

**Das porzine Jejunumepithel:
Optimierung eines Zellkulturmodells
und Charakterisierung des Effekts von Zink
auf die intestinale Barrierefunktion**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Silke S. Zakrzewski

aus Berlin

2014

Diese Arbeit wurde von September 2010 bis Januar 2014 unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Dorothee Günzel am Institut für Klinische Physiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin angefertigt.

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Dorothee Günzel
Institut für Klinische Physiologie
Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin
Freie Universität Berlin und Humboldt-Universität zu Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Matthias F. Melzig
Institut für Pharmazie, Pharmazeutische Biologie
Freie Universität Berlin

Disputation am 16. Mai 2014

Meinen Eltern

INHALT

1 EINLEITUNG	1
<hr/>	
1.1 Das intestinale Epithel	1
1.1.1 Aufbau und Funktion	1
1.1.2 Transzelluläre Charakteristika	2
1.1.2.1 Pathologische Aspekte der Absorption	4
1.1.2.2 Pathologische Aspekte der Sekretion	4
1.1.3 Parazelluläre Charakteristika	5
1.1.3.1 TJ-Proteine	6
1.1.3.2 TJ-assoziierte Proteine	9
1.1.3.3 TJ als Zielstruktur von Pathogenen	10
1.2 Das Absetzen von Saugferkeln – die kritische Phase	10
1.2.1 Physiologische Ursachen einer gestörten Barriere	11
1.2.2 Infektionspathologie: Transmissible Gastroenteritis	13
1.3 Zink – ein bedeutendes Spurenelement	14
1.3.1 Zinkhomöostase	15
1.3.2 Therapeutische Anwendung	15
1.4 Intestinale Zellkulturmodelle	16
1.4.1 IPEC-J2: Eigenschaften und Anwendungen	17
1.4.2 IPEC-J2: Eignung als Barrieremodell	19
2 ZIELSETZUNG	.20
<hr/>	
3 MATERIAL UND METHODEN	21
<hr/>	
3.1 Geräte, Materialien und Reagenzien	21
3.1.1 Geräte	21
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	23
3.1.3 Laborchemikalien und Agenzien	24
3.1.4 Lösungen und Puffer	26
3.1.5 Effektoren und parazelluläre Marker	30
3.1.6 Gebrauchsfertige Kits und Lösungen	30
3.1.7 Antikörper	31
3.1.8 Primer	32
3.1.9 Software	32

3.2 Tierversuchsablauf	33
3.2.1 <i>Enterococcus faecium</i> - und Apfelextraktfütterungsversuch	33
3.2.2 Zinkfütterungsversuch	33
3.2.3 Zinkfütterungsversuch mit TGEV-Challenge	34
3.2.4 Gewebepräparation	34
3.3 Zellbiologische Methoden	35
3.3.1 Zellsystem IPEC-J2.....	35
3.3.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen	35
3.3.3 Versuchsansätze auf Filtermembranen.....	36
3.4 Elektrophysiologische Methoden	39
3.4.1 Manuelle Messung des transepithelialen Widerstands	39
3.4.2 Ussing-Technik.....	40
3.4.3 Ussing-Kammer: Messvorbereitung	41
3.4.4 Messung von TER und Kurzschlussstrom	42
3.4.5 Messung von Dilutionspotentialen.....	42
3.4.6 Messung von Fluxen parazellulärer Markermoleküle	43
3.4.6.1 Fluoreszein	44
3.4.6.2 FITC-Dextran 4000.....	45
3.4.7 Ein-Wege-Impedanzspektroskopie	45
3.4.8 Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie	47
3.5 Biochemische Methoden	49
3.5.1 Proteinextraktion	49
3.5.2 Bestimmung der Proteinquantität	49
3.5.3 SDS-PAGE.....	50
3.5.4 Western Blotting und Immundetektion	50
3.5.5 Zellproliferationsassay.....	51
3.5.6 Zellmembranintegritätsassay	51
3.6 Histochemische und optische Methoden	52
3.6.1 Fixierung.....	52
3.6.2 H&E-Färbung	53
3.6.3 PAS-Reaktion	54
3.6.4 Immunfluoreszenzfärbung.....	55
3.6.5 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	57
3.6.6 Ultradünnschnitte und Elektronenmikroskopie	59

3.6.7 Gefrierbruch und Elektronenmikroskopie	59
3.7 Molekularbiologische Methoden	60
3.7.1 RNA-Extraktion.....	60
3.7.2 Bestimmung der RNA-Quantität.....	61
3.7.3 DNase-Verdau.....	61
3.7.4 Reverse Transkription	61
3.7.5 Polymerasekettenreaktion.....	61
3.7.6 Agarosegelelektrophorese	62
3.7.7 PCR-Aufreinigung und Sequenzierung	63
3.8 Statistik.....	63
3.8.1 Student's t-Test und Bonferroni-Holm-Korrektur	63
3.8.2 Ein- und zweifaktorielle ANOVA.....	63
 4 ERGEBNISSE	 64
 4.1 Re-Etablierung des porzin-jejunalen Zellmodells IPEC-J2	 64
4.1.1 Optimierung der Kultivierungsbedingungen	64
4.1.2 Elektrophysiologische Charakterisierung	68
4.1.3 Morphometrische und substrukturelle Charakterisierung.....	72
4.1.4 Ultrastrukturelle Charakterisierung	75
4.1.5 Charakterisierung parazellulärer Permeabilitäten	76
4.1.6 Charakterisierung junctionaler und jejunaler Markerproteine	77
4.1.6.1 Junction-Proteine.....	77
4.1.6.2 Markerproteine	83
 4.2 Einfluss von Zink auf die jejunale Barrierefunktion	 85
4.2.1 Einfluss von Zink auf die epitheliale Barrierefunktion von IPEC-J2/PS.....	85
4.2.1.1 Zinkverbindung, -dosis und -inkubationsdauer.....	85
4.2.1.2 Barrierestärkung durch Zink: Effekt auf TER und Fluoreszeinpermeabilität	87
4.2.1.3 Elektrolytsekretion unbeeinflusst von Zink	88
4.2.2 Einfluss von Zinkprophylaxen auf die jejunale Barrierefunktion von gesunden Ferkeln im Kurz- und Langzeitexperiment	89
4.2.2.1 Zinkkonzentrationen in den Jejunumingesta	89
4.2.2.2 Keine Effekte durch Zink auf die Epithelmorphologie.....	90
4.2.2.3 Keine Effekte durch Zink auf den epithelialen Widerstand und Permeabilitäten.....	93
4.2.2.4 Effekte durch Zink auf TJ-Proteine	94
4.2.2.5 Keine Effekte durch Zink auf die induzierte Chloridsekretion.....	96

4.2.3 Einfluss von Zinkprophylaxen auf die jejunale Barrierefunktion von TGEV-infizierten Ferkeln	97
4.2.3.1 Erhalt der jejunalen Morphologie durch Zink	97
4.2.3.2 Milderung der epithelialen Apoptoserate durch Zink	99
4.2.3.3 Bewahrung der epithelialen Barriere durch Zink	99
4.2.3.4 Normalisierung sekretorischer und absorptiver Vorgänge durch Zink	100
5 DISKUSSION	102
<hr/>	
5.1 IPEC-J2/PS: Ein Kulturmodell mit Zellphysiologie des porzinen Jejunumepithels	102
5.1.1 Beziehung zwischen Morphologie und TER.....	103
5.1.2 Morphologieänderung induzierende Kultivierungsbedingungen	104
5.1.3 Funktionelles Proteinprofil	106
5.1.4 Differenzierung und Reifung.....	108
5.2 Einfluss von Zink auf die jejunale Barriere	111
5.2.1 Einschätzung der Eignung von Zink als Prophylaxe <i>in vivo</i>	111
5.2.2 Para- und transzelluläre Wirkung von Zink auf das intakte jejunale Epithel....	113
5.2.3 Wirkung von Zink auf das Jejunumepithel TGEV-infizierter Ferkel	116
5.3 Ausblick	120
6 ZUSAMMENFASSUNG	122
7 SUMMARY	124
8 LITERATUR	126
9 ANHANG	142
Abkürzungsverzeichnis	142
Publikationen	146
Lebenslauf.....	149
Danksagung	150

1 EINLEITUNG

1.1 Das intestinale Epithel

Das einschichtige Darmepithel von Vertebraten grenzt das Körperinnere von Körperäußerem ab und repräsentiert dabei gleichzeitig den Ort des Austausches zwischen internem und externem Milieu.

1.1.1 Aufbau und Funktion

Aufgenommene Nahrung muss in ihre kleinsten Bestandteile zerlegt werden, bevor sie vom Organismus als Energiequelle oder in Form von Biosynthesebausteinen und essentiellen Nährstoffen genutzt werden kann. Diese Verdauung sowie die Absorption von Nährstoffen bildet die Hauptaufgabe des Dünndarms (Duodenum, Jejunum, Ileum). Der saure Chymus aus dem Magen wird hier zunächst durch Pankreas- und Dünndarmsekret neutralisiert und vorverdaute Nahrungsbestandteile werden von aus Schleimhautdrüsen (Lieberkühn-Krypten) sezernierten Enzymen weiter hydrolytisch gespalten. Auf diese Weise entstehen niedermolekulare Verbindungen aus einst komplexen Kohlenhydrat-, Protein- und Fettmolekülen.

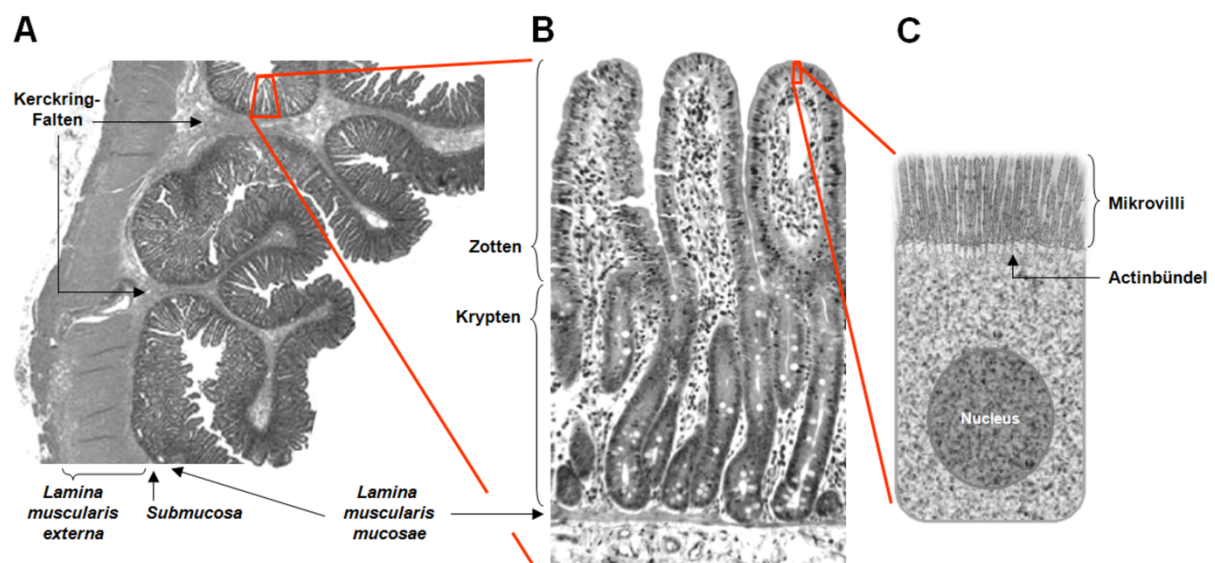


Abb. 1.1: Oberflächenvergrößerung des Darmepithels. (A) Querschnitt durch die in Kerckring-Falten gelegte humane Jejunumwand (modifiziert nach WISEMAN ET AL. (2007)). (B) H&E-Färbung porziner Jejunummukosa mit Zotten und Krypten. (C) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer murinen Epithelzelle mit Mikrovillisaum (modifiziert nach HEGAN ET AL. (2012)).

Für eine effiziente Nährstoffresorption ist das prismatische Schleimhautepithel im Vergleich zur *Lamina muscularis externa* in sogenannte Kerckring-Falten gelegt (**Abb. 1.1A**), welche wiederum Einstülpungen, die Krypten, und Ausstülpungen, die Zotten, zeigen (**Abb. 1.1B**).

Jede Epithelzelle ist zudem an ihrer dem Lumen zugewandten apikalen Seite mit einer Vielzahl weiterer kleiner Membranausstülpungen, den Mikrovilli, ausgestattet (**Abb. 1.1C**), die entscheidend zur Vergrößerung der epithelialen Kontaktfläche mit den Ingesta beitragen. Mikrovilli werden durch Actinfilamentbündel stabilisiert, die ihrerseits durch das actinbindende Protein Ezrin in der apikalen Zellmembran verankert sind. Somit ist die apikale Membran über das Actinzytoskelett in das *Signalling* der Zelle integriert (CASALETTO *ET AL.*, 2011).

Vor Selbstverdau und potentiellen Infektionen ist das intestinale Epithel geschützt, indem Becherzellen, die in den Epithelverband eingegliedert sind, Mukus synthetisieren und diesen apikal sezernieren. Damit wird Erregern eine erste Barriere entgegengebracht. In diesem Zusammenhang ist das mukosaassoziierte Lymphgewebe von großer immunologischer Bedeutung, da es über die in den Epithelverband integrierten M-Zellen und dendritischen Zellen in enger Verbindung mit potentiellen Pathogenen steht und Schritte zu deren Eliminierung einleiten kann.

Nachdem zugängliche Nährstoffe weitestgehend über das Dünndarmepithel resorbiert wurden, gelangen die Ingesta in den Dickdarm (lat. *Colon ascendens/descendens, Rectum*). Die epitheliale Morphologie des Dickdarms ähnelt der des Dünndarms, die Schleimhautstruktur unterscheidet sich jedoch durch das Fehlen von Zotten. Die Funktion besteht vornehmlich in der Resorption von Wasser und Elektrolyten. Durch bakterielle Fermentationsprozesse der residenten Dickdarmbakterien, deren Anzahl und Vielfalt im Vergleich zum Dünndarmmikrobiom deutlich umfassender sind, werden dem Wirt die bis hierhin unverdaulichen Ballaststoffe aufgeschlossen. Durch diese Prozesse wird er mit zusätzlicher Energie in Form von kurzkettigen Fettsäuren sowie mit essentiellen Vitaminen versorgt.

1.1.2 Transzelluläre Charakteristika

Der transzelluläre Stoffaustausch durch Enterozyten hindurch ist durch freie Diffusion lipophiler Solute und kleiner Moleküle, Transzytose großer Moleküle sowie durch gewebe-spezifische Transporter und Kanäle definiert. Letzteres soll anhand der Absorption von Monosacchariden und der Sekretion von Elektrolyten im Dünndarm näher erläutert werden.

Am Mikrovillisaum des Jejunums zu Hexosen hydrolysiert, werden Kohlenhydrate auf zweierlei Art über die apikale Membran transportiert – entweder über GLUT (engl. *glucose transporter*)-vermittelte erleichterte Diffusion oder über Na⁺-abhängigen carriervermittelten Transport. Die Absorption von Fruktose findet dabei über GLUT5 statt (JONES *ET AL.*, 2011), wohingegen Glukose bzw. Galaktose zusammen mit zwei Na⁺-Ionen vom SGLT1 (engl. *sodium glucose transporter 1*) transportiert werden (WRIGHT *ET AL.*, 2011) (**Abb. 1.2**). Die

Glukose-/Galaktoseabsorption ist somit elektrogen und sekundär aktiv. Letzteres bedeutet, dass der Na^+ -Gradient in die Zelle durch den vom ATP-getriebenen Na^+/K^+ -Antiport aufrecht erhalten wird. Der basolaterale Export von Fruktose wird schließlich über GLUT2 und GLUT5, der von Glukose und Galaktose ausschließlich über GLUT2 abgewickelt (JONES *ET AL.*, 2011; WRIGHT *ET AL.*, 2011) (**Abb. 1.2**). In Mausstudien konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass in Antwort auf hohe diätetische Fruktose- und Glukosekonzentrationen GLUT2 hoch reguliert und in die apikale Membran integriert wird, und dass in Folge dessen die Absorption von Monosacchariden gesteigert wird (GOUYON *ET AL.*, 2003; ZHENG *ET AL.*, 2012). Dennoch wird die apikale Lokalisation des GLUT2 derzeit kontrovers diskutiert (RÖDER *ET AL.*, 2013). Während in der Nahrung natürlich vorkommende Polyphenole wie die Flavonoide Quercetin und Phloretin als potente Inhibitoren des GLUT2 identifiziert wurden (KWON *ET AL.*, 2007; ZHENG *ET AL.*, 2012) bzw. Phloretin und sein Glykosid Phlorizin den SGLT1-vermittelten Transport hemmen (EHRENKRANZ *ET AL.*, 2005; WRIGHT *ET AL.*, 2011), konnten bislang für GLUT5 keine flavonoiden Inhibitoren identifiziert werden (KWON *ET AL.*, 2007).

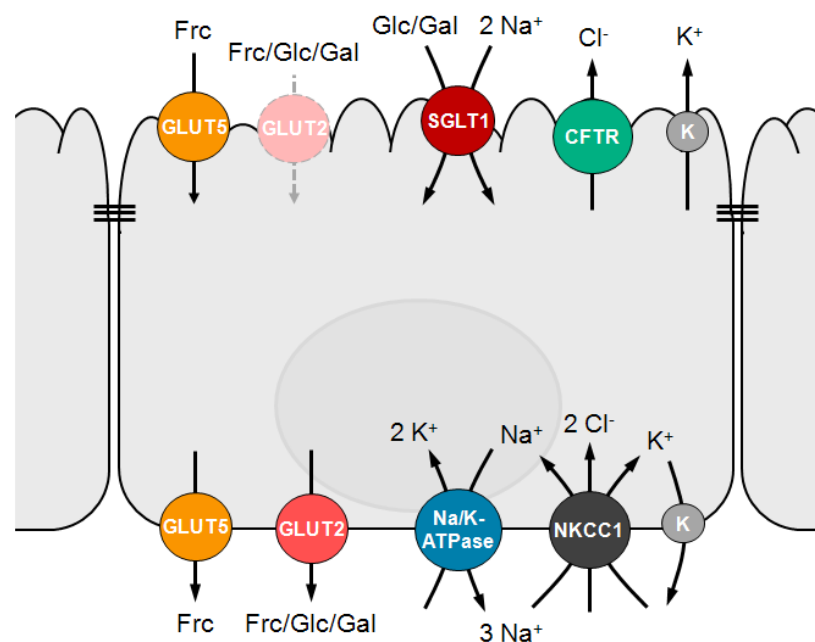


Abb. 1.2: Exemplarische Darstellung jejunaler absorptiver und sekretorischer Vorgänge. Erleichterter bzw. Na^+ -vermittelter Transport von Monosacchariden über die apikale und basolaterale Zellmembran. Der Na^+ -Gradient wird über die Na/K -ATPase aufgebaut, die zusammen mit dem NKCC1 zu einem basolateralen Cl^- -Import führt. Cl^- kann die Zelle apikal über den CFTR verlassen.

Neben der vornehmlich über das Zottenepithel stattfindenden Nährstoffabsorption spielt auch die in Krypten dominierende Ionensekretion eine entscheidende Rolle bei der Verdauung (THIAGARAJAH AND VERKMAN, 2012). Die über Chloridkanäle (CFTR , engl. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*; CaCC , engl. *calcium-activated chloride channel*;

ORCC, engl. *outwardly rectifying chloride channel*) stattfindende Chloridsekretion ist ein essentieller Vorgang der physiologischen plasmatischen Abgabe von auf NaCl basierendem Dünndarmsekret ins Lumen. Triebkraft ist auch hier die Na/K-ATPase, welche den Import von Na⁺, K⁺ und Cl⁻ über den NKCC1 (engl. *sodium potassium chloride cotransporter 1*) ermöglicht (**Abb. 1.2**). Über verschiedene Transporter werden Na⁺ und Cl⁻ wieder resorbiert, wodurch Wasser osmotisch in die Zelle folgt, sodass Absorptions- und Sekretionsprozesse im Dünndarm letztlich in einer Nettoabsorption resultieren (THAPAR AND SANDERSON, 2004). *Ex vivo* lässt sich die Chloridsekretion cAMP- bzw. Ca²⁺-mediert stimulieren. Dabei bewirkt Forskolin eine cAMP-abhängige und CFTR-vermittelte Chloridsekretion, wohingegen Carbachol Ca²⁺-abhängig die Chloridsekretion über den CaCC vermittelt (BARRETT AND KEELY, 2000; DHARMSATHAPHORN AND PANDOL, 1986). Es gibt jedoch Anhaltspunkte dafür, dass eine durch Carbachol induzierte Chloridsekretion ebenso CFTR-vermittelt ablaufen kann (HEUVELIN *ET AL.*, 2010; LEONHARD-MAREK *ET AL.*, 2009).

1.1.2.1 Pathologische Aspekte der Absorption

Fehlen bestimmte Saccharidasen im Lumen, sodass die Hydrolyse zu Monosacchariden nicht erfolgen kann, bzw. ist die Anzahl an Monosaccharidtransportern in der apikalen Membran reduziert, ihre Funktion eingeschränkt oder fehlen sie gänzlich, dann können Absorptionsprozesse entsprechender Monosaccharide nicht ablaufen und es resultiert ein osmosebedingter luminaler Einstrom von Wasser – das Entstehen einer malabsorptiven Diarrhö (FROMM AND SCHULZKE, 2008). Dies ist beispielsweise symptomatisch für eine Infektion mit enteropathogenen *Escherichia coli*, während der die Glukose- bzw. Na⁺-Absorption über den SGLT1, neben weiteren absorptiven Mechanismen (HODGES AND GILL, 2010) und Beeinträchtigung der parazellulären Barriere (MUZA-MOONS *ET AL.*, 2004), inhibiert ist (DEAN *ET AL.*, 2006). In welchem Maße eine gesteigerte Sekretion zur Symptomatik beiträgt, ist zur Zeit kontrovers diskutiert (HODGES AND GILL, 2010). Von diesen Pathologien abgeleitet, gewinnen jedoch Strategien zu kontrolliert verminderter Zuckerabsorption zunehmend an Bedeutung, wenn es um therapeutische Fragestellungen wie beispielsweise Adipositas und Diabetes geht (WILLIAMSON, 2013).

1.1.2.2 Pathologische Aspekte der Sekretion

Die Lokalisation des CFTR ist nicht nur auf die Darmschleimhaut beschränkt. Eine Beeinträchtigung seiner Funktion resultiert in einer gestörten Ionen- und Flüssigkeitshomöostase an epithelialen Oberflächen. Ist der CFTR durch Mutationen funktionell stark eingeschränkt oder gar funktionslos, spricht man von Mukoviszidose (engl. *cystic fibrosis*),

welche sich beim Menschen durch mit zähflüssigem Mukus bedeckte Epithelien äußert (DAVIES *ET AL.*, 2007). Neben anderen Organbeeinträchtigungen ist die Sterblichkeit Betroffener hauptsächlich auf chronische Atemwegserkrankungen zurückzuführen (DAVIES *ET AL.*, 2007). Neben dieser CFTR-Unterfunktion ist eine CFTR-Überfunktion ebenso verheerend. Verschiedene *Vibrio cholerae*-Toxine lösen zum Beispiel durch Erhöhung der Konzentration intrazellulärer *second messenger* wie cAMP, cGMP und Ca^{2+} eine exzessive CFTR-(un-)abhängige Chloridsekretion aus, wobei gleichzeitig die Elektrolytaborption vermindert ist (HODGES AND GILL, 2010). Zusätzlich zur transzellulären Beeinträchtigung manipuliert das Cholera-toxin auch die parazelluläre Barriereintegrität (GOLDBLUM *ET AL.*, 2011). Bei der Abwehr von Pathogenen könnte eine gesteigerte Sekretion, eine Art Spüleffekt, kurzfristig von Vorteil sein (LEONHARD-MAREK *ET AL.*, 2009), um Erreger auf diese Weise effizient zu eliminieren. Hält dieser Zustand jedoch längere Zeit an, kommt es zu einer permanenten Nettosekretion an Elektrolytlösung, was gemeinhin als sekretorische Diarrhö bezeichnet wird (FROMM AND SCHULZKE, 2008) und innerhalb weniger Tage aufgrund einer Dehydratation des Organismus zum Tod führt – mit 15% einer der Hauptgründe von Kleinkindsterblichkeit in Entwicklungsländern (WHO AND UNICEF, 2004).

1.1.3 Parazelluläre Charakteristika

Die Kontakte zwischen benachbarten Epithelzellen tragen maßgeblich zur Integrität des Epithels bei. Dabei werden verschiedene Zell-Zell-Kontakte funktionell voneinander unterschieden. So bieten Gap Junctions (lat. *Macula communicans*) die Möglichkeit des interzellulären Austausches und vermitteln Desmosomen (lat. *Macula adherens*) und Adherens Junctions (lat. *Zonula adhaerens*) strukturelle Kontinuität des Zellverbandes durch epitheliales Cadherin (E-cad)-vermittelte Stabilisierung des Netzwerks aus Intermediär- und Actinfilamenten (**Abb. 1.3**). Die für Epithelien unabdingbaren Eigenschaften der Zellpolarität (engl. *fence function*) und permselektiven Limitierung des parazellulären Solutfluxes (engl. *gate function*) werden durch Proteine der Gap- und Adherens Junctions vermittelt, indem sie die apikolaterale Assemblierung der zellumgürtenden Tight Junctions (lat. *Zonula occludens*) (**Abb. 1.3**) sowohl initiieren als auch stabilisieren (GUMBINER, 1987; KOJIMA *ET AL.*, 2007; MAIERS *ET AL.*, 2013). Die Kontinuität der zellulären Polarität ist in sofern entscheidend, als dass beispielsweise gerichtete Transportprozesse nur dann orientiert ablaufen können, wenn entsprechende Transportproteine entweder in die apikale oder basolaterale Zellmembran integriert sind – eine räumliche Vermischung also unterbleibt. Die Barrierefunktion ist in diesem Zusammenhang ausschlaggebend für den Erhalt von Konzentrationsgradienten zwischen extra- und intrazellulärem Milieu. *Gate-* und *fence function* der Tight Junction (TJ)

halten auf diese Weise die Homöostase sowohl auf subzellulärer als auch auf Organebene aufrecht (SAWADA, 2013).

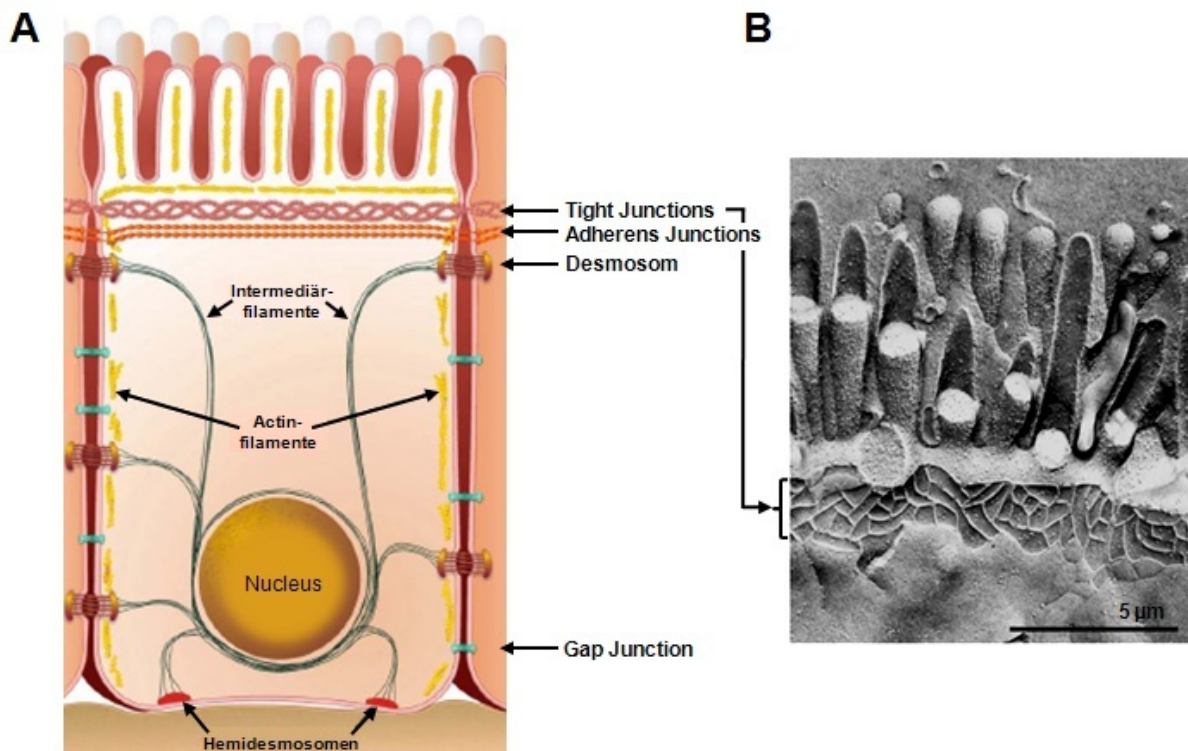


Abb. 1.3: Epitheliale Interzellulärkontakte. (A) Schematische Darstellung apikolateraler Tight Junctions sowie lateraler Adherens Junctions, Desmosomen und Gap Junctions (modifiziert nach GUTTMAN AND FINLAY (2009)). (B) Elektronenmikroskopische Gefrierbruchaufnahme eines apikalen Ausschnitts intestinalen Rattenepithels mit Mikrovilli und Netzwerk aus Tight Junctions (modifiziert nach FÖRSTER (2008)).

Nachdem die TJ erstmals im Jahr 1963 als Fusion zweier Zellmembranen benachbarter Zellen beschrieben wurde, resultierte daraus die Annahme eines vollständigen Verschlusses des parazellulären Spalts (FARQUHAR AND PALADE, 1963). Inzwischen sind zahlreiche molekulare Bestandteile der TJ beschrieben und es wird davon ausgegangen, dass wechselwirkende Transmembranproteine aneinandergrenzender Epithelzellen einen permselektiven TJ-Komplex bilden (TSUKITA ET AL., 2001).

1.1.3.1 TJ-Proteine

Trotz ihrer funktionellen Variabilität lassen sich die epithelialen TJ-Proteine nach transmembranären Gemeinsamkeiten klassifizieren.

Tetraspanmembranproteine

Viele der TJ-Proteine durchspannen die Zellmembran vier Mal, woraus zwei extrazelluläre Schleifen sowie eine intrazelluläre Domäne resultieren (**Abb. 1.4A**). Diese Tetraspanstruktur ist den TJ-assoziierten MARVEL-Proteinen (TAMPs) und Claudinen gemein, wobei die Größe der extrazellulären Schleifen und Länge der zytoplasmatischen N- und C-Termini proteinspezifisch variiert (GONZÁLEZ-MARISCAL *ET AL.*, 2003; IKENOUCI *ET AL.*, 2005).

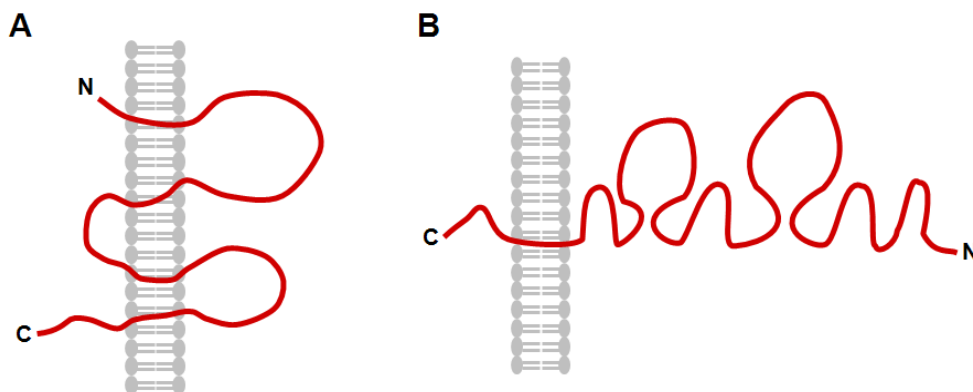


Abb. 1.4: Transmembranäre Strukturtypen von TJ-Proteinen. (A) Tetraspanntyp von Claudinen, Occludin und Tricellulin und (B) Monospanntyp von JAMs und CAR (modifiziert nach EBNET *ET AL.* (2004) und TSUKITA *ET AL.* (2001)).

Occludin, mit dem im Jahr 1993 (FURUSE *ET AL.*, 1993) die molekulare Beschreibung von Tetraspanmembranproteinen der TJ begann, und Tricellulin (-a und -a1, zwei von vier Tricellulin-Isoformen), sind beide TAMP-Repräsentanten, die sich jedoch funktionell unterscheiden. Aus Überexpressionsstudien ergab sich, dass Tricellulin, wenn ausschließlich trizellulär exprimiert, die Passage von Makromolekülen ab einer Größe von ~10 Å limitiert (GÜNZEL, 2012; KRUG *ET AL.*, 2009a). Außerdem dichtet zusätzlich bizellulär exprimiertes Tricellulin-a die TJ gegen Ionen und kleinere Moleküle ab (KRUG *ET AL.*, 2009a). Inwieweit Occludin zu epithelialen Barriereigenschaften beiträgt, wird derzeit kontrovers diskutiert. So beschreiben Occludin-*Knockout*-Studien durch bizelluläre Tricellulinexpression einerseits kompensatorische Effekte (IKENOUCI *ET AL.*, 2008), und andererseits eine Zunahme der epithelialen Permeabilität für Ionen sowie kleine und große Moleküle, während der epitheliale Widerstand beeinträchtigt ist oder nicht (AL-SADI *ET AL.*, 2011; BUSCHMANN *ET AL.*, 2013; YU *ET AL.*, 2005). Davon unabhängig wird eine Occludin-Überexpression als barrierestärkend beschrieben (MCCARTHY *ET AL.*, 1996).

TAMPs assemblieren zu Homo- und Heterodimeren und teilen diese Eigenschaft mit den Claudinen, wobei für TAMPs lediglich *cis*-Interaktionen (innerhalb einer Zellmembran) und für Claudine auch *trans*-Interaktionen (zwischen benachbarten Zellmembranen) beschrieben

sind (GÜNZEL, 2012), durch die sich parazelluläre Poren eines Radius von 4 Å ergeben (VAN ITALLIE *ET AL.*, 2008) und auf denen die Entstehung einer permselektiven Barriere beruht. An ihrem C-terminalen Ende besitzen Claudine ein PDZ (PSD95/Disc large/ZO-1)-Bindemotiv, über das sie entweder mit TJ-assoziierten Gerüstproteinen oder regulatorischen Komponenten in Verbindung stehen.

Die für die epitheliale Barrierefunktion essentiellen Claudine sind Teil einer Gesamtheit von bis dato 27 Mitgliedern in Epi- und Endothelien von Säugetieren und repräsentieren damit die größte Fraktion der TJ-Proteine (MINETA *ET AL.*, 2011). Für einige Claudine konnten bereits spezifische Eigenschaften ermittelt werden. Entsprechend ihrer generellen Funktion unterscheidet man abdichtende Proteine wie Claudin-1, -3 und -5 (AMASHEH *ET AL.*, 2005; FURUSE *ET AL.*, 2002; MILATZ *ET AL.*, 2010), Anionenporenbildner wie Claudin-10a und -17 (KRUG *ET AL.*, 2012; VAN ITALLIE *ET AL.*, 2006) sowie Kationenporenbildner wie Claudin-2, -10b und -15 (AMASHEH *ET AL.*, 2002; GÜNZEL *ET AL.*, 2009; TAMURA *ET AL.*, 2011), wobei für Claudin-2 zudem auch Eigenschaften eines Wasserkanals beschrieben sind (ROSENTHAL *ET AL.*, 2010).

Die Expressionsmuster der Claudine sind individuell entwicklungs- und gewebespezifisch. Darüber hinaus kann ihre physikochemische Eigenschaft und somit ihre Funktion stark von Wechselwirkungen mit weiteren Claudinen abhängen (GÜNZEL, 2012). Auf diese Weise entstehen Epithelien mit detailliert auf ihre Funktion abgestimmten Eigenschaften – beispielsweise das lecke Dünndarm- (SCHULTZ, 1972) und das dichte Harnblasenepithel (WANG *ET AL.*, 2003).

Monospanmembranproteine

Monospanproteine wie das junctionale Adhäsionsmolekül (JAM)-A, JAM-4 und der Coxsackie- und Adenovirusrezeptor (CAR) gehören zur Gruppe der Immunglobulin-superfamilie und unterscheiden sich hinsichtlich ihrer molekularen Struktur hauptsächlich in der Länge ihrer zytoplasmatischen Domäne (EBNET *ET AL.*, 2004) (**Abb. 1.4B**). Über das C-terminale PDZ-Bindemotiv wechselwirkt CAR mit Gerüstproteinen (COHEN *ET AL.*, 2001) und wechselwirken JAMs zusätzlich auch mit Polaritätskomplexelementen (EBNET *ET AL.*, 2004). Die Hauptaufgabe dieser Proteine ist somit weniger die direkte als vielmehr die indirekte parazelluläre Barrierebildung durch regulatorische Assemblierung weiterer TJ-Komponenten in der TJ (COHEN *ET AL.*, 2001; MANDELL AND PARKOS, 2005).

1.1.3.2 TJ-assozierte Proteine

Für die Rekrutierung und Anordnung von TJ-Proteinen, ihre Verankerung in der Zellmembran sowie ihre funktionelle Regulation ist eine Vielzahl weiterer Proteine verantwortlich (**Abb. 1.5**). Neben den zur MAGUK (engl. *membrane-associated guanylate kinase*)-Familie gehörenden Gerüstproteinen ZO (lat. *Zonula occludens*)-1 und -2, die an alle Transmembranproteine der TJ PDZ-abhängig aber auch PDZ-unabhängig binden und durch Assoziation an den perijunctionalen Actomyosinring die TJ-Proteine in der Membran verankern (SAWADA, 2013), sind auch sogenannte Polaritätsproteine von Bedeutung. Zu verschiedenen Komplexen zusammengeschlossen stehen apiko-basale Zellpolarität vermittelnde Proteine wie PAR3, PALS1 und PATJ über ZO-Proteine mit der TJ in Kontakt (GÜNZEL, 2012; PIECZYNSKI AND MARGOLIS, 2011).

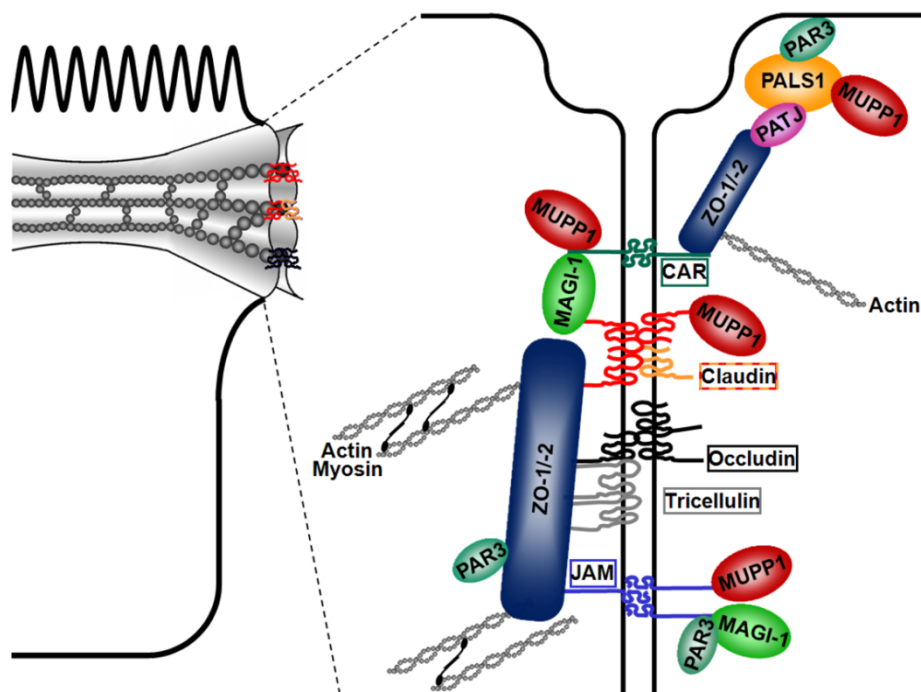


Abb. 1.5: Molekulare Komposition der TJ. Der TJ-Komplex besteht sowohl aus Monospan- und Tetraspanmembranproteinen wie JAM, CAR, Claudinen, Occludin und Tricellulin als auch aus Gerüst- und Signalproteinen wie MAGI1, MUPP1, PATJ, PALS1 und PAR3. Die Gerüstproteine ZO-1 und -2 verknüpfen die TJ mit dem perijunctionalen Actomyosinring (modifiziert nach GÜNZEL (2012)).

Des Weiteren wird MAGI (engl. *membrane-associated guanylate kinase 1 with inverted domain structure*) und MUPP (engl. *multiple PDZ domain protein 1*) eine Gerüstfunktion zugeordnet bzw. sind sie ins TJ-Signalling involviert (GUILLEMOT ET AL., 2008). Vielen weiteren TJ-assozierten Proteinen, die im Gegensatz zu den eben genannten kein PDZ-Bindemotiv besitzen, kommt ebenso eine Gerüst- bzw. Regulatorfunktion zu (GUILLEMOT ET AL., 2008).

1.1.3.3 TJ als Zielstruktur von Pathogenen

Die TJ steht als selektiv permeable Barriere dem unkontrollierten Durchtritt von Wasser, kleinen Ionen und anderen Soluten sowie der Aufnahme von immunogenen Makromolekülen gegenüber. Aus diesem Grund stellt sie für zahlreiche Pathogene eine Pforte multipler Invasionsstrategien dar, weshalb der TJ-vermittelte Barriereerhalt immer weiter in den Fokus therapeutischer und präventiver Strategien rückt (HERING *ET AL.*, 2012; JOHN *ET AL.*, 2011).

TJ-Proteine selbst können Rezeptoren für Mikroorganismen darstellen, wie beispielsweise die Claudine 3 und 4, die als Rezeptoren für das bakterielle *Clostridium perfringens* Enterotoxin fungieren, welches sie aus der TJ aussortiert und damit die Barriere massiv beeinträchtigt (SONODA *ET AL.*, 1999). Auch Viren haben sich Transmembranproteine der TJ zum direkten Ziel gemacht. So präsentieren JAM und CAR jeweils spezifische Strukturen, an denen Reoviren bzw. Adeno- und Coxsackieviren binden können und als Folge dessen TJ-modulierend internalisiert werden (GUTTMAN AND FINLAY, 2009). Gewisse bakterielle und virale Erreger haben mit Pathogenitätsfaktoren oder der induzierten Expression TJ-modulierender Proteine indirekte Invasionsstrategien entwickelt. Auf diese Weise vermitteln beispielsweise enteropathogene *Escherichia coli* und *Vibrio cholerae* bzw. Rotaviren die Dissoziation von ZO-1, Occludin und Claudin-1 bzw. -3 aus der TJ (GOLDBLUM *ET AL.*, 2011; MUZA-MOONS *ET AL.*, 2004; NAVA *ET AL.*, 2004). Neben den TJ- und Gerüstproteinen bieten auch Polaritätskomplexproteine wie PALS1 und PAR3 mikrobiologische Angriffspunkte – nämlich für SARS (schweres, akutes respiratorisches Syndrom)-Coronaviren und Rhesus Papillomaviren, die durch ihren Eingriff in das Zellpolarität-*Signalling* die TJ-Assemblierung hemmen (JAVIER AND RICE, 2011).

Wurde die Barriere durch TJ-Disassemblierung beeinträchtigt, so kommt es einerseits zu unkontrollierter Aufnahme von Antigenen, da nun auch Substanzen mit einem molekularen Radius größer als 4 Å den parazellulären Weg passieren können (RODGERS AND FANNING, 2011), und andererseits zu ungehinderter Solutdiffusion aus dem Interstitium. Letzteres wird im Fall einer intestinalen Problematik als Leckflux-Diarrhö bezeichnet (FIELD, 2003).

1.2 Das Absetzen von Saugferkeln – die kritische Phase

Die alles entscheidende Phase in der Schweinezucht stellt die Ablaktation der Ferkel dar, denn der darauf folgende etwa zweiwöchige Zeitraum wird gemeinhin mit Wachstumsrückständen, intestinalen Beeinträchtigungen mit Diarrhöen (bakterieller, parasitärer, viraler und/oder diätetischer Natur (HAMADEJOVA AND VITOVEC, 2005; LECCE, 1986; MILLER *ET AL.*, 1984)) sowie mit einer hohen Ferkelsterblichkeit assoziiert (LALLÈS *ET AL.*, 2004; PLUSKE,

2013). Bereits in den späten 1940er Jahren wurde der Einsatz von Antibiotika in Geflügel- und Schweinebeständen als äußerst produktionseffizient beschrieben (DIBNER AND RICHARDS, 2005). Ein knappes Jahrzehnt später traten infolgedessen erstmals Antibiotikaresistenzen in Schlachtgeflügel auf (DIBNER AND RICHARDS, 2005). In den 1960er Jahren wurden antibiotikaresistente Bakterien aus dem Schwein im Menschen nachgewiesen (AARESTRUP, 2012). Eine Antibiotikamono-resistenz der Darmmikrobiota bei Schweinen wird heutzutage bereits als eine Art „*background resistance level*“ beschrieben (BEDNORZ ET AL., 2013; GROBBEL ET AL., 2007). Um eine durch den Verzehr tierischer Produkte mögliche Übertragung von Antibiotikaresistenzen auf den Menschen einzudämmen, verhängte die Europäische Union 2006 schließlich ein Verbot des Einsatzes von Antibiotika als Wachstumsförderer in Nutztierbeständen. Seit diesem Zeitpunkt stieg die Verwendung von therapeutischen Antibiotika an und wurde die Suche nach geeigneten Alternativen drastisch intensiviert (GAGGIA ET AL., 2010; HEO ET AL., 2013; KIM ET AL., 2012; PLUSKE, 2013), woraus die höchst aktuelle Thematik eines Verbundprojektes der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG; Sonderforschungsbereich (SFB) 852) entstand. Dieser veterinärmedizinische SFB beschäftigt sich mit der Ernährung und der intestinalen Mikrobiota-Wirt-Interaktion beim Schwein, basierend auf der Fragestellung, wie Nahrungsfaktoren die Darmfunktion und Tiergesundheit beeinflussen. Diese Thematik wird in kollaborativer Weise von Teilprojekten unterschiedlicher Fachrichtungen (Anatomie, Biochemie, Immunologie, Mikrobiologie, Molekularbiologie, Physiologie, Trophologie, Virologie und Bioinformatik) bearbeitet, sodass die Fragestellung allumfassend biomedizinisch behandelt wird. Die vorliegende Arbeit entstand im Bereich der Physiologie, deren Schwerpunkt im SFB 852 auf der parazellulären Darmbarriere liegt.

1.2.1 Physiologische Ursachen einer gestörten Barriere

Das Absetzen von der Muttersau beinhaltet für das Ferkel eine Vielzahl von Stressoren. Zum einen erfährt es durch die abrupte Trennung und eine neue Umgebung mit anderen Artgenossen einen Stress auf psychosozialer Ebene, zum anderen muss sich das Ferkel an eine neue diätetische Situation anpassen (LALLÈS ET AL., 2004). Nach der leicht verdaulichen Sauenmilch muss es sich an festes, weniger gut verdauliches pflanzliches Futter gewöhnen. Dabei sind weder das Fressverhalten des Ferkels, noch die Funktionen des Gastrointestinaltrakts und des Immunsystems schon vollständig entwickelt (LALLÈS ET AL., 2004).

Direkt nach dem Absetzen kommt es beim Ferkel zu einer vorübergehend verminderten Futteraufnahme (Anorexie) mit Gewichtsverlust (LALLÈS ET AL., 2004; LE DIVIDICH AND SÈVE, 2000; PLUSKE ET AL., 1997). Bis die Aufnahme verstoffwechselbarer Energie eines

Absetzferkels wieder der eines Saugferkels entspricht, können bis zu zwei Wochen vergehen (LE DIVIDICH AND SÈVE, 2000). Anorexie wird zudem als Auslöser für atrophische Zotten und hyperplastische Krypten des Dünndarms gesehen (HAMPSON, 1986; PLUSKE *ET AL.*, 1997). Diese morphologischen Änderungen gehen generell mit einem Abfall der Aktivitäten von Verdauungsenzymen des Mikrovillisaums wie beispielsweise den Disaccharidasen Laktase, Maltase und Sukrase einher (PLUSKE *ET AL.*, 1997), wovon die Laktaseaktivität im weiteren Verlauf weiterhin kontinuierlich abfällt und die Aktivitäten von Maltase und Sukrase wieder beständig ansteigen (KIDDER AND MANNERS, 1980). Die Zottenatrophie wird funktionell mit einer Malabsorption von Nährstoffen assoziiert (SHEPHERD *ET AL.*, 1979), womit das Entstehen einer Diarrhö erklärt werden kann (HAMPSON, 1986). Eine Kryptenhyperplasie dagegen hängt nicht generell mit einer erhöhten Sekretion zusammen (SHEPHERD *ET AL.*, 1979), welche letztlich vielmehr von exogenen Stimuli abhängt. Die absetzbedingte gastrointestinale Imbalance basiert dabei nicht ausschließlich auf Änderungen der intestinalen Struktur und Funktion, sondern auch auf Adaptationsvorgängen der residenten Mikrobiota. So nimmt die Zahl an potentiell förderlichen Lactobacillaceae während der Umstellung zum selbständigen Ferkel ab (LALLÈS *ET AL.*, 2007).

Direkt nach dem Absetzen ist die jejunale Genexpression proinflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Interleukin (IL)-1 β und IL-6 erhöht (PIÉ *ET AL.*, 2004), was hauptsächlich eine Folge der Anorexie und der damit assoziierten jejunalen Morphologieänderung darstellt (MCCRACKEN *ET AL.*, 1999). Da ein Ferkel ohne eigene Immunabwehr auf die Welt kommt, ist es ganz entscheidend auf die Erstversorgung mit Immunglobulinen aus dem Kolostrum angewiesen, welche es in den ersten Lebensstunden passiv immunisieren, deren Konzentration in der Milch jedoch schnell wieder auf ein Basislevel absinkt (LECCE, 1986). Bis sich das Immunsystem ausreichend entwickelt hat und nach Ablaktation der Wegfall der maternalen Immunglobuline kompensiert ist, besteht für einige Wochen eine Immunitätslücke, in denen das Ferkel lokalen Entzündungen nicht effektiv entgegenwirken kann (LECCE, 1986). Proinflammatorische Zytokine sind unter anderem in die Modulation der TJ involviert. So ist beispielsweise bekannt, dass TNF- α das abdichtende Claudin-1 aus der TJ aussortiert (AMASHEH *ET AL.*, 2010) bzw. zu einer Hochregulation des Kationenkanalbildners Claudin-2 führt (MANKERTZ *ET AL.*, 2009) und auf diese Weise die Barrierestärke beeinträchtigt. Verschiedene Studien berichten absetzbedingt für jejunale Mukosae von erhöhten parazellulären Permeabilitäten für kleine Moleküle und für Makromoleküle (HU *ET AL.*, 2013c; SPREEUWENBERG *ET AL.*, 2001), wodurch Pathogenen bzw. ihren Toxinen vermutlich der Eintritt in den Organismus erleichtert wird. Des Weiteren interagieren Pathogene mit dem Epithel und lösen eine erhöhte Elektrolytsekretion aus (WAPNIR AND TEICHBERG, 2002). Das führt zusammen mit morphologisch bedingten transzellulären Charakteristika und der

gestörten parazellulären Barriere schließlich zu einer ernsthaften, nicht selten letal endenden malabsorptiv-sekretorischen Leckflux-Diarrhö, deren Ausmaß erheblich vom Grad der Pathogenbelastung in der Umgebung des Ferkels abhängt (LECCE, 1986).

In der Europäischen Union ist das Mindestabsetzalter für Ferkel auf 21 Tage festgesetzt (EU-RAT, 2008), wobei die Tiere in der biologischen Landwirtschaft erst nach mindestens 40 Tagen von der Sau getrennt werden (EG-KOMMISSION, 2008). Die Folgen des Absetzens sind zum einen altersbedingt und zum anderen von der ersten Futteraufnahme nach Ablaktation abhängig. Je jünger ein Ferkel beim Absetzen ist, desto unvollständiger ist die physiologische sowie psychosoziale Entwicklung und desto anfälliger ist es für Enteropathogene (MCLAMB *ET AL.*, 2013; SMITH *ET AL.*, 2010). Darüber hinaus ist die Gewichtszunahme in der ersten Woche nach Absetzen ausschlaggebend für die Entwicklung und Schwere einer intestinalen Problematik im Verlauf weiterer drei Wochen (MADEC *ET AL.*, 1998) und letztlich für die Dauer bis zum Erreichen der Schlachtreife (CAMPBELL *ET AL.*, 2013) – dem entscheidenden Wirtschaftsfaktor in der Schweinemast.

1.2.2 Infektionspathologie: Transmissible Gastroenteritis

Der virale Erreger der Oldenburger Schweineseuche, einer Magen-Darm-Entzündung bei Schweinen, wurde erstmals im Jahr 1946 in Purdue, USA isoliert und als TGEV (engl. *transmissible gastroenteritis virus*) bezeichnet (DOYLE AND HUTCHINGS, 1946). Zur Familie der *Coronaviridae* gehörend ist das TGEV ein behülltes Virus mit einzelsträngiger RNA positiver Polarität, das das Schwein wirtsspezifisch infiziert (MARONPOT AND WHITEHAIR, 1967) und eine bedeutende Ursache für porzin-virale Enteritiden darstellt (REN *ET AL.*, 2011; WEISS AND NAVAS-MARTIN, 2005). Es ist für Schweine jeden Alters virulent, wobei das Pathogeneseausmaß bei neugeborenen Ferkeln am verheerendsten ist (MARONPOT AND WHITEHAIR, 1967; MOON *ET AL.*, 1975; MOON *ET AL.*, 1973) und durch eine hohe Infektiosität mit Verlusten von bis zu 100% einhergeht (REN *ET AL.*, 2011). Schon bei zwei bis drei Wochen alten Ferkeln ist die Mortalität durch einen TGEV-Infekt jedoch reduziert (MOON *ET AL.*, 1975; MOON *ET AL.*, 1973). Aufgrund der hohen Sterblichkeit junger Ferkel und der Wachstumseinbußen bei überlebenden Ferkeln (MARONPOT AND WHITEHAIR, 1967) entstanden allerdings bedeutende ökonomische Verluste (WEISS AND NAVAS-MARTIN, 2005).

Je nach Alter leiden Ferkel bereits 9 bis 48 h *post infectionem* (LA BONNARDIERE AND LAUDE, 1981; PENZAERT *ET AL.*, 1970a; THAKE *ET AL.*, 1973) an heftigen Enteritiden mit Anorexie, Vomieren und Diarrhö gefolgt von Dehydratation (MARONPOT AND WHITEHAIR, 1967; THAKE *ET AL.*, 1973), während adulte Tiere einen deutlich mildereren Krankheitsverlauf erfahren (WEISS AND NAVAS-MARTIN, 2005). Das Virus befällt den Dünndarm, insbesondere das

Jejunum (MARONPOT AND WHITEHAIR, 1967; PENSAERT *ET AL.*, 1970a), indem es sich im Zytoplasma ausgereifter Zottenepithelzellen vervielfältigt und diese zerstört – Enterozyten der Krypten sind hingegen nicht betroffen (PENSAERT *ET AL.*, 1970a; PENSAERT *ET AL.*, 1970b). Bereits 12 h *post infectionem* kann die virusbedingte zelluläre Degeneration und Loslösung aus dem epithelialen Zellverband beobachtet werden (PENSAERT *ET AL.*, 1970a). Die Folgen sind eine Zottenatrophie mit teilweise fusionierten, abgestumpften oder gar fehlenden Zotten, je nach Schwere der Infektion (MARONPOT AND WHITEHAIR, 1967), und ein reduzierter Gehalt an Verdauungsenzymen (MOON *ET AL.*, 1973). Durch Verkleinerung der absorptiven Fläche werden die Vorgänge der Verdauung und Absorption aus dem Gleichgewicht gebracht und es resultiert schließlich eine malabsorptive Diarrhö (MOON *ET AL.*, 1973). Um den Verlust an Enterozyten der Zotten zu kompensieren, werden die Krypten hyperplastisch, um im Anschluss das Zottenepithel durch Migration zunächst kubischer, noch nicht ausgereifter Enterozyten zu ersetzen (PENSAERT *ET AL.*, 1970b; THAKE *ET AL.*, 1973). Im Stadium der Restauration des Zottenepithels leidet das Ferkel weiterhin an Diarrhö, da funktionelle Komponenten des Absorptionsapparates, wie beispielsweise der SGLT1, noch nicht ausgereift sind (SHEPHERD *ET AL.*, 1979; THAKE, 1968). Das „neue“ Zottenepithel kann, ebenso wie das Kryptenepithel, nicht durch das TGEV infiziert werden (PENSAERT *ET AL.*, 1970a), wodurch es zu einer Selbstlimitierung der Infektion kommt. Nach ungefähr drei Tagen ist die Zottenarchitektur und -funktion jedoch wieder hergestellt (PENSAERT *ET AL.*, 1970b) und das Ferkel hat die TGEV-Infektion überstanden.

1.3 Zink – ein bedeutendes Spurenelement

Zink ist ein essentielles Spurenelement und wesentlicher Faktor einer Vielzahl biochemischer Prozesse – sowohl in der Pflanze als auch im Tier (NIELSEN, 2012). Drei bis zehn Prozent der Gene des humanen Genoms kodieren für Proteine mit Zinkbindedomäne (COUSINS *ET AL.*, 2006), welche mit Zink als integralem Bestandteil und/oder Cofaktor sowohl katalytische, regulative als auch strukturelle Funktionen erfüllen. So wird beispielsweise die Strukturgebung von Zinkfingerproteinen durch Bindung von zweiwertig kationischen Zinkionen an Cystein- und Histidinreste gewährleistet, denn die Eigenschaft einer Lewisäure macht Zink zu einem starken Bindungspartner von Thiol- und Imidazolgruppen (WEITZEL, 1956). Aus diesem Grund liegt Zink sowohl intra- als auch extrazellulär häufig proteingebunden vor (KREBS, 2000).

1.3.1 Zinkhomöostase

Zu den Geweben und Organen mit besonders hoher Zinkkonzentration gehören Knochen, Leber, Niere und Pankreas, neben denen dem Dünndarm mit der Zinkeinspeisung in den Organismus eine besondere Aufgabe zukommt. Für den Erhalt der zellulären Zinkhomöostase ist ein komplexes Zusammenspiel von Zinktransportern und einem intrazellulären Puffermolekül verantwortlich. Die Zusammenstellung dieses Systems ist gewebe-spezifisch und ihre Komponenten sind durch physiologische Stimuli empfindlich geregelt und aufeinander abgestimmt (COUSINS *ET AL.*, 2006). Metallothionein, ein Protein mit 20 Cysteinresten und einer Bindungskapazität für neun Zinkionen, wird sowohl zugesprochen, am intrazellulären Zinktransport beteiligt zu sein, als auch detoxifizierende Funktion auszuüben (COUSINS *ET AL.*, 2006). Dabei steht seine regulatorische Funktion in enger Beziehung mit Zinktransportern der ZnT (engl. *zinc transporter*)-Familie, welche Zink aus dem Zytoplasma exportieren, und Transportern der Zip (engl. *Zrt- and Irt-like protein*)-Familie, welche Zink in das Zytoplasma importieren (LICHTEN AND COUSINS, 2009). Die Expression der jeweiligen Transporter kann auf die vorherrschenden extrazellulären Zinkkonzentrationen eingestellt werden. Zip4, der den Zinktransport *via* erleichterter Diffusion vermittelt (HILL AND LINK, 2009), wird beispielsweise im Darm bei marginaler luminaler Zinkkonzentration heraufreguliert (LIUZZI *ET AL.*, 2004), vermutlich um eine ausreichende Zinkversorgung der Enterozyten zu gewährleisten. Bei erhöhter Zinkkonzentration wird Zip4 dagegen herunterreguliert (FUJIMURA *ET AL.*, 2012), wahrscheinlich um die Zelle vor unphysiologisch hohen Zinkkonzentrationen zu bewahren. Eine Mutation des Zip4-Gens konnte beim Menschen als Ursache des erblich bedingten Zinkmangels Acrodermatitis enteropathica identifiziert werden (WANG *ET AL.*, 2002).

