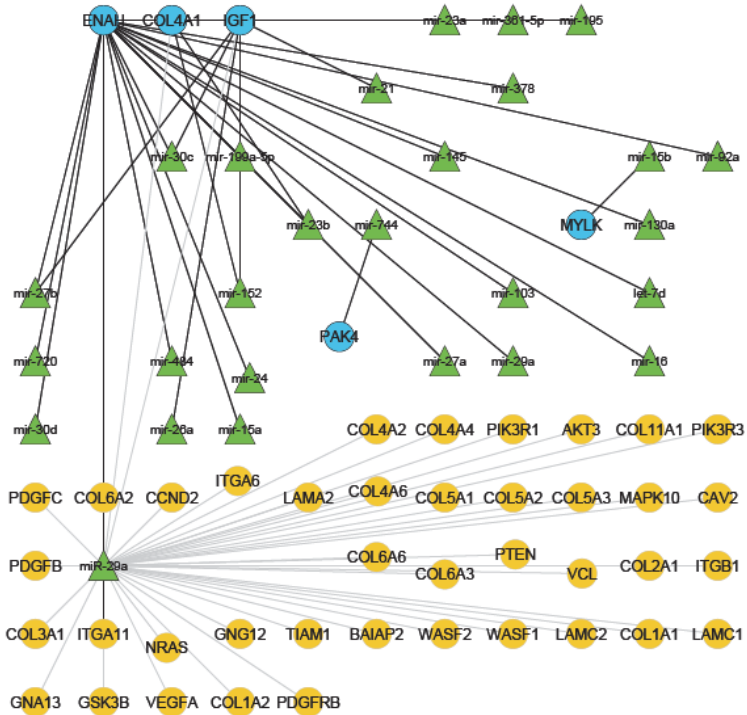


Abb. 29: Cytoscape Netzwerk: erste Netzwerknachbarn (miRNAs, **grüne Dreiecke**) von COL4A1, ENAH, IGF1, MYLK und PAK4 (**türkise Kreise**) sowie miR-29a Zielgene (**gelbe Kreise**), die in den KEGG Pathways „focal adhesion“ und „Regulation of actin cytoskeleton“ eine Rolle spielen. **Schwarze Linien:** mittels MAGIA hervorgesagte Interaktionen; **graue Linien:** mittels TargetScan und RNAhybrid hervorgesagte miR-29a Interaktionen.

3.4.4. CAV2 ist ein direktes Ziel der miR-29a

Analysen der humanen und porcinen CAV2 3'UTR auf potentielle Bindungsstellen für die miR-29a mittels RNAhybrid ergaben bei beiden Spezies Bindungsstellen für die konservierte miR-29a seed Sequenz. Die Bindungsstellen zeigten eine 83,3 %ige Übereinstimmung in beiden Spezies. Die minimale freie Energie lag bei der humanen Interaktion bei -19,5 kcal/mol ($p < 0,058$), sowie bei der porcinen bei -21,4 kcal/mol ($p < 0,091$). Abb. 30 zeigt die mittels RNAhybrid ermittelte Targetinteraktion.

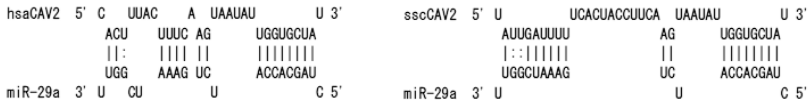


Abb. 30: humane bzw. porcine CAV2–miR-29a Targetinteraktion ermittelt durch RNAhybrid

Zur weiteren Bestätigung der Interaktion zwischen der miR-29a und CAV2 wurden Reporterassays durchgeführt. Hierzu wurden HeLa sowie IPEC-J2 Zellen co-transfiziert mit einem Gaussia Luciferase Plasmid, welches mit der miR-29a oder der mutagenisierten Bindungsstelle fusioniert wurde, sowie mit miR-29a mimics oder nonsense miRNA. Ein mitgeführtes Kontrollplasmid kodierte für die Cypridina Luciferase.

Die Co-Transfektion mit der miR-29a sowie dem humanen bzw. porcinen Reporter ergab eine signifikante 0,53-fach verringerte Luciferase Aktivität im Vergleich zur mutagenisierten Bindungsstelle im humanen sowie eine 0,21-fache im porcinen System. Die Co-Transfektion der Bindungsstelle mit der nonsense miRNA zeigten keine veränderte Luciferaseaktivität (Abb. 31).

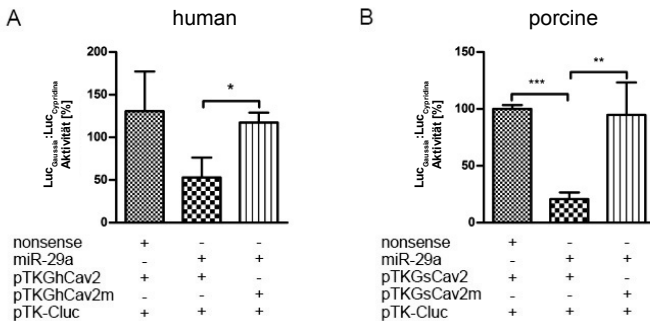


Abb. 31: Reporterassay: relative Luciferase Aktivität nach Co-Transfektion in HeLa Zellen (A) sowie IPEC-J2 Zellen (B). Statistische Analysen wurden mittels paired T-Test durchgeführt; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

In beiden Spezies konnte so gezeigt werden, dass CAV2 ein Zielgen der miR-29a darstellte.

Diese Reporterassayergebnisse wurden anhand von *knock-down* Versuchen des intrinsischen CAV2 in HT-29 Zellen überprüft. Hierzu wurden RNAi- sowie Überexpressionsstudien durchgeführt. HT-29 Zellen wurden mit der miR-29a, einer Anti-miR-29a, nonsense miRNA, einer siRNA spezifisch für CAV2, einem Expressionsplasmid für die humane CAV2 Bindungsstelle sowie einem Kontrollplasmid transfiziert. Anschließend wurde anhand von Western Blot Experimenten die intrinsische CAV2 Expression ermittelt. Abb. 32 zeigt die CAV2 Proteinexpression, hierbei war eine deutlich erhöhte Expression nach Transfektion mit der Anti-miR-29a im Gegensatz zur nonsense miRNA zu beobachten. Die Anti-miR-29a band an endogenes miR-29a und inhibierte dieses. Nach Transfektion mit der miR-29a sowie der siRNA CAV2 war eine deutlich verringerte CAV2 Expression im Vergleich zur nonsense miRNA nachzuweisen. Die CAV2 Expression nach Transfektion mit dem CAV2

Expressionsplasmid war im Vergleich zum Kontrollplasmid deutlich erhöht.

Park *et al.* (2009) beschrieben CDC42 als direktes Zielgen der miR-29a. Western Blot Untersuchungen auf die intrinsische CDC42 Proteinexpression nach miR-29a- und CAV2-Überexpressionsstudien ergaben keine Veränderung in der intrinsischen CDC42 Expression in HT-29 Zellen in Abhängigkeit von der miR-29a und CAV2 Expression (Abb. 32).

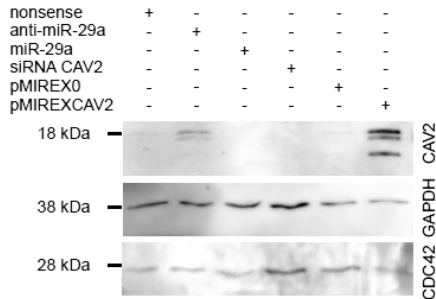


Abb. 32 Western Blot: CAV2, GAPDH sowie CDC42 Expression in HT-29 Zellen nach Transfektion mit der miR-29a, einer Anti-miR-29a, CAV2 siRNA, nonsense miRNA, einem Expressionsplasmid für die humane CAV2 Bindungsstelle und einem Kontrollplasmid; GAPDH diente als Referenzprotein.

Die mittels Western Blot generierten Ergebnisse wurden anhand von immunzytologischen Färbungen von intrinsischem CAV2 validiert. Hierzu dienten HT-29 und IPEC-J2 Zellen. In beiden Zelllinien war nach Transfektion mit der miR-29a und der CAV2 spezifischen siRNA ein deutlich verringertes CAV2 Fluoreszenzsignal zu beobachten. Die Anti-miR-29a sowie das CAV2 Expressionsplasmid hingegen führten zu einem deutlich verstärkten CAV2 Signal. Das intrinsische CDC42 Level nach Transfektion war nicht verändert (Abb. 33).

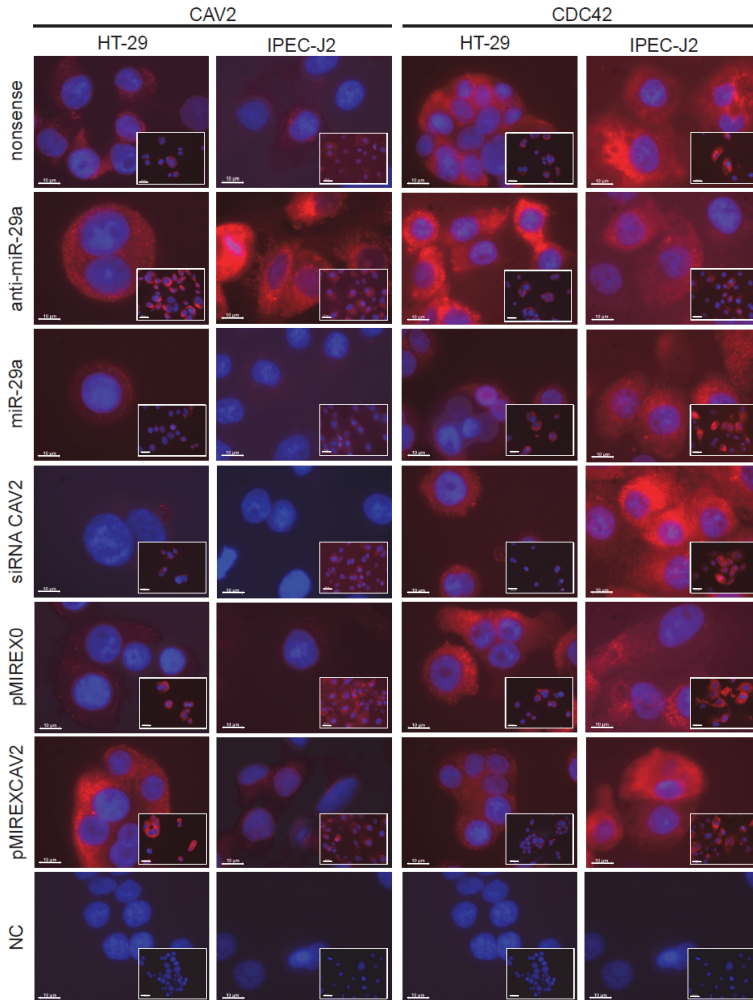


Abb. 33 Immunzytologische Markierung von CAV2 und CDC42 in HT-29 und IPEC-J2 Zellen nach Transfektion mit der miR-29a, einer Anti-miR-29a, CAV2 siRNA, nonsense miRNA, einem Expressionsplasmid für die humane bzw. porcine CAV2 Bindungsstelle und einem Kontrollplasmid. Rote Fluoreszenz: spezifischer CAV2 bzw. CDC42 Proteinnachweis; blaue Fluoreszenz: Kernfärbung DAPI .
 Maßstabsbalken große Bilder: 10 μ m; kleine Bilder: 20 μ m

3.4.5. miR-29a und CAV2 Expression im Verlaufe der Salmonelleninfektion im Ileum

Um die festgestellte Beobachtung, dass die miR-29a die Expression von CAV2 im Zellsystem reguliert, ebenfalls im porcinen Darmgewebe nachzuvollziehen, wurden RT-qPCRs zur Quantifizierung von intestinalem miR-29a und dem vorhergesagten Zielgen CAV2 im Verlauf einer Salmonelleninfektion durchgeführt. Wie aus Abb. 34A hervorgeht, war die miR-29a zu frühen Infektionszeitpunkten (3 h p.i.) in der S- und SP-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle 1,5-fach hochreguliert. Zum Zeitpunkt 3 d p.i. zeigte sich eine signifikante 1,4-fach verstärkte miR-29a Expression in der S-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle. 28 d p.i. waren keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu erkennen. Im Vergleich hierzu zeigt Abb. 34B die relative CAV2 Expression in den gleichen Gruppen. 3 h p.i. zeigte sich eine 0,52-fach verringerte CAV2 Expression in der S-Gruppe sowie eine 0,66-fach verringerte in der SP-Gruppe. 3 d nach der Infektion war die CAV2 Expression 0,52-fach signifikant in der S-Gruppe verringert. Zum Zeitpunkt 28 d p.i. zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Die miR-29a und CAV2 Expression war zum Zeitpunkt 3 h p.i. in der S-Gruppe deutlich anti-korreliert (Pearson $r = -0,8$; $p \leq 0,05$ two-tailed).

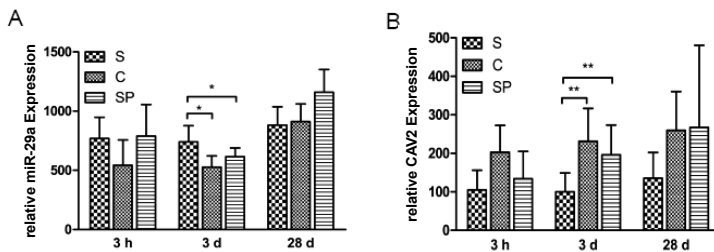


Abb. 34: RT-qPCR von miR-29a (A) und CAV2 (B) in porcinem ilealem Gewebe im Verlaufe einer Salmonelleninfektion (3 h bis 28 d p.i.). Statistische Analysen wurden mittels Mann-Whitney U-Test durchgeführt * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

Die CDC42 Expression im porcinen ilealem Gewebe zeigte zum Zeitpunkt 3 h p.i. in der S-Gruppe eine 0,65-fach signifikant verringerte CDC42 Expression im Vergleich zur Kontrolle. Zu sehr frühen (3 h p.i.) und späten (28 d p.i.) Infektionszeitpunkten konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen nachgewiesen werden (Abb. 35).

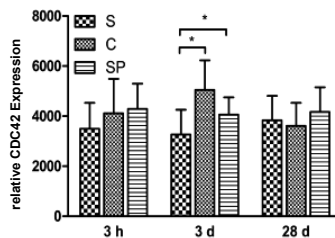


Abb. 35: RT-qPCR von CDC42 in porcinem ilealem Gewebe im Verlaufe einer Salmonelleninfektion (3 h bis 28 d p.i.). Statistische Analysen wurden mittels Mann-Whitney U-Test durchgeführt * $p \leq 0,05$

Die RT-qPCR Ergebnisse bekräftigten somit die Beobachtung, dass CAV2 ein direktes Zielgen der miR-29a darstellt. Die miR-29a–CDC42 Interaktion konnte im Darmgewebe, im Gegensatz zum Zellsystem, nachvollzogen werden, stellte sich jedoch nicht so deutlich dar, wie die miR-29a–CAV2 Interaktion.

Die posttranskriptionelle Regulierung durch miRNAs kann einerseits zu einer Degradation der mRNA führen, sowie zu einer Hemmung der Translation. Aus diesem Grund wurden Proteinexpressionsanalysen durchgeführt. Abb. 36 zeigt die mittlere relative CAV2 sowie CDC42 Expression, ermittelt aus vier Western Blot Analysen. Zum frühen Infektionszeitpunkt war die CAV2 Expression in der S-Gruppe signifikant um 0,54-fach im Vergleich zu C-Gruppe verringert. 3 d p.i. war die Expression sowohl in der S- als auch in der SP-Gruppe signifikant um 0,36 bzw. 0,44-fach im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt. Zum Zeitpunkt 28 d p.i. zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die CDC42 Expression war 3 h p.i. in der S-Gruppe signifikant zur Kontrolle 2,7-fach verstärkt. Zu den weiteren Zeitpunkten traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf.

Anhand des Proteinexpressionsmusters ließ sich ebenfalls die Beobachtung bekräftigen, dass CAV2 ein direktes Zielgen der miR-29a darstellte. Bei CDC42 konnte auf Proteinebene keine Anti-Korrelation zur miR-29a Expression ermittelt werden.

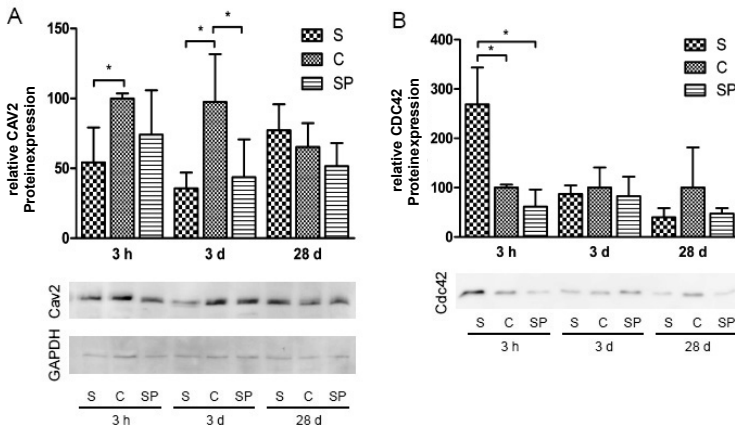


Abb. 36 Western Blot Analyses: Proteinexpression normalisiert mittels GAPDH als Referenzprotein. Relative Proteinexpression ermittelt aus dem Mittel von vier einzelnen Western Blot Analysen sowie beispielhafte Darstellung jeweils eines Blotes. (A) CAV2; (B) CDC42. Statistische Analysen wurden mittels Mann-Whitney U-Test durchgeführt * $p < 0,05$.

Eine Lokalisierung der CAV2 und CDC42 Proteinexpression im Gewebe wurde mittels immunhistologischer Untersuchungen vollzogen. Abb. 37 zeigt die spezifische Anfärbung von CAV2 und CDC42. CAV2 war vorwiegend in lymphatischen Zellen der Mukusschicht sowie vereinzelt in Zellen der Lamina propria nachweisbar. CDC42 war zytoplasmatisch in Enterozyten nachweisbar.

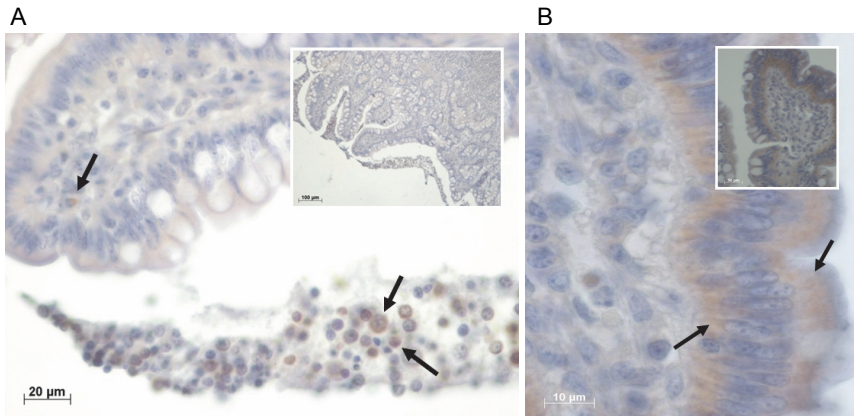


Abb. 37: Immunhistologie (A): CAV2 (B): CDC42. Pfeile zeigen spezifische CAV2 bzw. CDC42 Markierung.

3.4.6 miR-29a-CAV2 Interaktion in intestinalen Zellen

Im Folgenden wurden Einflüsse der miR-29a-CAV2 Interaktion auf humane sowie porcine Darmzellen näher charakterisiert.

3.4.6.1 Proliferationshemmung

Um den Einfluss von CAV2 auf die Proliferation von humanen und porcinen intestinalen Zellen näher zu charakterisieren, wurden *knock-down* Experimente in HT-29 und IPEC-J2 Zellen durchgeführt. Hierzu wurden Transfektionen mit einer siRNA gegen CAV2, der miR-29a sowie zur Überexpression von CAV2 mit einem Expressionsplasmid für CAV2 und der Anti-miR-29a durchgeführt. Die Proliferationsrate wurde im Anschluss an die Transfektion mit dem xCELLigence System in Echtzeit gemessen und aufgezeichnet. In HT-29 Zellen war die Proliferation nach Transfektion mit der CAV2 spezifischen siRNA nach 30 h vollständig zum Erliegen gekommen. Bis zum Messende nach 90 h stieg die Proliferation hier nicht mehr an. Die miR-29a zeigte ähnliche Tendenzen wie die siRNA; verringerte Zellproliferation im Gegensatz zur nonsense miRNA nach 50 h. Eine Transfektion mit der Anti-miR-29a führte zu einer verstärkten Zellproliferation 60 h nach Transfektion (Abb. 38A). Eine ebenfalls erhöhte Zellproliferation war, im Gegensatz zum Kontrollplasmid, 70 h nach Transfektion mit dem Expressionsplasmid für CAV2 zu beobachten (Abb. 38B). Die Proliferationsrate der IPEC-J2 Zellen wird in Abb. 38C und D gezeigt. Auch hier konnte die verringerte Zellproliferation nach Transfektion mit der siRNA CAV2 und miR-29a, sowie die erhöhte Proliferationsrate im Anschluss an die Transfektion mit dem CAV2 Expressionsplasmid und der Anti-miR-29a beobachtet werden.

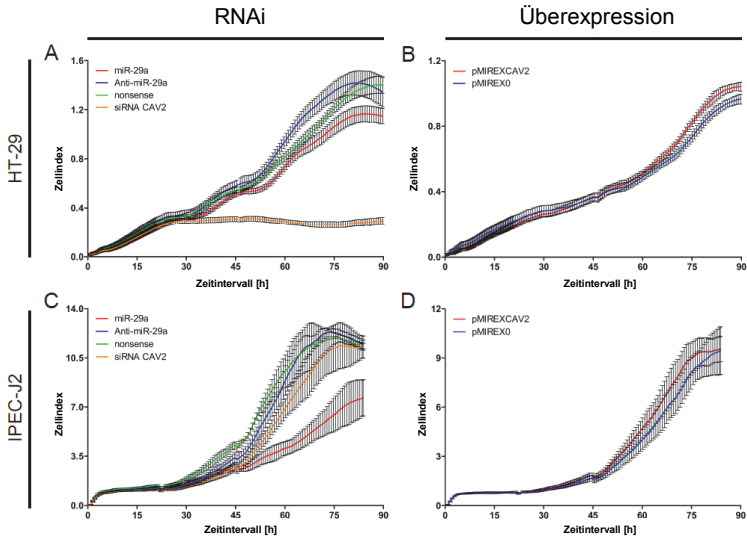


Abb. 38: Zellproliferation mittels xCELLigence System ermittelt. Aufzeichnung des Zellindex direkt im Anschluss an die Transfektion mit der miR-29a, CAV2 siRNA, einer Anti-miR-29a, nonsense miRNA, einem Expressionsplasmid für die CAV2 Bindungsstelle und einem Kontrollplasmid. Die Aufzeichnung erfolgte bis 90 h nach der Transfektion. (A) HT-29 Zellen: RNAi Versuche; (B) HT-29 Zellen: CAV2 Überexpression; (C) IPEC-J2 Zellen: RNAi Versuche; (D) IPEC-J2 Zellen: CAV2 Überexpression

3.4.6.2 Salmonelleninvasion

Um den Einfluss von CAV2 auf die Aufnahme von Salmonellen näher zu charakterisieren, wurden *in vitro* Invasionsstudien in HT-29 Zellen durchgeführt. Hierzu wurden RNAi Studien mittels miR-29a, Anti-miR-29a, nonsense miRNA und CAV2 siRNA durchgeführt. Des Weiteren wurden HT-29 Zellen, die transient CAV2 exprimieren, verwendet. Die Infektion mit Salmonellen erfolgte 48 h nach Transfektion um einen deutlichen *knock-down* sicher zu stellen. 2 h nach Infektion wurde die Anzahl intrazellulärer Salmonellen ermittelt.

