

Der Hedgehog Signalweg und dessen Regulation durch microRNAs in der postnatalen Darmentwicklung des Schweins

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

Diplom Biologe
Marc Bohmer

aus Berlin

2014

Die vorliegende Doktorarbeit wurde im Zeitraum vom 01.03.2010 bis 01.01.2014 an der Freien Universität Berlin, im Institut für Veterinär-Biochemie, Arbeitsgruppe Sharbati bei Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am 12.05.2014

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. microRNAs (miRNAs)	1
1.1.1. miRNAs in der postnatalen Darmentwicklung	2
1.1.2. Die miRNA-Familie miR-15a/15b/16/195/424/497	3
1.2. Der Hedgehog Signalweg	4
1.3. Postnatale Darmentwicklung beim Schwein	6
1.3.1. Salmonelleninfektion im porzinen Intestinaltrakt	7
1.4. Ziel dieser Studie	8
2. Material & Methoden	9
2.1. Bioinformatische Hilfsprogramme	9
2.2. Probenmaterial für porzine Gewebeproben	9
2.3. Molekularbiologische Methoden	9
2.3.1. RNA Extraktion	9
2.3.2. Polymerasekettenreaktion (PCR) und Primer	10
2.3.3. Agarose-Gelelektrophorese	10
2.3.4. Reverse Transkription	10
2.3.5. Reverse Transkription- quantitative PCR (RT-qPCR) und Arrays	11
2.3.6. miR-Q: miRNA RT-qPCR und Arrays	12
2.3.7. Stem Loop 3' UTR RACE PCR (SLURP)	13
2.3.8. Seed Mutagenesis Assembly PCR (SMAP)	13
2.3.9. Klonierung	15
2.3.10. Herstellung von Reporterplasmiden	15
2.4. Zellkultur	16
2.5. Transfektion	16
2.5.1. HT-29	17
2.5.2. HT-29/B6	17
2.5.3. HeLa	17
2.5.4. miRNA Mimics	17

2.6. Reporter-Gen-Assays	17
2.7. mRNA Degradations-Assay	18
2.8. Protein Isolierung und Western Blot	18
2.9. Immunhistochemie (IHC) zur Detektion von IHH	19
2.10. <i>In situ</i> Hybridisierung (ISH) zur Detektion der miRNA-Familienmitglieder	20
2.11. Statistik	21
3. Ergebnisse	23
3.1. <i>In silico</i> Analysen der Interaktion der miRNA-Familie	
miR-15a/15b/16/195/424/497 mit IHH	23
3.2. Stem Loop 3' UTR RACE PCR (SLURP)	25
3.2.1. Identifikation potentieller miRNA-Zielsequenzen innerhalb der 3' UTR	
von mRNAs durch SLURP	26
3.3. Herstellung von Reporter-Gen-Plasmiden mittels SMAP	29
3.4. Untersuchung der Interaktion von CASP7 und miR-29a durch Reporter-Gen-	
Assays	30
3.5. Analyse der Interaktion der miRNA Familie mit der 3' UTR von IHH mit	
Reporter-Gen-Assays	32
3.5.1. Patched 1 (PTCH1) als weiteres potentielles Zielgen der miRNA-	
Familie	33
3.6. Degradations-Assay zur Analyse der intrinsischen Regulation von IHH	
durch die miRNA-Familie	34
3.7. Langzeit-Kultivierung von HT-29/B6 zur Analyse der IHH-Expression . .	34
3.7.1. Ergebnis der RT-qPCR zur Analyse der IHH-Expression in langzeit-	
kultivierten HT-29/B6 Zellen	35
3.7.2. Ergebnis des Western Blots zur Analyse der IHH-Expression in	
langzeit-kultivierten HT-29/B6 Zellen	36
3.8. IHH in HT-29/B6 Zellen transient transfiziert mit miRNA-Mimics	36
3.9. Expressionsanalyse des Hedgehog Signalwegs im porzinen postnatalen	
Intestinalgewebe durch mRNA RT-qPCR Arrays	37
3.9.1. Der Hedgehog Signalweg in der porzinen postnatalen Darment-	
wicklung (Kolon und Ileum)	37
3.9.2. Der Hedgehog Signalweg in mit Salmonellen infizierten Ferkeln im	
Vergleich zu nicht infizierten Tieren (Kolon und Ileum)	41
3.10. Expressionsanalyse der miR-15 Familie im porzinen postnatalen Kolon	
durch miRNA RT-qPCR Arrays	44

3.11. Lokalisierung der miRNA-Familie im porzinen postnatalen Kolongewebe durch <i>in situ</i> Hybridisierung	45
3.12. Lokalisierung von IHH im porzinen, intestinalen Gewebe durch Immunhistochemie	50
4. Diskussion	55
4.1. Ausblick	65
5. Zusammenfassung	67
6. Summary	69
Literaturverzeichnis	71
Appendix	80
A. Anhang	81
A.1. Abkürzungsverzeichnis	81
A.2. Plasmidkarten	85
A.2.1. Reporter Plasmide	85
A.2.2. Expressionsplasmid	88
A.3. Material	89
A.4. Oligonukleotide	92
A.5. Nukleotidsequenzen	95
A.5.1. DHH 3' UTR	95
A.5.2. SELPLG 3' UTR	95
A.5.3. TGFBR3 3' UTR	96
A.5.4. CASP7 3' UTR	96
A.6. Publikationsliste	97
A.6.1. Publikationen	97
A.6.2. Poster	97
A.7. Danksagung	98
A.8. Selbstständigkeitserklärung	99

Abbildungsverzeichnis

1.1. Vergleich der Sequenzen der miR-15 Familie	4
3.1. Darstellung des Hedgehog Signalwegs (KEGG) mit den potentiellen miRNA-Familien Zielgenen	23
3.2. Interaktion der miRNA-Familie mit der humanen und porzinen IHH 3' UTR im direkten Vergleich	24
3.3. Darstellung des Stem Loop RT Primers und des SLURP-Nested PCR Prinzips	26
3.4. Ergebnis der SLURP für die 3' UTR des porzinen DHH	27
3.5. Ergebnis der SLURP für die 3' UTR des porzinen CASP7	28
3.6. Interaktion der miRNA miR-29a mit der humanen und porzinen CASP7 3' UTR im direkten Vergleich	29
3.7. Schematische Darstellung der SMAP-Methode am Beispiel der CASP7 3' UTR	30
3.8. Reportergen-Assay für beide humane CASP7 Zielsequenzen gegen miRNA-Mimics	31
3.9. Reportergen-Assay für die porzine IHH Zielsequenz gegen miRNA-Mimics	32
3.10. Reportergen-Assay für die humane IHH Zielsequenz gegen miRNA-Mimics	33
3.11. IHH-mRNA Degradations-Assay in HT-29 Zellen	34
3.12. Expression von IHH, SHH und HHAT bei langzeit (22 Tage) kultivierten HT-29/B6	35
3.13. Westernblot von IHH bei langzeit (22 Tage) kultivierten HT-29/B6	36
3.14. Repräsentativer Western Blot für IHH und die Ladekontrolle GAPDH in transfizierten HT-29/B6 Zellen	37
3.15. Auswertung der mRNA RT-qPCR Arrays der Kontrollferkel (Kolon)	38
3.16. Auswertung der mRNA RT-qPCR Arrays der Kontrollferkel (Kolon)	39
3.17. Auswertung der mRNA RT-qPCR Arrays der Kontrollferkel (Ileum)	40
3.18. Auswertung der mRNA RT-qPCR Arrays des Vergleichs von mit <i>Salmonella</i> infizierten sowie Kontrollferkeln (Kolon)	41

3.19. Auswertung der mRNA RT-qPCR Arrays des Vergleichs von mit <i>Salmonella</i> infizierten sowie Kontrollferkeln (Kolon)	42
3.20. Auswertung der mRNA RT-qPCR Arrays des Vergleichs von mit <i>Salmonella</i> infizierten sowie Kontrollferkeln (Ileum)	43
3.21. Auswertung der miRNA RT-qPCR Arrays der Kontrollferkel (Kolon) . . .	44
3.22. Anatomische Nomenklatur für die <i>in situ</i> Hybridisierung	45
3.23. Repräsentative Positivkontrolle sowie Negativkontrolle der ISH im Kolon von 14 Tage alten Ferkeln	46
3.24. ISH von miR-15b im Kolon von 14, 31 und 56 Tage alten Ferkeln	47
3.25. ISH von miR-195 im Kolon von 14, 31 und 56 Tage alten Ferkeln	48
3.26. ISH von miR-497 im Kolon von 14, 31 und 56 Tage alten Ferkeln	49
3.27. Negativkontrolle für die immunhistochemische Detektion von IHH im Kolon von 7 Tage alten Ferkeln	50
3.28. IHH-Detektion in der Tela submucosa bei 14 Tage altem Ferkel	50
3.29. Immunhistochemische Detektion von IHH im Kolon von 7-56 Tagen alten Ferkeln	51
3.30. Immunhistochemische Detektion von IHH im Kolon von 7-28 Tagen alten Ferkeln	52
3.31. Immunhistochemische Detektion von IHH im Kolon von 31-56 Tagen alten Ferkeln	53
4.1. Schematische Darstellung der hypothetischen Verknüpfung der Wnt und Hedgehog Signalkaskade mit Apoptose	65
A.1. pTK-GLuc und pTK-CLuc	85
A.2. pTKGhIHH	86
A.3. pTKGhIHHm	86
A.4. pTKGsIHH	87
A.5. pTKGsIHHm	87
A.6. pMIREX0 und pMIREX_IHH	88

1. Einleitung

1.1. microRNAs (miRNAs)

Die Erstbeschreibung einer miRNA fand im Jahr 1993 anhand von *lin-4* in *Caenorhabditis elegans* statt. MiRNAs sind kurze (~ 20 nt), einzelsträngige RNA-Moleküle, die im Organismus Prozesse wie Entwicklung, Zelldifferenzierung und Proliferation beeinflussen (Lee et al., 1993; Huang et al., 2013; Yu et al., 2013). Sie werden dabei vorerst, ebenso wie messenger RNAs (mRNA), von einer RNA-Polymerase II transkribiert. Die Pri-miRNA wird anschließend durch ein RNase III Enzym namens Drosha zu einem kürzeren RNA-Molekül (Pre-miRNA) prozessiert und aus dem Zellkern geschleust (Lee et al., 2003). Diese Vorläufer RNA wird dann von einer weiteren RNA-Endonuklease (Dicer) geschnitten, wodurch ein 20-25 Basenpaar (bp) langes Doppelstrang-RNA-Molekül entsteht (Hutvágner et al., 2001). Die beiden Stränge werden dabei unterteilt in den 5' nahen und den 3' nahen Strang (5p oder 3p). Einer dieser Stränge wird präferiert, während der zweite seltener im RNA-Induced-Silencing-Complex (RISC) zu finden ist (Hammond et al., 2000; Martinez et al., 2002; Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). Der RISC ist ein Protein-Komplex aus Proteinen der Argonaut-Familie und weiteren Proteinen, die dazu notwendig sind die Interaktion zwischen der miRNA und seinem Ziel sowohl zu initialisieren als auch zu stabilisieren (Lambert et al., 2011).