1.3.2 Therapeutische Anwendung

Aufgrund seiner Involvierung in zahlreiche körperliche Prozesse hat Zink ein breites therapeutisches Wirkungsspektrum. Einer mit Zink behandelbaren körperlichen Beeinträchtigung liegt jedoch häufig ein entsprechender Mangelzustand zugrunde. So können durch Zinkmangel die Haut, das Gastrointestinal-, Immun- und Zentralnervensystem, die Atemwege sowie das Skelett- und Fortpflanzungssystem geschädigt sein (TUERK AND FAZEL, 2009).

In Entwicklungsländern führt hauptsächlich eine auf Pflanzen basierte Ernährung zu Zinkmangelerscheinungen (GIBSON, 1994), welche die Immunfunktion abschwächt und Betroffene anfälliger für Infektionen macht (KEEN AND GERSHWIN, 1990). Durch Kontakt mit Enteropathogenen entstehen häufig gastrointestinale Erkrankungen, die in sekretorischen Diarrhöen resultieren, welche den Zinkmangel durch Malabsorption und einem enormen

Verlust an Elektrolyten noch verstärken und auf diese Weise einen Teufelskreis initiieren (WAPNIR, 2000). Besonders anfällig für dieses Krankheitsbild sind Kleinkinder. So starben im Jahr 1979 in den Entwicklungsländern 4,5 Millionen Kinder unter fünf Jahren an Diarrhöen. Durch Einführung einer oralen Rehydratationstherapie konnte die Sterblichkeit jedoch bis zum Jahr 2002 um 75% gesenkt werden (WHO AND UNICEF, 2004). Im letzten Jahrzehnt wurde die antidiarrhöische Therapie stets weiterentwickelt und verschiedene Studien kamen zu dem Ergebnis, dass sowohl die Zugabe von Zink zur Rehydratationslösung (BAHL *ET AL.*, 2002; BHATNAGAR *ET AL.*, 2004) als auch eine alleinige Zinksupplementierung (BHUTTA *ET AL.*, 1999; LUKACIK *ET AL.*, 2008) sehr effiziente Strategien darstellen, den Krankheitsverlauf um bis zu 15% zu verkürzen und/oder abzuschwächen, wobei der Wirkmechanismus noch der Aufklärung bedarf.

Nach dem Absetzen von Ferkeln sinkt die Plasmakonzentration von Zink auf ein Level ab (CARLSON *ET AL.*, 1999; DAVIN *ET AL.*, 2013), welches mit dem von Kindern mit Zinkmangel vergleichbar ist (CHAUDHARY *ET AL.*, 1996; STRAND *ET AL.*, 2004). Eine Zinksupplementierung der Ferkel, weit über die empfohlene tägliche Zinkdosis von 100 mg/kg Futter (GFE, 2006) hinaus (>2000 mg Zink pro kg Futter), kann das Plasmalevel von Zink allerdings wieder auf das eines Saugferkels anheben (CARLSON *ET AL.*, 1999; DAVIN *ET AL.*, 2013). Darüber hinaus ist die Diarrhöinzidenz der Ferkel im kritischen Zeitraum nach dem Absetzen deutlich geringer als bei ihren unbehandelten Artgenossen (FENG *ET AL.*, 2006; HU *ET AL.*, 2013a; HU *ET AL.*, 2012; HU *ET AL.*, 2013b; KIM *ET AL.*, 2010; OU *ET AL.*, 2007; ZHANG AND GUO, 2009).

1.4 Intestinale Zellkulturmodelle

Die Verwendung intestinaler Epithelzelllinien aus Tumoren ist weit verbreitet. Darunter sind Zellmodelle tierischen Ursprungs, wie z. B. CMT-93 des murinen Rectumkarzinoms, sowie häufig verwendete humane Colonzelllinien, beispielsweise HT-29, T84 und Caco-2. Letztere entwickelt unter bestimmten Bedingungen sogar Eigenschaften des Dünndarmepithels. Die Eignung solcher Epithelmodelle muss jedoch aufgrund ihrer pathologischen Abstammung fallspezifisch diskutiert werden.

Eine Alternative zu Karzinomzelllinien stellen Zellkulturen gesunder Gewebe dar. Obwohl die Verwendung von Primärkulturen prinzipiell durch die Anzahl begrenzter Zellteilungen und somit schlechter Reproduzierbarkeit limitiert ist, können Primärkulturen ein Vorläufermodell für kontinuierliche Zellkulturen darstellen. Diese werden häufig durch virale Infektion erzeugt, wonach immortalisierungsbedingte Veränderungen der Zellphysiologie nicht ausgeschlossen werden können. Folglich repräsentieren nicht transformierte aber dennoch kontinuierliche Zelllinien die *in vivo*-Situation im Vergleich am besten.

Kontinuierliche und nicht transformierte Zelllinien nur einiger weniger Spezies und intestinaler Abschnitte sind bislang verfügbar, z. B. IEC-6 (engl. *intestinal epithelial cells from rat small intestine*) aus dem Rattendünndarm (QUARONI *ET AL.*, 1979), IEC-18 (engl. *intestinal epithelial cells from rat ileum*) aus dem Rattenileum (MA *ET AL.*, 1992), IPEC-1 (engl. *intestinal porcine epithelial cells from small intestine*) aus dem Schweinejejunum und -ileum (BERSCHNEIDER, 1989), IPEC-J2 (engl. *intestinal porcine epithelial cells from jejunum*) aus dem Schweinejejunum (BERSCHNEIDER, 1989) sowie PSI (engl. *porcine small intestinal cells*) aus dem Schweinedünndarm (NISSEN *ET AL.*, 2009).

Bezüglich der intestinalen Barriereforschung am Schwein stellen porzine Zellmodelle naheliegender Weise die repräsentativsten dar – nicht zuletzt dadurch, weil sich die Physiologie des Gastrointestinaltrakts von Nagern und Schweinen unterscheidet. Einen positiven Nebeneffekt der Verwendung porziner intestinaler Zellmodelle stellt zudem die physiologische Verwandtschaft des porzinen Darms zum humanen Pendant dar (GUILLOTEAU *ET AL.*, 2010), da auf diese Weise auch Fragestellungen humanen Hintergrunds bearbeitet werden können.

1.4.1 IPEC-J2: Eigenschaften und Anwendungen

Bevor ein *in vitro*-Modell als Ersatz für mechanistische *in vivo*-Studien verwendet werden kann, sollte es umfassend funktionell, morphologisch sowie auf molekularer Ebene charakterisiert werden. Bis dato geschah dies am ausführlichsten an IPEC-J2 (BERSCHNEIDER, 1989; GEENS AND NIEWOLD, 2010, 2011; MARIANI *ET AL.*, 2009; NOSSOL *ET AL.*, 2011; SCHIERACK *ET AL.*, 2006).

Die im Jahr 1989 von Helen M. Berschneider erzeugte jejunal-porzine Epithelzelllinie wurde von ihr im Anschluss charakterisiert und die auf Filtermembranen kultivierten Zellen als geeignetes Modell für die Analyse der epithelialen Differenzierung sowie des Ionentransports bewertet (BERSCHNEIDER, 1989). Dies basierte auf der Bildung konfluenter Monolayer, bestehend aus Jejunozysten mit kubischer bis säulenartiger Form, dem Vorhandensein des Enzyms Laktase, welches die epitheliale Abstammung bestätigte sowie von Zell-Zell-Kontakten in Form von Tight Junctions und Desmosomen. Des Weiteren wurden eine Natriumabsorption und induzierbare Chloridsekretion sowie ein transepithelialer Widerstand (TER, engl. *transepithelial resistance*) von $549 \pm 39 \Omega \cdot \text{cm}^2$ beschrieben. In den darauffolgenden 17 Jahren wurde an IPEC-J2 nur wenig geforscht. Dennoch schien sich in diesem Zeitintervall die Elektrophysiologie der Zellen verändert zu haben, denn als SCHIERACK *ET AL.* im Jahr 2006 die Zelllinie hinsichtlich bakterieller Pathogenese charakterisierten, beschrieben sie einen deutlich erhöhten TER (1,2 bis $6,5 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$, abhängig vom Material der Filtermembran).

Auf der ursprünglichen Kultivierungsbedingung basierend (DMEM/F-12/HAM + 5% FBS (engl. *fetal bovine serum*) + EGF (engl. *epidermal growth factor*) + ITS (Insulin/Transferrin/Selenium)) (BERSCHNEIDER, 1989) wurde Medium (DMEM, DMEM/F-12/HAM) (CHAPMAN *ET AL.*, 2012; SCHIERACK *ET AL.*, 2006) in voneinander unabhängigen Studien mit Serum (5-20% FBS) (BOTIC *ET AL.*, 2007; CHAPMAN *ET AL.*, 2012; SCHIERACK *ET AL.*, 2006), ± Antibiotika (Penicillin/Streptomycin, Kanamycin) (GOOSSENS *ET AL.*, 2012; KOH *ET AL.*, 2008; NOSSOL *ET AL.*, 2011), ± einer Puffersubstanz (HEPES) (JOHNSON *ET AL.*, 2010; NOSSOL *ET AL.*, 2011), ± einem Differenzierungsreagenz (Dexamethason) (KOH *ET AL.*, 2008; SCHIERACK *ET AL.*, 2006), ± einem Wachstumsförderer (EGF) (BROWN AND PRICE, 2007; SCHIERACK *ET AL.*, 2006) und ± Zusatzstoffen (ITS, Glutamin) (CHAPMAN *ET AL.*, 2012; LODEMANN *ET AL.*, 2013; SKJOLAAS *ET AL.*, 2007) angereichert. Damit wurden Zellen verschiedener Passagen (38-98) (CHAPMAN *ET AL.*, 2012; DIESING *ET AL.*, 2011b; SCHMIDT *ET AL.*, 2008) versorgt, die mit verschiedener Saatkichte (4×10^4 bis 1×10^6 Zellen/cm²) (BROWN AND PRICE, 2007; DIESING *ET AL.*, 2011a) auf mit Kollagen beschichteten (SCHIERACK *ET AL.*, 2006) oder unbeschichteten (NOSSOL *ET AL.*, 2011) unterschiedlichen Filtermembranmaterialien (alumina matrix, PC, PET, PTFE) (GEENS AND NIEWOLD, 2011; SCHIERACK *ET AL.*, 2006) verschiedener Membranfläche (0,33, 1,12, 4,2, 4,67 cm²) (BROWN AND PRICE, 2007; DIESING *ET AL.*, 2011a; GEENS AND NIEWOLD, 2011; NOSSOL *ET AL.*, 2011) und diverser Porengröße (0,2, 0,4, 1,0, 3,0 µm) (GEENS AND NIEWOLD, 2011; KOH *ET AL.*, 2008; NOSSOL *ET AL.*, 2011; SCHIERACK *ET AL.*, 2006) ausgesät und bis zu 40 Tage (GEENS AND NIEWOLD, 2011) bei 37 oder 39 °C (NOSSOL *ET AL.*, 2011; SCHIERACK *ET AL.*, 2006) kultiviert wurden. Keine der zahlreichen Kultivierungsbedingungen stellte den Originalzustand hinsichtlich TER wieder her. Dennoch wurde eine Vielzahl weiterer Studien an IPEC-J2 durchgeführt, welche hauptsächlich die bakterielle Adhäsion bzw. Invasion thematisierten (z. B. RASSCHAERT *ET AL.* (2010), ZHOU *ET AL.* (2013)). Dies ist vorrangig damit zu begründen, dass relevante Parameter für dieses Forschungsfeld nicht beeinträchtigt schienen. So exprimieren IPEC-J2 beispielsweise Toll-like-Rezeptoren (z. B. BURKEY *ET AL.* (2009), HERMES *ET AL.* (2011)) zur Erkennung bakterieller Erreger, β-Defensine (z. B. MAO *ET AL.* (2013), VELDHUIZEN *ET AL.* (2009)) zur Abwehr dieser und Zytokine (z. B. HERMES *ET AL.* (2011), MARIANI *ET AL.* (2009)) für die Immunmodulation.

In der Zwischenzeit hat sich das Forschungsfeld um IPEC-J2 zu größerer Vielfalt entwickelt und umfasst nun auch Toxizitätsstudien (z. B. BONDZIO *ET AL.* (2013a), DEVREESE *ET AL.* (2013)), ernährungsphysiologische Anwendungen (z. B. MÜLLER AND PFAFFL (2012), SEWEKOW *ET AL.* (2012)) und Studien mit viraler Fragestellung (z. B. LAN *ET AL.* (2013), LIU *ET AL.* (2010)).

1.4.2 IPEC-J2: Eignung als Barrieremodell

Für molekulare Studien mechanistischen Hintergrunds zwischen beispielsweise Keimexposition und diarrhöischem Effekt beim Schwein ist ein porzines Epithelmodell höchst erstrebenswert. Jedoch ist ein solches System nur dann valid, wenn es so nah wie möglich mit Eigenschaften des porzinen Gegenparts übereinstimmt. Für Untersuchungen der jejunalen Barrierefunktion sollten Zellmodelle deshalb Folgendes aufweisen: eine säulenartige Zellmorphologie, einen adäquaten TER, eine angemessene Transportfunktion, eine induzierbare Elektrolytsekretion sowie eine Expression jejunumtypischer TJ-Proteine. Werden diese Voraussetzungen erfüllt, ist das System potentiell als jejunales Epithelzellmodell geeignet.

Wie über die Jahre für IPEC-J2 kontinuierlich gezeigt wurde, sind TJ-Proteine anhaltend nachweisbar (BERSCHNEIDER, 1989; DIESING *ET AL.*, 2011a; SCHIERACK *ET AL.*, 2006). Dagegen weicht die Zellmorphologie durch geringe Höhe und enorme Breite (GEENS AND NIEWOLD, 2011; NOSSOL *ET AL.*, 2011; SCHIERACK *ET AL.*, 2006) von der ursprünglichen Beschreibung (BERSCHNEIDER, 1989) ab. Zudem wurden die von Berschneider beobachteten Transport- und Sekretionseigenschaften (BERSCHNEIDER, 1989) nicht mehr beschrieben.

Verglichen mit herkömmlich verwendeten intestinalen Epithelzelllinien (CMT-93, TER: $400 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (FLYNN AND BURET, 2008); HT-29/B6, TER: $500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (KRUG *ET AL.*, 2009b)) und porzinem Colonepithel (R^{epi} : $55 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (RICHTER *ET AL.*, 2013)), ist sofort ersichtlich, dass IPEC-J2 – ebenso wie IPEC-1 und PSI – zum Zeitpunkt, an dem sie in der jeweiligen Studie als differenziert eingestuft wurden, außergewöhnlich hohe TER-Werte ausbilden (1 bis 15 $\text{k}\Omega \cdot \text{cm}^2$, z. B. CHAPMAN *ET AL.* (2012), GOOSSENS *ET AL.* (2012), LOISEAU *ET AL.* (2007), NISSEN *ET AL.* (2009)). Der TER spiegelt die aus der Gesamtheit der TJ-Proteine eines Epithels resultierenden abdichtenden und ionenporenbildenden Eigenschaften sowie transzellulären Transportprozesse wider (GÜNZEL *ET AL.*, 2012) und kann als Maß der Ionenbewegung über das Epithel gemessen werden. Je nach para- und transzellulären Charakteristika resultieren daraus dichte, wenig permeable Epithelien, bei denen das Verhältnis aus parazellulärem (R^{para} , engl. *paracellular resistance*) und transzellulärem Widerstand (R^{trans} , engl. *transcellular resistance*) als $R^{\text{para}}/R^{\text{trans}} > 1$ definiert ist, oder lecke Epithelien mit hoher Ionenpermeabilität wie das des Jejunums, für die $R^{\text{para}}/R^{\text{trans}} < 1$ gilt (SCHULTZ, 1972). Initial schien es schwer vorstellbar, dass die parazelluläre Leitfähigkeit ($1/R^{\text{para}}$) die transzelluläre Leitfähigkeit ($1/R^{\text{trans}}$) übersteigen könnte, um nach $R^{\text{para}} \cdot R^{\text{trans}} / R^{\text{para}} + R^{\text{trans}}$ einen TER im $\text{k}\Omega$ -Bereich zu generieren.

In Hinsicht auf die Zellmorphologie und Elektrophysiologie ist es deshalb fraglich, ob IPEC-J2 als geeignetes Modell fungieren können, welches Eigenschaften des porzinen Dünndarmepithels reflektiert.

2 ZIELSETZUNG

Ferkel erkranken nach der Ablaktation häufig an Diarrhöen, die in vielen Fällen letal sind. Die Gründe sind eine erhöhte Infektanfälligkeit des intestinalen Epithels und eine daraus resultierende Störung der Barrierefunktion. Mit Zinksupplementierung des Futters kann diese Symptomatik eingedämmt werden, wobei der Mechanismus der therapeutischen Wirksamkeit von Zink derzeit noch unverstanden ist. Hauptziel der vorliegenden Arbeit war daher, die Effekte von Zink auf die intestinale Barriere *in vitro* und *in vivo* zu charakterisieren.

Das einzig verfügbare Epithelzellmodell porzin-jejunalen Herkunft – IPEC-J2 – weist unter den bisher publizierten Kulturbedingungen elektrophysiologische und morphologische Eigenschaften auf, die denen des Schweinejejunums in keiner Weise entsprechen. Daher sollten im ersten Teil der vorliegenden Arbeit die Zellkulturbedingungen für IPEC-J2 so optimiert werden, dass diese Zelllinie als valides Barriremodell des jejunalen Epithels etabliert und genutzt werden kann. Neben einer Charakterisierung morphologischer und elektrophysiologischer Zellaspekte setzte dies eine vergleichende Analyse der Expression und Lokalisation barriererelevanter Proteine des porzinen Jejunums *in vivo* und unterschiedlich kultivierter IPEC-J2-Layer *in vitro* voraus.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung dreier verschiedener Zinkkonzentrationen im Futter gesunder und infizierter Ferkel auf deren epitheliale Barriere des Jejunums analysiert werden. Zu diesem Zweck sollten vorab gesunde Ferkel eine bzw. vier Wochen nach dem Absetzen beprobt werden, um Kurz- und Langzeiteffekte durch Zink zu erfassen und dadurch eine Bewertung der Zinksupplementierung als Prophylaxe abgeben zu können. Anschließend sollten TGEV-infizierte Ferkel eine Woche nach Ablaktation beprobt werden, um eine potentiell barrierefördernde Wirkung von Zink aufzudecken. Ziel dieser Versuche war zunächst, jejunale Mukosae in Ussing-Kammern elektrophysiologisch bezüglich ihres epithelialen Widerstands, ihres stimulierbaren elektrogenen Transports sowie ihrer Permeabilitätseigenschaften für Moleküle unterschiedlicher Größe zu untersuchen. Die in diesem Screening identifizierten fütterungsbedingt veränderten Parameter sollten anschließend eingehend analysiert werden. Dafür war geplant, das jejunale Gewebe morphometrisch zu vermessen, eine veränderte Expression von TJ-Proteinen zu quantifizieren sowie die zelluläre Lokalisation der infrage kommenden Proteine zu analysieren. Mithilfe komplementärer *in vitro*-Untersuchungen zur Auswirkung einer Zinkapplikation auf IPEC-J2-Layer sollte eine eingehende Analyse der Zinkeffekte auf die epitheliale Barrierefunktion erfolgen.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Geräte, Materialien und Reagenzien

3.1.1 Geräte

Brutschrank, begast, B 5060 EC-02	Heraeus, Hanau
Drainagesauger Medap P 4010	Maquet, Rastatt
Electrochemical Interface 1286	Solartron, Schlumberger, Farnborough, Großbritannien
Elektrophoresesystem Mini-Protean® 3	Bio-Rad, München
Elektrophoretische Transferzelle Mini Trans-Blot®	Bio-Rad, München
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Flachbettelektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Frequency generator/response analyzer 1250	Solartron, Schlumberger, Farnborough, Großbritannien
Gefrierbruchgerät Denton Vacuum DV-502	Denton Vacuum, Moorestown, USA
Gewebehomogenisator (Potter), 3 ml, manuell	Wheaton, USA
Hamilton-Spritze	Hamilton, Reno, Nevada, USA
Heizblöcke	
Accu Block™	Labnet, Edison, New Jersey, USA
Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Lumineszenzbildanalytoren	
LAS-1000	FujiFilm, Düsseldorf
Fusion FX 7	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Magnetrührer/Heizplatte IKA®-Combimag Reo	IKA, München
Magnetrührfische	Merck, Darmstadt
Messelektroden STX2, manuell	World Precision Instruments, Berlin
Messelektroden STX2, manuell, automatisiert	Inst. f. Klinische Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, CBF
Mikroskope	
Konf. Laser Scanning-Mikroskop LSM 510 META	Zeiss, Jena
Fluoreszenzmikroskop BX 60	Olympus, Hamburg
Lichtmikroskop IMT-2	Olympus, Hamburg
Elektronenmikroskop Zeiss 902 A	Zeiss, Jena
Mikrotiterplattenlesegeräte	
Spectra Classic	Tecan, Crailsheim

Infinite M200	Tecan, Crailsheim
iMark™	Bio-Rad, München
Mikrotome	
Cryomikrotom CM 1900	Leica, Wetzlar
Schlittenmikrotom	Reichert-Jung, Heidelberg
Ultramikrotom UltraCut S	Leica, Wetzlar
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Netzgerät Power Pac 200/300	Bio-Rad, München
Ohmmeter	Inst. f. Klinische Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, CBF
pH-Meter HI 9017 microprocessor	Hanna Instruments, Kehl
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Integra, Fernwald
Schüttler	
IKA®-Schüttler MTS 4	IKA, München
WT 12/17	Biometra, Göttingen
Spektrophotometer NanoDrop 2000	Thermo Scientific, Schwerte
Stanze (für Filtermembranen)	Inst. f. Klinische Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, CBF
Sterilwerkbank BSB 4	Gelaire, Sydney, Australien
Thermocycler 2720	Applied Biosystems, Darmstadt
Ultraschallstab UP50H	Hielscher, Teltow
Ussing-Kammern (Zellkultur, Gewebe)	Inst. f. Klinische Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, CBF
Videokamera (Elektronenmikroskop) iTEM Veleta	Olympus, Hamburg
Voltage-Clamp-Apparaturen CVC6/8	Fiebig, Berlin
Vortex-Geräte	Pharmacia Biotech, Freiburg
Waage 1204 MP	Sartorius, Göttingen
Wasserbäder	
Zellkultur	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Ussingstände	Haake, Berlin
Zentrifugen	
Z 200 A	Hermle, Wehingen
Z 233 MK-2	Hermle, Wehingen
Mini-Zentrifuge Sprout™	Heathrow Scientific, Illinois, USA

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Cryoröhrchen (1,6 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Dialysekammern Slide-A-Lyzer® (0,5 - 3 ml)	Thermo Scientific, Schwerte
Filterpapier (3 MM)	Whatman, Maidstone, Großbritannien
Kanülen (26G 3/8", 25G x1", 20G 1½")	Becton Dickinson, Frankreich
Kupfernetzgrids	Ted Pella, Redding, Kalifornien, USA
Mikrotiterplatten	
transparent, Rundboden	Roth, Karlsruhe
schwarz, Flachboden, halbe Fläche	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Objekträger	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
Objekträger Super Frost® Plus	R. Langenbrinck, Emmendingen
Parafilm	Pechiney, Menasha, Wisconsin, USA
Petrischalen	
ø 6 cm	Roth, Karlsruhe
ø 15 cm	TPP, Klettgau
Pipettenspitzen (± gestopft, 0,5 - 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Plexiglas™-Ringe	Charité - Universitätsmedizin Berlin
PVDF-Membran	Perkin Elmer, Rodgau
Reaktionsgefäße	
0,2, 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
1,5, 4,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
15, 50 ml	Becton Dickinson, Frankreich
Skalpelle	Feather, Osaka, Japan
Spritzen	
5, 20 ml	B. Braun, Melsungen
50 ml	Becton Dickinson, Frankreich
Stabpipetten (1, 5, 10, 25 ml)	Becton Dickinson, Frankreich
Sterilfilter (0,2 µm)	Whatman, Maidstone, Großbritannien
Wellplatten (6, 12, 24)	Nunc, Karlsruhe
Zellkulturfiltermembranen	
Millicell®-HA (0,45 µm; 0,6 cm ²)	Merck Millipore, Darmstadt
Millicell®-PCF (0,4, 3,0 µm; 0,6 cm ²)	Merck Millipore, Darmstadt
Millicell®-PET (0,4, 1,0 µm; 4,25 cm ²)	Merck Millipore, Darmstadt
Transwell® PC (0,4 µm; 1,12 cm ²)	Corning, Amsterdam, Niederlande
Transwell® PTFE (0,4, 3,0 µm; 1,12 cm ² , coated)	Corning, Amsterdam, Niederlande

Zellkulturflaschen (25, 75 cm²)

Becton Dickinson, Frankreich

3.1.3 Laborchemikalien und Agenzien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar 100	Agar Scientific, Essex, Großbritan.
Agarose	Serva, Heidelberg
Alcianblau 8 GS	Roth, Karlsruhe
Amylacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Benzyldimethylamin	Agar Scientific, Essex, Großbritan.
Bleicitrat	Laurylab, Saint-Fons Cedex, Frankr.
Bromphenolblau	Amersham, München
BSA (bovines Serumalbumin)	Roth, Karlsruhe
Cacodylsäure Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Carbogen	Linde, Berlin
Chloroform	Merck, Darmstadt
Corbit-Balsam	I. Hecht
D(+)-Mannose	Fluka, Seelze
Dako-Stift	Dako, Glostrup, Dänemark
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol)	Roche, Grenzach-Wyhlen
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMEM/F-12/HAM	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
dNTP-Mix	Bioline, Luckenwalde
Dodecenylnhydrid	Agar Scientific, Essex, Großbritan.
DTT (Dithiotreitol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
EGF (epidermaler Wachstumsfaktor)	Sigma-Aldrich, Steinheim
EGTA (Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eosin	Merck, Darmstadt
Eselserum	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Th. Geyer, Renningen
Ethidiumbromid	Invitrogen, Karlsruhe

Formalin (Roti [®] -Histofix 4%)	Roth, Karlsruhe
Freon 22	TEGA, Würzburg
Glutaraldehyd	Serva, Heidelberg
Glycerol	Serva, Heidelberg
Glycin	Serva, Heidelberg
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan- sulfonsäure	Fluka, Seelze
Histokleber Histoacryl [®]	B. Braun, Melsungen
Insulin/Transferrin/Selenium (100x; ITS)	Gibco, Invitrogen, Kalifornien, USA
Isopropanol	T. J. Baker, Deventer, Niederlande
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kollagen (vom Rattenschwanz)	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Glutamin	Fluka, Seelze
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Mannitol	Merck, Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Methyl nadic anhydride</i>	Agar Scientific, Essex, Großbritan.
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdisulfit	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumhypochlorit	Roth, Karlsruhe
Osmiumtetroxid	ChemPur, Karlsruhe
PageRuler [™] Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Schwerte
PBS ^{+/-Ca/Mg}	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA, Cölbe
peqGOLD RNAPure [™]	peqLab, Erlangen
Perjodsäure (1%)	Roth, Karlsruhe
Pertex	Medite, Burgdorf
PFA (Paraformaldehyd)	Merck, Darmstadt
PFA-Lösung (Paraformaldehyd, 16%)	Science Services, München
Phalloidin-Atto 647N	Sigma-Aldrich, Steinheim

Piperacillin	LKT Laboratories, Minnesota, USA
Propylenoxid	VWR, Darmstadt
ProTaq Mount Fluor	Biocyc, Luckenwalde
Proteaseinhibitor Complete, Mini, EDTA-free	Roche, Grenzach-Wyhlen
Rinderserum (adult; ABS)	PAA, Cölbe
Rinderserum (fötal; FBS)	PAA, Cölbe
RPMI 1640	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Schweineserum (adult, klar, hitzeinaktiviert; PS ^{HI})	Biochrom, Berlin
Schweineserum (adult, trüb; PS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Fluka, Seelze
Stickstoff (flüssig)	Linde, Berlin
Sukrose	Serva, Heidelberg
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Roth, Karlsruhe
TissueTek	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
TriDye 100 bp DNA Ladder	NEB, Frankfurt am Main
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Merck, Darmstadt
TRIS-Lösung, pH x	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Uranylacetat	Serva, Heidelberg
Wasser (steril, RNase-frei)	Biochrom, Berlin
Xylol	Roth, Karlsruhe
Ziegenserum (adult; GS)	PAA, Cölbe
ZIENAM [®]	MSD, Haar
β-Hydroxybutyrat	Sigma-Aldrich, Steinheim

3.1.4 Lösungen und Puffer

Alcianblaulösung	0,1 %	Alcianblau
	<i>ad</i>	3% Essigsäure
Blockierlösung (Western Blot)	5 %	BSA
	0,04 %	Natriumazid
	<i>ad</i>	TBST

Blockierlösung (Immunfluoreszenz)	5 %	Ziegenserum / Eselserum
	1 %	BSA
	<i>ad</i>	PBS ^{+Ca/Mg}
Cacodylatpuffer	0,2 M	Cacodylsäure Natriumsalz pH 7,4 (HCl)
Citratpuffer	10 mM	Natriumcitrat pH 6,0 (NaOH)
DNA-Probenpuffer (6×)	40 %	Sukrose
	5 mM	EDTA pH 8,0
EDTA-Puffer	1 mM	EDTA pH 8,0 (NaOH)
EPHO-Puffer	10 %	West-Puffer (10×)
	0,1 %	SDS
Glutaraldehydpuffer I	60 mM	Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O
	10 mM	KH ₂ PO ₄
	2,5 %	Glutaraldehyd
Glutaraldehydpuffer II	60 mM	Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O
	10 mM	KH ₂ PO ₄
	0,25 %	Glutaraldehyd
HEPES-Ringerlösung	134,6 mM	NaCl
	5,4 mM	KCl
	21 mM	NaHCO ₃
	2,4 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,2 mM	CaCl ₂
	1,2 mM	MgCl ₂
	0,6 mM	NaH ₂ PO ₄
	10,6 mM	HEPES
		mit Carbogen begast, pH 7,4

MATERIAL UND METHODEN

Karnovsky-Fixationsgemisch	30 g	PFA, in 400 ml <i>Aqua dest</i> lösen (60 °C, 1 N NaOH)
	300 ml	Glutaraldehyd (25%)
	300 ml	Cacodylatpuffer
	500 mg	Calciumchlorid
Kochsalzlösung	154 mM	NaCl
	1 mM	CaCl ₂
		mit Carbogen begast
Laemmli-Probenpuffer (5×)	125 mM	TRIS-Puffer pH 6,8
	500 mM	DTT
	50 %	Glycerol
	10 %	SDS
	0,001 %	Bromphenolblau
Mannitol-Ringerlösung	238 mM	Mannitol
	5,4 mM	KCl
	21 mM	NaHCO ₃
	1,2 mM	CaCl ₂
	1 mM	MgSO ₄
	3 mM	HEPES
	10 mM	D(+)-Glukose
		pH 7,8
Natrium-Ringerlösung	119,0 mM	NaCl
	5,4 mM	KCl
	21 mM	NaHCO ₃
	1,2 mM	CaCl ₂
	1 mM	MgSO ₄
	3 mM	HEPES
	10 mM	D(+)-Glukose
		pH 7,8
Osmiumtetroxidlösung	1 %	Osmiumtetroxid
	<i>ad</i>	Cacodylatpuffer

Ringerlösung	113,6 mM NaCl
	5,4 mM KCl
	21 mM NaHCO ₃
	2,4 mM Na ₂ HPO ₄
	1,2 mM CaCl ₂
	1,2 mM MgCl ₂
	0,6 mM NaH ₂ PO ₄
ohne D(+)-Glukose	10 mM D(+)-Glukose
	mit Carbogen begast, pH 7,4
mit Zinkacetat	500 mM Zinkacetat-Dihydrat
mit Natriumacetat	1000 mM Natriumacetat-Trihydrat
mit Substraten und Antibiotika	2,5 mM L-Glutamin
	0,5 mM β-Hydroxybutyrat
	10 mM D(+)-Mannose
	50 mg/l Piperacillin
	4 mg/l Zienam [®]
RIPA-Puffer	25 mM HEPES pH 7,6
	2 mM EDTA
	25 mM NaF
	1 % SDS
pro 10 ml	1 Tabl. Proteaseinhibitor
Sammelgel	5,1 % Acrylamid
	125 mM TRIS-Puffer pH 6,8
	0,1 % SDS
	0,1 % APS
	0,1 % TEMED
Sulfitwasser	45 mM HCl
	41 mM Natriumdisulfit
TAE-Puffer	40 mM TRIS
	20 mM Essigsäure
	1 mM EDTA
	pH 8,5

TBST	20 mM	TRIS
	500 mM	NaCl
	0,1 %	Tween 20
Transferpuffer	10 %	West-Puffer (10×)
	10 %	Methanol
Trenngel	12,5 %	Acrylamid
	350 mM	TRIS-Puffer pH 8,8
	0,1 %	SDS
	0,1 %	APS
	0,1 %	TEMED
West-Puffer (10×)	1,9 M	Glycin
	0,25 M	TRIS
		pH 8,1 - 8,4

3.1.5 Effektoren und parazelluläre Marker

Amilorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bariumchlorid	Merck, Darmstadt
D(+)-Glukose	Roth, Karlsruhe
FITC-Dextran 4000	TdB, Uppsala, Schweden
Fluoreszein	Sigma-Aldrich, Steinheim
Forskolin	Calbiochem, Merck, Darmstadt
Natriumacetat-Trihydrat	Merck, Darmstadt
Phlorizin	Sigma-Aldrich, Steinheim
TEA (Tetraethylammonium)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zinkacetat-Dihydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim

3.1.6 Gebrauchsfertige Kits und Lösungen

Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche, Grenzach-Wyhlen
High Capacity cDNA Archive Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
HotStarTaq [®] DNA Polymerase und 10×Puffer	Qiagen, Hilden
LumiLight ^{Plus} Western Blotting Kit	Roche, Grenzach-Wyhlen
Membranintegritätsassay CytoTox-ONE [™]	Promega, Mannheim

NucleoSpin® Extract II Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® RNA/Protein Kit	Macherey-Nagel, Düren
Pierce® BCA Protein Assay	Thermo Scientific, Schwerte

3.1.7 Antikörper

Tab. 3.1: Verwendete Antikörper

Spez.	anti-	Target (+Label)	Verd. (IF*)	Verd. (WB*)	Firma
Primärantikörper					
<i>rabbit</i>	α-	Claudin-1/-2/-3/-7/-8/-12	1/250	1/1000	Invitrogen, San Francisco, Kalifornien, USA
<i>mouse</i>	α-	Claudin-4	1/250	1/2000	Invitrogen, San Francisco, Kalifornien, USA
<i>rabbit</i>	α-	Claudin-5	1/250	-	Invitrogen, San Francisco, Kalifornien, USA
<i>mouse</i>	α-	Claudin-5	-	1/1000	Invitrogen, San Francisco, Kalifornien, USA
<i>mouse</i>	α-	Claudin-15	1/250	-	Invitrogen, San Francisco, Kalifornien, USA
<i>rabbit</i>	α-	Claudin-15	-	1/1000	Aviva System Biology, San Diego, Kalifornien, USA
<i>rabbit</i>	α-	Occludin	1/250	1/2000	Invitrogen, San Francisco, Kalifornien, USA
<i>rabbit</i>	α-	Tricellulin-a	1/200	1/2000	Invitrogen, San Francisco, Kalifornien, USA
<i>rabbit</i>	α-	Zonula occludens 1	1/250	-	Invitrogen, San Francisco, Kalifornien, USA
<i>mouse</i>	α-	E-cadherin	1/250	1/3000	BD Transduction Laboratories™, Frankreich
<i>mouse</i>	α-	E-cadherin (AlexaFluor®647)	1/1000	-	Becton Dickinson Pharmingen™, Frankreich
<i>mouse</i>	α-	Vimentin	1/250	1/1000	Dako, Hamburg
<i>rabbit</i>	α-	Ezrin	1/250	1/2000	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA
<i>rabbit</i>	α-	SGLT1	1/250	1/1000	Alpha Diagnostic International, San Antonio, Texas, USA
<i>rabbit</i>	α-	GLUT2	-	1/2500	Abbotec, San Diego, Kalifornien, USA
<i>goat</i>	α-	GLUT2	1/250	-	abcam, Cambridge, Großbritannien
<i>mouse</i>	α-	Na/K-ATPase, α1 subunit	1/250	1/1000	abcam, Cambridge, Großbritannien
<i>goat</i>	α-	Snail	-	1/1000	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
<i>mouse</i>	α-	β-Actin	-	1/10000	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>rabbit</i>	α-	<i>cleaved</i> Caspase-3	1/250	-	Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA
Sekundärantikörper					
<i>goat</i>	α-	<i>mouse</i> (Cy2)	1/500	-	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Großbritannien
<i>goat</i>	α-	<i>rabbit</i> (AlexaFluor®594)	1/500	-	Invitrogen, San Francisco, Kalifornien, USA
<i>rabbit</i>	α-	<i>goat</i> (AlexaFluor®594)	1/500	-	Invitrogen, San Francisco, Kalifornien, USA
<i>goat</i>	α-	<i>rabbit</i> (DyLight™488), F(ab') ₂	1/500	-	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Großbritannien
<i>goat</i>	α-	<i>mouse</i> (peroxidase), F(ab') ₂	-	1/5000	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Großbritannien
<i>goat</i>	α-	<i>rabbit</i> (peroxidase), F(ab') ₂	-	1/5000	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Großbritannien
<i>rabbit</i>	α-	<i>goat</i> (peroxidase)	-	1/5000	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Großbritannien

*IF – Immunfluoreszenzfärbung, WB – Western Blotting

3.1.8 Primer

Tab. 3.2: Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Firma
Claudin-2_forward	GTTGCCATGCTGCTCCCCAGCTG	metabion, Martinsried, Deutschland
Claudin-2_reverse	TCACACATACCCCGTCAGGCTGTAG	metabion, Martinsried, Deutschland
Claudin-12_forward	ATGGGCTGTCGGGATGTCCACGCA	metabion, Martinsried, Deutschland
Claudin-12_reverse	TTAGGTGGTGTGGGAACTACTGG	metabion, Martinsried, Deutschland
Claudin-15_forward	CACGGGAACGTCATCACCACCA	metabion, Martinsried, Deutschland
Claudin-15_reverse	TCCAGGCCCCCAATGTTGGTGC	metabion, Martinsried, Deutschland

3.1.9 Software

Bildbearbeitung

Fiji (Fiji Is Just Image J)

Schindelin, MPI-CBG, Dresden

freeware, <http://fiji.sc/Fiji>

Image J

Rasband, NIH, Bethesda, Maryland, USA

freeware, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>

Densitometrische Auswertung

AIDA Version 3.21.001

Raytest, Berlin

Morphometrische Auswertung

analySIS®, Version 3.0

Soft Imaging System GmbH, Münster

Photometrische Auswertung

Easywin Fitting, Version V6.0a

Tecan, Grödig, Österreich

Programmsteuerung, Datenaufnahme

(Ussing-Kammern) Analogon

Institut für Klinische Physiologie, Charité –
Universitätsmedizin Berlin, CBF

Sequenzdarstellung

Chromas LITE, Version 2.01

Technelysium Pty Ltd, Australien

freeware, <http://technelysium.com.au/>

Statistische Auswertung

Grubbs' Test

<http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>

SPSS®, Version 20

IBM, Chicago, Illinois, USA

Neben der aufgeführten Software wurden Microsoft Office Excel 2007 für Standardanwendungen und gerätspezifische Software verwandt.

3.2 Tierversuchsablauf

3.2.1 *Enterococcus faecium*- und Apfelextraktfütterungsversuch

Die Fütterungsversuche wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) Berlin unter den Registrierungsnummern G 0347/09 (*Enterococcus faecium* NCIMB 10415) und G 0261/11 (Apfelextrakt) genehmigt und wurden am/vom Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Ab dem Alter von zwölf Tagen hatten die reinrassigen Landrasse-Ferkel Zugang zu einer Prä-Starterdiät, bis die Tiere nach 26 ± 2 Tagen von der Muttersau abgesetzt wurden und *ad libitum* Zugang zu Wasser und einer Standarddiät auf Basis von Weizen, Gerste und Soja erhielten. Nach 53 bis 56 Tagen wurden die Ferkel mit 20 mg Ketamin (Ursotamin[®], Serumwerk Bernburg AG) und 2 mg Azaperon (Stresnil[®], Jansen-Cilag, Neuss) pro kg Körpergewicht sediert und anschließend mit einer intrakardialen Kombiinjektion von 10 mg Tetracain, Mebezonium und Embutramid (T61[®], Intervet, Unterschleißheim) pro kg Körpergewicht eingeschläfert.

Für die vorliegende Arbeit wurden experimentelle Daten von insgesamt sechs Kontrolltieren des *Enterococcus faecium*-Fütterungsversuchs und zehn Kontrolltieren des Apfelextraktfütterungsversuchs verwendet, um das *ex vivo*-Pendangt zu *in vitro*-Versuchen darzustellen.

3.2.2 Zinkfütterungsversuch

Der Fütterungsversuch wurde vom LaGeSo Berlin unter der Registrierungsnummer G 0347/09 genehmigt und am/vom Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Alle reinrassigen Landrasse-Ferkel hatten ab dem zwölften Lebenstag Zugang zu einer Prä-Starterdiät, die den Anforderungen der entsprechenden Ferkelgewichtsklasse entsprach (GFE, 2006). Im Alter von 26 ± 1 Tagen wurden die Ferkel (n=96) abgesetzt und willkürlich in drei Fütterungsgruppen à 32 Tiere aufgeteilt. Dabei waren die Anzahl an Wurfgeschwistern, das Geschlecht und das Körpergewicht der Ferkel in allen Gruppen ausgeglichen. Bis zum Alter von 54 ± 1 Tagen erhielten die Ferkel *ad libitum* Wasser sowie eine auf Weizen, Gerste und Soja basierte Starterdiät, die entsprechend der Fütterungsgruppe mit näherungsweise 50, 150 oder 2500 mg ZnO (Sigma-Aldrich, Steinheim) pro kg Futter supplementiert war. Während des gesamten Versuchszeitraums wurden keine Antibiotika verabreicht. Im Alter von 33 ± 1 , 40 ± 1 , 47 ± 1 und 54 ± 1 Tagen wurden je acht Ferkel pro Fütterungsgruppe sediert und euthanasiert (siehe 3.2.1).

Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt 48 Tiere untersucht – jeweils acht Tiere pro Fütterungsgruppe der Beprobungszeitpunkte 33 ± 1 Tage (eine Woche nach Absetzen) und 54 ± 1 Tage (vier Wochen nach Absetzen).

3.2.3 Zinkfütterungsversuch mit TGEV-Challenge

Der Fütterungsversuch wurde vom LaGeSo Berlin unter der Registrierungsnummer G 0116/12 genehmigt und am/vom Leibniz-Institut für Nutztierbiologie in Dummerstorf und am Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlin von der Abteilung für Biologische Sicherheit der Fachgruppe für Molekulare Diagnostik und Genetik durchgeführt.

Deutsche Landrasse-Ferkel ($n=60$) beider Geschlechter eines TGEV-freien Schweinebestands wurden im Alter von 21 Tagen abgesetzt und beliebig in drei Fütterungsgruppen à 20 Ferkel aufgeteilt. Die Tiere erhielten *ad libitum* Wasser und Futter auf Weizen-Gerste-Soja-Basis, das entweder mit 80, 150 oder 2500 mg ZnO (Sigma-Aldrich, Steinheim) pro kg supplementiert war. Am Tag 26 wurden die Ferkel aus Dummerstorf nach Berlin gebracht und zwei Tage später oral mit 2 ml TGEV (10^7 PFU (engl. *plaque forming units*)/ml) infiziert. Jeweils zehn Tiere pro Fütterungsgruppe wurden einen Tag bzw. 18 Tage *post infectionem* sediert und im Anschluss euthanasiert (siehe 3.2.1).

Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt 30 Tiere untersucht – jeweils zehn Tiere pro Fütterungsgruppe einen Tag *post infectionem* (eine Woche nach Absetzen). In Anbetracht der hohen Infektiosität für Schweinebestände wurden entsprechende Sicherheitsmaßnahmen getroffen, das Virus in der Umwelt nicht freizusetzen – sowohl bei der Präparation vor Ort, beim Transport als auch im Labor.

3.2.4 Gewebepreparation

Nach Euthanasie und Abdominalinzision entlang der Mittellinie wurde der Intestinaltrakt entnommen. 20 cm des mittleren Jejunums wurden präpariert, mit auf ~ 4 °C gekühlter Kochsalzlösung gespült, entlang des Mesenteriums geöffnet und in gekühlter Kochsalzlösung ins Institut für Klinische Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, CBF transportiert. Im Labor wurden durch partielles Strippen die Serosa und *Lamina muscularis externa* entfernt.

Elektrophysiologie

Für Messungen in der Ussing-Kammer wurden auf die serosale Seite der Schleimhaut PlexiglasTM-Ringe geklebt. Die Präparate wurden ausgeschnitten und bis zum Einbau zunächst in auf ~ 4 °C gekühlter Kochsalzlösung aufbewahrt.

Histochemie

Kleine Gewebestücke wurden entweder direkt oder auf Plexiglas™-Ringe geklebt fixiert.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Zellsystem IPEC-J2

Die porzin-jejunale Epithelzelllinie IPEC-J2 wurde im Jahr 1989 isoliert (BERSCHNEIDER, 1989) und wurde von Dr. Peter Schierack, Hochschule Lausitz, Senftenberg, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.3.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die porzin-jejunale Epithelzelllinie IPEC-J2 wurde in Zellkulturflaschen (25 cm²) bei 37 °C unter 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte im Brutschrank (BSB 4, Gelaire) unter zwei verschiedenen Mediumzusammensetzungen kultiviert. Dabei wurde folgendes Medium drei Mal pro Woche erneuert:

- I. DMEM/F-12/HAM + 1% Pen/Strep + 10% FBS
- II. DMEM/F-12/HAM + 1% Pen/Strep + 5% PS + 1% ITS + 5 ng EGF/ml

IPEC-J2/FBS (I) und IPEC-J2/PS (II) der Passagen 65 bis 80 wurden wöchentlich wie folgt passagiert. Der konfluente Zellschicht wurde mit PBS^{-Ca/Mg} gewaschen und Zellen wurden enzymatisch mittels 1 ml Trypsin/EDTA bei 37 °C vollständig vom Flaschenboden abgelöst. Die Zellen wurden in 10 ml Medium mittels Pipette behutsam resuspendiert und damit vereinzelt. In einer neuen Zellkulturflasche wurden 6 ml Medium mit 1,2 ml Zellsuspension angeimpft und weiterkultiviert. Je nach Versuchsaufbau wurden Zellen zusätzlich auch auf Filtermembranen (siehe 3.3.3) oder für den Gefrierbruch in 6-Wellplatten gesät ((I) 1,8·10⁵ Zellen/cm² bzw. (II) 2·10⁵ Zellen/cm²) und mindestens 14 Tage kultiviert, wobei auch hier der Mediumwechsel drei Mal pro Woche erfolgte. Die Bestimmung der Zellzahl geschah lichtmikroskopisch unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer.

Für den Erhalt möglichst geringer Zellpassagen wurden Zellen regelmäßig eingefroren. Dazu wurden sie wie oben beschrieben trypsinisiert, in Medium resuspendiert und anschließend bei 2.000 ×g für 10 min zentrifugiert (Z 200 A, Hermle). Das Zellpellet wurde in 3,3 ml entsprechendem Medium (inkl. 7,5% DMSO) resuspendiert, die Suspension in Cryoröhrchen überführt und in *Freezing*-Containern bis auf -80 °C herunter gekühlt. Im Anschluss daran wurden die Cryoröhrchen in der Gasphase flüssigen Stickstoffs gelagert. Nach Bedarf

wurden die Zellen mittels lauwarmen Wassers aufgetaut und die Suspension in eine Zellkulturflasche (75 cm²) mit 25 ml Medium überführt und bis zur Konfluenz kultiviert.

3.3.3 Versuchsansätze auf Filtermembranen

Um dem natürlichen Funktionszustand des Darmepithels nahezukommen, welche sowohl den apikalen als auch den basolateralen Stoffaustausch umfasst, wurden die Zellen für morphologische und elektrophysiologische Messungen auf Filtermembranen ausgesät. Diese Membran ist für das eingesetzte Kulturmedium durchlässig, jedoch teilt ein geschlossener Zellschicht auf der Membran das Kultursystem in ein apikales (oberhalb der Filtermembran) und ein basolaterales Kompartiment (die Zellkulturschale) auf, zwischen denen der Transport von Ionen sowie kleinen und großen Molekülen untersucht werden kann.

Jeweils drei bis fünf stehende Filter (HA, PCF) wurden in einer Kulturschale (ø 6 cm) platziert, wohingegen hängende Filter (PC, PET, PTFE) in passende Wells einer Wellplatte eingesetzt wurden. Nach Einsaat der adhären Zellen wurde zunächst das apikale, danach das basolaterale Kompartiment mit Medium aufgefüllt. Dabei blieb der basolaterale Flüssigkeitsstand stets unter dem des apikalen, um ein Ablösen der Zellen von der Membran zu vermeiden.

Optimierung der Zellkulturbedingung

Auf Filtermembranen kultivierte IPEC-J2/FBS wiesen eine unphysiologische Morphologie sowie Elektrophysiologie auf. Für die Optimierung der Zellkulturbedingung, ausgehend von der Startbedingung (III), wurden deshalb folgende Versuchsansätze getestet:

- III. 1,8·10⁵ Zellen/cm², HA-Filter (Porengröße, 0,45 µm), DMEM/F-12/HAM + 1% Pen/Strep + 10% FBS, 37 °C
- Ohne 1% Pen/Strep
 - Ohne 10% FBS
 - Mit 0,1 µM Dexamethason
 - Mit RPMI 1640-Medium anstatt DMEM/F-12/HAM
 - 1,7·10⁶ Zellen/cm²
 - 39 °C (Körpertemperatur des Schweins)
 - Unter *air liquid interface* (ALI)-Bedingungen: Drei Tage nach Aussaat wurde das Medium apikal und basolateral abgesaugt. Apikal verblieb lediglich ein

dünner Mediumfilm, basolateral wurden 2,8 ml Medium hinzugefügt. Wöchentlich wurde der TER gemessen, nachdem das apikale und basolaterale Kompartiment mit vorgewärmtem (37 °C) und begastem (5% CO₂) Medium aufgefüllt wurden. Nach der Messung wurde die ALI-Bedingung wieder hergestellt.

- Unter 95% O₂: Direkt nach Aussaat wurden die Filter in der Kulturschale in einem Exsikkator platziert, dieser wurde für 10 min mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) befüllt und anschließend geschlossen in den Brutschrank gestellt. Für eine angemessene Luftfeuchte sorgte eine Kulturschale (ø 15 cm) mit Wasser. Die 95%ige O₂-Atmosphäre wurde während täglicher TER-Messungen an der Luft unterbrochen und anschließend erneuert.
- Auf mit Kollagen beschichteten HA-Filtern: Durch apikale Applikation einer Kollagenlösung (50 µg Kollagen/ml 5 mM Essigsäure) wurden Membranen mit 8 µg Kollagen/cm² beschichtet. Es folgte eine 4-stündige Inkubation im Inkubator, wonach der Überstand abgesaugt wurde, die Filter nach weiterer Inkubation über Nacht mit PBS^{+Ca/Mg} gewaschen und anschließend besät wurden.
- Auf PCF-Filtern (0,4 µm)
- Auf PCF-Filtern (3,0 µm)
- Auf PC-Filtern (0,4 µm)
- Auf PTFE-Filtern (0,4 µm, kollagenbeschichtet)
- Auf PTFE-Filtern (3,0 µm, kollagenbeschichtet)
- Auf PET-Filtern (0,4 µm)
- Auf PET-Filtern (1,0 µm)

Anstatt 10% FBS

- Mit 5% FBS, 1% ITS, 5 ng EGF/ml
- Mit 5% ABS, 1% ITS, 5 ng EGF/ml
- Mit 5% GS, 1% ITS, 5 ng EGF/ml
- Mit 5% PS, 1% ITS, 5 ng EGF/ml

Im Anschluss daran wurde unter der optimierten IPEC-J2/PS-Startbedingung (IV) der Effekt von PS ausgetestet. Die IV-Saadichte resultierte aus kleineren Zellen und einem zur III-Bedingung äquivalenten Saatvolumen.

IV. $2 \cdot 10^5$ Zellen/cm², HA-Filter (0,45 µm), DMEM/F-12/HAM + 1% Pen/Strep + 5% PS + 1% ITS + 5 ng EGF/ml, 37 °C

Anstatt 5% PS

- 5% PS (F), gefiltert (0,2 µm)
- 5% PS (HI), hitzeinaktiviert (30 min 56 °C)
- 5% PS (HI^a), hitzeinaktiviert, von Biochrom
- 10% PS, ohne 1% ITS, ohne 5 ng EGF/ml

Wenn die Medien der Test- und Startbedingung voneinander verschieden waren, wurde nach eintägiger Kultivierung mit Startmedium – Zellen adhären nun auf der Membran – durch Mediaumtausch zur Testbedingung gewechselt. Der TER des Zelllayers wurde, wenn nicht anders vermerkt, mehrmals pro Woche und nie direkt nach einem Mediumwechsel gemessen (siehe 3.4.1).

Charakterisierung von IPEC-J2/FBS und -PS

Erst wenn IPEC-J2/FBS und -PS-Layer auf HA-Filtern einen konstanten TER aufwiesen, etwa nach 14 Tagen Kultivierung, wurden sie zu elektrophysiologischen Messungen und morphologischen Analysen sowie histochemischen und optischen Verfahren herangezogen.

Einfluss von Zink auf epitheliale Eigenschaften

Um den Einfluss von Zink auf IPEC-J2/PS-Layer elektrophysiologisch zu analysieren, wurde zunächst die Abhängigkeit des TER von der Zinkacetat-Dihydrat (ZnAc)-Dosis ermittelt. Dazu wurden aus einem ZnAc-Stock (20 mM) folgende ZnAc-Konzentrationen in IPEC-J2/PS-Medium (II) angesetzt: 1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500 µM. Nach bestätigender Messung konstanter TER-Werte von auf HA-Filtern kultivierten IPEC-J2/PS, nach ca. 14 Tagen Kultivierung, wurde das vorhandene Medium zum Zeitpunkt t_0 basolateral und apikal abgesaugt und apikal durch 500 µl des konditionierten Mediums ersetzt. Das basolaterale Kompartiment wurde mit IPEC-J2/PS-Medium aufgefüllt. Der TER wurde mehrmals über einen Zeitraum von 24 h gemessen (siehe 3.4.1). Nach Ermittlung der Dosis maximaler Wirkung auf den TER (500 µM ZnAc) wurde untersucht, ob der Zinkeffekt zinkspezifisch und applikationsseitenabhängig ist, sowie ob und unter welcher Bedingung Zink die Membranintegrität beeinflusst. Dazu wurden entweder 500 µl 1000 µM Natriumacetat-Trihydrat (NaAc; 40 mM-Stock) apikal oder 8 ml 500 µM ZnAc basolateral appliziert. Anschließend wurde der TER stündlich über 6 h und nach 24 h gemessen. Nach 24 h wurde die Zytotoxizität entsprechender Bedingungen bestimmt (siehe 3.5.6). Unbehandelte IPEC-J2/PS-Layer wurden stets als Kontrollen mitgeführt.

3.4 Elektrophysiologische Methoden

3.4.1 Manuelle Messung des transepithelialen Widerstands

Der transepitheliale Widerstand (TER) eines Zelllayers diente als Anhaltspunkt für dessen Barriereigenschaften. Eigens für die TER-Messung von Zelllayern, die in stehenden Zellkulturfiltern in Kulturschalen wuchsen, wurde eine mechanische Elektrodenvorrichtung entwickelt (Ing. grad. Detlef Sorgenfrei, Institut für Klinische Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, CBF), welche automatisiert das Eintauchen beider Elektroden in das auf 37 °C temperierte apikale und basolaterale Kulturmedium gewährleistete (KREUSEL *ET AL.*, 1991). In Verbindung mit einem Ohmmeter ergab sich der TER gemäß Ohm'schen Gesetzes aus der Spannungsänderung, welche durch einen Rechteckstrom ($\pm 10 \mu\text{A}$, 21 Hz) induziert wurde. Die TER-Messung von auf hängenden Filtern wachsenden Zelllayern erfolgte untemperiert und ohne Automatisierung der Elektrodeneintauchtiefe. Der Eigenwiderstand eines unbewachsenen Filters wurden vom Messwert subtrahiert und der resultierende TER mit der Filterfläche multipliziert. Auf diese Weise konnten TER-Werte, von auf verschiedenen Membranmaterialien und -flächen gewachsenen Zelllayern, auf die Epithelfläche normiert, in $\Omega \cdot \text{cm}^2$ verglichen werden. Um Aussagen zur TER-Entwicklung nach einer Behandlung von Zelllayern zu machen, wurden entsprechende Werte prozentual auf den TER zum Zeitpunkt t_0 bezogen. Die Messelektroden wurden vor und nach Gebrauch in 80%igen Ethanol getaucht, sodass die TER-Messung beliebig oft unter sterilen Bedingungen einer Sterilwerkbank (BSB 4, Gelaire) erfolgen konnte.

Hill-Plot

Die Ermittlung der mittleren effektiven ZnAc-Dosis wurde über die Darstellung des prozentualen TER-Effekts als Wirkung und der ZnAc-Konzentration (1-500 μM) laut Hill-Gleichung wie folgt im Hill-Plot durchgeführt (**Abb. 3.1**):

$$\log\left(\frac{W}{W_{\max} - W}\right) = n \cdot \log([\text{ZnAc}]) - \log([\text{ED50}])$$

W	Prozentuale Wirkung auf den TER
W_{\max}	Maximale Wirkung (100%) auf den TER
n	Hill-Koeffizient
$\log([\text{ED50}])$	Dekadischer Logarithmus der ZnAc-Konzentration mit halbmaximaler Wirkung (50%) auf den TER, in μM
$\log([\text{ZnAc}])$	Dekadischer Logarithmus der ZnAc-Konzentration, in μM

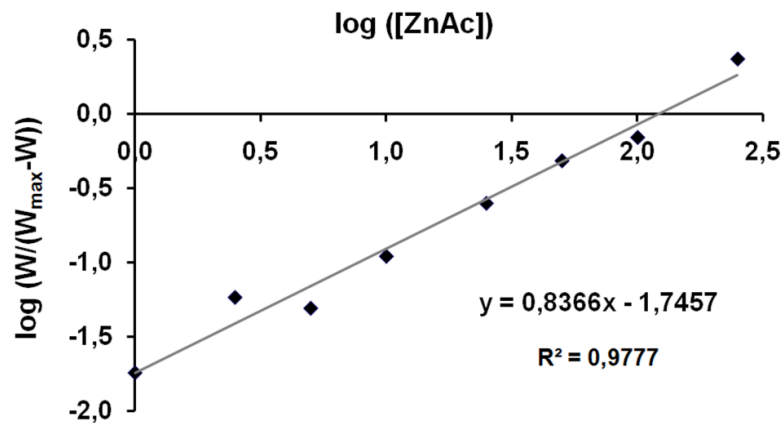


Abb. 3.1: Hill-Plot. Graphische Darstellung von $\log(W/(W_{\max}-W))$ gegen $\log([ZnAc])$. Der Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse repräsentiert die [ED50].