Eine erhöhte CAV2 Expression, hervorgerufen mittels Anti-miR-29a und transientser Transfektion mit einem CAV2 Expressionsplasmid, führten zu einer verringerten Aufnahme von Salmonellen. Die Aufnahme verringerte sich dabei zur jeweiligen Kontrolle bei der Anti-miR-29a auf 66 % (± 20) und beim CAV2 Expressionsplasmid auf 70 % (± 25). Eine verstärkte Aufnahme von Salmonellen konnte hingegen nach einer verringerten CAV2 Expression durch miR-29a (175 % ± 36) und siRNACAV2 (190 % ± 99) Transfektion beobachtet werden (Abb. 39). Die Ergebnisse zeigten eine direkte Beteiligung von CAV2 bei der Aufnahme von Salmonellen in humane intestinale Epithelzellen.

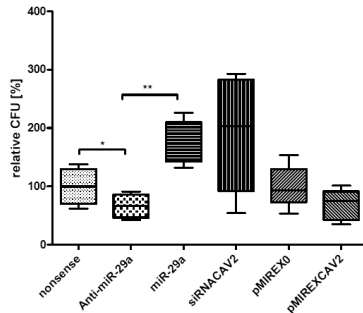


Abb. 39: Salmonelleninvasion: 48 h nach der Transfektion erfolgte für 2 h die Infektion mit Salmonellen und anschließend die Bestimmung der relativen CFU (CFU/lebende Zellen). Statistische Analyse mittels Mann-Whitney U-Test * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$

3.4.6.3 Aktivierungszustand von CDC42 und Rac1

Eine Sequenzanalyse von humanem und porcinem CAV2 ergab eine Region vergleichbar zur GDI von CAV1, mit einer Sequenzübereinstimmung von 40 %. Die Region in CAV2 ist in beiden Spezies bis auf eine Aminosäure an Position 84 gleich. Beim Schwein befindet sich hier ein Isoleucin anstelle eines Methionins (FEISKYV (porcin I) MYK; AS 77-86). Dieses Ergebnis legte die Vermutung nahe, dass auch CAV2 als CDC42 GDI wirkt. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden CDC42 G-LISA Versuche mit HT-29 Zellen durchgeführt. Mit Hilfe des G-LISAs wurde spezifisch die Menge an GTP gebundenem (aktiven) CDC42 sowie Rac1 ermittelt. Der G-LISA erfolgte im Anschluss an RNAi- (miR-29a, Anti-miR-29a, nonsense miRNA und CAV2 siRNA) und CAV2 Überexpressionsstudien (pMIREXCAV2, pMIREX0). Ein signifikant verstärkter Aktivierungsgrad vom CDC42 Protein (GTP gebunden) konnte nach einer verringerten CAV2 Expression beobachtet werden. Hervorgehoben wurde die verringerte CAV2 Expression durch eine miR-29a sowie siRNACAV2 Transfektion und erhöhte die GTP gebundene CDC42 Fraktion um 163 % (± 38) durch miR-29a sowie 144 % (± 39) durch die siRNACAV2. (Abb. 40). Eine erhöhte CAV2 Expression, erhalten mittels transients Transfektion mit Anti-miR-29a und einem CAV2 Expressionsplasmid, führten zu einem verringerten Aktivierungsgrad vom CDC42 Protein, im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Bei der Anti-miR-29a verringerte sich der Aktivierungsgrad auf 75 % (± 37) und beim CAV2 Expressionsplasmid auf 37 % (± 23). Wie bereits beschrieben, hatte CAV2 bzw. miR-29a nach Western Blot Untersuchungen keinen Einfluss auf das Gesamt-CDC42 Protein (aktiv und inaktiv) (Abb. 40). Die Ergebnisse bekräftigen somit die Vermutung, dass CAV2 als GDI für CDC42 agierte.

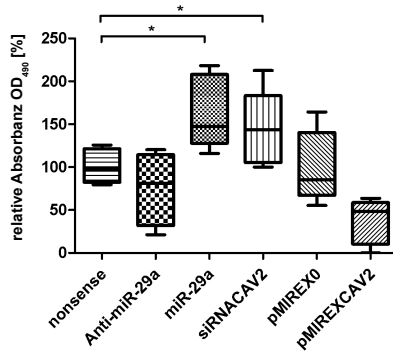


Abb. 40: CDC42 G-LISA 48 h nach der Transfektion erfolgte der Nachweis von aktivem GTP gebundenem CDC42. Statistische Analyse mittels Mann-Whitney U-Test * $p \leq 0.05$.

Des Weiteren wurde der Einfluss von CAV2 auf den Aktivierungszustand der RhoGTPase Rac1 untersucht, da es wie CDC42 während der Aufnahme von Salmonellen eine entscheidende Rolle spielt (Hardt *et al.* 1998). Rac1 G-LISA Untersuchungen ergaben jedoch keinen Einfluss von CAV2 auf den Aktivierungszustand von Rac1 (Daten nicht gezeigt).

4. Diskussion

4.1. Postnatale Darmentwicklung

4.1.1. Microarraystudien belegen kritische Phasen innerhalb der postnatalen Darmentwicklung

Mukosale Oberflächen des Darmes sind kontinuierlich mit harmlosen Umweltantigenen sowie kommensalen Bakterien, die in symbiontischer Gemeinschaft mit dem Wirt zusammenleben, in Kontakt. Die homöostatische Balance zwischen Toleranz und Immunität repräsentiert hierbei eine einzigartige regulatorische Aufgabe, die das Darmimmunsystem zu erfüllen hat. Hierzu muss gegenüber Kommensalen eine sog. immunologische Hyporesponsivität ausgebildet werden, um die immunologischen Kapazitäten gegenüber Pathogenen zu schonen. Kommt es jedoch zur Störung dieser Homöostase, können eine Vielzahl von Entzündungsgeschehen die Folge sein, wie beispielsweise Futtermittelallergien, chronisch entzündliche Darmerkrankungen (IBD) sowie Darmtumore (Artis 2008). Die postnatale Phase stellt dabei einen kritischen Punkt für die Kolonisierung des Darmtraktes dar und steht deshalb im besonderen Fokus gegenüber der Ausprägung der Krankheitsgeschehen. Das Absetzen vom Muttertier sowie die ersten Tage *post natum* werden hierbei in der Ausbildung der homöostatischen Balance als besonders kritisch angesehen, da hier die Exposition mit neuen Antigenen, insbesondere aus der Nahrung, stark zunimmt. Zu diesen Zeitpunkten ist die Immunität noch sehr unzureichend ausgebildet und begünstigt damit die Empfindlichkeit gegenüber Pathogenen (Bailey *et al.* 2005).

Anhand von Microarraystudien konnten diese beiden kritischen Phasen während der postnatalen Darmentwicklung in der vorliegenden Arbeit belegt werden. Es wurde ein Gencluster identifiziert, der in beiden Darmabschnitten eine verringerte Genexpression zu frühen Phasen der postnatalen Darmentwicklung sowie zum Zeitpunkt des Absetzens aufwies und eine Rolle in der adaptiven Immunantwort spielte. In den RT-qPCR Studien konnten Entwicklungs- und absetzeffektbasierte Unterschiede in Vertretern der adaptiven Immunantwort bestätigt werden. Insbesondere beim Immunglobulin A wurde die zu frühen Zeitpunkten der postnatalen Darmentwicklung noch unzureichend ausgebildete mukosale Immunantwort sichtbar. Immunglobulin A wird vom mukosalen Immunsystem sezerniert und dient als protektives Molekül in der ersten Abwehrstrategie. Scharek *et al.* beschrieben 2005 einen Abfall der Gesamt-IgA Konzentration im Kot von Schweinen bis 56 d p.n., gefolgt von einem Anstieg. In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass im Ileum die Immunglobulin A2 Expressionsrate zu frühen Zeitpunkten stark verringert war und bereits nach 28 d p.n. signifikant erhöht vergleichbar zu späten Zeitpunkten. Im Colon ascendens wurde dieses Expressionslevel hingegen erst nach 35 d p.n. erreicht. Dies deutet daraufhin, dass die beiden Unterklassen der Immunglobuline während der postnatalen Darmentwicklung unterschiedlich reguliert werden. Deutliche absetzeffektbasierte Expressionsunterschiede konnten bei HLA-F nachgewiesen werden, welches dem Majorhistokompatibilitätskomplex I angehört (Goodridge *et al.* 2010) und eine zentrale Rolle bei Funktionen des Immunsystems spielt. Die Expressionsprofile von IgA2 und HLA-F verdeutlichten somit besonders in den beiden kritischen Phasen der Entwicklung die erhöhte Anfälligkeit der Tiere gegenüber Pathogenen, durch die hier aufgetretene unzureichende Entwicklung des Immunsystems. Bekräftigt werden konnte dies ebenfalls anhand von Genen, die zu diesen Zeitpunkten

verstärkt exprimiert waren, und im Zusammenhang mit einer pathogenen *E. coli* Infektion und des Glutathionmetabolismus standen.

Glutathion stellt einen der wichtigsten antioxidativen Stoffe der intestinalen Epithelzellen dar und scheint dabei eine wichtige Rolle in der intestinalen Barriere zu spielen (van Ampting *et al.* 2009). Eine Inhibierung des antioxidativen Systems durch verminderte Expression von antioxidativen Enzymen wie SOD und GSH-Px wurde in Absetzferkeln beschrieben (Zhu *et al.* 2012). Eine Aktivierung der Glutathion-S-transferase (GST), die organische, körperfremde Substanzen zur Entgiftung auf Glutathion überträgt, konnte zum frühen Entwicklungszeitpunkt und zum Absetzen beobachtet werden. RT-qPCR Studien der Glutathion Peroxidase 2 (GPX2) hingegen wiesen während des Absetzens auf eine Inhibierung des antioxidativen Systems hin. Glutathionperoxidase stellt das wichtigste antioxidative Enzym für die Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies dar und führt zur Aufrechterhaltung der Zellmembranintegrität gegenüber Schädigungen durch oxidativen Stress. Ähnliche Ergebnisse mit verminderter Expression der Glutathionperoxidase und verstärkter Expression der GST wurden während einer Salmonelleninfektion in Ratten beschrieben (Mehta *et al.* 1998, van Ampting *et al.* 2009). Dies ließ den Schluss zu, dass der Verlust der zellulären Integrität durch verminderte Expression der GPX während der Absetzphase die Anfälligkeit gegenüber Pathogenen förderte. Der Einfluss einer verstärkten Expression der GST während der Absetzphase muss hingegen noch näher charakterisiert werden.

Die Gene ACTB, ACTG1, TUBA1B und TUBA1C akkumulierten in einem Gencluster, der eine gegensätzliche Genregulation zu Vertretern der adaptiven Immunantwort aufwies. Bei einer pathogenen *E. coli* Infektion kommt es über TUBA zu einer Zerstörung des mikrotubulären Netzwerkes und damit einhergehend zu einer Regulierung des Aktin-Zytoskeletts, gefolgt von einer starken Zelldeformation. Störungen in der intestinalen Zellstruktur sowie die Bildung von Enterotoxinen durch das Bakterium sind die vorwiegenden Auslöser für die Ausbildung einer Diarrhoe. Eine pathogene *E. coli* Infektion stellt dabei einen der wichtigsten Auslöser für absetzbasierte Diarrhoe in Ferkeln dar (Fairbrother *et al.* 2005). Diese Ergebnisse verdeutlichen den direkten Zusammenhang zwischen einer vermindert ausgebildeten Immunantwort mit der erhöhten Infektanfälligkeit gegenüber Pathogenen wie beispielsweise *E. coli*.

Ein weiterer Faktor, der mit der erhöhten Infektanfälligkeit in den kritischen Phasen der postnatalen Darmentwicklung in Verbindung gebracht werden konnte, stellte das Apolipoprotein A1 (APOA1) dar. APOA1 ist die primäre Proteinkomponente vom Lipoprotein hoher Dichte (HDL). Aktuelle Studien zeigten einen anti-inflammatorischen Effekt von APOA1 durch Hemmung des CD11a auf aktivierten humanen neutrophilen Leukozyten. Des Weiteren trat eine Inhibierung der Leukozyten-Rekrutierung in einem *in vivo* Entzündungsmausmodell auf (Murphy *et al.* 2011). In Makrophagen inhibierte APOA1 die durch das lösliche CD40L ausgelöste Immunantwort (Yin *et al.* 2012). APOA1 zeigte in beiden Darmabschnitten eine stark erhöhte Expression *post natum*. Dieser anti-inflammatorische Effekt von APOA1 könnte somit eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die hohe Infektanfälligkeit darstellen. Zu diesem Zeitpunkt war das Immunsystem noch unzureichend ausgebildet und der anti-inflammatorische Effekt des APOA1 verschärfte diese

Situation noch zusätzlich, als Folge war der Darmtrakt nicht in der Lage angemessen auf Pathogene zu reagieren.

Ein Hinweis, auf den verstärkten Umbau bzw. Aufbau von Gewebe im Verlaufe der postnatalen Darmentwicklung wurde anhand der Microarraystudien sowie der RT-qPCR erhalten. Die Kollagene COL4A1, COL1A1 und COL26A1 zeigten eine Regulierung über den Verlauf der postnatalen Darmentwicklung. Die Kollagene COL4A1 und COL1A1 zeigten hierbei eine stetige Zunahme der Expression mit kurzzeitigem Abfall zum Zeitpunkt des Absetzens, wohingegen COL26A1 in beiden Darmabschnitten eine Abnahme in der Expression aufwies. In einer Studie von Sato *et al.* (2002) zeigte COL26A1 im Hoden, im Ovar und im Nierengewebe von Mäusen, vergleichbar zu der vorliegenden Arbeit, in frühen Entwicklungsphasen die höchste Expression sowie mit fortlaufender Entwicklung eine Expressionsabnahme. Das COL26A1 scheint somit in frühen Entwicklungszeitpunkten eine wichtige Rolle bei der intakten Ausbildung von elastischen Fasern zu spielen. Die COL4A-Familie wurde als wichtiger Bestandteil bei der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität von Basalmembranen insbesondere zu späteren Zeitpunkten der Organentwicklung und bei einer erhöhten mechanischen Belastung beschrieben (Pöschl *et al.* 2004). COL4A1 zeigte in der vorliegenden Arbeit in beiden Darmabschnitten eine verringerte Expression zum Zeitpunkt des Absetzens. Dies könnte zu einer Destabilisierung des Gewebes führen, was besonders in dieser Phase als kritisch anzusehen war, da durch die vermehrte Aufnahme von strukturiertem Futter die mechanische Beanspruchung des Gewebes noch zunahm. Die hierbei verstärkt auftretende Zerstörung des Gewebes könnte die zu diesem Zeitpunkt verstärkt auftretende Anfälligkeit gegenüber Pathogenen erklären.

4.1.2. miRNAs als Regulatoren der postnatalen Darmentwicklung

Diese komplexen Vorgänge während der postnatalen Darmentwicklung werden durch eine hierarchische Genexpressionsregulierung gesteuert. Hierbei stellen miRNAs potentielle Regulatoren dar, ihre Bedeutung bei der Entwicklung von Vertebraten ist hinlänglich bekannt (Wienholds *et al.* 2005).

In dieser Arbeit konnte erstmalig das miRNA Expressionsmuster im porcinen Ileum und Colon ascendens während dieser Phase aufgezeigt werden. Über den gesamten untersuchten Verlauf der postnatalen Darmentwicklung konnten nur wenige miRNAs identifiziert werden, die ein differentielles Expressionsmuster aufwiesen. Vor allem konnten miRNAs identifiziert werden, die als potentielle Regulatoren während der Absetzphase eine entscheidende Rolle spielen könnten. Differentiell regulierte miRNAs nahmen hierbei über ihre potentiellen Zielgene Einfluss auf die Regulierung des Aktin-Zytoskeletts, spielten eine Rolle bei fokalen Adhäsionen und Endozytose. Damit stellen sie ein Indiz dar, das auf die erhöhte Infektanfälligkeit gegenüber Pathogenen hinweist. Die Beteiligung im „Pathway in cancer“ wies auf die veränderte Zellproliferation und den vermehrten Umbau des Gewebes hin. Diese Ergebnisse verdeutlichten den möglichen Einfluss der miRNAs auf zelluläre Prozesse, die auch mittels Microarrayanalyse während der Absetzphase als besonders bedeutend identifiziert wurden.

Die integrative Analyse stellte eine wichtige Grundlage zur Darstellung der posttranskriptionellen Genregulation während der postnatalen Darmentwicklung dar. Bis heute sind keine Studien bekannt, die den Einfluss von miRNAs auf die Genexpression in dieser

kritischen Phase beim Schwein untersucht haben. Die Identifikation von Regulatoren könnte wichtige Aufschlüsse bezüglich von Ansatzpunkten zur Behandlung von Erkrankungen geben, die im Zusammenhang mit dieser kritischen Entwicklungsphase des Darmes gesehen werden. Ein besonderer Einfluss konnte anhand der integrativen Analyse auf das Zellwachstum, die Zellproliferation und die Zellmotilität während der postnatalen Darmentwicklung belegt werden. Hiermit konnten erstmalig potentielle Regulatoren während der komplexen Umbauvorgänge im Verlaufe der postnatalen Entwicklung vorhergesagt werden. Die miR-145 wurde dabei als potentieller Regulator von RALBP1 und ACTG1 vorhergesagt. Interessanterweise wurde eine verminderte Expression der als Tumorsuppressor beschriebenen miR-145 in neueren Studien in Verbindung gebracht, mit einer Prädisposition für die ulcerative Colitis (UC) sowie einem erhöhten Risiko der neoplastischen Entartung des Gewebes (Pekow *et al.* 2012). In der vorliegenden Arbeit konnte eine verminderte Expression des miR-145/143 Clusters im Ileum *post natum* sowie direkt zum Zeitpunkt des Absetzens identifiziert werden. Das potentielle Zielgen RALBP1 wurde in verschiedenen Tumorzelllinien verstärkt exprimiert, unter anderem im kolorektalen Krebs (Mollberg *et al.* 2012). Die vorliegende Arbeit stellte somit die erste Vorhersage der möglichen Interaktion der miR-145 mit RALBP1 dar und ihre potentielle Bedeutung während der Entstehung von UC und Krebserkrankungen während der postnatalen Darmentwicklung. Die mögliche Regulation von RALBP1 könnte ebenfalls durch Beeinflussung der Rezeptorvermittelten Endozytose direkten Einfluss auf die Invasion von Pathogenen nehmen. Einen weiteren Hinweis auf die bedeutende Rolle der miRNAs auf die Entstehung von Krebsgeschehen in dieser sensiblen Phase gab die Vorhersage der Regulation des Insulinähnlichen Wachstumsfaktors (IGF1). Der IGF1/IGF1R Signaltransduktionsweg wurde im Zusammenhang mit der Entwicklung, dem Überleben sowie der Metastasierung von humanem kolorektalen Krebs beschrieben (Hakam *et al.* 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte eine erhöhte Expression von IGF1 im Ileum zum Absetzen hin beschrieben werden. Die hier vorhergesagten potentiellen Regulatoren (miR-148a/152 und miR-215) wurden im kolorektalen Krebs vermindert exprimiert und legten damit die Wirkung als Tumorsuppressor nahe (Chen *et al.* 2010, Faltejškova *et al.* 2012). Die postnatale Phase stellt einen besonders kritischen Prozess dar, bei dem komplexe Umbauvorgänge der Darmmukosa stattfinden und mit der Entstehung von einer Vielzahl von Entzündungsgeschehen in Verbindung gebracht werden. Eine abnorme miRNA Expression könnte somit besonders in dieser Phase die Entstehung von Entzündungsgeschehen begünstigen. In der vorliegenden Arbeit konnten erstmalig Vorhersagen über die während der postnatalen Darmentwicklung und insbesondere zum Zeitpunkt des Absetzens zugrunde liegenden regulatorischen miRNA abhängigen Vorgänge, die die Entstehung von UC, die Besiedlung mit Pathogenen und der Entartung des Gewebes begünstigen, getroffen werden. Damit liefern diese Vorhersagen neue Ansatzpunkte die Darmbesiedlung mit Pathogenen, wie beispielsweise Salmonellen, zu verhindern. Eine Infektion mit Salmonellen die zum Zeitpunkt der Geburt und während der postnatalen Darmentwicklung stattfindet bleibt häufig auch bei älteren Tieren bestehen (Berends *et al.* 1996). Da sich Schweine in der Regel latent infizieren, stellen sie eine Hauptursache für lebensmittelbedingte Infektionen beim Menschen dar. Bestrebungen, die Infektion bei Schweinen schon zu frühen Entwicklungsphasen zu bekämpfen, sind daher wünschenswert.

4.2. Salmonelleninfektion

4.2.1 Darmabschnittsspezifische miRNA Expression während einer *S. Typhimurium* Infektion

Zur Charakterisierung des Einflusses einer Pathogeninfektion zum Zeitpunkt des Absetzens wurden Infektionsstudien mit *S. Typhimurium* an Absetzferkeln durchgeführt. Der Darmtrakt stellt hierbei mit seiner enormen Oberfläche das größte Grenzorgan des Organismus dar (Beckmann 2000), womit ihm eine entscheidende Rolle zukommt, das Eindringen von Pathogenen zu verhindern. Pathogene wie Salmonellen haben Mechanismen entwickelt, die zelluläre Integrität zu stören, dem Wirt damit zu schädigen und somit eine Gesundheitsgefahr darzustellen. Salmonellen sind in der Lage, nach oraler Aufnahme das saure Milieu im Magen, durch ihre Säuretoleranz zu überstehen und den Dünndarm zu besiedeln. Dort penetrieren sie die intestinale Mukusschicht, mit eingebetteter autochtoner Darmflora, weichen den Wirtsabwehrmechanismen wie beispielsweise Verdauungsenzymen, Gallensalzen, sekretorischen IgA, dem darmassoziierten Immunsystem und antimikrobiellen Peptiden aus und befallen die Darmepithelzellen (Haraga *et al.* 2008). Die Darmepithelzellen separieren dabei das Wirtsbindegewebe von der Umwelt und stehen somit im besonderen Fokus bei der Aufrechterhaltung der intestinalen Barriere.