Das Ziel einer miRNA ist meist eine komplementäre Sequenz innerhalb der 3' UTR von mRNAs. Hierbei binden die 5'-Nukleotide 2-8 der miRNA, die sogenannte Seed-Sequenz, in der Regel 100%ig komplementär zu der mRNA. Wenn die Bindung ausreichend stabil ist, sind aber auch einzelne Guanin-Uracil Basenpaarungen innerhalb dieser Bindung möglich (Didiano and Hobert, 2006). Der folgende 3'-Bereich der miRNAs ist im Tierreich nicht vollständig komplementär zur mRNA, wodurch sich Schlaufen und Überhänge bilden, die ebenfalls eine wichtige strukturelle Komponente zur erfolgreichen Interaktion der beiden Moleküle darstellen (Ye et al., 2008; Lewis et al., 2005). Im Pflanzenreich ist die komplementäre Bindung der miRNA zur mRNA nicht auf die Seed-Sequenz beschränkt, sondern umfasst beinahe die gesamte miRNA, wodurch bioinformatische Zielgenvorhersagen vereinfacht werden (Rhoades et al., 2002). Die Konsequenz aus dieser

Bindung ist die Inhibierung der Translation oder auch die Degradation der mRNA. Bei beiden Ereignissen bleibt eine Proteinsynthese aus oder wird zumindest reduziert (Lee et al., 1993; Tuschl et al., 1999).

Ein funktionierendes Gleichgewicht zwischen miRNAs und Zielgenen führt somit zu sehr genau regulierten zellulären Prozessen, die wiederum Einfluss auf den gesamten Organismus haben. Auf Grund der Wichtigkeit solcher regulativer Zusammenhänge sind viele miRNAs sowie die Zielsequenzen innerhalb der mRNAs zwischen unterschiedlichen Spezies hoch konserviert. Die Disregulation von Schlüssel-miRNAs und die hieraus resultierende Über- oder Unterrepräsentation von Transkripten und Proteinen kann an unterschiedlichsten Erkrankungen oder auch Fehlbildungen wie Tumorerkrankungen, Alzheimer oder bronchopulmonaler Dysplasie beteiligt sein (Croce, 2009; den Hove et al., 2013; Dong et al., 2012). Waren Anfangs nur einige wenige miRNAs bekannt, so kamen durch größere Sequenzierungskapazitäten schnell immer mehr miRNAs in immer mehr Spezies hinzu. Die genauen Sequenzen der miRNA Vorläufermoleküle, sowie auch der reifen miRNAs, können in Datenbanken wie miRBase jederzeit abgerufen werden (www.mirbase.org) (Griffiths-Jones et al., 2006).

Die Vorhersage von mRNA:miRNA Interaktionen ist mit Hilfe von bioinformatischen Hilfsprogrammen möglich. Hierbei wird auf die bekannten Regel- und Gesetzmäßigkeiten zurückgegriffen. Wie von Alexiou et al. (2009) beschrieben, existiert eine große Fülle an solchen Programmen um *in silico* Vorhersagen zu treffen. Nicht selten ergibt die Suche nach Zielgenen für eine miRNA mehr als 1.000 mögliche Interaktionspartner, vieles davon sind falsch-positive Ergebnisse. Da es sich dabei um ausschließlich mathematische Modelle und Algorithmen handelt, müssen solche Interaktionen zwingend experimentell belegt werden. Ein Schlüsselement, um dieses Ziel zu erreichen, ist die Entwicklung valider biochemischer Methoden.

1.1.1. miRNAs in der postnatalen Darmentwicklung

Eine Beteiligung von miRNAs in der postnatalen Darmentwicklung und späteren Aufrechterhaltung der Homöostase im adulten Intestinaltrakt von Säugetieren wurde bereits in unterschiedlichen Forschungsprojekten untersucht. In murinen Proben des Dünndarms wurde gezeigt, dass miRNAs Signalwege der Zelldifferenzierung und Proliferation durch die Regulation wichtiger Transkriptionsfaktoren beeinflussten (McKenna et al., 2010). Auch im humanen Kolon wurde gezeigt, dass Zusammenhänge zwischen miRNAs und Zellproliferation bestehen. Die Disregulation des miRNA-Clusters 17-92, dessen kontrollierte Expression für die Entwicklung des Embryos notwendig war, konnte so im adulten Organismus mit kolorektaler Krebsentstehung in Verbindung gebracht werden (Monzo

et al., 2008). Eine weitere Arbeit beschäftigte sich mit der Expression von miRNAs im porzinen Dünndarm während der Absetzphase von Ferkeln. Die Studie zeigte innerhalb dieses Zeitraums, dass vor allem für den Metabolismus die Stress- und Immunantwort relevante miRNAs beeinflusst werden (Tao and Xu, 2013).

Sharbati et al. (2010) untersuchten ebenfalls miRNAs im porzinen Intestinaltrakt durch Deep-sequencing und Microarray-Studien. Sie konnten dabei die Expression von 332 miRNAs in Jejunum und Ileum nachweisen, darunter auch 201 bis dahin unbeschriebene. Clusteranalysen der Microarray Experimente zeigten miRNAs, die ubiquitär und gleichmäßig innerhalb der Darmabschnitte Duodenum, Ileum, Jejunum und Kolon exprimiert waren. Ein Cluster zeigte hingegen eine klar erhöhte Expression im Ileum und distalen Jejunum von 31 Tage alten Ferkeln im Vergleich zu Duodenum und Kolon. Hierzu gehörte die miRNA ssc-miR-15b, ein Mitglied der im Folgenden als miR-15 Familie bezeichneten miRNA-Familie miR-15a/15b/16/195/424/497, welche auf Grund ihrer bis zu diesem Zeitpunkt beschriebenen und von uns vorhergesagten regulatorischen Interaktionen von besonderem Interesse war.

1.1.2. Die miRNA-Familie miR-15a/15b/16/195/424/497

Die miR-15 Familie setzt sich aus sechs miRNAs zusammen. Diese miRNAs treten sowohl beim Menschen als auch bei vielen anderen Vertebraten (z.B. *Sus scrofa*, *Mus musculus*, *Danio rerio* etc.) hochkonserviert auf. Sie werden zu einer Familie zusammengefasst, da die 5' Nukleotide 2-8 (Seed-Sequenz) zu 100 % identisch sind. Die übrigen Nukleotide können dagegen zwischen den Familienmitgliedern voneinander abweichen (Abb. 1.1). Dies führt dazu, dass alle sechs miRNAs die gleichen Ziel-mRNAs initial binden können. Auf Grund der unterschiedlichen 3'- Sequenzen der miRNAs ergeben sich dabei ungleiche Bindungswahrscheinlichkeiten und Stabilitäten der mRNA:miRNA Komplexe. Die tatsächlichen regulativen Eigenschaften der einzelnen Familienmitglieder können daher voneinander abweichen. Ebenso sind aber auch synergistische oder komplementierende Effekte innerhalb der Familie denkbar. Diese Möglichkeit wird noch verstärkt durch die genomische Lokalisation der miRNAs. Sie liegen teilweise als Cluster auf den Chromosomen vor: hsa-miR-15a + hsa-miR-16-1 (Chromosom 13), hsa-miR-15b + hsa-miR-16-2 (Chromosom 3) und hsa-miR-195 + hsa-miR-497 (Chromosom 17).

Für die miR-15 Familie wurden bereits experimentell validierte Zielgene beschrieben. Die hohe Sequenz-Homologie zwischen den einzelnen miRNA-Familienmitgliedern macht alle sechs miRNAs zu potentiellen Regulatoren der beschriebenen Faktoren. Es konnte gezeigt werden, dass miR-497-5p in der Prostata Krebszelllinie LNCaP durch die indirekte Aktivierung der Caspasen 3/7 apoptotische Prozesse einleitet (Wang et al., 2013). Die

Auslösung des Zell-Arrests und der Apoptose wird dabei auf die direkte Herabregulation der Faktoren B-cell CLL/Lymphoma 2 (BCL2), Cyclin D2 (CCND2) und Cell Division Cycle 42 (CDC42) zurückgeführt (Yadav et al., 2011; Zhu et al., 2012; Fu et al., 2013). Am Beispiel von miR-15b-5p wurde beschrieben, dass sie ebenso wie miR-497-5p, BCL2 herabregulieren kann (Shi et al., 2013). Zusätzlich konnten Yang et al. (2008) zeigen, dass die Caspasen 3/7 ebenfalls durch die Inhibierung des Hedgehog Signalwegs aktiviert werden können. Die genauen molekularen Mechanismen sowie die Verknüpfungen aller beteiligten Faktoren müssen noch aufgedeckt werden. In dieser Arbeit durchgeführte bioinformatische Berechnungen identifizierten die miR-15 Familie als möglichen Regulator des Hedgehog Signalwegs.

microRNA	Sequenz (5' - 3')
hsa-miR-15a-5p	U AGCAGCA CAUAAUGGUUUG
hsa-miR-15b-5p	U AGCAGCA CAUCAUGGUUACA
hsa-miR-16-5p	U AGCAGCA CGUAAAUAUUGGC
hsa-miR-195-5p	U AGCAGCA CAGAAAUAUUGGC
hsa-miR-424-5p	C AGCAGCA AUUCAUGUUUGAA
hsa-miR-497-5p	C AGCAGCA CACUGUGGUUUGU

Abb. 1.1.: **Vergleich der Sequenzen der miR-15 Familie.** Hervorgehoben in grün ist die identische Seed-Sequenz.