Die [ED50] ergibt sich als Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse, woraus eine [ED50] von 122 μM ZnAc resultierte. Der Hill-Koeffizient von 0,84 spricht dafür, dass die Zinkwirkung durch nicht-kooperative Bindestellen vermittelt wird.

3.4.2 Ussing-Technik

Die Ussing-Kammer (nach dem dänischen Zoophysologen Hans Henrikson Ussing, 1911-2000) stellt eine Messanordnung dar, mit der an *ex vivo*-Gewebeexplantaten und *in vitro*-Zelllayern folgende electrophysiologische Parameter bestimmt werden können: Trans-epitheliale Spannung (U) und transepithelialer Widerstand (TER), aktiver Ionentransport (Kurzschlussstrom, I_{SC}) und transepitheliale Fluxe von Tracermolekülen (USSING AND ZERAHN, 1951). Die beiden mit Elektrolytlösung gefüllten Ussing-Kammerhälften sind durch das zentral platzierte, zu vermessende Epithel getrennt (**Abb. 3.2**).

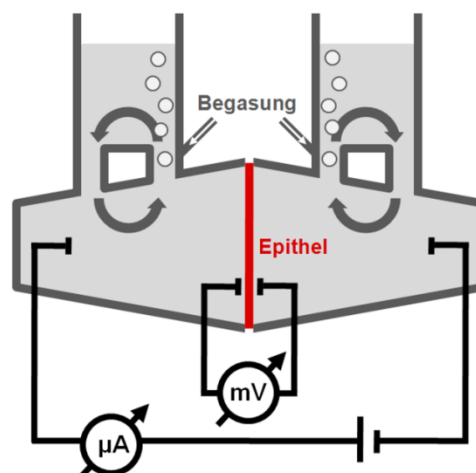


Abb. 3.2: Schematische Darstellung einer Ussing-Kammer mit eingespanntem Epithel.

Ein Stoffaustausch zwischen beiden Kammerhälften kann demzufolge nur über das Epithel erfolgen. Konzentrationsgradienten und hydrostatische Kräfte innerhalb des Systems, die den transepithelialen Transport beeinflussen würden, werden ausgeschaltet, indem Stoffkonzentration und Füllhöhe beidseits gleich sind. Konstante physiologische Bedingungen werden durch Temperierung der Badlösung (37 °C) und Aufrechterhalt ihres pH-Werts durch Begasung mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) gewährleistet, wobei Letzteres zudem für eine permanente Zirkulation der Badlösungen sorgt.

Beide Kammerhälften sind jeweils über Agarbrücken (3% Agar in einer 1,8% NaCl-Lösung) mit einer in Kaliumchloridlösung (3 M KCl) stehenden epithelnahen Spannungs- und epithelfernen Stromelektrode verbunden. Mit einem Voltmeter wird die transepitheliale Potentialdifferenz zwischen beiden Spannungselektroden (KCl/Kalomel) gemessen. Die Stromelektroden (Ag/AgCl) stehen in Verbindung mit einem Amperemeter und einer variablen Gleichstromquelle. Die Applikation eines Stroms verursacht über dem Epithel eine Potentialdifferenz, wodurch gemäß des Ohm'schen Gesetzes ($R = U / I$) der TER berechnet werden kann. Soll das transepitheliale Potential kurzgeschlossen werden, um den aktiven Transport (I_{sc}) über das Epithel zu erfassen, wird über die Stromelektroden ein Strom genau in der Höhe angelegt, durch den das transepitheliale Potential gleich Null gesetzt wird (Spannungsklemme).

3.4.3 Ussing-Kammer: Messvorbereitung

Vor der elektrophysiologischen Vermessung jedes Präparats wurden von der entsprechenden Versuchslösung in der Ussing-Kammer (ohne Gewebe bzw. mit HA-Filter ohne Zellen) sowohl die Potentialdifferenz der Spannungselektroden als auch der Widerstand gemessen – bereits bezogen auf die später exponierte Epithelfläche (Zellfilter: 0,6 cm², Gewebe: 0,28 cm²). Diese Parameter wurden anschließend von den Messwerten mit eingesetztem Epithel subtrahiert.

Nach Einbau des Zellkulturfilters in die Ussing-Kammer, parallelem Füllen beider Kammerhälften mit entsprechender Ringerlösung (jeweils 5 ml oder 10 ml) und Starten der Aufzeichnung elektrophysiologischer Parameter wurde der Zelllayer bis zum Erreichen konstanter Widerstände für etwa 30 min äquilibriert, bis das eigentliche Experiment begann. Das Vorgehen mit auf PlexiglasTM-Ringen geklebtem jejunalem Gewebe erfolgte analog, wobei ca. 45 min vergingen, ehe das Experiment begonnen wurde.

3.4.4 Messung von TER und Kurzschlussstrom

Durch regelmäßige Applikation (10 s-Intervalle) des Strom I und der Messung der transepithelialen Spannung U , wurde der transepitheliale Widerstand TER nach $TER = U / I$ ermittelt. Ebenso regelmäßig wurde der Kurzschlussstrom unter Spannungsklemme erfasst.

Zellkultur – Charakterisierung

In Ringerlösung und unter Bedingungen der Spannungsklemme wurden apikale Na^+ - und K^+ -Kanäle durch apikale Gaben von (Endkonzentration) 10 μM Amilorid, 5 mM TEA und 5 mM $BaCl_2$ zunächst blockiert. Nach basolateraler Gabe von 10 μM Forskolin (induziert Chloridsekretion) oder apikaler Gabe von 500 μM Phlorizin (hemmt SGLT1) wurde die ionale Bewegungsänderung als Änderung des Kurzschlussstroms erfasst. Eine Stimulierung der Na^+ /Glukose-Absorption erfolgte durch apikale Addition von 10 mM Glukose in initial glukosefreier Ringerlösung.

Zellkultur – Wirkung von Zink

Aufgrund der Tatsache, dass die Blockierung apikaler Na^+ - und K^+ -Kanäle keine Auswirkung auf den forskolininduzierten Kurzschlussstrom hatte, wurden Zelllayer in Ringerlösung mit und ohne 500 μM ZnAc bzw. 1000 μM NaAc unter Spannungsklemme direkt mit 10 μM Forskolin von basolateral stimuliert.

Gewebe

In Ringerlösung mit Substraten sowie Antibiotika und unter Spannungsklemme wurde der Kurzschlussstrom nach basolateraler Applikation von 10 μM Forskolin aufgezeichnet, während die Erfassung der Kurzschlussstromänderung nach apikaler Gabe von 10 mM Glukose in initial glukosefreier Ringerlösung stattfand.

3.4.5 Messung von Dilutionspotentialen

Dilutionspotentialmessungen ermöglichen die Bestimmung parazellulärer Permeabilitäten für Na^+ und Cl^- . Werden beide Ionen in einer Kammerhälfte teilweise osmotisch durch Mannitol ersetzt, stellt sich über dem Epithel ein Diffusionspotential ein – das Dilutionspotential. Aufgrund spezifischer Ionenbewegung entsteht ein weiteres Potential, das Liquid-Junction-Potential, welches in weiteren Rechnungen zu berücksichtigen ist. Unter Anwendung der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung kann das Dilutionspotential wie folgt berechnet werden:

$$\Delta E = 2,303 \cdot \frac{R \cdot T}{F} \cdot \log \left(\frac{P_{Na} \cdot a_{Na-ap} + P_{Cl} \cdot a_{Cl-bl}}{P_{Na} \cdot a_{Na-bl} + P_{Cl} \cdot a_{Cl-ap}} \right)$$

ΔE	Dilutionspotential, $E_{bl} - E_{ap}$, mit Korrektur für das Liquid-Junction-Potential
R	Allgemeine Gaskonstante
T	Temperatur
F	Faradaykonstante
P_{Na}, P_{Cl}	Epitheliale Permeabilität für Na^+ bzw. Cl^-
a_{Na-ap}, a_{Cl-ap}	Apikale Ionenaktivität für Na^+ bzw. Cl^-
a_{Na-bl}, a_{Cl-bl}	Basolaterale Ionenaktivität für Na^+ bzw. Cl^-

Nach Auflösen der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung nach P_{Na}/P_{Cl} können die relativen Permeabilitäten für Na^+ und Cl^- mit $s = 2,303 \cdot \frac{R \cdot T}{F}$ folgendermaßen ermittelt werden:

$$\frac{P_{Na}}{P_{Cl}} = \frac{10^{\frac{\Delta E}{s}} \cdot a_{Cl-ap} - a_{Cl-bl}}{a_{Na-ap} - 10^{\frac{\Delta E}{s}} \cdot a_{Na-bl}}$$

Zellkultur/Gewebe

Nach dem Befüllen der Ussing-Kammerhälften mit jeweils 5 ml Na^+ -Ringerlösung und Erreichen eines konstanten TER-Niveaus (siehe 3.4.3) wurden pro Kammerhälfte entweder apikal 5 ml Na^+ - bzw. Mannitol-Ringerlösung und basolateral 5 ml Mannitol- bzw. Na^+ -Ringerlösung addiert. Anschließend wurde das Dilutionspotential ermittelt.

Die Dilutionspotentialmessungen an IPEC-J2/FBS wurden sowohl bei 37 °C als auch bei 25 °C durchgeführt, um eventuelle Potentialüberlagerungen durch aktiven transzellulären Transport auszuschließen. Da die Dilutionspotentiale unter beiden Temperaturen nicht signifikant verschieden waren, wurden Dilutionspotentialmessungen an Gewebe und IPEC-J2/PS ausschließlich bei 37 °C durchgeführt.

3.4.6 Messung von Fluxen parazellulärer Markermoleküle

Die Bestimmung der epithelialen Permeabilität für mittelgroße (Fluoreszein, 332 Da) und große Moleküle (FITC-Dextran 4000, 4 kDa) wurde durch Messung entsprechender parazellulärer Markerfluxe in der Ussing-Kammer realisiert. Währenddessen konnte der TER als Maß der Barriereintegrität verfolgt werden. Durch die Begasung bzw. kontinuierliche

Zirkulation der Badlösung wurde das Auftreten von epithelnahen Markergrenzschichten höherer Konzentration vermieden.

3.4.6.1 Fluoreszein

Zellkultur

In Ringerlösung wurde nach Anlegung der Spannungsklemme Fluoreszein (Endkonzentration: 100 µM) appliziert – entweder apikal oder basolateral (= Donorseite). In einem 10 min-Takt erfolgten sechs Abnahmen von 300 µl basolateraler bzw. apikaler Badlösung (= Akzeptorseite) und Ersetzen dieses Volumens durch frische Ringerlösung. Die Bestimmung der Emissionsintensität des Fluorophors Fluoreszein wurde bei 525 nm im Mikrotiterplattenlesegerät (Infinite M200, Tecan) durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über eine geeignete Fluoreszeineichreihe. Der Markerflux ergibt sich aus folgender Gleichung:

$$J = \frac{(c_2' - c_1) \cdot V_{\text{Kammer}}}{(t_2 - t_1) \cdot A_{\text{Epithel}}}$$

mit zugabebedingter Korrektur der Konzentration: $c_2' = \frac{(c_1 \cdot V_{\text{Abnahme}}) + (c_2 \cdot V_{\text{Kammer}})}{V_{\text{Kammer}}}$

J	Markerflux
c ₁ , c ₂	Markerkonzentrationen der Akzeptorseite zum Zeitpunkt t ₁ bzw. t ₂
c ₂ '	c ₂ , korrigiert
t ₁ , t ₂	Zeitpunkt t ₁ bzw. t ₂
V _{Kammer} , V _{Abnahme}	Volumen der Kammerlösung bzw. der Abnahme
A _{Epithel}	Fläche des exponierten Epithels

Unter Einbeziehung der eingesetzten Markerkonzentration auf der Donorseite kann aus dem Markerflux die epitheliale Permeabilität für den Marker wie folgt berechnet werden:

$$P = \frac{J}{c_{\text{Donor}}}$$

P	Epitheliale Permeabilität für einen Marker
c _{Donor}	Markerkonzentration auf der Donorseite

Gewebe

Die Ermittlung der epithelialen Permeabilität für Fluoreszein an Gewebepräparaten fand in Ringerlösung mit Substraten sowie Antibiotika statt. Unter Spannungsklemme wurde apikal Fluoreszein (Endkonzentration: 50 μM) addiert. Nach 30 min Äquilibration wurden basolateral 500 μl Badlösung abgenommen und durch frische Ringerlösung mit Substraten sowie Antibiotika ersetzt. Eine weitere basolaterale Abnahme erfolgte 1 h nach der ersten. Sowohl der Fluoreszeinflux als auch die Permeabilität für Fluoreszein wurden analog zur Zellkultur (siehe oben) bestimmt.

3.4.6.2 FITC-Dextran 4000

Gewebe

Der experimentelle Ablauf der Fluxmessung von FITC-Dextran 4000 (FD4) entsprach in seinen Grundzügen der Fluoreszeinfluxmessung (siehe 3.4.6.1). Die zu applizierende FD4-Lösung wurde zuvor drei Tage lang bei 4 °C gegen Kochsalzlösung dialysiert (Slide-A-Lyzer, Thermo Scientific), um überschüssiges FITC zu entfernen und das spätere Messergebnis nicht falsch-positiv zu beeinflussen. Während des Dialysevorgangs veränderte sich das zu dialysierende Volumen beträchtlich, weswegen das in der Ussing-Kammer apikal eingesetzte FD4-Volumen lediglich annäherungsweise einer Endkonzentration von 250 μM entsprach und die wahre Konzentration erst nach Versuchsende durch Abnahme der apikalen Badlösung fluorimetrisch bestimmt werden konnte. 1 h nach apikaler Markerzugabe in Ringerlösung mit Substraten sowie Antibiotika wurde basolateral 1 ml abgenommen und durch frische Ringerlösung mit Substraten und Antibiotika ersetzt. Nach weiteren 2 h erfolgte die abschließende Abnahme. Der FD4-Flux und die Permeabilität wurden analog zu den Messungen und Berechnungen für Fluoreszein ermittelt (siehe 3.4.6.1).

3.4.7 Ein-Wege-Impedanzspektroskopie

Der TER setzt sich aus einer subepithelialen (R^{sub}) und einer epithelialen Komponente (R^{epi}) zusammen ($\text{TER} = R^{\text{sub}} + R^{\text{epi}}$). Während sich R^{epi} von auf Filtermembranen gewachsenen Zelllayern relativ einfach ermitteln lässt, indem der reine Filterwiderstand (R^{sub}) gemessen und vom TER subtrahiert wird (siehe 3.4.1), ist eine separate Ermittlung des R^{epi} an Gewebeexplantaten nicht ohne Weiteres möglich. Hierzu bedarf es der Impedanzspektroskopie.

Werden Epithel und Subepithel in einem elektrischen Ersatzschaltkreis beschrieben, dann repräsentiert das Subepithel einen reinen Ohm'schen Widerstand, der mit der Parallelschaltung eines Ohm'schen Widerstands und einer apparenten Kapazität des Epithels in Reihe geschaltet ist (FROMM *ET AL.*, 1985; SCHIFFERDECKER AND FRÖMTER, 1978) (**Abb. 3.3**).

Die apparente epitheliale Kapazität (C^{epi}) stellt dabei sowohl kapazitive Eigenschaften der apikalen (C^{ap}) als auch der basolateralen Membran (C^{bl}) dar (SCHIFFERDECKER AND FRÖMTER, 1978), wobei folgende Beziehung gilt: $C^{\text{epi}} = \frac{C^{\text{ap}} \cdot C^{\text{bl}}}{C^{\text{ap}} + C^{\text{bl}}}$.

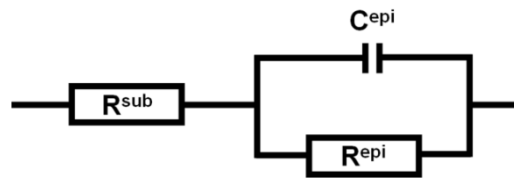


Abb. 3.3: Ersatzschaltkreis des epithelialen Zellmodells. Anwendung in der Ein-Wege-Impedanzspektroskopie.

Werden an das System aus Subepithel und Epithel Wechselströme steigender Frequenz angelegt, lässt sich folgende Extremwertbetrachtung anstellen: Geht die Wechselstromfrequenz (f) gegen Null, geht der kapazitive Blindwiderstand gegen unendlich, sodass kein Strom über den Kondensator fließt und der gemessene Widerstand $R^{\text{sub}} + R^{\text{epi}}$, also TER entspricht. Bei sehr hohen Wechselstromfrequenzen ($f \rightarrow \infty$) dagegen, geht der kapazitive Blindwiderstand gegen Null, wodurch der gesamte Strom über den Kondensator und nicht über R^{epi} fließt. Demnach entspricht der gemessene Widerstand lediglich R^{sub} .

Durch Parallelschaltung eines Kondensators mit einem Ohm'schen Widerstand oszilliert die Amplitude des Potentials nicht wie bei einem reinen Ohm'schen Widerstand mit der des Wechselstroms in Phase (Phasenwinkel $\theta = 0$), sondern um bis zu -90° phasenverschoben ($\theta = -90^\circ$). Die Impedanz Z kann deshalb als Vektor mit einem Phasenwinkel von 0° bis -90° betrachtet werden, welcher von der Kreisfrequenz ($\omega = 2 \cdot \pi \cdot f$) abhängig ist. Die gemessenen frequenzabhängigen Wechselstromwiderstände (Impedanzen) können nun entweder als Phase und Betrag in einem Polarkoordinatensystem dargestellt werden oder als komplexe Zahlen im kartesischen Koordinatensystem, indem die Imaginärteile der komplexen Impedanzen (Z_{im}) auf der y-Achse gegen die Realteile (Z_{re}) auf der x-Achse aufgetragen werden. Diese Art der Darstellung wird als Nyquist-Diagramm bezeichnet (**Abb. 3.4**). Mithilfe des Minimums bzw. Maximums von Z_{re} lassen sich die Ohm'schen Widerstände R^{sub} bzw. R^{epi} ermitteln, mithilfe des Minimums von Z_{im} lassen sich Aussagen über die kapazitiven Eigenschaften des Epithels treffen.

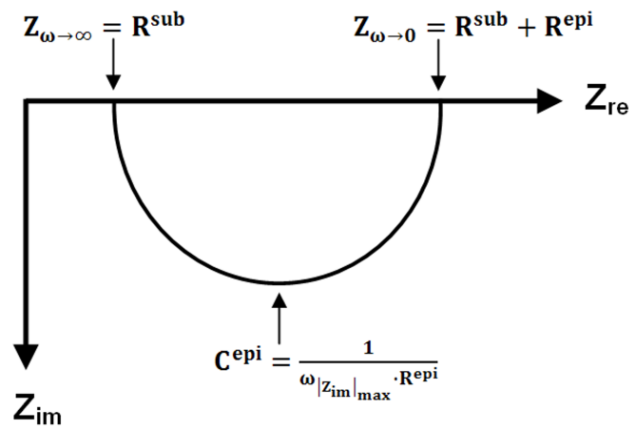


Abb. 3.4: Nyquist-Diagramm einer Modellmessung. Die graphische Darstellung von Impedanzen resultiert in einem Halbkreis, dessen Schnittpunkte mit der x-Achse bei hohen Wechselstromfrequenzen ($\omega \rightarrow \infty$) R^{sub} und bei niedrigen Frequenzen ($\omega \rightarrow 0$) $R^{sub} + R^{epi} = TER$ ergeben. C^{epi} wird mithilfe der Frequenz des Kreisbogenminimums ($\omega_{|Z_{im}|_{max}}$) ermittelt (SCHIFFERDECKER AND FRÖMTER, 1978).

Frequenzabhängig entsteht in einem Nyquist-Diagramm unterhalb der x-Achse ein Halbkreis aus Messpunkten, deren gefitteter Kurvenverlauf die oben genannten Extrema (R^{sub} , TER) als Schnittpunkte mit der x-Achse ergibt. C^{epi} wird dagegen nicht direkt aus dem Diagramm abgelesen, sondern über den imaginären Teil der Impedanz, nämlich anhand der Frequenz des Kreisbogenminimums $\omega_{|Z_{im}|_{max}}$, wie folgt berechnet:

$$C^{epi} = \frac{1}{\omega_{|Z_{im}|_{max}} \cdot R^{epi}}$$

Gewebe

Gewebestücke wurden zur Stabilisierung auf Kunststoffringe geklebt und in Ussing-Kammern eingebaut. Nach Äquilibrierung in Ringerlösung mit Substraten und Antibiotika (siehe 3.4.3) sowie Carbogen, folgten etwa drei aufeinanderfolgende Impedanzmessungen im Abstand von jeweils 5 min. Während der Impedanzmessungen wurde ein sinusförmiger Wechselstrom ($35 \mu A/cm^2$) 48 verschiedener Frequenzen ($f = 1,3 \text{ Hz bis } 65 \text{ kHz}$) angelegt. Die dadurch induzierten Spannungsänderungen wurden mit phasensensitiven Verstärkern (Frequency generator/response analyzer 1250, Electrochemical Interface 1286, Solartron Schlumberger) erfasst und die daraus resultierenden Impedanzwerte (Z_{im} , Z_{re}) aufgezeichnet.

3.4.8 Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie

Mithilfe der Ein-Wege-Impedanzspektroskopie kann zwar zwischen R^{sub} und R^{epi} unterschieden werden, jedoch nicht zwischen dem para- (R^{para}) und dem transzellulären Wider-

stand (R^{trans}) – also den parallelgeschalteten Widerstandskomponenten von R^{epi} (**Abb. 3.5**).

Es gilt folgende Beziehung: $\frac{1}{R^{\text{epi}}} = \frac{1}{R^{\text{trans}}} + \frac{1}{R^{\text{para}}}$ bzw. $R^{\text{epi}} = \frac{R^{\text{trans}} \cdot R^{\text{para}}}{R^{\text{trans}} + R^{\text{para}}}$.

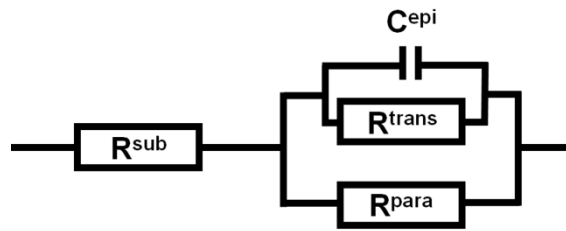


Abb. 3.5: Ersatzschaltkreis des epithelialen Zellmodells. Anwendung in der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie.

Um eine Diskriminierung zwischen R^{para} und R^{trans} zu erreichen, wurde die Methodik am Institut für Klinische Physiologie (Charité – Universitätsmedizin Berlin, CBF) zur Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie erweitert (KRUG ET AL., 2009b). Diese kombiniert die Ein-Wege-Impedanzspektroskopie mit Fluxmessungen des parazellulären Markers Fluoreszein vor und nach Öffnung der TJ. Unter Zugabe eines Calciumchelators (EGTA) sinkt R^{epi} , da der parazelluläre Weg durch Entzug extrazellulären Calciums reversibel geöffnet wird (MARTINEZ-PALOMO ET AL., 1980). Dies führt zu einem Anstieg des Fluoreszeinfluxes und es wird angenommen, dass dieser Anstieg proportional zur Änderung der parazellulären Leitfähigkeit $G^{\text{para}} (= 1/R^{\text{para}})$ ist. Mithilfe der Fluxverhältnisse und Impedanzmessungen vor und nach TJ-Öffnung kann R^{trans} von R^{para} unterschieden werden.

Zellkultur

Der erste Teil der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie an Zelllayern erfolgte prinzipiell analog zur Ein-Wege-Impedanzspektroskopie an Gewebeexplantaten (siehe 3.4.7). Nach Äquilibrierung in Ringerlösung wurden etwa acht Impedanzspektren im Abstand von jeweils 10 min aufgenommen, zwischen denen die transepitheliale Spannung auf 0 mV geklemmt wurde. Nach dem ersten Impedanzspektrum wurde Fluoreszein (Endkonzentration: 100 μM) apikal appliziert. Basolaterale Abnahmen (300 μl) wurden im 10 min-Takt realisiert, wobei sie genau 5 min versetzt zu den Impedanzmessungen erfolgten. Nach der dritten Probenentnahme nach Fluoreszeinapplikation wurde EGTA (130 mM-Stock, zunächst 85 μl , dann 5 μl -weise bis TER-Effekt eintrat) beidseitig appliziert. Bei zu heftigem TER-Abfall wurde mit CaCl_2 (200 mM-Stock) beidseitig vorsichtig gegentitriert. Die fluorimetrische Bestimmung der Fluoreszeinkonzentration erfolgte wie unter 3.4.6.1 beschrieben.

3.5 Biochemische Methoden

3.5.1 Proteinextraktion

Die Proteinextraktion erfolgte durch hoch denaturierenden RIPA (engl. *radio immuno precipitation assay*)-Puffer, um Multimerisierung von Proteinen sowie eine Unzugänglichkeit von Epitopen auszuschließen.

Zellkultur

Kleine Kulturflaschen mit konfluentem IPEC-J2-Rasen wurden zunächst mit kaltem PBS^{+Ca/Mg} gewaschen und danach mit 1 ml auf RT temperiertem RIPA-Puffer versetzt. Der Zelloberfläche wurde nach 2 min Inkubation auf Eis sacht abgeschwenkt und in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. Es folgten die Resuspension des viskosen Lysates und eine 30-minütige Inkubation auf Eis mit gelegentlichem Vortexen. Darauf folgend wurde das Lysat zu ~250 µl aliquotiert und mit einem Ultraschallstab (UP50H, Hielscher) jeweils 13 Mal 1 s sonifiziert. Danach wurde das Lysat wieder vereint und jeweils drei Mal durch eine 20G 1½"- und 26G ⅜"-Nadel gezogen. Die nun flüssige Lösung wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Gewebe

Ein ~1 cm² großes Stück Gewebe wurde zusammen mit 1 ml RIPA-Puffer in einen Potter auf Eis gegeben. Darauf folgte die Homogenisierung des Gewebes mit dem Pistill. Das homogene Lysat wurde auf Eis inkubiert, sonifiziert, durch Nadeln gezogen und anschließend gelagert, wie unter Zellkultur (siehe oben) beschrieben.

3.5.2 Bestimmung der Proteinquantität

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zell- und Gewebelysaten erfolgte mittels BCA (engl. *bicinchoninic acid*)-Methodik nach Angaben des Herstellers (Pierce[®], Thermo Scientific). Das Prinzip basiert darauf, dass Proteine in alkalischem Milieu Cu²⁺ quantitativ zu Cu⁺ reduzieren, wovon letztere Ionen mit Bicinchoninsäure Komplexe bilden, was durch einen Farbumschlag von grün nach violett sichtbar wird.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte in Duplikaten. Ein Volumen von 10 µl jeder Probe (ggf. mit RIPA-Puffer verdünnt), des reinen RIPA-Puffers und der BSA-Kalibrationslösungen (0, 0,2, 0,8 und 1,2 mg BSA/ml) wurden in Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte vorgelegt, bevor 190 µl der BCA-Gebrauchslösung dazupipettiert wurden. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C und eine anschließende Messung der Absorption bei 562 nm im

Mikrotiterplattenlesegerät (Spectra Classic, Tecan). Unter Erstellung einer Eichgeraden wurden die zu bestimmenden Proteinkonzentrationen der Lysate ermittelt.

3.5.3 SDS-PAGE

Um Proteine unabhängig von ihrer Ladung und Konformation nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, wurde die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (LAEMMLI, 1970) durchgeführt. Dafür wurden die Lysate in 1× Laemmli-Puffer für 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden 20 µg Protein pro Probe in Geltaschen des 1,5 mm flachen Gelsystems geladen. Außerdem wurden in jeweils eine Tasche der Gelenden 5 µl eines Größenstandards (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) appliziert, mit dem die spätere Größenordnung der Probenbanden gewährleistet wurde. Im Anschluss erfolgte die Gelelektrophorese im Mini-Protean® 3 Elektrophoresesystem (Bio-Rad) bei einer Spannung von 100 V für etwa 1,5 h.

3.5.4 Western Blotting und Immundetektion

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen aus dem SDS-Polyacrylamidgel mussten diese zunächst aus dem Gel auf eine Membran übertragen werden. Dies wurde mittels Western Blotting im Nassblotverfahren realisiert. Die Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran wurde dafür in Methanol aktiviert und danach wie alle weiteren Komponenten des Blot-Sandwiches in Transferpuffer äquilibriert, wonach das Blot-Sandwich wie folgt geschichtet wurde:

Anode (-)

Schwamm

Filterpapier (3 MM)

SDS-Polyacrylamidgel

PVDF-Membran

Filterpapier (3 MM)

Schwamm

Kathode (+)

In der elektrophoretischen Transferzelle Mini Trans-Blot® (Bio-Rad) erfolgte der Proteintransfer in Transferpuffer und unter gleichmäßiger Kühlung bei 100 V für 1 h.

Im Anschluss an das Blotting wurden freie Proteinbindestellen auf der Membran durch 2-stündige Inkubation in Blockierlösung geblockt. Anschließend wurde die Membran in Blockierlösung angesetztem Primärantikörper (*rabbit/mouse/goat* anti-Cldn1, -2, -3, -4, -5, -7,

-8, -12, -15, Tric-a, Occl, Ezrin, SGLT1, GLUT2, Na/K-ATPase, Vim, Snail, β -Actin, E-cad; siehe 3.1.7, Tab. 3.1) über Nacht bei leichtem Schwenken und 4 °C inkubiert und danach drei Mal in TBST gewaschen. Unter Verwendung des LumiLight^{Plus} Western Blotting Kits (Roche) wurde die Membran für 1,5 h unter Schwenken mit peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpern (siehe 3.1.7, Tab. 3.1) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBST und der Einwirkung der LumiLight^{Plus}-Entwicklerreagenzien fand die Detektion der Chemilumineszenzsignale, resultierend aus der Luminolreaktion, am Lumineszenzbildanalysator (Fusion FX 7, Vilber Lourmat) statt. Zur Überprüfung der Menge geladenen Proteins wurden β -Actin bzw. E-cadherin durch entsprechendes Zerteilen der Blotmembran entweder parallel zu den Zielproteinen detektiert oder die Blotmembranen wurden im Anschluss an die Entwicklung, falls speziesdifferent, erneut mit TBST gewaschen und anschließend mit Primär-, Sekundärantikörpern und Entwicklerreagenzien behandelt und detektiert. Die densitometrische Auswertung der Western Blot-Signale erfolgte unter Verwendung der Software AIDA (Advanced Image Data Analyzer, Raytest).

3.5.5 Zellproliferationsassay

Mittels des Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche) wurde die Zellproliferation durch Quantifizierung metabolisch aktiver Zellen bestimmt. Diese Methode basiert auf der mitochondrialen Umsetzung des roten Tetrazoliumsalzes WST-1 zu gelbem Formazan.

Die Durchführung des Zellproliferationsassays erfolgte SFB-intern durch Dr. Angelika Bondzio (Institut für Veterinär-Biochemie, Freie Universität Berlin). IPEC-J2 vier verschiedener Zellpassagen wurden zu 10^4 Zellen/Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte in einem Volumen von 100 μ l eingesät und 4 bzw. 72 h im Inkubator kultiviert. Nach beiden Wachstumsphasen wurde das WST-1-Reagenz laut Hersteller appliziert und die Absorption bei 450/630 nm in einem Mikrotiterplattenreader (iMarkTM, Bio-Rad) gemessen. Die Absorption nach 4-stündigem Wachstum wurde gleich 100% gesetzt und die Absorption nach 72 h dazu in Relation gebracht.

3.5.6 Zellmembranintegritätsassay

Durch Beeinträchtigung der zellulären Membranbarriere kommt es zur Freisetzung zytoplasmatischer Bestandteile wie Enzymen. Vor diesem Hintergrund lässt sich die Zellmembranintegrität durch indirekte Messung der enzymatischen Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) bestimmen, da die LDH auch außerhalb der Zelle stabil bzw. aktiv ist. Durch die enzymatische Oxidation von Laktat zu Pyruvat werden Reduktionsäquivalente frei, durch

welche der blaue Farbstoff Resazurin zu rosafarbenem, fluoreszierenden Resorufin reduziert wird. Dabei ist die LDH-Aktivität proportional zur Fluoreszenzintensität.

Nach 24 h Inkubation mit 500 μM ZnAc oder 1000 μM NaAc von apikal bzw. basolateral wurde der apikale Überstand abgenommen und in ein Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. In schwarzen Mikrotiterplatten wurde unter Verwendung des Membranintegritätsassays Cyto-Tox-ONE™ (Promega) nach Herstellerangaben die Emissionsintensität der Zellüberstände bei 590 nm im Mikrotiterplattenlesegerät (Infinite M200, Tecan) gemessen. Die Emissionsintensität des Überstands von Kontrollzelllayern wurde gleich Eins gesetzt und die aus behandelten Zelllayern resultierende Emission dazu ins Verhältnis gesetzt.

3.6 Histochemische und optische Methoden

3.6.1 Fixierung

Die Fixierung der Zelllayer und des Gewebes diente der Konservierung der Präparate, wobei die Fixierungsagenzien spezifisch auf die weitere Verwendung abgestimmt wurden.

Methanolfixierung

Zellkultur

Auf Filtern kultivierte IPEC-J2 wurden mit $\text{PBS}^{+\text{Ca/Mg}}$ gewaschen und anschließend in eiskaltem Methanol bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ für 10 min fixiert. Es folgte ein $\text{PBS}^{+\text{Ca/Mg}}$ -Waschschritt, nach dem die bewachsenen Filter aus dem Kunststoffrahmen gestanzt wurden. Bis zur Immunfluoreszenzfärbung, die noch am selben Tag erfolgte, lagerten die Filter in $\text{PBS}^{+\text{Ca/Mg}}$ in 24-Wellplatten.

Gewebe

Die orientierte Einbettung von in flüssigem Stickstoff eingefrorenem Gewebe erfolgte nach kurzfristigem Antauen in TissueTek bei $-18\text{ }^\circ\text{C}$. Anschließend wurden am Cryomikrotom (CM 1900, Leica) 5 μm dünne Längsschnitte angefertigt und auf Objektträger gezogen. Die Fixierung erfolgte in eiskaltem Methanol für 10 min bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$, wonach die Schnitte in $\text{PBS}^{+\text{Ca/Mg}}$ gewaschen und bis zur Immunfluoreszenzfärbung am selben Tag aufbewahrt wurden.

Formalinfixierung

Zellkultur

Zellbewachsene Filter wurden zunächst mit $\text{PBS}^{+\text{Ca/Mg}}$ gewaschen, wonach die Fixierung in 4% Formalin für 20 min bei RT erfolgte. Nach einem $\text{PBS}^{+\text{Ca/Mg}}$ -Waschschritt wurden die

Filter in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet (durchgeführt von Mitarbeitern der Pathologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin). Die paraffinierten Filter wurden mit einem Schlittenmikrotom (Reichert-Jung) in 5 µm dünne Längsschnitte geschnitten, auf Objektträger gezogen und bis zur PAS-Reaktion bei RT gelagert (institutsintern durchgeführt von In-Fah M. Lee, Institut für Klinische Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin).

Gewebe

Auf PlexiglasTM-Ringe geklebtes Gewebe wurde 4 h in 4% Formalin bei RT fixiert und anschließend über Nacht in PBS^{+Ca/Mg} inkubiert. Die Ringe wurden vom Gewebe entfernt, welches anschließend nach Entwässerung und Paraffineinbettung geschnitten wurde (siehe oben, Zellkultur). Die Schnitte wurden bis zur Verwendung für H&E- bzw. Immunfluoreszenzfärbungen bei RT gelagert.

PFA-Fixierung

Zellkultur

IPEC-J2-Filter wurden mit PBS^{+Ca/Mg} gewaschen und anschließend mit 2% PFA für 20 min bei RT fixiert. Es folgte ein PBS^{+Ca/Mg}-Waschschritt, nach dem die Filter aus dem Kunststoffrahmen gestanzt und bis zur Immunfluoreszenzfärbung am selben Tag in PBS^{+Ca/Mg} in 24-Wellplatten gelagert wurden.

Gewebe

Auf PlexiglasTM-Ringe geklebtes Gewebe wurde 4 h in 2% PFA fixiert und im Anschluss über Nacht in 50 mM Glycin inkubiert. Danach wurde das Gewebe für jeweils 1 h in 10%, 20% und 30% Sukrose bei 4 °C entwässert, bis es danach in TissueTek bei -18 °C eingebettet wurde und am Cryomikrotom (CM 1900, Leica) 5 µm dünne Gewebelängsschnitte angefertigt und auf Objektträger gezogen wurden. Bis zur Immunfluoreszenzfärbung wurden die Schnitte bei -20 °C aufbewahrt.

3.6.2 H&E-Färbung

Mittels H(ämatoxylin)&E(osin)-Färbung lassen sich Übersichtsfärbungen herstellen, bei denen Hämatoxylin, ein Farbstoff des Blauholzbaums, saure Molekülgruppen wie Desoxyribonukleinsäuren im Gewebe (z. B. Zellkerne) blau anfärbt und Eosin, ein synthetischer Farbstoff, basische Strukturen wie zytoplasmatische Proteine und Kollagen rot färbt.

Die H&E-Färbung wurde institutsintern von In-Fah M. Lee (Institut für Klinische Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin) durchgeführt. Direkt vor der Färbung wurden die Paraffingewebeschnitte in zwei Schritten (10 min, 30 s) in Xylol entparaffiniert. Danach folgte die Rehydratisierung in einer absteigenden Alkoholreihe (je 30s 100%, 96%, 70%, 30% Ethanol, *Aqua bidest*). Nach 1-minütiger Inkubation in Hämatoxylin wurden die Schnitte in lauwarmem Leitungswasser gebläut und im Anschluss in einer aufsteigenden Alkoholreihe wieder dehydratisiert (1 min *Aqua bidest*; je 30 s 30%, 70%, 96% Ethanol). Nach 10 bis 30 s Inkubation in Eosin folgte eine kurze Differenzierung der Schnitte in 96% Ethanol und die abschließende Dehydratisierung in 100% Ethanol für zwei Mal 30 s. Schließlich wurden die Schnitte zwei Mal 30 s in Xylol geklärt und mit Pertex eingedeckt. Mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop (BX 60, Olympus) wurden bei 10-facher Vergrößerung Aufnahmen der ausgehärteten Schnitte aufgenommen und mithilfe der Software Image J (W. Rasband, NIH) folgendermaßen morphometrisch vermessen: Unter Verwendung des „Freihand-Werkzeugs“ wurde von fünf Schnitten pro Ferkel sowohl die epitheliale Oberfläche als auch die korrespondierende Strecke der *Lamina muscularis mucosae* abgefahren bzw. ausgemessen. Des Weiteren wurden die Kryptentiefe und -dichte auf einer Strecke von ~750 µm der *Lamina muscularis mucosae* ermittelt.

3.6.3 PAS-Reaktion

Während der PAS (engl. *periodic acid-Schiff*)-Reaktion werden unsubstituierte Glykolgruppen durch Perjodsäure zu Aldehydgruppen oxidiert, welche mit fuchsinschwefeliger Säure des Schiff'schen Reagenzes zu einer pinkfarbenen Tönung kohlenhydrathaltiger Komponenten wie Mukopolysacchariden führt. Die PAS-Reaktion neutraler Mukopolysaccharide kann durch Verwendung von Alcianblau auf das Anfärben von sauren Mukopolysacchariden erweitert werden.

Die Durchführung der PAS-Reaktion erfolgte institutsintern durch In-Fah M. Lee (Institut für Klinische Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin). Vor der Reaktion wurden die Zellkulturparaffinschnitte 10 min und 30 s in Xylol entparaffiniert und im Anschluss in einer absteigenden Alkoholreihe rehydratisiert (je 30s 100%, 96%, 70%, 30% Ethanol, *Aqua bidest*). Nach 3-minütiger Inkubation in 3% Essigsäure, 10-minütiger Einwirkung in Alcianblaulösung und einem Spülen mit *Aqua bidest* wurden die Schnitte 10 min in 1% Perjodsäure (frisch angesetzt) inkubiert. Nach erneutem Spülen mit *Aqua bidest* folgte ein 15-minütiger Inkubationsschritt in Schiff'schem Reagenz. Anschließend wurden die Schnitte drei Mal 2 min in Sultitwasser inkubiert, unter fließendem Leitungswasser gespült und mit *Aqua bidest* gewaschen. Es folgte ein 10-minütiges Einwirken von Hämatoxylin, ein darauf folgendes

Bläuen unter fließendem lauwarmen Leitungswasser und ein Spülen mit *Aqua bidest.* Abschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydratisiert (je 30 s 30%, 70%, 96%, 100% Ethanol), 30 s in Xylol geklärt und mit Pertex eingedeckt. Aufnahmen der ausgehärteten Schnitte wurden mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop (BX 60, Olympus) bei 40-facher Vergrößerung erstellt.

3.6.4 Immunfluoreszenzfärbung

Über eine Antigen-Antikörper-Bindung mit Kopplung des Antikörpers an einen Fluoreszenzfarbstoff lassen sich die Verteilungsmuster bestimmter zellulärer Proteine spezifisch markieren und anschließend fluoreszenzoptisch visualisieren. Eine gleichzeitige Färbung mehrerer Proteine kann dann erfolgen, wenn die eingesetzten proteinspezifischen Primärantikörper aus verschiedenen Spezies stammen und somit die anschließend applizierten spezies-spezifischen, fluorophormarkierten Sekundärantikörper gezielt nur den Primärantikörper gleicher Spezies erkennen. Auf diese Weise werden Proteine indirekt markiert. Es ist jedoch auch möglich, ein Protein über einen fluorophormarkierten Primärantikörper zu markieren.

Für eine zell- bzw. gewebeinterne Orientierung wurden zusätzlich zum Zielprotein meistens auch ein Referenzprotein, die sogenannte Gegenfärbung, sowie der Zellkern markiert. Letzteres basiert auf keinem immunologischen Prinzip, sondern auf Interkalierung des Fluoreszenzfarbstoffs DAPI mit der DNA. Die Darstellung von Actinfilamenten durch das mit hoher Affinität daran bindende Mycotoxin Phalloidin ist ebenfalls nicht immunologischer Natur. Da eine für IPEC-J2-Layer etablierte Methanolfixierung zum einen die native Struktur der Actinfilamente und zum anderen deren Epitope für Phalloidin beeinflusst, wurde im Falle der Actinfärbung an Zellkulturen auf die alternative PFA-Fixierung ausgewichen. Gewebeschnitte gesunder Ferkel wurden entweder mit Methanol (für Cldn1, -3, -5, -12, -15, Tric-a, Occl, ZO-1, E-cad, Ezrin, SGLT1, GLUT2, Na/K-ATPase, Vim) oder PFA (für Cldn2, -7, -8, E-cad) fixiert, was von der jeweiligen Primärantikörperpräferenz und somit dem visuellen Färbeergebnis abhing. Gewebeschnitte TGEV-infizierter Ferkel hingegen resultierten aus einer Formalinfixierung, welche sich gegen die PFA-Fixierung durchsetzte – eine Methanolfixierung kam wegen der erst „späten“ Fixierung nach Gewebepräparation und der damit verbundenen potentiellen Verbreitungsgefahr des Virus nicht infrage.

Zellkultur

Für die Immunfluoreszenzfärbung des Zielproteins (Cldn1, -2, -3, -5, -7, -8, -12, -15, Tric-a, Occl, Ezrin, SGLT1, GLUT2, Na/K-ATPase, Vim) und des Referenzproteins (Cldn4, E-cad, ZO-1, Actin) von Zelllayern wurde eine Kombination aus beiden Primärantikörpern mit 0,5%

Triton X-100 (in PBS^{+Ca/Mg}) verdünnt (siehe 3.1.7, Tab. 3.1) und in einem Volumen von 300 µl/Filter/Well einer 24-Wellplatte für 2 h bei RT und sachtem Schütteln inkubiert. Dies diente sowohl der Permeabilisierung der Zellmembran durch das nicht-ionische Detergenz Triton X-100 als auch der Antikörperbindung. Nach einem 1- und zwei 10-minütigen Waschschritten mit PBS^{+Ca/Mg} wurden die Zellschichten mit einem in 0,5% Triton X-100 und 1 µg/ml DAPI (in PBS^{+Ca/Mg}) entsprechend verdünnten Mix aus den Sekundärantikörpern (siehe 3.1.7, Tab. 3.1) bzw. Phalloidin-Atto 647N (1:200) für 2 h bei RT und sachtem Schütteln im Dunkeln inkubiert. Nach einem 1- und zwei 10-minütigen Waschschritten mit PBS^{+Ca/Mg} schloss sich die Inkubation in *Aqua bidest* an, bis die Filter leicht abgetupft und eingedeckt wurden. Dabei wurden auf einem Objektträger zwei in Streifen geschnittene Deckglasspacer neben dem Filter platziert, dieser mit drei Tropfen ProTaq Mount Fluor (Biocyc) beträufelt und mit einem Deckglas blasenfrei eingedeckt. Die Objektträger wurden bis zur Mikroskopie im Dunkeln bei RT gelagert.

Gewebe

Während methanolfixierte Schnitte ohne weitere Behandlung für die Immunfluoreszenzfärbung verwendbar waren, bedurften sowohl PFA-fixierte Cryoschnitte als auch formalinfixierte Paraffinschnitte vorab einer Demaskierung potentieller Epitope. Dazu wurden die PFA-fixierten Cryoschnitte 15 min in EDTA-Puffer gekocht und in abgekühltem Zustand mit PBS^{+Ca/Mg} gewaschen und bis zum weiteren Vorgehen darin gelagert. Formalinfixierte Paraffinschnitte wurden zunächst während zwei 5-minütigen Inkubationen in Xylol entparaffiniert, anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (jeweils zwei Mal 5 min 100%, 96%, 80%, 70% Ethanol, *Aqua bidest*) rehydratisiert und zwei Mal 5 min in PBS^{+Ca/Mg} inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Schnitte 15 min in Citratpuffer gekocht und nach dem Auskühlen bis zur Weiterverarbeitung in PBS^{+Ca/Mg} gelagert.

Die Objektträger wurden aus dem PBS^{+Ca/Mg} genommen und die Schnitte darauf mit einer hydrophoben Flüssigkeit (Dako-Stift, Dako) umrandet, um für die folgende Färbung eine klar begrenzte und möglichst kleine Fläche zu schaffen. Anschließend wurden die Schnitte 5 min mit 0,5% Triton X-100 (in PBS^{+Ca/Mg}) permeabilisiert und danach für 1 h bei RT in Blockierlösung inkubiert, um unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden. Für die Immunfluoreszenzfärbung des Zielproteins (Cldn1, -2, -3, -5, -7, -8, -12, -15, Occl, Tric-a, Ezrin, SGLT1, GLUT2, Na/K-ATPase, Vim, Caspase-3) und des Referenzproteins (E-cad, ZO-1) an Gewebeschnitten wurden beide in Blockierlösung verdünnten Primärantikörper (siehe 3.1.7, Tab. 3.1) als Mix in einem Volumen von 100-200 µl/Objektträger (je nach Anzahl der Schnitte) für 1,5 h bei RT inkubiert. Nach Abspülen der Primärantikörper mit Blockierlösung wurden die Schnitte zwei Mal 5 min in selbiger Lösung inkubiert, wonach die

Schnitte in 100-200 μl der in Blockierlösung verdünnten Sekundärantikörper (siehe 3.1.7, Tab. 3.1) mit 1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI für 1,5 h bei RT im Dunkeln inkubiert wurden. Nach einem Waschschrift mit Blockierlösung und zwei Mal 5-minütiger Inkubation in Blockierlösung wurden die Schnitte schließlich drei Mal in *Aqua bidest* getaucht, leicht abgetupft, mit zwei Tropfen ProTaq Mount Fluor (Biocyc) beträufelt und mit einem Deckglas blasenfrei eingedeckt.

3.6.5 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Mit der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie können optische Schnitte in räumlich ausgedehnten Objekten visualisiert werden. Dabei wird eine Probe von einem Laserstrahl definierter Wellenlänge Punkt für Punkt bestrahlt und auf diese Weise die Fokusebene zeilenweise abgerastert (x- und y-Achse). Das von der Fokusebene emittierte Licht sowie emittiertes Streulicht darunter und darüber liegender Probenebenen treffen dann auf eine Lochblende variablen Durchmessers, durch welche Streulicht von der Detektion weitestgehend ausgeschlossen wird. Dadurch wird die betrachtete Probenebene von einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop in einem Bild höherer Auflösung dargestellt als es mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop möglich ist, bei welchem emittiertes Licht der Fokusebene von emittiertem Streulicht überlagert wird. Räumliche Bildinformationen werden erhalten wenn der Laserstrahl verschiedene Probenebenen einer festgelegten Tiefe abrastert (z-Achse). Ein vollständiges Bild entsteht dabei erst, nachdem die ausgesandten punktuellen Lichtsignale von einem Rechner zu einem Ganzen übersetzt wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem LSM 510 META (Zeiss) gearbeitet, einem inversen Mikroskop, dessen Objektive (**Tab. 3.3**) sich unterhalb des Objektisches befinden. Für die Aufnahme immunfluoreszenzgefärbter Proben wurden die in **Tabelle 3.4** aufgelisteten Fluorophore mit Laserlicht einer passenden Wellenlänge ($\lambda^{\text{Exzitation}}$) angeregt und das emittierte Licht im angegebenen Wellenlängenbereich ($\lambda^{\text{Emission}}$) detektiert (**Tab. 3.4**).

Tab. 3.3: Verwendete Objektive.

Objektive

- 20 \times / 0,5 NA Plan-Neofluar
- 40 \times / 1,1 NA Water LD C-Apocromat
- 40 \times / 1,3 NA Oil Plan-Neofluar
- 63 \times / 1,4 NA Oil Plan-Apochromat

Tab. 3.4: Verwendete Fluorophore und Wellenlängen.

Fluorophore	$\lambda^{\text{Exzitation}}$ (nm)	$\lambda^{\text{Emission}}$ (nm)
• DAPI	405	420-480
• DyLight™488, FITC	488	505-550
• AlexaFluor®594	543	582-647
• AlexaFluor®647, Atto 647N	633	657-754

Während von Gewebeschnitten Aufnahmen in xy-Achsenorientierung erstellt wurden, dienten sowohl xy- als auch xz- und yz-Achsenansichten der Darstellung von Zelllayern. Die Präsentation der Aufnahmen erfolgte mit der LSM 510 META-spezifischen Software sowie Fiji (Schindelin, MPI-CBG).

Live Cell Imaging

Um die maximale Zellhöhe sowie -breite lebender Zellen zu erfassen, ohne diese Parameter durch Fixierung möglicherweise zu beeinflussen, wurden lebende, auf Filtern wachsende Zelllayer mit einer Fluorophorlösung umgeben und analysiert.

Dazu wurde der Filter aus dem Kunststoffrahmen ausgestanzt, invers (Zellen nach unten) in einem Tropfen HEPES-Ringerlösung auf einem großen Deckglas über dem Objektiv platziert und mechanisch fixiert. Anschließend wurden 20 μl FD4 (25 mM) auf den Filter appliziert, um den parazellulären Raum sowie die Umgebung damit zu fluten. Die Aufnahme der Zellgrenzen erfolgte in xy- und xz-Achsenorientierung mit dem LSM 510 META (Zeiss).

Für die Bestimmung der IPEC-J2-Zellhöhe wurden mittels *Live Cell Imaging* aufgenommene xz-Ansichten ausgewertet, für die Bestimmung der Höhe porziner Jejunozysten wurden Immunfluoreszenzaufnahmen E-cadherin-gefärbter Mukosalängsschnitte herangezogen. An jeweils drei verschiedenen Monolayern bzw. Gewebeschnitten wurde die Zellhöhe bestimmt (IPEC-J2/FBS: je 6-12 Zellen, IPEC-J2/PS: je 11-18 Zellen, Jejunum: je 6-9 Zellen). *Live Cell Imaging*-Aufnahmen in xy-Achsenansicht sowie Immunfluoreszenzaufnahmen Junction-Protein-gefärbter Zelllayer bzw. Mukosaquerschnitte dienten der Bestimmung des „Durchmessers“ der Zellen. Diese erfolgte nach Auszählung der Zellen einer definierten Fläche (IPEC-J2/FBS: 10.000-40.000 μm^2 , IPEC-J2/PS: 10.000-20.000 μm^2 , Jejunum: 400-2500 μm^2) dreier verschiedener Monolayer bzw. Mukosaquerschnitte. Mit der hypothetischen Annahme einer ideal hexagonalen Zellform wurde aus der Zellfläche (A) nach $D = 2 \cdot \sqrt{\left(\frac{A}{\sqrt{3}} \cdot \frac{2}{3}\right)}$ die Diagonale über drei Seiten (D) als „Durchmesser“ ermittelt. Die Darstel-

lung und Analyse der Aufnahmen wurde mit der LSM 510 META-spezifischen Software ausgeführt.

3.6.6 Ultradünnschnitte und Elektronenmikroskopie

Durch die Dünnschnitttechnik und anschließende Transmissionselektronenmikroskopie können feine zelluläre Substrukturen wie Organellen und Mikrovilli veranschaulicht werden.

IPEC-J2-Zelllayer wurden nach Waschen in PBS^{+Ca/Mg} in Karnovsky's Fixationsgemisch fixiert und über Nacht gelagert. Die folgenden vorbereitenden Schritte zur Herstellung von Ultradünnschnitten sowie das Schneiden selbst erfolgten SFB 852-intern durch Monika Sachtleben (Institut für Veterinär-Anatomie, Freie Universität Berlin). Nach drei 10-minütigen Waschschritten mit Cacodylatpuffer wurden die Zelllayer in Osmiumtetroxidlösung nachfixiert und erneut vier Mal 10 min gewaschen. Anschließend wurden die Zelllayer für jeweils 10 min in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100% Ethanol) dehydratisiert, zwei Mal 10 min in Propylenoxid inkubiert und abschließend in einem Kunstharzgemisch (12,4% Agar 100 (w/v), 7,3% Dodecenylnhydrid (v/v), 3,6% *methyl nadic anhydride* (v/v), 0,6% Benzyldimethylamin (v/v)) eingebettet. Das Kunstharz wurde für jeweils 24 h bei 45 und 60 °C auspolymerisiert. Im Anschluss wurden mit einem Ultramikrotom (UltraCut S, Leica) 70 nm ultradünne Längsschnitte angefertigt, auf Kupfernetzgrids gezogen und mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert. Aufnahmen der Schnitte wurden institutsintern von In-Fah M. Lee (Institut für Klinische Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin) an einem mit einer Videokamera (iTEM, Soft Imaging Solution, Veleta) ausgestatteten Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss 902 A) bei 3.200- bzw. 22.000-facher Vergrößerung aufgenommen.

Ihrer Länge nach vollständig angeschnittene Mikrovilli sowie die Anzahl an Mikrovilli entlang einer definierten Strecke der apikalen Zellmembran (IPEC-J2/FBS: 4-6 µm, IPEC-J2/PS: 2-5 µm) wurden pro Kulturbedingung von drei verschiedenen Zellen unter Verwendung der Software *analySIS*[®] (Version 3.0, Münster) vermessen bzw. ausgezählt.

3.6.7 Gefrierbruch und Elektronenmikroskopie

Durch die Gefrierbruchtechnik können Membranultrastrukturen in ihren nativen Dimensionen mittels Elektronenmikroskopie analysiert werden. Die angewandte Gefrierbruchmethode führt zu einem Zellmembranbrechen entlang des hydrophoben Membraninneren und somit zu zwei Bruchflächen. Komponenten der TJ zeichnen sich als reliefartige Struktur auf der protoplasmatischen Seite und als komplementäre Vertiefung auf der exoplasmatischen Seite ab.

In 6-Wellplatten kultivierte IPEC-J2 wurden zunächst mit PBS^{+Ca/Mg} gewaschen und danach 1 h in Glutaraldehydpuffer I fixiert, wohingegen auf PlexiglasTM-Ringe geklebtes Gewebe 4 h in Glutaraldehydpuffer I fixiert wurde. Zellen und Gewebe wurden anschließend in Glutaraldehydpuffer II einige Tage bei 4 °C gelagert. Nach mindestens jeweils 30-minütiger Entwässerung der Proben in 10% und 30% Glycerol bei RT erfolgte die Durchführung des Gefrierbruchs sowie der Elektronenmikroskopie institutsintern durch In-Fah M. Lee (Institut für Klinische Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin). Das Gewebe wurde entsprechend zurechtgeschnitten und die Zellen wurden mithilfe eines Skalpells vom Kunststoffboden des Wells abgeschabt und in einen Gefrierbruchhalter transferiert, der danach in mit flüssigem Stickstoff gekühltes Freon 22 eingefroren wurde. Anschließend wurde die tiefgekühlte Probe in ein Gefrierbruchgerät (Denton Vacuum DV-502) eingebaut und bei -100 °C unter Vakuum ($2 \cdot 10^7$ Torr) gebrochen. Weiterhin gekühlt und unter Vakuum wurde die Probe erst mit Platin, dann schräg versetzt mit Kohlenstoff bedampft, wodurch die Repliken, das heißt metallene Abdrücke der darunter liegenden Schichten, entstanden. Organische Reste der Repliken wurden in 1-stündiger Inkubation mit Natriumhypochlorit weggeätzt. Abschließend wurden die Repliken mit *Aqua bidest* gewaschen, auf Kupfernetzgrids übertragen und mit Amylacetat gespült.

Die erzeugten Repliken wurden an einem Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss 902 A) durchgemustert und mittels einer angeschlossenen Videokamera (iTEM, Soft Imaging Solution, Veleta) digital aufgenommen. Für die morphometrische Auswertung der TJ (institutsinterne Zusammenarbeit mit Dr. Susanne M. Krug, Institut für Klinische Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin) wurde bei 51.000-facher Vergrößerung ein virtuelles Gitternetz an den am weitesten apikal gelegenen TJ-Strang angelegt, wodurch die vertikale Netzausdehnung gemessen und die horizontale Strangzahl bestimmt werden konnten. Zusätzlich wurden die analysierten TJ-Stränge entweder als kontinuierlich oder partikelartig klassifiziert.

3.7 Molekularbiologische Methoden

3.7.1 RNA-Extraktion

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus Zelllayern kleiner Zellkulturflaschen bzw. jejunalem Gewebe erfolgte durch eine Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Fällung, basierend auf der *single step*-Methode (CHOMCZYNSKI AND SACCHI, 1987). Unter Verwendung des peqGOLD RNAPureTM-Reagenzes (peqLab) wurde nach Angaben des Herstellers vorgegangen, indem die RNA nach Phasentrennung aus der wässrigen Phase isoliert, mit Isopropanol gefällt und mit 75%igem Ethanol gewaschen wurde. Nach Trocknen wurde das RNA-Pellet in Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser gelöst und bei -80 °C gelagert.

3.7.2 Bestimmung der RNA-Quantität

Die RNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch mittels NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) ermittelt. Dabei erfolgte die Konzentrationsbestimmung im DNA-/RNA-Absorptionsmaximum bei 260 nm.