Im weiteren Verlauf der Infektion besiedeln die Salmonellen weitere Abschnitte des Darms und innere Organe. Durch die Interaktion der Salmonellen mit den Enterozyten kommt es zu vielfältigen Umbauvorgängen der Zelle und Aktivierung von zellulären Signalkaskaden. In den meisten Studien, die sich mit der veränderten Genexpression während einer Salmonelleninfektion im porcinen Darmtrakt beschäftigten, sind vor allem Änderungen in der Immunantwort im Dünndarm charakterisiert worden (Meurens *et al.* 2009, Collado-Romero *et al.* 2010). Der Dickdarm stellt jedoch ebenfalls einen wichtigen Ort der Besiedlung durch Salmonellen dar. In Tieren der vorliegenden Arbeit konnte 1 d und 3 d p.i. die höchste Salmonellenbelastung im Colon, vor allem in der SP-Gruppe, nachgewiesen werden (Szabó *et al.* 2009). Dies korrelierte mit den hier generierten Microarrayexpressionsdaten, in denen Gene der pathogenen *E. coli* Infektion sowie des Aktin-Zytoskeletts im Ileum bereits 3 h p.i. verstärkt exprimiert waren, im Colon ascendens jedoch erst ab 1 d p.i. Im Verlaufe einer Salmonelleninfektion produzieren Salmonellen spezifische Effektorproteine, die daraufhin RhoGTPasen aktivieren, wodurch eine Rekrutierung von ARP2/3 resultiert (Hardt *et al.* 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte eine Induktion der RhoGTPasen RhoA und Rac2 sowie von ARP2/3 nachvollzogen werden. Der damit einhergehende Umbau des Aktin-Zytoskeletts wurde sichtbar anhand der Induktion von tubulären Genen wie TUBA1B, TUBA4A, TUBA1C und TUBB2A. Dies spiegelte somit die zu diesem Zeitpunkt stattgefundenen Salmonelleninfektion wieder. *E. faecium* behandelte Tiere zeigten ebenfalls eine Induktion dieser Gene, was auch in diesen Tieren für eine stattgefundenen Salmonelleninfektion sprach. Des Weiteren waren Gene der Immunantwort im Ileum bereits 3 h p.i. differentiell exprimiert, im Colon ascendens erst ab 1 d p.i. Im Colon ascendens wurden vor allem Komponenten des Majorhistokompatibilitätskomplex I verstärkt exprimiert, dies deutete auf eine in erster Linie T-Zellvermittelte Immunantwort hin.

Dass jeder Darmabschnitt ganz individuell auf die Besiedlung mit Pathogenen reagiert, wurde bereits beschrieben (Collado-Romero *et al.* 2010). Dabei spielt auch der

unterschiedliche histologische Aufbau des Dün- und Dickdarms eine entscheidende Rolle. Im Dickdarm sind beispielsweise keine Darmzotten mehr vorhanden. Aufgrund der darmabschnitts-spezifischen Reaktionen auf Salmonellen wurden beide Darmabschnitte in der vorliegenden Arbeit getrennt voneinander betrachtet. Collado-Romero *et al.* (2010) beschrieben bereits unterschiedliche darmabschnittsspezifische Expressionsmuster von Genen der Immunantwort im Verlaufe einer *S. Typhimurium* Infektion im Schwein. Im Ileum wurde beispielsweise eine verminderte Expression oder die fehlende Induktion einiger pro-inflammatorischer Zytokine beschrieben. Ähnliche Beobachtungen konnten in der vorliegenden Arbeit beschrieben werden. B2M, eine Komponente des MHC I, sowie HLA-DQA waren im Ileum vermindert exprimiert, wogegen im Colon ascendens eine erhöhte Expression während der Salmonelleninfektion nachgewiesen werden konnte. CD8b zeigte im Ileum eine verstärkte, im Colon ascendens hingegen eine verminderte Expression. Auch wurden verschiedene Signaltransduktionskaskaden darmabschnittsspezifisch angesprochen. Im Colon ascendens konnte eine Beteiligung im Glutathion Metabolismus und „Wnt Signaling Pathway“ im Verlaufe der Salmonelleninfektion nachgewiesen werden.

Der „Wnt Signaling Pathway“ spielt eine entscheidende Rolle bei gastrointestinaler Epithelzellproliferation und Immunantwort (Liu *et al.* 2011). In einer Studie von Duan *et al.* (2007) rief *S. Typhimurium* eine Degradation von β -Catenin, einem Zielgen des „Wnt signaling Pathways“ hervor (Solberg *et al.* 2012) mit einhergehender Aktivierung des NF κ B-Transkriptionsfaktors mit folgender Produktion pro-inflammatorischer Zytokine. Interessanterweise waren die Gene CER1 und NKD1 in der vorliegenden Arbeit im Colon ascendens im Vergleich zur Kontrolle in der S- und SP-Gruppe verstärkt exprimiert. Beide Gene stellen einen Inhibitor des „Wnt signaling Pathways“ dar und unterstützen somit die Ergebnisse der Studie von Duan *et al.* 2007. Im Ileum zeigte der Transkriptionsfaktor Tcf3 zu frühen Infektionszeitpunkten eine erhöhte Expression. Tcf3 stellte einen Repressor von β -Catenin dar und spielt möglicherweise in der Kaskade der Inhibierung des „Wnt signaling Pathways“ ebenfalls eine Rolle.

Eine Beteiligung am Glutathionmetabolismus während einer Salmonelleninfektion wurde von Mehta *et al.* (1998) beschrieben. Im salmonelleninfizierten Rattenileum wurde eine verminderte Expression von Enzymen des Glutathionmetabolismus (GSH, SOD, GSH-Px, GSR und G6PDH) sowie eine verstärkte Expression von GST nachgewiesen. Die Autoren schlussfolgerten daraus einen Pathogenitätsmechanismus der Salmonellen durch einen verringerten endogenen intestinalen Schutz gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies. Eine Depletion von Glutathion erschwerte ebenfalls die ileale Entzündung in *Salmonella* infizierten Ratten (van Ampting *et al.* 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde im Colon ascendens eine dazu passende verminderte Expression der Gene GSTP1, GPX2 und MGST3 nachgewiesen.

Die Regulation von ribosomalen Proteinen war während der Salmonelleninfektion ebenfalls spezifisch im Ileum und Colon ascendens. Der Einfluss einer *S. choleraesuis* Infektion auf die Expression ribosomaler Proteine in porcinen Mesenteriallymphknoten wurde 2008 von Wang *et al.* beschrieben. Die Autoren beschrieben eine verringerte Expression dieser Gene, korrelierend zu den Microarrayexpressionsdaten der vorliegenden Arbeit im Ileum. Im Colon ascendens hingegen wurde eine Induktion nach Salmonelleninfektion nachgewiesen. Diese Ergebnisse verdeutlichten, dass die unterschiedlichen Darmabschnitte ganz individuell und

zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf eine Salmonelleninfektion reagierten. Was ebenfalls deutlich wurde anhand von Genen die zu den ECM Komponenten gerechnet werden (DAG, COL3A1, COL1A1, COL4A1). Im Colon ascendens wurde im Verlaufe der Salmonelleninfektion eine Zerstörung dieser Komponenten nachgewiesen, wobei im Ileum eine Induktion der Gene auftrat. Eine Zerstörung von ECM Komponenten wie Kollagene und Laminin durch einige Pathogene zur besseren Adhäsion und Induktion der Wirtsimmunität ist bereits beschrieben (Singh *et al.* 2012).

Des Weiteren gab es Hinweise auf eine im Ileum zu frühen Infektionszeitpunkten stattfindende Induktion der Apoptose. Die Induktion der Apoptose stellt zum Einen einen Pathogenitätsmechanismus dar, der den Bakterien hilft, den Wirt besser attackieren und ins Gewebe eindringen zu können (Grassmé *et al.* 2001). Auf der anderen Seite gilt die Apoptose als evolutionär konservierte Immunantwort des Wirtes, um infizierte Zellen eliminieren zu können. Für einige Bakterien wie beispielsweise Mycobakterien wurde eine Inhibierung der Apoptose über Modifizierung des Bcl2 Pathways als möglicher Mechanismus beschrieben der Wirtsimmunantwort zu entkommen (Zhang *et al.* 2005). Im Ileum zeigte sich zu frühen Infektionszeitpunkten in *Salmonella* infizierten Tieren eine erhöhte Bax Expression, die sich im Verlaufe der Infektion verringerte. Dies deutet zu frühen Zeitpunkten auf eine damit einhergehende Apoptoseförderung mit gefolgter Apoptoseinhibierung hin. Die angenommene anfängliche Apoptoseförderung legt die Vermutung nahe, dass Salmonellen dadurch vermehrt in der Lage sind ins Gewebe einzudringen, sowie durch die anschließende Apoptoseinhibierung der Wirtsimmunität zu entkommen, um sich im Gewebe manifestieren zu können. Interessanter Weise war die Bax Expression in SP-Tieren über den gesamten Verlauf vermindert. Dies könnte zu einer verminderten Aufnahme von Salmonellen ins Gewebe geführt haben.

Anhand des miRNA Expressionsprofils wurden die individuellen Reaktionen der Darmabschnitte während einer Salmonelleninfektion ebenfalls sichtbar. Gleichzeitig konnten unterschiedliche Einflüsse des Probiotikums *E. faecium* charakterisiert werden. Im Ileum wurden miRNAs beschrieben, die in der S- und SP-Gruppe gleich reguliert waren. Der Einfluss der Salmonelleninfektion auf die differentielle Expression ist hier übereinstimmend mit den mRNA Profilen. Im Colon ascendens hingegen wurden vorwiegend miRNAs differentiell in der SP-Gruppe ab 3 d p.i. nachgewiesen. Die durch die Zielgene der miRNA angesprochenen Pathways „Endocytosis“, „Regulation of actin cytoskeleton“, „focal adhesion“, „MAPK signaling pathway“ und „Pathway in cancer“ wiesen darauf hin, dass die untersuchten miRNAs eine Rolle während der Pathogen-Wirt-Interaktion sowie bei Zelldifferenzierungs- und Proliferationsvorgängen spielten. Hierdurch wurde deutlich, dass im Colon ascendens das miRNA Profil durch die Salmonelleninfektion nicht signifikant verändert wurde, jedoch der Einsatz des Probiotikums die miRNAs, welche regulatorisch während der Infektion wirken, signifikant in ihrer Expression verändert hat und damit fördernd auf eine *Salmonella* Infektion wirkte. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Szabó *et al.* 2009, in denen die Autoren in den gleichen Tieren feststellten, dass die Ferkel der SP-Gruppe nach Gabe von *E. faecium* eine erhöhte Ausscheidung von Salmonellen zeigten, sowie eine höhere Kolonisierung in Organen vor allem auch im Colon ascendens. Dies resultierte wiederum in einer früheren und stärkeren humoralen Immunantwort (Szabó *et al.* 2009).

Anhand der miRNA Expressionsprofile wurde deutlich, dass vor allem das Colon ascendens einen entscheidenden Beitrag bei der verstärkten Reaktion auf die Salmonelleninfektion in der SP-Gruppe leistete. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig das miRNA Expressionsmuster im porcinen Ileum und Colon ascendens während einer Salmonelleninfektion und der Einfluss des Probiotikums *E. faecium* aufgezeigt werden. Bis heute gibt es nur Studien, die den Einfluss einer *S. Typhimurium* Infektion auf das Expressionsprofil einiger ausgewählter miRNAs in humanen Monozyten, murinen Makrophagen und HeLa Zellen charakterisierten (Sharbati *et al.* 2012, Schulte *et al.* 2011).

Die integrative Analyse der mRNA und miRNA Expressionsprofile verdeutlichte zusätzlich die darmabschnittspezifischen Reaktionen. Während im Colon ascendens weitaus weniger proteinkodierende Gene unter der Regulation von miRNAs standen, konnten im Ileum 248 potentielle Interaktionen nachgewiesen werden. Trotz der unterschiedlichen Anzahl der Interaktionen wurden in beiden Darmabschnitten ähnliche Pathways angesprochen. Hier standen vor allem Gene im Vordergrund, die in Verbindung mit einer Salmonelleninfektion und des stattgefundenen Gewebeumbaus standen. COL4A1 war beispielsweise in der Regulation des Aktin-Zytoskeletts und in fokalen Adhäsionen involviert. In beiden Darmabschnitten konnten gemeinsame potentielle Regulatoren identifiziert werden, unter anderem die miR-23b. Dies stellte auch die erste Vorhersage der regulativen Wirkung von miR-23b auf COL4A1 dar. In der Literatur sind weitere Regulatoren von COL4A1 beschrieben worden, wie miR-21 und miR-29a. In proximalen Nierentubuluszellen (HK-Zellen) fand unter dem Einfluss von Glukose/TGFbeta eine COL4A1 Regulation durch miR-29a statt (Du *et al.* 2010). Die miR-21 wirkte in humanen Granulosazellen regulatorisch auf COL4A1 (Mase *et al.* 2012). Beide beschriebenen Interaktionen konnten in der vorliegenden Arbeit spezifisch im Colon ascendens nachvollzogen werden. Der Vergleich der Microarrayexpressionsdaten von COL4A1 und der miR-29a Expression im Ileum ergab eine negative Korrelation und damit eine Bekräftigung dieser Interaktion. Übereinstimmungen konnten ebenfalls zu den Vorhersagen aus der integrativen Analyse aus den Daten der Absetzphase gefunden werden. IGF-1 wurde im Colon ascendens und während der Absetzphase potentiell durch die miR-152 reguliert sowie im Ileum und während der Absetzphase durch miR-30c, miR-27b, miR-361-5p und miR-26a. Alle vorhergesagten Interaktionen stellten erstmalige Vorhersagen dar.

4.2.2. Eine Salmonelleninfektion führt zu einer veränderten SELPLG und miR-34a Expression im Colon ascendens

Nach der Kontaktaufnahme von Salmonellen mit Enterozyten werden mittels des Typ-III Sekretionsapparates Effektorproteine ins Cytoplasma der Enterozyten eingeschleust. Dies aktiviert eine Vielzahl von Signalkaskaden, die nicht nur die Aufnahme der Salmonellen hervorrufen, sondern auch komplexe immunologische Abwehrmechanismen des Wirtes in Gang setzen. Die Aktivierung des MAPK Pathway resultiert in einer Aktivierung von AP-1 und NF- κ B, was wiederum zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL-8, führt. Diese pro-inflammatorischen Zytokine stimulieren eine PMN Transmigration sowie Entzündungsreaktionen im infizierten Gewebe (Haraga *et al.* 2008). Der Sinn einer Immunantwort liegt dabei in der Unschädlichmachung eines eingedrungenen Antigens

(Mikroorganismus oder Fremdkörper) und damit Schutz vor einer systemischen Infektion. Da die Salmonellen aber durch ihre Effektorproteine selbst in der Lage sind, die Immunantwort zu beeinflussen, sehen neuere Studien genau darin einen Pathogenitätsmechanismus der Salmonellen, ihre Überlebenschancen im Darm zu erhöhen. Diskutiert wird dabei der Einfluss auf die kommensale Mikrobiota des Darms. In einer gesunden intestinalen Mukosa besteht eine Homöostase zwischen dem Immunsystem und kommensalen Mikroorganismen. Pathogene müssen die autochtone Mikrobiota zerstören, um kolonisieren zu können. Dies realisieren Salmonellen direkt durch Salmonellen-Kommensalen-Interaktion, mittels Aktivierung der Wirtsimmunität oder durch Kombination beider Mechanismen (Barman *et al.* 2008). Die Zerstörung der autochtonen Mikrobiota ermöglicht den Salmonellen daraufhin zu kolonisieren und den Darmtrakt zu überwachen. Die Aktivierung der Wirtsimmunität durch Salmonellen konnte in der vorliegenden Arbeit anhand der Microarrayanalyse in beiden Darmabschnitten nachvollzogen werden. CD74 und HSP90 zeigten beispielsweise eine Induktion nach Infektion, wogegen in der physiologischen Entwicklung zum gleichen Zeitpunkt kurz nach dem Absetzen eine Verringerung der Expression auftrat. Ein weiterer Mechanismus, wie Salmonellen die Wirtsimmunität für ihre Zwecke nutzen, ist von Winter *et al.* (2010) beschrieben worden. Aktivierte Immunzellen bilden als Abwehrstrategie reaktive Sauerstoffspezies, dabei wird Thiosulfat zu Tetrathionat oxidiert. Salmonellen sind in der Lage, das Tetrathionat als Sauerstoffsatz zu nutzen, um über Gärung Energie zu gewinnen und sich damit gegenüber der autochtonen Mikrobiota einen Überlebensvorteil zu sichern. Diese Studien belegen die Theorie, dass Salmonellen die Immunantwort des Wirtes beeinflussen, um ihr eigenes Überleben zu fördern; eine nähere Charakterisierung weiterer Mechanismen muss hierzu aber noch erfolgen.

Eine Idee eines möglichen weiteren Mechanismus lieferte eine Studie von Kum *et al.* (2009) in Verbindung mit Ergebnissen, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurden. In der Studie von Kum *et al.* (2009) wurde der Einfluss einer veränderten Immunantwort auf die Salmonelleninfektion charakterisiert. In SELPLG defizienten Mäusen wurde eine erhöhte Mortalität, Salmonellenlast und Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF α und MCP-1 beschrieben. In der vorliegenden Arbeit konnte eine ähnliche Feststellung getroffen werden. Im Colon ascendens wurde eine verminderte SELPLG Expression auf transkriptioneller und translationeller Ebene in salmonelleninfizierten Schweinen beschrieben. Eine erhöhte TNF α und MCP-1 Expression wurde ebenfalls beobachtet. Dies deutet auf einen durch Salmonellen hervorgerufenen Effekt hin, der zum Ziel hat, eine erhöhte Entzündungsreaktion und damit einhergehende verstärkte Salmonelleninvasion auszulösen. SELPLG stellt den wichtigsten Selektin Liganden dar und ist für die Leukozyten Rekrutierung von entscheidender Bedeutung. Kum *et al.* fanden in den SELPLG defizienten Mäusen zusätzlich eine erhöhte Expression von MAdCAM-1 und dem $\alpha_4\beta_7$ Integrin. Die vermehrte Neutrophileninfiltration konnte in diesen Mäusen vermindert werden, nach Blockierung des $\alpha_4\beta_7$ Integrins. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass ein Alternativweg, über MAdCAM-1 vermehrt abließ und damit zu einer verstärkten Entzündungsreaktion führte. Dies förderte die vermehrte Zerstörung von Gewebe, was ein besseres Eindringen der Salmonellen gewährleistete. Interessanterweise wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine erhöhte MAdCAM-1 Expression, verbunden mit einer Verminderung der SELPLG Expression beobachtet. Dies lässt die Vermutung zu, dass es sich hierbei um einen

Mechanismus der Salmonellen handelt, das Wirtsimmunsystem zu ihren Gunsten zu beeinflussen. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu einer Studie, in der keine veränderten Expressionsverläufe von MAdCAM-1 während einer *S. Typhimurium* Infektion in porcinen Jejunal Schleifen nachgewiesen wurden (Meurens *et al.* 2008). Erstaunlicherweise verringerte sich die transkriptionelle und translationelle SELPLG Expression in salmonelleninfizierten Tieren, die zusätzlich mit dem Probiotikum *E. faecium* behandelt wurden, nicht. Die Beobachtung könnte anhand der Studie von Kum *et al.* jedoch die Schlussfolgerung zu lassen, dass durch eine normale SELPLG Expression weniger Salmonellen im Vergleich zur Salmonelleninfizierten Gruppe einwandern können, hervorgerufen durch eine Verhinderung der überschüssigen Entzündungsreaktion und damit einhergehenden verringerten Zerstörung des Gewebes. Für diese These sprach das TNF α Expressionsprofil in dem von uns untersuchten Darmgewebe.

TNF α wird im Laufe einer bakteriellen Entzündung verstärkt exprimiert, führt über die Induktion von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen zu einer verstärkten Rekrutierung von Leukozyten und erhöht damit die Entzündungsreaktion des Gewebes. Die TNF α Expression war signifikant in der S-Gruppe während der Infektion erhöht, in der SP-Gruppe wurde hingegen keine veränderte Expression beschrieben. Das gleiche Expressionsprofil wies das pro-inflammatorische Zytokin MCP-1 auf. MCP-1 wird während einer Infektion durch TNF α induziert und fördert die Chemotaxis von Monozyten und neutrophilen Leukozyten (Watanabe *et al.* 2004). Die Expressionsprofile dieser beiden pro-inflammatorischen Zytokine implizieren eine verringert ablaufende Immunantwort gegenüber Salmonellen in der SP-Gruppe. Konträre Ergebnisse lieferten jedoch in der vorliegenden Arbeit die Expressionsprofile des pro-inflammatorischen Zytokins IL-8, sowie der Adhäsionsmoleküle VCAM-1, MAdCAM-1 und ICAM-1. Hier zeigte sich eine verstärkte Expression in der SP-Gruppe. Dies zeigte, dass trotz scheinbar verringerter Immunantwort eine Infektion mit Salmonellen, durch ihre Effektorproteine vor allem eine IL-8 Induktion hervorrief. Hier traten somit einerseits eine Aktivierung der Entzündungsreaktion durch eine verstärkte Expression von IL-8, VCAM-1, ICAM-1 und MAdCAM-1 sowie andererseits eine Dämpfung der Immunantwort durch verminderte TNF α und MCP-1 Expression auf. Szabó *et al.* (2009) beschrieben in den Ferkeln der SP-Gruppe eine verstärkte Ausprägung von Krankheitserscheinungen mit Diarrhoe und vermehrtem Fieber, sowie einer erhöhten Salmonellenlast im Colon. Diese Beobachtungen ließen die Schlussfolgerung zu, dass die Salmonellen, wie in der SP-Gruppe zu beobachten gewesen ist, eine ausgeglichene Immunantwort des Wirtes benötigen, um sich im Darm langfristig vermehren zu können und im Endeffekt somit zu einer Manifestierung der Infektion führten.

Interessanterweise sorgen Salmonellen im Laufe der Infektion selbst für eine Dämpfung der Immunantwort durch Effektorproteine des Typ III Sekretionsapparates. Die Effektorproteine SspH1 und AvrA inhibieren den durch die Effektorproteine SopE, SopE2 und SopB aktivierten NF- κ B Transkriptionsfaktor. Dies führt zu einer verminderten Produktion von IL-8. (Collier-Hyams *et al.* 2002, Haraga & Miller 2006). Das Probiotikum *E. faecium* schien durch den Einfluss auf einige pro-inflammatorische Zytokine wie TNF α oder MCP-1 die Immunantwort zu dämpfen, was wiederum den Salmonellen half, im Darm zu überleben, und in einer verstärkten Salmonelleninfektion mündete.