1.2. Der Hedgehog Signalweg

Der Hedgehog Signalweg ist eine Signalkaskade, die erstmals in *Drosophila melanogaster* beschrieben wurde. Eine Mutation im Hedgehog-Lokus löst bei den Larven der Tiere eine embryonale Fehlentwicklung aus, die zur Ausbildung eines igelartigen Phänotyps führt (Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980). Die Komplexität des kanonischen Hedgehog Signalweges unterscheidet sich zwischen den Spezies, die Funktionsweise innerhalb der vielzelligen Tiere (Metazoa) ist jedoch stark konserviert. Während in *Drosophila* nur ein Signalmolekül beschrieben ist, existieren innerhalb der Vertebraten drei Signalproteine: Indian Hedgehog (IHH), Sonic Hedgehog (SHH) und Desert Hedgehog (DHH) (Kumar et al., 1996). Sie werden als Vorläuferprotein exprimiert und unterlaufen in den exprimierenden Zellen eine autoproteolytische Spaltung, wodurch ein C-terminales und ein N-terminales Peptid entstehen (Lee et al., 1994; Kornberg, 2011). Das N-terminale Peptid wird durch die Hedgehog Acyltransferase (HHAT) modifiziert, ist damit sekretierbar und fähig an seinen spezifischen Transmembran-Rezeptor Patched (PTCH1) zu binden (Chamoun et al., 2001; Nüsslein-Volhard and Wieschaus, 1980). Wenn diese Bindung

erfolgt, wird eine Signalkaskade in der Empfängerzelle ausgelöst. Der Rezeptor verliert seinen reprimierenden Einfluss auf den G-Protein gekoppelten Rezeptor Smoothed (SMO). So werden die Transkriptionsfaktoren GLI-Kruppel family member (GLI) 1-3 aktiviert, wandern aus dem Zytosol in den Zellkern und aktivieren dort die Expression diverser Zielgene (Alcedo et al., 1996; Domínguez et al., 1996) (Abb. 3.1).

Diese Signalkaskade spielt sowohl im embryonalen als auch adulten Intestinaltrakt eine wichtige Rolle bei der Etablierung und Aufrechterhaltung einer funktionalen und gesunden Darmaktivität. Die meisten *in vivo* Untersuchungen zur Funktion und Regulation des Hedgehog Signalwegs wurden in der Maus durchgeführt. Hier werden IHH und SHH als koexprimierte, für Proliferation, Entwicklung und Differenzierung verantwortliche, Faktoren beschrieben (Mao et al., 2010). Ramalho-Santos et al. (2000) konnten zeigen, dass sowohl IHH als auch SHH wichtig für die Entwicklung des intestinalen Muskelgewebes und der Orientierung des Verdauungstraktes in der Embryonalentwicklung von Mäusen ist. Ebenfalls zeigte sich, dass IHH die Ausbildung der Darmkrypten und der Zottenstruktur im Darm steuert. Mutationen von IHH und SHH führten bei oder kurz nach der Geburt der Tiere zum Versterben, was ein weiterer Nachweis für die essentielle Notwendigkeit einer funktionalen Hedgehog Signalwirkung ist. Wird dagegen die epitheliale Zellschicht des adulten murinen Kolons entfernt, so treten akute entzündliche sowie Wundheilungs-Prozesse auf, die wiederum durch die extrinsische Zugabe der Hedgehog Liganden reversibel waren (Zacharias et al., 2010). Die chronische Reduktion oder auch Überexpression der Liganden IHH und SHH führt ebenso zu inflammatorischen Prozessen im Gewebe und zudem zu Fehlbildungen im Bereich der glatten Muskulatur und zu einer verstärkten Proliferation innerhalb der Darmkrypten (van Dop et al., 2010).

Die Expression der Signalpeptide erfolgt vorwiegend innerhalb des Epithels von Dünn- und Dickdarm. Hierbei scheint IHH das dominante Hedgehog Signalprotein zu sein (van Dop et al., 2009). Die Signalkaskade verläuft dann in parakriner Weise zu den mesenchymalen Zellen. Hierbei konkurriert die anti-proliferative und pro-differenzierende Wirkung des Hedgehog Signalweges mit der entgegengesetzten Wirkung des Wnt-Signalweges. Die Wirksamkeit der Signalmoleküle beider Kaskaden wird vor allem durch Konzentrationsgradienten limitiert. Während epithelnahe Gewebe besonders durch die Hedgehog-Proteine beeinflusst werden, reagieren die Zellen im Bereich der Darmkrypten verstärkt auf die Proteine des Wnt-Signalweges. Das Zusammenspiel dieser Signalkaskaden spielt somit eine wichtige Rolle in der embryonalen und postnatalen Darmentwicklung von Säugetieren (Batts et al., 2006; van den Brink et al., 2004).

1.3. Postnatale Darmentwicklung beim Schwein

Die postnatale Darmentwicklung bei Säugern ist ein komplexer Prozess, der essenzielle morphologische und funktionelle Veränderungen des gesamten Intestinaltraktes beinhaltet (Brunsgaard, 1997). Dieser Vorgang wird im Verlauf der Entwicklung durch exogene Faktoren beeinflusst. Durch die Ernährung zugeführte Moleküle, wie Antikörper, Hormone und Nährstoffe des Kolostrums und der Muttermilch, spielen dabei eine wichtige Rolle (Zhang et al., 1998).

Eine ebenso wichtige Rolle spielen endogene Signalkaskaden wie der Hedgehog, Wnt, Tgf- β und BMP Signalweg sowie Hormone (z.B. Aldosteron). Diese Signalwege können dabei nicht alleinstehend betrachtet werden. Durch genaue räumliche wie auch zeitliche Regulation findet durch das Zusammenspiel dieser Kaskaden eine strukturelle wie auch funktionale Organisation des Intestinaltraktes statt. So wird unter anderem die Proliferation, Differenzierung und Lokalisation von Zellen im Gewebe reguliert, aber auch Einfluss auf die absorptiven und sekretorischen Eigenschaften des Epithels genommen (Ramalho-Santos et al., 2000; Ferguson et al., 1979; de Santa Barbara et al., 2003). Das intakte mukosale Epithel des Gastrointestinaltrakts stellt hierbei ein Schlüsselement der mukosalen Barriere gegen ein weites Spektrum potenziell schädlicher Faktoren, wie Nahrungsbestandteile und bakterielle Pathogene, dar. Außerdem ist die epitheliale Integrität notwendig für die intestinale Immunität und Toleranz (Bailey et al., 2005; Anastasilakis et al., 2013). Die optimale Ausprägung des neonatalen Darmtrakts ist somit eine wichtige Grundvoraussetzung für die gesunde Entwicklung eines neugeborenen Organismus, deren negative Beeinflussung sowohl reversible als auch irreversible Schäden hervorrufen kann (Karasov et al., 1985; Smith et al., 2010).

Unter natürlichen Bedingungen ist die Entwöhnung von der Muttersau ein gradueller Prozess, der frühestens 11-12 Wochen *post partum* (p.p.) abgeschlossen ist. Da aber gezeigt werden konnte, dass durch ein Absetzen der Ferkel nach 4 Wochen die meisten Jungtiere pro Sau und Jahr erzielt werden können, wird dieser Zeitraum meist in der konventionellen Schweinezucht gewählt (Bøe, 1991). Der Übergang erfolgt dabei nicht allmählich, sondern abrupt ohne Möglichkeit der langsamen Adaptation des Darms. Somit werden die Ferkel in dieser Phase massiv einer neuen Nährstoffkomposition sowie Nahrungsantigenen ausgesetzt. Dieser starke Einschnitt in die natürliche Reifung des Intestinaltraktes macht sich auf morphologischer und funktionaler Ebene bemerkbar. Wie bereits in Abschnitt 1.1.1 beschrieben, zeigt sich ein deutlicher Effekt des Absetzens auf die Expression von mit Immun- und Stresskaskaden assoziierten miRNAs mit weitreichenden Folgen auf das postnatale Transkriptom im Intestinaltrakt (Tao and Xu,

2013). Die Folgen des Absetzens sind morphologisch im Dünndarm an einer Atrophie der Darmzotten und einer Hypertrophie der Darmkrypten zu erkennen. Diese Entwicklung bewirkt eine reduzierte Anzahl reifer Enterozyten und damit einhergehend auch reduzierte Verdauungsenzymaktivitäten (Gu et al., 2002). Häufig ergeben sich hieraus Probleme wie eine verringerte Nahrungsaufnahme, Diarrhö und erhöhte Infektanfälligkeit der Tiere (Lallés et al., 2007). So zeigen Ferkel, die früh von der Mutter getrennt wurden, unter anderem eine erhöhte Anfälligkeit für enteropathogene *Escherichia coli* (*E.coli*), einhergehend mit deutlich schwereren Krankheitsverläufen als bei später abgesetzten Tieren (McLamb et al., 2013).