3.7.3 DNase-Verdau

Um die Reinheit von RNA-Lösungen durch Eliminierung genomischer DNA-Kontaminationen zu erhöhen, wurde die RNA (siehe 3.7.1) unter Verwendung des NucleoSpin[®] RNA/Protein Kits (Protokoll 5, Schritte 4-9; Macherey-Nagel) mittels rDNase verdaut.

3.7.4 Reverse Transkription

Durch die reverse Transkriptase und zufällig verteilten, als Primer fungierende Hexamer-Nukleotiden wurde RNA der DNase-verdauten Lösung in *copy* DNA (cDNA) umgeschrieben. Diese besteht, im Gegensatz zu genomischer DNA, komplett aus kodierenden Exonsequenzen.

Für die reverse Transkription von RNA mittels High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) wurde zunächst ein Ansatz pipettiert (**Tab. 3.5**), der anschließend für 10 min bei 25 °C und 2 h bei 37 °C im Thermocycler 2720 (Applied Biosystems) inkubiert wurde. Die resultierende cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

Tab. 3.5: Ansatz für die reverse Transkription.

Reverse Transkriptase-Puffer (10×)	4 µl
dNTPs (25×)	1,6 µl
Random Hexamer Primers	4 µl
RNase Out (Inhibitor)	1 µl
Reverse Transkriptase	2 µl
RNA	≤ 4 µg
Wasser (RNase-frei)	ad 40 µl

3.7.5 Polymerasekettenreaktion

Über die Polymerasekettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) lässt sich mithilfe einer DNA-Polymerase und spezifischen Primern ein bestimmter DNA-Abschnitt *in vitro* vervielfältigen.

Um die Existenz bestimmter Claudingene zu überprüfen, wurde ein Genabschnitt mittels entsprechender Primerpaare (siehe 3.1.8, Tab. 3.2) und einer *Taq*-Polymerase amplifiziert. Die aus dem bakteriellen *Thermus aquaticus* (*Taq*) stammende *Taq*-Polymerase ist außergewöhnlich hitzestabil und aus diesem Grund über viele PCR-Amplifikationszyklen einsetzbar. Der PCR-Ansatz wurde unter Verwendung der HotStarTaq® DNA Polymerase (Qiagen) nach geeignetem Schema pipettiert (Tab. 3.6) und anschließend im Thermocycler 2720 (Applied Biosystems) während eines genabschnittspezifischen Temperaturprofils inkubiert (Tab. 3.7).

Tab. 3.6: PCR-Ansatz.

PCR-Ansatz	
<i>Taq</i> -Puffer (10×)	2,5 µl
Primer (for)	2,5 µl
Primer (rev)	2,5 µl
dNTPs	2 µl
cDNA	0,2 µg
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 µl
Wasser (RNase-frei)	ad 25 µl

Tab. 3.7: Temperaturprofil.

Temperaturprofil		
	95 °C	15 min
	95 °C	30s
Claudin-2	62 °C	30s
Claudin-12	58 °C	30s
Claudin-15	59 °C	30s
	72 °C	1 min
	72 °C	10 min
	4 °C	∞

35x

3.7.6 Agarosegelelektrophorese

Über Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und mithilfe von Ethidiumbromid durch Interkalierung mit der DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Diese Methode diente der Überprüfung der vorangegangenen PCR, indem die Größe amplifizierter DNA-Fragmente mit der erwarteten verglichen wurde.

Nach Beladung eines Agarosegels (1% Agarose in TAE-Puffer, 0,5% Ethidiumbromid) mit jeweils 5 µl PCR-Produkt in DNA-Probenpuffer (1×) und die Probentaschen flankierend mit 7 µl eines Längenstandards (TriDye 100 bp DNA Ladder, NEB) erfolgte die elektrophoretische Auftrennung in TAE-Puffer in einer Flachbettelektrophoresekammer (Bio-Rad) bei 60 mV für etwa 1 h. Die Visualisierung des DNA-Bandenmusters erfolgte mittels Lumineszenzbildanalysator LAS-100 (FujiFilm).

3.7.7 PCR-Aufreinigung und Sequenzierung

Da entweder keine bzw. nur eine Art eines amplifizierten DNA-Fragments im jeweiligen PCR-Ansatz vorhanden war (siehe 4.1.6.1, Abb. 4.14B), wurde auf eine Bandenaufreinigung aus dem Agarosegel verzichtet und die DNA aus dem PCR-Ansatz direkt aufgereinigt (NucleoSpin[®] Extract II Kit, Protokoll 5; Macherey-Nagel) und für die Sequenzierung nach Sanger (Kettenabbruchsynthese) mit dem entsprechenden *forward*-Primer (siehe 3.1.8, Tab. 3.2) der Firma LGC Genomics (Berlin) übergeben. Die Darstellung der erhaltenen Sequenzen erfolgte mit Chromas LITE (Technelysium Pty Ltd), deren Abgleich mit Datenbanken über BLAST.

3.8 Statistik

Alle Experimente wurden n-fach durchgeführt und daraus resultierende Messwerte als arithmetisches Mittel (Mittelwert, MW) ± SEM (engl. *standard error of the mean*) angegeben. Jede Wertegruppe wurde mittels Grubbs' Test auf das Vorhandensein eines Ausreißers getestet. Werte, die als Ausreißer identifiziert wurden, wurden eliminiert.

3.8.1 Student's t-Test und Bonferroni-Holm-Korrektur

Die Irrtumswahrscheinlichkeit p zwischen zwei Wertegruppen wurde mithilfe des zweiseitigen Student's t-Tests für gepaarte bzw. ungepaarte Stichproben ungleicher Varianz ermittelt. Für den Vergleich verschiedener Wertegruppen mit der Kontrollgruppe, wurden die p -Werte nach Bonferroni-Holm korrigiert. Unterschiede wurden als signifikant eingestuft, wenn $p < 0,05$ war (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,001$; ***, $p < 0,001$).

3.8.2 Ein- und zweifaktorielle ANOVA

Wurden für die Erfassung von Effekten innerhalb von Altersgruppen bzw. zwischen Altersgruppen mehr als zwei Wertegruppen hinsichtlich ihrer Irrtumswahrscheinlichkeiten p untereinander verglichen, wurde eine ein- bzw. zweifaktorielle ANOVA (engl. *analysis of variance*) mit dem Tukey HSD Post-hoc-Test angewandt, wobei $p < 0,05$ als signifikant bewertet wurde (Signifikanzlevel siehe 3.8.1).

4 ERGEBNISSE

Da die in der Literatur konventionell kultivierten IPEC-J2, wie unter 1.4.2 erläutert, für die intestinale Barriereforschung nicht ohne Weiteres verwendbar schienen, lag die Priorität zunächst darin, IPEC-J2 als ein geeignetes Modell für das porcine Dünndarmepithel zu etablieren. Deshalb soll im Folgenden zunächst auf die Zellmodellthematik eingegangen werden, von der aus über *in vitro*-Zinkbehandlungen die Ferkelfütterungsversuche mit Zink thematisiert werden.

4.1 Re-Etablierung des porzin-jejunalen Zellmodells IPEC-J2

Um die Eignung des porcinen intestinalen Zellkulturmodells IPEC-J2 für Untersuchungen an der epithelialen Barriere festzustellen, ist der Vergleich mit Eigenschaften des nativen Jejunumepithels vom Schwein unabdingbar. Aus diesem Grund werden im Folgenden, wenn es die Methodik zulässt, zum Vergleich selbsterhobene Daten von acht Wochen alten unbehandelten Schweinen herangezogen.

4.1.1 Optimierung der Kultivierungsbedingungen

Auf Filtern kultivierte IPEC-J2-Monolayer wiesen mit $3.842 \pm 125 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (n=20) einen immens hohen TER auf, bei gleichzeitig abnormer (flach, groß) Zellmorphologie (**Abb. 4.1**) – ungewöhnlich für intestinale Epithelzellkulturen, die die prismatische Form und hohe Transportaktivität des nativen Darmepithels widerspiegeln sollten. Der epitheliale Widerstand über das porcine Jejunumepithel lag zum Vergleich bei $28 \pm 5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (n=15). Bevor IPEC-J2 als Modell für die epitheliale Barriere zum Einsatz kommen würden, bestand somit ausdrücklicher Bedarf an der Optimierung dieses Zellsystems – hinsichtlich moderaten TER und physiologischen Zelldimensionen.

Der einzige Ansatzpunkt, die Zellphysiologie von IPEC-J2 exogen zu beeinflussen, war die Veränderung der Kulturbedingungen. Der TER von auf Filtern gewachsenen Zelllayern wurde hierzu als erster Anhaltspunkt der Barriereigenschaften gemessen und dokumentiert. Als weiterer und leicht zugänglicher Parameter diente die Zellmorphologie. Tag 14 wurde als Zeitpunkt festgesetzt, zu dem TER-Werte aller verschiedenen kultivierten Zelllayer miteinander verglichen wurden, da zu diesem Zeitpunkt unter allen Bedingungen konstante TER-Werte erreicht waren. Die Werte sind in **Tabelle 4.1** dargestellt und sollten die bereits in der Literatur getesteten Bedingungen (siehe 1.4.1) ergänzen.

Tab. 4.1: Getestete Kultivierungsbedingungen an IPEC-J2. IPEC-J2-Monolayer wurden unter verschiedenen Bedingungen auf Filtermembranen kultiviert und ihr TER regelmäßig dokumentiert. Soweit nicht anders vermerkt, wurden die TER-Werte aller Bedingungen an Tag 14 vergleichend gegenübergestellt. Gezeigt sind MW ± SEM, n=3-12.*

Nummer	Medium	Serum	Zusätze	Antibiose	Filtermaterial	Filterporengröße [µm]	Filterbeschichtung	Saadichte [Zellen/cm ²]	Kultivierungstemperatur [°C]	Differenzierungsreagenz	Kultivierungsregime	TER, Tag 14 [Ω·cm ²]
1	DMEM/ F-12/HAM	10% FBS	/	1% Pen/Strep	HA	0,45	/	1,8×10 ⁵	37	/	submerged	3.372 ± 311
2	DMEM/ F-12/HAM	10% FBS	/	/	HA	0,45	/	1,8×10 ⁵	37	/	submerged	1.452 ± 139
3	DMEM/ F-12/HAM	10% FBS	/	1% Pen/Strep	HA	0,45	Kollagen	1,8×10 ⁵	37	/	submerged	4.079 ± 293
4	DMEM/ F-12/HAM	10% FBS	/	1% Pen/Strep	HA	0,45	/	1,7×10 ⁵	37	/	submerged	4.247 ± 190
5	DMEM/ F-12/HAM	10% FBS	/	1% Pen/Strep	HA	0,45	/	1,8×10 ⁵	39	/	submerged	6.069 ± 243
6	DMEM/ F-12/HAM	10% FBS	/	1% Pen/Strep	HA	0,45	/	1,8×10 ⁵	37	Dexa	submerged	5.658 ± 159
7	DMEM/ F-12/HAM	10% FBS	/	1% Pen/Strep	HA	0,45	/	1,8×10 ⁵	37	- 10% FBS	submerged	2.394 ± 180
8	DMEM/ F-12/HAM	10% FBS	/	1% Pen/Strep	HA	0,45	/	1,8×10 ⁵	37	/	air liquid interface	4.265 ± 153
9	DMEM/ F-12/HAM	10% FBS	/	1% Pen/Strep	HA	0,45	/	1,8×10 ⁵	37	/	submerged, 95% O ₂	362 ± 63
10	RPMI 1640	10% FBS	/	1% Pen/Strep	HA	0,45	/	1,8×10 ⁵	37	/	submerged	3.467 ± 399
11	DMEM/ F-12/HAM	10% FBS	/	1% Pen/Strep	PCF	0,4	/	1,8×10 ⁵	37	/	submerged	4.786 ± 163
12	DMEM/ F-12/HAM	10% FBS	/	1% Pen/Strep	PCF	3,0	/	1,8×10 ⁵	37	/	submerged	28 ± 5
13	DMEM/ F-12/HAM	10% FBS	/	1% Pen/Strep	PC	0,4	/	1,8×10 ⁵	37	/	submerged	11.200 ± 323
14	DMEM/ F-12/HAM	10% FBS	/	1% Pen/Strep	PTFE	0,4	Kollagen	1,8×10 ⁵	37	/	submerged	9.911 ± 340
15	DMEM/ F-12/HAM	10% FBS	/	1% Pen/Strep	PTFE	3,0	Kollagen	1,8×10 ⁵	37	/	submerged	8.092 ± 485
16	DMEM/ F-12/HAM	10% FBS	/	1% Pen/Strep	PET	0,4	/	1,8×10 ⁵	37	/	submerged	9.911 ± 340
17	DMEM/ F-12/HAM	10% FBS	/	1% Pen/Strep	PET	1,0	/	1,8×10 ⁵	37	/	submerged	8.275 ± 64
18	DMEM/ F-12/HAM	5% FBS	ITS, EGF	1% Pen/Strep	HA	0,45	/	1,8×10 ⁵	37	/	submerged	3.162 ± 65
19	DMEM/ F-12/HAM	5% ABS	ITS, EGF	1% Pen/Strep	HA	0,45	/	1,8×10 ⁵	37	/	submerged	3.050 ± 218
20	DMEM/ F-12/HAM	5% GS	ITS, EGF	1% Pen/Strep	HA	0,45	/	1,8×10 ⁵	37	/	submerged	3.870 ± 267
21	DMEM/ F-12/HAM	5% PS	ITS, EGF	1% Pen/Strep	HA	0,45	/	2×10 ⁵	37	/	submerged	274 ± 26
22	DMEM/ F-12/HAM	5% PS (F)	ITS, EGF	1% Pen/Strep	HA	0,45	/	2×10 ⁵	37	/	submerged	447 ± 73
23	DMEM/ F-12/HAM	5% PS (HI)	ITS, EGF	1% Pen/Strep	HA	0,45	/	2×10 ⁵	37	/	submerged	531 ± 16
24	DMEM/ F-12/HAM	5% PS (HI ^a)	ITS, EGF	1% Pen/Strep	HA	0,45	/	2×10 ⁵	37	/	submerged	329 ± 46
25	DMEM/ F-12/HAM	10% PS	/	1% Pen/Strep	HA	0,45	/	2×10 ⁵	37	/	submerged	256 ± 11

*Anmerkung: Nr. 8 – Nach drei Tagen submerged-Kultivierung wurden die Zelllayer unter air liquid interface-Bedingungen kultiviert und wurde anschließend wöchentlich der TER gemessen. Der

angegebene TER bezieht sich auf Tag 10. Abkürzungen: DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium, RPMI – Roswell Park Memorial Institute, FBS – fötales Rinderserum, ABS – adultes Rinderserum, GS – adultes Ziegenserum, PS (F, HI, HI^a) – trübes adultes Schweineserum (gefiltert (0,22 µm), hitzeinaktiviert, hitzeinaktiviert und klar von weiterem Hersteller (Biochrom)), ITS – Insulin/Transferrin/Selenium, EGF – epidermaler Wachstumsfaktor, Pen/Strep – Penicillin und Streptomycin, HA – gemischte Zelluloseester, PCF – Polyvinylpyrrolidon-freies Polycarbonat, PC – Polycarbonat, PTFE – Polytetrafluorethylen, PET – Polyethylenterephthalat, submerged – von beiden Seiten mit Medium kultiviert.

Ausgehend von der Startbedingung (**Tab. 4.1, Nr.1**) wurden die Auswirkungen der Antibiose (**Tab. 4.1, Nr. 2**), der Filterbeschichtung (**Tab. 4.1, Nr. 3**), der Saaddichte (**Tab. 4.1, Nr. 4**), der Kultivierungstemperatur (**Tab. 4.1, Nr. 5**) sowie Maßnahmen zur Zelldifferenzierung (**Tab. 4.1, Nr. 6 und 7**) getestet. Außerdem wurden der Effekt des Kulturmediums (**Tab. 4.1, Nr. 10**) und des Filtermaterials inklusive der Filterporengröße (**Tab. 4.1, Nr. 11-17**) auf den TER untersucht. Hier ist anzumerken, dass der niedrige TER von IPEC-J2 auf PCF-Filtern einer Porengröße von 3,0 µm (**Tab. 4.1, Nr. 12**) fluoreszenzoptisch (nicht gezeigt) auf fehlende Zell-Zell-Kontakte zurückgeführt werden konnte. Zudem wurde geprüft, ob die Wirkung des Serumanteils bzw. von Zusätzen Einfluss auf den TER nimmt (**Tab. 4.1, Nr. 18**). Ferner wurden Zelllayer unter *air liquid interface*-Bedingungen bzw. 95% O₂ kultiviert (**Tab. 4.1, Nr. 8 und 9**). Hierbei muss der niedrige TER unter 95% O₂ (**Tab. 4.1, Nr. 9**) relativiert werden, denn 50% der Zelllayer wiesen bereits nach zwei Wochen einen vernachlässigbaren TER auf (<15 Ω·cm², von zuvor bis zu 3.000 Ω·cm²), was an Tag 28 sogar für 100% der Zelllayer galt. Somit konnte keine der bis hierhin getesteten Kultivierungsbedingungen den TER des intakten IPEC-J2-Layers über eine Größenordnung hinweg reduzieren.

Damit die Zellen optimal mit Wachstumsfaktoren, Hormonen und anderen serumtypischen Bestandteilen versorgt waren, wurde dem Kulturmedium standardmäßig Serum des fötalen Rindes (FBS, engl. *fetal bovine serum*) zugesetzt. Ob das Serum einer anderen Spezies Unterschiede bezüglich des TER hervorruft, wurde geprüft, indem die Zelllayer nahe- liegender Weise mit adultem Schweineserum (PS, engl. *porcine serum*) (**Tab. 4.1, Nr. 25**) kultiviert wurden. Überraschenderweise führte dies zu dem angestrebten Effekt: Der TER lag mit 256 ± 11 Ω·cm² (n=7) im physiologischen Bereich.

Um auszuschließen, dass die Wirkung des Schweineserums vom prozentualen Serumanteil im Medium (**Tab. 4.1, Nr. 21**), vom Trübheitsgrad (**Tab. 4.1, Nr. 22**), von der Hitzeinaktivierung (**Tab. 4.1, Nr. 23**) oder vom Hersteller (**Tab. 4.1, Nr. 24**) abhing, wurden entsprechende Möglichkeiten geprüft und für irrelevant befunden, da sich der TER weiterhin

auf einem niedrigen Niveau hielt. Ob der beobachtete Effekt durch Schweineserum aus dem Alter des Blutdonortieres resultierte oder serumspeziespezifisch war, wurde anhand geeigneter Kultivierungsbedingungen untersucht (Tab. 4.1, Nr. 19 und 20), mit dem Ergebnis, dass die Serumspezies allein den entscheidenden Faktor darstellte.

Parallel zum TER-Effekt (Abb. 4.1A) zeigten *Live Cell Imaging*-Aufnahmen eine drastisch veränderte Morphologie der PS-kultivierten IPEC-J2, die nun deutlich höher und schmäler waren als die FBS-kultivierten Zellen (Abb. 4.1B).

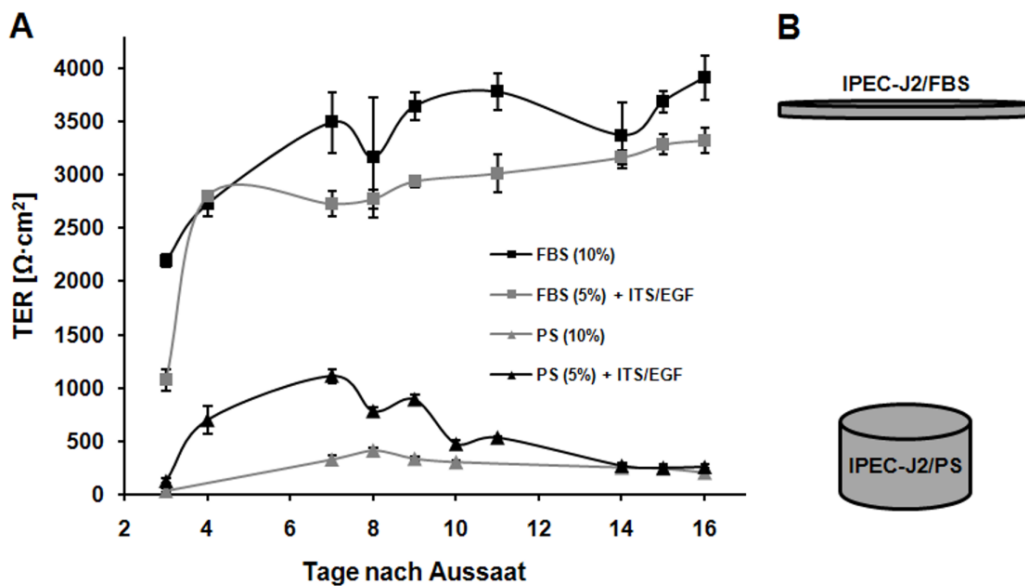


Abb. 4.1: TER-Verlauf und Größenproportionen von IPEC-J2. (A) Verlauf des TER von IPEC-J2-Layern unter dem Einfluss verschiedener Kulturbedingungen (wie in der Abbildung erläutert). PS verhinderte die Entwicklung eines FBS-typischen TER. Gezeigt sind MW \pm SEM, jeweils $n=4-5$. (B) Schematische Darstellung der Größenproportionen von IPEC-J2/FBS (oben) und IPEC-J2/PS (unten), die mittels *Live Cell Imaging* ermittelt wurden (siehe 4.1.3, Abb. 4.8).

Während der TER-Verlauf unter 10% PS nach ~ 7 Tagen relativ konstant blieb, entwickelte sich unter 5% PS mit ITS/EGF (IPEC-J2/PS) nach ~ 7 Tagen ein maximaler TER, welcher sich nach ~ 14 Tagen auf ein tiefer liegendes Plateau ($200-600 \Omega \cdot \text{cm}^2$) für die Dauer einiger Tage einstellte (Abb. 4.1A). Die Kultivierung unter 5% PS mit ITS/EGF resultierte zudem in einem gleichmäßigeren Zelllayer, weshalb diese Bedingung zur weiteren funktionellen, morphologischen sowie molekularen Charakterisierung der IPEC-J2 im Zeitfenster des TER-Plateaus ausgewählt wurde. Da sich die TER-Verläufe (Abb. 4.1A) der FBS-kultivierten flachen, großen IPEC-J2 (Abb. 4.1B) nicht wesentlich voneinander unterschieden, wurde aufgrund einer Vielzahl bereits unter 10% FBS erhobener Daten für die Charakterisierung die

Kultivierung mit 10% FBS (IPEC-J2/FBS) gewählt und der Zeitpunkt experimenteller Analysen an IPEC-J2/PS angepasst.

Dass Änderungen der IPEC-J2-Morphologie und des TER auf eine veränderte Wachstumsrate zurückzuführen waren, wurde ausgeschlossen, da die Zellproliferation von IPEC-J2/PS ($172 \pm 12\%$, $n=4$) und IPEC-J2/FBS ($164 \pm 9\%$, $n=4$) (**Abb. 4.2**) nicht verschieden waren.

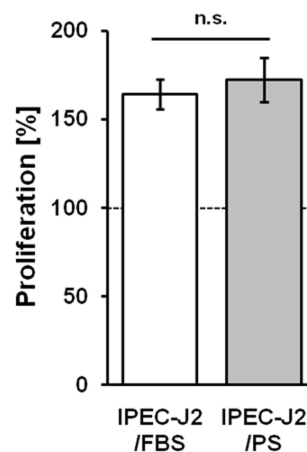


Abb. 4.2: Zellproliferation. Stoffwechselaktive IPEC-J2 wurden zu zwei Zeitpunkten mithilfe des WST-Assays quantifiziert. Die Proliferationsraten zwischen 4 h (100%) und 72 h nach Aussaat waren nicht verschieden (*n.s.*) zwischen IPEC-J2/FBS und IPEC-J2/PS. Gezeigt sind $MW \pm SEM$; jeweils vier verschiedene Zellpassagen wurden analysiert. Dieser Datensatz entstand SFB 852-intern in Kooperation mit Dr. Angelika Bondzio vom Institut für Veterinär-Biochemie der Freien Universität Berlin, die den Proliferationsassay durchführte.

4.1.2 Elektrophysiologische Charakterisierung

Für den Vergleich von epithelflächenabhängigen Messwerten zwischen IPEC-J2 und porzinem Jejunumepithel muss berücksichtigt werden, dass die Epithelfläche des Jejunums durch Zotten und Krypten im Vergleich zur *Lamina muscularis mucosae* enorm vergrößert ist. In der Zellkultur ist keine entsprechende Oberflächenvergrößerung zu beobachten, denn IPEC-J2 wachsen plan auf der Filtermembran. Aus diesem Grund wurde von Juliane Rieger (Veterinär-Anatomie der Freien Universität Berlin) im Rahmen des SFB 852 ein für das Schwein spezifischer jejunaler Epithelflächenvergrößerungsfaktor ($11,3 \pm 0,5$, $n=13$; Wertebereich 8,7 bis 14,7) ermittelt, der aus Gründen der Zweckmäßigkeit gleich 10 gesetzt wurde. Entsprechend korrigierte (^{kor}) IPEC-J2-Daten waren nun direkt mit porzinen Messwerten vergleichbar.

Im direkten Vergleich ergab sich, dass IPEC-J2/FBS einen TER^{kor} ($384 \pm 12 \Omega \cdot cm^2$, $n=20$) entwickelten, der noch immer um eine Größenordnung höher lag als der Wert des Schweine-

jejunums ($28 \pm 5 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n=15$, $p<0,001$) (**Abb. 4.3**). Dagegen waren Werte der IPEC-J2/PS ($27 \pm 1 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n=20$, n.s.) und des Schweinejejunums nicht verschieden.

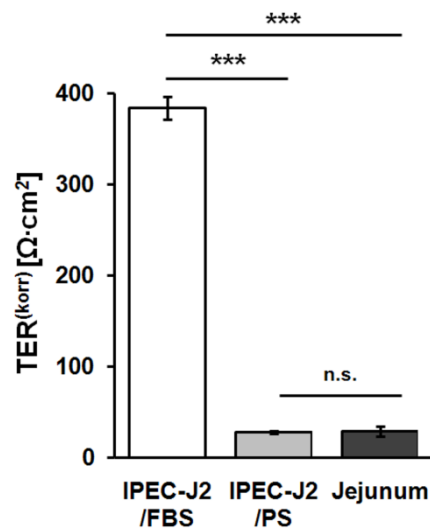


Abb. 4.3: Flächenkorrigierter TER. TER-Werte von IPEC-J2/FBS- und IPEC-J2/PS-Layern wurden bezüglich der porzinen jejunalen Epithelflächenvergrößerung (Faktor 10) korrigiert (TER^{korr}). Der TER^{korr} von IPEC-J2/FBS ($n=20$) war um eine Größenordnung höher als der von IPEC-J2/PS ($n=20$; ***, $p<0,001$) und der porzinen Jejunums ($n=15$, ***, $p<0,001$), wohingegen Letzterer nicht verschieden zu dem von IPEC-J2/PS ($n=20$, n.s.) war. Gezeigt sind MW \pm SEM.

Unterschiede im epithelialen Widerstand (R^{epi} , entspricht dem TER im Zellkultursystem, wenn Filterwiderstände wie gewöhnlich subtrahiert werden) können sowohl para- als auch transzellulär bedingt sein. Mithilfe der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie ließen sich para- (R^{para}) und transzelluläre (R^{trans}) Anteile des epithelialen Widerstands von IPEC-J2/FBS und IPEC-J2/PS ermitteln.

Wie in **Abbildung 4.4** dargestellt, setzte sich R^{epi} ($2111 \pm 356 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n=6$) von IPEC-J2/FBS aus R^{para} ($3323 \pm 1145 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n=6$) und R^{trans} ($4168 \pm 967 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n=6$) zusammen. Ähnlich, jedoch auf einem tieferen Widerstandsniveau, bestand R^{epi} ($242 \pm 28 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n=6$) der IPEC-J2/PS aus R^{para} ($411 \pm 62 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n=6$) und R^{trans} ($679 \pm 113 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n=6$). In IPEC-J2 beider Serumvarianten lag das Verhältnis R^{para}/R^{trans} leicht unter 1 (IPEC-J2/FBS, $0,85 \pm 0,2$, $n=6$; IPEC-J2/PS, $0,69 \pm 0,1$, $n=6$; siehe auch SCHMID ET AL. (2013)). Trotz des teilweise sehr hohen Widerstands (IPEC-J2/FBS), bedeutet $R^{para}/R^{trans}<1$ definitionsgemäß „leckes Epithel“ (SCHULTZ, 1972), wie es für das Jejunumepithel charakteristisch ist.

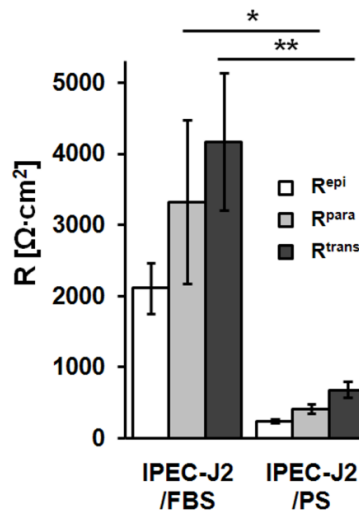


Abb. 4.4: R^{epi} , R^{para} , R^{trans} . Mittels Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie wurden R^{para} und R^{trans} von IPEC-J2/FBS und IPEC-J2/PS ermittelt. In IPEC-J2/PS konnte sowohl eine signifikante Verminderung von R^{para} (*, $p < 0,05$) als auch von R^{trans} (**, $p < 0,01$) verzeichnet werden, verglichen mit IPEC-J2/FBS. R^{epi} wurde aus $R^{para} \cdot R^{trans} / (R^{para} + R^{trans})$ ermittelt. Gezeigt sind MW \pm SEM, jeweils $n=6$.

Typische Eigenschaften des Jejunums sind sowohl die induzierbare Chloridsekretion als auch die Absorption von Nährstoffen, beispielsweise über den natriumabhängigen Glukosetransporter 1 (SGLT1). Aufgrund dieser Tatsache wurde untersucht, ob und in welchem Maße diese Eigenschaften auch auf IPEC-J2 zutreffen.

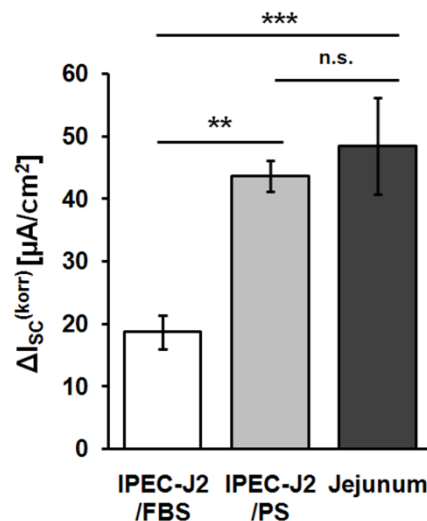


Abb. 4.5: Aktiver Ionentransport. Änderungen des forskolininduzierten Kurzschlussstroms (ΔI_{sc}) von IPEC-J2/FBS- und IPEC-J2/PS-Layern wurden bezüglich der porzinen jejunalen Epithelflächenvergrößerung (Faktor 10) korrigiert (ΔI_{sc}^{korr}). Stimulation durch Forskolin ergab in IPEC-J2/PS ($n=11$) eine signifikant erhöhte ionensekretorische Antwort, verglichen mit IPEC-J2/FBS ($n=10$, **, $p < 0,01$), die die Werte des Schweinejejunums ($n=9$, n.s.) fast erreichte. Gezeigt sind MW \pm SEM. ***, $p < 0,001$.

Der Stimulation mit Forskolin von IPEC-J2/PS-Layern folgte eine signifikant erhöhte Stromantwort ($\Delta I_{sc}^{korrr} = 44 \pm 2 \mu A/cm^2$, $n=11$), verglichen mit der von IPEC-J2/FBS-Layern ($19 \pm 3 \mu A/cm^2$, $n=10$, $p < 0,01$), die beinahe den Sekretionsstrom des porzinen Jejunums ($48 \pm 8 \mu A/cm^2$, $n=9$, n.s.) erreichte (**Abb. 4.5**). Die Glukoseabsorption wurde zum einen direkt als glukoseinduzierter Kurzschlussstrom, zum anderen indirekt als Kurzschlussstrom nach SGLT1-Inhibition durch Phlorizin untersucht. Entgegen den Erwartungen konnte in IPEC-J2/FBS und IPEC-J2/PS eine Änderung des Kurzschlussstroms weder nach Glukosegabe noch nach Gabe von Phlorizin beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Es wurde untersucht, inwieweit sich der TER von IPEC-J2 beider Bedingungen an die jeweils andere anpassen kann und ob eine potentielle Adaptation möglicherweise mit einer morphologischen Änderung der Einzelzelle einhergeht. Hierzu wurden IPEC-J2/PS- und IPEC-J2/FBS-Layer zwei Wochen lang kultiviert und ihre transepithelialen Widerstände gemessen, bevor die Kulturbedingungen umgekehrt wurden. Zuvor mit PS kultivierte Zellen erhielten nun FBS-haltiges Medium und andersherum. Kontrolllayer, bei denen kein Austausch des Serums stattfand, wurden mitgeführt, um den TER-Verlauf unter konstanten Kulturbedingungen zu beschreiben. Nach 14 bzw. 28 Tagen wurde die Morphologie jeweils eines Zelllayers pro Kondition mittels *Live Cell Imaging* untersucht.

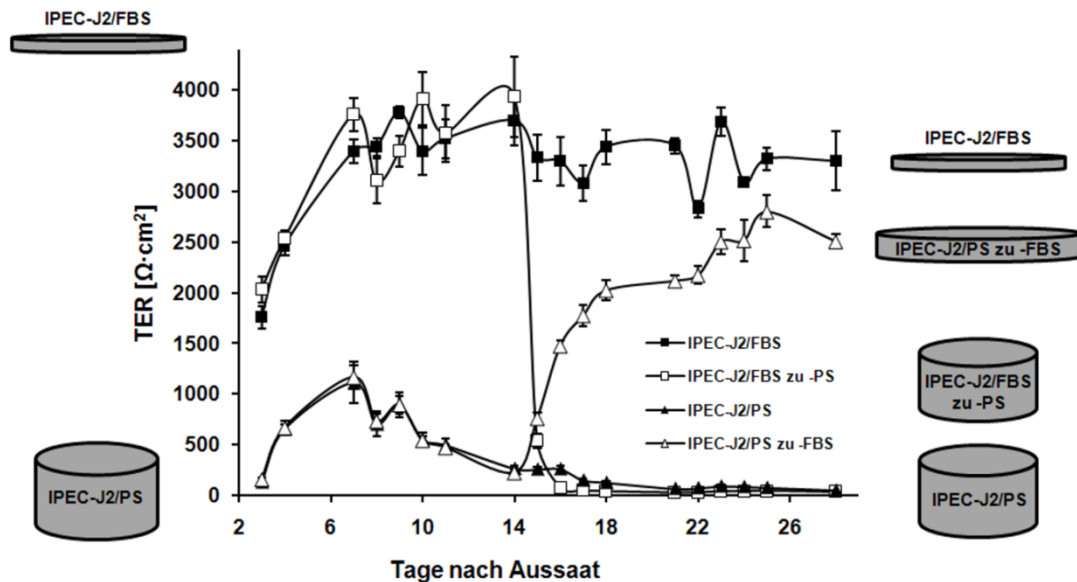


Abb. 4.6: TER-Verlauf und Morphologie vor und nach Serumaustausch. Der Verlauf des TER von IPEC-J2/PS und IPEC-J2/FBS wurde zwei Wochen vor und nach dem Austausch der jeweiligen Serumbedingung (wie in der Abbildung erläutert) dokumentiert. Als Kontrollen wurden jeweils Zelllayer mit konstanter Kulturbedingung mitgeführt. Zellformen jeweils eines Zelllayers (MW, $n=4$ Zellen) wurden nach 14 Tagen (links) bzw. 28 Tagen (rechts) mittels *Live Cell Imaging* beschrieben. Gezeigt sind TER-MW \pm SEM, jeweils $n=4-5$.

Nachdem PS durch FBS (und umgekehrt) ersetzt wurde, begann sofort, sich ein serumtypischer TER einzustellen (**Abb. 4.6**). Dies geschah deutlich schneller wenn PS FBS ersetzte. Parallel zu Änderungen des TER konnten 14 Tage nach Serumwechsel auch serumtypische Änderungen der Zellmorphologie beobachtet werden. PS induzierte eine kubische Zellform, wohingegen sich unter FBS größere und flachere Zellen entwickelten.

Der transepitheliale Widerstand von Zellschichten hängt von der Zusammensetzung der TJ ab, genauso wie von der TJ-Länge und der Zellmembranfläche pro Filterfläche, wobei der Kurzschlussstrom nur von Letzterem abhängt. Die Zellmembranfläche resultiert dabei aus der Zellmorphologie und wird durch die epitheliale Kapazität (C^{epi}) widergespiegelt. Es blieb nun zu prüfen, ob die zuvor gezeigte Änderung der Zellmorphologie mit einer messbaren Änderung der Zellmembranfläche einherging und somit in C^{epi} in Erscheinung tritt. Aus impedanzspektroskopischen Messungen ermittelt, vervierfachte sich C^{epi} in IPEC-J2/PS ($4,06 \pm 0,25 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $n=15$, $p<0,001$), verglichen mit IPEC-J2/FBS ($1,12 \pm 0,06 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, $n=22$) (**Abb. 4.7**), und erreichte somit Werte von prismatischen HT-29/B6-Zellen ($3,5 - 4,5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$) (GÜNZEL *ET AL.*, 2012). Eine Zunahme der Zellmembranfläche wurde hiermit bestätigt.

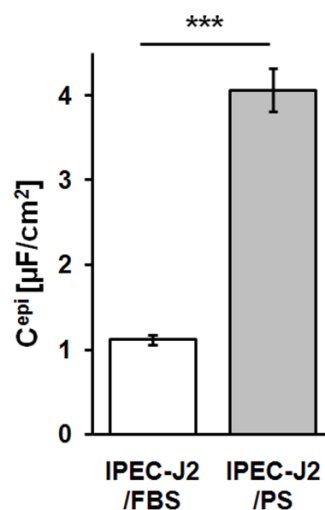


Abb. 4.7: C^{epi} . Die epitheliale Kapazität von IPEC-J2/FBS und IPEC-J2/PS wurde mittels Impedanzspektroskopie ermittelt. Im Vergleich zu IPEC-J2/FBS ($n=22$) war C^{epi} in IPEC-J2/PS ($n=15$, ***, $p<0,001$) signifikant erhöht. Gezeigt sind MW \pm SEM.

4.1.3 Morphometrische und substrukturelle Charakterisierung

Die durch C^{epi} elektrophysiologisch bestätigten Morphologieunterschiede zwischen IPEC-J2/FBS und IPEC-J2/PS wurden nun morphometrisch analysiert.

Im Vergleich zu IPEC-J2/FBS („Durchmesser“: $42,2 \pm 3,3 \mu\text{m}$; Höhe: $3,0 \pm 0,3 \mu\text{m}$; $n=3$ Monolayer) waren die Zellen unter PS schmaler ($21,8 \pm 1,1 \mu\text{m}$, $n=3$ Monolayer, $p<0,01$) (**Abb. 4.8A**) und höher ($17,4 \pm 2,2 \mu\text{m}$, $n=3$ Monolayer, $p<0,001$) (**Abb. 4.8B**). Folglich verdoppelte sich die TJ-Gesamtlänge in IPEC-J2/PS, bezogen auf IPEC-J2/FBS. Die Maße porziner Jejunozysten („Durchmesser“: $8,2 \pm 1,0 \mu\text{m}$, $n=3$ Gewebeschnitte, $p<0,01$; Höhe: $29,2 \pm 0,8 \mu\text{m}$, $n=3$ Gewebeschnitte, $p<0,01$) wurden allerdings nicht erreicht.

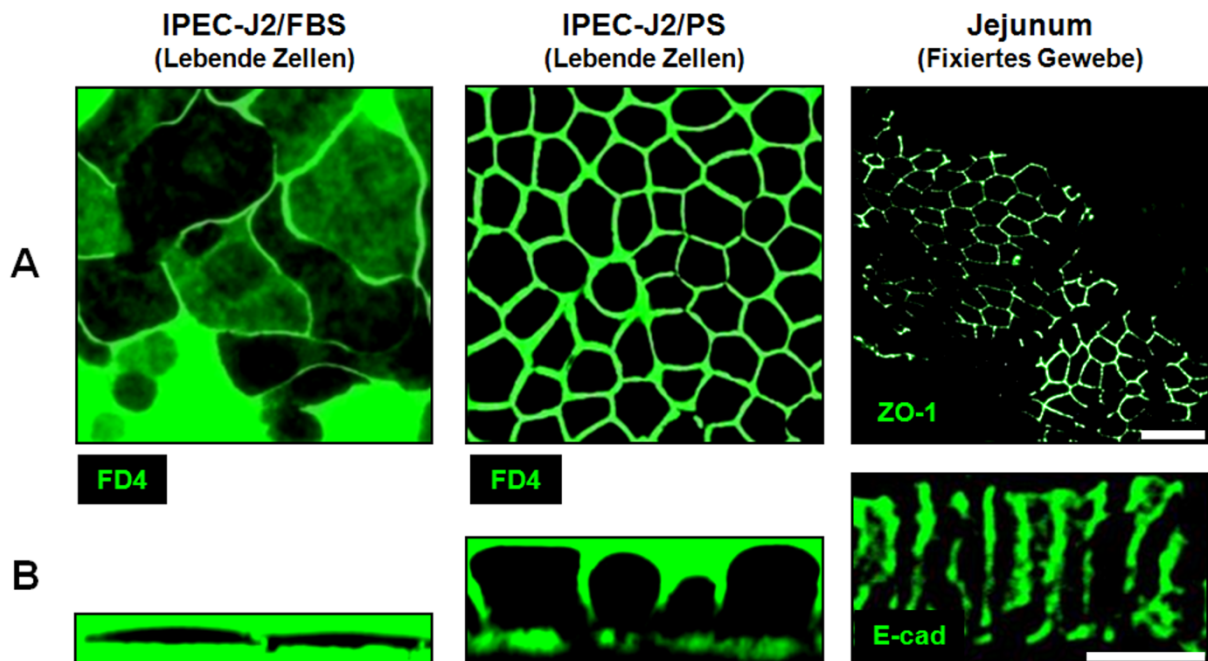


Abb. 4.8: Zelldimensionen. Repräsentative horizontale (A) und vertikale Aspekte (B) von IPEC-J2/FBS und IPEC-J2/PS wurden während Live Cell Imaging mittels FITC-Dextran 4000 (FD4) beschrieben, Zellgrenzen von porzinen Jejunozysten wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung von ZO-1 (A) und E-cadherin (B) veranschaulicht. IPEC-J2/PS waren schmaler und höher, verglichen mit IPEC-J2/FBS, und näherten sich Dimensionen porziner Jejunozysten an. Balken: 20 μm .

Um die Einblicke in die unterschiedlichen Morphologien zu vertiefen, wurden IPEC-J2 beider Kultivierungsbedingungen substrukturell untersucht.

Wie sich aus transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen von Ultradünnschnitten ergab, wiesen IPEC-J2/PS eine kuppelartige apikale Membran (**Abb. 4.9A**) mit zahlreichen ($7,0 \pm 1,1$ Mikrovilli/ μm , $n=3$, $p<0,05$) und langen Mikrovilli (450 ± 30 nm, $n=3$, $p<0,01$) auf (**Abb. 4.9B**), wohingegen die Membran von IPEC-J2/FBS fast planar war und nur wenige ($2,7 \pm 0,4$ Mikrovilli/ μm , $n=3$) stummelartige Mikrovilli (110 ± 10 nm, $n=3$) zeigte. Zwar waren in IPEC-J2/FBS und IPEC-J2/PS junctionale Strukturen innerhalb der Zell-Zell-Kontakte maximal apikal lokalisiert, doch im Gegensatz zu IPEC-J2/FBS war die apikale Membran

der IPEC-J2/PS konvex geformt, sodass die TJ nicht die maximale Zellhöhe repräsentierte (**Abb. 4.9A, B**). Die amorphe Substanz (**Abb. 4.9A**, gekennzeichnet mit „M“), die hauptsächlich in IPEC-J2/PS in Erscheinung trat, konnte mithilfe der PAS-Reaktion als Ansammlung neutraler Mukopolysaccharide identifiziert werden (**Abb. 4.9C**). Diese Schleimkapseln sind für Becherzellen des Darmepithels charakteristisch und auch in verschiedenen epithelialen Zellkulturen existent (KREUSEL *ET AL.*, 1991; WENG *ET AL.*, 2005).

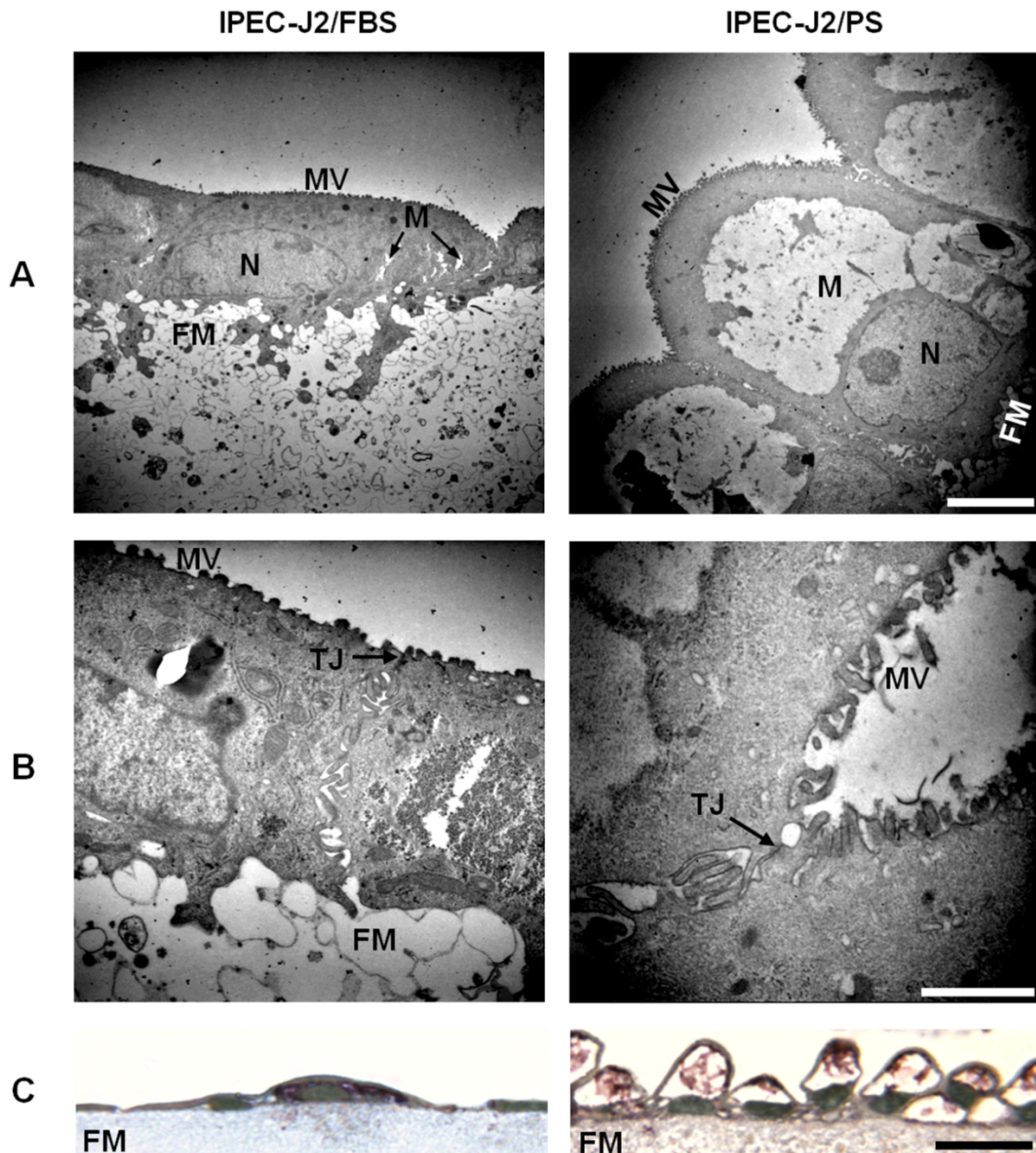


Abb. 4.9: Zelluläre Substrukturen. (A) Exemplarische transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten enthüllten eine kuppelförmige apikale Membran von IPEC-J2/PS mit zahlreichen und langen Mikrovilli, im Vergleich zu IPEC-J2/FBS. M – Mukopolysaccharide; FM – Filtermembran; MV - Mikrovilli; N – Nucleus; Balken: 5 μ m. (B) Detailliertere Aufnahmen geben

junctionale Strukturen des apikolateralen Bereiches wieder. TJ – Tight Junction; Balken: 1 μm . Dieser Datensatz entstand SFB 852-intern in Kooperation mit Monika Sachtleben vom Institut für Veterinär-Anatomie der Freien Universität Berlin, die die Ultradünnschnitte anfertigte und kontrastierte. (C) Paraffinschnitte von IPEC-J2/FBS und IPEC-J2/PS wurden herangezogen, um mithilfe der PAS-Reaktion neutrale Mukopolysaccharide (rosa) anzufärben, die hauptsächlich in IPEC-J2/PS zu finden waren. Nuclei sind in Dunkelblau dargestellt. Balken: 20 μm .

4.1.4 Ultrastrukturelle Charakterisierung

Um von der substrukturellen auf die ultrastrukturelle Ebene zu gelangen und eine Analyse der TJ-Struktur möglich zu machen, die gegebenenfalls Erklärungen der hohen und niedrigen TER-Werte liefern kann, wurden IPEC-J2/FBS, IPEC-J2/PS und jejunales Gewebe gefrierbruchelektronenmikroskopisch untersucht und die TJ analysiert.

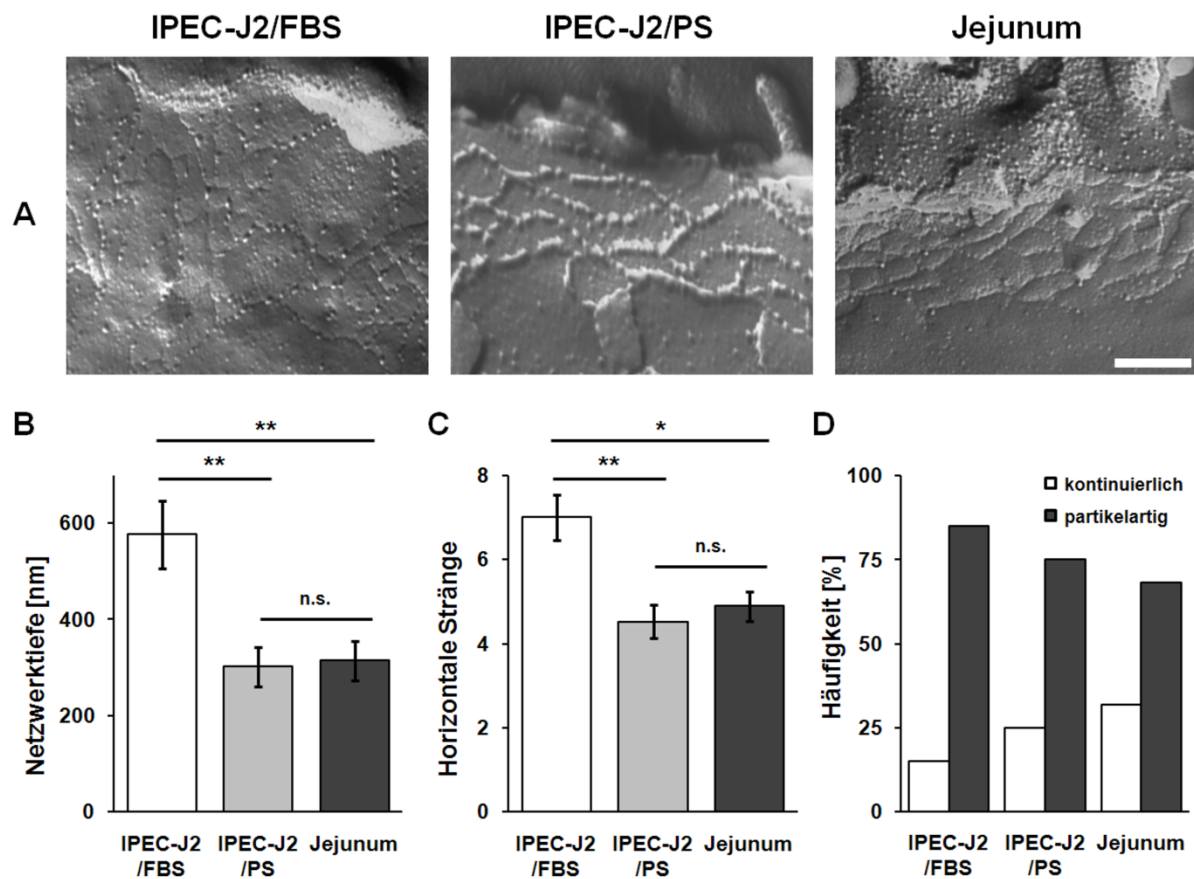


Abb. 4.10: Analyse der TJ-Ultrastruktur. (A) Repräsentative gefrierbruchelektronenmikroskopische Aufnahmen von IPEC-J2/FBS, IPEC-J2/PS und jejunalem Gewebe. Balken: 200 nm. (B) Morphometrische Analyse der TJ-Netzwerktiefe, (C) der Anzahl horizontaler TJ-Stränge und (D) des TJ-Strangtyps (kontinuierlich vs. partikelartig). Die TJ-Netzwerktiefe und die Anzahl horizontaler TJ-Stränge unterschieden sich nicht (n.s.) zwischen IPEC-J2/PS (jeweils n=22) und porzinem Epithel (jeweils n=23). IPEC-J2/FBS hingegen unterschieden sich signifikant (Netzwerktiefe: **, $p < 0,01$; hori-

zontale Stränge: **, $p < 0,01$; jeweils $n=20$) von IPEC-J2/PS. Das Auftreten kontinuierlicher TJ-Stränge war bei IPEC-J2/FBS am geringsten und in porzinen Jejunozyten am höchsten, wohingegen für partikelartige Stränge eine umgekehrte Inzidenz beobachtet wurde. Gezeigt sind $MW \pm SEM$. *, $p < 0,05$.

Sowohl die Netzwerktiefe als auch die horizontale Stranzahl war zwischen IPEC-J2/PS (Netzwerktiefe: 302 ± 41 nm, n.s.; horizontale Stränge: $4,52 \pm 0,4$, n.s.; jeweils $n=22$) und porzinen Jejunozyten (Netzwerktiefe: 315 ± 41 nm; horizontale Stränge: $4,88 \pm 0,35$; jeweils $n=23$) nicht verschieden (**Abb. 4.10A, B, C**). Im Gegensatz dazu wichen IPEC-J2/FBS (Netzwerktiefe: 577 ± 70 nm, $p < 0,01$; horizontale Stränge: $7,00 \pm 0,53$, $p < 0,01$; jeweils $n=20$) beträchtlich von IPEC-J2/PS ab. Die Häufigkeit des Auftretens kontinuierlicher Stränge war bei IPEC-J2/FBS am geringsten, mittelmäßig bei IPEC-J2/PS und am höchsten in jejunalem Epithel, während für partikelartige Stränge ein entgegengesetztes Verhalten zu beobachten war (**Abb. 4.10D**). Eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein kontinuierlicher TJ-Stränge und hohen TER-Werten konnte somit nicht beobachtet werden.

4.1.5 Charakterisierung parazellulärer Permeabilitäten

Der TJ-Zusammensetzung unterliegen strukturelle sowie funktionelle Aspekte, die ganz entscheidend zu den Eigenschaften der parazellulären Barriere, wie z. B. Durchlässigkeiten für anorganische Ionen und kleine Moleküle, beitragen.

Das Verhältnis der Permeabilitäten von Na^+ (23 Da, Stokesradius 1,84 Å) und Cl^- (35 Da, Stokesradius 1,21 Å) ($P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$) gilt als ein Maß der Ladungsselektivität. $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$ war unter beiden Zellkulturbedingungen geringer als im jejunalen Gewebe ($1,44 \pm 0,07$, $n=12$, $p < 0,001$) (**Abb. 4.11A**). Zwischen IPEC-J2/FBS ($1,05 \pm 0,02$, $n=11$) und IPEC-J2/PS ($1,11 \pm 0,01$, $n=13$, n.s.) gab es zudem keine Unterschiede hinsichtlich der Ladungsselektivität. Diese Datenlage könnte auf Unterschiede in der TJ-Zusammensetzung zwischen IPEC-J2 und dem Jejunum hindeuten. Demnach könnten im Jejunumepithel mehr kationenkanalbildende TJ-Proteine, wie Claudin-2 (AMASHEH *ET AL.*, 2002) und Claudin-15 (TAMURA *ET AL.*, 2011), vorhanden sein.

Die Permeabilität für Fluoreszein (332 Da, Stokesradius 4,5 Å) von IPEC-J2/PS ($0,94 \pm 0,15 \cdot 10^{-6}$ cm/s, $n=7$, $p < 0,001$) entsprach ~20 Mal der von IPEC-J2/FBS ($0,04 \pm 0,004 \cdot 10^{-6}$ cm/s, $n=8$) (**Abb. 4.11B**) womit Werte, ähnlich denen von HT-29/B6-Zellen ($0,86 \pm 0,14 \cdot 10^{-6}$ cm/s) (KRUG *ET AL.*, 2009b) ermittelt wurden. Der TER-Unterschied zwischen IPEC-J2/FBS und IPEC-J2/PS geht demnach mit einer erhöhten parazellulären Permeabilität für Fluoreszein einher.

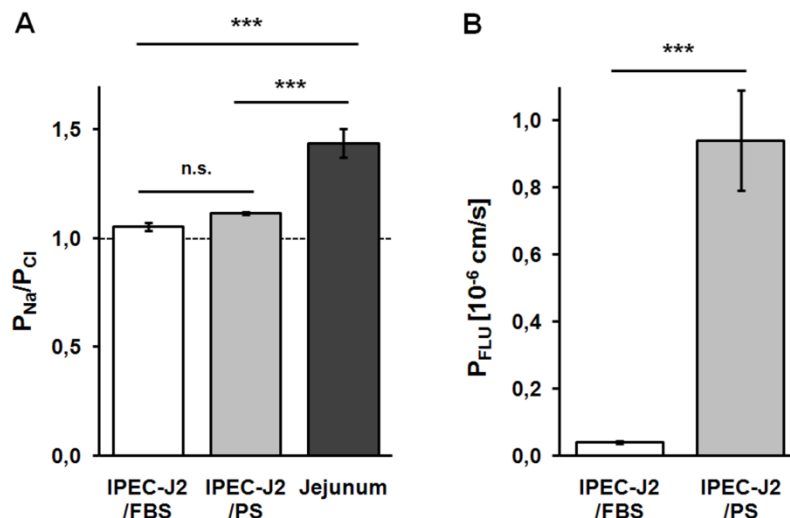


Abb. 4.11: Permeabilität. (A) Das Verhältnis der Permeabilitäten von Na^+ und Cl^- (P_{Na}/P_{Cl}) wurde über Dilutionspotentialmessungen ermittelt. Verglichen mit jejunalem Gewebe ($n=12$) war P_{Na}/P_{Cl} in den IPEC-J2 deutlich geringer (***, $p<0,001$). Zwischen IPEC-J2/FBS ($n=11$) und IPEC-J2/PS ($n=13$) bestand kein Unterschied (n.s.). Die gestrichelte Linie markiert das Verhältnis ausgeglichener Ladungsselektivität. (B) Die parazelluläre Permeabilität für Fluoreszein (P_{FLU}) wurde über Fluxmessungen ermittelt. P_{FLU} von IPEC-J2/PS ($n=7$) war 20-fach höher als in IPEC-J2/FBS ($n=8$, ***, $p<0,001$). Gezeigt sind $MW \pm SEM$.