Die molekularen Wirkungsmechanismen von Probiotika sind noch unzureichend charakterisiert. Erklärungsansätze sind beispielsweise, die Blockierung der Bindungsstellen für das Kolonisieren von Pathogenen durch Besiedlung des Mukus mit probiotischen Keimen sowie die Induktion der Wirtsimmunität. Für *E. faecium* (SF68) wurde eine Stimulierung der Immunantwort in Hunden beschrieben (Benyacoub *et al.* 2003). In einer Studie von Choi *et al.* (2012) wurde in Peritonealmakrophagen von *Listeria monocytogenes* infizierten Mäusen eine erhöhte NO, IL-1 β und TNF α Expression während einer *E. faecium* Gabe beschrieben. Dies resultierte in einer verstärkten Bekämpfung des Pathogens. Demgegenüber konnte in einer Studie von Scholven *et al.* (2009) keine Induktion der TNF α Expression nach Applikation von *E. faecium* in Absetzferkeln beobachtet werden. Ähnliche Ergebnisse wurden in Mäusen beschrieben, bei denen nach Besiedlung des Darmtraktes mit *E. faecium* und Induktion einer *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonie keine erhöhten TNF α , IL-6 und MCP-1 Level auftraten und damit keine verbesserte Immunantwort gegenüber *P.aeruginosa* zu beobachten gewesen war (Leendertse *et al.* 2009). Vahjen *et al.* (2003) konnten ebenfalls keinen eindeutigen Vorteil von *E. faecium* in Hunden beschreiben. Nach Gabe von *E. faecium* wurde hier eine erhöhte Besiedlung mit *Salmonella spp.* und *Clostridium spp.* sowie eine Reduktion von *Campylobacter spp.* nachgewiesen. Verbunden mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, die eine verringerte TNF α Expression durch *E. faecium* während einer Salmonelleninfektion beschrieben, verdeutlicht dies die sehr unterschiedliche Reaktion auf die Applikation von *E. faecium*, die speziesabhängig sowie abhängig vom Co-infizierten Keim zu sein scheint.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals ein potentieller Regulator (miR-34a) von SELPLG identifiziert werden, der im beschriebenen Geschehen regulativ Einfluss nehmen könnte. MiRNAs sind schon lange als Regulatoren der Immunantwort identifiziert, beispielsweise können sie eine Rolle bei der Regulation der Bildung von Entzündungsmediatoren spielen (Lindsay 2008). Auch eine regulatorische Beteiligung bei der Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1, ICAM-1 oder auch Selektin-E ist beschrieben (Harris *et al.* 2008, Harris *et al.* 2010, Suárez *et al.* 2010). Eine evolutionär hohe Konservierung konnte durch das Vorkommen der miR-34a-SELPLG Interaktion im humanen und porcinen System, mittels Luciferaseassay belegt werden. Interessanterweise wurde die Rolle von miR-34a während Entzündungsprozessen in neueren Studien beschrieben (Liu *et al.* 2011), während die Beteiligung als Tumorsuppressor seit langem bekannt war. Die in der vorliegenden Arbeit festgestellte erhöhte miR-34a Expression nach Salmonelleninfektion in der S- und SP-Gruppe stand im Widerspruch zu einer Studie von Jiang *et al.* (2012). Die Autoren beschrieben hier eine verminderte miR-34a Expression durch LPS Stimulierung in Makrophagen, einhergehend mit einer erhöhten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF α und IL-6 durch eine miR-34a-Notch1 Interaktion. Eine LPS induzierte NF- κ B Aktivierung wurde durch miR-34a deutlich reduziert.

Ausgehend von der Annahme, dass die Salmonellen eine Balance zwischen Aktivierung und Dämpfung des Immunsystems benötigen, könnte in der SP-Gruppe postuliert werden, dass die miR-34a hierbei einen entscheidenden Einfluss nahm. Die miR-34a Expression war, wie erwähnt, in der SP-Gruppe erhöht, ein direkter Einfluss auf SELPLG konnte nicht nachgewiesen werden. Die erhöhte miR-34a Expression könnte jedoch zu einer verminderten

TNF α Expression geföhrt haben mit gefolgt vermindelter Aktivierung von MCP-1, die damit dämpfend auf das Immunsystem wirkte und damit Einfluss auf die Stärke der Salmonelleninfektion nahm. In der S-Gruppe konnte ein gegensätzliches Expressionsprofil zwischen miR-34a und SELPLG nachgewiesen werden. Eine verminderte TNF α Expression einhergehend mit der erhöhten miR-34a Expression, konnte demgegenüber nicht nachgewiesen werden. Schlussfolgernd läßt sich sagen, dass entweder das Probiotikum *E. faecium* Einfluss auf die miR-34a-SELPLG Interaktion nahm und diese verhinderte, oder dass die miR-34a-SELPLG Interaktion in diesem System keinen Einfluss hatte und die gegensätzliche Regulation in der S-Gruppe einen Zufallsbefund darstellte. Deshalb müsste diese Interaktion weiter charakterisiert werden, indem beispielsweise eine transiente miR-34a Transfektion von Monozyten erfolgt mit anschließender Bestimmung der SELPLG Expression.

4.2.3 Eine Salmonelleninfektion föhrt zu einer miR-29a induzierten CAV2 Regulation im Ileum

Bei der Aufrechterhaltung der intestinalen Barriere, einem entscheidenden Faktor bei der Abwehr von Pathogenen, stellen die Zellmigration und Zellproliferation wichtige Mechanismen dar. Der dynamische Auf- und Abbau von fokalen Adhäsionen stellt wiederum einen Hauptmechanismus in der Regulierung der Zellmigration dar, der durch die kontinuierlich ablaufenden Erneuerungsprozesse der Epithelzellen gewährleistet wird. Die Epithelzellproliferation findet dabei in den Darmkrypten statt, mit anschließender Migration zu den Villi, wo die Zellen durch Apoptose abgeschilfert werden (Radtko *et al.* 2005). Fokale Adhäsionen sind hoch dynamische Strukturen, die das Aktin-Zytoskelett mechanisch an die extrazelluläre Matrix koppeln und gekennzeichnet sind durch ein kontinuierliches Austauschen von Proteinen wie beispielsweise der focal adhesion Kinase (FAK), Vinculin und Paxillin (Goetz *et al.* 2009). Interessanterweise zeigte Paxillin in der vorliegenden Arbeit in den Microarrayanalysen im Ileum eine verstärkte Expression zu frühen Phasen der Salmonelleninfektion. Die fördernde Wirkung der FAK auf die Wundheilung durch Regulation der intestinalen Epithelzellproliferation und das Überleben durch verstärkte Expression von Cyclin D1 wurde erst kürzlich beschrieben (Owen *et al.* 2011). Ein weiteres fokales Adhäsionsprotein, das Tyrosin phosphorylierte Caveolin 1 (pY14CAV1), ermöglicht Zellmigration und Zellsignalkaskaden durch Stabilisierung der FAK in fokalen Adhäsionen, was wiederum zu erhöhtem Umsatz und Abbau der fokalen Adhäsionen föhrt (Goetz *et al.* 2008). PY19CAV2 wurde in Co-Lokalisierung mit aktivierter FAK in fokalen Adhäsionen beschrieben, dies impliziert ähnliche Funktionen in der Signaltransduktion wie pY14CAV1 (Lee *et al.* 2002). Diese Studien heben hervor, dass auch Caveoline eine lang bekannte Proteinfamilie der fokalen Adhäsionen darstellen, ihre Funktion als Signalmolekül ist aber noch nicht vollständig aufgeklärt (Goetz *et al.* 2009). Ebenso scheint ihre Beteiligung an Signalkaskaden zellabhängig zu sein.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein CAV2 *knock-down* oder eine forcierte CAV2 Expression die Proliferation von humanen sowie porcinen intestinalen Zelllinien direkt förderte bzw. reduzierte. Kürzlich wurde gezeigt, dass CAV2 vielseitige Effekte auf die Proliferation von Tumorzellen besitzt. Die Autoren zeigten hierbei, dass eine CAV2 Expression in Neuroblastom- und Leberzellkarzinomzellen zu einer verminderten

Proliferation führte, wo hingegen ein *knock-down* von CAV2 in Gliomzellen den gleichen Effekt hervorrief (Lee *et al.* 2011). Durch eine in der vorliegenden Arbeit belegte miR-29a-CAV2 abhängige Verminderung der epithelialen Zellproliferation könnte die epitheliale Zellerneuerung gehemmt werden und damit einhergehend auch die Wundheilung von infiziertem Gewebe. Um diese These zu stützen sind hierfür jedoch weitere *in vivo* Studien nötig. Die Proliferationsunterschiede im Vergleich zur nonsense Kontrolle fielen in IPECJ-2 Zellen jedoch geringer aus als in den HT-29 Zellen; ursächlich ist hier die Uniformität der kolorektalen Karzinomzellen (HT29) zu sehen, die zu einer geringeren Standardabweichung führte und damit Proliferationsunterschiede deutlicher sichtbar wurden.

Fokale Adhäsionen stellen nicht nur Zellverankerungen dar, sondern fungieren als bidirektionale mechanische Biosensoren, die es ermöglichen die Umwelt wahrzunehmen und somit die Zelle über den Zustand der extrazellulären Matrix zu informieren, um daraufhin angemessen reagieren zu können. Sie integrieren dabei intrazelluläre und extrazelluläre Stimuli (Goetz *et al.* 2009). Während Enterozyten basolateral mit der *Lamina propria mucosae* kommunizieren, müssen sie apikal Kontakt zur Umwelt aufnehmen. Dies legt die Ausbildung von fokalen adhäsionsähnlichen Strukturen nahe, um diese Aufgabe zu erfüllen. Solche Strukturen zwischen Enterozyten und Salmonellen sind ebenfalls wichtig für die Aufnahme von Salmonellen auf der apikalen Seite von intestinalen Zellen, die frei von Integrinen sind. Es wurde bereits gezeigt, dass FAK und p130CAS wichtig sind für die bakterielle Aufnahme durch Formation von fokalen adhäsionsähnlichen Strukturen (Ly *et al.* 2007).

Die integrative Analyse von mRNA und miRNA Expressionsprofilen in ilealem, intestinalem, *Salmonella* infiziertem Gewebe zeigten, dass fokale Adhäsionsproteine wie Vinculin und CAV2 aber auch in der Formation von fokalen Adhäsionen involvierte ECM Proteine unter der Kontrolle von miRNAs standen. Vorwiegend wurde hier eine Regulation durch miR-29a beschrieben. Interessanterweise wurde die miR-29a bereits im Zusammenhang mit der Regulation von IFN γ in natürlichen Killerzellen und T Zellen während einer *L.monocytogenes* und *M.bovis* BCG Infektion beschrieben (Ma *et al.* 2012), sowie bei der Herabregulierung von CASP7 während einer *M.avium* Infektion in humanen Makrophagen mit gefolgter Inhibierung der Apoptose (Sharbati *et al.* 2011). Des Weiteren wurde beschrieben, dass miR-29a die dendritische Dorn Morphologie durch Regulation von Arp2/3 beeinflusste (Lippi *et al.* 2011). Eine frühe Heraufregulierung von miR-29a in *Salmonella* infizierten Tieren im Ileum mit gleichzeitiger Herabregulierung ihres Zielgens CAV2 konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Eine evolutionär hohe Konservierung konnte durch das Vorkommen der miR-29a-CAV2 Interaktion im humanen und porcinen System belegt werden. Dies wiederum spricht für die Regulierung einer basalen zellulären Signalkaskade, die während der Säugetierevolution unmodifiziert geblieben ist.

Bei Tieren, denen das Probiotikum *E. faecium* verabreicht wurde, konnte im Vergleich zu den Kontrollen keine veränderte CAV2, CDC42 und miR-29a Expression nachgewiesen werden. Der molekulare Mechanismus, der hinter der Wirkweise von Probiotika steht, ist noch wenig verstanden. Ein vermuteter Mechanismus beruht auf der Konkurrenz um Bindungsstellen zwischen Pathogenen und probiotischen Bakterien oder der Stimulation von Epitelzellbarrieren (Corr *et al.* 2009). Basierend auf dieser Idee könnte die Vermutung aufgestellt werden, dass die Konkurrenz zwischen *E. faecium* und *Salmonella* einen

physischen Kontakt der pathogenen Bakterien mit den intestinalen Epithelzellen verhinderte, einhergehend damit zu einer Verminderung der Ausbildung von fokalen adhäsionsähnlichen Strukturen führte und die Aufnahme hemmte. Abschließend lässt sich jedoch auch in der vorliegenden Arbeit nur ein sehr ambivalenter Nutzen von *E. faecium* feststellen. Im Ileum scheint es über den dargestellten Mechanismus der eventuellen Aufnahmehemmung von Salmonellen einen positiven Nutzen zu besitzen, im Colon ascendens hingegen konnte über die SELPLG Interaktion eher eine fördernde Wirkung auf die Salmonelleninfektion beschrieben werden.

In einer neueren Studie konnte gezeigt werden, dass miR-199a-3p den Umsatz der Zellproliferation sowie das Überleben der Zellen durch eine CAV2 Regulation moduliert (Shatseva *et al.* 2011). Des Weiteren wurde CDC42 als Zielgen von miR-199a-3p vorhergesagt. CAV2 und CDC42 besaßen dabei in der Tumorzelllinie MT1 eine negativ korrelierende Expression. Shatseva *et al.* vermuteten ursächlich transkriptionelle Effekte von CAV2 auf CDC42. Neben CDC42 stellt Rac1 die Haupt-RhoGTPase dar, die während einer zellulären Salmonelleninfektion durch Salmonelleneffektorproteine aktiviert wird und zu einer Aufnahme der Salmonellen führt (Ly & Casanova. 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnten anti-korrelierende Effekte zwischen miR-29a und CAV2 auf transkriptioneller oder translationeller Ebene bestätigt werden, aber keine Effekte auf CDC42. Eine CAV2 Herabregulierung mittels spezifischer siRNA sowie eine Überexpression von CAV2 in humanen und porcinen intestinalen Epithelzellen hatten keinen Effekt auf die CDC42 Expression auf translationeller und transkriptioneller Ebene. Die miR-29a wurde als Regulator für CDC42 bereits in HeLa Zellen beschrieben (Park *et al.* 2009). Es konnte aber kein Effekt von miR-29a auf CDC42 nachgewiesen werden, während CAV2 in gleichen Zellen signifikant verringert exprimiert gewesen war. Dieses Ergebnis legte die Vermutung nahe, dass die Regulation von CDC42 durch miR-29a zell- oder gewebespezifisch ist und daher näher charakterisiert werden muss. Sehr interessant war die Beobachtung, dass eine CAV2 Manipulation direkt verknüpft war mit einer veränderten bakteriellen Aufnahme. Da wie erwähnt die CDC42 Expression in den Zellen unverändert gewesen war, scheint das CDC42 Level keinen direkten Einfluss auf die Salmonellenaufnahme zu haben. Dies legt die Vermutung nahe, dass CAV2 direkt in die Aufnahme von Salmonellen involviert war oder eine Rolle in Signaltransduktionen spielte, die eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Salmonellen übernehmen, wie beispielsweise die Regulation des Aktin-Zytoskeletts. Wie schon erwähnt, spielt CAV2 eine wichtige Rolle in der FAK Signaltransduktion (Lee *et al.* 2002).

Zusätzlich ist bekannt, dass CAV1 als CDC42 GDI wirkt (Nevins *et al.* 2006). Deshalb wurde hier untersucht, ob CAV2 in der Lage ist, den Aktivierungszustand von CDC42 zu ändern. Die Ergebnisse zeigten eine direkte Beteiligung von CAV2 am Aktivierungszustand von CDC42, jedoch nicht von RAC1 und konnten somit die erhöhte Salmonellenaufnahme während einer verminderten CAV2 Expression erklären. Dies könnte einen neuen möglichen Pathogenitätsmechanismus zur vermehrten bakteriellen Aufnahme der Salmonellen aufzeigen. Eine erhöhte miR-29a Expression würde hierbei über eine verminderte CAV2 Expression zu einem erhöhten Aktivierungsgrad von CDC42 durch den Wegfall des CAV2 GDI Effektes auf CDC42 führen. Aktiviertes CDC42 würde daraufhin die Aktin-Zytoskelett

Signalkaskade stimulieren und damit zu einer erhöhten Salmonellenaufnahme in Enterozyten führen.

Die Suche nach Molekülen, die den CAV2 Signalweg unterbrechen oder das spezifische Herstellen von therapeutischen siRNA könnte die Möglichkeit bieten neue Therapieansätze für den Menschen und das Tier zu schaffen.

5. Zusammenfassung

Die Rolle intestinaler microRNAs und ihrer Zielgene in der postnatalen Darmentwicklung von Ferkeln insbesondere während der Absetzphase und nach Pathogen- sowie Probiotika-Pathogen-Exposition

Infektionen von Ferkeln während der Absetzphase können besonders kritisch sein und mit erhöhter Mortalität einhergehen. Der protektive Effekt der Milch fällt weg und die Ferkel werden zusätzlich großen Mengen neuer Nahrungs- und mikrobieller Antigene ausgesetzt. Während dieses Zeitraumes finden essentielle morphologische und funktionelle Veränderungen der Darmmukosa statt, die über eine Regulierung der Genexpression gesteuert werden. MiRNAs werden hierbei als bedeutende Regulatoren der Genexpression auf post-transkriptioneller Ebene angesehen. Ihre Beteiligung bei Zelldifferenzierungsvorgängen, der Organentwicklung und bei Pathogen-Wirt Interaktionen wurde bereits beschrieben.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, eine entwicklungsspezifische Expressionsanalyse von mRNA sowie miRNA durchzuführen, die zum besseren Verständnis der postnatalen Darmentwicklung bei Ferkeln, insbesondere während der Absetzphase beiträgt. Hierzu wurden Darmproben (Ileum und Colon ascendens) an sechs Zeitpunkten (7-56 d *post natum*) gewonnen. Die Genexpressionsanalyse der mRNA sowie miRNA erfolgte auf transkriptioneller Ebene mittels Microarrayanalysen, gefolgt von einer integrativen Analyse beider Datensätze. Erstmals konnte innerhalb dieser Arbeit das miRNA Expressionsmuster im porcinen Ileum und Colon ascendens aufgezeigt werden. MiRNAs, die zum Zeitpunkt des Absetzens differentiell reguliert gewesen waren, zeigten vor allem eine Beteiligung bei Signalkaskaden, die Einfluss bei Wirt-Pathogen-Interaktionen sowie Zellproliferationsvorgängen haben. Des Weiteren wurden erstmalig Regulatoren vorhergesagt, die während der postnatalen Darmentwicklung insbesondere bei der Ausbildung von Entzündungsgeschehen wie beispielsweise chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder Darmkrebs eine entscheidende Rolle spielen könnten. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse könnten Ansatzpunkte zur Behandlung von Erkrankungen, die in dieser kritischen Entwicklungsphase des Darmes auftreten, gefunden werden.

Schweine, die sich zum Zeitpunkt der Geburt und während der postnatalen Darmentwicklung mit Salmonellen infizieren, bleiben häufig auch in späteren Entwicklungsphasen infiziert. Da sich Schweine in der Regel latent infizieren, stellen sie eine Hauptsache für lebensmittelbedingte Infektionen beim Menschen dar. Bestrebungen, die Infektion bei Schweinen schon zu frühen Entwicklungsphasen zu bekämpfen, sind daher wünschenswert. Aus diesem Grund bestand ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, in der Charakterisierung des regulatorischen Einflusses von miRNAs während einer experimentellen *S. Typhimurium* Infektion sowie bei gleichzeitiger Applikation des Probiotikums *E. faecium* während der postnatalen Darmentwicklung. Die Charakterisierung erfolgte zu den Zeitpunkten 3 h-28 d *post infectionem* (28–56 d p.n.). Erstmals wurde das miRNA Expressionsprofil im porcinen Ileum und Colon ascendens während einer experimentellen Salmonelleninfektion sowie nach Applikation des Probiotikums *E. faecium* beschrieben. Hierbei zeigte sich, zum ersten Mal, die darmabschnittsspezifische zeitlich unterschiedliche Beeinflussung von *Salmonella*-spezifischen Signalkaskaden durch miRNAs.

Beide Darmabschnitte wurden aus diesem Grund getrennt voneinander betrachtet. Im Colon ascendens wurden v.a. miRNAs identifiziert, die während einer Salmonelleninfektion differentiell reguliert waren und Einfluss auf die adaptive Immunantwort nahmen. Eine RT-qPCR Analyse zeigte eine verstärkte miR-34a Expression nach *Salmonella* Infektion, das potentielle Zielgen der Selektin-P-Ligand (SELPLG) hingegen eine verminderte Expression. Reporterassaystudien bestätigten diese Interaktion im humanen sowie porcinen Zellmodell und dies stellt damit die erstmalige Beschreibung dieser Interaktion dar. Die integrative Analyse der mRNA und miRNA Expressionsprofile im Ileum ergab vor allem einen regulatorischen Einfluss der miRNAs während der Salmonelleninfektion auf fokale Adhäsionen und Aktin-Zytoskelett-Signalkaskaden. Die miR-29a übernahm dabei eine herausragende regulatorische Funktion, beispielsweise wurde Caveolin 2 (CAV2) von ihr reguliert. Mittels RT-qPCR Studien konnte eine Hochregulierung der miR-29a nach *Salmonella* Infektion nachgewiesen werden, wohingegen das potentielle Zielgen CAV2 eine verminderte Expression zeigte. Reporterassaystudien sowie RNAi und CAV2 Überexpressionsstudien, bestätigten CAV2 als direktes Zielgen der miR-29a. Dies stellt die erstmalige Charakterisierung dieser Interaktion dar. Ein *knock-down* von CAV2 resultierte in einer Proliferationshemmung von porcinen sowie humanen intestinalen Zellen. Des Weiteren konnte eine erhöhte Salmonelleninvasion in humane intestinale Zellen durch Regulierung des Aktivierungsstatus der RhoGTPase CDC42 nachgewiesen werden.

Eine gleichzeitige Applikation des Probiotikums *E. faecium* resultierte in keiner veränderten Expression von CAV2 und miR-29a im Ileum. Möglicherweise verhindert die Konkurrenz zwischen *E. faecium* und *Salmonella* den physischen Kontakt von Salmonellen mit intestinalen Epithelzellen, einhergehend mit verminderter Expression von fokalen adhäsionsähnlichen Strukturen und damit verringerter bakterieller Aufnahme. Die vorliegende Arbeit ermöglicht die Identifikation neuer Therapiemöglichkeiten bezüglich entzündlicher Vorgänge im Darm während der postnatalen Darmentwicklung, durch beispielsweise die Entwicklung von siRNAs, die spezifische Signalwege unterbrechen. Auch liefert sie durch die Beschreibung, wie miRNAs direkt Einfluss nehmen können auf die Invasion von Salmonellen in intestinale Zellen sowie die Beeinflussung der Wirtsimmunantwort neue Ansatzpunkte bei der Salmonellenbekämpfung.