1.3.1. Salmonelleninfektion im porzinen Intestinaltrakt

Salmonella Typhimurium ist ein begeißeltes, gramnegatives Bakterium. Es kann in einer Vielzahl von Wirbeltieren zu einer akuten, teilweise schweren Gastroenteritis führen. *Salmonella* kann zusätzlich das Immunsystem umgehen und sich auf Organe wie Tonsillen, Milz und Leber ausbreiten (Parys et al., 2011). Die Invasionsstrategien der Bakterien sind dabei sehr komplex. Sie sind dazu in der Lage, mit dem mukosalen Epithel des Darmes zu interagieren und dieses zu passieren. Dabei bedienen sie sich eines Sekretionssystems, um manipulative Effektoren in die Wirtszelle einzuschleusen (Finlay and Brummell, 2000). Niewold et al. (2007) konnten in einem Zeitraum von 0-8 Stunden nach der Infektion in der Dünndarmmukosa von Schweinen mit Hilfe von cDNA-Arrays nur acht differenziell exprimierte Transkripte feststellen. Sie führten dies auf die immunsupprimierende Fähigkeit der Salmonellen sowie vielfältige und individuelle zelluläre Interaktionen innerhalb der porzinen Mukosa zurück. Anhand von miR-29a, miR-146, miR-155 und let-7 konnte bereits gezeigt werden, dass auch miRNAs eine Rolle bei der Immunantwort des Wirtes auf eine Salmonelleninfektion spielen (Staedel and Darfeuille, 2013). Durch *in vivo* Infektionsversuche konnten Hoeke et al. (2013) eine Salmonellen induzierte Expression von miR-29a nachweisen. Hierdurch wurde das direkte Zielprotein Caveolin2 herunterreguliert, was *in vitro* eine erhöhte Invasivität der Bakterien zur Folge hatte. Diese Ergebnisse zeigen, dass die regulativen Netzwerke zur Abwehr und Kontrolle von bakteriellen Infektionen im Intestinaltrakt von Säugetieren multifaktoriell und komplex sind. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die molekularen Hintergründe aufzudecken und neue therapeutische Ansätze zu entwickeln.

1.4. Ziel dieser Studie

Die miRNA miR-15b-5p hatte sich bereits in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Sharbati als differenziell exprimierte miRNA im postnatalen porzinen Intestinaltrakt während des Absetzens gezeigt (Sharbati et al., 2010).

Daher sollte in einem ersten Arbeitsschritt eine *in silico*-Analyse der möglichen Zielgene und Ziel-Signalwege der gesamten miRNA-Familie durchgeführt werden. Die Vorhersagen wiesen auf eine sehr wahrscheinliche Verbindung zwischen dem Hedgehog Signalweg und der miR-15 Familie hin. Auf Grund seiner essentiellen Rolle in der postnatalen Darmentwicklung von Säugetieren, wurde die Wechselbeziehung zwischen miR-15 Familie und dem Hedgehog Signalweg als Anfangshypothese dieser Arbeit ausgewählt.

Mit der zur Verfügung stehenden Analyse-Software war es ausschließlich möglich, die Zielgen-Analyse für das humane Transkriptom durchzuführen. Daher bestand der zweite Schritt in der Untersuchung der Zielgen-Sequenzen im porzinen System durch die Sequenzierung der zugehörigen 3' UTRs.

Im Anschluss an diese Auswertung sollten *in vitro* Methoden entwickelt und etabliert werden, um die im ersten Schritt vorhergesagten Interaktionen experimentell zu überprüfen und im zellulären Kontext näher zu charakterisieren. Um die Vorgänge während der postnatalen Darmentwicklung besser nachvollziehen zu können, sollte die Expression der entscheidenden Faktoren des kanonischen Hedgehog Signalwegs sowie der miRNA-Familie im Ileum und Kolon von Ferkeln im Alter von 7-56 Tagen untersucht werden. Da IHH in diesen Darmabschnitten das vorherrschende Signalprotein zu sein scheint (van den Brink, 2007), wurden alle *in vivo* Untersuchungen an diesem Gewebe durchgeführt. Hierbei sollten die quantitativen Messungen durch die Lokalisierung der Faktoren im Intestinaltrakt vervollständigt werden.

Die Kolonisierung des Darms durch pathogene Bakterien findet ebenfalls in Ileum und Kolon statt. Auf Grund seiner starken Verknüpfung mit der Etablierung eines differenzierten Epithels und seines damit einhergehenden Einflusses auf die mukosale Integrität war der potentielle Einfluss einer Salmonelleninfektion auf den Hedgehog Signalweg von großem Interesse. Hierzu sollten porzine Proben aus Ileum und Kolon 3 h, 71 h und 28 Tage nach der Infektion analysiert werden.

2. Material & Methoden

2.1. Bioinformatische Hilfsprogramme

Zur miRNA Zielgenanalyse wurden die online verfügbaren Programme: DAVID (Huang et al., 2009b,a) sowie Targetscan (Lewis et al., 2005) verwendet. Zur näheren Untersuchung möglicher mRNA:miRNA Bindesequenzen wurde anschließend RNAhybrid (Rehmsmeier et al., 2004) eingesetzt.

2.2. Probenmaterial für porcine Gewebeproben

Für die RNA-Isolationen aus porcinem Gewebe sowie die *in situ* Hybridisierungen und immunhistochemischen Experimente wurden Gewebeproben einer Hybridschweinerasse (EUROC x Pietrain) verwendet. Die Kontrolltiere wurden im Institut für Tierernährung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin gehalten und versorgt, während die Infektion von Ferkeln mit *Salmonella enterica* Subspezies *enterica* Serovar Typhimurium DT104 am Bundesinstitut für Risikobewertung durchgeführt wurden. Kontrolltiere wurden 7, 14, 28, 31, 35 und 56 Tage (d) p.p. und die am 28. Tag p.p. mit Salmonellen infizierten Tiere jeweils 3 h, 71 h und 28 d *post infectionem* (p.i.) getötet. Die Entnahme der Proben erfolgte im Rahmen der Doktorarbeit von Jutta Sharbati (2010) innerhalb der DFG Forschergruppe 438 (BMELV Genehmigungs-Nr.: G0037/02). Die Lagerung der Gewebeproben erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. RNA Extraktion

RNAs wurden mit Hilfe des miRVana miRNA Isolierungskits (Life Technologies GmbH) gemäß Herstellerprotokoll isoliert. Während der im Kit enthaltene Lysispuffer ausreichte um in Kultur gehaltene Zellen direkt zu lysieren, mussten porcine, intestinale Gewebeproben mechanisch aufgeschlossen werden (FastPrep Homogenisierer, Qiogene/MPBiomedicals). Um eine repräsentative Probe für die unterschiedlichen Gewebe

zu erhalten, wurden jeweils drei schmale Querschnitte (Beginn, Mitte, Ende) eines kryokonservierten Präparates gemeinsam homogenisiert und deren RNA isoliert. Die RNA-Qualität/ Quantität wurde mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer und RNA Nano Chips (Agilent) sowie durch das Nanodrop 1000 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific GmbH) bestimmt.

2.3.2. Polymerasekettenreaktion (PCR) und Primer

Sämtliche verwendeten Oligonukleotide für PCR-Reaktionen wurden von der Metabion AG sowie Sigma-Aldrich Chemie GmbH synthetisiert. Die Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer sind in Abschnitt A.4 aufgeführt. Die PCRs wurden mit der ImmolaseTM sowie der AccuSureTM DNA Polymerase (Bioline GmbH) durchgeführt. Als Cycler wurden der T_{Gradient} Thermal Cycler (Biometra) sowie der Veriti[®] 96-Well Thermal Cycler (Life Technologies GmbH) verwendet. Die Sequenzierung von PCR-Amplifikaten wie auch Plasmiden erfolgte durch die GATC Biotech AG.

2.3.3. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Gelelektrophorese wurde LE Agarose (Biozym Diagnostik GmbH) verwendet. Die Konzentration der Agarose wurde der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente angepasst (0,8-2%). Die Gelelektrophorese wurde bei 80 Volt mit TAE-Puffer (Carl Roth GmbH) in horizontalen Elektrophoresekammern durchgeführt. Die Visualisierung der DNA erfolgte durch Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) (Carl Roth GmbH). Zur Aufreinigung der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet.

2.3.4. Reverse Transkription

Soweit nicht anders beschrieben wurde 1 µg RNA mit 1 Unit (U) RNase freier DNase (Thermo Fisher Scientific GmbH) in 10 µl Gesamtvolumen gemäß Herstellerprotokoll behandelt. Anschließend wurde die so behandelte RNA revers transkribiert. Hierzu wurden 200 Units RevertAidTM Reverse Transkriptase (Thermo Fisher Scientific GmbH), 0,2 µg random Hexamere und 200 µM dNTPs in 20 µl Gesamtvolumen eingesetzt. Reaktionen bei denen die Proben ohne Reverse Transkriptase mitgeführt wurden, dienten als Negativkontrollen um DNA Kontaminationen auszuschließen.

2.3.5. Reverse Transkription- quantitative PCR (RT-qPCR) und Arrays

Die RT-qPCR wurde im StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Life Technologies GmbH) mit SensiMix™ SYBR Hi-ROX (Bioline GmbH) durchgeführt. Für die qPCR wurden MicroAmp® Fast96-Well Reaction Plates (Life Technologies GmbH) verwendet. Die Reverse Transkription wurde wie bereits beschrieben durchgeführt. Für die Reaktion wurden jeweils 0,2 mM genspezifischer Primer, sowie 1 μ l 1:5 verdünnter cDNA in 10 μ l Gesamtvolumen eingesetzt. Der erste Amplifikationsschritt war die Initiation bei 95 °C für 10 Minuten (min), gefolgt von 40 Zyklen für 15 Sekunden (sec) bei 95 °C, 10 sec bei 60 °C und 20 sec bei 72 °C. Die Fluoreszenz wurde bei 72 °C erfasst. Zum Abschluss der PCR wurde eine Schmelzkurven-Analyse durchgeführt um die Spezifität der RT-qPCR zu kontrollieren. Alle Reaktionen wurden als Triplikatmessungen durchgeführt. Die Primersequenzen wurden so gewählt, dass sie nach Möglichkeit eine Hybridisierungstemperatur von 60 °C aufwiesen. So waren sie sowohl für Einzelassays als auch für RT-qPCR Arrays zu verwenden. Die Normalisierung der so akquirierten Daten erfolgte entweder mittels geNorm Algorithmus (Vandesompele et al., 2002) oder mittels $\Delta\Delta$ -Cq Methode (Winer et al., 1999) unter Gebrauch geeigneter Referenzgene (GAPDH, ACTb, UBC, TBP). Die alte Bezeichnung Ct wurde gemäß MIQE Guidelines in Cq abgewandelt (Bustin et al., 2009).