4.1.6 Charakterisierung junctionaler und jejunaler Markerproteine

Die Zusammensetzung des Pools an Junction-Proteinen und das Vorhandensein intestinaler Marker der Epithelzelldifferenzierung wurden qualitativ sowie quantitativ analysiert.

4.1.6.1 Junction-Proteine

Da Übersichtsarbeiten zu intestinalen TJ-Proteinen beim Schwein in der Literatur noch fehlen, wurde anhand von Mäuse- und Rattenstudien ausgewählt (HOLMES *ET AL.*, 2006; IKENOUCI *ET AL.*, 2005; MARKOV *ET AL.*, 2010), welches Protein für die Analyse im jejunalen Kontext infrage kam. Wie sich aus Immunfluoreszenzfärbungen ergab, waren im porzinen Jejunum alle ausgewählten TJ-Proteine (Claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7, -8, -12, -15, Tricellulin-a, Occludin), das TJ-assoziierte Protein ZO-1 sowie das Adherens Junction-Protein E-cadherin vorhanden und in Zell-Zell-Kontakten lokalisiert (**Abb. 4.12A, 4.12B, 4.12C**). Darauf basierend wurde das Expressionsmuster von verschiedenen kultivierten IPEC-J2 untersucht. Claudin-1, -3, -4, -5, -7 und -8 der porzinen Zelllinie konnten unter beiden Kulturbedingungen in der TJ detektiert werden, wobei das Claudin-7-Signal diskontinuierlich und schwach schien (**Abb. 4.12A, 4.12B**). Claudin-2-, -12- und -15-Signale erschienen hingegen äußerst blass und lediglich sporadisch (**Abb. 4.12C**). Tricellulin-a wurde unter beiden Serumbedingungen

trizellulär exprimiert, erschien jedoch auch in der bizellulären TJ, was häufiger in IPEC-J2/FBS als in IPEC-J2/FBS auftrat (**Abb. 4.12B**). Occludin, ZO-1 und E-cadherin waren erwartungsgemäß jeweils in der Tight bzw. Adherens Junction lokalisiert (**Abb. 4.12B, 4.12C**).

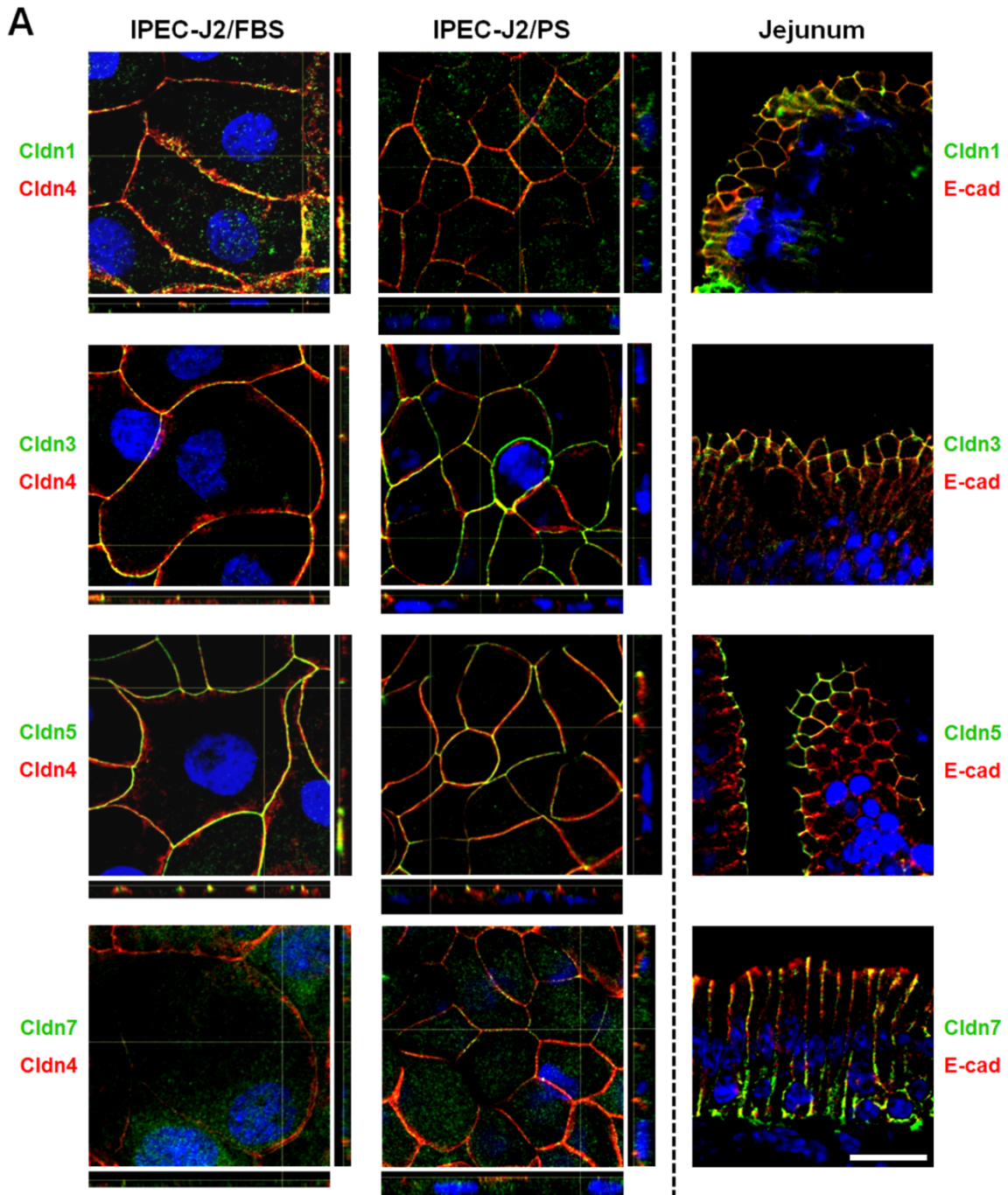


Abb. 4.12A: Lokalisation von TJ-Proteinen. Konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen von IPEC-J2/FBS, IPEC-J2/PS und Cryoschnitten jejunaler Mukosa. Claudin-1, -3, -5 und -7 sind in Grün dargestellt, die Gegenfärbung in Rot und Nuclei (DAPI) in Blau. Zwischen den Kulturbedingungen konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Lokalisation junctionaler Proteine ausgemacht werden. Die gestrichelte Linie gibt an, dass die Gegenfärbung zwischen IPEC-J2 und Jejunum variiert. Balken: 20 μ m.

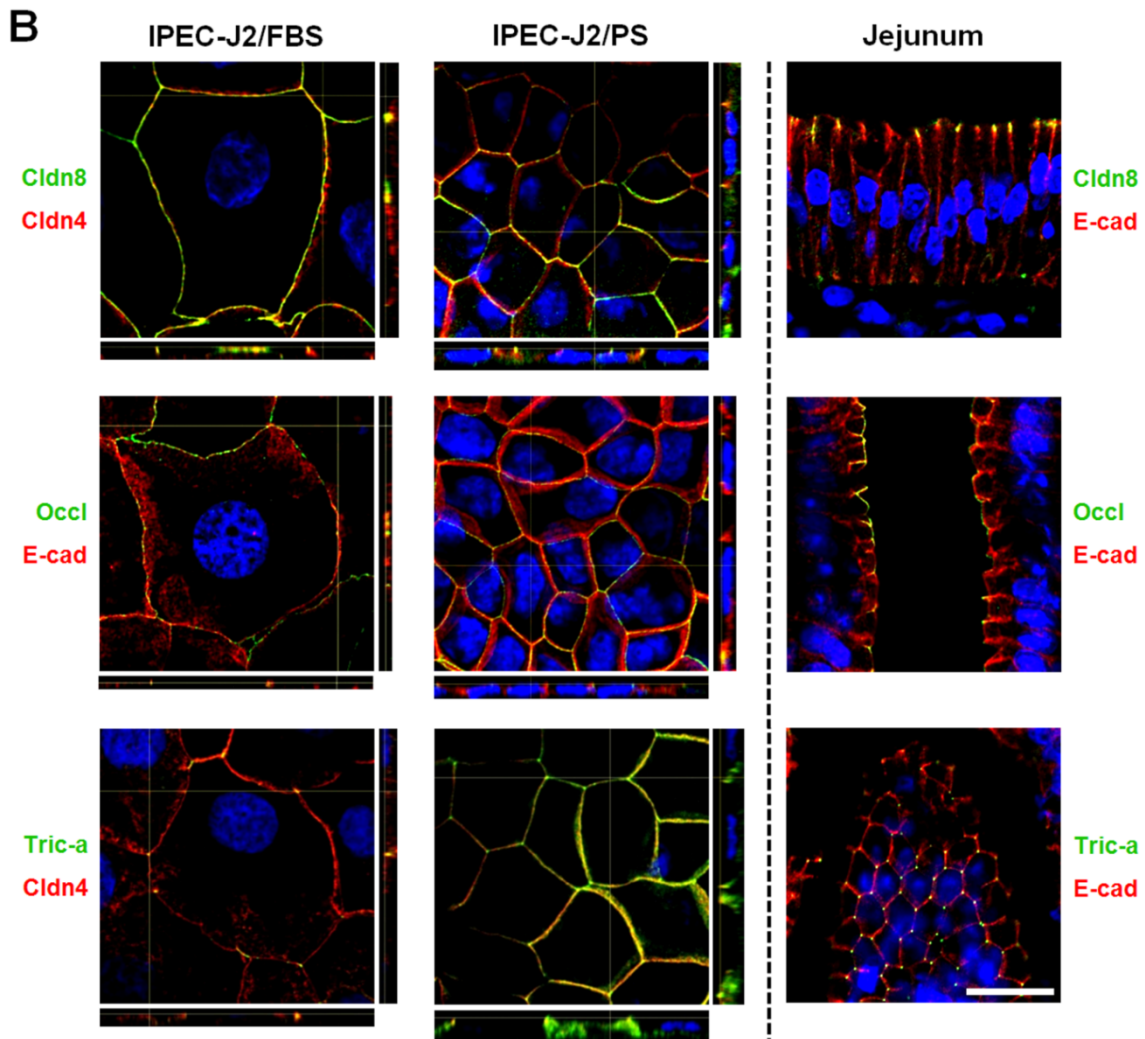


Abb. 4.12B: Lokalisation von TJ-Proteinen. Konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen von IPEC-J2/FBS, IPEC-J2/PS und Cryoschnitten jejunaler Mukosa. Claudin-8, Occludin und Tricellulin-a sind in Grün dargestellt, die Gegenfärbung in Rot und Nuclei (DAPI) in Blau. Bis auf eine vermehrt bizelluläre Lokalisation von Tricellulin-a in IPEC-J2/PS konnten zwischen den Kulturbedingungen keine Unterschiede hinsichtlich der Lokalisation junctionaler Proteine ausgemacht werden. Die gestrichelte Linie gibt an, dass die Gegenfärbung zwischen IPEC-J2 und Jejunum variiert. Balken: 20 μ m.

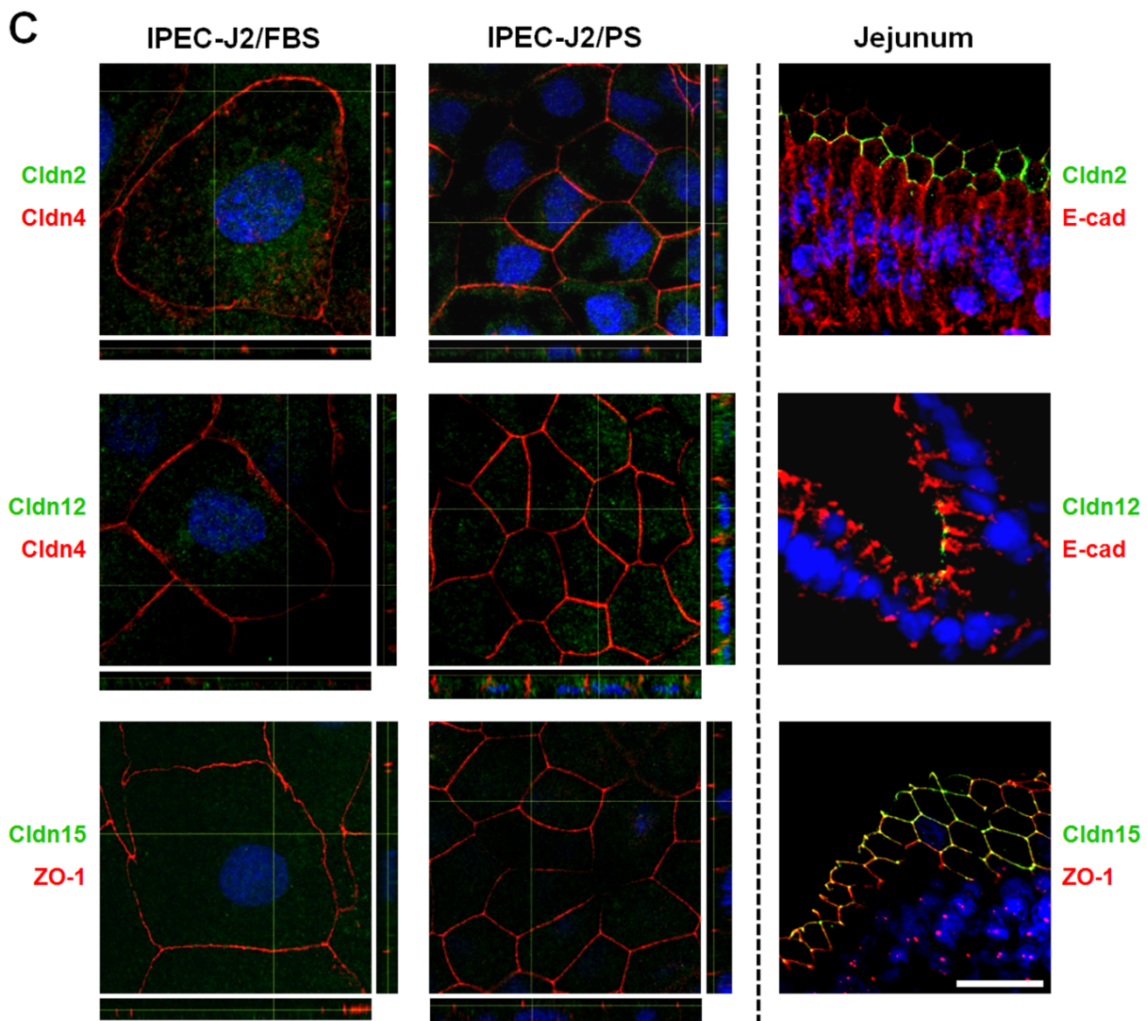


Abb. 4.12C: Lokalisation von TJ-Proteinen. Konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen von IPEC-J2/FBS, IPEC-J2/PS und Cryoschnitten jejunaler Mukosa. Claudin-2, -12 und -15 sind in Grün dargestellt, die Gegenfärbung in Rot und Nuclei (DAPI) in Blau. Im Gegensatz zu porzinem Jejunum konnten Claudin-2, -12 und -15 in IPEC-J2 lediglich sporadisch und zudem äußerst schwach detektiert werden. Die gestrichelte Linie gibt an, dass die Gegenfärbung zwischen IPEC-J2 und Jejunum variiert. Balken: 20 μ m.

Da aufgrund der hoch individuellen jejunalen Proteinexpression im einzelnen Schwein und der im Subepithel potentiell enthaltenen endothelialen TJ-Proteine ein direkter Vergleich der Proteinexpression zwischen Jejunum und IPEC-J2 nicht sinnvoll erschien, dienten Western Blot-Signale porzinen Proteins als bestens geeignete Größenkontrollen für das jeweilige Pendant in IPEC-J2. Somit wurde bei der densitometrischen Signalauswertung der Fokus auf die relative Proteinexpression von IPEC-J2/PS zu IPEC-J2/FBS gelegt. Es ergab sich eine signifikant erhöhte Expression von Claudin-4 ($135 \pm 8\%$, $n=3$ verschiedene Zellpassagen, $p<0,05$) und Claudin-5 ($169 \pm 13\%$, $n=3$, $p<0,05$) (**Abb. 4.13A, B**), wohingegen die Expression weiterer getesteter junctionaler Proteine gegenüber IPEC-J2/FBS statistisch

unbedeutend blieb (Claudin-1: $66 \pm 13\%$, $n=4$, $p<0,1$; Claudin-3: $105 \pm 23\%$, $n=3$, n.s.; Claudin-7: $179 \pm 56\%$, $n=3$, n.s.; Claudin-8: $153 \pm 107\%$, $n=3$, n.s.; Occludin: $168 \pm 17\%$, $n=3$, $p<0,1$; Tricellulin-a: $187 \pm 30\%$, $n=4$, $p<0,1$).

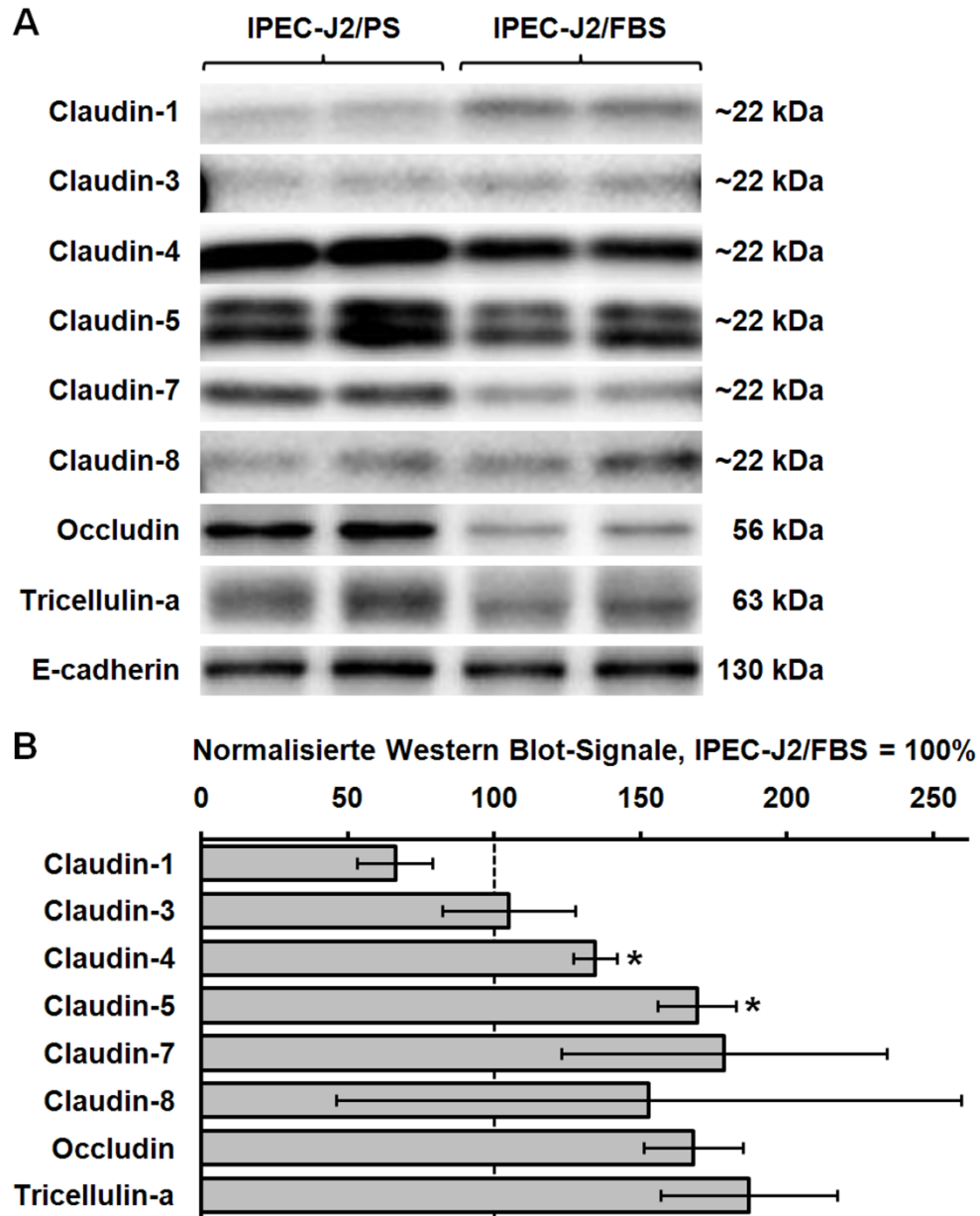


Abb. 4.13: Quantifizierung von TJ-Proteinen. Zelllysate von IPEC-J2/FBS und IPEC-J2/PS wurden mittels Western Blot-Analyse zunächst qualitativ beurteilt (repräsentative Western Blots) (A) und die Signale anschließend densitometrisch quantifiziert (B). Um die verschiedenen Zellmorphologien von IPEC-J2 zu berücksichtigen, wurden Western Blot-Signale gegen E-cadherin normalisiert. Relativ zu IPEC-J2/FBS (100%) ergab sich für IPEC-J2/PS eine erhöhte Expression von Claudin-4 und -5 (*, $p<0,05$). Gezeigt sind MW \pm SEM aus Western Blot-Analysen drei bis vier verschiedener Zellpassagen.

Von den getesteten junctionalen Proteinen ließen sich einzig Claudin-2, -12 und -15 in IPEC-J2 mittels Western Blotting nicht nachweisen (**Abb. 4.14A**), was Anlass dazu gab, die entsprechenden und ohnehin schwachen Signale in der Immunfluoreszenzfärbung (**Abb. 4.12C**) als unspezifisch einzuordnen. Ein potientielles Fehlen zumindest der Kationenkanalbildner Claudin-2 und -15 (AMASHEH *ET AL.*, 2002; TAMURA *ET AL.*, 2011) in IPEC-J2 hatte sich bereits bei den Dilutionspotentialmessungen (siehe 4.1.5, Abb. 4.11A) angekündigt, als die Zellen im Vergleich zum Jejunumepithel deutlich weniger kationenselektiv waren. Um zu begründen, weshalb Claudin-2, -12 und -15 in IPEC-J2/FBS und IPEC-J2/PS auf Proteinebene nicht detektiert werden konnten, wurde auf der Leiter der Proteinbiosynthese einen Schritt zurück gegangen und die mRNA-Expression der entsprechenden Nukleinsäuren untersucht. Während Claudin-12-mRNA nachgewiesen werden konnte, fehlten Claudin-2 und -15 auf mRNA-Ebene (**Abb. 4.14B**).

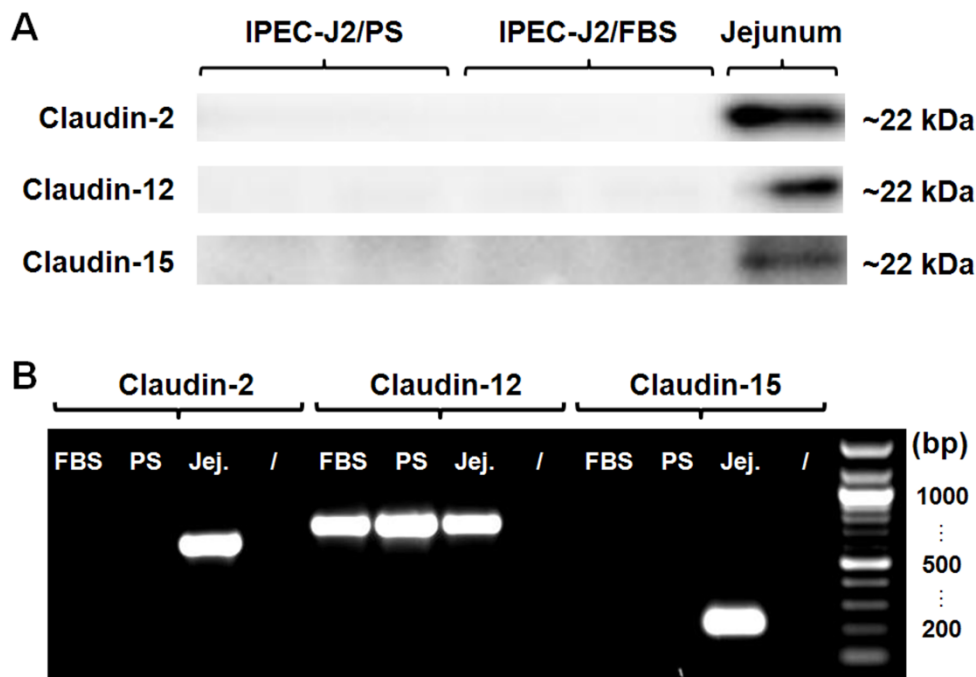


Abb. 4.14: Qualitative TJ-Protein-Analyse. (A) Zellysate von IPEC-J2/FBS, IPEC-J2/PS und Schweinejejunum wurden mittels Western Blot-Technik analysiert (repräsentative Western Blots). Im Gegensatz zu porzinem Jejunum konnten keine Signale für Claudin-2, -12 und -15 aus IPEC-J2 detektiert werden. (B) mRNA aus IPEC-J2/FBS (FBS), IPEC-J2/PS (PS) und Schweinejejunum (Jej.) wurde mittels PCR qualitativ untersucht. Während Claudin-2 (626 bp)-, Claudin-12 (734 bp)- und Claudin-15 (223 bp)-mRNA im Schwein vorhanden war, war in IPEC-J2 beider Kultivierungsbedingungen lediglich Cldn12-mRNA verfügbar. Der Negativ-Kontroll-PCR-Ansatz ist mit “/” gekennzeichnet.

4.1.6.2 Markerproteine

Hinsichtlich epithelialer Polarisationsmarker im Jejunum konnte das Vorhandensein von Ezrin und SGLT1 in der apikalen Membran sowie GLUT2 und der Na/K-ATPase in der basolateralen Membran bestätigt werden. Die intraepitheliale Expression von Vimentin, einem mesenchymalen Marker, konnte ausgeschlossen werden (**Abb. 4.15**).

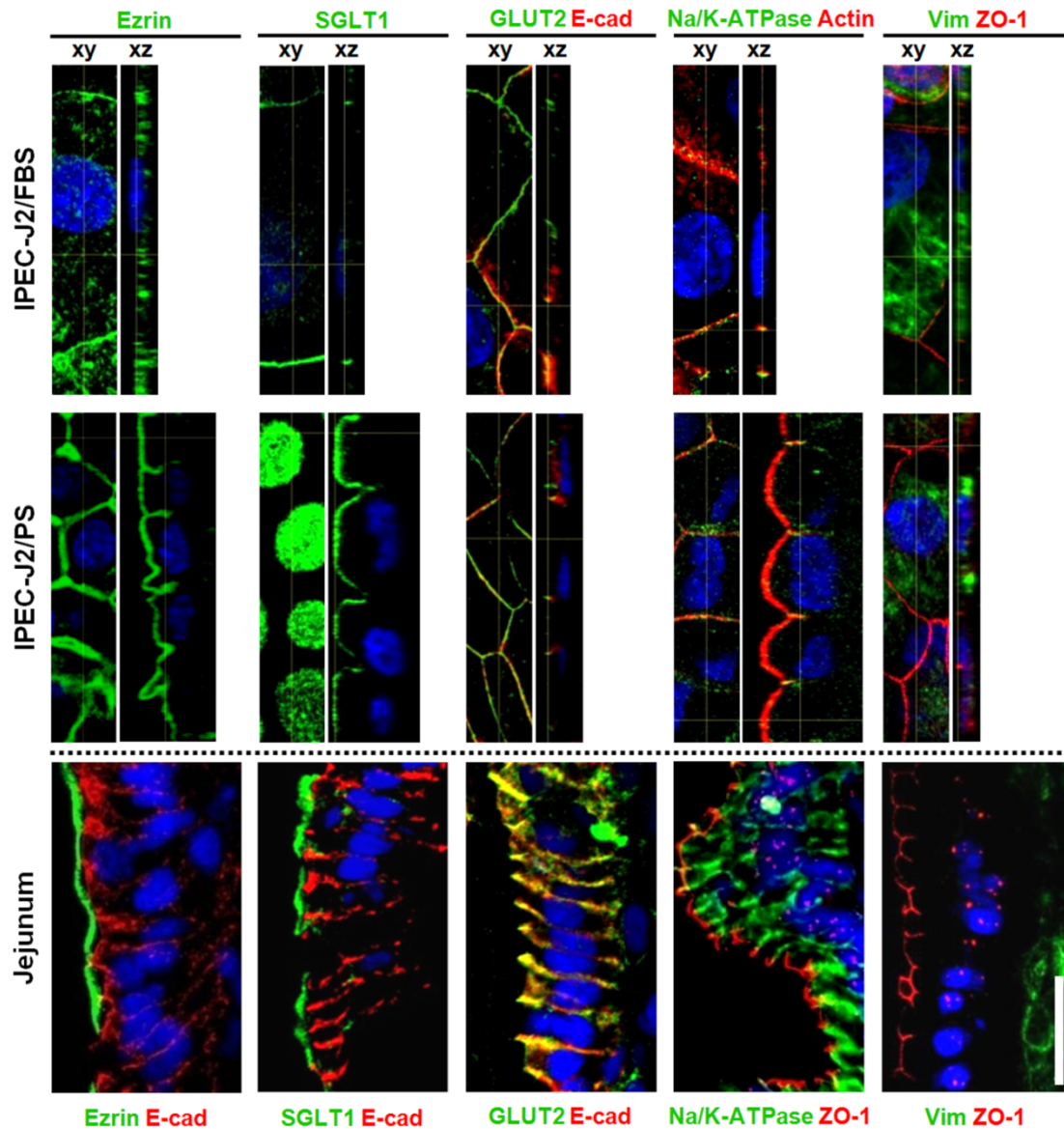


Abb. 4.15: Jejunale Markerproteine. Konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen von IPEC-J2/FBS, IPEC-J2/PS und Cryoschnitten jejunaler Mukosa. Ezrin, SGLT1, GLUT2, Na/K-ATPase und Vimentin sind in Grün dargestellt, die Gegenfärbung in Rot und Nuclei (DAPI) in Blau. In IPEC-J2 beider Kultivierungsregime konnten GLUT2 und die Na/K-ATPase in der basolateralen Membran detektiert werden, wohingegen Ezrin und SGLT1 in der apikalen Membran ausschließlich in IPEC-J2/PS lokalisiert werden konnten. Beide IPEC-J2 waren im Gegensatz zu Jejunozyten vimentinpositiv. Die gestrichelte Linie gibt an, dass die Gegenfärbung zwischen IPEC-J2 und Jejunum variiert. Balken: 20 μ m.

Unter beiden Kultivierungsbedingungen für IPEC-J2 konnte die Expression von GLUT2 und der Na/K-ATPase in der basolateralen Membran belegt werden, wohingegen die Präsenz von Ezrin und SGLT1 in der apikalen Membran lediglich in IPEC-J2/PS bestätigt werden konnte, da es aufgrund der geringen Zellhöhe von IPEC-J2/FBS schwierig war, apikale und basolaterale Membranen räumlich getrennt zu visualisieren (**Abb. 4.15**). Entgegen den Erwartungen waren sowohl IPEC-J2/FBS als auch IPEC-J2/PS positiv für Vimentin.

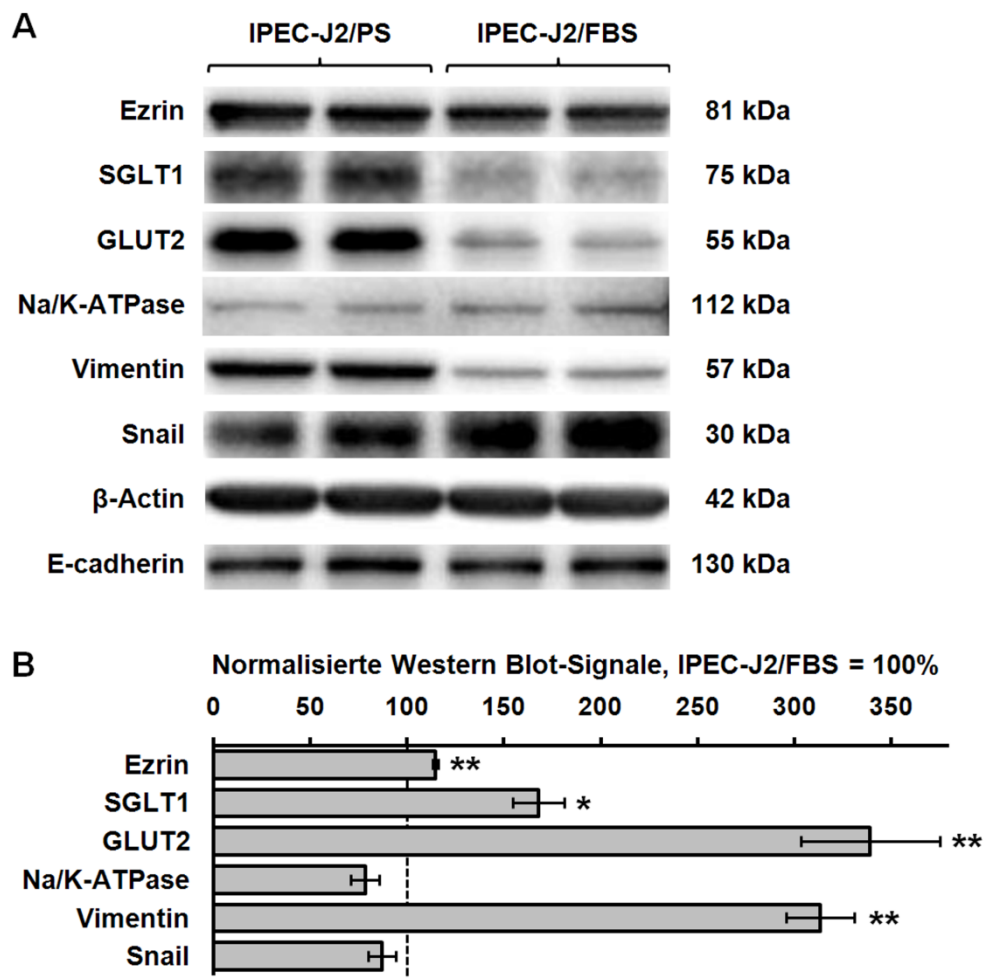


Abb. 4.16: Quantifizierung jejunaler Markerproteine. Zelllysate von IPEC-J2/FBS und IPEC-J2/PS wurden mittels Western Blot-Analyse zunächst qualitativ beurteilt (repräsentative Western Blots) (**A**) und die Signale anschließend densitometrisch quantifiziert (**B**). Um die verschiedenen Zellmorphologien von IPEC-J2 zu berücksichtigen, wurden Western Blot-Signale gegen E-cadherin normalisiert. Ausschließlich Vimentinsignale wurden mit β -Actin relativiert. Relativ zu IPEC-J2/FBS (100%) ergab sich für IPEC-J2/PS eine erhöhte Expression von Ezrin und GLUT2 (**, $p < 0,01$) sowie von SGLT1 (*, $p < 0,05$) und Vimentin (*, $p < 0,01$). Gezeigt sind MW \pm SEM aus Western Blot-Analysen drei bis vier verschiedener Zellpassagen.

Die Expression der epithelialen Differenzierungsmarker Ezrin ($115 \pm 2\%$, $n=4$, $p<0,01$), GLUT2 ($339 \pm 36\%$, $n=4$, $p<0,01$), SGLT1 ($168 \pm 13\%$, $n=4$, $p<0,05$) sowie die des mesenchymalen Markers Vimentin ($313 \pm 18\%$, $n=3$, $p<0,01$) waren signifikant erhöht (**Abb. 4.16A, B**). Die Expression des Transkriptionsfaktors Snail, der indirekt Hinweise auf den Zelldifferenzierungsstatus geben kann (BARRALLO-GIMENO AND NIETO, 2005), war nicht verändert ($p=0,17$).

4.2 Einfluss von Zink auf die jejunale Barrierefunktion

Es wurde sowohl anhand von *in vivo*- als auch *in vitro*-Arbeiten gezeigt, dass Zink positive Effekte hinsichtlich Barrierefunktion sowohl auf das intakte als auch auf das beeinträchtigte Epithel ausüben kann – je nach Dosis, Bioverfügbarkeit, Zinkquelle, Applikationsseite und Zelldifferenzierung. Ob epitheliale Effekte nach Langzeitexposition auftreten bzw. welche und vor allem wie barriererelevante Parameter beeinflusst werden, ist bislang nicht erforscht bzw. größtenteils am Nagermodell und an humanen Zellkulturen beschrieben. Das Wissen hinsichtlich des Schweins ist deutlich limitiert, womöglich nicht zuletzt durch das Fehlen unterstützender mechanistischer Untersuchungen an geeigneten Zellmodellen. So werden nun in diesem Teil der vorliegenden Arbeit zum einen ansatzweise die potentielle Eignung für ernährungsrelevante Fragestellungen des im vorangegangenen Teil etablierten Zellmodells IPEC-J2/PS beleuchtet, zum anderen wird die Auswirkung einer prophylaktischen Zinksupplementierung auf die Darmbarriere gesunder Ferkel im Kurz- und Langzeitversuch sowie TGEV-infizierter Ferkel geschildert.

4.2.1 Einfluss von Zink auf die epitheliale Barrierefunktion von IPEC-J2/PS

4.2.1.1 Zinkverbindung, -dosis und -inkubationsdauer

In Fütterungsversuchen, in denen die Wirkung von Zink auf den Organismus Schwein untersucht wird, ist Zinkoxid (ZnO) trotz seiner geringen Wasserlöslichkeit die Verbindung der Wahl, die mit der Ration verabreicht wird. Mit dem Futter im Magen angelangt, löst sich ZnO im sauren Milieu ($\text{pH } 3,9 \pm 0,1$ (variiert von $\text{pH } 1,5$ bis $5,8$), nicht publizierte Daten von Dr. Robert Pieper, Institut für Tierernährung, Freie Universität Berlin) und bilden sich Zn^{2+} -Ionen. Mit zunehmendem Vordringen in den Gastrointestinaltrakt steigt der pH-Wert im Milieu kontinuierlich wieder an (Jejunum, $\text{pH } 6,4 \pm 0,1$ (variiert von $\text{pH } 5,8$ bis $7,0$), nicht publizierte Daten von Dr. Robert Pieper, Institut für Tierernährung, Freie Universität Berlin), sodass die Zinkionen zumindest teilweise von Nahrungsbestandteilen wie Aminosäuren, Diptiden und organischen Säuren komplexiert werden (KREBS, 2000; WAPNIR *ET AL.*, 1983).

Da eine wässrige Lösung von Zinkchlorid (ZnCl_2) stark sauer ist und bei Neutralisierung mit Alkalien Zink in Form von Zinkhydroxid ($\text{Zn}(\text{OH})_2$) ausfällt, schied ZnCl_2 als geeignete Zinkquelle für *in vitro*-Versuche aus. Anstatt dessen wurde hydratisiertes Zinkacetat ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, ZnAc), das Zinksalz der Essigsäure, verwendet, unter welchem sich, in Wasser gelöst, eine lediglich schwach saure Lösung (20 mM, pH 6,2) einstellte.

Ab welcher Konzentration die apikale Gabe von ZnAc ihre maximale Wirkung auf den TER erreicht bzw. ab welcher Dosis diese Wirkung nachlässt, wurde zunächst mithilfe einer Konzentrationsreihe und TER-Messungen nach 24 h ermittelt. Bis zu einer Konzentration von 500 μM ZnAc stieg der TER prozentual mit zunehmender Dosis an (**Abb. 4.17**). Höhere ZnAc-Konzentrationen führten zu einem Wirkungsabfall und erreichten sogar Werte unterhalb des Ausgangsniveaus. Über die Hill-Gleichung (siehe 3.4.1, Abb. 3.1) wurde eine mittlere effektive ZnAc-Dosis ([ED50]) von 122 μM ermittelt (angedeutet durch gestrichelte Linien in **Abb. 4.17**).

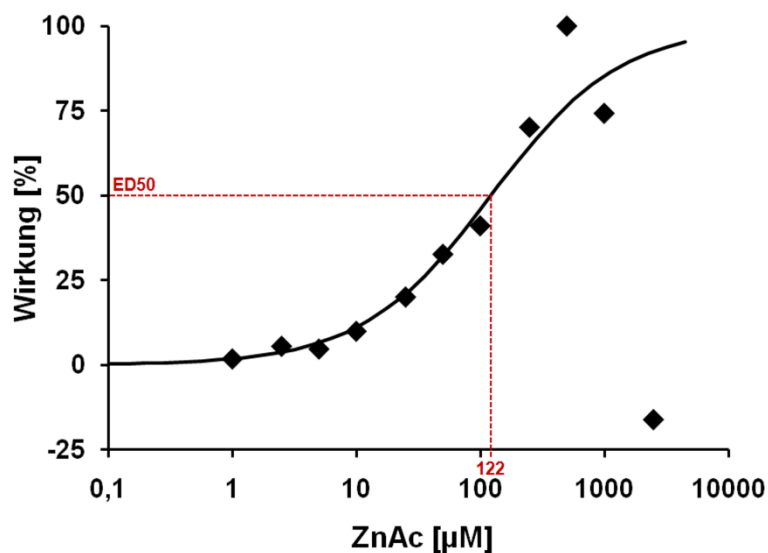


Abb. 4.17: Dosis-Wirkung-Kurve. IPEC-J2/PS-Layer wurden über einen Zeitraum von 24 h apikal mit verschiedenen ZnAc-Konzentrationen inkubiert. Die TER-Änderung als Wirkungsmaß wurde als Funktion der ZnAc-Konzentration halblogarithmisch dargestellt. Die halbmaximale Wirkung wurde bei einer Dosis von 122 μM ZnAc erreicht. Gezeigt sind MW, jeweils $n=4$.

Für den Einsatz von 500 μM ZnAc in künftigen *in vitro*-Versuchen musste zunächst ausgeschlossen werden, dass diese Dosis zytotoxisch wirkt, denn unauffällige TER-Werte stellen diesbezüglich kein eindeutiges Indiz dar (LODEMANN *ET AL.*, 2013). Als Maß für die Membrantintegrität wurde nach 24 h Inkubation der Anteil freigesetzter LDH-Aktivität im apikalen

Zellüberstand des Zelllayers bestimmt ($1,2 \pm 0,08$ rel. Fluoreszenzeinheiten (rFE), $n=4$, n.s.), welcher nicht von den Kontrollwerten ($1,0 \pm 0,1$ rFE, $n=4$) verschieden war (**Abb. 4.18B**).

IPEC-J2/PS-Monolayer unter apikalen $500 \mu\text{M}$ ZnAc erreichten bereits nach ~ 4 h ein TER-Plateau mit $\sim 150\%$ des Ausgangswiderstands, wohingegen die basolaterale Applikation gleicher Konzentration zu einem Widerstandseinbruch auf 10% des Ausgangsniveaus (**Abb. 4.18A**) und einer signifikant erhöhten LDH-Freisetzung ($2,6 \pm 0,07$ rFE, $n=4$, $p<0,001$), im Vergleich zur Kontrolle, führte (**Abb. 4.18B**).

Um im Folgenden Effekte durch ZnAc ($500 \mu\text{M}$) spezifisch auf Zinkionen zurückführen zu können, wurde eine Acetatkontrolle in Form von Natriumacetat ($\text{NaCH}_3\text{CO}_2 \times 3 \text{H}_2\text{O}$, NaAc, $1000 \mu\text{M}$) mitgeführt, die sich hinsichtlich des TER-Niveaus der Kontrollzelllayer (**Abb. 4.18A**) und der LDH-Freisetzung ($0,9 \pm 0,07$ rFE, $n=4$, n.s.) (**Abb. 4.18B**) aus Kontrollzelllayer statistisch nicht unterschied.

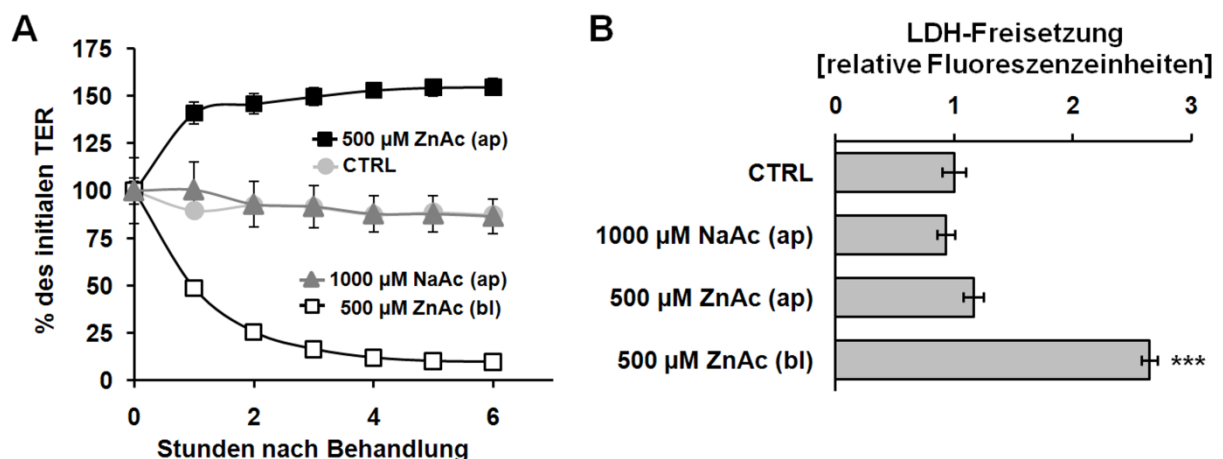


Abb. 4.18: TER-Zeitreihe und LDH-Freisetzung. IPEC-J2/PS-Monolayer wurden entweder von apikal (ap) mit $500 \mu\text{M}$ ZnAc bzw. $1000 \mu\text{M}$ NaAc oder von basolateral (bl) mit $500 \mu\text{M}$ ZnAc inkubiert – die Kontrollen blieben unbehandelt. Der TER wurde über 6 h verfolgt (**A**) und die LDH-Freisetzung im apikalen Überstand nach 24 h gemessen (**B**), welche lediglich nach basolateraler ZnAc-Gabe signifikant erhöht war (***, $p<0,001$), verglichen mit der CTRL. Gezeigt sind MW \pm SEM, jeweils $n=4$.

4.2.1.2 Barrierestärkung durch Zink: Effekt auf TER und Fluoreszeinpermeabilität

Eine ~ 5 -stündige Inkubation mit ZnAc führte, bezogen auf unbehandelte Monolayer ($523 \pm 35 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n=8$), zu einem signifikanten Anstieg des TER ($916 \pm 77 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n=8$, $p<0,01$), der nach Behandlung mit NaAc ($551 \pm 42 \Omega \cdot \text{cm}^2$, $n=8$, n.s.) nicht beobachtet wurde (**Abb. 4.19A**). Ob der durch ZnAc induzierte TER-Effekt durch Änderungen des parazellu-

lären Weges hervorgerufen wurde, ließ sich anhand von Fluxexperimenten mit Fluoreszein als größtmäßig geeignetes Markermolekül (332 Da, Stokesradius 4,5 Å) beschreiben.

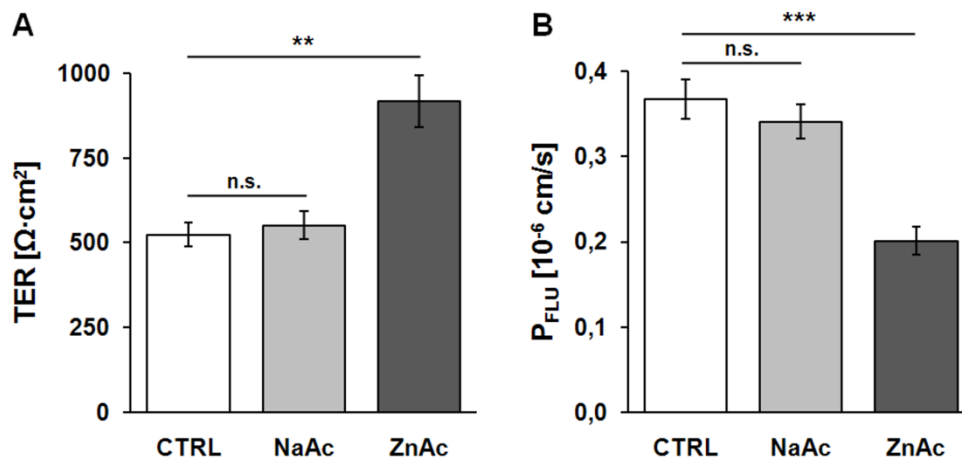


Abb. 4.19: TER und Parazelluläre Permeabilität. IPEC-J2/PS-Monolayer wurden 4 h apikal entweder mit 500 μM ZnAc oder 1000 μM NaAc vorinkubiert, bis sie unter Beibehaltung dieser Konzentrationen in die Ussing-Kammern eingespannt wurden. Kontrolllayer blieben unbehandelt. Dargestellt sind der TER (A) und die parazelluläre Permeabilität für Fluoreszein (B), ca. 5 h nach Acetatapplikation. ZnAc führte sowohl zu einem signifikant erhöhten TER (**, $p < 0,01$) als auch zu einer signifikanten Reduktion der Permeabilität für Fluoreszein (***, $p < 0,001$). Gezeigt sind $\text{MW} \pm \text{SEM}$, jeweils $n=8$.

In gegenläufiger Richtung zur TER-Entwicklung verhielt es sich mit der Permeabilität für Fluoreszein. Da Permeabilitätsunterschiede zwischen bidirektional (apikal bzw. basolateral) appliziertem Fluoreszein einer Versuchsgruppe statistisch nicht relevant waren, wurden sie zu einer Gesamtpermeabilität zusammengefasst. Im Vergleich zu Kontrollmonolayern ($0,37 \pm 0,02 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$, $n=8$) blieb die Permeabilität von NaAc-behandelten IPEC-J2/PS ($0,34 \pm 0,02 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$, $n=8$, n.s.) unbeeinflusst, wurde jedoch durch die Applikation von ZnAc signifikant reduziert ($0,20 \pm 0,02 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$, $n=8$, $p < 0,001$) (**Abb. 4.19B**).

4.2.1.3 Elektrolytsekretion unbeeinflusst von Zink

Bezüglich des mit Forskolin induzierten Kurzschlussstroms konnten weder statistisch relevante Änderungen durch ZnAc-Behandlung ($4,60 \pm 0,16 \mu\text{A/cm}^2$, $n=8$, n.s.) noch durch NaAc-Behandlung ($4,48 \pm 0,18 \mu\text{A/cm}^2$, $n=8$, n.s.) zu Kontrollzelllayern ($4,86 \pm 0,18 \mu\text{A/cm}^2$, $n=8$) beobachtet werden (**Abb. 4.20**).

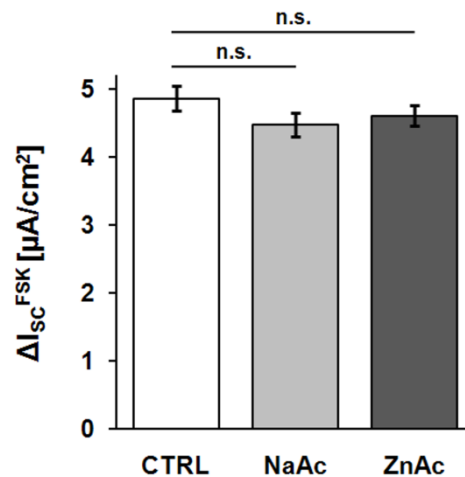


Abb. 4.20: Induzierter Strom. IPEC-J2/PS-Monolayer wurden 4 h apikal entweder mit 500 μM ZnAc oder 1000 μM NaAc vorinkubiert, bis sie unter Beibehaltung dieser Konzentrationen in die Ussing-Kammern eingespannt wurden und ca. 6 h nach Acetatapplikation durch basolaterale Gabe von Forskolin ein Strom induziert wurde. Es ergaben sich keine Unterschiede (n.s.). Gezeigt sind $MW \pm SEM$, jeweils $n=8$.

4.2.2 Einfluss von Zinkprophylaxen auf die jejunale Barrierefunktion von gesunden Ferkeln im Kurz- und Langzeitexperiment

Der Einfluss zweier verschieden hoch dosierter Zinkprophylaxen wurde in einer Studie mit 48 Ferkeln untersucht. Vier Wochen *post partum* wurden die Saugferkel von der Sau abgesetzt und willkürlich in drei Gruppen à 16 Ferkel eingeteilt, die entweder eine geringe (Zn^K , 57 mg/kg Futter, entspricht der Kontrolldosis), eine mittlere (Zn^M , 164 mg/kg Futter) oder eine hohe Zinkdosis (Zn^H , 2425 mg/kg Futter) mit dem Futter erhielten. Eine Woche bzw. vier Wochen nach gruppenspezifischem Fütterungsbeginn wurden acht Ferkel pro Gruppe eingeschläfert und Gewebe des mittleren Jejunums für anschließende Untersuchungen präpariert. Die Ferkeltötungen waren zeitlich über neun Monate verteilt.

Dem Versuchsdesign zugrunde liegend wurden alle in diesem Abschnitt vorgestellten Messergebnisse eines Ferkels entweder parallel oder in direktem Anschluss aneinander erhoben.

4.2.2.1 Zinkkonzentrationen in den Jejunumingesta

Wie viel Zink ein Ferkel aus dem Futter absorbiert, hängt neben vielen Faktoren wie z. B. der Futteraufnahme und der jejunalen Ausstattung mit Zinktransportern auch entscheidend von der individuellen Bioverfügbarkeit des Zinks ab. Bevor das Zink in die Epithelzellen aufgenommen wird, steht es in Kontakt mit der jejunalen Mukosa. Um vergleichende Aussagen über Effekte unterschiedlicher gefütterter Zinkdosen treffen zu können, ist es demzufolge

wichtig, die wahre Konzentration am Ort der Absorption zu kennen. Zu diesem Zweck wurden die Konzentrationen theoretisch absorbierbaren Zinks in den Jejunumingesta bestimmt.

Tab. 4.2: Zinkkonzentrationen in Futter und Jejunumingesta. Dieser Satz nicht publizierter Daten wurde SFB 852-intern von Dr. Robert Pieper vom Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin zur Verfügung gestellt. Gezeigt sind MW ± SEM, jeweils n=6.

Alter Diät	Tag 33			Tag 54		
	Zn ^K	Zn ^M	Zn ^H	Zn ^K	Zn ^M	Zn ^H
Zink im Futter [mg/kg Futter]	57	164	2425	57	164	2425
Zink in Ingesta [µmol/l IFM*]						
Gesamt	675 ± 142	641 ± 161	5726 ± 1398	772 ± 132	665 ± 94	11698 ± 1598
Organisch geb.	14 ± 6	13 ± 8	247 ± 52	25 ± 8	16 ± 6	406 ± 78
Frei (Zn ²⁺)	75 ± 25	69 ± 25	152 ± 56	91 ± 26	88 ± 25	233 ± 72

*IFM - Ingestafrischmasse

Während die Zinkgehalte der Diäten sich deutlich voneinander unterschieden, haben sich die Zinklevel in den jejunalen Ingesta der Gruppen Zn^K und Zn^M angeglichen (**Tab. 4.2**). Die jejunalen Zinkkonzentrationen der Gruppe Zn^H liegen dagegen deutlich höher. In Bezug auf den Gesamtzinkgehalt der Ingesta macht Zink in organisch gebundener Form in beiden Altersgruppen < 5% aus. Die Konzentration an freien Zn²⁺-Ionen rangierte zwischen ~10% in den Gruppen Zn^K und Zn^M und < 3% in der Gruppe Zn^H.

4.2.2.2 Keine Effekte durch Zink auf die Epithelmorphologie

Die epitheliale Oberfläche ist ein Schlüsselparameter für die Erhebung flächenabhängiger Messwerte. Letztere sind nur dann direkt untereinander vergleichbar, wenn die Epithelfläche eine konstante Basis bildet. Vor diesem Hintergrund wurden Mukosaschnitte des mittleren Jejunums 33 Tage alter Ferkel der Gruppen Zn^K, Zn^M und Zn^H morphometrisch analysiert und der Quotient aus mukosaler zu serosaler Oberfläche als Maß der effektiven Epithelfläche gebildet. Zwischen den Gruppen ergaben sich keine statistisch relevanten Flächenunterschiede (**Tab. 4.3**). Kryptentiefe und -dichte waren ebenfalls unverändert. Des Weiteren konnte Ping Liu (Institut für Tierernährung, Freie Universität Berlin) im Rahmen des SFB 852 zeigen (unveröffentlichte Daten), dass zu keinem von vier Zeitpunkten (Tag 33, 40, 47, 54) hinsichtlich Zottenhöhe, Kryptentiefe und dem Quotienten daraus statistisch relevante Gruppenunterschiede auftraten – weder im proximalen noch im distalen Jejunum (**Tab. 4.4**). Daraus wurde geschlussfolgert, dass für das Verhältnis von mukosaler zu serosaler Epithel-

fläche des mittleren Jejunums auch bei 54 Tage alten Ferkeln keine relevanten Gruppenunterschiede zu erwarten sind.

Tab. 4.3: Morphometrie der Mukosa mittleren Jejunums. Gezeigt sind MW \pm SEM, jeweils n=3.

Alter Diät	Tag 33		
	Zn ^K	Zn ^M	Zn ^H
Kryptentiefe [μm]	225 \pm 25	207 \pm 14	221 \pm 37
Kryptendichte [1/100 μm]	1,9 \pm 0,2	1,8 \pm 0,1	2,1 \pm 0,3
Oberfläche (mukosal/serosal)	4,4 \pm 1,5	4,1 \pm 2,3	5,7 \pm 1,2

Tab. 4.4: Morphometrie der Mukosa proximalen und distalen Jejunums. Dieser Satz noch nicht publizierter Daten wurde SFB 852-intern von Ping Liu (Institut für Tierernährung, Freie Universität Berlin) zur Verfügung gestellt. Gezeigt sind MW, jeweils n=8.

Alter [Tage]	Zn ^k								Zn ^m								Zn ^h				p-Wert	
	33	40	47	54	54	33	40	47	54	33	40	47	54	54	33	40	47	54	SEM	Diät	Alter	Diät × Alter
Proximales Jejunum																						
Zottenhöhe [µm]	360	437	476	455	313	385	513	515	362	391	494	500	8,33	0,954	<0,001	0,346						
Kryptentiefe [µm]	224	248	246	250	215	215	239	250	226	218	225	237	3,71	0,215	0,117	0,762						
Zottenhöhe/ Kryptentiefe	1,66	1,77	1,95	1,84	1,47	1,78	2,17	2,05	1,82	1,82	2,26	2,14	0,04	0,229	<0,001	0,627						
Distales Jejunum																						
Zottenhöhe [µm]	341	358	485	458	307	397	470	497	367	396	488	455	8,98	0,777	<0,001	0,724						
Kryptentiefe [µm]	203	230	255	238	204	227	231	237	203	220	244	218	3,65	0,495	0,003	0,887						
Zottenhöhe/ Kryptentiefe	1,70	1,60	1,91	1,95	1,51	1,74	2,03	2,10	1,82	1,83	2,00	2,08	0,03	0,260	<0,001	0,697						

4.2.2.3 Keine Effekte durch Zink auf den epithelialen Widerstand und Permeabilitäten

Mithilfe der Ein-Wege-Impedanzspektroskopie konnte gezeigt werden, dass die gefütterten Zinkdosen auf die Höhe des epithelialen Widerstands R^{epi} , als Maß der pauschalen Barrierestärke, keinen modulatorischen Einfluss haben – sowohl nach einer Woche (Tag 33; Zn^K : $30,9 \pm 4,2 \Omega \cdot cm^2$, $n=7$; Zn^M : $28,9 \pm 3,4 \Omega \cdot cm^2$, $n=8$; Zn^H : $32,1 \pm 2,8 \Omega \cdot cm^2$, $n=8$; n.s.) als auch nach vier Wochen (Tag 54; Zn^K : $22,7 \pm 4,2 \Omega \cdot cm^2$, $n=8$; Zn^M : $33,2 \pm 8,5 \Omega \cdot cm^2$, $n=8$; Zn^H : $22,4 \pm 2,3 \Omega \cdot cm^2$, $n=5$; n.s.) (**Abb. 4.21**). Auch hinsichtlich Alterseffekten (Tag 33 vs. Tag 54) und einer Diät-Alter-Interaktion ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede.