6. Summary

The role of intestinal microRNA's and their targets during porcine intestinal postnatal development focussing on the weaning phase and pathogen- as well as pathogen-probiotic-exposition

Infections of piglets during the weaning period can be fatal and thus leading to increased mortality. During that period, the protective effect of milk is missing and piglets are exposed to new antigens, as for instance feed antigens. Furthermore, due to the essential change in intestinal mucosal function and morphology during that period, the intestine is extremely stressed. Regulation of gene expression is essential for growth and development of intestinal mucosa. A major class of mammalian gene modulators is constituted by miRNAs. It is known that miRNAs play a major role in cell differentiation processes, organ development and pathogen-host-interactions.

The aim of this study was to characterise the regulative influence of miRNAs during the porcine postnatal intestinal development focusing on the weaning phase. For this purpose intestinal tissue samples (Ileum and ascending colon) from healthy piglets were collected within 7–56 d *post natum*. Gene expression analyses of mRNA and miRNA were conducted by microarray analysis, followed by integrative analysis of both datasets. For the first time it was shown, in this work, the expression of miRNAs in the porcine ileum and ascending colon. Particularly at weaning differentially regulated miRNAs were involved in host-pathogen-interactions and cell proliferation pathways. Furthermore this study represents the first characterisation of major gene expression regulators during the porcine postnatal development, which are mainly involved in intestinal inflammation for example inflammatory bowel disease or cancer. Based on these findings approaches to treating diseases that occur during this critical phase of development of the intestine, could be found.

At birth and during the postnatal development with *Salmonella* infected pigs often remain infected in later development phases. Pigs are usually latently infected with *Salmonella*; thereby they are a major cause of food-borne infections in humans. Efforts to fight the infection in pigs are therefore desirable already at early stages of development.

For this reason a further aim of this study was to characterise the regulative influence of miRNAs during *S. Typhimurium* infection. This was done in animals with and without additional treatment with the probiotic strain *E. faecium*. Samples from both groups were taken 3 h–28 d *post infection* (28–56 d p.n.). For the first time, the miRNA expression profile has been described in porcine ileum and ascending colon during experimental *Salmonella* infection as well as after administration of the probiotic strain *E. faecium*. The results showed, for the first time, that the influence of *Salmonella*-specific pathways is time dependant and differentially regulated in both loci. Therefore both parts of intestine were considered separately. In ascending colon the identified miRNAs mainly regulate the adaptive immunity. RT-qPCR studies showed an increased miR-34a expression directly after *Salmonella* infection. In contrast the potential target Selectin-P-Ligand (SELPLG) showed a decreased expression. Reporter gene assays in human and porcine cell lines confirmed SELPLG as a miR-34a target and thus represents the first characterization of this interaction. Integrated expression analysis with target prediction in ileum identified miRNAs that mainly regulate focal adhesion as well as actin cytoskeleton pathways. MiR-29a was involved in

most calculated interactions including Caveolin 2 (CAV2). RT-qPCR experiments verified up-regulation of miR-29a after infection while its predicted target CAV2 was significantly down-regulated as shown by RT-qPCR and immuno detection. Reporter gene assays as well as RNAi experiments confirmed CAV2 as miR-29a target in human and porcine intestinal cells. This represents the first characterization of this interaction. *Knock-down* of CAV2 in human intestinal epithelial cells resulted in retarded proliferation and in increased bacterial uptake by regulating the activation state of the small Rho GTPase CDC42. A simultaneous application of the probiotic strain *E. faecium* resulted in no change in expression of miR-29a and CAV2 in the ileum. Maybe the competition between *E. faecium* and *Salmonella* prevented physical contact of *Salmonella* with intestinal epithelial cells, accompanied by reduced expression of focal adhesion structures and associated reduced intake. These results show, for the first time, that during *Salmonella* infection the influence of miRNA differs depending on the intestinal subdivision. The study provides the identification of new therapy strategies with respect to the inflammatory bowel disease during postnatal development by searching for molecules interrupting signaling pathways or the specific delivery of therapeutic siRNA. In addition this study gives new ideas for the control of *Salmonella* infection by the description of how miRNAs could regulate cellular uptake of *Salmonella* and by manipulation of host immunity.

7. Literaturverzeichnis

- Alon, Ronen; Ley, Klaus (2008):** Cells on the run: shear-regulated integrin activation in leukocyte rolling and arrest on endothelial cells. In: *Curr. Opin. Cell Biol.* 20 (5), S. 525–532.
- Artis, David (2008):** Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. In: *Nat. Rev. Immunol.* 8 (6), S. 411–420.
- Atarashi, Kazuyuki; Hirata, Takako; Matsumoto, Masanori; Kanemitsu, Naotoshi; Miyasaka, Masayuki (2005):** Rolling of Th1 cells via P-selectin glycoprotein ligand-1 stimulates LFA-1-mediated cell binding to ICAM-1. In: *J. Immunol.* 174 (3), S. 1424–1432.
- Babbin, Brian A.; Parkos, Charles A.; Mandell, Kenneth J.; Winfree, L. Matthew; Laur, Oskar; Ivanov, Andrei I.; Nusrat, Asma (2007):** Annexin 2 regulates intestinal epithelial cell spreading and wound closure through Rho-related signaling. In: *Am. J. Pathol.* 170 (3), S. 951–966.
- Bailey, M.; Haverson, K.; Inman, C.; Harris, C.; Jones, P.; Corfield, G. Miller, B.; Stokes, C. (2005):** The development of the mucosal immune system pre- and post-weaning: balancing regulatory and effector function. In: *Proc. Nutr. Soc.* 64 (4), S. 451–457.
- Barman, Melissa; Unold, David; Shifley, Kathleen; Amir, Elad; Hung, Kueichun; Bos, Nicolaas; Salzman, Nita (2008):** Enteric salmonellosis disrupts the microbial ecology of the murine gastrointestinal tract. In: *Infect. Immun.* 76 (3), S. 907–915.
- Baum, Michael; Bielau, Simone; Rittner, Nicole; Schmid, Kathrin; Eggelbusch, Kathrin; Dahms, Michael; Schlauersbach, Andrea; Tahedl, Harald; Beier, Markus; Gümil, Ramon; Scheffler, Matthias; Hermann, Carsten; Funk, Jörg-Michael; Wixmerten, Anke; Rebscher, Hans; Hönig, Matthias; Andreae, Claas; Büchner, Daniel; Moschel, Erich; Glathe, Andreas; Jäger, Evelyn; Thom, Marc; Grell, Andreas; Bestvater, Felix; Obermeier, Frank; Burgmaier, Josef; Thome, Klaus; Weichert, Sigrid; Heln, Silke; Binnewies, Tim; Foitzik, Volker; Müller, Manfred; Stähler, Cord Friedrich; Stähler, Peer Friedrich (2003):** Validation of a novel, fully integrated and flexible microarray benchtop facility for gene expression profiling. In: *Nucleic Acids Res.* 31 (23), S. e151.
- Beckmann, Gero (Hrsg.) (2000):** Mikrobiologie des Darmes. Grundlagen, Diagnostik, Therapie. Hannover: Schlütersche.
- Benyacoub, Jalil; Czarnecki-Maulden, Gail L.; Cavadini, Christoph; Sauthier, Thérèse; Anderson, Rachel E.; Schiffrin, Eduardo J.; Weid, Thierry von der (2003):** Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs. In: *J. Nutr.* 133 (4), S. 1158–1162.
- Berends, B. R.; Urlings, H. A.; Snijders, J. M.; van Knapen, F. (1996):** Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. In: *Int. J. Food Microbiol.* 30 (1-2), S. 37–53.
- Waldmann, Karl-Heinz; Wendt, Michael (Hrsg.) (2001):** Lehrbuch der Schweinekrankheiten. 3. Aufl. Berlin: Parey.
- Boettcher, Jan Peter; Kirchner, Marieluise; Churin, Yuri; Kaushansky, Alexis; Pombaiah, Malvika; Thorn, Hans; Brinkmann, Volker; Meyer, Macbeath; Gavin, Thomas F. (2010):** Tyrosine-phosphorylated caveolin-1 blocks bacterial uptake by inducing Vav2-RhoA-mediated cytoskeletal rearrangements. In: *PLoS Biol.* 8 (8), e1000457
- Butler, J. E.; Sun, J.; Weber, P.; Navarro, P.; Francis, D. (2000):** Antibody repertoire development in fetal and newborn piglets. III. Colonization of the gastrointestinal tract selectively diversifies the preimmune repertoire in mucosal lymphoid tissues. In: *Immunology* 100 (1), S. 119–130.
- Casey, Pat G.; Gardiner, Gillian E.; Casey, Garrett; Bradshaw, Bernard; Lawlor, Peadar G.; Lynch, P. Brendan; Leonard, Finola C.; Stanton, Catherine; Ross, R. Paul; Fitzgerald, Gerald F. (2007):** A five-strain probiotic combination reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in pigs challenged with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (6), S. 1858–1863.

- Chen, Yue; Song, Yongxi; Wang, Zhenning; Yue, Zhenyu; Xu, Huimian; Xing, Chengzhong; Liu, Zhuangkai (2010):** Altered expression of MiR-148a and MiR-152 in gastrointestinal cancers and its clinical significance. In: *J. Gastrointest. Surg.* 14 (7), S. 1170–1179.
- Choi, Hyun Jong; Shin, Myeong Su; Lee, Sang Myeong; Lee, Wan Kyu (2012):** Immunomodulatory property of *Enterococcus faecium* JWS 833 isolated from duck intestinal tract and the suppression against *Listeria monocytogenes* infection. In: *Microbiol. Immunol.* 56 (9), S.613-620
- Cline, Melissa S.; Smoot, Michael; Cerami, Ethan; Kuchinsky, Allan; Landys, Nerius; Workman, Chris; Christmas, Rowan; Avila-Campilo, Iliona; Creech, Michael; Gross, Benjamin (2007):** Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. In: *Nat Protoc* 2 (10), S. 2366–2382.
- Collado-Romero, Melania; Arce, Cristina; Ramírez-Boo, María; Carvajal, Ana; Garrido, Juan J. (2010):** Quantitative analysis of the immune response upon *Salmonella Typhimurium* infection along the porcine intestinal gut. In: *Vet. Res.* 41 (2), S. 23.
- Collier-Hyams, Lauren S.; Zeng, Hui; Sun, Jun; Tomlinson, Amelia D.; Bao, Zhao Qin; Chen, Huaqun; Madara, James L.; Orth, Kim; Neish, Andrew S. (2002):** Cutting edge: *Salmonella* AvrA effector inhibits the key proinflammatory, anti-apoptotic NF-kappa B pathway. In: *J. Immunol.* 169 (6), S. 2846–2850.
- Corr, Sinead C.; Hill, Colin; Gahan, Cormac G. M. (2009):** Understanding the mechanisms by which probiotics inhibit gastrointestinal pathogens. In: *Adv. Food Nutr. Res.* 56, S. 1–15.
- Du, Bin; Ma, Li-Ming; Huang, Mian-Bo; Zhou, Hui; Huang, Hui-Lin; Shao, Peng; Chen, Yue-Qin; Qu, Liang-Hu (2010):** High glucose down-regulates miR-29a to increase collagen IV production in HK-2 cells. In: *FEBS Lett.* 584 (4), S. 811–816.
- Duan, Yingli; Liao, Anne P.; Kuppireddi, Sumalatha; Ye, Zhongde; Ciancio, Mae J.; Sun, Jun (2007):** beta-Catenin activity negatively regulates bacteria-induced inflammation. In: *Lab. Invest.* 87 (6), S. 613–624.
- Duncan, Matthew J.; Li, Guojie; Shin, Jeoung-Sook; Carson, Johnny L.; Abraham, Soman N. (2004):** Bacterial penetration of bladder epithelium through lipid rafts. In: *J. Biol. Chem.* 279 (18), S. 18944–18951.
- EFSA (2009):** Analyse der Grundlagenerhebung zur Prävalenz von *Salmonella* in Haltungsbetrieben mit Zuchtschweinebeständen in der EU im Jahr 2008; Teil A: Schätzung der *Salmonella* Prävalenz. In: *EFSA J.* 7(12):1377
- Esworthy, R. Steven; Yang, Lixin; Frankel, Paul H.; Chu, Fong-Fong (2005):** Epithelium-specific glutathione peroxidase, Gpx2, is involved in the prevention of intestinal inflammation in selenium-deficient mice. In: *J. Nutr.* 135 (4), S. 740–745.
- Fairbrother, John M.; Nadeau, Eric; Gyles, Carlton L. (2005):** *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. In: *Anim Health. Res. Rev.* 6 (1), S. 17–39.
- Faltejškova, Petra; Svoboda, Marek; Srutova, Klara; Mlcochova, Jitka; Besse, Andrej; Nekvindova, Jana; Radova, Lenka; Fabian, Pavel; Slaba, Katerina; Kiss, Igor (2012):** Identification and functional screening of microRNAs highly deregulated in colorectal cancer. In: *J. cell. mol. med.* 16 (11), S. 2655-2666
- FAO/WHO (2001)** Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina, 1-4 October 2001
- Fu, Y.; Galán, J. E. (1999):** A salmonella protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. In: *Nature* 401 (6750), S. 293–297.
- Garrean, Sean; Gao, Xiao-Pei; Brovkovich, Victor; Shimizu, Jun; Zhao, You-Yang; Vogel, Stephen M.; Malik, Asrar B. (2006):** Caveolin-1 regulates NF-kappaB activation and lung inflammatory response to sepsis induced by lipopolysaccharide. In: *J. Immunol.* 177 (7), S. 4853–4860.

- Gingras, D.; Gauthier, F.; Lamy, S.; Desrosiers, R. R.; Béliveau, R. (1998):** Localization of RhoA GTPase to endothelial caveolae-enriched membrane domains. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247 (3), S. 888–893.
- Goetz, Jacky G.; Joshi, Bharat; Lajoie, Patrick; Strugnell, Scott S.; Scudamore, Trevor; Kojic, Liliana D.; Nabi, Ivan R. (2008):** Concerted regulation of focal adhesion dynamics by galectin-3 and tyrosine-phosphorylated caveolin-1. In: *J. Cell. Biol.* 180 (6), S. 1261–1275.
- Goetz, Jacky G. (2009):** Bidirectional control of the inner dynamics of focal adhesions promotes cell migration. In: *Cell. Adh. Migr.* 3 (2), S. 185–190.
- Goodridge, Jodie P.; Burian, Aura; Lee, Ni; Geraghty, Daniel E. (2010):** HLA-F complex without peptide binds to MHC class I protein in the open conformer form. In: *J. Immunol.* 184 (11), S. 6199–6208.
- Grassmé, H.; Jendrossek, V.; Gulbins, E. (2001):** Molecular mechanisms of bacteria induced apoptosis. In: *Apoptosis* 6 (6), S. 441–445.
- Green, Michael R.; Sambrook, Joseph (2012):** Molecular cloning. A laboratory manual. 4. Aufl. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Guenin-Macé, Laure; Carrette, Florent; Asperti-Boursin, François; Le Bon, Agnès; Caleechurn, Laxmee; Di Bartolo, Vincenzo; Fontanet, Arnaud; Bismuth, Georges; Demangel, Caroline (2011):** Mycolactone impairs T cell homing by suppressing microRNA control of L-selectin expression. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108 (31), S. 12833–12838.
- Hakam, A.; Yeatman, T. J.; Lu, L.; Mora, L.; Marcet, G.; Nicosia, S. V.; Karl, R.C.; Coppola, D. (1999):** Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in human colorectal cancer. In: *Hum. Pathol.* 30 (10), S. 1128–1133.
- Hampson, D. J. (1986):** Attempts to modify changes in the piglet small intestine after weaning. In: *Res. Vet. Sci.* 40 (3), S. 313–317.
- Hanahan, D. (1983):** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. In: *J. Mol. Biol.* 166 (4), S. 557–580.
- Hansen-Wester, I.; Hensel, M. (2001):** Salmonella pathogenicity islands encoding type III secretion systems. In: *Microbes Infect.* 3 (7), S. 549–559.
- Haraga, Andrea; Miller, Samuel I. (2003):** A *Salmonella enterica* serovar Typhimurium translocated leucine-rich repeat effector protein inhibits NF-kappa B-dependent gene expression. In: *Infect. Immun.* 71 (7), S. 4052–4058.
- Haraga, Andrea; Miller, Samuel I. (2006):** A *Salmonella* type III secretion effector interacts with the mammalian serine/threonine protein kinase PKN1. In: *Cell. Microbiol.* 8 (5), S. 837–846.
- Haraga, Andrea; Ohlson, Maikke B.; Miller, Samuel I. (2008):** Salmonellae interplay with host cells. In: *Nat. Rev. Microbiol.* 6 (1), S. 53–66.
- Hardt, W. D.; Chen, L. M.; Schuebel, K. E.; Bustelo, X. R.; Galán, J. E. (1998):** *S. Typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. In: *Cell* 93 (5), S. 815–826.
- Harris, Tamia A.; Yamakuchi, Munekazu; Ferlito, Marcella; Mendell, Joshua T.; Lowenstein, Charles J. (2008):** MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (5), S. 1516–1521.
- Harris, Tamia A.; Yamakuchi, Munekazu; Kondo, Maiko; Oettgen, Peter; Lowenstein, Charles J. (2010):** Ets-1 and Ets-2 regulate the expression of microRNA-126 in endothelial cells. In: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30 (10), S. 1990–1997.
- Hayward, Richard D.; Cain, Robert J.; McGhie, Emma J.; Phillips, Neil; Garner, Matthew J.; Koronakis, Vassilis (2005):** Cholesterol binding by the bacterial type III translocon is essential for virulence effector delivery into mammalian cells. In: *Mol. Microbiol.* 56 (3), S. 590–603.

- Hobbie, S.; Chen, L. M.; Davis, R. J.; Galán, J. E. (1997):** Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella* Typhimurium in cultured intestinal epithelial cells. In: *J. Immunol.* 159 (11), S. 5550–5559.
- Huang, Da Wei; Sherman, Brad T.; Lempicki, Richard A. (2009):** Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. In: *Nat. Protoc.* 4 (1), S. 44–57.
- Huber, Wolfgang; Heydebreck, Anja von; Sültmann, Holger; Poustka, Annemarie; Vingron, Martin (2002):** Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. In: *Bioinformatics* 18 Suppl 1, S. S96–104.
- Huntzinger, Eric; Izaurralde, Elisa (2011):** Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. In: *Nat. Rev. Genet.* 12 (2), S. 99–110.
- Hutvagner, Gyorgy (2005):** Small RNA asymmetry in RNAi: function in RISC assembly and gene regulation. In: *FEBS Lett.* 579 (26), S. 5850–5857.
- Jiang, Pei; Liu, Ronghua; Zheng, Yijie; Liu, Xiaoming; Chang, Lijun; Xiong, Shudao; Chu, Yiwei (2012):** MiR-34a inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through targeting Notch1 in murine macrophages. In: *Exp. Cell. Res.* 318 (10), S. 1175–1184.
- Johnnidis, Jonathan B.; Harris, Marian H.; Wheeler, Robert T.; Stehling-Sun, Sandra; Lam, Michael H.; Kirak, Oktay; Brummelkamp, Thijn; Fleming, Mark D.; Camargo, Fernando D. (2008):** Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. In: *Nature* 451 (7182), S. 1125–1129.
- Ketting, R. F.; Fischer, S. E.; Bernstein, E.; Sijen, T.; Hannon, G. J.; Plasterk, R. H. (2001):** Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. In: *Genes Dev.* 15 (20), S. 2654–2659.
- Krüger, Jan; Rehmsmeier, Marc (2006):** RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. In: *Nucleic Acids Res.* 34 (Web Server issue), S. W451–4.
- Kum, Winnie W. S.; Lee, Sansan; Grassl, Guntram A.; Bidshahri, Roza; Hsu, Kimberly; Ziltener, Hermann J.; Finlay, B. Brett (2009):** Lack of functional P-selectin ligand exacerbates *Salmonella* serovar Typhimurium infection. In: *J. Immunol.* 182 (10), S. 6550–6561.
- Lallès, Jean-Paul; Bosi, Paolo; Smidt, Hauke; Stokes, Chris R. (2007):** Nutritional management of gut health in pigs around weaning. In: *Proc. Nutr. Soc.* 66 (2), S. 260–268.
- Laszik, Z.; Jansen, P. J.; Cummings, R. D.; Tedder, T. F.; McEver, R. P.; Moore, K. L. (1996):** P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid, and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells. In: *Blood* 88 (8), S. 3010–3021.
- Lee, R. C.; Feinbaum, R. L.; Ambros, V. (1993):** The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. In: *Cell* 75 (5), S. 843–854.
- Lee, Hyangkyu; Park, David S.; Wang, Xiao Bo; Scherer, Phillip E.; Schwartz, Phillip E.; Lisanti, Michael P. (2002):** Src-induced phosphorylation of caveolin-2 on tyrosine 19. Phospho-caveolin-2 (Tyr(P)19) is localized near focal adhesions, remains associated with lipid rafts/caveolae, but no longer forms a high molecular mass hetero-oligomer with caveolin-1. In: *J. Biol. Chem.* 277 (37), S. 34556–34567.
- Lee, Sangho; Kwon, Hyeon; Jeong, Kyuho; Pak, Yunbae (2011):** Regulation of cancer cell proliferation by caveolin-2 down-regulation and re-expression. In: *Int. J. Oncol.* 38 (5), S. 1395–1402.
- Lee, Yoontae; Ahn, Chiyoung; Han, Jinju; Choi, Hyounjeong; Kim, Jaekwang; Yim, Jeongbin; Lee, Junho; Provast, Patrick; Radmark, Olaf; Kim, Sunyoung (2003):** The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. In: *Nature* 425 (6956), S. 415–419.
- Lee, Yoontae; Kim, Minju; Han, Jinju; Yeom, Kyu-Hyun; Lee, Sanghyuk; Baek, Sung Hee; Kim, V. Narry (2004):** MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. In: *EMBO J.* 23 (20), S. 4051–4060.
- Leendertse, Masja; Willems, Rob J. L.; Giebelen, Ida A. J.; Roelofs, Joris J. T. H.; Top, Janetta; Bonten, Marc J. M.; van der Poll, Tom (2009):** Intestinal colonization with *Enterococcus faecium*