Die RT-qPCR Arrays wurden ebenfalls im StepOnePlus™ Real-Time PCR System mit SensiMix™ SYBR Hi-ROX durchgeführt. Die Reverse Transkription wurde wie beschrieben durchgeführt und der halbe cDNA-Ansatz (10 μ l) wurde in der folgenden qPCR eingesetzt. Die Primer aller zu untersuchenden Gene sowie der Referenzgene wurden in einer 4 μ M Verdünnung gemischt und es wurde je 1 μ l dieses Primer-Pools pro Reaktion verwendet. Die Normalisierung der so akquirierten Daten erfolgte mittels $\Delta\Delta$ -Cq-Methode unter Gebrauch geeigneter Referenzgene (GAPDH, ACTb, UBC, TBP). Hierzu wurden zunächst die Δ -Cq Werte der einzelnen 7 d alten Ferkel (n=5) der Kontrollgruppe berechnet. Anschließend wurde hieraus das arithmetische Mittel bestimmt. Um die $\Delta\Delta$ -Cq Werte jedes Tieres zu errechnen wurde dann das so ermittelte arithmetische Mittel von den individuellen Δ -Cq Werten abgezogen (Formel 2.1). Zur besseren Darstellbarkeit wurden die $\Delta\Delta$ -Cq Werte in Fold Differences umgewandelt (Formel 2.2). Die praktische Durchführung der RT-qPCR Arrays erfolgte im Rahmen der Bachelorarbeit von Elisabeth Hahn. Die Anzahl der untersuchten Tiere betrug n=5.

$$\Delta\Delta C_q = [C_q GOI(Probe) - C_q Ref.(Probe)] - [C_q GOI(Kal.) - C_q Ref.(Kal.)]. \quad (2.1)$$

C_q = Quantitation Cycle

GOI = zu untersuchendes Gen

$Ref.$ = Referenzgen

$Kal.$ = Kalibrator

$$FoldDifference = 2^{-[\Delta\Delta C_q]} \quad (2.2)$$

2.3.6. miR-Q: miRNA RT-qPCR und Arrays

Die Quantifizierung von miRNAs wurde wie in Sharbati-Tehrani et al. (2008) beschrieben durchgeführt. Es wurden in der Reversen Transkription 50 ng Gesamt-RNA mit 250 fmol miRNA spezifischem Primer (RT6-miR-x), 1mM dNTPs und 100 U RevertAidTM Reverse Transkriptase in 10 μ l Gesamtvolumen verwendet. Die PCR Reaktion bestand aus 4 nM miR-x-rev Primer, 100 nM MP-fw sowie 100 nM MP-rev Primer und SensiMixTMSYBR Hi-ROX in 10 μ l Gesamtvolumen. Die Amplifikation erfolgte über eine Initiation bei 95 °C für 10 min, gefolgt von 40 Zyklen bei 95 °C für 15 sec, 10 sec bei der optimalen Hybridisierungstemperatur und 72 °C für 20 sec. Die Fluoreszenz wurde bei 72 °C erfasst. Zum Abschluss der PCR wurde eine Schmelzkurven-Analyse durchgeführt um die Spezifität der RT-qPCR kontrollieren zu können. Alle Reaktionen wurden als Triplikatmessungen durchgeführt.

Die miRNA RT-qPCR Arrays wurden ebenfalls im StepOnePlusTM Real-Time PCR System mit SensiMixTMSYBR Hi-ROX durchgeführt. Die Reverse Transkription wurde wie in Sharbati et al. (2012) beschrieben, mit einem 1 μ M Pool aller im Array einzusetzenden RT6-Oligonukleotiden, 500-1000 ng Gesamt-RNA sowie 1 mM dNTPs und 200 U Reverse Transkriptase in 10 μ l Gesamtvolumen durchgeführt. Die cDNA wurde 1:10 mit ddH₂O verdünnt und entweder halbiert oder komplett mit SensiMixTMSYBR Hi-ROX und je 100 nM der MP-fw/rev Primer eingesetzt. Die miRNA spezifischen Primer (miR-x-rev) aller zu untersuchenden miRNAs sowie der Referenzgene wurde in einer 4 μ M Verdünnung gemischt und es wurde je 1 μ l dieses Primer-Pools (Endkonzentration 5 nM) pro Reaktion verwendet. Die Amplifikation erfolgte über eine Initiation bei 95 °C für 10 min, gefolgt von 40 Zyklen bei 95 °C für 15 sec, 20 sec bei 60 °C und 72 °C für 20 sec. Die Fluoreszenz wurde bei 72 °C erfasst. Zum Abschluss der PCR wurde eine Schmelzkurven-Analyse

durchgeführt, um die Spezifität der RT-qPCR zu kontrollieren. Alle Reaktionen wurden als Triplikatmessungen durchgeführt. Die Normalisierung der so akquirierten Daten erfolgte mittels $\Delta\Delta$ -Cq Methode unter Gebrauch geeigneter Referenzgene (RNU6, miR-145, miR-21). Die Anzahl der untersuchten Tiere betrug n=5.

2.3.7. Stem Loop 3' UTR RACE PCR (SLURP)

Für die Stem Loop 3' UTR RACE PC (SLURP) wurde die Gesamt-RNA von porzinem Intestinalgewebe wie bereits beschrieben mit DNase behandelt und anschließend mit 2,5 μ M "SLURP rt" Primer revers transkribiert. Die Reaktion wurde bei 42 °C für 1 h durchgeführt und durch einen Erwärmung auf 70 °C für 10 min abgebrochen. Die PCR Reaktion wurde dann mit 2,5 U Immolase DNA Polymerase unter Zusatz von 2x PolyMate Additive (Bioline GmbH), 1 μ l (500-700 ng) eines cDNA Pools, 3 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTPs, 0,4 μ M je Primer und 10x Reaktionspuffer in 25 μ l Gesamtvolumen durchgeführt. Das Protokoll entsprach einer Nested PCR. Hierbei band der erste fw Primer (fw i) innerhalb einer Ankersequenz, die durch den "SLURP rt" Primer gegeben war, im 5' Bereich der 3' UTR, während der erste genspezifische Primer (GSP) am 3' Ende der cDNA 3' UTR (GSP rev i) binden konnte. Innerhalb einer zweiten PCR wurde die Spezifität und Amplifikatmenge der Reaktion durch einen zweiten fw Primer (fw ii) innerhalb der Ankersequenz sowie einen zweiten GSP (GSP rev ii) erhöht. Beide Reaktionen der nested PCR begannen mit einer initialen linearen Amplifikationsphase. Nach der Aktivierung der Polymerase bei 95 °C für 10 min wurde entweder nur der GSP rev i oder GSP rev ii zur Reaktion zugegeben. Diese lineare Amplifikation erfolgte für 10 Zyklen mit 30 sec Denaturierung bei 95 °C, 30 sec Hybridisierung bei 58-62 °C und der Elongation für 1-2,5 min bei 72 °C. Direkt im Anschluss wurden entweder der fw i oder fw ii Primer zur Reaktion hinzugefügt und weitere 30 Zyklen, deren Bedingungen den ersten 10 Zyklen entsprachen, schlossen sich an. Der zweite Durchgang der nested PCR wurde mit 0,5-1 μ l der ersten Reaktion als Template durchgeführt. Beide Stränge der Amplifikate wurden entweder direkt mit genspezifischen sowie Ankerprimern sequenziert oder durch Primerwalking nach Klonierung in pJET1.2/blunt. Die Methode wurde in Bohmer et al. (2013) gemeinsam mit der SMAP-Methode publiziert.

2.3.8. Seed Mutagenesis Assembly PCR (SMAP)

Zur Herstellung eines Templates für die Mutagenese und anschließende Klonierung potentieller miRNA-Zielsequenzen, wurde Gesamt-RNA revers transkribiert und die daraus resultierende cDNA für die anschließenden PCRs verwendet. Hierzu wurden 2 μ l

der cDNA mit je 10 pmol fw und rev Primer, 1 U Immolase DNA Polymerase, 3 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs und 10 x Reaktionspuffer in 25 µl Gesamtvolumen eingesetzt. Die Reaktion wurde durch eine Aktivierung der Polymerase bei 95 °C für 8 min gestartet, gefolgt von 40 Zyklen von 45 sec bei 95 °C, 15 sec mit Temperaturgradient (59, 60, 61, 62 und 63 °C) und 30 sec bei 72 °C und einer abschließenden Elongation von 5 min bei 72 °C.

Um die Mutagenisierung einzelner oder mehrerer miRNA-Zielsequenzen zu erreichen, wurden Primer mit mutierten Seedsequenzen in der PCR eingesetzt. Die resultierenden PCR-Amplikons besaßen zwei (Mutagenese einer einzelnen Zielsequenz) oder fünf (Mutagenese zweier Zielsequenzen) überlappende Bereiche. Die anschließende Assemblierung dieser Amplikons erbrachte die Herstellung vollständiger 3' UTRs oder langer 3' UTR Regionen mit mutagenisierten Seed-Sequenzen der miRNA. Das Template wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend aus dem Gel extrahiert. Das so aufgereinigte Produkt (0,05-0,1 pmol) wurde mit je 10 pmol fw und rev Primer, 1 U Immolase DNA Polymerase, 3 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs und 10 x Reaktionspuffer in 25 µl Gesamtvolumen in der PCR eingesetzt. Die Initialisierung erfolgte erneut bei 95 °C für 8 min, die ersten 10 Zyklen wurden für 20 sec bei 95 °C, 10 sec mit Temperaturgradient (54, 55, 56, 57 und 58 °C) und +dT 0,5 °C pro Zyklus durchgeführt, gefolgt von einer Elongation von 15 sec bei 72 °C. In den anschließenden 30 Zyklen wurde die Denaturierung der Probe für 20 sec bei 95 °C, die Primerhybridisierung für 10 sec mittels Temperaturgradient (59, 60, 61, 62 und 63 °C) und die Elongation für 15 sec bei 72 °C gefolgt von einem abschließenden Schritt bei 72 °C für 2 min durchgeführt. Die Amplikons wurden erneut mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Anschluss aus dem Gel eluiert.