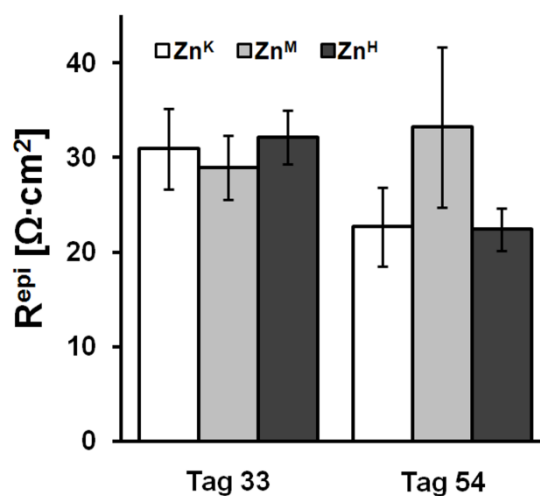


Abb. 4.21: Kein Zinkeffekt auf den jejunalen R^{epi} . Nach einer bzw. vier Wochen gemäßer Zink-supplementierung wurde an jejunalen Mukosae der Gruppen Zn^K , Zn^M und Zn^H mittels Ein-Wege-Impedanzspektroskopie der epitheliale Widerstand R^{epi} ermittelt. Es ergaben sich weder Gruppen- noch Alterseffekte. Gezeigt sind $MW \pm SEM$. Tag 33: Zn^K , $n=7$; $Zn^{M,H}$, $n=8$; Tag 54: $Zn^{K,M}$, $n=8$; Zn^H , $n=5$.

Inwieweit eine Zinksupplementierung die Epithelpermeabilität für Ionen sowie kleine und größere Markermoleküle widerspiegelt, ist in **Tabelle 4.5** zusammengestellt und wird im Folgenden zunächst anhand des Verhältnisses der Permeabilitäten für Natrium (23 Da, Stokesradius 1,84 Å) und Chlorid (35 Da, Stokesradius 1,21 Å) als Maß der Ladungsselektivität des Epithels erläutert. Aus Dilutionspotentialmessungen ermittelt, kam es durch verschiedene Zinkprophylaxen zu keinerlei statistisch relevanten Änderung des Verhältnisses P_{Na}/P_{Cl} , weder in jungen noch in älteren Ferkeln. Es ergaben sich jedoch Alterseffekte ($n=8$, $p<0,01$), die im Verhältnis zur Chloridpermeabilität in einer selektiv verringerten Permeabilität für Natrium in Erscheinung traten. Bezüglich der epithelialen Permeabilität für Fluoreszein (332 Da, Stokesradius 4,5 Å) resultierten aus Fluxmessungen keine Gruppeneffekte. Die Fluoreszeinpermeabilität ließ sich hingegen mit zunehmendem

Alter der Tiere als tendenziell abnehmend ($p=0,06$) interpretieren. Bei Fluxmessungen mit FITC-Dextran 4000 (4 kDa, Stokesradius ~ 14 Å) traten ebenfalls keine Gruppeneffekte auf, äußerten sich jedoch altersbedingte Effekte in einer erhöhten Permeabilität ($n=7-8$, $p<0,05$).

Tab. 4.5: Keine Zinkeffekte auf die jejunale Permeabilität für Ionen, kleine und größere Moleküle. Nach einer bzw. vier Wochen entsprechender Zinksupplementierung wurden das Permeabilitätsverhältnis P_{Na}/P_{Cl} sowie die Permeabilitäten für Fluoreszein (P_{FLU}) und FITC-Dextran 4000 (P_{FD4}) an jejunalen Mukosae der Gruppen Zn^K , Zn^M und Zn^H ermittelt. Gezeigt sind $MW \pm SEM$, jeweils $n=7-8$.

Alter Diät	Tag 33			Tag 54			p-Wert		
	Zn^K	Zn^M	Zn^H	Zn^K	Zn^M	Zn^H	Diät	Alter	Diät \times Alter
P_{Na}/P_{Cl}	1,57 \pm 0,06	1,75 \pm 0,10	1,79 \pm 0,07	1,55 \pm 0,13	1,39 \pm 0,06	1,40 \pm 0,10	n.s.	$p<0,01$	n.s.
P_{FLU} [10^{-6} cm/s]	0,79 \pm 0,19	0,62 \pm 0,10	0,70 \pm 0,14	0,54 \pm 0,20	0,29 \pm 0,05	0,49 \pm 0,24	n.s.	$p=0,06$	n.s.
P_{FD4} [10^{-6} cm/s]	0,32 \pm 0,08	0,29 \pm 0,08	0,21 \pm 0,06	0,40 \pm 0,06	0,42 \pm 0,09	0,58 \pm 0,16	n.s.	$p<0,05$	n.s.

4.2.2.4 Effekte durch Zink auf TJ-Proteine

Da in der Literatur bereits Effekte durch Zink auf junctionale Proteine wie z. B. Claudin-1, -2 und Tricellulin (HU *ET AL.*, 2013a; WANG *ET AL.*, 2013b) beschrieben wurden, bildete dieses Wissen einen Ausgangspunkt für die Analyse der parazellulären Barriere auf Proteinebene. Da die Gruppenmittel des R^{epi} der älteren Ferkel aufgrund ihrer Verschiedenheit Anlass zu der Vermutung gaben, Unterschiede in parazellulären Komponenten aufzuweisen, welche für eine spätere Evaluierung der Zinkprophylaxe bei Langzeitwirkung von Bedeutung wären, wurden im Folgenden Gewebelysate auf Claudin-1, -2, -5, -8, -15 und Tricellulin-a untersucht.

Um die jejunale Proteinexpression von 24 Ferkeln der drei Fütterungsgruppen vergleichend in Western Blot-Analysen gegenüberzustellen, mussten die Gewebelysate aus technischen Gründen in zwei Gruppen aufgeteilt werden. Damit die Ergebnisse durch potentielle jahreszeitenbedingte Schwankungen in der Proteinexpression nicht verfälscht wurden, wurden Gewebelysate von Ferkeln je einer Fütterungsgruppe und Tötung innerhalb einer definierten Jahreshälfte (Sommer/Herbst oder Winter/Frühling) in einer Western Blot-Analyse vergleichend gegenübergestellt. Repräsentative Western Blots sind in den **Abbildungen 4.22A** und **B** illustriert.

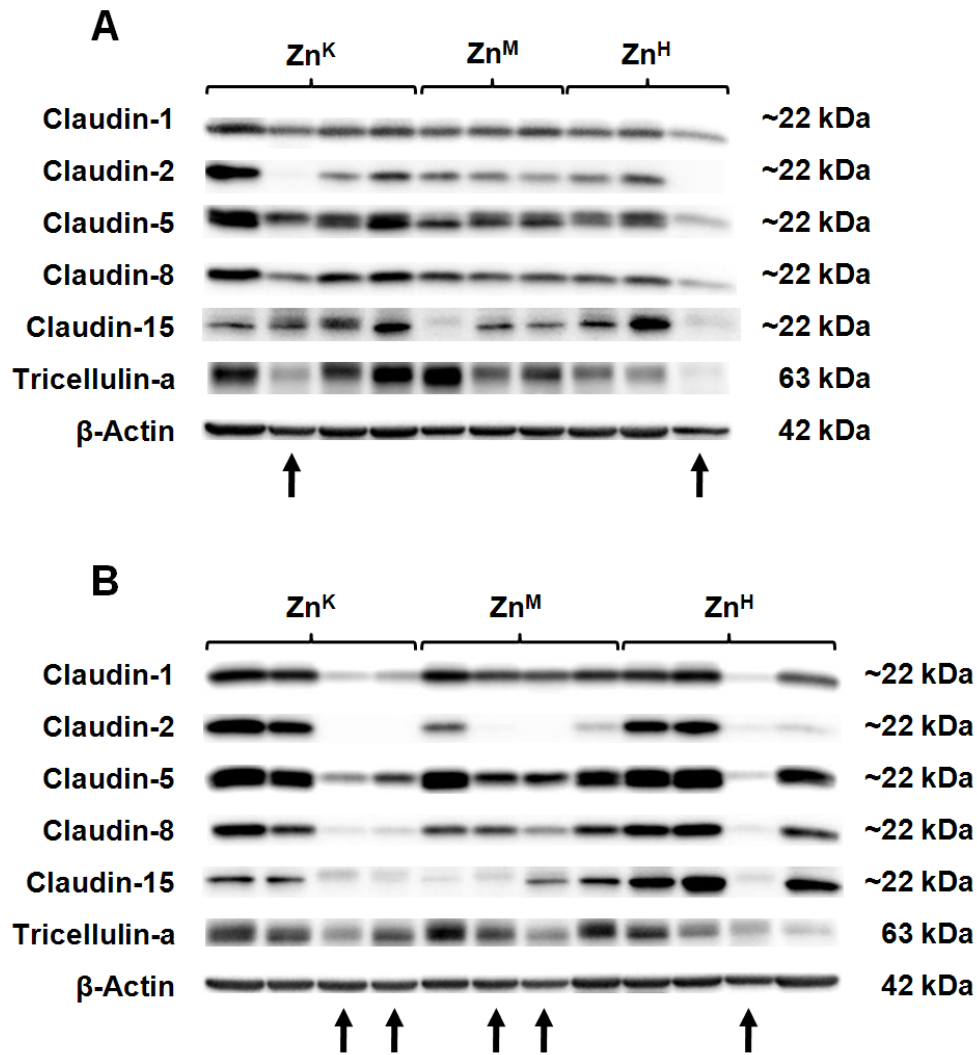


Abb. 4.22: Qualitative Analyse der jejunalen TJ-Proteinexpression. Gewebelysate von 54 Tage alten „Sommer/Herbst“-Ferkeln (**A**) und „Winter/Frühling“-Ferkeln (**B**) wurden in Western Blot-Analysen hinsichtlich ihrer TJ-Proteinexpression qualitativ beurteilt. Pfeile indizieren Tiere mit auffällig geringer Expression aller getesteten TJ-Proteine.

Neben der auffallend hohen Variabilität innerhalb der Fütterungsgruppen (Pfeile in **Abb. 4.22A** und **B** kennzeichnen Ferkel mit besonders geringem Gehalt an TJ-Proteinen) ergab die densitometrische Analyse der Western Blot-Signale (**Abb. 4.23**), verglichen mit Gruppe Zn^K (100%, n=8), eine Heraufregulation von Claudin-1 ($118 \pm 5\%$, $p < 0,05$) und Tricellulin-a ($158 \pm 19\%$, $p < 0,05$) in Gruppe Zn^M (n=7) sowie eine Herabregulation der Expression von Tricellulin-a ($71 \pm 11\%$, $p < 0,05$) in Gruppe Zn^H (n=7).

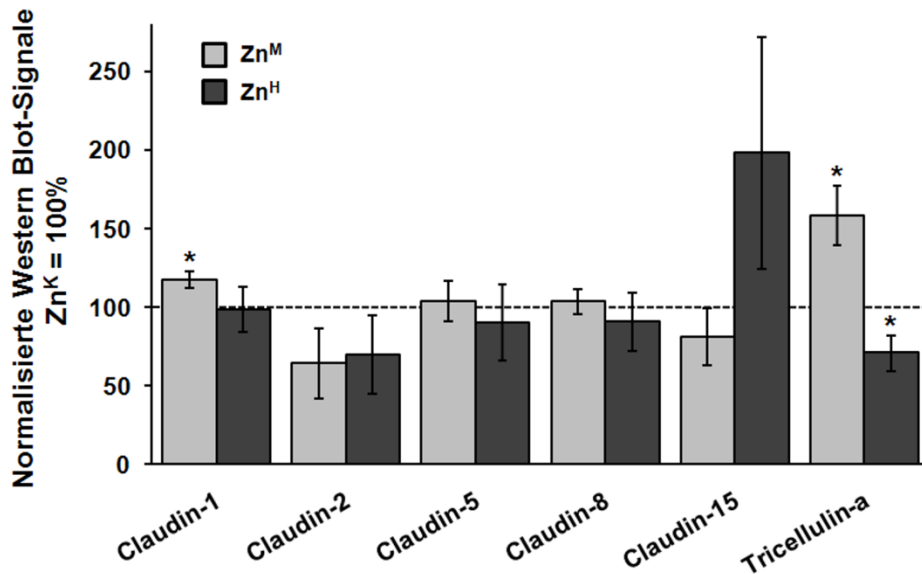


Abb. 4.23: Quantitative Analyse der jejunalen TJ-Proteinexpression. Es erfolgte eine densitometrische Auswertung der Signalstärken (siehe Abb. 4.22) mit Normalisierung an β -Actin – zunächst separat für „Sommer/Herbst“- und „Winter/Frühling“-Banden, deren Ergebnisse schließlich zusammengefasst wurden. Zn^M und Zn^H sind in Relation zu Zn^K (gestrichelte Linie, 100%) dargestellt. Es ergab sich eine signifikant erhöhte Expression von Claudin-1 und Tricellulin-a der Gruppe Zn^M bzw. eine signifikante Reduktion der Tricellulin-a-Expression in Gruppe Zn^H (*, $p < 0,05$). Gezeigt sind $MW \pm SEM$. Zn^K , $n=8$; $Zn^{M,H}$, $n=7$.

4.2.2.5 Keine Effekte durch Zink auf die induzierte Chloridsekretion

Bei der Behandlung von sekretorischen Diarrhöen, sowohl am Schwein als auch am Menschen, wird Zink bereits erfolgreich angewandt. Ziel dabei ist es, die erhöhte Chloridsekretion der intestinalen Mukosa wieder auf ein normales Maß zu reduzieren. Vor diesem Hintergrund wurde die jejunale Mukosa in der Ussing-Kammer mit Forskolin stimuliert und die induzierte Elektrolytsekretion in Form des ΔI_{SC} ermittelt. Es kam zu beiden Zeitpunkten zu keinen statistisch relevanten Unterschieden zwischen den Fütterungsgruppen (Tag 33, Zn^K : $77,5 \pm 10,2 \mu A/cm^2$, Zn^M : $84,3 \pm 8,8 \mu A/cm^2$, Zn^H : $105,4 \pm 15,7 \mu A/cm^2$, $n=8$, n.s.; Tag 54, Zn^K : $44,2 \pm 7,5 \mu A/cm^2$, Zn^M : $51,2 \pm 6,0 \mu A/cm^2$, Zn^H : $52,4 \pm 9,5 \mu A/cm^2$, $n=8$, n.s.) (**Abb. 4.24**). Die Chloridsekretion nahm jedoch mit zunehmendem Alter der Ferkel signifikant ab ($p < 0,001$). Eine Diät-Alter-Interaktion ergab sich nicht.

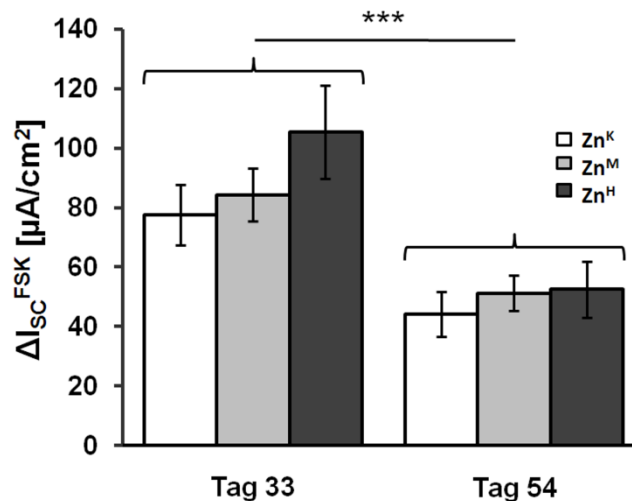


Abb. 4.24: Kein Zinkeffekt auf die jejunale induzierte Chloridsekretion. Nach einer bzw. vier Wochen entsprechender Zinksupplementierung wurde an jejunalen Mukosae der Gruppen Zn^K, Zn^M und Zn^H die Stromantwort nach Forskolinabgabe gemessen. Es resultierten Alterseffekte (***, $p < 0,001$). Gezeigt sind MW \pm SEM, jeweils $n=8$.

4.2.3 Einfluss von Zinkprophylaxen auf die jejunale Barrierefunktion von TGEV-infizierten Ferkeln

In dieser Studie wurden zwei verschiedene Zinkprophylaxen auf ihren präventiven Charakter bei Infektion mit TGEV (engl. *transmissible gastroenteritis virus*) von insgesamt 30 Schweinen untersucht. Drei Wochen *post partum* wurden die Ferkel entwöhnt und beliebig in drei Gruppen à zehn Ferkel aufgeteilt, die entweder eine geringe (Zn^K, 51 mg/kg Futter, entspricht der Kontrolldosis), eine mittlere (Zn^M, 153 mg/kg Futter) oder eine hohe Zinkdosis (Zn^H, 2190 mg/kg Futter) mit dem Futter erhielten. Im Alter von vier Wochen wurden die Tiere oral mit TGEV infiziert und einen Tag später getötet, woraufhin das mittlere Jejunum für anschließende Analysen beprobt wurde. Dem Versuchsdesign entsprechend wurden alle in diesem Abschnitt vorgestellten Messergebnisse eines Ferkels entweder parallel oder im direkten Anschluss aneinander erhoben. Eine Messung der Zinkkonzentration in den jejunalen Ingesta erfolgte nicht. Aufgrund ähnlicher verabreichter Zinkdiäten wurden mit dem Zinkfütterungsversuch vergleichbare Zinkkonzentrationen angenommen.

4.2.3.1 Erhalt der jejunalen Morphologie durch Zink

Eine charakteristische Folge der TGEV-Infektion bei Ferkeln ist das Auftreten einer offensichtlichen Zottenatrophie. Um zu prüfen, in welchem Maße die Jejunummukosa in Mitleidenschaft gezogen wurde und wie sich eine Zinkprophylaxe bemerkbar macht, wurden morphometrische Analysen an Gewebeschnitten durchgeführt. Die Histologie offenbarte in der

Zn^K-Gruppe eine drastische Vernichtung der Zottenstruktur, wohingegen eine Zottenatrophie in den Gruppen Zn^M und Zn^H nicht zu beobachten war (**Abb. 4.25A**). Die Kryptentiefe wurde durch Zinksupplementierung nicht beeinflusst (**Abb. 4.25B**).

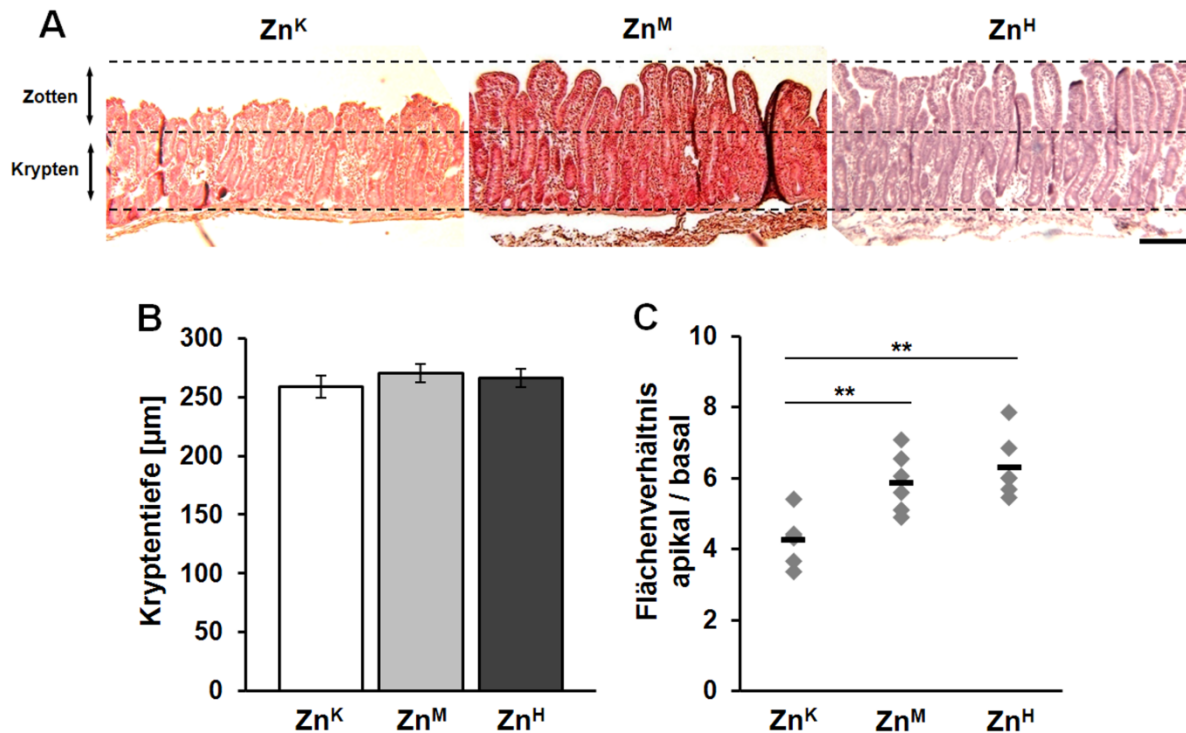


Abb. 4.25: Morphometrie des TGEV-behandelten Jejunumepithels. (A) Repräsentative H&E-Färbungen von jejunalen Mukosaschnitten. Die obere und untere gestrichelte Linie indizieren die apikale und basale Grenze des Epithels. Die mittlere gestrichelte Linie zeigt die Transitionszone, von der aus Zotten nach oben und Krypten nach unten ragen. Die TGEV-Infektion in Zn^K-Ferkeln resultierte in Zottenatrophie, welche durch Zn^M- und Zn^H-Diäten verhindert wurde. Balken: 200 µm. (B) Unabhängig von der Zinksupplementierung blieb die Kryptentiefe konstant. Gezeigt sind MW ± SEM, jeweils n=6. (C) Das Verhältnis von apikaler zu basaler Fläche repräsentiert ein Maß für die effektive Epithelfläche und war in der Gruppe Zn^K signifikant verringert (**, p<0,01), verglichen mit den Gruppen Zn^M und Zn^H, jeweils n=6. Einzelwerte sind als graue Rauten, Mittelwerte als schwarze Striche dargestellt.

Änderungen in der Zottenarchitektur gehen konsequenterweise mit Änderungen der jeweiligen jejunalen Epithelfläche einher. So war die intestinale Oberfläche der Gruppe Zn^K ($4,3 \pm 0,3$, n=6) um den Faktor 1,48 signifikant verringert, verglichen mit der Gruppe Zn^H ($6,3 \pm 0,4$, n=6, p<0,01) (**Abb. 4.25C**). In Bezug auf Gruppe Zn^M ($5,9 \pm 0,3$, n=6, p<0,01) war die Oberfläche der Gruppe Zn^K um den Faktor 1,38 reduziert, was gleichermaßen signifikant war. Unterschiede zwischen den Oberflächendimensionen der Gruppen Zn^M und Zn^H waren statistisch nicht relevant.

4.2.3.2 Milderung der epithelialen Apoptoserate durch Zink

Aus verschiedenen Publikationen ist bekannt, dass der strukturelle Status der Zotten mit der Caspase-3-vermittelten Apoptoserate TGEV-infizierter Zellen korreliert. Wie aus **Abbildung 4.26A** ersichtlich, war durch die TGEV-Infektion einzig das Zottenepithel von apoptotischen Ereignissen betroffen, die Kryptenregionen blieben frei davon. Entsprechend der Zottenatrophie der Gruppe Zn^K war nahezu die Gesamtheit der Epithelzellen kubisch deformiert und apoptotisch, während Gruppe Zn^M morphologisch nicht beeinflusst schien und die epitheliale Apoptoserate zudem deutlich reduziert war (**Abb. 4.26B**). In Gruppe Zn^H war die Zellform regelrecht und Apoptosen traten lediglich sporadisch auf.

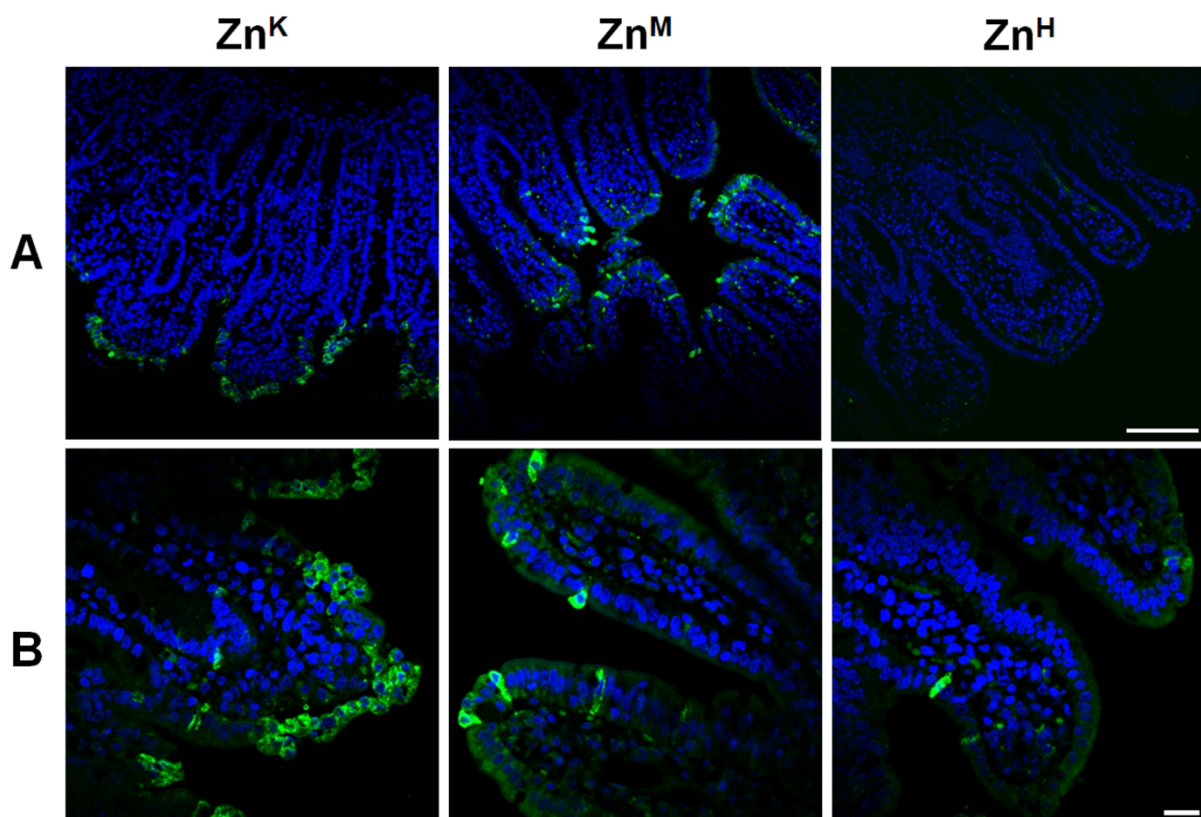


Abb. 4.26: Apoptosen im Jejunumepithel. Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen von aktivierter Caspase-3 (abgebildet in Grün). Nuclei (DAPI) sind in Blau dargestellt. **(A)** Bei Beeinflussung des jejunalen Epithels durch TGEV-Infektion waren nur Enterozyten der Zotten apoptotisch, das Kryptenepithel blieb intakt. Balken: 100 μ m. **(B)** Von Gruppe Zn^K zu Zn^H stellte sich die gewöhnliche Zellmorphologie wieder her und nahm die Zahl apoptotischer Zellen ab. Balken: 20 μ m.

4.2.3.3 Bewahrung der epithelialen Barriere durch Zink

Damit epithelflächenabhängige Parameter zwischen den einzelnen Gruppen vergleichbar wurden, wurden elektrophysiologische Messwerte unter Berücksichtigung der Epithelflächen-

unterschiede korrigiert (^{korrr}). Wie unter 4.2.2.2 gezeigt, wurden durch verschieden dosierte Zinkprophylaxen allein keine Morphologieveränderungen des Jejunumepithels induziert, weswegen die größtmögliche Epithelfläche des Jejunums der infizierten Ferkel (Gruppe Zn^H) als Ausgangspunkt für die Korrekturen diente.

Als erstes Maß der Barrierestärke wurde $R^{\text{epi,korr}}$ ermittelt, der im Vergleich zur Gruppe Zn^K ($19,3 \pm 2,1 \Omega \cdot \text{cm}^2$, n=8) in Zn^H-Ferkeln ($29,4 \pm 2,5 \Omega \cdot \text{cm}^2$, n=10, $p < 0,05$) signifikant erhöht war (**Abb. 4.27A**). Unterschiede der Barrierestärke zwischen den Gruppen Zn^K und Zn^M ($27,7 \pm 2,6 \Omega \cdot \text{cm}^2$, n=10, $p < 0,1$) konnten lediglich als steigende Tendenz interpretiert werden. Die Permeabilität für das parazelluläre Markermolekül Fluoreszein war zwischen den Gruppen statistisch nicht verschieden (Zn^K: $0,67 \pm 0,12 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$, n=8; Zn^M: $0,70 \pm 0,14 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$, n=9; Zn^H: $0,88 \pm 0,12 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$, n=9; n.s.) (**Abb. 4.27B**).

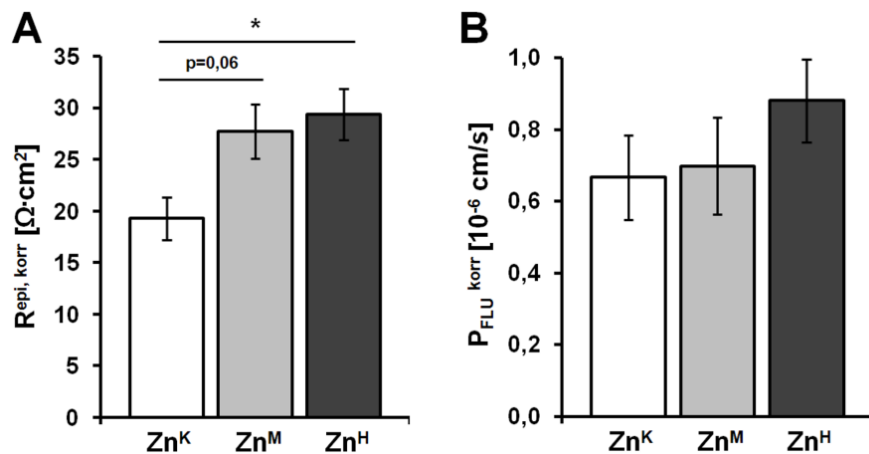


Abb. 4.27: Epithelialer Widerstand und parazelluläre Permeabilität für Fluoreszein. (A) Im Vergleich zu Zn^K-Ferkeln (n=8) wiesen die Gruppen Zn^M (n=10, $p < 0,1$) und Zn^H (n=10, *, $p < 0,05$) einen tendenziell bzw. signifikant erhöhten $R^{\text{epi,korr}}$ auf. (B) Die Permeabilität für Fluoreszein $P_{\text{FLU}}^{\text{korr}}$ war zwischen den Gruppen statistisch unbedeutend (Zn^K, n=8; Zn^{M,H}, n=9). Gezeigt sind MW ± SEM.

4.2.3.4 Normalisierung sekretorischer und absorptiver Vorgänge durch Zink

In Hinsicht auf aktive Transportprozesse ergab sich folgende Situation: Die durch Forskolin induzierte Stromantwort war im Jejunum von Ferkeln der Gruppe Zn^K ($118,7 \pm 12,4 \mu\text{A/cm}^2$, n=8, $p < 0,001$) signifikant erhöht, verglichen mit der der Gruppen Zn^M ($57,9 \pm 5,8 \mu\text{A/cm}^2$, n=9) und Zn^H ($54,0 \pm 7,9 \mu\text{A/cm}^2$, n=10) (**Abb. 4.28A**). Im Gegensatz dazu waren die Mittelwerte des glukoseinduzierten Kurzschlussstroms zwischen den Gruppen statistisch nicht verschieden (Zn^K: $64,0 \pm 20,7 \mu\text{A/cm}^2$, n=7; Zn^M: $61,7 \pm 9,5 \mu\text{A/cm}^2$, n=8, Zn^H: $40,5 \pm 5,41 \mu\text{A/cm}^2$, n=8; n.s.) (**Abb. 4.28B**). Das Wertespektrum in Gruppe Zn^K übertraf jedoch die Varianz innerhalb der Gruppen Zn^M und Zn^H bei Weitem.

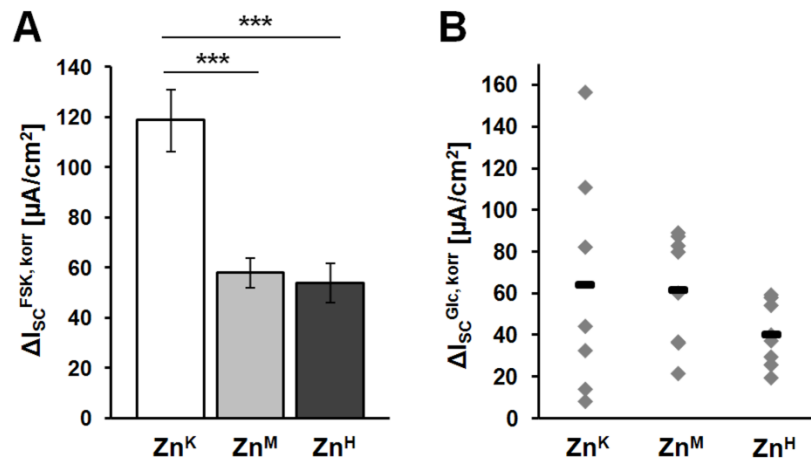


Abb. 4.28: Elektrolytsekretion und Glukoseabsorption. Alle Messwerte wurden hinsichtlich der Epithelflächenunterschiede korrigiert (^{kor}). **(A)** Der Kurzschlussstrom nach Stimulierung des Epithels mit Forskolin ($\Delta I_{SC}^{FSK,corr}$) war in Gruppe Zn^K (n=8, ***, p<0,001) signifikant erhöht, verglichen mit den Gruppen Zn^M (n=9) und Zn^H (n=10). Gezeigt sind MW \pm SEM. **(B)** Glukoseinduzierte Kurzschlussströme ($\Delta I_{SC}^{Glc,corr}$) waren im Mittel statistisch nicht verschieden zwischen den Gruppen (jeweils n=8). Die Streuung in Gruppe Zn^K ist allerdings bemerkenswert. Einzelwerte sind als graue Rauten, Mittelwerte als schwarze Striche dargestellt.

5 DISKUSSION

Die Absatzproblematik bei Schweinen stellt immer noch ein nicht zu unterschätzendes Problem in der Schweinemast dar, das es noch intensiver zu erforschen gilt. Während dieses Prozesses sind ethische Vertretbarkeit und Nutzen der Versuchstierstudien immerfort abzuwägen. Bereits im Jahr 1959 postulierten Russel und Burch die Prinzipien humaner Experimentierweise: *Replacement, Reduction and Refinement (3Rs)*. Darin empfahlen sie, die Verwendung von Tieren bei bestehender Möglichkeit zu ersetzen und bei unwider-ruflicher Notwendigkeit die Anzahl der Individuen auf ein Minimum zu reduzieren. Des Weiteren plädierten sie dafür, Schmerz und Leid des Tieres auf ein kleinstmögliches Höchstmaß zu begrenzen (FLECKNELL, 2002). Mittlerweile hat sich diese humane Herangehensweise weitgehend durchgesetzt und so können beispielsweise *in vitro*-Bioassays und mechanistische Studien an Zellkulturmodellen außerordentlich hochwertige Alternativen zum Tierversuch darstellen (BARNARD AND GUREVICH, 2005; FESTING AND WILKINSON, 2007; HENDRIKSEN, 2002). Zwar werden damit die Forderungen der 3Rs erfüllt, im Gegenzug ist es jedoch weitverbreitete Praxis, bei der Kultivierung von Zellen auf tierische Produkte wie z. B. fötales Kälberserum (FBS) zurückzugreifen. Um den globalen jährlichen Bedarf an FBS zu decken, ist eine Anzahl von Feten zwischen ein und zwei Millionen veranschlagt, aus denen mit Vakuumpumpen und ohne vorige anästhetische Maßnahmen das Blut gewonnen wird (JOCHEMS ET AL., 2002). Somit sollte aus moralischen Gründen ein weiteres Ziel des humanen Experimentierens darin gesehen werden, den Bedarf an FBS zu senken. Zudem ist es aus wissenschaftlicher Sicht fraglich, inwieweit die molekulare Zusammensetzung des pauschal verwendeten FBS mit der des Serums der Spezies übereinstimmt, aus der die zu kultivierenden Zellen stammen. So konnte bereits vor drei Jahrzehnten gezeigt werden, dass allein die Gehalte an Fettsäuren in den Seren von Kälberfeten, Rindern, Pferden und Schweinen beträchtlich voneinander abweichen (STOLL AND SPECTOR, 1984) und adhärente Zellen durchaus Präferenzen für individuelle Seren zeigen (JAYME ET AL., 1988).

5.1 IPEC-J2/PS: Ein Kulturmodell mit Zellphysiologie des porzinen Jejunumepithels

Ein Zellkulturmodell kann ein geeignetes Werkzeug zur Unterstützung von *in vivo*-Versuchen darstellen, vorausgesetzt es zeigt funktionelle sowie strukturelle Äquivalenz zum Gewebe seiner Abstammung. Im Fall des porzin-jejunalen Epithelmodells IPEC-J2 sollten Zellen somit Eigenschaften von Jejunozyten aufweisen, welche grob in einer hoch prismatischen

Morphologie, der Ausbildung eines Monolayers und der Nährstoffresorption bestehen. Während konventionell kultivierte IPEC-J2 enorm groß und flach sind und ihre Monolayer TER im $\text{k}\Omega\cdot\text{cm}^2$ -Bereich ausbilden, sind jejunale Epithelien des Schweins aus schmalen, säulenförmigen Zellen aufgebaut, mit einem um zwei Größenordnungen niedrigeren TER. Aufgrund dessen, dass die epitheliale Fläche des Jejunums durch Zotten und Krypten vergrößert ist, sollten TER-Werte des planen IPEC-J2-Monolayers für einen direkten Vergleich entsprechend korrigiert werden. Die resultierende TER-Diskrepanz zwischen Gewebe und IPEC-J2 beträgt dennoch eine Größenordnung.

5.1.1 Beziehung zwischen Morphologie und TER

Der TER wird von den parallel geschalteten Widerständen R^{trans} und R^{para} reflektiert. Wird ein konstanter R^{para} pro Längeneinheit der TJ angenommen sowie eine konstante Anzahl Ionenkanäle pro Membraneinheit, würden Monolayer aus kleinen, hohen Zellen geringere TER-Werte aufweisen als Monolayer bestehend aus großen, flachen Zellen. Die die Membranfläche vergrößernden Mikrovilli und basolateralen Invaginationen würden den TER zusätzlich verringern (GÜNZEL, 2012). Dementsprechend konnte an einem porzinen Colonepithelmodell, welches eine angemessene Zellmorphologie inklusive eines Mikrovillisaums sowie diverser Zell-Zell-Kontakte aufweist (PETTO *ET AL.*, 2011), gezeigt werden, dass Monolayer adäquaten TER aufweisen ($\sim 500\text{-}800 \Omega\cdot\text{cm}^2$ (PETTO *ET AL.*, 2011)), der, wäre er auf die entsprechende Epithelflächenvergrößerung durch Krypten korrigiert (Faktor 9, dieser Faktor wurde SFB 852-intern von Juliane Rieger vom Institut für Veterinär-Anatomie der Freien Universität Berlin zur Verfügung gestellt), Dimensionen des porzinen Colonepithels (R^{epi} : $55 \Omega\cdot\text{cm}^2$ (RICHTER *ET AL.*, 2013)) aufwiese. Eine ähnliche Beziehung zwischen Morphometrie und TER konnte zwischen unterschiedlich kultivierten bronchialen Epithelzellen des Menschen beobachtet werden. Diese bilden einen desto niedrigeren TER, je höher die Calu-3 Zellen sind (GRAINGER *ET AL.*, 2006).

Die hohen TER-Werte konventionell kultivierter IPEC-J2-Monolayer, welche nicht ihrem Pendant *ex vivo* entsprechen, sind somit hauptsächlich eine Folge enormer Zellgröße. Zusätzlich wurde die apikale Membranfläche durch lediglich wenige und zudem kurze Mikrovilli kaum vergrößert. Im Gegensatz dazu resultierte die Kultivierung mit Schweineserum in einer Umgestaltung der großen, flachen IPEC-J2 zu kleineren Zellen kubischer Form mit zahlreichen und langen Mikrovilli. Diese Metamorphose der Zellmorphologie wurde von einer drastischen Reduktion des TER begleitet. Sowohl von FBS als auch von PS ausgehend, passten sich Morphologie und TER gegenläufig an die jeweils andere Bedingung an.

Frühere Arbeiten zur Ultrastruktur der TJ zeigten eine Korrelation zwischen der Anzahl horizontaler TJ-Stränge und dem TER, genau genommen R^{para} (CLAUDE, 1978; CLAUDE AND GOODENOUGH, 1973), obwohl auch weitere Faktoren wie die TJ-Komposition diese Korrelation bewiesenermaßen beeinträchtigen können (STEVENSON *ET AL.*, 1988). Auch wenn in der vorliegenden Arbeit die Gesamtlänge der TJ hauptverantwortlich für den TER zu sein scheint, könnte die TJ-Ultrastruktur den TER genauso beeinflusst haben, denn die Tiefe des TJ-Netzwerkes und die Anzahl horizontaler Stränge darin waren in IPEC-J2/FBS erhöht. Neben Änderungen von Länge und Struktur der TJ hat die Umgestaltung der Zellmembranfläche wahrscheinlich ebenso zum drastischen TER-Effekt zwischen den Kulturbedingungen beigetragen. In IPEC-J2/PS resultierte diese morphologische Änderung in einer Zunahme der Zellhöhe, in der Anzahl und Länge der Mikrovilli sowie in einer kuppelförmigen apikalen Membran und lateralen Membraneinstülpungen. Die Vergrößerung der Membranfläche korreliert dabei mit der Erhöhung der epithelialen Kapazität.

Unter beiden Kulturbedingungen gilt das Verhältnis $R^{para}/R^{trans} < 1$, welches typisch für das Jejunum ein leckes Epithel indiziert (SCHULTZ, 1972). Interessanterweise nahmen R^{para} und R^{trans} von IPEC-J2/FBS zu IPEC-J2/PS ab, sodass ihr Verhältnis zueinander unter beiden Konditionen konstant blieb. Demnach ist der TER-Effekt gleichermaßen sowohl para- als auch transzellulär bedingt.

Bezüglich letzteren Parameters konnte, verglichen mit IPEC-J2/FBS, in IPEC-J2/PS ein erhöhter, durch Forskolin induzierter Kurzschlussstrom verzeichnet werden, der vermutlich auf eine Zunahme der Membranfläche durch ihre kuppelartige Struktur und zahlreichen Mikrovilli zurückgeführt werden kann. Effekte bezüglich einer höheren Kanaldichte pro Membraneinheit wurden in dieser Arbeit nicht untersucht, sind jedoch nicht auszuschließen.

5.1.2 Morphologieänderung induzierende Kultivierungsbedingungen

Auf Filtermembranen kultivierte Zellen werden für gewöhnlich sowohl von apikaler als auch von basolateraler Seite mit Medium versorgt (engl. *submerged*). Im Bereich der epithelialen Lungenforschung hingegen wird die ALI (engl. *air liquid interface*)-Technik erfolgreich angewandt, indem die apikale Diffusionsbarriere von Sauerstoff durch lediglich einen dünnen Flüssigkeitsfilm minimiert wird und so die *in vitro*-Bedingungen dem *in vivo*-Zustand angeglichen werden. Für das tracheobronchiale Epithelmodell Calu-3 wurde gezeigt, dass sich, verglichen mit *submerged* kultivierten Zell Layern, der Zellphänotyp unter ALI-Kultivierung stark an die native Morphologie anpasst (GRAINGER *ET AL.*, 2006).

Aufgrund der dürrftigen Morphologie *submerged* kultivierter IPEC-1 und IPEC-J2, stellten NOSSOL *ET AL.* (2011) die Vermutung auf, dass die Sauerstoffversorgung des Monolayers unzureichend sein könnte. Da die zelluläre Sauerstoffversorgung in *submerged* kultivierten IPEC-Monolayern allerdings noch nicht bestimmt wurde, konnte eine potentielle Hypoxie bislang auch nicht bestätigt werden. Sauerstoff wird intrazellulär für eine Vielzahl biochemischer Vorgänge sowie Transportprozesse benötigt, die in Beziehung mit der ATP-Synthese stehen. Um also die Differenzierung und Funktionalität der IPEC-Monolayer zu verbessern, wandten sie die ALI-Technik an (NOSSOL *ET AL.*, 2011). Die spezielle Kultivierung optimierte zwar das Zellhöhe/-breite-Verhältnis von IPEC-1, jedoch nicht das von IPEC-J2. In umgekehrter Weise blieb der TER von IPEC-1 während zwei Wochen ALI-Kultivierung unverändert, sank aber der TER von IPEC-J2 um 50% ab, womit jedoch immer noch Werte im $\text{k}\Omega\cdot\text{cm}^2$ -Bereich erreicht wurden. Die Tatsache, dass sich Morphometrie und TER entgegengesetzt zu der in dieser Arbeit postulierten Hypothese (siehe 5.1.1) verhalten, deutet darauf hin, dass sich die TJ-Struktur und/oder die Anzahl an Membrankanälen unter ALI-Bedingungen dramatisch verändert haben muss. Bisher bleiben die Mechanismen der ALI-bedingten Morphologieänderung jedoch unklar. Eigene Versuche, IPEC-J2 zwar *submerged*, jedoch in einer Atmosphäre mit 95% Sauerstoff zu kultivieren, ergaben keinen Einfluss auf den anfänglichen TER (Daten nicht gezeigt), jedoch nach Erreichen eines TER-Maximums einiger $\text{k}\Omega\cdot\text{cm}^2$ ein Absinken in Richtung Null. Es ist zu vermuten, dass die unphysiologisch hohe Sauerstoffkonzentration von 95% die Zellen zugrunde gehen lässt.

Andererseits ist es durchaus denkbar, dass ALI- und PS-induzierte Zellmorphologieänderungen zwei Seiten derselben Medaille repräsentieren. ALI-bedingte Umgestaltungen könnten durch eine Anreicherung von apikal sezernierten zelleigenen Substanzen im dünnen Flüssigkeitsfilm auf den Zellen hervorgerufen worden sein. Folglich könnte angenommen werden, dass IPEC-1 in der Lage sind, Substanzen zu synthetisieren, die die Zellmorphologie beeinflussen, wohingegen IPEC-J2 dazu nicht befähigt sind oder in geringerem Maße. Demnach könnten IPEC-1 nur dann effektiv Botenstoffe akkumulieren, wenn das apikale Medium wie im Fall der ALI-Kultivierung begrenzt ist.

Im Schweineserum, dessen Proteom noch nicht zur Gänze analysiert ist (ZHANG *ET AL.*, 2012), sind vermutlich alle benötigten, mit Differenzierung und Reifung assoziierten Signalstoffe vorhanden, sodass sich sowohl Morphologie als auch Funktionalität der IPEC-J2 durch simples Ersetzen des fötalen Rinderserums durch Schweineserum ändert.

Darüber hinaus hat der Versuchsaufbau schweineserumkultivierter Zellen einen entscheidenden Vorteil. Werden Zelllayer von beiden Seiten mit Medium kultiviert, ist es möglich, Substanzen sowohl von der apikalen als auch der basolateralen Seite zu applizieren und ihre

Effekte zu analysieren. Hingegen ist das Untersuchen der Auswirkung apikal zugegebener Substanzen unter ALI-Bedingungen in zweierlei Hinsicht heikel. Entweder werden die Substanzen in einem verschwindend geringen Volumen appliziert oder der ALI-Modus muss für die Zeit der Inkubation unterbrochen werden. Letzteres könnte einen kritischen Schritt darstellen, da in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass sich TER und Morphologie nach einem Serumwechsel (PS \leftrightarrow FBS) binnen 24 Stunden auf die jeweils andere Bedingung einstellen.

Obwohl fötales Rinderserum im Jahr 1989 hinsichtlich epithelialer Zelleigenschaften seinen Zweck erfüllte (BERSCHNEIDER, 1989), erscheint es gegenwärtig als Mediumadditiv für die schon weit passagierten IPEC-J2 ungeeignet. Schweineserum dagegen scheint essentielle Komponenten zu enthalten, um die vollständige Differenzierung/Reifung von IPEC-J2 zu ermöglichen.

5.1.3 Funktionelles Proteinprofil

Obwohl Maus und Ratte als Nagetiere zur selben taxonomischen Ordnung gehören, deuten sich Unterschiede in ihrem jejunalen TJ-Profil an. Beispielsweise wurde anhand von Western Blot-Analysen des Rattenjejunums ein Vorhandensein von ZO-1 (BEUTHEU *ET AL.*, 2013) und Claudin-1 (MARKOV *ET AL.*, 2010), jedoch ein Fehlen von Claudin-4 und -8 beschrieben (MARKOV *ET AL.*, 2010), während die murine Genexpression von Claudin-4 mit ZO-1 vergleichbar ist (HOLMES *ET AL.*, 2006), aber Claudin-8 und -1 nur einen Bruchteil der Expression von ZO-1 ausmachen (HOLMES *ET AL.*, 2006). Es bliebe hier natürlich zu klären, ob Western Blot-Signale aus Unspezifität für das porcine Protein oder aus Kreuzreaktivität mit einem anderen porcinen Protein resultierten.

Die in dieser Arbeit anhand von Maus- und Rattenstudien zusammengestellten und an porciner Jejunummukosa getesteten TJ-Proteine (Claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7, -8, -12, -15, Occludin, Tricellulin-a) konnten ausnahmslos nachgewiesen werden. Somit ist das jejunale TJ-Proteinprofil der Maus, der Ratte und des Schweins letztlich jeweils individuell zusammengesetzt und die Bedeutung speziesspezifischer Zellmodelle wird augenscheinlich.

Die Analyse von TJ-Proteinen *in vitro* offenbarte eine phänotypische Änderung des Tricellulin-a in IPEC-J2/PS. Neben der ausgeprägten überwiegend trizellulären Lokalisation in IPEC-J2/FBS, kam in IPEC-J2/PS eine vermehrt bizelluläre Expression hinzu, welche sich in einer tendenziell erhöhten Proteinquantität äußerte. Dieses Phänomen konnten KRUG *ET AL.* (2009a) bereits in einer Überexpressionsstudie demonstrieren, in der es bei moderater Expression von Tricellulin-a bei einer trizellulären Lokalisation blieb und es bei übermäßiger

Expression zu einer zusätzlich bizellulären Anordnung kam. Darüber hinaus stellten sie eine Abhängigkeit der Tricellulin-a-Lokalisation mit Permeabilitätseigenschaften des renalen Modellepithels fest. So wirkte sich die bizelluläre Präsenz von Tricellulin-a für das parazelluläre Markermolekül Fluoreszein abdichtend auf die Barrierefunktion aus. Eine Verringerung der Fluoreszeinpermeabilität in IPEC-J2/PS im Vergleich zu IPEC-J2/FBS konnte hingegen nicht beobachtet werden – stattdessen nahm die Permeabilität der IPEC-J2/PS zu. Hier hängt die Begründung vermutlich mit den Zelldimensionen zusammen. Aufgrund dessen, dass IPEC-J2/PS kleiner sind als IPEC-J2/FBS, steht mehr TJ-Länge pro Filterfläche zur Verfügung, wodurch R^{para} (auch im Falle identischen TJ-Proteinprofils), wie bereits erläutert, als Konsequenz reduziert war, was im Umkehrschluss nachweislich eine erhöhte Permeabilität für TJ-gängige Ionen und/oder Moleküle impliziert. Da davon auszugehen ist, dass der zellgrößeninduzierte parazelluläre Permeabilitätseffekt (+ 2.000%) den einer veränderten Tricellulin-a-Expression (vgl. - 60% (KRUG ET AL., 2009a)) von IPEC-J2 übertreffen würde, sind Aussagen bezüglich bizellulärer Funktionalität von Tricellulin-a in IPEC-J2/PS nicht möglich.

Eine ähnliche funktionelle Aussagekraft gilt für die in IPEC-J2/PS erhöhten Expressionen von Claudin-4 und -5. Während die Claudin-5-Überexpression in Caco-2-Monolayern, einem lecken intestinalen Modellepithel, zur Erhöhung des TER sowie zu einer Reduktion der Permeabilität für das kleine, ungeladene Molekül Mannitol (182 Da, Stokesradius 3,6 Å) führt (AMASHEH ET AL., 2005), ist die Funktion von Claudin-4 stark vom molekularen Kontext abhängig. In dem renalen Zellsystem MDCK II, welches die Eigenschaft selektiver Natriumpermeabilität mit dem porzinen Jejunum teilt, konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Claudin-4 zu einer Minderung der Natriumpermeabilität führt, während die Permeabilitäten für Chlorid sowie für Mannitol unbeeinflusst bleiben (VAN ITALLIE ET AL., 2001). Beide Claudine könnten somit auf unterschiedliche Weise zum TER-Effekt von IPEC-J2/PS beigetragen haben. Analog zum oben erwähnten zellgrößeninduzierten parazellulären Permeabilitätseffekt kommt hier sowohl die zellgrößeninduzierte R^{para} -Reduktion als auch die membranflächeninduzierte R^{trans} -Reduktion zum Tragen. Potentiell barrierestärkende Effekte durch Claudin-4 und/oder-5 wurden vermutlich aufgrund ihrer geringeren Effektstärke durch die extremen zellmorphologischen Auswirkungen maskiert. Selektive Änderungen der Ionenpermeabilität sollten sich allerdings in Hinsicht auf Claudin-4 in einem niedrigeren Permeabilitätsverhältnis von Natrium zu Chlorid widerspiegeln. Das Verhältnis der Ionenpermeabilitäten von IPEC-J2/FBS und IPEC-J2/PS war jedoch statistisch nicht verschieden, was möglicherweise mit einer gleichzeitig herabgesetzten Chloridpermeabilität zu erklären ist oder damit, dass beteiligte Mechanismen gewebe- bzw. speziesspezifisch sind.

Die TJ-vermittelte epitheliale Ionenpermeabilität nimmt grundsätzlich durch die parazellulären Kationenkanäle Claudin-2 und -15 stark zu (AMASHEH *ET AL.*, 2002; TAMURA *ET AL.*, 2011). Darauf Bezug nehmend zeigten WADA *ET AL.* (2013) in murinen Doppel-*Knockout*-Studien, dass ein Fehlen der Claudine 2 und 15 zu einer Verringerung des Permeabilitätsverhältnisses von Natrium zu Chlorid führt. Beide Claudine waren in porzin-jejunalem Epithel nachweisbar, jedoch unabhängig von der Kulturbedingung nicht in IPEC-J2 vorhanden. Dieses Fehlen begründet aller Wahrscheinlichkeit nach die geringere Kationenselektivität von IPEC-J2 im Vergleich zu porzinem Jejunum. Des Weiteren stellten WADA *ET AL.* (2013) einen Zusammenhang zwischen Claudin-15 und der Na⁺-abhängigen und SGLT1-vermittelten Glukoseabsorption her. Dabei kommt Claudin-15 eine Schlüsselrolle zu, da bei *Knockout* das Na⁺-Recycling über die apikale Membran zum Erliegen kommt, wodurch wiederum die SGLT1-vermittelte Glukoseabsorption limitiert wird. Ein Ferkelfütterungsversuch mit phlorizinhaltigem Apfelextrakt ergab zudem eine Hochregulation der Claudin-15-Expression im Jejunum apfelextraktgefütterter Ferkel, verglichen mit der Kontrollgruppe (ZAKRZEWSKI *ET AL.*, 2013b). Daraus wurde hergeleitet, dass die Hochregulation von Claudin-15, und damit einhergehend das Na⁺-Recycling, eine erhöhte Triebkraft für die Glukoseabsorption darstellt, um die phlorizinspezifische Hemmung des SGLT1 zu kompensieren. Diese Daten geben Grund zur Aufstellung der Hypothese, dass Claudin-15 und der SGLT1 über ein (in)direktes *Signalling* in Verbindung stehen. In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression des SGLT1 in der apikalen Membran von IPEC-J2/PS zwar nachgewiesen, seine Transportaktivität in der Membran jedoch nicht bestätigt werden. Die Funktion des Transporters könnte deshalb durch das Fehlen von Claudin-15 beeinträchtigt sein.

5.1.4 Differenzierung und Reifung

Proliferative Vorläufer der Jejunozyten gehen aus pluripotenten Stammzellen des tiefen Kryptenepithels hervor. Während ihrer Wanderung entlang der Achse zwischen Krypte und Zotte beginnen sie, sich funktionell sowie strukturell zu differenzieren. Mit Erreichen des Zottenepithels ist die Differenzierung der Jejunozyten vollendet und ihre Reifung beginnt. Die Begriffe „Differenzierung“ und „Reifung“ werden allerdings oft synonym verwendet. Dabei beschreibt „Differenzierung“ qualitative Änderungen, wohingegen „Reifung“ den Prozess quantitativer Veränderung des Zellphänotyps wiedergibt (POTTEN AND LOEFFLER, 1990). Für die Beurteilung des Differenzierungszustands kultivierter Epithelzellen kann eine Vielzahl verschiedener Marker herangezogen werden, welche für den jeweiligen Zelltyp spezifische Proteine umfassen, die den Zellphänotyp fortschreitend vervollständigen.

Eigenschaften polarisierter, barrierebildender und transportaktiver Epithelzellen des Jejunums wurden durch die Proteinexpression folgender exemplarisch ausgewählter Markerkandidaten geprüft: Ezrin, SGLT1, GLUT2, Na/K-ATPase, verschiedene TJ-Proteine, Vimentin sowie der Transkriptionsfaktor Snail.

Es war offensichtlich, dass alle getesteten Markerproteine, mit Ausnahme von Claudin-2, -12 und -15, sowohl in IPEC-J2/FBS als auch IPEC-J2/PS qualitativ nachzuweisen waren. Dieses Ergebnis deutete folglich darauf hin, dass Zellen beider Bedingungen den gleichen Differenzierungsstatus innehaben. Es waren jedoch Unterschiede bezüglich der Markerquantität zu beobachten. Eine erhöhte Expression der apikolateralen TJ-Proteine Claudin-4 und -5, des apikalen Mikrovilliproteins Ezrin, des apikalen Transporters SGLT1 sowie des basolateralen Transporters GLUT2 in IPEC-J2/PS implizieren ein im Vergleich zu IPEC-J2/FBS vorangeschrittenes Reifungsstadium.