- does not influence pulmonary defense against *Pseudomonas aeruginosa* in mice. In: *PLoS ONE* 4 (8), S. e6775.
- Lewis, Benjamin P.; Burge, Christopher B.; Bartel, David P. (2005):** Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. In: *Cell* 120 (1), S. 15–20.
- Ley, Klaus; Laudanna, Carlo; Cybulsky, Myron I.; Nourshargh, Sussan (2007):** Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. In: *Nat. Rev. Immunol.* 7 (9), S. 678–689.
- Lindberg, J. E.; Ogle, Brian (Hrsg.) (2001):** Digestive physiology of pigs. Proceedings of the 8th Symposium. New York: *CABI Publishing*.
- Lindsay, Mark A. (2008):** microRNAs and the immune response. In: *Trends Immunol.* 29 (7), S. 343–351.
- Lim, Jae Sung; Choy, Hyon E.; Park, Sang Chul; Han, Jung Min; Jang, Ik-Soon; Cho, Kyung A. (2010):** Caveolae-mediated entry of *Salmonella* Typhimurium into senescent nonphagocytotic host cells. In: *Aging Cell* 9 (2), S. 243–251.
- Lim, Jae Sung; Na, Hee Sam; Lee, Hyun Chul; Choy, Hyon E.; Park, Sang Chul; Han, Jung Min; Cho, Kyung A. (2009):** Caveolae-mediated entry of *Salmonella* Typhimurium in a human M-cell model. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390 (4), S. 1322–1327.
- Lim, Lee P.; Lau, Nelson C.; Garrett-Engle, Philip; Grimson, Andrew; Schelter, Janell M.; Castle, John; Bartel, David P.; Linsley, Peters; Johnson, Jason M. (2005):** Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. In: *Nature* 433 (7027), S. 769–773.
- Lippi, Giordano; Steinert, Joern R.; Marczylo, Emma L.; D'Oro, Sabina; Fiore, Roberto; Forsythe, Ian D.; Schrott, Gerhard; Zoli, Michele; Nicotera, Pierluigi; Young, Kenneth W. (2011):** Targeting of the Arpc3 actin nucleation factor by miR-29a/b regulates dendritic spine morphology. In: *J. Cell. Biol.* 194 (6), S. 889–904.
- Liu, Can; Kelnar, Kevin; Liu, Bigang; Chen, Xin; Calhoun-Davis, Tammy; Li, Hangwen; Patrawala, Lubna; Yan, Hong; Jeter, Collene; Honorio, Sofia (2011):** The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. In: *Nat. Med.* 17 (2), S. 211–215.
- Ly, Kim Thien; Casanova, James E. (2007):** Mechanisms of *Salmonella* entry into host cells. In: *Cell. Microbiol.* 9 (9), S. 2103–2111.
- Liu, Xingyin; Lu, Rong; Wu, Shaoping; Zhang, Yong-Guo; Xia, Yinglin; Sartor, R. Balfour; Sun, Jun (2012):** Wnt2 inhibits enteric bacterial-induced inflammation in intestinal epithelial cells. In: *Inflamm. Bowel Dis.* 18 (3), S. 418–429.
- Ma, Wubin; Xie, Shengsong; Ni, Minjie; Huang, Xingxu; Hu, Shuanggang; Liu, Qiang; Liu, Aihua; Zhang, Jinsong; Zhang, Yonglian (2012):** MicroRNA-29a inhibited epididymal epithelial cell proliferation by targeting nuclear autoantigenic sperm protein (NASP). In: *J. Biol. Chem.* 287 (13), S. 10189–10199.
- Ma, Yan-Qing; Plow, Edward F.; Geng, Jian-Guo (2004):** P-selectin binding to P-selectin glycoprotein ligand-1 induces an intermediate state of alphaMbeta2 activation and acts cooperatively with extracellular stimuli to support maximal adhesion of human neutrophils. In: *Blood* 104 (8), S. 2549–2556.
- Mase, Yuri; Ishibashi, Osamu; Ishikawa, Tomoko; Takizawa, Takami; Kiguchi, Kazunari; Ohba, Takashi; Katabuchi, Hidetaka; Takeshita, Toshiyuki; Takizawa, Toshihiro (2012):** Mir-21 Is Enriched in the RNA-Induced Silencing Complex and Targets col4a1 in Human Granulosa Cell Lines. In: *Reprod. Sci.* 19 (10), S. 1030-1040
- Mayer, P. (1891):** Über das Färben mit Hämatoxylin. In: *MITTHEILUNGEN AUS DER ZOOLOGISCHEN STATION ZU NEAPEL* 10(1), S-170.
- Medina, Freddy A.; Almeida, Cecilia J. de; Dew, Elliott; Li, Jiangwei; Bonuccelli, Gloria; Williams, Terence M.; Cohen, Alex W.; Pestell, Richard G.; Frank, Phillippe G.; Tanowitz,**

- Herbert B. (2006):** Caveolin-1-deficient mice show defects in innate immunity and inflammatory immune response during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. In: *Infect. Immun.* 74 (12), S. 6665–6674.
- Mehta, A.; Singh, S.; Ganguly, N. K. (1998):** Impairment of intestinal mucosal antioxidant defense system during *Salmonella Typhimurium* infection. In: *Dig. Dis. Sci.* 43 (3), S. 646–651.
- Meurens, François; Berri, Mustapha; Auray, Gael; Melo, Sandrine; Levast, Benoît; Virlogeux-Payant, Isabelle; Chevaleyre, Claire; Gerdts, Volker; Salmon, Henri (2009):** Early immune response following *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium infection in porcine jejunal gut loops. In: *Vet. Res.* 40 (1), S. 5.
- Meyer, C.; Große Beilage, E.; Krieter, J. (2004):** Salmonellen in der Schweineproduktion – Risikofaktoren und Ansätze zur Bekämpfung. In: *Züchtungskunde* (76), S. 354–366.
- Mishra, Prasun J.; Bertino, Joseph R. (2009):** MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine. In: *Pharmacogenomics* 10 (3), S. 399–416.
- Mollberg, Nathan M.; Steinert, Gunnar; Aigner, Maximilian; Hamm, Alexander; Lin, Fang-Ju; Elbers, Heike; Reissfelder, Christoph; Weitz, Jürgen; Buchler, Markus W.; Koch, Moritz (2012):** Overexpression of RalBP1 in colorectal cancer is an independent predictor of poor survival and early tumor relapse. In: *Cancer Biol. Ther.* 13 (8), S. 694–700.
- Monzo, Mariano; Navarro, Alfons; Bandres, Eva; Artells, Rosa; Moreno, Isabel; Gel, Bernat; Ibeas, Rafael; Moreno, Jase; Martinez, Francisco; Diaz, Tania (2008):** Overlapping expression of microRNAs in human embryonic colon and colorectal cancer. In: *Cell. Res.* 18 (8), S. 823–833.
- Moore, Kevin L. (2003):** The biology and enzymology of protein tyrosine O-sulfation. In: *J. Biol. Chem.* 278 (27), S. 24243–24246.
- Moore, K. L.; Stults, N. L.; Diaz, S.; Smith, D. F.; Cummings, R. D.; Varki, A.; McEver, R. P. (1992):** Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. In: *J. Cell. Biol.* 118 (2), S. 445–456.
- Murphy, Andrew J.; Woollard, Kevin J.; Suhartoyo, Andreas; Stirzaker, Roslynn A.; Shaw, James; Sviridov, Dmitri; Chin-Dusting, Jaye P. F. (2011):** Neutrophil activation is attenuated by high-density lipoprotein and apolipoprotein A-I in *in vitro* and *in vivo* models of inflammation. In: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31 (6), S. 1333–1341.
- Nethe, Micha; Hordijk, Peter L. (2011):** A model for phospho-caveolin-1-driven turnover of focal adhesions. In: *Cell. Adh. Migr.* 5 (1), S. 59–64.
- Nevins, Angela K.; Thurmond, Debbie C. (2006):** Caveolin-1 functions as a novel Cdc42 guanine nucleotide dissociation inhibitor in pancreatic beta-cells. In: *J. Biol. Chem.* 281 (28), S. 18961–18972.
- Ørom, Ulf Andersson; Lim, Meng K.; Savage, Jason E.; Jin, Lianjin; Saleh, Anthony D.; Lisanti, Michael P.; Simone, Nicole L. (2012):** MicroRNA-203 regulates caveolin-1 in breast tissue during caloric restriction. In: *Cell Cycle* 11 (7), S. 1291–1295.
- Owen, Katherine A.; Abshire, Michelle Y.; Tilghman, Robert W.; Casanova, James E.; Bouton, Amy H. (2011):** FAK regulates intestinal epithelial cell survival and proliferation during mucosal wound healing. In: *PLoS ONE* 6 (8), S. e23123.
- Park, Chanjae; Yan, Wei; Ward, Sean M.; Hwang, Sung Jin; Wu, Qiuxia; Hatton, William J.; Park, Jong Kun; Sanders, Kento-M.; Ro, Seungil. (2011):** MicroRNAs dynamically remodel gastrointestinal smooth muscle cells. In: *PLoS ONE* 6 (4), S. e18628.
- Park, Seong-Yeon; Lee, Jung Hyun; Ha, Minju; Nam, Jin-Wu; Kim, V. Narry (2009):** miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42. In: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16 (1), S. 23–29.
- Parolini, I.; Sargiacomo, M.; Galbiati, F.; Rizzo, G.; Grignani, F.; Engelman, J. A.; Okamoto, T.; Ikezu, T.; Scherer, P.E.; Mora, R. (1999):** Expression of caveolin-1 is required for the transport of caveolin-2 to the plasma membrane. Retention of caveolin-2 at the level of the golgi complex. In: *J. Biol. Chem.* 274 (36), S. 25718–25725.

- Pasquinelli, A. E.; Reinhart, B. J.; Slack, F.; Martindale, M. Q.; Kuroda, M. I.; Maller, B.; Hayward, D.C.; Ball, E.E.; Degnan, B.; Müller, P. (2000): Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. In: *Nature* 408 (6808), S. 86–89.
- Pekow, Joel R.; Dougherty, Urszula; Mustafi, Reba; Zhu, Hongyan; Kocherginsky, Masha; Rubin, David T.; Hanauer, Stephan B.; Hart, John; Cheng, Eugene B.; Fischera, Alessandro (2012): miR-143 and miR-145 are downregulated in ulcerative colitis: putative regulators of inflammation and protooncogenes. In: *Inflamm. Bowel Dis.* 18 (1), S. 94–100.
- Pöschl, Ernst; Schlötzer-Schrehardt, Ursula; Brachvogel, Bent; Saito, Kenji; Ninomiya, Yoshifumi; Mayer, Ulrike (2004): Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. In: *Development* 131 (7), S. 1619–1628.
- Pollmann, M.; Nordhoff, M.; Pospischil, A.; Tedin, K.; Wieler, L. H. (2005): Effects of a probiotic strain of *Enterococcus faecium* on the rate of natural chlamydia infection in swine. In: *Infect. Immun.* 73 (7), S. 4346–4353.
- Quinn, Susan R.; O'Neill, Luke A. (2011): A trio of microRNAs that control Toll-like receptor signalling. In: *Int. Immunol.* 23 (7), S. 421–425.
- Radtke, Freddy; Clevers, Hans (2005): Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. In: *Science* 307 (5717), S. 1904–1909.
- Rehmsmeier, Marc; Steffen, Peter; Hochsmann, Matthias; Giegerich, Robert (2004): Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. In: *RNA* 10 (10), S. 1507–1517.
- Rinkinen, Minna; Jalava, Katri; Westermarck, Elias; Salminen, Seppo; Ouwehand, Arthur C. (2003): Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization? In: *Vet. Microbiol.* 92 (1-2), S. 111–119.
- Rivera-Nieves, Jesús; Burcin, Tracy L.; Olson, Timothy S.; Morris, Margaret A.; McDuffie, Marcia; Cominelli, Fabio; Ley, Klaus (2006): Critical role of endothelial P-selectin glycoprotein ligand 1 in chronic murine ileitis. In: *J. Exp. Med.* 203 (4), S. 907–917.
- Rolfe, R. D. (2000): The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. In: *J. Nutr.* 130 (2S Suppl), S. 396S–402S.
- Sales, Gabriele; Coppe, Alessandro; Bisognin, Andrea; Biasiolo, Marta; Bortoluzzi, Stefania; Romualdi, Chiara (2010): MAGIA, a web-based tool for miRNA and Genes Integrated Analysis. In: *Nucleic Acids Res.* 38 (Web Server issue), S. W352–9.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 (12), S. 5463–5467.
- Sato, Keiji; Yomogida, Kentaro; Wada, Takayuki; Yoriyuzi, Tetuya; Nishimune, Yoshitake; Hosokawa, Nobuko; Nagata, Kazuhiro (2002): Type XXVI collagen, a new member of the collagen family, is specifically expressed in the testis and ovary. In: *J. Biol. Chem.* 277 (40), S. 37678–37684.
- Saxena, Sandeep; Jónsson, Zophonias O.; Dutta, Anindya (2003): Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. In: *J. Biol. Chem.* 278 (45), S. 44312–44319.
- Scharek, L.; Guth, J.; Reiter, K.; Weyrauch, K. D.; Taras, D.; Schwerk, P.; Schierack, P.; Schmidt, M.F.G.; Wieler, L.H.; Tedin, K. (2005): Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sows and piglets. In: *Vet. Immunol. Immunopathol.* 105 (1-2), S. 151–161.
- Scholven, Jutta; Taras, David; Sharbati, Soroush; Schön, Jennifer; Gabler, Christoph; Huber, Otmar; Zum Meyer Büschenfelde, Dirk; Blin, Nikolaus; Einspanier, Ralf (2009): Intestinal expression of TFF and related genes during postnatal development in a piglet probiotic trial. In: *Cell. Physiol. Biochem.* 23 (1-3), S. 143–156.
- Schulte, Leon N.; Eulalio, Ana; Mollenkopf, Hans-Joachim; Reinhardt, Richard; Vogel, Jörg (2011): Analysis of the host microRNA response to *Salmonella* uncovers the control of major cytokines by the let-7 family. In: *EMBO J.* 30 (10), S. 1977–1989.

- Sharbati, Jutta (2010):** Mukosale Genexpression während der porcinen postnatalen Darmentwicklung und Einfluss eines Probiotikagabe. *Dissertation*
- Sharbati, Jutta; Lewin, Astrid; Kutz-Lohroff, Barbara; Kamal, Elisabeth; Einspanier, Ralf; Sharbati, Soroush (2011):** Integrated microRNA-mRNA-analysis of human monocyte derived macrophages upon *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* infection. In: *PLoS ONE* 6 (5), S. e20258.
- Sharbati, Soroush; Friedländer, Marc R.; Sharbati, Jutta; Hoeke, Lena; Chen, Wei; Keller, Andreas; Stähler, Peer F; Rajewski, Nikolaus; Einspanier, Ralf (2010):** Deciphering the porcine intestinal microRNA transcriptome. In: *BMC Genomics* 11, S. 275.
- Sharbati, Soroush; Sharbati, Jutta; Hoeke, Lena; Bohmer, Marc; Einspanier, Ralf (2012):** Quantification and accurate normalisation of small RNAs through new custom RT-qPCR arrays demonstrates *Salmonella*-induced microRNAs in human monocytes. In: *BMC Genomics* 13, S. 23.
- Sharbati-Tehrani, Soroush; Kutz-Lohroff, Barbara; Bergbauer, Ramona; Scholven, Jutta; Einspanier, Ralf (2008):** miR-Q: a novel quantitative RT-PCR approach for the expression profiling of small RNA molecules such as miRNAs in a complex sample. In: *BMC Mol. Biol.* 9, S. 34.
- Shatseva, Tatiana; Lee, Daniel Y.; Deng, Zhaoqun; Yang, Burton B. (2011):** MicroRNA miR-199a-3p regulates cell proliferation and survival by targeting caveolin-2. In: *J. Cell. Sci.* 124 (Pt 16), S. 2826–2836.
- Singh, Birendra; Fleury, Christophe; Jalalvand, Farshid; Riesbeck, Kristian (2012):** Human pathogens utilize host extracellular matrix proteins laminin and collagen for adhesion and invasion of the host. In: *FEMS Microbiol. Rev.* 36 (6), S. 1122-1180
- Smart, E. J.; Graf, G. A.; McNiven, M. A.; Sessa, W. C.; Engelman, J. A.; Scherer, P. E.; Okamoto, T.; Lisanti, M.P.. (1999):** Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. In: *Mol. Cell. Biol.* 19 (11), S. 7289–7304.
- Solberg, Nina; Machon, Ondrej; Machonova, Olga; Krauss, Stefan (2012):** Mouse Tcf3 represses canonical Wnt signaling by either competing for β -catenin binding or through occupation of DNA-binding sites. In: *Mol. Cell. Biochem.* 365 (1-2), S. 53–63.
- Soulsby, Lord of Swaffham Prior (2008):** The 2008 Garrod Lecture: Antimicrobial resistance—animals and the environment. In: *J. of Antimicrob. Chemother.* 62 (2), S. 229–233.
- Stein, Hans H.; Kil, Dong Y. (2006):** Reduced use of antibiotic growth promoters in diets fed to weanling pigs: dietary tools, part 2. In: *Anim. Biotechnol.* 17 (2), S. 217–231.
- Strompfová, Viola; Marcináková, Miroslava; Simonová, Monika; Gancarcíková, Sona; Jonecová, Zuzana; Sciranková, Luboslava; Koscová, Jana; Buleca, Viktor; Cabanová, Klaudia; Lauková, Andrea (2006):** *Enterococcus faecium* EK13—an enterocin a-producing strain with probiotic character and its effect in piglets. In: *Anaerobe* 12 (5-6), S. 242–248.
- Suárez, Yajaira; Wang, Chen; Manes, Thomas D.; Pober, Jordan S. (2010):** Cutting edge: TNF-induced microRNAs regulate TNF-induced expression of E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 on human endothelial cells: feedback control of inflammation. In: *J. Immunol.* 184 (1), S. 21–25.
- Szabó, István; Wieler, Lothar H.; Tedin, Karsten; Scharek-Tedin, Lydia; Taras, David; Hensel, Andreas; Appel, Bernd; Nöckler, Kartsen (2009):** Influence of a probiotic strain of *Enterococcus faecium* on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 infection in a porcine animal infection model. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (9), S. 2621–2628.
- Tang, Z.; Scherer, P. E.; Okamoto, T.; Song, K.; Chu, C.; Kohtz, D. S.; Nishimoto, I; Lasish, H.F.; Lisanti, M.P. (1996):** Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. In: *J. Biol. Chem.* 271 (4), S. 2255–2261.
- Taras, D.; Vahjen, W.; Macha, M.; Simon, O. (2006):** Performance, diarrhea incidence, and occurrence of *Escherichia coli* virulence genes during long-term administration of a probiotic *Enterococcus faecium* strain to sows and piglets. In: *J. Anim. Sci.* 84 (3), S. 608–617.

- Theppangna, Watthana; Otsuki, Koichi; Murase, Toshiyuki (2006):** Inhibitory effects of Enterococcus strains obtained from a probiotic product on in vitro growth of Salmonella enterica serovar enteritidis strain IFO3313. In: *J. Food Prot.* 69 (9), S. 2258–2262.
- Vahjen, W.; Männer, K. (2003):** The effect of a probiotic Enterococcus faecium product in diets of healthy dogs on bacteriological counts of Salmonella spp., Campylobacter spp. and Clostridium spp. in faeces. In: *Arch. Tierernähr.* 57 (3), S. 229–233.
- van Ampting, Marleen T. J.; Schonewille, Arjan J.; Vink, Carolien; Brummer, Robert Jan M.; van der Meer, Roelof; Bovee-Oudenhoven, Ingeborg M. J. (2009):** Intestinal barrier function in response to abundant or depleted mucosal glutathione in Salmonella-infected rats. In: *BMC Physiol.* 9, S. 6.
- van Iersel, Martijn P.; Kelder, Thomas; Pico, Alexander R.; Hanspers, Kristina; Coort, Susan; Conklin, Bruce R.; Evelo, Chris (2008):** Presenting and exploring biological pathways with PathVisio. In: *BMC Bioinformatics* 9, S. 399.
- Vandesompele, Jo; Preter, Katleen de; Pattyn, Filip; Poppe, Bruce; van Roy, Nadine; Paepe, Anne de; Speleman, Frank (2002):** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. In: *Genome Biol.* 3 (7), S. RESEARCH0034.
- Vorwerk, Sonja; Ganter, Kerstin; Cheng, Yang; Hoheisel, Jörg; Stähler, Peer F.; Beier, Markus (2008):** Microfluidic-based enzymatic on-chip labeling of miRNAs. In: *N. Biotechnol.* 25 (2-3), S. 142–149.
- Wang, Hai-Bo; Wang, Jin-Tao; Zhang, Lei; Geng, Zhen H.; Xu, Wei-Li; Xu, Tao; Huo, Yuding; Zhu, Xueliang; Plow, Edward F.; Chei, Ming (2007):** P-selectin primes leukocyte integrin activation during inflammation. In: *Nat. Immunol.* 8 (8), S. 882–892.
- Wang, Yanfang; Couture, Oliver P.; Qu, Long; Uthe, Jolita J.; Bearson, Shawn M. D.; Kuhar, Daniel; Lunney, Joan K.; Nettleton, Dan; Dekkers, Jack C.M.; Tuggle, Christopher K. (2008):** Analysis of porcine transcriptional response to Salmonella enterica serovar Choleraesuis suggests novel targets of NFkappaB are activated in the mesenteric lymph node. In: *BMC Genomics* 9, S. 437.
- Watanabe, Toshio; Higuchi, Kazuhide; Hamaguchi, Masaki; Shiba, Masatsugu; Tominaga, Kazunari; Fujiwara, Yasuhiro; Matsumoto, Takayuki; Arakawa, Tets (2004):** Monocyte chemotactic protein-1 regulates leukocyte recruitment during gastric ulcer recurrence induced by tumor necrosis factor-alpha. In: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287 (4), S. G919-28.
- WHO (2013):** Drug-Resistant Salmonella (WHO-Fact sheet [No 139])
- Wienholds, Erno; Plasterk, Ronald H. A. (2005):** MicroRNA function in animal development. In: *FEBS Lett.* 579 (26), S. 5911–5922.
- Winter, Sebastian E.; Thiennimitr, Parameth; Winter, Maria G.; Butler, Brian P.; Huseby, Douglas L.; Crawford, Robert W.; Russell, Joseph M.; Bevins, Charles (2010):** Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for Salmonella. In: *Nature* 467 (7314), S. 426–429.
- Yi, Rui; Qin, Yi; Macara, Ian G.; Cullen, Bryan R. (2003):** Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. In: *Genes. Dev.* 17 (24), S. 3011–3016.
- Yin, Kai; Chen, Wu-Jun; Zhou, Zhi-Gang; Zhao, Guo-Jun; Lv, Yun-Chen; Ouyang, Xin-Pin; Yu, Xiao-Hua; Fu, Yuchang; Jiang, Zhi-Sheng; Tang, Chao-Ke (2012):** Apolipoprotein A-I Inhibits CD40 Proinflammatory Signaling via ATP-Binding Cassette Transporter A1-Mediated Modulation of Lipid Raft in Macrophages. In: *J.Atheroscler. Thromb.* 19 (9), S. 823-836
- Zaas, David W.; Duncan, Mathew J.; Li, Guojie; Wright, Jo Rae; Abraham, Soman N. (2005):** Pseudomonas invasion of type I pneumocytes is dependent on the expression and phosphorylation of caveolin-2. In: *J. Biol. Chem.* 280 (6), S. 4864–4872.
- Zhang, Jianling; Jiang, Ru; Takayama, Hisao; Tanaka, Yoshinori (2005):** Survival of virulent Mycobacterium tuberculosis involves preventing apoptosis induced by Bcl-2 upregulation and release resulting from necrosis in J774 macrophages. In: *Microbiol. Immunol.* 49 (9), S. 845–852.
- Zhu, L. H.; Zhao, K. L.; Chen, X. L.; Xu, J. X. (2012):** Impact of weaning and an antioxidant blend on intestinal barrier function and antioxidant status in pigs. In: *J. Anim. Sci.* 90 (8), S. 2581-2589