Die Assemblierung der erstellten Amplifikate erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurden äquimolare Mengen der DNA zusammengeführt um ein Template für die PCR zu liefern, danach wurde die PCR unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: 0,5 pmol je Amplikon, 1 U Immolase DNA Polymerase, 3 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs und 1 x Reaktionspuffer in 25 µl Gesamtvolumen. Die Assemblierung begann mit 95 °C für 8 min, gefolgt von 10 Zyklen je 30 sec bei 95 °C, 15 sec mit Temperaturgradient (59, 60, 61, 62 und 63 °C) und 30 sec bei 72 °C. Die Proben wurden abschließend auf 4 °C abgekühlt. Zur nachfolgenden Amplifikation der so assemblierten Nukleotide wurden 10 pmol der terminalen fw und rev Primer hinzugefügt. Um eine spätere Klonierbarkeit zu gewährleisten beinhalteten die Primersequenzen zusätzliche Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen REN. Die Reaktion wurde mit 1 U Immolase DNA Polymerase, 3 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs und 10 x Reaktionspuffer in 50 µl Gesamtvolumen angesetzt. Die zweite PCR

wurde initialisiert durch eine Erwärmung von 95 °C für 8 min, gefolgt von 25 Zyklen mit 30 sec bei 95 °C, 15 sec bei 63 °C und 30 sec bei 72 °C. Zum Abschluss wurde eine Elongation von 2 min bei 72 °C durchgeführt. Die hieraus resultierenden Amplikons, mutagenisierte 3' UTR sowie Wildtyp 3' UTR, wurden mit den entsprechenden REN verdaut und in das Reporterplasmid pTK-GLuc kloniert. Sense- und Antisense-Strang wurden jeweils zur Verifizierung der korrekt erfolgten Mutagenese sequenziert (Bohmer et al., 2013).

2.3.9. Klonierung

Plasmide sowie zugehörige DNA-Fragmente wurden mit der T4 DNA Ligase (New England Biolabs GmbH) ligiert. Die REN wurden ebenfalls von New England Biolabs bezogen. Die Transformation von *E. coli* DH5 α (DSMZ) erfolgte gemäß der Methode von Hanahan (Hanahan, 1983). Die Anzucht der Bakterien erfolgte in Flüssig-LB-Medium und die Selektion positiver Klone auf LB-Agar Platten (Carl Roth GmbH) unter der Verwendung von Ampicillin in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma Aldrich GmbH). Zur Klonierung von PCR Produkten wurde das CloneJETTMPCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific GmbH) mit pJET1.2/blunt gemäß Herstellerangaben benutzt. Die Präparation und Aufreinigung von Plasmiden erfolgte mit dem NucleoSpin[®] Plasmid QuickPure (Macherey und Nagel GmbH).

2.3.10. Herstellung von Reporterplasmiden

Die Reporterplasmide pTKGsIHH, pTKGsIHHm, pTKGhIHH und pTKGhIHHm wurden durch einen Restriktionsverdau des Ursprungsplasmids pTK-GLuc (New England Biolabs GmbH) mit den REN NotI und XbaI innerhalb der "Multiple Cloning Site (MCS)" sowie das einklonieren eines ca. 50 bp langen entsprechenden Oligonukleotiden konstruiert. Hierbei wurden je 100 pmol des Sense- sowie des Antisense-Strang zuvor im PCR-Cycler hybridisiert. Die Assemblierung erfolgte in 10 μl 1 x Ligasepuffer durch 3 min Erhitzen auf 95 °C und anschließendes schrittweises Abkühlen von 1 °C je 10 sec auf 22 °C. Die Herstellung der Reporterplasmide für die Caspase7 (CASP7) Reportergeren-Assays erfolgte wie in Abschnitt 2.3.8 beschrieben mit einem 1342 nt großen PCR-Amplifikat, welches in pTK-GLuc ligiert wurde. Beides wurde zuvor mit den REN NotI und XhoI geschnitten. Das Expressionsplasmid für humanes IHH wurde subkloniert aus dem Plasmid hsaIHH-pMA-T (GeneArt, Life Technologies GmbH). Die kodierende Sequenz wurde mit Restriktionsschnittstellen für SacI und HindIII tragenden spezifischen Primern amplifiziert, geschnitten und in das ebenso geschnittene pMIREX_0 Plasmid ligiert. Das hieraus

resultierende Plasmid wurde als pMIREX_IHH bezeichnet. Zur Transfektion von Zellen in der Zellkultur wurden endotoxinfreie Plasmide benötigt. Diese wurden mit dem Kit NucleoBond Xtra Midi Plus EF (Macherey und Nagel GmbH) gemäß Herstellerangaben isoliert.

2.4. Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Kultivierung erfolgte wenn nicht anders erwähnt in 75 cm² Kulturflaschen mit Belüftung (Sarstedt AG). Den Medien wurde FBS (FBS-Superior, S 0615, Biochrom AG) zugegeben. Zur Subkultivierung wurden die Zellen mit warmem PBS (PAA Laboratories GmbH) gespült, mit Accutase (A6964, Sigma-Aldrich GmbH) von der Oberfläche abgelöst, 1:1 mit Trypanblau (0,5 % , Serva Heidelberg) vermischt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die entsprechenden Zellzahlen wurden anschließend wieder in 75 cm² Kulturflaschen ausgesät. Verbrauchtes Medium wurde 2-3 mal wöchentlich ausgetauscht. Die humane Kolonkarzinomzelllinie HT-29 (LGC Standards GmbH, ATCC[®] HTB-38TM) und HT-29/B6 (Kreusel et al., 1991) sowie die Zervixkarzinomzelllinie HeLa (LGC Standards GmbH, ATCC[®] CCL-2TM) wurden in RPMI 1640 (F 1215, Biochrom AG) mit dem Zusatz von 10 % FBS kultiviert und wöchentlich passagiert. Die Zellen wurden regelmäßig einem Test auf Mykoplasmenkontamination unterzogen. Hierzu wurde eine, die mikrobielle 16S ribosomale RNA detektierende, PCR mit zellfreien Medienüberständen durchgeführt (van Kuppeveld et al., 1994).

2.5. Transfektion

Die Transfektionen der Zelllinien wurden mit dem NucleofectorTM2b (Lonza Cologne AG), mittels Elektroporation gemäß vom Hersteller optimierter Protokolle, durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in 175 cm² Zellkulturflaschen (Sarstedt AG) angezogen. Zur Transfektion wurden die Zellen im Anschluss mit Accutase abgelöst, die benötigte Zellzahl durch Auszählen der Zelldichte in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt und dann in Elektroporationsküvetten (Lonza Cologne AG) transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden dann in 1,5 ml Kulturmedium in 6 Well Platten (Greiner Bio-One GmbH) weiter kultiviert.

2.5.1. HT-29

Die Zellen wurden drei Tage vor der Transfektion in 175 cm² Zellkulturflaschen in einer Dichte von 3 x 10⁴ Zellen/cm² ausgesät. Die Transfektion erfolgte mit Kit R und Programm W-017 gemäß optimiertem Protokoll des Herstellers.

2.5.2. HT-29/B6

Die Zellen wurden drei Tage vor der Transfektion in 175 cm² Zellkulturflaschen in einer Dichte von 3 x 10⁴ Zellen/cm² ausgesät. Die Transfektion erfolgte mit Kit L und Programm X-005.

2.5.3. HeLa

Die Zellen wurden drei Tage vor der Transfektion in 175 cm² Zellkulturflaschen in einer Dichte von 3 x 10³ Zellen/cm² ausgesät. Die Transfektion erfolgte mit Kit R und Programm I-013 gemäß optimiertem Protokoll des Herstellers.

2.5.4. miRNA Mimics

Die miRNA Mimics sowie die miRNA Inhibitoren wurden von der Ambion GmbH, die small interfering RNAs (siRNA) und siRNA Pools von Thermo Fisher Scientific GmbH/Dharmacon bezogen. Die lyophilisierten RNAs wurden entsprechend Herstellerangaben in siRNA Puffer oder nukleasefreiem Wasser in einer Konzentration von 50 pmol/ μ l aufgenommen.

2.6. Reporter-Gen-Assays

Die Transfektionen der HeLa Zellen wurden mit dem NukleofectorTM2b von Lonza mit 5 x 10⁵ – 1 x 10⁶ Zellen durchführt. Es wurden 1 – 2 μ g Reporterplasmid (modifizierter pTK-GLuc, New England Biolabs GmbH), 100 – 200 ng Normalisierungsplasmid (pTK-CLuc, New England Biolabs GmbH) und 100 pmol synthetischer miRNA verwendet. Die Luziferaseaktivität wurde 48 h nach der Transfektion als Dreifachbestimmung je Probe durch Verwendung des Biolux Assay Kits (New England Biolabs GmbH) in weißen 96 Well Mikrotiterplatten (Greiner Bio-One GmbH) im automatisierten FLUOstar OPTIMA Luminometer (BMG Labtech) durchgeführt. Im Anschluss wurde zur Normalisierung der Quotient aus der gemessenen Luziferaseaktivität des Reporterplasmids und des Normalisierungsplasmids errechnet.

2.7. mRNA Degradations-Assay

Die Zellen wurden unter Verwendung des NucleofectorTM2b mit 100 pmol synthetischer Non Target siRNA, miRNA-Mimics, miRNA-Inhibitoren oder siRNAs transfiziert. Nach sowohl 24 h als auch 48 h wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gespült und die RNA wurde isoliert und revers transkribiert wie bereits beschrieben. Die Zielgene wurden mittels RT-qPCR Assay quantifiziert. Die relativen mRNA Level wurden in Relation zu Non Target siRNA transfizierten Kontrollen berechnet.

2.8. Protein Isolierung und Western Blot

Die Proteine wurden durch die Verwendung eines RIPA Puffers (Cell Signaling Technology), dem ein Protease Inhibitor Cocktail (P8340, Sigma-Aldrich GmbH) zugesetzt war, isoliert. Adhärenente Zellen wurde mit Accutase abgelöst, abzentrifugiert (200 x g) mit PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in RIPA Puffer aufgenommen und auf Eis lysiert. Die Quantifizierung des Gesamtproteins erfolgte durch das 2-D Quant Kit (GE Healthcare Europe GmbH) nach Herstellerangaben.