Obwohl IPEC-J2, wie bereits erläutert, als differenziert eingestuft werden konnten, war es umso erstaunlicher, dass der mesenchymale Marker Vimentin unter beiden Kulturbedingungen exprimiert wurde und zudem in IPEC-J2/PS den Gehalt aus IPEC-J2/FBS überstieg. Dieses Phänomen der epithelialen Vimentinexpression ist auch in ausdifferenzierten Jejunozysten einer bovinen Primärkultur beschrieben, wo es auf eine Unterdrückung der posttranskriptionellen Inhibition der Vimentinsynthese zurückgeführt wurde (RUSU *ET AL.*, 2005). Das massive Auftreten von Vimentin in IPEC-J2/PS könnte dagegen auch auf den Beginn einer epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) hindeuten, die von zahlreichen, den Transkriptionsfaktor Snail induzierenden Signalwegen ausgelöst wird (BARRALLO-GIMENO AND NIETO, 2005; KOKKINOS *ET AL.*, 2007). Ereignisse dieser Art gehen mit der transkriptionellen Repression von E-cadherin und TJ-Proteinen einher (BARRALLO-GIMENO AND NIETO, 2005), wobei im Gegenzug die Vimentinexpression hochreguliert wird (KOKKINOS *ET AL.*, 2007). Da jedoch weder Snail hoch-, noch junctionale Proteine herunterreguliert wurden, ist eine Dedifferenzierung von IPEC-J2/PS mit ziemlicher Sicherheit auszuschließen. Darüber hinaus wird Vimentin auch von vielen etablierten Epithelzellmodellen wie beispielsweise MDCK-C7 (engl. *Madin-Darby canine kidney cells*) (STUMPF *ET AL.*, 2011), MDBK (engl. *Madin-Darby bovine kidney cells*) (BEN-ZE'EV, 1984) und sogar von Epithelzellen *in vivo* (MORK *ET AL.*, 1990) synthetisiert.

Ebenso wie die entsprechenden Proteinqualitäten und -quantitäten beider Kulturbedingungen reflektiert der zeitliche TER-Verlauf die Stadien der Differenzierung bzw. Reifung. Der TER von sowohl IPEC-J2/FBS als auch IPEC-J2/PS erreichte etwa eine Woche nach Aussaat sein Maximum, was vermutlich auf einem vollendeten Differenzierungsprozess beruht. IPEC-J2/FBS hielten den TER im Anschluss daran auf einem mehr oder minder

konstant hohen Niveau. Dagegen fiel der TER von IPEC-J2/PS nach ungefähr einer Woche wieder ab, bis er sich auf einem niedrigeren Plateau einstellte, was vermutlich in einem Reifungsprozess mit angepasster Proteinkomposition begründet ist und den Unterschied zu IPEC-J2/FBS manifestiert.

In Anbetracht der Datenlage ist der Verlust an endogener Reifungskompetenz von IPEC-J2 vermutlich ein Nachteil, der auf die Tatsache der nicht transformierten aber dennoch kontinuierlichen Zelllinie zurückzuführen ist. Um derartige *loss of function*-Ereignisse zu kompensieren, stellt die serumspeziesspezifische Kultivierung womöglich die effektivste Herangehensweise dar. Durch welche Schweineserumkomponenten das Modell IPEC-J2 beeinflusst wird, ob diese einzig im Schweineserum vorkommen und folglich in Seren aus beispielsweise Rind oder Ziege jeglichen Alters nicht existieren, oder ob die Komponenten schweinspezifisch sind und demnach im Falle des entsprechenden Rinder-/Ziegenanalogons in einem *loss of function*-Ereignis resultieren, bleibt gegenwärtig noch ungeklärt, wird jedoch Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bezüglich elektrophysiologischer und morphologischer Aspekte von IPEC-J2 machen eindrucksvoll klar, dass diese Zelllinie offensichtlich erst unter Verwendung von speziesspezifischem Serum Eigenschaften porziner Jejunozysten entwickelt – frei nach Ludwig Feuerbach (dt. Philosoph, 1804-1872): Du bist, was du isst!

Mit IPEC-J2/PS wurde ein einzigartiges *in vitro*-Werkzeug etabliert, das morphologische Aspekte und Barriereparameter mit großer Nähe zum Schweinejejunum aufweist und deshalb bestens für *in vitro*-Untersuchungen der porzinen Verdauungsphysiologie geeignet scheint (ZAKRZEWSKI ET AL., 2013a). Ein solches System wird dringend benötigt, um unphysiologisch funktionierende Dünndarmepithelmodelle des Schweins sowie Nager- und Tumorzelllinien in diesem porzinen Forschungsfeld zu ersetzen. Zudem wurden unter dem Aspekt der 3Rs gleich zwei entscheidende Beiträge geleistet. Zum einen wurden IPEC-J2/PS als Modell für das porzine Jejunumepithel validiert (*Replacement*), zum anderen konnte durch Mediumsupplementierung mit Schweineserum der Bedarf an FBS und somit an Rinderfeten reduziert werden (*Reduction*), das Serum adulter Schweine nämlich wird 3Rs-konform als ein Nebenprodukt des Schlachtprozesses gewonnen.

5.2 Einfluss von Zink auf die jejunale Barriere

Die prophylaktische Verabreichung einer mit Zink supplementierten Diät sollte dreierlei leisten können. Sie sollte...

- I. bei Ferkeln, so unterschiedlich diese auch sind, vergleichbare Wirkung zeigen,
- II. bei Ferkeln mit unauffälliger Klinik diesen Status unterstützen oder gar verbessern,
- III. das Pathogeneseausmaß infizierter Ferkel minimieren oder sogar verhindern.

5.2.1 Einschätzung der Eignung von Zink als Prophylaxe *in vivo*

Für die Bewertung einer vierwöchigen Zinkprophylaxe für Absetzferkel sollten so viele Aspekte wie möglich mit in Betracht gezogen werden, damit aus Einzeldaten keine falschen Schlüsse gezogen werden. Das ist die große Stärke des SFB 852: Jedes Versuchsferkel wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen beprobt, wodurch die Ergebnisse der einzelnen Fachrichtungen in einzigartiger Weise direkt aufeinander bezogen und interpretiert werden können. Fast alle Ferkel dieser Studie blieben über den gesamten Versuchszeitraum gesund, es traten lediglich vereinzelt und gruppenunspezifisch Diarrhöen auf (MARTIN *ET AL.*, 2013b). Anfängliche positive Auswirkungen der pharmakologischen Zinkdosis Zn^H auf zotechnische Parameter waren vier Wochen nach Ablaktation nicht mehr verschieden zu denen der Kontrollgruppe Zn^K (MARTIN *ET AL.*, 2013b). Die intestinale Zinkhomöostase der Zn^H -Ferkel schien einerseits durch die epitheliale Herabregulation von Zip4 und die Heraufregulation von ZnT1 und Metallothionein (MARTIN *ET AL.*, 2013a) geregelt, andererseits kam es sowohl fütterungs- als auch altersbedingt systemisch zu einer Anreicherung von Zink in verschiedenen Organen, darunter Leber und Pankreas (MARTIN *ET AL.*, 2013b). Diese Zinkakkumulation wird mit der Heraufregulation von Stressproteinen hepatischer (BONDZIO *ET AL.*, 2013b) und pankreatischer (BONDZIO *ET AL.*, 2013c) Herkunft assoziiert, möglichen Vorboten von zellulärer Toxizität (GUPTA *ET AL.*, 2010).

Während in der vorliegenden Arbeit elektrophysiologisch erfasste, barriererelevante Parameter des Jejunums (TER , P_{Na}/P_{Cl} , P_{FLU} , P_{FD4} , ΔI_{SC}^{FSK}) sowohl eine Woche als auch vier Wochen nach Absetzen hinsichtlich diätbedingter Unterschiede statistisch nicht verschieden waren, waren Alterseffekte zu beobachten. Diese gingen erwartungsgemäß mit einer Stärkung der epithelialen Barriere einher, die sich in einer reduzierten Natriumselektivität, einer tendenziell verminderten Fluoreszeinpermeabilität sowie in einer verringerten stimulierbaren Chloridsekretion äußerte. Zusammen mit dem Anstieg der Sukrase- und Maltaseaktivität (Laktaseaktivität unverändert) (MARTIN *ET AL.*, 2013b) wurde damit die

natürliche intestinale Entwicklung und Adaptation an eine milchfreie, auf Getreide und Soja basierende Diät beschrieben (CARLSON *ET AL.*, 2004; KIDDER AND MANNERS, 1980).

Aus Western Blot-Analysen ergab sich bezüglich des jejunalen TJ-Proteinprofils älterer Ferkel ein inhomogenes Bild. Unabhängig von der Fütterungsgruppe waren vornehmlich Claudin-2- und/oder Claudin-15-Signale einiger Ferkel offensichtlich reduziert oder sogar abwesend, was möglicherweise den altersbedingten insgesamten Rückgang der Kationenpermeabilität widerspiegelt. Des Weiteren waren in Zn^M-Ferkeln, im Vergleich zu Zn^K-Ferkeln, Claudin-1 und Tricellulin-a heraufreguliert, was prinzipiell mit einer Limitierung des parazellulären Durchtritts einhergeht. Claudin-1 limitiert dabei bekanntermaßen den parazellulären Weg für Moleküle einer maximalen Größe von ~600 Da (Stokesradius ~5 Å) (FURUSE *ET AL.*, 2002), wobei Tricellulin-a den Zentralkanal der trizellulären TJ gegen Moleküle ab einer Größe von 900 Da (Stokesradius ~6 Å) abdichtet (KRUG *ET AL.*, 2009a). Diese für das Ferkel grundsätzlich positiven TJ-Effekte konnten sich jedoch in Zn^H-Ferkeln nicht behaupten. Im Gegenteil – die Proteinexpression von Claudin-1 lag auf dem Zn^K-Niveau, die von Tricellulin-a sogar darunter. Möglicherweise sind das erste Anzeichen für eine zinkinduzierte epitheliale Imbalance, zumal die Permeabilität für FITC-Dextran 4000 (4 kDa, Stokesradius ~14 Å) in Zn^H-Ferkeln tendenziell zunahm.

Neben der Analyse auf epithelialer bzw. systemischer Ebene ist für ein umfassendes Bild die Einbeziehung der gastrointestinalen Mikrobiota von großer Bedeutung, da sie mit Zink in Kontakt steht, noch bevor es über das Epithel absorbiert wird. Während die pharmakologische Zinkdosis zu Fütterungsbeginn mit vermindertem mikrobiellen Wachstum und reduzierten Zellzahlen im Gastrointestinaltrakt noch einen potentiellen Vorteil darstellte, schwanden die Effekte mit zunehmendem Alter, indem sich einzig potentiell pathogene Enterobacteriaceae an die Zn^H-Dosis anpassten (STARKE *ET AL.*, 2013a; STARKE *ET AL.*, 2013b). Darüber hinaus entdeckten BEDNORZ *ET AL.* (2013) auffällige Antibiotikaresistenzen von *E. coli* im Darm von Zn^H-Ferkeln. Davon wiesen 18,6% der getesteten *E. coli* eine Resistenz gegen mindestens drei Antibiotikaklassen auf, wohingegen in *E. coli* aus Zn^K-Ferkeln keinerlei Multiresistenzen auftraten.

In der Literatur wird die etablierte Wirkung einer prophylaktischen pharmakologischen Zinkgabe (>2000 mg Zink pro kg Futter vs. <150 mg Zink pro kg Futter) auf die gastrointestinale Problematik beim Ferkel meist nur bis zu zwei Wochen nach Ablaktation der drei bis vier Wochen alten Tiere beschrieben. Dabei stimmen die beschriebenen Effekte hinsichtlich zootechnischer Parameter (CARLSON *ET AL.*, 1999; FENG *ET AL.*, 2006; HU *ET AL.*, 2013a; HU *ET AL.*, 2012; HU *ET AL.*, 2013b; SCHELL AND KORNEGAY, 1996), Zinkkonzentrationen in Blut und Gewebe (CARLSON *ET AL.*, 2008; DAVIN *ET AL.*, 2013; FENG *ET AL.*, 2006),

gastrointestinaler Mikrobiota (HOJBERG *ET AL.*, 2005; LI *ET AL.*, 2001), mukosaler Morphologie (HEDEMANN *ET AL.*, 2006; HU *ET AL.*, 2013b; LI *ET AL.*, 2001), Aktivitäten von Verdauungsenzymen (HEDEMANN *ET AL.*, 2006; HU *ET AL.*, 2012) und intestinaler Barriereparameter (CARLSON *ET AL.*, 2004; CARLSON *ET AL.*, 2008; FENG *ET AL.*, 2006; HU *ET AL.*, 2013a) mit denen des kollaborativen Zinkfütterungsversuchs entweder überein oder zeigen eine entsprechend andere, entweder neutrale, negative (Zottenlänge, Körpergewicht) oder positive, Wirkung – negative Auswirkungen auf den Gesundheitsstatus werden dabei nicht beschrieben. Eine Begründung für diesen weiten Effektbereich ist möglicherweise mit einem Zusammenhang zwischen den Studien individuellen Zinkstatus der Ferkel gegeben. Je ausgeprägter der ablatkationsbedingte Zinkmangel (DAVIN *ET AL.*, 2013) zu Versuchsbeginn ist, desto größer sind die Effekte, die durch Zinksupplementierung erreicht werden können. Die Höhe des Zinkeffekts könnte somit als ein Maß des Zinkmangels interpretiert werden.

Generell wird die konzentrationsabhängige Wirkung von Zink auch vom pH-Wert des Mageninhalts bestimmt. Je geringer dieser ist, desto mehr ZnO dissoziiert zu Zn^{2+} -Ionen (ENDERSON *ET AL.*, 1995) und desto mehr absorbierbares Zink wird mit den Ingesta im Jejunum ankommen. Aus einer hohen pH-Wert-Bandbreite des Mageninhalts von Ferkeln (pH 1,5 bis 5,8, siehe 4.2.1.1) ergeben sich konsequenterweise jejunale Konzentrationen freien Zinks mit ebenso hoher Varianz ($\pm 30\%$, siehe 4.2.2.1), sodass am Ort der Aufnahme bereits verschiedene Ausgangsbedingungen innerhalb von Fütterungsgruppen geschaffen sind. Es ist nicht auszuschließen, dass sich auf diese Weise das Wirkungsspektrum entsprechender Zinkdosen verbreitert hat und potentielle Effekte maskiert wurden.

Mit der Begründung, dass die Verwendung pharmakologischer Zinkprophylaxen gegenüber einwöchiger Anwendung nach vier Wochen mit einer exzessiven Zinkanreicherung in den Organen, einer Selektion von Enterobacteriaceae und der Entwicklung von *E. coli*-Multi-resistenzen an förderlicher Wirkung einbüßt und beginnt, sich nachteilig auf den Gastrointestinaltrakt auszuwirken, kann aus physiologischer Sicht eine Empfehlung für die prophylaktische Verabreichung nur für die erste Woche nach Absetzen ausgesprochen werden.

5.2.2 Para- und transzelluläre Wirkung von Zink auf das intakte jejunale Epithel

Mit zunehmender apikaler Zinkkonzentration stieg der TER von IPEC-J2/PS-Monolayern kontinuierlich an. Dabei wurde mit 500 μM ZnAc ein TER-Maximum erreicht, wonach bei höheren Konzentrationen der TER bis unter das Ausgangsniveau absank. Es ist bekannt, dass die intestinale Aufnahme moderater Zinkkonzentrationen sättigbar ist, die Zinkaufnahme hoher Konzentrationen dagegen nicht (MENARD AND COUSINS, 1983). Dieser Sachverhalt gibt Grund zu der Vermutung, dass hohe Zinkdosen parazellulär über das Epithel diffundieren.

Daneben ist erwiesen, dass eine basolaterale intestinale Zinkabsorption sekundär aktiv ohne Sättigungskinetik erfolgen kann (RAFFANIELLO *ET AL.*, 1992) und eine übermäßig hohe intrazelluläre Zinkkonzentration toxisch wirkt (CARIO *ET AL.*, 2000). Wahrscheinlich basiert die toxische Wirkung apikal hoher Zinkkonzentrationen deshalb auf einer von basolateral vermittelten intrazellulären Zinkanreicherung. Diese Theorie wird von den Tatsachen unterstützt, dass die basolaterale Gabe von 500 μM ZnAc zu IPEC-J2/PS toxisch wirkte, Caco-2-Zellen gleichermaßen auf basolaterales Zink reagierten (ZEMANN *ET AL.*, 2011) und präkonfluente IPEC-J2 und Caco-2-Zellen gegenüber apikalen Zinkdosen sensitiver waren als konfluente Layer (LODEMANN *ET AL.*, 2013; ZEMANN *ET AL.*, 2011). Dabei werden jedoch geringe basolaterale Zinkdosen von differenzierten Zellen toleriert (ZEMANN *ET AL.*, 2011). In der epithelialen Nierenzelllinie MDCK II führten dagegen auch hohe basolaterale Zinkkonzentrationen zu einem TER-Anstieg (CARR *ET AL.*, 2010), was auf eine unterschiedliche Regulation der Zinkabsorption in intestinalen und renalen Epithelien hindeutet.

Nach apikaler ZnAc-Inkubation von IPEC-J2/PS-Monolayern konnte ein TER-Anstieg und eine Abnahme der Fluoreszeinpermeabilität beobachtet werden. Ein solcher TER-Effekt wird von einigen Studien nicht berichtet (LODEMANN *ET AL.*, 2013; ZEMANN *ET AL.*, 2011), was aller Wahrscheinlichkeit nach sowohl an unterschiedlichen effektiven Zinkdosen von Zelllinien unterschiedlicher Subtypen als auch an der apikal applizierten Zinkdosis lag (ROSELLI *ET AL.*, 2003). Verschiedene *in vitro*-Studien zeigen dennoch, dass der TER als Antwort auf eine apikale Zinkgabe ansteigt (CARR *ET AL.*, 2010; ROSELLI *ET AL.*, 2003; WANG *ET AL.*, 2013a; WANG *ET AL.*, 2013b) und die Natriumselektivität in renalen Modellen gleichzeitig vermindert ist (CARR *ET AL.*, 2010; WANG *ET AL.*, 2013a). Mehrwertige Kationen wie La^{3+} (Stokesradius 3,96 Å), Ca^{2+} (Stokesradius 3,10 Å) und Mg^{2+} (Stokesradius 3,47 Å) können bewiesenermaßen kompetitiv an einen im Innern der Claudin-2-Pore liegenden Aspartatrest binden und auf diese Weise die Claudin-2-vermittelte Natriumpermeabilität herabsetzen (YU *ET AL.*, 2010). Aufgrund seiner Ladung und Größe ist es theoretisch möglich, dass auch Zn^{2+} (Stokesradius 3,49 Å) in hoher Dosis zu einem Kationenkanalblock führen kann. Es besteht somit Grund zu der Annahme, dass Zink den TER gewebespezifisch erhöht, da die Natriumpermeabilität intestinaler Caco-2-Zellen nach Zinkbehandlung unverändert ist (WANG *ET AL.*, 2013b) und IPEC-J2/PS kein Claudin-2 exprimierten. Deshalb liegen weitere Gründe nahe, wie z. B. die Regulation von TJ-Proteinen oder der Block parazellulärer TJ-Poren. Von diesen Möglichkeiten ist die Porenvariante wahrscheinlicher, da der TER-Effekt nach Zinkapplikation auf IPEC-J2/PS-Layern bereits nach einer Stunde fast vollständig ausgebildet war – früher als Effekte durch potentielle Neusynthese von TJ-Proteinen zu erwarten gewesen wären. Im Einklang mit dem TER-Effekt und der Theorie des parazellulären Blocks

ist die Permeabilität für kleine Moleküle von IPEC-J2/PS und auch der porzin-renalen Zelllinie LLC-PK₁ (engl. *cells from porcine kidney cortex*) (WANG ET AL., 2013a) erniedrigt.

Präparationsbedingt wurde apikales Zink von jejunalen Mukosae des Zinkfütterungsversuches ausgewaschen und in die Badlösung der Ussing-Kammer nicht wieder zugegeben. Gewebe von Zn^K-, Zn^M- und Zn^H-Ferkeln wiesen daraufhin untereinander keine Unterschiede hinsichtlich TER und Natriumselektivität auf, was mit anderen Versuchen übereinstimmt (CARLSON ET AL., 2008; FENG ET AL., 2006). Ein Fütterungsversuch, in dem Zink akut in die apikale Badlösung der Ussing-Kammer gegeben wurde, beschreibt ebenfalls einen unveränderten TER (CARLSON ET AL., 2008), der möglicherweise auf eine mit 23 µM Zink zu geringe und deshalb effektlose Zinkdosis zurückzuführen ist (vgl. ~200 µM Zn²⁺ in jejunalen Ingesta (siehe 4.2.2.1, Tab. 4.2) und 500 µM ZnAc auf IPEC-J2/PS). Für die jejunalen Permeabilitäten für Fluoreszein und FITC-Dextran 4000 (FD4) des Zinkfütterungsversuchs ergaben sich ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen, was zusammen mit obigen Parametern gegen eine in Erscheinung tretende TJ-Modulation durch Zink spricht. HU ET AL. (2013a) berichten bei einem vergleichbaren Versuchsaufbau allerdings von reduzierten jejunalen FD4-Fluxen, wobei jedoch gleichzeitig die Zotten verlängert waren und sich als Folge vermutlich die Epithelfläche, im Vergleich zur Kontrolle, vergrößerte. Wäre die Oberflächenvergrößerung in die Berechnung des flächenabhängigen Fluxes mit einbezogen worden, hätte sich der Effekt voraussichtlich relativiert.

Zink wird seit Jahrzehnten als therapeutische antidiarrhöische Maßnahme eingesetzt. Wie Zink dabei wirkt, ist noch nicht genau verstanden, jedoch Gegenstand verschiedener *in/ex vivo*- und *in vitro*-Studien. Ein Wirkmechanismus von Zink wird in der Blockierung basolateraler cAMP-aktivierter K⁺-Kanäle gesehen (BZIK ET AL., 2012; HOQUE ET AL., 2005; MEDANI ET AL., 2012), wodurch der apikalen Chloridsekretion die Triebkraft genommen wird. In der vorliegenden Arbeit konnten nach forskolininduzierter Stimulierung jejunaler Mukosae der Gruppen Zn^K, Zn^M und Zn^H keine Änderungen der Chloridsekretion aufgezeichnet werden. Aller Wahrscheinlichkeit nach lag es daran, dass epithelassoziertes Zink während der Mukosapräparation ausgewaschen und in die Badlösung der Ussing-Kammer nicht wieder zugegeben wurde. Unter einer entsprechenden Versuchsanordnung beobachteten FENG ET AL. (2006) ebenfalls keinerlei Effekte auf die cAMP-vermittelte Chloridsekretion, wohingegen CARLSON ET AL. (2004) eine reduzierte sekretorische Antwort dokumentierten. Es ist nicht auszuschließen, dass dies durch eine verminderte Kryptentiefe (LI ET AL., 2001) und somit verminderte sekretorische Kapazität des Epithels zustande kam. Der zwischen den Fütterungsgruppen nicht unterschiedliche Anstieg des Kurzschlussstroms macht deutlich, dass diätetisches Zink auf molekularer Ebene keine effektiven Änderungen an

beteiligten Komponenten der Chloridsekretionskaskade induziert hat. In mit ZnAc von apikal behandelten IPEC-J2/PS-Monolayern resultierte aus der Forskolingabe ebenfalls kein Effekt. Höchstwahrscheinlich war die apikale Dosis von 500 μM ZnAc nicht ausreichend hoch, um eine effektive Dosis auf die andere Seite des Epithels zu transportieren. In *ex vivo*-Studien an humanen Colonbiopsien (MEDANI *ET AL.*, 2012) oder Rattenmukosae (BZIK *ET AL.*, 2012; HOQUE *ET AL.*, 2005), in denen von einem basolateralen K^+ -Kanalblock und konsequenter Minderung der Chloridsekretion berichtet wird, wurde Zink entweder basolateral addiert oder apikal zusammen mit einem TJ-öffnenden Agens zugegeben. Auf diese Weise wurde gewährleistet, dass Zink basolateral in definierter Konzentration zur Verfügung stand.

Zink beeinflusst den parazellulären Weg gesunder Epithelien, ohne dass es auf TJ-Ebene effektiv regulatorisch wirkt. Vielmehr dichtet es den parazellulären Weg akut ab. Da epitheliale Zinkeffekte gesunder Ferkel *ex vivo* aufgrund des unweigerlichen Auswaschens des Zinks funktionell nicht unter „*in vivo*“-Bedingungen analysiert werden können, stellt IPEC-J2/PS ein umso wertvolleres Modell dar, den Einfluss von Zink auf die jejunale Barriere des Schweins detailliert zu untersuchen.

5.2.3 Wirkung von Zink auf das Jejunumepithel TGEV-infizierter Ferkel

Die Wirkung von Zink bei TGEV-infizierten Ferkeln wurde in kollaborativer Weise über 18 Tage *post infectionem* untersucht, wobei sich die vorliegende Arbeit auf die akuten Effekte einen Tag nach Infektion konzentriert. Altersentsprechend waren die klinischen Symptome der Zn^{K} -Ferkel mild. Es traten über den gesamten Infektionszeitraum keine Anorexie, Dehydratation und Unterschiede der Körpertemperatur zwischen den Gruppen auf (CHAI *ET AL.*, submitted). Dennoch ging die TGEV-Infektion in jejunaler Zn^{K} -Mukosa mit einer regelrechten Zottenatrophie einher, wobei eine Kryptenhyperplasie nicht zu beobachten war. Offensichtlich reichte der Zeitraum von 24 h nach initialer Infektion nicht aus, um eine Re-Epithelialisierung durch Enterozyten aus hyperplastischen Krypten anzuregen. GROOTJANS *ET AL.* (2011) beschreiben an einem human-jejunalen *in vivo*-Modell die Auswirkungen von Ischämie und Re-Perfusion auf das Zottenepithel und die Zottenarchitektur. Darin zeigen sie, dass sich die Basallamina epithelial beeinträchtigter Zotten zurückzieht und sich die Enterozyten ohne basalen Kontakt Actin- und pMLC (engl. *phosphorylated myosin light chain*)-abhängig zusammenlagern, was schließlich nach wenigen Stunden über einen *Purse-String*-Mechanismus zur Abstoßung des losen Epithels führt. Sehr wahrscheinlich kann auf diese Weise das Auftreten epithelgesäumter atrophischer Zotten von Zn^{K} -Ferkeln begründet werden, die vermutlich durch eine reduzierte lädierte Epithelfläche eine entscheidende Maßnahme zur Eindämmung der viralen Infektion darstellen. Jejunale Zn^{M} - und Zn^{H} -Mukosae

schienen im Vergleich zu Zn^K-Mukosae morphologisch nicht beeinträchtigt. Ein direkter Vergleich mit Gewebe (und anderen Parametern) von uninfizierten Tieren erwies sich jedoch als schwierig, da die Zinkfütterungsversuche mit bzw. ohne Challenge in Ställen verschiedener Institute stattfanden und somit generelle haltungsbedingte Effekte nicht ausgeschlossen werden konnten.

Es ist beschrieben, dass als Antwort auf eine TGEV-Infektion die intestinale Konzentration des Signalproteins IFN- α ansteigt (RIFFAULT *ET AL.*, 2001). Interferone stimulieren die Expression der 2'-5'-OAS (-Oligoadenylatsynthetase), die in aktiviertem Zustand wiederum die für einzelsträngige RNA hochpotente Ribonuklease L aktiviert und unter Beteiligung einer Vielzahl an Komponenten den programmierten Zelltod auslösen kann (PLAYER AND TORRENCE, 1998) – vermutlich durch indirektes Triggern des Apoptosevermittlers Caspase-3 (RUSCH *ET AL.*, 2000). Verglichen mit der Zn^H-Mukosa wurden in der Zn^K-Mukosa sowohl für IFN- α als auch für die 2'-5'-OAS signifikant erhöhte RNA-Level gemessen (CHAI *ET AL.*, submitted).

Der erhöhte Gehalt an 2'-5'-OAS begründet dabei wahrscheinlich die hohe Apoptoserate im stark deformierten Zottenepithel, die durch Visualisierung aktivierter Caspase-3 festgestellt werden konnte. Des Weiteren wurde damit die zottenspezifische Infektion durch das TGEV bestätigt. Im jejunalen Zn^H-Epithel war das Auftreten apoptotischer Zellen deutlich verringert. Zudem war bei dennoch vereinzelt auftretenden positiven Zellen die Morphologie nicht beeinträchtigt. WEI *ET AL.* (2012) konnten *in vitro* an einer porzinen Testiszelllinie zeigen, dass Zink die TGEV-Adhäsion an den Zielzellen zwar nicht verhindert, aber dennoch antivirale Wirkung zeigt. So konnte durch Zink sowohl die Virusinvasion vermindert werden als auch die intrazelluläre Virusreplikation durch zinkspezifische Hemmung der viralen RNA- und Proteinsynthese reduziert werden (WEI *ET AL.*, 2012). Letzteres ist vermutlich auf eine Inhibierung der RNA-Replikation durch direktes Wirken einer erhöhten Konzentration an Zink auf die virale RNA-Polymerase zurückzuführen (TE VELTHUIS *ET AL.*, 2010), denn die Hochregulation von Metallothionein (CHAI *ET AL.*, submitted) macht eine erhöhte intrazelluläre Zinkkonzentration wahrscheinlich. Die geringere TGEV-Belastung und epitheliale Intaktheit in Zn^H-, verglichen mit Zn^K-Mukosae, könnte schließlich auch auf IFN- α zurückzuführen sein, dessen antivirale Wirkung durch Zink potenziert werden kann (BERG *ET AL.*, 2001) bzw. könnte in einer zinkmedierten Hemmung der Caspase-3-Aktivierung begründet liegen (TRUONG-TRAN *ET AL.*, 2001).

Durch eine Korrektur der epithelialen Fläche sind nun flächenabhängige elektrophysiologisch erhobene Daten zwischen den Fütterungsgruppen direkt miteinander vergleichbar. Zn^K-Mukosae wiesen im Vergleich zu Zn^H-Mukosae einen signifikant erniedrigten epithelialen Widerstand auf, während verschiedene Zinkdosen keinen Effekt auf die Permeabilität für

Fluoreszein (332 Da, Stokesradius 4,5 Å) ausübten. Daraus lässt sich schließen, dass das Zn^K-Epithel trotz seiner starken Deformierung noch nicht massiv im Bereich der Zell-Zell-Kontakte in Mitleidenschaft gezogen wurde, um relativ kleine Moleküle vermehrt passieren zu lassen. Als Grund für den erniedrigten epithelialen Widerstand könnte das großflächige Auftreten von Apoptosen gesehen werden. Während die intestinale Integrität bei einzelnen Apoptosen durch Raumanpassung der Nachbarzellen weitestgehend aufrechterhalten werden kann (FLORIAN *ET AL.*, 2002), ist der Verlust bei gehäuft auftretenden Apoptosen vermutlich nicht mehr zu kompensieren. Da die Zotten 24 h *post infectionem* jedoch noch kontinuierlich vom Epithel gesäumt waren, war der programmierte Zelltod sehr wahrscheinlich noch nicht vollständig abgeschlossen, sodass die parazelluläre Barriere lediglich beeinflusst (R^{epi}), jedoch noch nicht verheerend beeinträchtigt war (P_{FLU}). Da Coronaviren des SARS bei Infektion nicht direkt die TJ auf Ebene der Tetraspanmembranproteine angreifen, sondern indirekt durch den Eingriff in die Zellpolarität (TEOH *ET AL.*, 2010), ist nicht auszuschließen, dass ein Polaritätsverlust durch das TGEV-Coronavirus ausgelöst werden konnte, der 24 h *post infectionem* zu einem beginnenden Verlust der TJ-Kontakte führte.

Malabsorption ist besonders in jungen Ferkeln eine häufige Begleiterscheinung der TGE-Pathologie, der die Vernichtung des absorptiven Zottenepithels vorangeht (MOON *ET AL.*, 1973). In jejunalen Zn^K-Mukosae war die Na⁺-abhängige Glukoseabsorption zwischen den einzelnen Ferkeln sehr weit gefächert, verglichen mit der insgesamt verhältnismäßig niedrigen Absorption der Zn^H-Ferkel. Stichprobenartige Analysen des SGLT1 auf Proteinebene ergaben in einem Zn^H-Ferkel eine schwache Expression (**Abb. 5.1**) für eine dem Zn^H-Gruppenmittel entsprechende Stromantwort (siehe 4.2.3.4, Abb. 4.28B) und normaler Mukosamorphologie (siehe 4.2.3.1, Abb. 4.25C). Für das Ferkel Zn^{K2} aus der Zn^K-Gruppe ergab sich eine mittlere SGLT1-Expression bei sehr hoher Stromantwort und ausgeprägter Zottenatrophie. Dagegen ergab sich für das Ferkel Zn^{K1} eine sehr hohe SGLT1-Expression bei niedrigerer Stromantwort und einer drastisch ausgeprägten Zottenatrophie. Anhand dieser Daten scheint es möglich, dass die SGLT1-Expression antiproportional zum epithelialen Flächenverhältnis reguliert wird, möglicherweise um bei Zottenatrophie mit einer erhöhten Glukoseabsorption, dem Wasser- und Elektrolytverlust entgegenzuwirken. Bei einer sehr schweren Zottenatrophie ist das Epithel vermutlich funktionell so sehr beeinträchtigt, dass die durch SGLT1-Expression theoretisch mögliche Glukoseabsorptionsleistung nicht mehr erbracht werden kann.

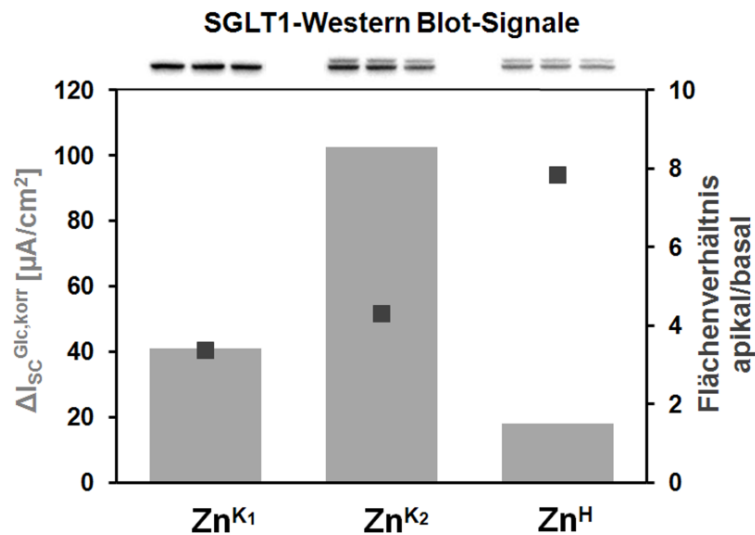


Abb. 5.1: Glukoseabsorptionsstrom, epitheliales Flächenverhältnis und SGLT1-Expression. Dargestellt sind ein niedriger (Zn^{K1}) und ein hoher (Zn^{K2}) Glukoseabsorptionsstrom von zwei Zn^K -Ferkeln sowie der mittlere Glukoseabsorptionsstrom eines Zn^H -Ferkels. Für jedes Ferkel sind dem Glukoseabsorptionsstrom (Balken) das epitheliale Flächenverhältnis (Quadrate) und die SGLT1-Expression (Triplikate) zugeordnet.

Im Vergleich zum nahezu unversehrten Zn^H -Epithel, konnte in Zn^M - und Zn^K -Mukosae mit Forskolin eine erhöhte Elektrolytsekretion stimuliert werden. Da Zink, wie unter 5.2.2 erläutert, aller Wahrscheinlichkeit nach präparationsbedingt von der Mukosa weggewaschen wurde, ist ein direkter Zinkeffekt auf das jejunale Epithel auch nach TGEV-Infektion nicht zu erwarten. Dadurch ist das Ausmaß der Sekretion zwischen den Gruppen vergleichbar. Durch die TGEV-Infektion hat sich vermutlich die Sensitivität der cAMP-abhängigen Chloridsekretion verstärkt oder sind Komponenten des *Signalling* heraufreguliert worden (LOHI ET AL., 2002) – ein Prozess der auch in entzündeter Colonmukosa beobachtet wird (LOHI ET AL., 2002) und als Spüleffekt kurzfristig durch Eliminierung noch nicht eingedrungener Pathogene von Vorteil sein könnte. Dieser Spüleffekt ging zwei bis sieben Tage *post infectionem* in Ferkeln der 18-tägigen TGEV-Überwachung mit signifikant weicheren Faeces einher, was jedoch keinen Einfluss auf das Körpergewicht der Ferkel hatte (CHAI ET AL., submitted).

Es ist erstaunlich, dass häufig auch bereits die Zn^M -Dosis eine mit der Zn^H -Dosis vergleichbare Wirkung zeigte, die Zn^K -Dosis jedoch keinerlei Schutz vor einer TGEV-Infektion auszuüben schien, obwohl die Zinkkonzentrationen in den jejunalen Ingesta von Zn^K und Zn^M auf gleichem Niveau lagen. Für die Coronavirushemmung *in vitro* ist eine Zinkkonzentration von 70 μM bereits antiviral wirksam (TE VELTHUIS ET AL., 2010), während auch Zinkkonzentrationen von bis zu 200 μM eingesetzt werden (WEI ET AL., 2012) (vgl. 4.2.2.1, Tab. 4.2, [Zn] in Jejunumingesta, Zn^K : 75 μM , Zn^M : 70 μM , Zn^H : 150 μM). Dies lässt den Schluss zu, dass

vermutlich erst etwas höhere Dosen als Zn^M für einen effektiven Schutz gegen TGEV-Infektion ausreichend wären.

Die pharmakologische (und moderate) Zinkdosis inhibiert die TGEV-Infektion vermutlich durch Eliminierung viraler RNA (CHAI *ET AL.*, submitted) und Verhinderung Caspase-3-mediierter Apoptose und erhält auf diese Weise die gesunde Mukosamorphologie sowie die trans- und parazelluläre jejunale Barriere aufrecht.

5.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten IPEC-J2 unter einer neuen Kulturbedingung, nämlich der Kultivierung mit Schweineserum anstatt mit fötalem Rinderserum, als *in vitro*-Modell für das porcine Jejunumepithel charakterisiert und etabliert werden. Welche Substanzen im Schweineserum die Reifung in IPEC-J2/PS auslösten, ist bisher nicht untersucht. Die Identifizierung dieser Faktoren wäre eine entscheidende Voraussetzung für die gezielte Auslösung der Reifung von Enterozyten in Zellpopulationen, in denen das *Signalling* der Reifung beeinträchtigt bzw. verzögert ist. Dies könnte womöglich bei TGEV-Infektionen akut therapeutisch zum Einsatz kommen, um die Dauer der Diarrhö durch ein schneller entstehendes funktionelles Zottenepithels zu verkürzen. Auf diese Weise würde das Ferkel vor fortschreitender Dehydratation und weiterem Gewichtsverlust bewahrt und würde der Schweinezüchter vor wirtschaftlichen Einbußen aufgrund längerer Mastzeiten verschont. Welche molekularen Zellkomponenten durch Faktoren des Schweineserums explizit in IPEC-J2/PS gesteuert werden, soll dabei mittels NGS (engl. *next-generation sequencing*) als Vorabscreening erste Anhaltspunkte liefern.

IPEC-J2 exprimierten kein Claudin-2 und Claudin-15 auf mRNA-Ebene, sodass sich diese auch nicht in IPEC-J2/PS wiederfinden. Ein solches „natürliches *Knockout*-Modell“ ist einerseits experimentell nützlich, wenn es beispielsweise darum geht, die bereits beschriebene Wirkung von Zink auf die intestinale Barriere zu untersuchen, welche häufig auf Blockierung des Claudin-2-Kationenkanals zurückgeführt wird (CARR *ET AL.*, 2010; WANG *ET AL.*, 2013a). Andererseits wird für Anwendungen wie die Prüfung der Hypothese, dass Claudin-15 und die Funktion des SGLT1 in IPEC-J2/PS über ein (in)direktes *Signalling* in Verbindung stehen, ein Zellkulturmodell benötigt, welches Claudin-15 auf Proteinebene exprimiert. Deshalb ist es notwendig, über Transfektionen mit Claudin-2 und/oder -15 die Zelllinie IPEC-J2/PS zu vervollständigen.

Obwohl pharmakologische Dosen ZnO positive Auswirkungen auf die Diarrhöinzidenz von Absetzferkeln haben können, stellen hohe Schwermetallkonzentrationen im Boden als Fol-

gen prophylaktischer ZnO-Supplementierung ein massives Problem für die Umwelt dar (KIM *ET AL.*, 2010). Unter diesem Aspekt ist es geboten, sich stärker auf Alternativen für pharmakologische Zinkdosen zu konzentrieren. KIM *ET AL.* (2010) konnten in einer Studie belegen, dass bei ähnlicher antidiarrhöischer Wirkung, sowohl in gesunden als auch in *E. coli*-infizierten Absetzferkeln, eine 30-fache Reduktion einer Dosis von 3000 mg ZnO pro kg Futter durch lipidummantelnde Mikroverkapselung möglich ist. Dabei waren die Zinkkonzentrationen im Serum und in den Faeces der Ferkel zwischen der Kapsel- und der Kontrollgruppe nicht verschieden (KIM *ET AL.*, 2010). Wie und wo genau das lipidummantelte ZnO seine Wirkung im Gastrointestinaltrakt entfaltet und woraus der protektive Effekt gegenüber der Kontrollgruppe resultiert, bleibt dabei noch zu untersuchen. Möglicherweise stellt die Mikroverkapselung von ZnO eine ZnO-Alternative für die Zukunft dar. Es bliebe jedoch noch zu prüfen, ob mikroverkapseltes ZnO gleiche positive wie negative Wirkungen auf den Organismus des Schweins ausübt wie herkömmliches ZnO. Vermutlich sind jedoch aufgrund der deutlich geringeren Dosis von mikroverkapseltem ZnO keine mikrobiellen und systemischen Effekte zu erwarten, welche diese Art von Darreichungsform auch für die prophylaktische Langzeitanwendung etablieren könnten.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der Schweinezucht tritt nach der Entwöhnung von der Muttermilch oft eine infektiologisch verursachte Diarrhösymptomatik auf, die für die Absetzferkel letal sein kann. Im Rahmen eines DFG-Verbundprojekts (SFB 852) mit dem Ziel, die Ferkelüberlebensrate zu steigern, war die Aufgabe der vorliegenden Arbeit, die Untersuchung von Faktoren, die die intestinale Barriere stärken oder wiederherstellen. Ein Großteil der Verbundprojektstudien wurde an dem porzin-jejunalen Zellkulturmodell IPEC-J2 und an nativen Darmepithelien von Ferkeln durchgeführt.

Ausgangspunkt des ersten Teils dieser Arbeit war der Befund, dass das bisher allgemein verwendete Zellkulturmodell IPEC-J2, hinsichtlich seiner Barriere- und Transporteigenschaften, dem Dünndarmepithel völlig unähnlich war, wodurch Effekte von Nahrungsfaktoren bisher nicht realistisch analysiert werden konnten. Dieser Teil der Arbeit hatte deshalb zum Ziel, die Zelllinie IPEC-J2 in ein besser geeignetes Modell zu konvertieren und die beiden Zellsysteme hinsichtlich epithelialer Struktur, Elektrophysiologie und Expression von epithelialen Polarisationsmarkerproteinen und barrierelevanten Tight Junction (TJ)-Proteinen zu charakterisieren. Dazu wurden IPEC-J2 auf permeablen Filtermembranen kultiviert – entweder konventionell mit *fetal bovine serum* (FBS) oder speziesspezifisch mit *porcine serum* (PS). Mukosae des porzinen Jejunums wurden zum Vergleich analysiert.

Elektrophysiologische, morphometrische, ultrastrukturelle und proteinbiochemische Versuche ergaben, dass unter PS-Kultivierung (IPEC-J2/PS), verglichen mit der FBS-Kultur (IPEC-J2/FBS), die Zellhöhe um das 6-fache zunahm, während sich der Zelldurchmesser halbierte. Außerdem wies die apikale Zellmembran von IPEC-J2/PS typische Mikrovilli auf. Der transepitheliale Widerstand (TER) sowie die para- und transzellulären Widerstände von IPEC-J2 waren bei PS-Kultivierung um eine Größenordnung verringert und die sekretorische Antwort auf Forskolin, verglichen mit IPEC-J2/FBS, verdoppelt. Struktur (Zellform) und Ultrastruktur (TJ-Stränge) von IPEC-J2/PS ähnelten nun denen von Jejunozyten und die Expression von Marker- und TJ-Proteinen war in Richtung fortgeschrittener Reifung verändert. Alle Parameter, die unter PS-Kultivierung gemessen wurden, waren denen porziner Jejunozyten näher als jemals seit der initialen Etablierung des Zellmodells IPEC-J2 im Jahr 1989 berichtet. Somit stellt IPEC-J2/PS das gegenwärtig beste Modell zur Untersuchung der porzin-jejunalen Barrierefunktion dar (ZAKRZEWSKI *ET AL.*, 2013a).

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Effekt einer Zinksupplementierung als ein potentielles Prophylaktikum in gesunden Absetzferkeln sowie als eine therapeutische Maßnahme bei der Behandlung TGEV (engl. *transmissible gastroenteritis virus*)-mediierter intestinaler

Erkrankungen bei Absetzferkeln untersucht. Pharmakologische Zinkdosen hatten keine signifikanten elektrophysiologisch erfassbaren Kurzzeiteffekte auf die jejunale Barrierefunktion. Als einziger statistisch relevanter Effekt traten Veränderungen der Barriereparameter in Abhängigkeit mit dem Lebensalter auf. Unter Einbeziehung von Daten anderer Projekte des SFB 852 ergab sich insgesamt, dass in Anbetracht eines mit der Zeit nachteilig werdenden Effekts der Zinksupplementierung lediglich eine Kurzzeitanwendung positiv wirksam ist.

Am optimierten Zellsystem IPEC-J2/PS bewirkte Zink einen TER-Anstieg und eine Permeabilitätsabnahme für den parazellulären Marker Fluoreszein – also insgesamt eine Verstärkung der Barriereigenschaften *in vitro*. Das Ausbleiben dieses Effekts am nativen Darmepithel *ex vivo* ist vermutlich auf ein Auswaschen des Zinks während der Gewebepreparation zurückzuführen. Daher scheint für die Barrierestärkung die akute Wirkung von Zink auf das jejunale Epithel essentiell.

Für TGEV-infizierte Ferkel im Kurzzeitversuch stellte die prophylaktische Zinksupplementierung hinsichtlich der jejunalen Barrierefunktion einen enormen Vorteil dar. Verglichen mit der Kontrollgruppe führte die pharmakologische Zinkdosis zu einer Verhinderung der Zottenatrophie, Milderung der epithelialen Apoptoserate und Bewahrung der epithelialen Barriere durch Aufrechterhalt des epithelialen Widerstands und Niedrighalten der induzierbaren Chloridsekretion. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine pharmakologische Zinksupplementierung das porzine Jejunum vor einer TGEV-Infektion schützen kann (CHAI *ET AL.*, submitted).

7 SUMMARY

In pig breeding, infection-associated diarrhea frequently occurs directly after weaning and is often lethal for weanling piglets. Within the framework of the DFG-funded collaborative research center (CRC) 852, whose overall goal was to increase the weaners' survival rate, this thesis investigated factors which strengthen or recover the intestinal barrier. The majority of CRC 852 projects were performed by using the porcine jejunal cell line IPEC-J2 and native epithelial explants from porcine gut.

The first part of this thesis was based on the finding that the cell culture system IPEC-J2, which has been commonly used during the past decades, did not resemble small bowel epithelium with regard to barrier and transport properties. Effects of nutritional factors therefore could not be reliably investigated. Thus, it was a major aim of the present thesis to convert IPEC-J2 into a valid model and to characterize epithelial architecture, electrophysiology, and expression of epithelial polarization marker proteins and barrier-relevant tight junction (TJ) proteins in both cell systems. For this, IPEC-J2 monolayers were cultivated on permeable supports, either conventionally with fetal bovine serum (FBS) or species-specifically with porcine serum (PS). Porcine jejunal mucosae were analyzed for comparison.

Electrophysiological, morphometrical, ultrastructural, and protein biochemical studies revealed that under PS conditions (IPEC-J2/PS), compared to FBS culture (IPEC-J2/FBS), cell height increased 6-fold while the cell diameter was reduced by 50%. In addition, the apical cell membrane of IPEC-J2/PS exhibited typical microvilli. Under PS condition, transepithelial resistance (TER) and trans- and paracellular resistances were reduced by one order of magnitude and the secretory response to forskolin was increased 2-fold, compared to FBS condition. Structure (cell shape) and ultrastructure (TJ strands) of IPEC-J2/PS resembled those of jejuncytes and the expression of epithelial polarization marker and TJ proteins was changed towards advanced maturation. All parameters measured under PS conditions were much closer to those of typical pig jejuncytes than ever reported since the cell line's initial establishment in 1989. Hence, IPEC-J2/PS monolayers currently represent the most suitable model to investigate porcine jejunal barrier function (ZAKRZEWSKI *ET AL.*, 2013a).

The second part of this thesis aimed at investigating the effect of zinc supplementation as a potential prophylactic tool in healthy piglets and as a therapeutic agent in treating TGEV (transmissible gastroenteritis virus)-mediated intestinal disorders in weanling pigs. Pharmacological zinc doses exerted no significant electrophysiologically ascertainable short-term effects on jejunal barrier function. The only statistically relevant effects were age-related

changes in barrier parameters. Including other CRC 852 groups' data, piglets appear to profit solely from a short-term zinc application as adverse effects increase over time.

In IPEC-J2/PS, zinc caused an increase in TER and a decrease in permeability to the paracellular marker fluorescein – reflecting an overall barrier strengthening *in vitro*. *Ex vivo* however, such effects could not be observed. This is presumed to be due to zinc being washed out during tissue preparation. Thus, with respect to barrier strengthening, the acute presence of zinc seems to be essential.

When piglets were virally challenged in a short-term trial, prophylactic zinc had tremendous beneficial effects on jejunal barrier function. Compared to a control group, pharmacological zinc doses prevented villus atrophy, mitigated apoptotic events in enterocytes, and retained the jejunal barrier by maintaining epithelial resistance and by keeping inducible chloride secretion down. These results suggest that high dietary zinc could provide enhanced protection against TGEV infection in piglet jejunum (CHAI *ET AL.*, submitted).

8 LITERATUR

AARESTRUP F (2012) Sustainable farming: Get pigs off antibiotics. *Nature* 486:465-466

AL-SADI R, KHATIB K, GUO S, YE D, YOUSSEF M, MA T (2011) Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300:G1054-1064

AMASHEH M, FROMM A, KRUG SM, AMASHEH S, ANDRES S, ZEITZ M, FROMM M, SCHULZKE JD (2010) TNF α -induced and berberine-antagonized tight junction barrier impairment via tyrosine kinase, Akt and NF κ B signaling. *J Cell Sci* 123:4145-4155

AMASHEH S, MEIRI N, GITTER AH, SCHÖNEBERG T, MANKERTZ J, SCHULZKE JD, FROMM M (2002) Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci* 115:4969-4976

AMASHEH S, SCHMIDT T, MAHN M, FLORIAN P, MANKERTZ J, TAVALALI S, GITTER AH, SCHULZKE JD, FROMM M (2005) Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. *Cell Tissue Res* 321:89-96

BAHL R, BHANDARI N, SAKSENA M, STRAND T, KUMAR GT, BHAN MK, SOMMERFELT H (2002) Efficacy of zinc-fortified oral rehydration solution in 6- to 35-month-old children with acute diarrhea. *J Pediatr* 141:677-682

BARNARD R, GUREVICH KG (2005) In vitro bioassay as a predictor of in vivo response. *Theor Biol Med Model* 2:3

BARRALLO-GIMENO A, NIETO MA (2005) The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 132:3151-3161

BARRETT KE, KEELY SJ (2000) Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects. *Annu Rev Physiol* 62:535-572

BEDNORZ C, OELGESCHLAGER K, KINNEBANN B, HARTMANN S, NEUMANN K, PIEPER R, BETHE A, SEMMLER T, TEDIN K, SCHIERACK P, WIELER LH, GUENTHER S (2013) The broader context of antibiotic resistance: zinc feed supplementation of piglets increases the proportion of multi-resistant *Escherichia coli* in vivo. *Int J Med Microbiol* 303:396-403

BEN-ZE'EV A (1984) Differential control of cytokeratins and vimentin synthesis by cell-cell contact and cell spreading in cultured epithelial cells. *J Cell Biol* 99:1424-1433

BERG K, BOLT G, ANDERSEN H, OWEN TC (2001) Zinc potentiates the antiviral action of human IFN- α tenfold. *J Interferon Cytokine Res* 21:471-474

BERSCHNEIDER H (1989) Development of normal cultured small intestinal epithelial cell lines which transport Na and Cl. *Gastroenterology* 96:A41 (Congress Abstract)

BEUTHEU S, OUELAA W, GUÉRIN C, BELMONTE L, AZIZ M, TENNOUNE N, BÔLE-FEYSOT C, GALAS L, DÉCHELOTTE P, COEFFIER M (2013) Glutamine supplementation, but not combined glutamine and arginine supplementation, improves gut barrier function during chemotherapy-induced intestinal mucositis in rats. *Clin Nutr* [Epub ahead of print, doi 10.1016/j.clnu.2013.09.003]

BHATNAGAR S, BAHAL R, SHARMA PK, KUMAR GT, SAXENA SK, BHAN MK (2004) Zinc with oral rehydration therapy reduces stool output and duration of diarrhea in hospitalized children: a randomized controlled trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 38:34-40

- BHUTTA ZA, BLACK RE, BROWN KH, GARDNER JM, GORE S, HIDAYAT A, KHATUN F, MARTORELL R, NINH NX, PENNY ME, ROSADO JL, ROY SK, RUEL M, SAZAWAL S, SHANKAR A (1999)** Prevention of diarrhea and pneumonia by zinc supplementation in children in developing countries: pooled analysis of randomized controlled trials. *J Pediatr* 135:689-697
- BONDZIO A, LODEMANN U, WEISE C, EINSPANIER R (2013a)** Cry1Ab treatment has no effects on viability of cultured porcine intestinal cells, but triggers Hsp70 expression. *PLoS One* 8:e67079
- BONDZIO A, PIEPER R, GABLER C, WEISE C, SCHULZE P, ZENTEK J, EINSPANIER R (2013b)** Feeding low or pharmacological concentrations of zinc oxide changes the hepatic proteome profiles in weaned piglets. *PLoS One* 8:e81202
- BONDZIO A, PIEPER R, WEISE C, GABLER C, ZENTEK J, EINSPANIER R (2013c)** Influence of a long-term supplementation of high levels of zinc oxide on pancreatic protein expression in piglets. *Proc Soc Nutr Physiol* 22:59 (Congress Abstract)
- BOTIC T, KLINGBERG TD, WEINGARTL H, CENCIC A (2007)** A novel eukaryotic cell culture model to study antiviral activity of potential probiotic bacteria. *Int J Food Microbiol* 115:227-234
- BROWN DR, PRICE LD (2007)** Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 invasion in an epithelial cell line (IPEC J2) from porcine small intestine. *Vet Microbiol* 120:328-333
- BURKEY TE, SKJOLAAS KA, DRITZ SS, MINTON JE (2009)** Expression of porcine Toll-like receptor 2, 4 and 9 gene transcripts in the presence of lipopolysaccharide and *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Choleraesuis. *Vet Immunol Immunopathol* 130:96-101
- BUSCHMANN MM, SHEN L, RAJAPAKSE H, RALEIGH DR, WANG Y, WANG Y, LINGARAJU A, ZHA J, ABBOTT E, MCAULEY EM, BRESKIN LA, WU L, ANDERSON K, TURNER JR, WEBER CR (2013)** Occludin OCEL-domain interactions are required for maintenance and regulation of the tight junction barrier to macromolecular flux. *Mol Biol Cell* 24:3056-3068
- BZIK VA, MEDANI M, BAIRD AW, WINTER DC, BRAYDEN DJ (2012)** Mechanisms of action of zinc on rat intestinal epithelial electrogenic ion secretion: insights into its antidiarrhoeal actions. *J Pharm Pharmacol* 64:644-653
- CAMPBELL JM, CRENSHAW JD, POLO J (2013)** The biological stress of early weaned piglets. *J Anim Sci Biotechnol* 4:[Epub ahead of print, doi 10.1186/2049-1891-1184-1119]
- CARIO E, JUNG S, HARDER D'HEUREUSE J, SCHULTE C, STURM A, WIEDENMANN B, GOEBELL H, DIGNASS AU (2000)** Effects of exogenous zinc supplementation on intestinal epithelial repair in vitro. *Eur J Clin Invest* 30:419-428
- CARLSON D, POULSEN HD, SEHESTED J (2004)** Influence of weaning and effect of post weaning dietary zinc and copper on electrophysiological response to glucose, theophylline and 5-HT in piglet small intestinal mucosa. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 137:757-765
- CARLSON D, SEHESTED J, FENG Z, POULSEN HD (2008)** Serosal zinc attenuate serotonin and vasoactive intestinal peptide induced secretion in piglet small intestinal epithelium in vitro. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 149:51-58
- CARLSON MS, HILL GM, LINK JE (1999)** Early- and traditionally weaned nursery pigs benefit from phase-feeding pharmacological concentrations of zinc oxide: effect on metallothionein and mineral concentrations. *J Anim Sci* 77:1199-1207

- CARR G, WRIGHT JA, SIMMONS NL (2010)** Epithelial barrier resistance is increased by the divalent cation zinc in cultured MDCKII epithelial monolayers. *J Membr Biol* 237:115-123
- CASALETTO JB, SAOTOME I, CURTO M, McCLATCHEY AI (2011)** Ezrin-mediated apical integrity is required for intestinal homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:11924-11929
- CHAI W, ZAKRZEWSKI SS, GÜNZEL D, PIEPER R, WANG Z, TWARDZIOK S, JANCZYK P, OSTERRIEDER N, BURWINKEL M (submitted)** High-dose dietary zinc oxide mitigates infection with transmissible gastroenteritis virus in piglets. *BMC Vet Res* submitted 2013-09-27
- CHAPMAN JC, LIU Y, ZHU L, RHOADS JM (2012)** Arginine and citrulline protect intestinal cell monolayer tight junctions from hypoxia-induced injury in piglets. *Pediatr Res* 72:576-582
- CHAUDHARY S, VERMA M, DHAWAN V, NAIN CK, KUMAR R, KUMAR L, GANGULY NK (1996)** Plasma vitamin A, zinc and selenium concentrations in children with acute and persistent diarrhoea. *J Diarrhoeal Dis Res* 14:190-193
- CHOMCZYNSKI P, SACCHI N (1987)** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159
- CLAUDE P (1978)** Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J Membr Biol* 39:219-232
- CLAUDE P, GOODENOUGH DA (1973)** Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. *J Cell Biol* 58:390-400
- COHEN CJ, SHIEH JT, PICKLES RJ, OKEGAWA T, HSIEH JT, BERGELSON JM (2001)** The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:15191-15196
- COUSINS RJ, LIUZZI JP, LICHTEN LA (2006)** Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *J Biol Chem* 281:24085-24089
- DAVIES JC, ALTON EW, BUSH A (2007)** Cystic fibrosis. *BMJ* 335:1255-1259
- DAVIN R, MANZANILLA EG, KLASING KC, PEREZ JF (2013)** Effect of weaning and in-feed high doses of zinc oxide on zinc levels in different body compartments of piglets. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 97:6-12
- DEAN P, MARESCA M, SCHULLER S, PHILLIPS AD, KENNY B (2006)** Potent diarrheagenic mechanism mediated by the cooperative action of three enteropathogenic *Escherichia coli*-injected effector proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:1876-1881
- DEVREESE M, PASMANS F, DE BACKER P, CROUBELS S (2013)** An in vitro model using the IPEC-J2 cell line for efficacy and drug interaction testing of mycotoxin detoxifying agents. *Toxicol In Vitro* 27:157-163
- DHARMSATHAPHORN K, PANDOL SJ (1986)** Mechanism of chloride secretion induced by carbachol in a colonic epithelial cell line. *J Clin Invest* 77:348-354
- DIBNER JJ, RICHARDS JD (2005)** Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poult Sci* 84:634-643
- DIESING AK, NOSSOL C, DÄNICKE S, WALK N, POST A, KAHLERT S, ROTHKÖTTER HJ, KLUSS J (2011a)** Vulnerability of polarised intestinal porcine epithelial cells to mycotoxin deoxynivalenol depends on the route of application. *PLoS One* 6:e17472