8. Anhang

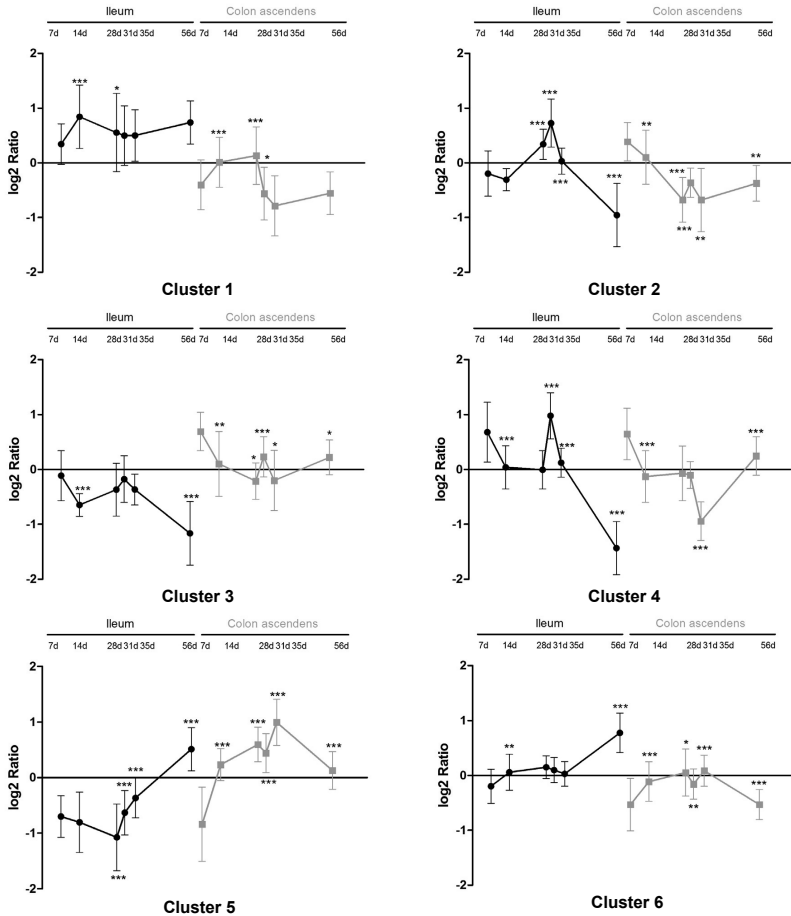
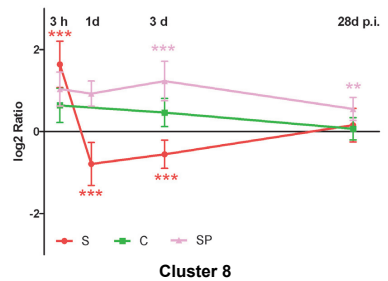
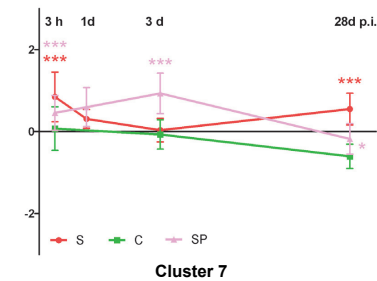
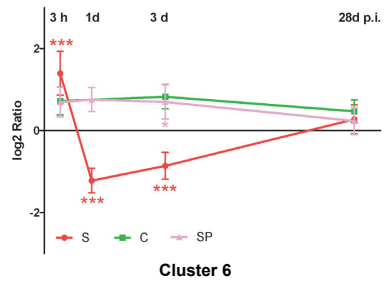
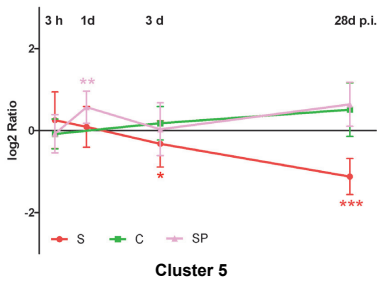
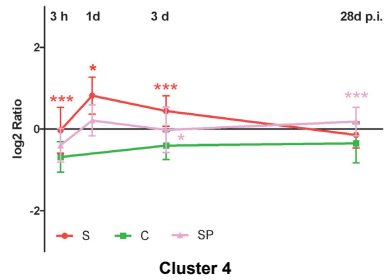
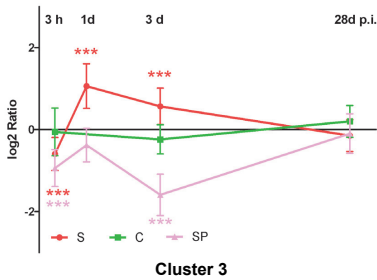
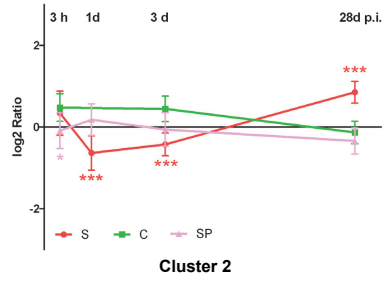
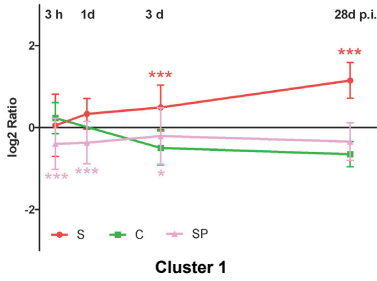


Abb. 41: Centroid Graphen postnatale Darmentwicklung: Übersicht über die durchschnittlichen log₂ Ratios der 6 Cluster, generiert aus den Genexpressionsdaten, im Verlauf der postnatalen Darmentwicklung (7 d – 56 d p.n.). Violette Kurve: Ileum; grüne Kurve: Colon ascendens. Signifikanzen jeweils zum vorhergehenden Zeitpunkt berechnet mittels Mann-Whitney U-Test, * p≤0,05, ** p≤0,01, *** p≤0,001.

Tab. 17: MAGIA-Interaktionen während der postnatalen Darmentwicklung im Ileum und Colon ascendens mit einer Pearsonkorrelation ≤ -0.5

Entrez Gene ID	Gene Symbol	miRNA	Pearson r	Entrez Gene ID	Gene Symbol	miRNA	Pearson r
4781	NFIB	ssc-mir-532-3p	-0,85	7009	TMBIM6	ssc-mir-27a	-0,63
283149	BCL9L	ssc-mir-532-3p	-0,84	4781	NFIB	ssc-mir-106b	-0,63
7009	TMBIM6	ssc-mir-125b	-0,81	3479	IGF1	ssc-mir-30b	-0,63
25960	GPR124	ssc-mir-145	-0,79	23263	MCF2L	ssc-mir-93	-0,63
3479	IGF1	ssc-mir-26a	-0,79	9185	REPS2	ssc-mir-93	-0,62
3479	IGF1	ssc-mir-130a	-0,78	25960	GPR124	ssc-mir-30d	-0,62
3479	IGF1	ssc-mir-27b	-0,76	81609	SNX27	ssc-mir-24	-0,61
23213	SULF1	ssc-mir-93	-0,76	10238	DCAF7	ssc-mir-199a-5p	-0,61
3479	IGF1	ssc-mir-152	-0,75	65249	ZSWIM4	ssc-mir-532-3p	-0,61
10928	RALBP1	ssc-mir-24	-0,74	22877	MLXIP	ssc-mir-93	-0,61
84301	DDI2	ssc-let-7a	-0,74	9757	MLL4	ssc-mir-106b	-0,60
4983	OPHN1	ssc-mir-145	-0,73	10928	RALBP1	ssc-mir-145	-0,59
10928	RALBP1	ssc-mir-130a	-0,72	4983	OPHN1	ssc-mir-24	-0,59
22877	MLXIP	ssc-mir-532-3p	-0,72	154881	KCTD7	ssc-mir-532-3p	-0,59
4983	OPHN1	ssc-mir-214	-0,71	3479	IGF1	ssc-let-7d	-0,59
81786	TRIM7	ssc-mir-532-3p	-0,71	221002	RASGEF1A	ssc-mir-532-3p	-0,58
3479	IGF1	ssc-mir-27a	-0,71	71	ACTG1	ssc-mir-145	-0,58
4983	OPHN1	ssc-mir-27a	-0,71	784	CACNB3	ssc-mir-532-3p	-0,58
4781	NFIB	ssc-mir-93	-0,71	221002	RASGEF1A	ssc-mir-106b	-0,58
2321	FLT1	ssc-mir-532-3p	-0,71	4781	NFIB	ssc-mir-107	-0,58
147912	SIX5	ssc-mir-532-3p	-0,70	3479	IGF1	ssc-mir-148a	-0,57
10928	RALBP1	ssc-mir-152	-0,70	81609	SNX27	ssc-mir-152	-0,56
221002	RASGEF1A	ssc-mir-93	-0,69	55766	H2AFJ	ssc-mir-145	-0,56
3479	IGF1	ssc-mir-30d	-0,69	5980	REV3L	ssc-mir-145	-0,55
862	RUNX1T1	ssc-mir-215	-0,69	81609	SNX27	ssc-mir-199a-5p	-0,55
10238	DCAF7	ssc-mir-24	-0,68	3479	IGF1	ssc-mir-30c	-0,55
3479	IGF1	ssc-mir-361-5p	-0,68	862	RUNX1T1	ssc-mir-107	-0,54
8462	KLF11	ssc-mir-93	-0,68	10284	SAP18	ssc-mir-25	-0,54
25960	GPR124	ssc-mir-199a-5p	-0,68	9185	REPS2	ssc-mir-106b	-0,53
51246	SHISA5	ssc-mir-532-3p	-0,68	11083	DIDO1	ssc-mir-99b	-0,53
4983	OPHN1	ssc-mir-27b	-0,67	389421	LIN28B	ssc-mir-195	-0,53
7009	TMBIM6	ssc-mir-27b	-0,67	10928	RALBP1	ssc-mir-148a	-0,53
9757	MLL4	ssc-mir-93	-0,67	10396	ATP8A1	ssc-mir-148a	-0,53
3479	IGF1	ssc-let-7a	-0,66	81609	SNX27	ssc-mir-130a	-0,52
79026	AHNAK	ssc-mir-93	-0,66	55766	H2AFJ	ssc-mir-23a	-0,52
84301	DDI2	ssc-let-7d	-0,65	130	ADH6	ssc-mir-423-5p	-0,51



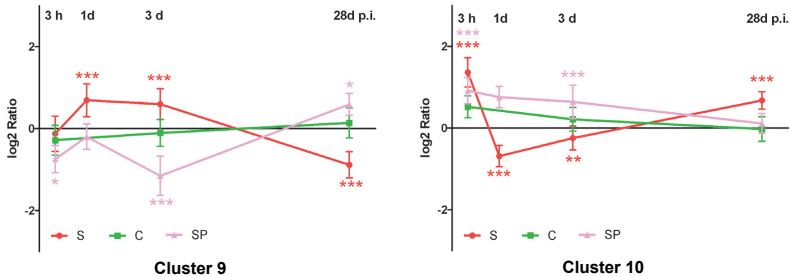
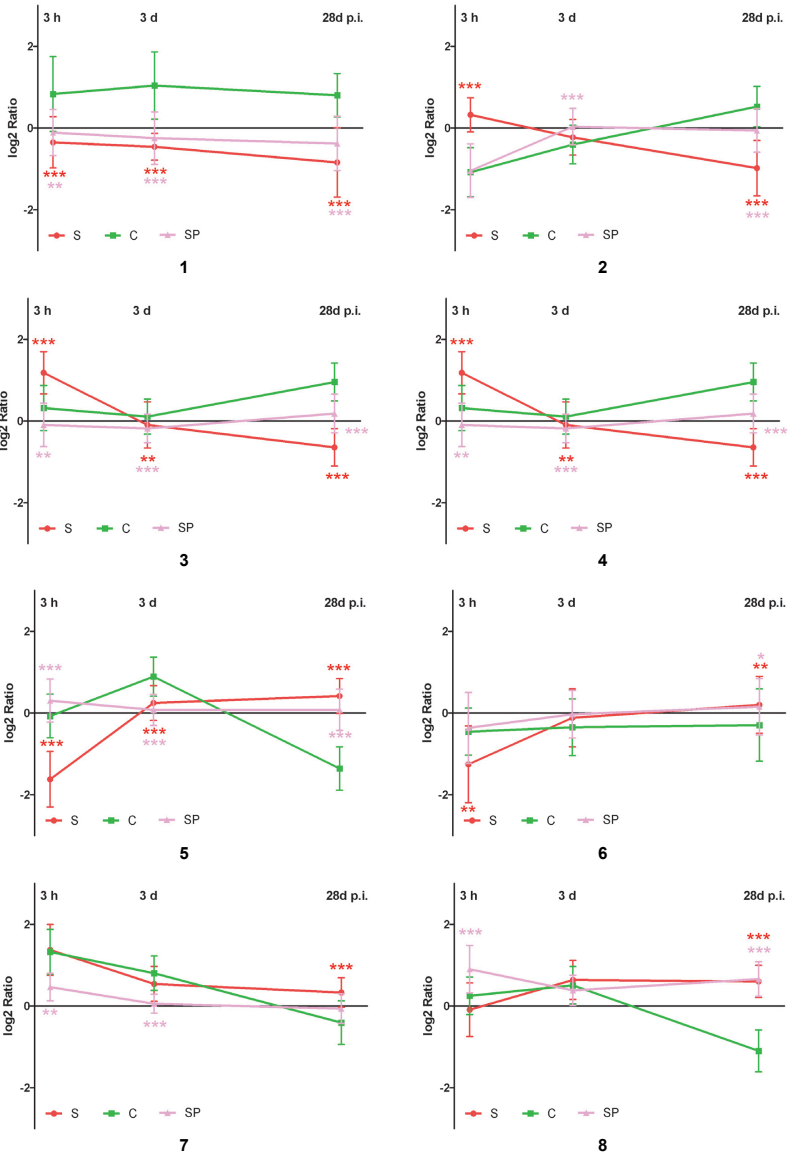


Abb. 42 Centroid Graphen Colon ascendens: Übersicht über die durchschnittlichen log₂ Ratios der 10 Cluster, generiert aus den Genexpressionsdaten, im Verlauf der Salmonelleninfektion (rot), der Kontrollgruppe (grün) sowie der Salmonellen-Probiotikum Gruppe (blassrosa) (3 h – 28 d p.i.) im Colon ascendens. Signifikanzen gegenüber der Kontrollgruppe zu 3 h, 1 d und 28 d p.i., zum Zeitpunkt 1 d p.i. im Vergleich zur SP-Gruppe mittels Kruskal Wallis Test und Dunns Post Test ermittelt, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

Tab. 18: MAGIA-Interaktionen im Verlaufe einer Salmonelleninfektion im Colon ascendens mit einer Pearsonkorrelation <- 0.5

Entrez Gene ID	Gen Symbol	miRNA	Pearson r	Entrez Gene ID	Gen Symbol	miRNA	Pearson r
830	CAPZA2	ssc-mir-23a	-0.86	6416	MAP2K4	ssc-mir-29a	-0.58
7009	TMBIM6	ssc-mir-17	-0.85	151194	FAM119A	ssc-mir-199a-5p	-0.58
830	CAPZA2	ssc-mir-23b	-0.82	4199	ME1	ssc-mir-30b	-0.58
414	ARSD	ssc-mir-185	-0.76	6416	MAP2K4	ssc-mir-199a-5p	-0.56
7009	TMBIM6	ssc-mir-125b	-0.74	9332	CD163	ssc-mir-16	-0.56
9332	CD163	ssc-mir-23a	-0.72	84503	ZNF527	ssc-mir-423-5p	-0.56
6416	MAP2K4	ssc-mir-16	-0.71	1282	COL4A1	ssc-mir-21	-0.55
9332	CD163	ssc-mir-23b	-0.715	7009	TMBIM6	ssc-mir-106b	-0.55
1508	CTSB	ssc-mir-195	-0.71	283149	BCL9L	ssc-mir-23a	-0.55
10103	TSPAN1	ssc-mir-16	-0.70	6416	MAP2K4	ssc-mir-145	-0.54
361	AQP4	ssc-mir-29a	-0.69	151194	FAM119A	ssc-mir-25	-0.54
830	CAPZA2	ssc-mir-16	-0.67	1282	COL4A1	ssc-let-7a	-0.54
9751	SNPH	ssc-mir-720	-0.67	862	RUNX1T1	ssc-mir-23b	-0.53
151194	FAM119A	ssc-mir-29a	-0.67	4605	MYBL2	ssc-mir-29a	-0.53
1282	COL4A1	ssc-mir-23a	-0.64	151194	FAM119A	ssc-mir-125b	-0.52
151194	FAM119A	ssc-mir-185	-0.63	6416	MAP2K4	ssc-mir-25	-0.52
1282	COL4A1	ssc-mir-29a	-0.62	283149	BCL9L	ssc-mir-29a	-0.52
6416	MAP2K4	ssc-mir-27b	-0.62	23650	TRIM29	ssc-mir-744	-0.52
9332	CD163	ssc-mir-195	-0.62	283149	BCL9L	ssc-mir-23b	-0.52
151194	FAM119A	ssc-mir-720	-0.62	1282	COL4A1	ssc-let-7d	-0.51
994	CDC25B	ssc-mir-16	-0.61	9751	SNPH	ssc-mir-145	-0.51
527	ATP6V0C	ssc-mir-199a-5p	-0.60	2002	ELK1	ssc-mir-185	-0.51
151194	FAM119A	ssc-mir-151-5p	-0.60	7009	TMBIM6	ssc-mir-27a	-0.51
10105	PPIF	ssc-mir-195	-0.60	3479	IGF1	ssc-mir-152	-0.50
154881	KCTD7	ssc-mir-185	-0.59	132720	C4orf32	ssc-mir-29a	-0.50
1282	COL4A1	ssc-mir-23b	-0.59	862	RUNX1T1	ssc-mir-23a	-0.50
6416	MAP2K4	ssc-mir-27a	-0.58	4199	ME1	ssc-mir-30d	-0.50
4983	OPHN1	ssc-mir-744	-0.58				



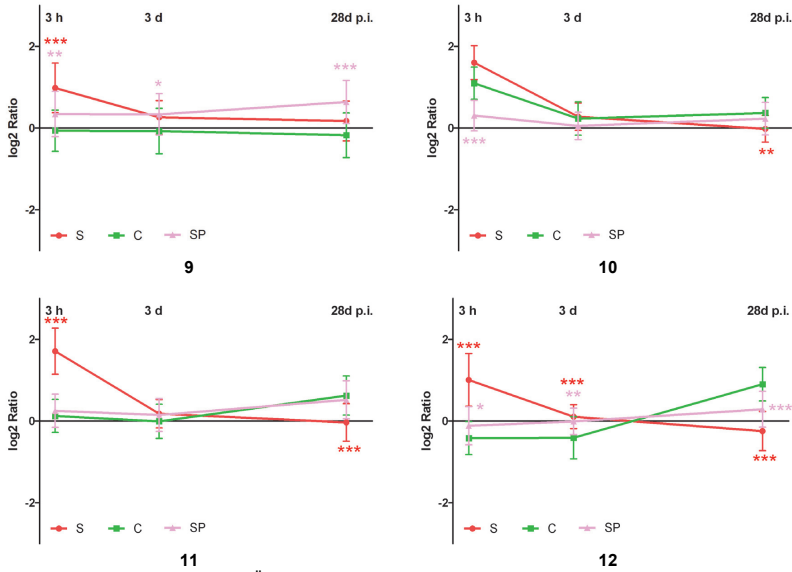


Abb. 43 Centroid Graphen Ileum: Übersicht über die durchschnittlichen log₂ Ratios der 12 Cluster, generiert aus den Genexpressionsdaten, im Verlauf der Salmonelleninfektion (rot), der Kontrollgruppe (grün) sowie der Salmonellen-Probiotikum Gruppe (blassrosa) (3 h – 28 d p.i.) im Ileum. Signifikanzen gegenüber der Kontrollgruppe mittels Kruskal Wallis Test und Dunns Post Test ermittelt, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

Tab. 19: MAGIA-Interaktionen im Verlaufe einer Salmonelleninfektion im Ileum mit einer Pearsonkorrelation r<- 0.5

Entrez Gene ID	Gen Symbol	miRNA	Pearson r	Entrez Gene ID	Gen Symbol	miRNA	Pearson r
84301	DDI2	ssc-let-7a	-0,98	25960	GPR124	ssc-mir-145	-0,66
4810	NHS	ssc-mir-93	-0,97	10628	TXNIP	ssc-mir-15a	-0,66
23085	ERC1	ssc-mir-24	-0,94	23326	USP22	ssc-mir-30c	-0,66
4810	NHS	ssc-mir-148a	-0,94	129303	TMEM150A	ssc-mir-145	-0,66
84301	DDI2	ssc-let-7d	-0,94	23162	MAPK8IP3	ssc-mir-378	-0,66
80144	FRAS1	ssc-let-7d	-0,94	3479	IGF1	ssc-mir-195	-0,66
23085	ERC1	ssc-mir-103	-0,94	94239	H2AFV	ssc-mir-744	-0,65
55691	FRMD4A	ssc-mir-106b	-0,93	55740	ENAH	ssc-mir-27b	-0,65
84447	SYVN1	ssc-mir-125b	-0,93	4810	NHS	ssc-mir-361-5p	-0,65
55066	PDPDR	ssc-mir-103	-0,93	55740	ENAH	ssc-mir-195	-0,65
55066	PDPDR	ssc-let-7a	-0,93	2690	GHR	ssc-let-7a	-0,65
25960	GPR124	ssc-mir-103	-0,93	55740	ENAH	ssc-mir-29a	-0,65
80144	FRAS1	ssc-let-7a	-0,92	3479	IGF1	ssc-mir-21	-0,65
64114	TMBIM1	ssc-mir-484	-0,92	55740	ENAH	ssc-mir-145	-0,64
23085	ERC1	ssc-mir-484	-0,92	55740	ENAH	ssc-mir-30c	-0,64
23085	ERC1	ssc-mir-93	-0,91	55740	ENAH	ssc-mir-484	-0,64
80144	FRAS1	ssc-mir-93	-0,91	25828	TXN2	ssc-mir-423-5p	-0,64
23085	ERC1	ssc-mir-720	-0,91	25828	TXN2	ssc-mir-15b	-0,64
23085	ERC1	ssc-mir-185	-0,91	1808	DPYSL2	ssc-mir-130a	-0,64
23085	ERC1	ssc-mir-25	-0,9	1995	ELAVL3	ssc-mir-296-5p	-0,64
55066	PDPDR	ssc-mir-24	-0,9	10105	PPIF	ssc-mir-23b	-0,64