Die Proben wurden mit 3 x Blue Loading Buffer und 30 x DTT (1,25 M) gemischt und im Thermo-Cycler 5 min bei 95 °C erhitzt, anschließend abgekühlt und 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Auftrennung der Proteine (10-15 µg) erfolgte unter Kühlung (10 °C) durch SDS-PAGE (13,5 %). Anschließend wurden die Proteine in der TE 77 ECL Semi-Dry Transfer Unit (Amersham Biosciences, GE Healthcare Europe GmbH) mit Towbinpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20 % Methanol, pH 8,3) auf eine 0,45 µM PVDF Membran (Amersham HybondTM-P, GE Healthcare Europe GmbH) mit 1,1 mA/cm² für 30-45 min übertragen. Die Blockierung der Membran erfolgte in 5 %iger Milchpulverlösung (Carl Roth GmbH) in TBS-T (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5 + 0,1 % Tween 20) für 1-3 h. Die Detektion von IHH erfolgte durch den primären Anti-IHH Antikörper (ab52919, Abcam) in einer Verdünnung von 1:10.000, während der sekundäre ECL-Anti-rabbit IgG Antikörper (GE Healthcare Europe GmbH) in einer Verdünnung von 1:4.000 eingesetzt wurde. Die Ladekontrolle wurde mit dem primären Mouse Anti-GAPDH (1D4) Antikörper (No. NB300-221, Novus Biologicals) mit einer Verdünnung von 1:20.000 und dem sekundären ECL Anti-mouse IgG Antikörper (GE Healthcare Europe GmbH) in einer Verdünnung von 1:40.000 durchgeführt.

Um eine PVDF-Membran nach der Detektion eines ersten Proteins noch einmal verwenden zu können wurde das Western Blot Reprobing Protocol von Cell Signaling durchgeführt. Hierzu wurde die Membran mit TBS-T gewaschen und anschließend für 30 min in Stripping

Puffer (63 mM Tris, 2 % SDS und 0,7 % β -Mercaptoethanol, pH 6,8) bei leichtem Schütteln inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit TBS-T konnte erneut mit dem Blockieren der Membran begonnen werden.

2.9. Immunhistochemie (IHC) zur Detektion von IHH

Für die Immunhistochemie (IHC) wurden in Paraffin eingebettete Schnitte von porzinem intestinalen Gewebe verwendet. Die Fixierung erfolgte im Institut für Veterinär-Anatomie der Freien Universität Berlin in Bouinscher Lösung bei Raumtemperatur über Nacht. Nach der Fixierung wurde das Gewebe in 70 % Ethanol gewaschen, dehydriert und in Paraffin eingebettet. Die Blöcke wurden anschließend mit dem MICROM HM 340 E (Thermo Scientific GmbH) in 4,5 μ m schmale Sektionen geschnitten und auf Objektträgern fixiert. Um das Gewebe rehydrieren zu können, wurden die Objektträger auf 60 °C erwärmt (45-60 min). Das verflüssigte Paraffin konnte anschließend durch ein Bad in vorgewärmten Roticlear[®] (Carl Roth GmbH) abgespült werden. Danach wurden die Objektträger in einer Ethanolreihe (100, 95, 70 und 50 %) weiter gewaschen und zum Schluss in ddH₂O getaucht. Zur Rehydrierung diente ein Bad in 1 x PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4) für 10 min. Zur Demaskierung der Epitope wurden die Proben 45 min in Citratpuffer (10 mM Zitronensäure, 0,05 % Tween 20, pH 6) gekocht, wieder abgekühlt und erneut mit PBS gespült. Die Proben wurden dann in einem Blockierungspuffer (10 % Ziegen Serum in PBS) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Blockierlösung wurde entfernt und der primäre Antikörper (ab52919, Abcam, 1:50) wurde, verdünnt im Inkubationspuffer (1 % BSA in PBS pH 7,4), zugegeben und über Nacht bei 2-8 °C inkubiert. Als negativ Kontrolle diente eine Probe mit Inkubationspuffer aber ohne primären Antikörper. Nach der Inkubation wurden die Objektträger 3 x für 10 min mit 1 x PBS gespült. Der sekundäre Antikörper (ab150085, Abcam, 1:300) wurde ebenfalls in Inkubationspuffer verdünnt und nach Herstellerangaben verwendet (60 min bei Raumtemperatur). Erneut wurden die Objektträger 3 x für 10 min mit Waschpuffer gespült. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und die Schnitte wurden in Roti[®]-Mount FluorCare PI (Carl Roth) eingebettet. Die Schnitte und IHC-Färbungen erfolgten im Rahmen eines proteinbiochemischen Praktikums durch Elisabeth Hahn.

2.10. *In situ* Hybridisierung (ISH) zur Detektion der miRNA-Familienmitglieder

Für die ISH wurden ebenfalls Bouin-fixierte Gewebeschnitte verwendet (siehe 2.9). Es wurden miRCURY LNATMDetection Probes (Exiqon) eingesetzt, die sowohl 5'- als auch 3'-terminal mit Digoxigenin (DIG) markiert waren. Bei sämtlichen Arbeitsschritten wurden ausschließlich RNase-freien Materialien und Lösungen verwendet. Die Pufferlösungen wurden mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt und anschließend autoklaviert, um RNase-Aktivitäten zu minimieren. Zuerst wurden die Objektträger bei 59 °C für 1 h und anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurden sie mit Roticlear und Ethanol bei Raumtemperatur schüttelnd entparaffinisiert. Das Bouin-fixierte Gewebe wurde dreimal je 20 min mit Roticlear und anschließend in einer Ethanolreihe (100, 96, 80 und 70 %) ebenfalls je 20 min und abschließend noch einmal 5 min in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit Proteinase K (20 µg/ml) in speziellem Puffer (5 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA, 1 mM NaCl, in H₂O) bedeckt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Objektträger zweimal mit PBS gewaschen. Durch die Verwendung einer in der Konzentration aufsteigenden Ethanolreihe wurden die Gewebe dann wieder dehydriert (70, 80, 96 und 100 % für je 1 min). Die LNA-Sonde wurde bei 90 °C für 4 min denaturiert und die Objektträger dann mit 500 µl Hybridisierungsmix (40 nM miRNA-x und microRNA ISH Puffer (Enzo Life Sciences)) über Nacht in Scienion Feuchtkammern bei 37 °C inkubiert. Die Hybridisierungslösung wurde am nächsten Tag in 5xSSC Puffer (Roti[®]-Stock 20x SSC, Carl Roth GmbH) bei RT und leichtem Schütteln mit zwei Waschschritten für jeweils 10 min wieder entfernt. Die folgenden Waschschrritte erfolgten jeweils für 5 min bei 40 °C: einmaliges Waschen mit 5xSSC, zweimaliges Waschen mit 1xSSC für 5 min, erneut zweimaliges Waschen mit 0,2xSSC. Abschließend folgten zwei Waschschrritte mit 0,2xSSC für 10 min mit leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Nach einem weiteren Waschen mit PBS wurden die einzelnen Schnitte mit einem hydrophoben Stift (Circle Writer Fine, Science Services GmbH) umzeichnet und die Objektträger für eine 15 minütige Inkubation mit Blockierlösung (PBS-T 0,1 % (pH 7,4), 2 % Sheep serum (sc-2488, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) bei Raumtemperatur in eine feuchte Kammer überführt und danach mit PBS gewaschen. Die folgenden Arbeitsschrritte wurden ebenfalls innerhalb einer Feuchtkammer durchgeführt. Es wurde Sheep anti-DIG-AP (Roche, Cat. No. 11 093 274 910) in einer 1:800 Verdünnung in Verdünnungslösung (PBS-T 0,1 % (pH 7,4), 1 % Sheep serum, 1 % BSA (Sigma Aldrich GmbH)) für 60 min bei Raumtemperatur mit den Proben inkubiert. Die Objektträger wurden dann dreimal für je 3 min mit PBS-T gespült. Anschließend wur-

de AP Substrat (BCIP/NBT (Roche GmbH) in 10 ml H₂O, 0,2 mM Levamisol (Dako GmbH)) für 2 h bei 30 °C zugegeben. Die Reaktion wurde mit zwei fünf minütigen Waschschrinen mit KTBT Puffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM KCl in H₂O) gestoppt und die Objektträger zweimal für je 1 min mit H₂O gewaschen. Dann wurde Nuclear Fast RedTM(N3020, Sigma Aldrich GmbH) für 1 min zum Färben der Zellkerne zugegeben. Die Lösung wurde mit H₂O für 10 min abgewaschen und die Proben wurden aus der feuchten Kammer entfernt. Erneut erfolgte eine Dehydrierung der Gewebe mittels aufsteigenden Ethanolreihe (70, 80, 96 und 100 % für je 1 min). Die Objektträger wurden dann mit Mounting Medium überschichtet (Roti[®]-Histokitt, Carl Roth GmbH). Während einer über Nacht Inkubation bei 37 °C konnte sich das Präzipitat absetzen, so dass die Ergebnisse am folgenden Tag im Lichtmikroskop erfasst werden konnten. Die Etablierung des Protokolls sowie die praktische Durchführung der ISH erfolgte zum Teil durch Claudia Steiner.

2.11. Statistik

Die statistische Auswertung der RT-qPCRs und der Reporter-Gen-Assays erfolgte gemäß ungepaartem t-Test mit den Signifikanzwerten: *: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$. Die statistische Auswertung der RT-qPCRs Arrays zur Quantifizierung von mRNAs und miRNAs erfolgte gemäß Man-Whitney-U-Test mit den Signifikanzwerten: *: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$.

3. Ergebnisse

3.1. *In silico* Analysen der Interaktion der miRNA-Familie miR-15a/15b/16/195/424/497 mit IHH

Auf Grund der differentiellen Expression von miR-15b-5p entlang des porzinen Intestinaltraktes (Sharbati et al., 2010) wurde die Interaktion der gesamten miRNA-Familie mit ihren potentiellen Zielgenen untersucht. Die online verfügbare Software Targetscan (Lewis et al., 2005) ermöglichte eine Auflistung aller rechnerisch möglichen Zielgene der miR-15 Familie, gemäß der in Abschnitt 1.1 beschriebenen Gesetzmäßigkeiten. Anschließend wurde diese Liste in die Online-Datenbank DAVID (Huang et al., 2009b,a) eingespeist, um Signalkaskaden zu identifizieren, in denen die entsprechenden Zielgene vermehrt zu finden waren. Innerhalb der Ergebnisse wurde der Hedgehog Signalweg aufgeführt (Abb.3.1).