- DIESING AK, NOSSOL C, PANTHER P, WALK N, POST A, KLUSS J, KREUTZMANN P, DÄNICKE S, ROTHKÖTTER HJ, KAHLERT S (2011b)** Mycotoxin deoxynivalenol (DON) mediates biphasic cellular response in intestinal porcine epithelial cell lines IPEC-1 and IPEC-J2. *Toxicol Lett* 200:8-18
- DOYLE LP, HUTCHINGS LM (1946)** A transmissible gastroenteritis in pigs. *J Am Vet Med Assoc* 108:257-259
- EBNET K, SUZUKI A, OHNO S, VESTWEBER D (2004)** Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci* 117:19-29
- EG-KOMMISSION (2008)** Verordnung (EG) Nr. 889/2008 der Kommission vom 5. September 2008 mit Durchführungsvorschriften zur Verordnung (EG) Nr. 834/2007 des Rates über die ökologische/biologische Produktion und die Kennzeichnung von ökologischen/biologischen Erzeugnissen hinsichtlich der ökologischen/biologischen Produktion, Kennzeichnung und Kontrolle. *Amtsblatt der Europäischen Union L 250/1:1-84*
- EHRENKRANZ JR, LEWIS NG, KAHN CR, ROTH J (2005)** Phlorizin: a review. *Diabetes Metab Res Rev* 21:31-38
- EU-RAT (2008)** Richtlinie 2008/120/EG des Rates vom 18. Dezember 2008 über Mindestanforderungen für den Schutz von Schweinen. *Amtsblatt der Europäischen Union L47/5:1-9*
- FARQUHAR MG, PALADE GE (1963)** Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 17:375-412
- FENG Z, CARLSON D, POULSEN HD (2006)** Zinc attenuates forskolin-stimulated electrolyte secretion without involvement of the enteric nervous system in small intestinal epithelium from weaned piglets. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 145:328-333
- FESTING S, WILKINSON R (2007)** The ethics of animal research. Talking Point on the use of animals in scientific research. *EMBO Rep* 8:526-530
- FIELD M (2003)** Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. *J Clin Invest* 111:931-943
- FLECKNELL P (2002)** Replacement, reduction and refinement. *ALTEX* 19:73-78
- FLORIAN P, SCHÖNEBERG T, SCHULZKE JD, FROMM M, GITTER AH (2002)** Single-cell epithelial defects close rapidly by an actinomyosin purse string mechanism with functional tight junctions. *J Physiol* 545:485-499
- FLYNN AN, BURET AG (2008)** Tight junctional disruption and apoptosis in an in vitro model of *Citrobacter rodentium* infection. *Microb Pathog* 45:98-104
- FÖRSTER C (2008)** Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol* 130:55-70
- FROMM M, SCHULZKE JD (2008)** Diarrhea. In: Lang F (ed) *Encyclopedia of molecular mechanisms of disease*. Springer, Berlin Heidelberg, pp 528-530
- FROMM M, SCHULZKE JD, HEGEL U (1985)** Epithelial and subepithelial contributions to transmural electrical resistance of intact rat jejunum, in vitro. *Pflügers Arch* 405:400-402
- FUJIMURA T, MATSUI T, FUNABA M (2012)** Regulatory responses to excess zinc ingestion in growing rats. *Br J Nutr* 107:1655-1663

FURUSE M, HATA M, FURUSE K, YOSHIDA Y, HARATAKE A, SUGITANI Y, NODA T, KUBO A, TSUKITA S (2002) Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 156:1099-1111

FURUSE M, HIRASE T, ITOH M, NAGAFUCHI A, YONEMURA S, TSUKITA S, TSUKITA S (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123:1777-1788

GAGGIA F, MATTARELLI P, BIAVATI B (2010) Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int J Food Microbiol* 141:S15-28

GEENS MM, NIEWOLD TA (2010) Preliminary Characterization of the Transcriptional Response of the Porcine Intestinal Cell Line IPEC-J2 to Enterotoxigenic Escherichia coli, Escherichia coli, and E. coli Lipopolysaccharide. *Comp Funct Genomics* 2010:1-11, Article ID 469583

GEENS MM, NIEWOLD TA (2011) Optimizing culture conditions of a porcine epithelial cell line IPEC-J2 through a histological and physiological characterization. *Cytotechnology* 63:415-423

GfE (2006) Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung von Schweinen. DLG Verlag, Frankfurt

GIBSON RS (1994) Zinc nutrition in developing countries. *Nutr Res Rev* 7:151-173

GOLDBLUM SE, RAI U, TRIPATHI A, THAKAR M, DE LEO L, DI TORO N, NOT T, RAMACHANDRAN R, PUCHE AC, HOLLENBERG MD, FASANO A (2011) The active ZOT domain (aa 288-293) increases ZO-1 and myosin 1C serine/threonine phosphorylation, alters interaction between ZO-1 and its binding partners, and induces tight junction disassembly through proteinase activated receptor 2 activation. *FASEB J* 25:144-158

GONZÁLEZ-MARISCAL L, BETANZOS A, NAVA P, JARAMILLO BE (2003) Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 81:1-44

GOOSSENS J, PASMANS F, VERBRUGGHE E, VANDENBROUCKE V, DE BAERE S, MEYER E, HAESBROUCK F, DE BACKER P, CROUBELS S (2012) Porcine intestinal epithelial barrier disruption by the Fusarium mycotoxins deoxynivalenol and T-2 toxin promotes transepithelial passage of doxycycline and paromomycin. *BMC Vet Res* 8:245

GOUYON F, CAILLAUD L, CARRIERE V, KLEIN C, DALET V, CITADELLE D, KELLETT GL, THORENS B, LETURQUE A, BROU-LAROCHE E (2003) Simple-sugar meals target GLUT2 at enterocyte apical membranes to improve sugar absorption: a study in GLUT2-null mice. *J Physiol* 552:823-832

GRAINGER CI, GREENWELL LL, LOCKLEY DJ, MARTIN GP, FORBES B (2006) Culture of Calu-3 cells at the air interface provides a representative model of the airway epithelial barrier. *Pharm Res* 23:1482-1490

GROBBEL M, LÜBKE-BECKER A, ALESIK E, SCHWARZ S, WALLMANN J, WERCKENTHIN C, WIELER LH (2007) Antimicrobial susceptibility of Escherichia coli from swine, horses, dogs and cats as determined in the BfT-GermVet monitoring program 2004-2006. *Berl Münch Tierarztl Wochenschr* 120:391-401

GROOTJANS J, THUIJLS G, DERIKX JP, VAN DAM RM, DEJONG CH, BUURMAN WA (2011) Rapid lamina propria retraction and zipper-like constriction of the epithelium preserves the epithelial lining in human small intestine exposed to ischaemia-reperfusion. *J Pathol* 224:411-419

- GUILLEMOT L, PASCHOUD S, PULIMENO P, FOGLIA A, CITI S (2008)** The cytoplasmic plaque of tight junctions: a scaffolding and signalling center. *Biochim Biophys Acta* 1778:601-613
- GUILLOTEAU P, ZABIELSKI R, HAMMON HM, METGES CC (2010)** Nutritional programming of gastrointestinal tract development. Is the pig a good model for man? *Nutr Res Rev* 23:4-22
- GUMBINER B (1987)** Structure, biochemistry, and assembly of epithelial tight junctions. *Am J Physiol* 253:C749-758
- GÜNZEL D, FROMM, M (2012)** Claudins and other tight junction proteins. *Comprehensive Physiology* 2:1819-1852
- GÜNZEL D, STUIVER M, KAUSALYA PJ, HAISCH L, KRUG SM, ROSENTHAL R, MEIJ IC, HUNZIKER W, FROMM M, MÜLLER D (2009)** Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function. *J Cell Sci* 122:1507-1517
- GÜNZEL D, ZAKRZEWSKI SS, SCHMID T, PANGALOS M, WIEDENHOEFT J, BLASSE C, OZBODA C, KRUG SM (2012)** From TER to trans- and paracellular resistance: lessons from impedance spectroscopy. *Ann N Y Acad Sci* 1257:142-151
- GUPTA SC, SHARMA A, MISHRA M, MISHRA RK, CHOWDHURI DK (2010)** Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? *Life Sci* 86:377-384
- GUTTMAN JA, FINLAY BB (2009)** Tight junctions as targets of infectious agents. *Biochim Biophys Acta* 1788:832-841
- HAMADEJOVA K, VITOVEC J (2005)** Occurrence of the coccidium *Isoospora suis* in piglets. *Vet Med – Czech* 50:159-163
- HAMPSON DJ (1986)** Alterations in piglet small intestinal structure at weaning. *Res Vet Sci* 40:32-40
- HEDEMANN MS, JENSEN BB, POULSEN HD (2006)** Influence of dietary zinc and copper on digestive enzyme activity and intestinal morphology in weaned pigs. *J Anim Sci* 84:3310-3320
- HEGAN PS, GIRAL H, LEVI M, MOOSEKER MS (2012)** Myosin VI is required for maintenance of brush border structure, composition, and membrane trafficking functions in the intestinal epithelial cell. *Cytoskeleton (Hoboken)* 69:235-251
- HENDERSON LM, BREWER GJ, DRESSMAN JB, SWIDAN SZ, DUROSS DJ, ADAIR CH, BARNETT JL, BERARDI RR (1995)** Effect of intragastric pH on the absorption of oral zinc acetate and zinc oxide in young healthy volunteers. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 19:393-397
- HENDRIKSEN CF (2002)** Refinement, reduction, and replacement of animal use for regulatory testing: current best scientific practices for the evaluation of safety and potency of biologicals. *ILAR J* 43:S43-48
- HEO JM, OPAPEJU FO, PLUSKE JR, KIM JC, HAMPSON DJ, NYACHOTI CM (2013)** Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 97:207-237
- HERING NA, FROMM M, SCHULZKE JD (2012)** Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics. *J Physiol* 590:1035-1044

- HERMES RG, MANZANILLA EG, MARTIN-ORUE SM, PEREZ JF, KLASING KC (2011)** Influence of dietary ingredients on in vitro inflammatory response of intestinal porcine epithelial cells challenged by an enterotoxigenic *Escherichia coli* (K88). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 34:479-488
- HEUVELIN E, LEBRETON C, BICHARA M, CERF-BENSUSSAN N, HEYMAN M (2010)** A *Bifidobacterium* probiotic strain and its soluble factors alleviate chloride secretion by human intestinal epithelial cells. *J Nutr* 140:7-11
- HILL GM, LINK JE (2009)** Transporters in the absorption and utilization of zinc and copper. *J Anim Sci* 87:E85-89
- HODGES K, GILL R (2010)** Infectious diarrhea: Cellular and molecular mechanisms. *Gut Microbes* 1:4-21
- HOJBERG O, CANIBE N, POULSEN HD, HEDEMAN MS, JENSEN BB (2005)** Influence of dietary zinc oxide and copper sulfate on the gastrointestinal ecosystem in newly weaned piglets. *Appl Environ Microbiol* 71:2267-2277
- HOLMES JL, VAN ITALLIE CM, RASMUSSEN JE, ANDERSON JM (2006)** Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns. *Gene Expr Patterns* 6:581-588
- HOQUE KM, RAJENDRAN VM, BINDER HJ (2005)** Zinc inhibits cAMP-stimulated Cl secretion via basolateral K-channel blockade in rat ileum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288:G956-963
- HU C, SONG J, LI Y, LUAN Z, ZHU K (2013a)** Diosmectite-zinc oxide composite improves intestinal barrier function, modulates expression of pro-inflammatory cytokines and tight junction protein in early weaned pigs. *Br J Nutr* 110:681-688
- HU C, SONG J, YOU Z, LUAN Z, LI W (2012)** Zinc oxide-montmorillonite hybrid influences diarrhea, intestinal mucosal integrity, and digestive enzyme activity in weaned pigs. *Biol Trace Elem Res* 149:190-196
- HU CH, SONG ZH, XIAO K, SONG J, JIAO LF, KE YL (2013b)** Zinc oxide influences intestinal integrity, the expressions of genes associated with inflammation and TLR4-myeloid differentiation factor 88 signaling pathways in weanling pigs. *Innate Immun* [Epub ahead of print, doi 10.1177/1753425913499947]
- HU CH, XIAO K, LUAN ZS, SONG J (2013c)** Early weaning increases intestinal permeability, alters expression of cytokine and tight junction proteins, and activates mitogen-activated protein kinases in pigs. *J Anim Sci* 91:1094-1101
- IKENOUCHI J, FURUSE M, FURUSE K, SASAKI H, TSUKITA S, TSUKITA S (2005)** Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 171:939-945
- IKENOUCHI J, SASAKI H, TSUKITA S, FURUSE M, TSUKITA S (2008)** Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin. *Mol Biol Cell* 19:4687-4693
- JAVIER RT, RICE AP (2011)** Emerging theme: cellular PDZ proteins as common targets of pathogenic viruses. *J Virol* 85:11544-11556
- JAYME DW, EPSTEIN DA, CONRAD DR (1988)** Fetal bovine serum alternatives. *Nature* 334:547-548
- JOCHEMS CE, VAN DER VALK JB, STAFLEU FR, BAUMANS V (2002)** The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Altern Lab Anim* 30:219-227

- JOHN LJ, FROMM M, SCHULZKE JD (2011)** Epithelial barriers in intestinal inflammation. *Antioxid Redox Signal* 15:1255-1270
- JOHNSON AM, KAUSHIK RS, HARDWIDGE PR (2010)** Disruption of transepithelial resistance by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* 141:115-119
- JONES HF, BUTLER RN, BROOKS DA (2011)** Intestinal fructose transport and malabsorption in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300:G202-206
- KEEN CL, GERSHWIN ME (1990)** Zinc deficiency and immune function. *Annu Rev Nutr* 10:415-431
- KIDDER DE, MANNERS MJ (1980)** The level of distribution of carbohydrases in the small intestine mucosa of pigs from 3 weeks of age to maturity. *Br J Nutr* 43:141-153
- KIM JC, HANSEN CF, MULLAN BP, PLUSKE JR (2012)** Nutrition and pathology of weaner pigs: Nutritional strategies to support barrier function in the gastrointestinal tract. *Anim Feed Sci Technol* 173:3-16
- KIM JC, HANSEN CF, PLUSKE JR, MULLAN BP (2010)** Evaluating the replacement of zinc oxide with an encapsulated zinc oxide product as a means of controlling post-weaning diarrhoea in piglets. Report prepared for the Co-operative Research Centre for an Internationally Competitive Pork Industry, http://www.apri.com.au/2C-114_Final_report.pdf (letzter Aufruf: 12.02.2014)
- KOH SY, GEORGE S, BROZEL V, MOXLEY R, FRANCIS D, KAUSHIK RS (2008)** Porcine intestinal epithelial cell lines as a new in vitro model for studying adherence and pathogenesis of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* 130:191-197
- KOJIMA T, MURATA M, GO M, SPRAY DC, SAWADA N (2007)** Connexins induce and maintain tight junctions in epithelial cells. *J Membr Biol* 217:13-19
- KOKKINOS MI, WAFAI R, WONG MK, NEWGREEN DF, THOMPSON EW, WALTHAM M (2007)** Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer – observations in vitro and in vivo. *Cells Tissues Organs* 185:191-203
- KREBS NF (2000)** Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. *J Nutr* 130:1374S-1377S
- KREUSEL KM, FROMM M, SCHULZKE JD, HEGEL U (1991)** Cl⁻ secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6). *Am J Physiol* 261:C574-582
- KRUG SM, AMASHEH S, RICHTER JF, MILATZ S, GÜNZEL D, WESTPHAL JK, HUBER O, SCHULZKE JD, FROMM M (2009a)** Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol Biol Cell* 20:3713-3724
- KRUG SM, FROMM M, GÜNZEL D (2009b)** Two-path impedance spectroscopy for measuring paracellular and transcellular epithelial resistance. *Biophys J* 97:2202-2211
- KRUG SM, GÜNZEL D, CONRAD MP, ROSENTHAL R, FROMM A, AMASHEH S, SCHULZKE JD, FROMM M (2012)** Claudin-17 forms tight junction channels with distinct anion selectivity. *Cell Mol Life Sci* 69:2765-2778
- KWON O, ECK P, CHEN S, CORPE CP, LEE JH, KRUHLAK M, LEVINE M (2007)** Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. *FASEB J* 21:366-377
- LA BONNARDIERE C, LAUDE H (1981)** High interferon titer in newborn pig intestine during experimentally induced viral enteritis. *Infect Immun* 32:28-31

- LAEMMLI UK (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- LALLÈS JP, BOSI P, SMIDT H, STOKES CR (2007)** Weaning — A challenge to gut physiologists. *Livest Sci* 108:82-93
- LALLÈS JP, BOUDRY G, FAVIER C, LE FLOCH N, LURON I, MONTAGNE L, OSWALD IP, PIÉ S, PIEL C, SÈVE B (2004)** Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Anim Res* 53:301–316
- LAN D, TANG C, YUE H, SUN H, CUI L, HUA X, LI J (2013)** Microarray analysis of differentially expressed transcripts in porcine intestinal epithelial cells (IPEC-J2) infected with porcine sapelovirus as a model to study innate immune responses to enteric viruses. *Arch Virol* 158:1467-1475
- LE DIVIDICH J, SÈVE B (2000)** Effects of underfeeding during the weaning period on growth, metabolism, and hormonal adjustments in the piglet. *Domest Anim Endocrinol* 19:63-74
- LECCE JG (1986)** Diarrhea: the nemesis of the artificially reared, early weaned piglet and a strategy for defense. *J Anim Sci* 63:1307-1313
- LEONHARD-MAREK S, HEMPE J, SCHROEDER B, BREVES G (2009)** Electrophysiological characterization of chloride secretion across the jejunum and colon of pigs as affected by age and weaning. *J Comp Physiol B* 179:883-896
- LI BT, VAN KESSEL AG, CAINE WR, HUANG SX, KIRKWOOD RN (2001)** Small intestinal morphology and bacterial populations in ileal digesta and feces of newly weaned pigs receiving a high dietary level of zinc oxide. *Can J Anim Sci* 81:511-516
- LICHTEN LA, COUSINS RJ (2009)** Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. *Annu Rev Nutr* 29:153-176
- LIU F, LI G, WEN K, BUI T, CAO D, ZHANG Y, YUAN L (2010)** Porcine small intestinal epithelial cell line (IPEC-J2) of rotavirus infection as a new model for the study of innate immune responses to rotaviruses and probiotics. *Viral Immunol* 23:135-149
- LIUZZI JP, BOBO JA, LICHTEN LA, SAMUELSON DA, COUSINS RJ (2004)** Responsive transporter genes within the murine intestinal-pancreatic axis form a basis of zinc homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:14355-14360
- LODEMANN U, EINSPANIER R, SCHARFEN F, MARTENS H, BONDZIO A (2013)** Effects of zinc on epithelial barrier properties and viability in a human and a porcine intestinal cell culture model. *Toxicol In Vitro* 27:834-843
- LOHI H, MÄKELÄ S, PULKKINEN K, HÖGLUND P, KARJALAINEN-LINDSBERG ML, PUOLAKKAINEN P, KERE J (2002)** Upregulation of CFTR expression but not SLC26A3 and SLC9A3 in ulcerative colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283:G567-575
- LOISEAU N, DEBRAUWER L, SAMBOU T, BOUHET S, MILLER JD, MARTIN PG, VIADERE JL, PINTON P, PUEL O, PINEAU T, TULLIEZ J, GALTIER P, OSWALD IP (2007)** Fumonisin B1 exposure and its selective effect on porcine jejunal segment: sphingolipids, glycolipids and trans-epithelial passage disturbance. *Biochem Pharmacol* 74:144-152
- LUKACIK M, THOMAS RL, ARANDA JV (2008)** A meta-analysis of the effects of oral zinc in the treatment of acute and persistent diarrhea. *Pediatrics* 121:326-336
- MA TY, HOLLANDER D, BHALLA D, NGUYEN H, KRUGLIAK P (1992)** IEC-18, a nontransformed small intestinal cell line for studying epithelial permeability. *J Lab Clin Med* 120:329-341

- MADEC F, BRIDOUX N, BOUNAIX S, JESTIN A (1998)** Measurement of digestive disorders in the piglet at weaning and related risk factors. *Prev Vet Med* 35:53-72
- MAIERS JL, PENG X, FANNING AS, DEMALI KA (2013)** ZO-1 recruitment to alpha-catenin – a novel mechanism for coupling the assembly of tight junctions to adherens junctions. *J Cell Sci* 126:3904-3915
- MANDELL KJ, PARKOS CA (2005)** The JAM family of proteins. *Adv Drug Deliv Rev* 57:857-867
- MANKERTZ J, AMASHEH M, KRUG SM, FROMM A, AMASHEH S, HILLENBRAND B, TAVALALI S, FROMM M, SCHULZKE JD (2009)** TNFalpha up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *Cell Tissue Res* 336:67-77
- MAO X, QI S, YU B, HE J, YU J, CHEN D (2013)** Zn²⁺ and L-isoleucine induce the expressions of porcine beta-defensins in IPEC-J2 cells. *Mol Biol Rep* 40:1547-1552
- MARIANI V, PALERMO S, FIORENTINI S, LANUBILE A, GIUFFRA E (2009)** Gene expression study of two widely used pig intestinal epithelial cell lines: IPEC-J2 and IPI-2I. *Vet Immunol Immunopathol* 131:278-284
- MARKOV AG, VESHNYAKOVA A, FROMM M, AMASHEH M, AMASHEH S (2010)** Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine. *J Comp Physiol B* 180:591-598
- MARONPOT RR, WHITEHAIR CK (1967)** Experimental sprue-like small intestinal lesions in pigs. *Can J Comp Med Vet Sci* 31:309-316
- MARTIN L, LODEMANN U, BONDZIO A, GEFELLER EM, VAHJEN W, ASCHENBACH JR, ZENTEK J, PIEPER R (2013a)** A high amount of dietary zinc changes the expression of zinc transporters and metallothionein in jejunal epithelial cells in vitro and in vivo but does not prevent zinc accumulation in jejunal tissue of piglets. *J Nutr* 143:1205-1210
- MARTIN L, PIEPER R, SCHUNTER N, VAHJEN W, ZENTEK J (2013b)** Performance, organ zinc concentration, jejunal brush border membrane enzyme activities and mRNA expression in piglets fed with different levels of dietary zinc. *Arch Anim Nutr* 67:248-261
- MARTINEZ-PALOMO A, MEZA I, BEATY G, CEREJIDO M (1980)** Experimental modulation of occluding junctions in a cultured transporting epithelium. *J Cell Biol* 87:736-745
- MCCARTHY KM, SKARE IB, STANKEWICH MC, FURUSE M, TSUKITA S, ROGERS RA, LYNCH RD, SCHNEEBERGER EE (1996)** Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci* 109:2287-2298
- MCCRACKEN BA, SPURLOCK ME, ROOS MA, ZUCKERMANN FA, GASKINS HR (1999)** Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. *J Nutr* 129:613-619
- MCLAMB BL, GIBSON AJ, OVERMAN EL, STAHL C, MOESER AJ (2013)** Early weaning stress in pigs impairs innate mucosal immune responses to enterotoxigenic *E. coli* challenge and exacerbates intestinal injury and clinical disease. *PLoS One* 8:e59838
- MEDANI M, BZIK VA, ROGERS A, COLLINS D, KENNELLY R, WINTER DC, BRAYDEN DJ, BAIRD AW (2012)** Zinc sulphate attenuates chloride secretion in human colonic mucosae in vitro. *Eur J Pharmacol* 696:166-171
- MENARD MP, COUSINS RJ (1983)** Zinc transport by brush border membrane vesicles from rat intestine. *J Nutr* 113:1434-1442

- MILATZ S, KRUG SM, ROSENTHAL R, GÜNZEL D, MÜLLER D, SCHULZKE JD, AMASHEH S, FROMM M (2010)** Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. *Biochim Biophys Acta* 1798:2048-2057
- MILLER BG, NEWBY TJ, STOKES CR, BOURNE FJ (1984)** Influence of diet on postweaning malabsorption and diarrhoea in the pig. *Res Vet Sci* 36:187-193
- MINETA K, YAMAMOTO Y, YAMAZAKI Y, TANAKA H, TADA Y, SAITO K, TAMURA A, IGARASHI M, ENDO T, TAKEUCHI K, TSUKITA S (2011)** Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett* 585:606-612
- MOON HW, KEMENY LJ, LAMBERT G, STARK SL, BOOTH GD (1975)** Age-dependent resistance to transmissible gastroenteritis of swine. III. Effects of epithelial cell kinetics on coronavirus production and on atrophy of intestinal villi. *Vet Pathol* 12:434-445
- MOON HW, NORMAN JO, LAMBERT G (1973)** Age dependent resistance to transmissible gastroenteritis of swine (TGE). I. Clinical signs and some mucosal dimensions in small intestine. *Can J Comp Med* 37:157-166
- MORK C, VAN DEURS B, PETERSEN OW (1990)** Regulation of vimentin expression in cultured human mammary epithelial cells. *Differentiation* 43:146-156
- MÜLLER J, PFAFFL MW (2012)** Synergetic downregulation of 67 kDa laminin receptor by the green tea (*Camellia sinensis*) secondary plant compound epigallocatechin gallate: a new gateway in metastasis prevention? *BMC Complement Altern Med* 12:258
- MUZA-MOONS MM, SCHNEEBERGER EE, HECHT GA (2004)** Enteropathogenic *Escherichia coli* infection leads to appearance of aberrant tight junctions strands in the lateral membrane of intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol* 6:783-793
- NAVA P, LOPEZ S, ARIAS CF, ISLAS S, GONZALEZ-MARISCAL L (2004)** The rotavirus surface protein VP8 modulates the gate and fence function of tight junctions in epithelial cells. *J Cell Sci* 117:5509-5519
- NIELSEN FH (2012)** History of zinc in agriculture. *Adv Nutr* 3:783-789
- NISSEN L, CHINGWARU W, SGORBATI B, BIAVATI B, CENCIC A (2009)** Gut health promoting activity of new putative probiotic/protective *Lactobacillus* spp. strains: a functional study in the small intestinal cell model. *Int J Food Microbiol* 135:288-294
- NOSSOL C, DIESING AK, WALK N, FABER-ZUSCHRATTER H, HARTIG R, POST A, KLUSS J, ROTHKÖTTER HJ, KAHLERT S (2011)** Air-liquid interface cultures enhance the oxygen supply and trigger the structural and functional differentiation of intestinal porcine epithelial cells (IPEC). *Histochem Cell Biol* 136:103-115
- OU D, LI D, CAO Y, LI X, YIN J, QIAO S, WU G (2007)** Dietary supplementation with zinc oxide decreases expression of the stem cell factor in the small intestine of weanling pigs. *J Nutr Biochem* 18:820-826
- PENSAERT M, HAELTERMAN EO, BURNSTEIN T (1970a)** Transmissible Gastroenteritis of Swine: Virus-intestinal Cell Interactions. I. Immunofluorescence, histopathology and virus production in the small intestine through the course of infection. *Arch Gesamte Virusforsch* 31:321-334
- PENSAERT M, HAELTERMAN EO, HINSMAN EJ (1970b)** Transmissible gastroenteritis of swine: Virus-intestinal cell interactions. II. Electron microscopy of the epithelium in isolated jejunal loops. *Arch Gesamte Virusforsch* 31:335-351

- PETTO C, LESKO S, GÄBEL G, BOTTNER M, WEDEL T, KACZA J, PFANNKUCHE H (2011)** Establishment and characterization of porcine colonic epithelial cells grown in primary culture. *Cells Tissues Organs* 194:457-468
- PIÉ S, LALLÈS JP, BLAZY F, LAFFITTE J, SÈVE B, OSWALD IP (2004)** Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *J Nutr* 134:641-647
- PIECZYNSKI J, MARGOLIS B (2011)** Protein complexes that control renal epithelial polarity. *Am J Physiol Renal Physiol* 300:F589-601
- PLAYER MR, TORRENCE PF (1998)** The 2-5A system: modulation of viral and cellular processes through acceleration of RNA degradation. *Pharmacol Ther* 78:55-113
- PLUSKE JR (2013)** Feed- and feed additives-related aspects of gut health and development in weanling pigs. *J Anim Sci Biotechnol* 4:[Epub ahead of print, doi 10.1186/2049-1891-1184-1181]
- PLUSKE JR, HAMPSON DJ, WILLIAMS IH (1997)** Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livest Prod Sci* 51:215-236
- POTTEN CS, LOEFFLER M (1990)** Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110:1001-1020
- QUARONI A, WANDS J, TRELSTAD RL, ISSELBACHER KJ (1979)** Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. *J Cell Biol* 80:248-265
- RAFFANIELLO RD, LEE SY, TEICHBERG S, WAPNIR RA (1992)** Distinct mechanisms of zinc uptake at the apical and basolateral membranes of caco-2 cells. *J Cell Physiol* 152:356-361
- RASSCHAERT K, DEVRIENDT B, FAVOREEL H, GODDEERIS BM, COX E (2010)** Clathrin-mediated endocytosis and transcytosis of enterotoxigenic *Escherichia coli* F4 fimbriae in porcine intestinal epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol* 137:243-250
- REN X, MENG F, YIN J, LI G, LI X, WANG C, HERRLER G (2011)** Action mechanisms of lithium chloride on cell infection by transmissible gastroenteritis coronavirus. *PLoS One* 6:e18669
- RICHTER JF, PIEPER R, ZAKRZEWSKI SS, GÜNZEL D, SCHULZKE JD, VAN KESSEL AG (2013)** Diets high in fermentable protein and fibre alter tight junction protein composition with minor effects on barrier function in piglet colon. *Br J Nutr* [Epub ahead of print, doi 10.1017/S0007114513003498]
- RIFFAULT S, CARRAT C, VAN REETH K, PENZAERT M, CHARLEY B (2001)** Interferon-alpha-producing cells are localized in gut-associated lymphoid tissues in transmissible gastroenteritis virus (TGEV) infected piglets. *Vet Res* 32:71-79
- RÖDER PV, GEILLINGER KE, ZIETEK TS, DANIEL H (2013)** Intestinal GLUT2 trafficking to the apical membrane in mice. *J Physiol Biochem* 69:672 (Congress Abstract)
- RODGERS LS, FANNING AS (2011)** Regulation of epithelial permeability by the actin cytoskeleton. *Cytoskeleton (Hoboken)* 68:653-660
- ROSELLI M, FINAMORE A, GARAGUSO I, BRITTI MS, MENGHERI E (2003)** Zinc oxide protects cultured enterocytes from the damage induced by *Escherichia coli*. *J Nutr* 133:4077-4082

- ROSENTHAL R, MILATZ S, KRUG SM, OELRICH B, SCHULZKE JD, AMASHEH S, GÜNZEL D, FROMM M (2010)** Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J Cell Sci* 123:1913-1921
- RUSCH L, ZHOU A, SILVERMAN RH (2000)** Caspase-dependent apoptosis by 2',5'-oligoadenylate activation of RNase L is enhanced by IFN-beta. *J Interferon Cytokine Res* 20:1091-1100
- RUSU D, LORET S, PEULEN O, MAINIL J, DANDRIFOSSE G (2005)** Immunochemical, biomolecular and biochemical characterization of bovine epithelial intestinal primocultures. *BMC Cell Biol* 6:42
- SAWADA N (2013)** Tight junction-related human diseases. *Pathol Int* 63:1-12
- SHELL TC, KORNEGAY ET (1996)** Zinc concentration in tissues and performance of weanling pigs fed pharmacological levels of zinc from ZnO, Zn-methionine, Zn-lysine, or ZnSO₄. *J Anim Sci* 74:1584-1593
- SCHIERACK P, NORDHOFF M, POLLMANN M, WEYRAUCH KD, AMASHEH S, LODEMANN U, JORES J, TACHU B, KLETA S, BLIKSLAGER A, TEDIN K, WIELER LH (2006)** Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochem Cell Biol* 125:293-305
- SCHIFFERDECKER E, FRÖMTER E (1978)** The AC impedance of Necturus gallbladder epithelium. *Pflügers Arch* 377:125-133
- SCHMID T, BOGDAN M, GÜNZEL D (2013)** Discerning apical and basolateral properties of HT-29/B6 and IPEC-J2 cell layers by impedance spectroscopy, mathematical modeling and machine learning. *PLoS One* 8:e62913
- SCHMIDT LD, KOHRT LJ, BROWN DR (2008)** Comparison of growth phase on Salmonella enterica serovar Typhimurium invasion in an epithelial cell line (IPEC J2) and mucosal explants from porcine small intestine. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 31:63-69
- SCHULTZ SG (1972)** Electrical potential differences and electromotive forces in epithelial tissues. *J Gen Physiol* 59:794-798
- SEWEKOW E, BIMCZOK D, KAHNE T, FABER-ZUSCHRATTER H, KESSLER LC, SEIDEL-MORGENSTERN A, ROTHKOTTER HJ (2012)** The major soyabean allergen P34 resists proteolysis in vitro and is transported through intestinal epithelial cells by a caveolae-mediated mechanism. *Br J Nutr* 108:1603-1611
- SHEPHERD RW, GALL DG, BUTLER DG, HAMILTON JR (1979)** Determinants of diarrhea in viral enteritis. The role of ion transport and epithelial changes in the ileum in transmissible gastroenteritis in piglets. *Gastroenterology* 76:20-24
- SKJOLAAS KA, BURKEY TE, DRITZ SS, MINTON JE (2007)** Effects of Salmonella enterica serovar Typhimurium, or serovar Choleraesuis, Lactobacillus reuteri and Bacillus licheniformis on chemokine and cytokine expression in the swine jejunal epithelial cell line, IPEC-J2. *Vet Immunol Immunopathol* 115:299-308
- SMITH F, CLARK JE, OVERMAN BL, TOZEL CC, HUANG JH, RIVIER JE, BLIKSLAGER AT, MOESER AJ (2010)** Early weaning stress impairs development of mucosal barrier function in the porcine intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298:G352-363

- SONODA N, FURUSE M, SASAKI H, YONEMURA S, KATAHIRA J, HORIGUCHI Y, TSUKITA S (1999)** Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J Cell Biol* 147:195-204
- SPREEUWENBERG MA, VERDONK JM, GASKINS HR, VERSTEGEN MW (2001)** Small intestine epithelial barrier function is compromised in pigs with low feed intake at weaning. *J Nutr* 131:1520-1527
- STARKE IC, PIEPER R, NEUMANN K, ZENTEK J, VAHJEN W (2013a)** The impact of high dietary zinc oxide on the development of the intestinal microbiota in weaned piglets. *FEMS Microbiol Ecol* [Epub ahead of print, doi 10.1111/1574-6941.12233]
- STARKE IC, ZENTEK J, VAHJEN W (2013b)** Ex vivo-growth response of porcine small intestinal bacterial communities to pharmacological doses of dietary zinc oxide. *PLoS One* 8:e56405
- STEVENSON BR, ANDERSON JM, GOODENOUGH DA, MOOSEKER MS (1988)** Tight junction structure and ZO-1 content are identical in two strains of Madin-Darby canine kidney cells which differ in transepithelial resistance. *J Cell Biol* 107:2401-2408
- STOLL LL, SPECTOR AA (1984)** Changes in serum influence the fatty acid composition of established cell lines. *In Vitro* 20:732-738
- STRAND TA, ADHIKARI RK, CHANDYO RK, SHARMA PR, SOMMERFELT H (2004)** Predictors of plasma zinc concentrations in children with acute diarrhea. *Am J Clin Nutr* 79:451-456
- STUMPF F, GEORGI MI, MUNDHENK L, RABBANI I, FROMM M, MARTENS H, GÜNZEL D (2011)** Sheep rumen and omasum primary cultures and source epithelia: barrier function aligns with expression of tight junction proteins. *J Exp Biol* 214:2871-2882
- TAMURA A, HAYASHI H, IMASATO M, YAMAZAKI Y, HAGIWARA A, WADA M, NODA T, WATANABE M, SUZUKI Y, TSUKITA S (2011)** Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na⁺ deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine. *Gastroenterology* 140:913-923
- TE VELTHUIS AJ, VAN DEN WORM SH, SIMS AC, BARIC RS, SNIJDER EJ, VAN HEMERT MJ (2010)** Zn²⁺ inhibits coronavirus and arterivirus RNA polymerase activity in vitro and zinc ionophores block the replication of these viruses in cell culture. *PLoS Pathog* 6:e1001176
- TEOH KT, SIU YL, CHAN WL, SCHLUTER MA, LIU CJ, PEIRIS JS, BRUZZONE R, MARGOLIS B, NAL B (2010)** The SARS coronavirus E protein interacts with PALS1 and alters tight junction formation and epithelial morphogenesis. *Mol Biol Cell* 21:3838-3852
- THAKE DC (1968)** Jejunal epithelium in transmissible gastroenteritis of swine. An electron microscopic and histochemical study. *Am J Pathol* 53:149-168
- THAKE DC, MOON HW, LAMBERT G (1973)** Epithelial cell dynamics in transmissible gastroenteritis of neonatal pigs. *Vet Pathol* 10:330-341
- THAPAR N, SANDERSON IR (2004)** Diarrhoea in children: an interface between developing and developed countries. *Lancet* 363:641-653
- THIAGARAJAH JR, VERKMAN AS (2012)** CFTR inhibitors for treating diarrheal disease. *Clin Pharmacol Ther* 92:287-290
- TRUONG-TRAN AQ, CARTER J, RUFFIN RE, ZALEWSKI PD (2001)** The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death. *Biomaterials* 14:315-330

- TSUKITA S, FURUSE M, ITOH M (2001)** Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:285-293
- TUERK MJ, FAZEL N (2009)** Zinc deficiency. *Curr Opin Gastroenterol* 25:136-143
- USSING HH, ZERAHN K (1951)** Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 23:110-127
- VAN ITALLIE C, RAHNER C, ANDERSON JM (2001)** Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest* 107:1319-1327
- VAN ITALLIE CM, HOLMES J, BRIDGES A, GOOKIN JL, COCCARO MR, PROCTOR W, COLEGIO OR, ANDERSON JM (2008)** The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2. *J Cell Sci* 121:298-305
- VAN ITALLIE CM, ROGAN S, YU A, VIDAL LS, HOLMES J, ANDERSON JM (2006)** Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities. *Am J Physiol Renal Physiol* 291:F1288-1299
- VELDHUIZEN EJ, KOOMEN I, ULTEE T, VAN DIJK A, HAAGSMAN HP (2009)** Salmonella serovar specific upregulation of porcine defensins 1 and 2 in a jejunal epithelial cell line. *Vet Microbiol* 136:69-75
- WADA M, TAMURA A, TAKAHASHI N, TSUKITA S (2013)** Loss of Claudins 2 and 15 From Mice Causes Defects in Paracellular Na⁺ Flow and Nutrient Transport in Gut and Leads to Death from Malnutrition. *Gastroenterology* 144:369-380
- WANG EC, LEE JM, JOHNSON JP, KLEYMAN TR, BRIDGES R, APODACA G (2003)** Hydrostatic pressure-regulated ion transport in bladder uroepithelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F651-663
- WANG K, ZHOU B, KUO YM, ZEMANSKY J, GITSCHER J (2002)** A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica. *Am J Hum Genet* 71:66-73
- WANG X, VALENZANO MC, MERCADO JM, ZURBACH EP, FLOUNDERS CJ, MULLIN JM (2013a)** Zinc enhancement of LLC-PK renal epithelial barrier function. *Clin Nutr* [Epub ahead of print, doi 10.1016/j.clnu.2013.05.001]
- WANG X, VALENZANO MC, MERCADO JM, ZURBACH EP, MULLIN JM (2013b)** Zinc supplementation modifies tight junctions and alters barrier function of CACO-2 human intestinal epithelial layers. *Dig Dis Sci* 58:77-87
- WAPNIR RA (2000)** Zinc deficiency, malnutrition and the gastrointestinal tract. *J Nutr* 130:1388S-1392S
- WAPNIR RA, KHANI DE, BAYNE MA, LIFSHITZ F (1983)** Absorption of zinc by the rat ileum: effects of histidine and other low-molecular-weight ligands. *J Nutr* 113:1346-1354
- WAPNIR RA, TEICHBERG S (2002)** Regulation mechanisms of intestinal secretion: implications in nutrient absorption. *J Nutr Biochem* 13:190-199
- WEI Z, BURWINKEL M, PALISSA C, EPHRAIM E, SCHMIDT MF (2012)** Antiviral activity of zinc salts against transmissible gastroenteritis virus in vitro. *Vet Microbiol* 160:468-472
- WEISS SR, NAVAS-MARTIN S (2005)** Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol Mol Biol Rev* 69:635-664

- WEITZEL G (1956)** Chemie und Physiologie biogener Zink-Verbindungen. *Angewandte Chemie* 68:566-573
- WENG XH, BEYENBACH KW, QUARONI A (2005)** Cultured monolayers of the dog jejunum with the structural and functional properties resembling the normal epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288:G705-717
- WHO, UNICEF (2004)** WHO/unicef joint statement: clinical management of acute diarrhoea. Geneva, Switzerland:1-8
- WILLIAMSON G (2013)** Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. *Mol Nutr Food Res* 57:48-57
- WISEMAN S, BUGIS S, MACFARLANE J (2007)** Jejunal adenoma presenting with gastrointestinal bleeding. *Can J Surg* 50:223-224
- WRIGHT EM, LOO DD, HIRAYAMA BA (2011)** Biology of human sodium glucose transporters. *Physiol Rev* 91:733-794
- YU AS, CHENG MH, COALSON RD (2010)** Calcium inhibits paracellular sodium conductance through claudin-2 by competitive binding. *J Biol Chem* 285:37060-37069
- YU AS, MCCARTHY KM, FRANCIS SA, MCCORMACK JM, LAI J, ROGERS RA, LYNCH RD, SCHNEEBERGER EE (2005)** Knockdown of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 288:C1231-1241
- ZAKRZEWSKI SS, RICHTER JF, KRUG SM, JEBAUTZKE B, LEE IF, RIEGER J, SACHTLEBEN M, BONDZIO A, SCHULZKE JD, FROMM M, GÜNZEL D (2013a)** Improved Cell Line IPEC-J2, Characterized as a Model for Porcine Jejunal Epithelium. *PLoS One* 8:e79643
- ZAKRZEWSKI SS, SCHULZKE JD, KRÄMER C, FROMM M, ZENTEK J, GÜNZEL D (2013b)** Apple polyphenol-enriched diet causes claudin-15 upregulation in piglet jejunum. *J Physiol Biochem* 69:656 (Congress Abstract)
- ZEMANN N, ZEMANN A, KLEIN P, ELMADFA I, HUETTINGER M (2011)** Differentiation- and polarization-dependent zinc tolerance in Caco-2 cells. *Eur J Nutr* 50:379-386
- ZHANG B, GUO Y (2009)** Supplemental zinc reduced intestinal permeability by enhancing occludin and zonula occludens protein-1 (ZO-1) expression in weaning piglets. *Br J Nutr* 102:687-693
- ZHANG K, LIU Y, SHANG Y, ZHENG H, GUO J, TIAN H, JIN Y, HE J, LIU X (2012)** Analysis of pig serum proteins based on shotgun liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *African Journal of Biotechnology* 11:12118-12127
- ZHENG Y, SCOW JS, DUENES JA, SARR MG (2012)** Mechanisms of glucose uptake in intestinal cell lines: role of GLUT2. *Surgery* 151:13-25
- ZHOU C, LIU Z, LIU Y, FU W, DING X, LIU J, YU Y, ZHANG Q (2013)** Gene silencing of porcine MUC13 and ITGB5: candidate genes towards Escherichia coli F4ac adhesion. *PLoS One* 8:e70303

9 ANHANG

Abkürzungsverzeichnis

3Rs	<i>Replacement, Reduction, Refinement</i>
Abb.	Abbildung
ABS	adultes Rinderserum, engl. <i>adult bovine serum</i>
ALI	engl. <i>air liquid interface</i>
ap	apikal
APS	Ammoniumpersulfat
bl	basolateral
BSA	Rinderserumalbumin, engl. <i>bovine serum albumin</i>
Ca	Calcium
CaCC	engl. <i>calcium-activated chloride channel</i>
cAMP	engl. <i>cyclic adenosine monophosphate</i>
CAR	Coxsackie- und Adenovirus-Rezeptor
CBF	Campus Benjamin Franklin
cDNA	engl. <i>copy DNA</i>
C ^{epi}	epitheliale Kapazität, engl. <i>epithelial capacitance</i>
CFTR	engl. <i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
cGMP	engl. <i>cyclic guanosine monophosphate</i>
Cl	Chlor
Cldn	Claudin
CRC	engl. <i>collaborative research center</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DMEM	engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	Dithiotreitol
E-cad	E-cadherin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	engl. <i>epidermal growth factor</i>
EGTA	Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure
FBS	Rinderserum, engl. <i>fetal bovine serum</i>
FD4	FITC-Dextran 4000

FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FLU	Fluoreszein
Frc	Fruktose
FSK	Forskolin
Gal	Galaktose
Glc	Glukose
GLUT	engl. <i>glucose transporter</i>
GS	Ziegenserum, engl. <i>goat serum</i>
H&E	Hämatoxylin & Eosin
HA	gemischte Zelluloseester
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure
IEC	engl. <i>intestinal epithelial cells from rat</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPEC-1	engl. <i>intestinal porcine epithelial cells from jejunum and ileum</i>
IPEC-J2	engl. <i>intestinal porcine epithelial cells from jejunum</i>
I _{sc}	Kurzschlussstrom, engl. <i>short-circuit current</i>
ITS	Insulin/Transferrin/Selenium
JAM	junctionales Adhäsionsmolekül
K	Kalium
La	Lanthan
LaGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales
LDH	Laktatdehydrogenase
LSM	Laser-Scanning Mikroskop
MDCK	engl. <i>Madin-Darby canine kidney</i>
Mg	Magnesium
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
MW	Mittelwert
Na	Natrium
NaAc	Natriumacetat-Trihydrat
NaCl	Natriumchlorid
NKCC1	engl. <i>sodium potassium chloride cotransporter 1</i>
OAS	Oligoadenylatsynthetase
Occl	Occludin
ORCC	engl. <i>outwardly rectifying chloride channel</i>
P	Permeabilität

PAS	engl. <i>periodic acid-Schiff</i>
PBS ^{+Ca/Mg}	engl. <i>phosphate-buffered saline with calcium and magnesium</i>
PBS ^{-Ca/Mg}	engl. <i>phosphate-buffered saline without calcium and magnesium</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PDZ	PSD95/Disc large/ZO-1
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PS	Schweineserum, engl. <i>porcine serum</i>
PSI	engl. <i>porcine small intestinal cells</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R ^{epi}	epithelialer Widerstand, engl. <i>epithelial resistance</i>
rFE	relative Fluoreszenzeinheiten
RNA	Ribonukleinsäure, engl. <i>ribonucleic acid</i>
R ^{para}	parazellulärer Widerstand, engl. <i>paracellular resistance</i>
RT	Raumtemperatur
R ^{trans}	transzellulärer Widerstand, engl. <i>transcellular resistance</i>
SARS	schweres akutes respiratorisches Syndrom
SDS	Natriumdodecylsulfat, engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	engl. <i>standard error of the mean</i>
SFB	Sonderforschungsbereich
SGLT1	engl. <i>sodium glucose transporter 1</i>
Tab.	Tabelle
TAMP	TJ-assoziierte MARVEL-Proteine
TEA	Tetraethylammonium
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TER	transepithelialer Widerstand, engl. <i>transepithelial resistance</i>
TGEV	engl. <i>transmissible gastroenteritis virus</i>
TJ	Tight Junction
TNF	Tumornekrosefaktor
Tric-a	Tricellulin-a
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
Vim	Vimentin
WST-1	engl. <i>water-soluble tetrazolium</i>
x ^{korr}	flächenkorrigierter Parameter x
Zip	engl. <i>Zrt- and Irt-like protein</i>

Zn	Zink
ZnAc	Zinkacetat-Dihydrat
Zn ^H	Diät mit hohem Zinkgehalt
Zn ^K	Diät mit Basis-Zinkgehalt
Zn ^M	Diät mit mittlerem Zinkgehalt
ZnO	Zinkoxid
ZnT	Zinktransporter
ZO	lat. <i>Zonula occludens</i>
Δ	Differenz

Physikalische Größen des Internationalen Einheitensystems sind nicht extra angegeben.

Publikationen

Originalarbeiten

- **TWARDZIOK SO, PIEPER R, ASCHENBACH JR, BEDNORZ C, BROCKMANN G, FROMM M, KLINGSPOR S, KREUZER S, LODEMANN U, MARTENS H, MARTIN L, RICHTER JF, SCHAREK-TEDIN L, STARKE IC, SIEPERT B, TEDIN K, VAHJEN W, WIELER L, ZAKRZEWSKI SS, ZENTEK J, WREDE P (2014).** Cross-talk between host, microbiome and probiotics: A systems biology approach for analyzing the effects of probiotic *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 in piglets. Mol Inf (accepted 06.01.2014)
- **ZAKRZEWSKI SS, RICHTER JF, KRUG SM, JEBAUTZKE B, LEE IM, RIEGER J, SACHTLEBEN M, BONDZIO A, SCHULZKE JD, FROMM M, GÜNZEL D (2013).** Improved cell line IPEC-J2, characterized as a model for porcine jejunal epithelium. PLoS one 8(11):e79643
- **RICHTER JF, PIEPER R, ZAKRZEWSKI SS, GÜNZEL D, SCHULZKE JD, VAN KESSEL AG (2013).** Diets high in fermentable protein and fibre alter tight junction protein composition with minor effect on barrier function in piglet colon. Br J Nutr [Epub ahead of print, doi 10.1017/S0007114513003498]:1-10
- **BRATZ K, BÜCKER R, GÖLZ G, ZAKRZEWSKI SS, JANCZYK P, NÖCKLER K, ALTER T (2012).** Experimental infection of weaned piglets with *Campylobacter coli* – excretion and translocation in a pig colonisation trial. Vet Microbiol 162(1):136-142
- **HINZ J, LEHNHARDT L, ZAKRZEWSKI S, ZHANG G, IGNATOVA Z (2012).** Polyglutamine expansion alters the dynamics and molecular architecture of aggregates in dentatorubropallidolusian atrophy. J Biol Chem 287(3):2068-2078
- **GÜNZEL D, ZAKRZEWSKI SS, SCHMID T, PANGALOS M, WIEDENHOEFT J, BLASSE C, OZBODA C, KRUG SM (2012).** From TER to trans- and paracellular resistance: Lessons from impedance spectroscopy. Ann N Y Acad Sci 1257:142-151
- **CHAI W, ZAKRZEWSKI SS, GÜNZEL D, PIEPER R, WANG Z, TWARDZIOK S, JANCZYK P, OSTERRIEDER N, BURWINKEL M (submitted).** High-dose dietary zinc oxide mitigates infection with transmissible gastroenteritis virus in piglets. BMC Vet Res, submitted 2013-09-27

Tagungsbeiträge

Vorträge

- *25th Meeting of the European Intestinal Transport Group (EITG), 11.-14.04.2013, Bad Herrenalb, Deutschland*
ZAKRZEWSKI SS, SCHULZKE JD, KRÄMER C, FROMM M, ZENTEK J, GÜNZEL D. Apple polyphenol-enriched diet causes claudin-15 upregulation in piglet jejunum. J Physiol Biochem 69:656 (Congress Abstract)
- *12th International Symposium on Digestive Physiology of Pigs (DPP), 29.05.-01.06.2012, Keystone, Colorado (USA)*
ZAKRZEWSKI SS, RICHTER JF, KRUG SM, LEE IM, JEBAUTZKE B, SACTLEBEN M, SCHULZKE JD, FROMM M, GÜNZEL D. Cell line IPEC-J2 develops properties of porcine jejunum if cultured under optimized conditions. (Poster zusätzlich als Vortrag ausgewählt)
- *3rd SFB 852 Mini Symposium, 27.-28.04.2012, Berlin, Deutschland*
ZAKRZEWSKI SS, RICHTER JF, KRUG SM, LEE IM, SACTLEBEN M, SCHULZKE JD, FROMM M, GÜNZEL D. IPEC-J2 develop properties of porcine jejunum if cultured species-specifically.
- *Arbeitsgruppentreffen „Transport und Barriere“ der DGVS (Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten) 2012, 30.-31.03.2012, Lohrbach, Deutschland*
ZAKRZEWSKI SS, RICHTER JF, SACTLEBEN M, SCHULZKE JD, GÜNZEL D, FROMM M. Influence of dietary zinc supplementation on intestinal barrier function in weaned piglets & IPEC-J2.
- *2nd SFB 852 Workshop, 27.-28.10.2011, Berlin, Deutschland*
ZAKRZEWSKI SS, RICHTER JF, SCHULZKE JD, FROMM M, GÜNZEL D. Establishing a model for paracellular intestinal barrier function using porcine intestinal epithelial cells: part 2.
- *2nd SFB 852 Mini Symposium, 02.05.2011, Berlin, Deutschland*
ZAKRZEWSKI SS, SCHULZKE JD, FROMM M, RICHTER JF. Establishing a model for paracellular intestinal barrier function using porcine intestinal epithelial cells: part 1.

Posterpräsentationen

- *1st International Workshop on Nutrition and Intestinal Microbiota-Host Interaction in the Pig*, 24.-25.10.2013, Berlin, Deutschland
ZAKRZEWSKI SS, RICHTER FJ, KRUG SM, RIEGER J, BONDZIO A, SCHULZKE JD, FROMM M, GÜNZEL D. Improved cell line IPEC-J2, a model for porcine jejunal epithelium.
- *12th International Symposium on Digestive Physiology of Pigs (DPP)*, 29.05.-01.06.2012, Keystone, Colorado (USA)
ZAKRZEWSKI SS, RICHTER JF, KRUG SM, LEE IM, JEBAUTZKE B, SACTLEBEN M, SCHULZKE JD, FROMM M, GÜNZEL D. Cell line IPEC-J2 develops properties of porcine jejunum if cultured under optimized conditions.
- *66. Tagung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE)*, 20.-22.03.2012, Göttingen, Deutschland
ZAKRZEWSKI SS, RICHTER JF, SCHULZKE JD, FROMM M. Influence of dietary zinc supplementation on intestinal barrier function in weaned piglets.
Proc Soc Nutr Physiol 21:127 (Congress Abstract)
- *24th Meeting of the European Intestinal Transport Group (EITG)*, 04.-07.09.2011, Oxford, Großbritannien
ZAKRZEWSKI SS, PANGALOS MA, SCHULZKE JD, FROMM M, RICHTER JF. Barrier and transport characteristics of IPEC-J2, a cell line of pig small intestinal origin.
Genes Nutr 6:76 (Congress Abstract)

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau **Priv.-Doz. Dr. Dorothee Günzel**, die es mir ermöglichte, diese spannende und abwechslungsreiche Arbeit im Rahmen des DFG-geförderten SFB 852 am Institut für Klinische Physiologie (Charité – Universitätsmedizin Berlin, CBF) durchzuführen und abzuschließen. Dies wurde nicht zuletzt durch ihre überaus engagierte und herzliche Betreuung, ihre vielen wertvollen Ratschläge und ihre spontane Unterstützung in Sachen „Schweine-SFB“ enorm vorangetrieben.

Bei Herrn **Prof. Dr. Matthias F. Melzig** (Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin) möchte ich mich für seine freundliche Bereitschaft bedanken, diese Arbeit zu begutachten.

Herrn **Prof. Dr. Michael Fromm** (Institut für Klinische Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, CBF) danke ich ganz besonders für sein in mich gesetztes Vertrauen und seine jederzeitige Ansprechbarkeit und Unterstützung. Ferner bedanke ich mich bei ihm für die Durchsicht dieser Dissertation.

Herrn **Prof. Dr. Jörg-Dieter Schulzke** (Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin, CBF) danke ich für sein stetes Interesse an meiner Arbeit und das im-Blick-Haben immer weiterer Möglichkeiten und Alternativen.

Dr. Jan F. Richter bin ich für seine anfängliche Betreuung sowie für die umfassende Einarbeitung in die experimentelle Planung und Projektdurchführung sehr dankbar, genauso wie für die Einführung in die Welt der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie.

Anja Fromm und **In-Fah M. Lee** gebührt mein Dank für ihre tatkräftige und verlässliche Hilfe an „Schweinetagen“. Ebenso danke ich **Dr. Roland Bücken** für seine Unterstützung, wenn es um den koordinierten Transport der Schweinedärme ins Labor ging. Des Weiteren gehört mein Dank **Anja Fromm** für ihre Unterstützung bei der Ein-Wege-Impedanzspektroskopie sowie für ihre Hilfe bei der morphometrischen Vermessung von Gewebeschnitten. **Britta Jebautzke** spreche ich meinen Dank für ihre Geduld und helfenden Hände beim Western Blotting und der Gewebeaufarbeitung aus. **In-Fah M. Lee** sei für ihre Künste beim Gefrierbruch und der Elektronenmikroskopie gedankt. Bei **Dr. Susanne M. Krug** möchte ich mich für ihre Unterstützung bei der Auswertung von Gefrierbruch- sowie Impedanzdaten bedanken, genauso wie bei **Priv.-Doz. Dr. Dorothee Günzel**, die mir bei Letzterem ebenfalls zur Seite stand. Ging es um technische Probleme jeglicher Art, hat oft schon die Anwesenheit von **Ing. grad. Detlef Sorgenfrei** dazu beigetragen, diese zu beheben. Ein herzliches Dankeschön für eure großartige Unterstützung!

Priv.-Doz. Dr. Rita Rosenthal, Britta Jebautzke, Julia Lüttig und **Claudia May** danke ich von Herzen für ihre nette Nachbarschaft im „Ecklaboralltag“ sowie die mentale Unterstützung und aufbauenden Worte in besonders arbeitsintensiven Zeiten.

Mein außerordentlicher Dank gilt zudem **ALLEN Mitarbeitern** der Labore Klinische Physiologie & Gastroenterologie für ihre ungeheure Hilfsbereitschaft und das familiäre Arbeitsklima.

Bei **Dr. Angelika Bondzio** (Institut für Veterinär-Biochemie, Freie Universität Berlin) und **Monika Sachtleben** (Institut für Veterinär-Anatomie, Freie Universität Berlin) bedanke ich mich für ihre SFB 852-interne Kooperation. Darüber hinaus gilt mein Dank auch **Ping Liu** (Institut für Tierernährung, Freie Universität Berlin), **Dr. Robert Pieper** (Institut für Tierernährung, Freie Universität Berlin) und **Juliane Rieger** (Institut für Veterinär-Anatomie, Freie Universität Berlin) für die SFB 852-intern zu Verfügung gestellten Daten.

Dem **SFB 852** möchte ich für die vielfältigen Möglichkeiten und die abwechslungsreiche Zeit im Graduiertenkolleg „*Biology of Nutrition*“ danken sowie für die erfolgreiche Kooperation bei der Umsetzung von Publikationen.

Des Weiteren danke ich sowohl dem **SFB 852** als auch der **Sonnenfeld-Stiftung** für die finanzielle Förderung zu Beginn meines Promotionsvorhabens.

Mein allergrößter Dank aber gilt meinen **Eltern**, die mich jederzeit unterstützen und auf die ich mich blind verlassen kann. Ebenso sehr danke ich meinen **Freunden** für ihr Interesse und ihre große Unterstützung in allen Phasen meiner Promotionsforschung.