25960	GPR124	ssc-mir-185	-0,9	6601	SMARCC2	ssc-mir-145	-0,64
55066	P DPR	ssc-mir-185	-0,9	10413	YAP1	ssc-mir-15b	-0,63
1739	DLG1	ssc-mir-29a	-0,9	784	CACNB3	ssc-mir-296-5p	-0,63
23085	ERC1	ssc-mir-125b	-0,89	5901	RAN	ssc-mir-107	-0,63
55066	P DPR	ssc-let-7d	-0,89	55740	ENAH	ssc-mir-27a	-0,62
4810	NHS	ssc-mir-17	-0,87	23326	USP22	ssc-mir-143	-0,62
23085	ERC1	ssc-mir-17	-0,87	55740	ENAH	ssc-mir-16	-0,62
23085	ERC1	ssc-mir-27a	-0,87	10960	LMAN2	ssc-mir-23b	-0,62
51621	KLF13	ssc-mir-143	-0,86	1112	FOXN3	ssc-mir-23b	-0,62
5660	PSAP	ssc-mir-214	-0,86	9811	KIAA0427	ssc-mir-195	-0,61
55066	P DPR	ssc-mir-15a	-0,86	10628	TXNIP	ssc-mir-16	-0,61
2355	FOSL2	ssc-mir-185	-0,86	55740	ENAH	ssc-mir-199a-5p	-0,61
8884	SLC5A6	ssc-let-7d	-0,85	10628	TXNIP	ssc-mir-130a	-0,61
4810	NHS	ssc-mir-26a	-0,85	10628	TXNIP	ssc-mir-93	-0,61
25960	GPR124	ssc-mir-15a	-0,85	1808	DPYSL2	ssc-mir-30d	-0,61
5980	REV3L	ssc-mir-25	-0,84	64061	TSPYL2	ssc-mir-16	-0,61
4810	NHS	ssc-mir-106b	-0,84	55740	ENAH	ssc-mir-720	-0,61
2355	FOSL2	ssc-mir-25	-0,84	23162	MAPK8IP3	ssc-mir-145	-0,61
55066	P DPR	ssc-mir-93	-0,84	23162	MAPK8IP3	ssc-mir-27b	-0,61
55066	P DPR	ssc-mir-720	-0,84	64061	TSPYL2	ssc-mir-195	-0,61
55066	P DPR	ssc-mir-484	-0,84	3312	HSPA8	ssc-mir-130b	-0,61
84447	SYVN1	ssc-mir-185	-0,83	221395	GPR116	ssc-mir-130a	-0,6
25960	GPR124	ssc-mir-93	-0,82	5980	REV3L	ssc-mir-92a	-0,6
25960	GPR124	ssc-mir-484	-0,82	396	ARHGDI A	ssc-mir-214	-0,6
4810	NHS	ssc-mir-30d	-0,82	51421	AMOTL2	ssc-mir-107	-0,6
55066	P DPR	ssc-mir-16	-0,82	1808	DPYSL2	ssc-mir-93	-0,6
55066	P DPR	ssc-mir-25	-0,82	283149	BCL9L	ssc-mir-23b	-0,6
80144	FRAS1	ssc-mir-125b	-0,81	3479	IGF1	ssc-mir-152	-0,6
51421	AMOTL2	ssc-mir-423-5p	-0,81	55740	ENAH	ssc-mir-130a	-0,6
55066	P DPR	ssc-mir-125b	-0,81	25960	GPR124	ssc-mir-92a	-0,6
23085	ERC1	ssc-mir-145	-0,81	55349	CHDH	ssc-mir-24	-0,59
25960	GPR124	ssc-mir-16	-0,81	10169	SERF2	ssc-mir-744	-0,59
5980	REV3L	ssc-mir-29a	-0,81	4810	NHS	ssc-mir-30c	-0,59
25960	GPR124	ssc-mir-30d	-0,8	64061	TSPYL2	ssc-mir-15a	-0,59
25960	GPR124	ssc-mir-25	-0,8	51621	KLF13	ssc-mir-378	-0,59
830	CAPZA2	ssc-mir-15b	-0,8	2280	FKBP1A	ssc-mir-15b	-0,59
80144	FRAS1	ssc-mir-29a	-0,8	10586	MAB21L2	ssc-mir-23b	-0,59
55066	P DPR	ssc-mir-15b	-0,8	9811	KIAA0427	ssc-mir-145	-0,59
23085	ERC1	ssc-mir-199a-5p	-0,8	863	CBFA2T3	ssc-mir-423-5p	-0,59
5980	REV3L	ssc-mir-30d	-0,79	1951	CFLSR3	ssc-mir-99b	-0,59
8884	SLC5A6	ssc-let-7a	-0,78	6549	SLC9A2	ssc-mir-17	-0,59
1808	DPYSL2	ssc-mir-30c	-0,78	84545	MRPL43	ssc-mir-125b	-0,59
25960	GPR124	ssc-mir-15b	-0,78	53637	S1PR5	ssc-mir-296-5p	-0,59
55066	P DPR	ssc-mir-17	-0,78	7975	MAFK	ssc-mir-214	-0,59
94239	H2AFV	ssc-mir-423-5p	-0,77	55740	ENAH	ssc-mir-23a	-0,59
55691	FRMD4A	ssc-mir-29a	-0,77	1611	DAP	ssc-mir-214	-0,58
55691	FRMD4A	ssc-mir-93	-0,77	4010	LMX1B	ssc-mir-214	-0,58
55066	P DPR	ssc-mir-151-5p	-0,77	6549	SLC9A2	ssc-mir-25	-0,58
4810	NHS	ssc-mir-27a	-0,76	2690	GHR	ssc-let-7d	-0,58
2690	GHR	ssc-mir-15b	-0,76	55740	ENAH	ssc-mir-378	-0,58
6653	SORL1	ssc-mir-532-3p	-0,76	22877	MLXIP	ssc-mir-214	-0,58
10169	SERF2	ssc-mir-423-5p	-0,76	10238	DCAF7	ssc-mir-199a-5p	-0,58
23085	ERC1	ssc-mir-92a	-0,75	2550	GABBR1	ssc-mir-423-5p	-0,58
863	CBFA2T3	ssc-mir-15b	-0,75	23213	SULF1	ssc-mir-214	-0,58

55066	P DPR	ssc-mir-497	-0,75	994	CDC25B	ssc-mir-214	-0,57
1808	DPYSL2	ssc-mir-145	-0,74	5901	RAN	ssc-mir-106b	-0,57
55766	H2AFJ	ssc-mir-744	-0,74	23524	SRRM2	ssc-mir-532-3p	-0,57
84545	MRPL43	ssc-mir-92a	-0,74	5467	PPARD	ssc-mir-152	-0,57
4638	MYLK	ssc-mir-15b	-0,74	55740	ENAH	ssc-mir-24	-0,57
25960	GPR124	ssc-mir-497	-0,74	1876	E2F6	ssc-mir-27a	-0,56
7862	BRPF1	ssc-mir-296-5p	-0,74	11083	DIDO1	ssc-mir-214	-0,56
55349	CHDH	ssc-mir-25	-0,73	10298	PAK4	ssc-mir-744	-0,56
10221	TRIB1	ssc-mir-23b	-0,73	1371	CPOX	ssc-mir-361-5p	-0,56
221395	GPR116	ssc-mir-152	-0,73	81786	TRIM7	ssc-mir-214	-0,56
1808	DPYSL2	ssc-mir-17	-0,73	23326	USP22	ssc-mir-145	-0,56
10238	DCAF7	ssc-mir-497	-0,72	55740	ENAH	ssc-let-7d	-0,55
4810	NHS	ssc-mir-130a	-0,72	4983	OPHN1	ssc-mir-103	-0,55
1951	CELSR3	ssc-mir-423-5p	-0,72	55740	ENAH	ssc-mir-30d	-0,55
80144	FRAS1	ssc-mir-145	-0,71	10238	DCAF7	ssc-mir-720	-0,55
55691	FRMD4A	ssc-mir-30d	-0,71	1951	CELSR3	ssc-mir-744	-0,55
1876	E2F6	ssc-mir-27b	-0,71	6549	SLC9A2	ssc-mir-93	-0,55
2355	FOSL2	ssc-mir-92a	-0,71	221395	GPR116	ssc-mir-148a	-0,55
10628	TXNIP	ssc-mir-17	-0,71	3479	IGF1	ssc-mir-27b	-0,55
3479	IGF1	ssc-mir-30c	-0,71	64061	TSPYL2	ssc-mir-130a	-0,54
1282	COL4A1	ssc-mir-23b	-0,71	6549	SLC9A2	ssc-mir-92a	-0,54
55740	ENAH	ssc-mir-92a	-0,7	84948	TIGD5	ssc-mir-152	-0,54
23085	ERC1	ssc-mir-361-5p	-0,7	1808	DPYSL2	ssc-mir-24	-0,54
55349	CHDH	ssc-mir-484	-0,7	414	ARSD	ssc-mir-296-5p	-0,54
55691	FRMD4A	ssc-mir-17	-0,69	10238	DCAF7	ssc-mir-15b	-0,53
1282	COL4A1	ssc-mir-152	-0,69	10238	DCAF7	ssc-mir-24	-0,53
11176	BAZ2A	ssc-mir-214	-0,69	10238	DCAF7	ssc-mir-151-5p	-0,53
4810	NHS	ssc-mir-27b	-0,69	11176	BAZ2A	ssc-mir-532-3p	-0,53
55066	P DPR	ssc-mir-199a-5p	-0,69	23326	USP22	ssc-mir-199a-5p	-0,52
1739	DLG1	ssc-mir-23a	-0,69	6929	TCF3	ssc-mir-532-3p	-0,52
64114	TMBIM1	ssc-mir-151-5p	-0,69	10628	TXNIP	ssc-mir-148a	-0,52
2280	FKBP1A	ssc-mir-423-5p	-0,69	10385	BTN2A2	ssc-mir-744	-0,52
10628	TXNIP	ssc-mir-195	-0,68	55740	ENAH	ssc-mir-103	-0,52
55740	ENAH	ssc-mir-15a	-0,68	10238	DCAF7	ssc-mir-29a	-0,52
3479	IGF1	ssc-mir-361-5p	-0,68	2690	GHR	ssc-mir-16	-0,52
10411	RAPGEF3	ssc-mir-423-5p	-0,68	11255	HRH3	ssc-mir-423-5p	-0,52
25960	GPR124	ssc-mir-199a-5p	-0,67	55740	ENAH	ssc-mir-23b	-0,52
51621	KLF13	ssc-mir-152	-0,67	55766	H2AFJ	ssc-mir-423-5p	-0,52
54904	WHSC1L1	ssc-mir-130b	-0,67	3479	IGF1	ssc-mir-26a	-0,51
10628	TXNIP	ssc-mir-152	-0,67	653121	ZBTB8A	ssc-mir-107	-0,51
51421	AMOTL2	ssc-mir-744	-0,67	65249	ZSWIM4	ssc-mir-296-5p	-0,51
10385	BTN2A2	ssc-mir-423-5p	-0,67	4781	NFIB	ssc-mir-361-5p	-0,51
10928	RALBP1	ssc-mir-152	-0,67	6528	SLC5A5	ssc-mir-744	-0,51
29942	PURG	ssc-mir-130a	-0,67	6549	SLC9A2	ssc-mir-130a	-0,5
9811	KIAA0427	ssc-mir-92a	-0,66	55766	H2AFJ	ssc-mir-296-5p	-0,5
1808	DPYSL2	ssc-mir-29a	-0,66	7975	MAFK	ssc-mir-532-3p	-0,5
5980	REV3L	ssc-mir-145	-0,66	25960	GPR124	ssc-mir-30c	-0,5
160	AP2A1	ssc-mir-296-5p	-0,66	10238	DCAF7	ssc-mir-195	-0,5
10791	VAMP5	ssc-mir-152	-0,66	55809	TRERF1	ssc-mir-214	-0,5

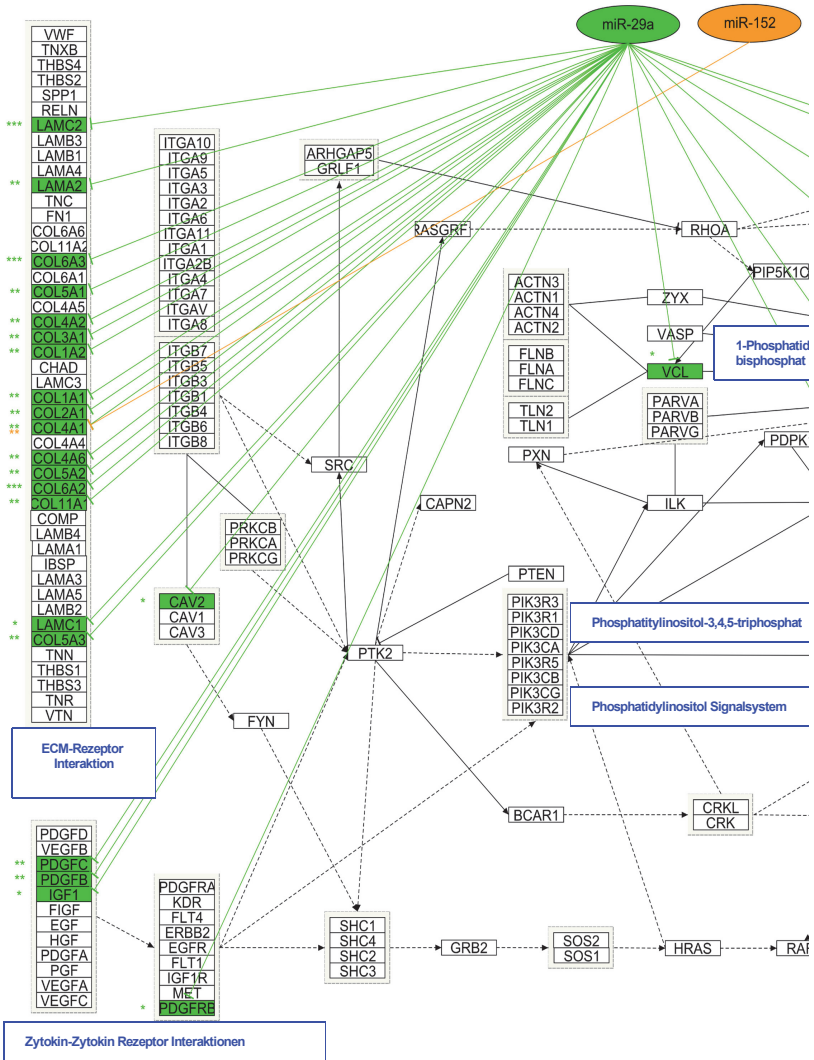
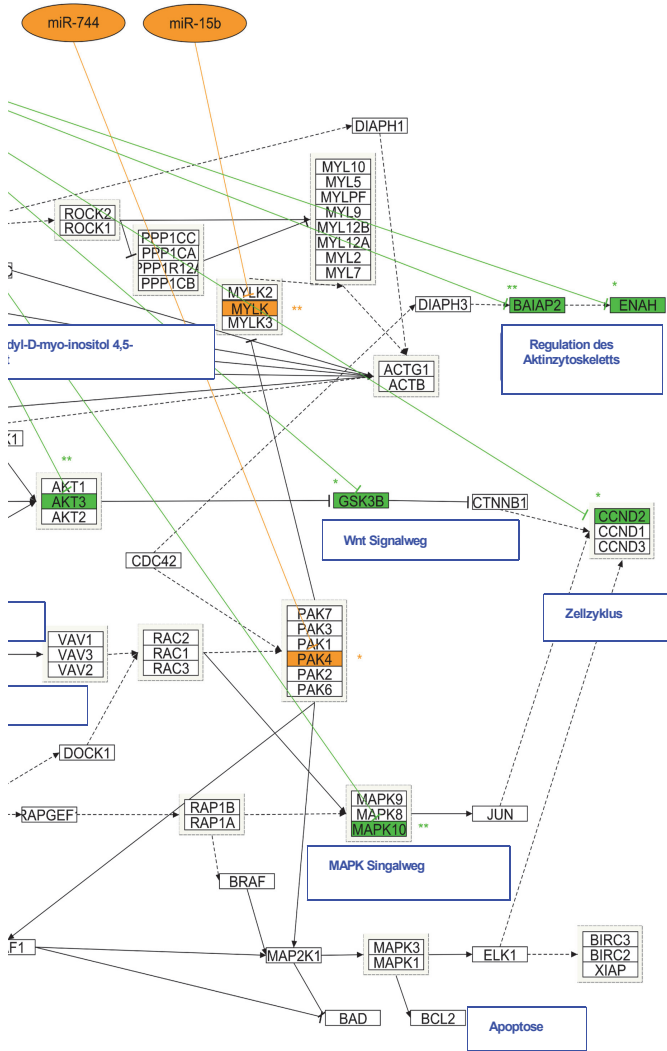


Abb. 44 Path Visio 2 Netzwerk: Der fokale Adhäsionspathway wurde als Grundgerüst gewählt. Interaktionen zwischen miRNAs und Genen des Pathways „focal adhesion“ wurden mittels RNAhybrid anhand des P-Werts (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$) ermittelt. Die miR-29a zeigte eine herausragende Rolle in der Regulation von Genen des Pathways „focal adhesion“.



9. Publikationsliste

9.1. Publikationen

Hoeke, Lena; Sharbati, Jutta; Pawar, Kamlesh; Keller, Andreas; Einspanier, Ralf; Sharbati, Soroush (2013): Intestinal Salmonella Typhimurium infection leads to miR-29a induced Caveolin 2 regulation In: *PLoS One*. 8(6):e67300

Malhotra, Shashwat; Bauer, Hannah; Tschiche, Ariane; Staedtler, Anna M; Mohr, Andreas; Calderon, Marcelo; Parmar, Virinder S, Sharbati, Soroush; **Hoeke, Lena;** Einspanier, Ralf; Haag, Rainer (2012): Glycine-terminated Dendritic Amphiphiles for Non-Viral Gene Delivery In: *Biomacromolecules* 13(10), S. 3087-98

Sharbati, Soroush; Sharbati, Jutta; **Hoeke, Lena;** Bohmer, Marc; Einspanier, Ralf (2012): Quantification and accurate normalisation of small RNAs through new custom RT-qPCR arrays demonstrates Salmonella-induced microRNAs in human monocytes. In: *BMC Genomics* 13, S. 1471-2164-13-23

Sharbati, Soroush; Friedländer, Marc R.; Sharbati, Jutta; **Hoeke, Lena;** Chen, Wei; Keller, Andreas Peer F; Rajewski, Nikolaus; Einspanier, Ralf (2010): Deciphering the porcine intestinal microRNA transcriptome. In: *BMC Genomics* 11, S. 1471-2164-11-275

9.2. Vorträge

Hoeke, Lena; Twardziok, Sven O; Sharbati, Jutta; Einspanier, Ralf; Sharbati, Soroush: Integrative Analyse von miRNA und mRNA Expressionsprofilen in der porcinen postnatalen Darmentwicklung sowie nach Pathogen bzw. Pathogen/Probiotika Applikation
6.Doktorandensymposium & DRS Präsentationsseminar „Biomedical Sciences“ 2011, Berlin

9.3. Posterbeiträge

Hoeke, Lena; Sharbati, Jutta; Einspanier, Ralf; Sharbati, Soroush: Influence of probiotic (*Enterococcus faecium*) treatment on intestinal gene expression during Salmonella infection
3rd Seeon Conference 2010, Seeon

Hoeke, Lena; Sharbati, Jutta; Einspanier, Ralf; Sharbati, Soroush: Expressionsanalyse porciner Darmzellen während der postnatalen Darmentwicklung anhand von Microarrayversuchen
5.Doktorandensymposium & DRS Präsentationsseminar „Biomedical Sciences“ 2010, Berlin

Hoeke, Lena; Sharbati, Jutta; Einspanier, Ralf; Sharbati, Soroush: The microRNA-29a targets Caveolin-2; International Fall Meeting of the German Society for Biochemistry and Molecular Biology 2011, Frankfurt/Main

Hoeke, Lena; Twardziok, Sven O; Sharbati, Jutta; Keller, Andreas; Einspanier, Ralf; Sharbati, Soroush: Regulative Networks in Salmonella Infections of Piglets
National Symposium on Zoonoses Research 2011, Berlin

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zu allererst bei Herrn Prof. Dr. Dr. Einspanier bedanken, für die Möglichkeit in einem innovativen und kreativen Umfeld zu promovieren, sowie für die kontinuierliche Unterstützung, Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Soroush Sharbati bedanken, für die vielen hilfreichen Anregungen, die schier unerschöpflichen und kreativen Ideen, die eine wahre Bereicherung für das Projekt darstellten, die intensive Betreuung und immerwährende Bereitschaft, Neues zu erklären und nicht zuletzt für das rasche und konstruktive Korrekturlesen meiner Arbeit.

Dr. Jutta Sharbati möchte ich dafür danken, dass sie mich so herzlich aufgenommen hat, für die hilfreiche Zeit der Einarbeitung und die angenehme gemeinsame Arbeit im Labor. Vor allem danke ich ihr dafür, dass sie vermittelt hat, dass ich die richtige Kompetenz für das Projekt mitgebracht habe.

Ein sehr herzlicher Dank gilt Barbara Kutz-Lohroff, nicht nur für die Unterstützung im Labor, sondern vor allem auch für das sehr harmonische Arbeitsklima im Labor, für ihr immer offenes Ohr, den Zuspruch und die aufbauenden Worte, die ich ab und zu nötig hatte. Vielen Dank!

Mein Dank gilt ebenso dem gesamten Institut für Veterinär-Biochemie für das angenehme Arbeitsumfeld und die Hilfsbereitschaft. Vor allem danke ich hier meiner Arbeitsgruppe und insbesondere Ines Lesniak, Julia Ritter, Hannah Bauer, Marc Bohmer und Carina Zäper für die vielen schönen gemeinsam verbrachten Arbeitsstunden.

Ganz besonders danken möchte ich meiner Familie und meinem Freund, die auf so vielerlei und jeder auf seine eigene Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, meinen Eltern, die mich auf meinem Weg immer unterstützt haben. Ohne Euch wäre ich nicht so weit gekommen. Danke!

Danke auch meinem Freund Marek Checinski, der mich zu jeder Zeit, sei es während der Dissertation oder der Examensvorbereitungen, immer intensiv unterstützt hat und fest an meiner Seite stand. Danke, dass es Dich gibt!

Danken möchte ich auch allen, die diese Arbeit unermüdlich Korrektur gelesen haben, meiner Mutter, meinem Freund, meiner Tante Dr. Andrea Schmidt und meinem Onkel Dr. Martin Jordan.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen Schweinen, die unfreiwillig Eingang in diese Arbeit gefunden haben, entschuldigen und bedanken. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

11. Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 22.04.2013

Lena Hoeke