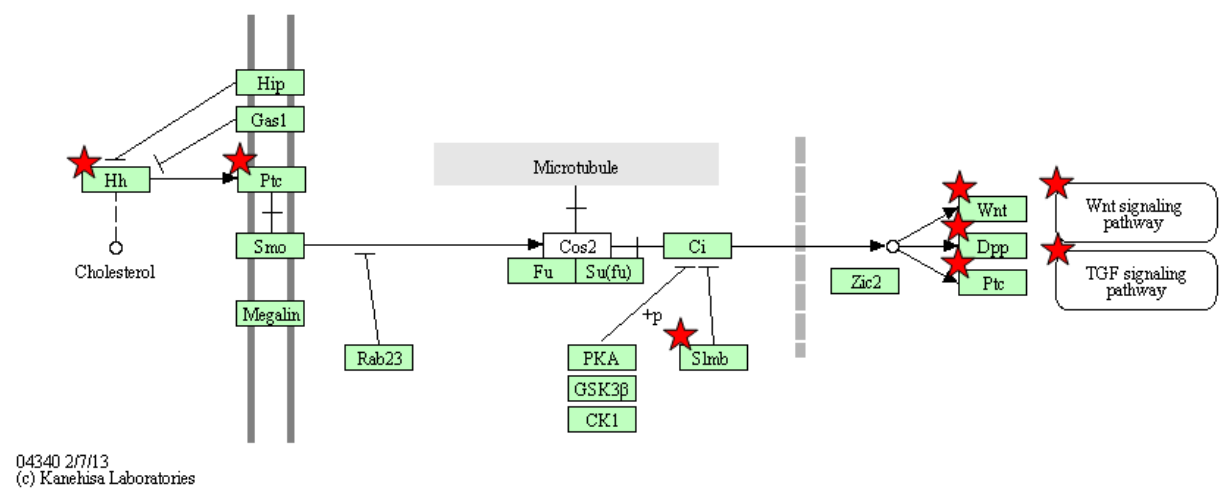


Abb. 3.1.: Darstellung des Hedgehog Signalwegs (KEGG) mit den potentiellen miRNA-Familien Zielgenen. Die potentiell beeinflussten Zielgene sowie auch Ziel-Signalwege sind durch Sterne gekennzeichnet.

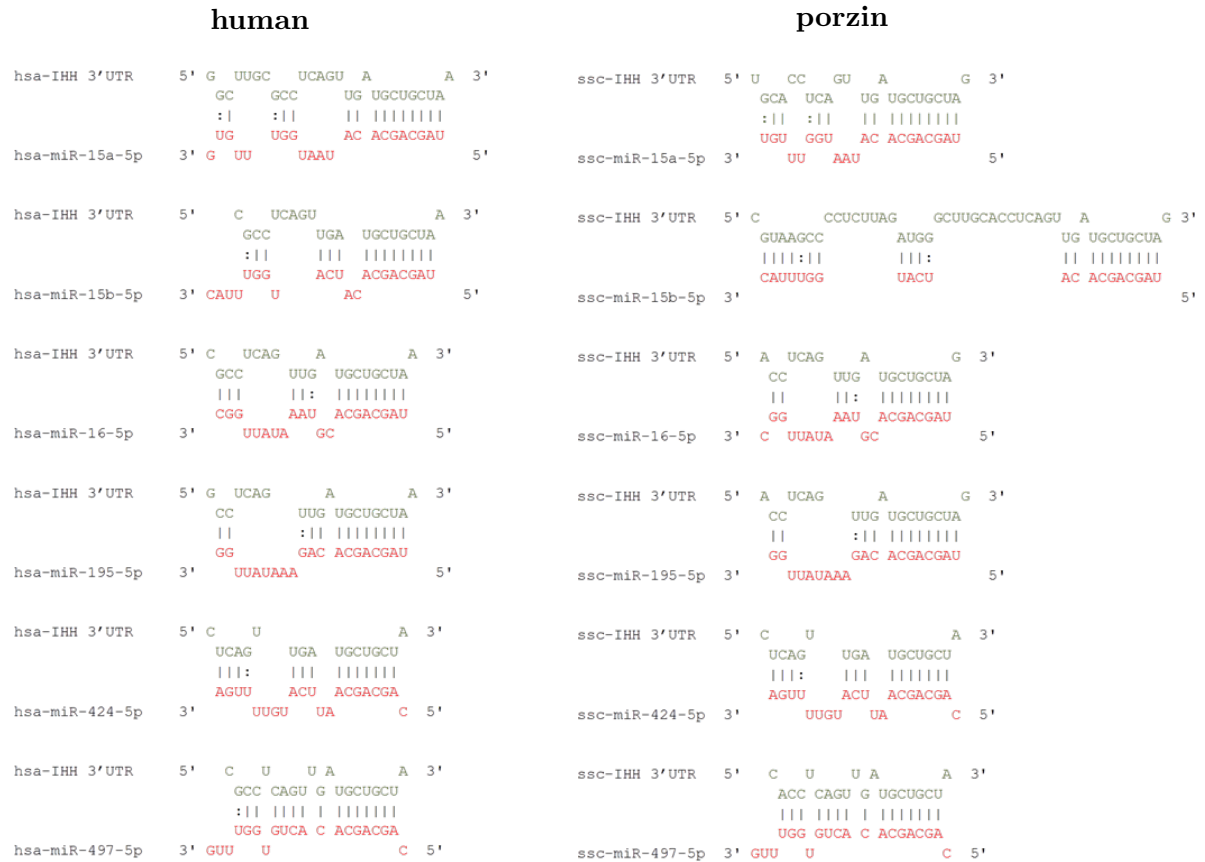


Abb. 3.2.: **Interaktion der miRNA-Familie mit der humanen und porzinen IHH 3' UTR im direkten Vergleich.** Die *in silico* Interaktion der IHH 3' UTR und der miRNAs wurde mit RNAhybrid durchgeführt. Linke Spalte: Potentielle Sekundärstruktur zwischen der miR-Familie (rot) und der humanen IHH-Zielsequenz (grün). Rechte Spalte: Potentielle Sekundärstruktur zwischen der miR-Familie (rot) und der porzinen IHH-Zielsequenz (grün).

Die weitere Analyse der potentiellen miRNA:mRNA Interaktion wurde mittels RNAhybrid (Rehmsmeier et al., 2004) durchgeführt und ergab für die 3' UTR von IHH eine hohe Wahrscheinlichkeit der Interaktion: hsa-miR-15a-5p (mfe: -22.0 kcal/mol; p-value: 0.042), hsa-miR-15b-5p (mfe: -22.7 kcal/mol; p-value: 0.032), hsa-miR-16-5p (mfe: -22.5 kcal/mol; p-value: 0.022), hsa-miR-195-5p (mfe: -19.5 kcal/mol; p-value: 0.055), hsa-miR-424-5p (mfe: -20.4 kcal/mol; p-value: 0.083) und hsa-miR-497-5p (mfe: -25.1 kcal/mol; p-value: 0.018). Da die humanen, als auch die porzinen miRNA-Sequenzen zu 100 % konserviert sind, wurde anschließend die Bindung dieser miRNAs an die IHH-Zielsequenzen von Mensch und Schwein verglichen. Die Bindungen zwischen miR-195-5p und miR-424-5p zeigten keine unterschiedlichen Sekundärstrukturen zwischen den humanen und porzinen

3' UTRs. Die miRNAs miR-15a, miR-16 und miR-497 zeigten nur leicht unterschiedliche Basenpaarungen, die aber keine großen Auswirkungen auf die Ausbildung der Sekundärstruktur hatten. Einzig die Sekundärstruktur der Bindung von miR-15b und der humanen und porzinen Zielsequenzen zeigte starke Unterschiede mit deutlich vergrößerten Schlaufen zwischen den Basenpaarungen (Abb.3.2).

3.2. Stem Loop 3' UTR RACE PCR (SLURP)

Viele porzine 3' UTRs sind noch unvollständig sequenziert, unbekannt oder nur durch automatische computerbasierte Analysen vorhanden. Da in dieser Arbeit porzine Proben verwendet wurden, benötigten wir auch die 3' UTR-Sequenzen der entsprechenden zu untersuchenden Faktoren. Um eine schnelle Methode zur Amplifikation dieser 3' UTRs zu besitzen, wurde in dieser Arbeit die 3' RACE Methode SLURP entwickelt. Das Protokoll basiert auf der Verwendung eines Stem Loop Oligo dT Primers zur Herstellung der cDNA. Es handelt sich dabei um ein 3' NV-(dT)₂₀-Oligonukleotid zur Hybridisierung an das poly-A Ende der mRNA. Daran schließt sich ein 5' Bereich mit zwei, eine Nested PCR ermöglichenden, Primerbindestellen für Ankerprimer an. Damit die Ankersequenzen keine Fehlpaarungen im mRNA-Pool verursachen können, ist die Sequenz des dT-Oligonukleotids so gewählt, dass eine Stem Loop-Sekundärstruktur diesen Bereich maskiert (Abb. 3.3 A). In dieser Struktur gehen 14 Nukleotide eine Basenpaarung miteinander ein, die errechnete Schmelztemperatur dieser Bindung betrug 47 °C. Auf diese Weise blieb die Sekundärstruktur während der cDNA-Synthese geschlossen. In der nachfolgenden PCR dagegen, lag die Schmelztemperatur dieser 14 Nukleotide unterhalb der Bindungstemperatur der Ankerprimer, wodurch die Ankersequenzen zugänglich wurden. Der Gebrauch von zwei genspezifischen Primern (GSP rev i und ii) sowie den beiden Ankerprimern ermöglichte eine Nested PCR mit erhöhter Spezifität und Ausbeute von PCR-Amplifikat (Abb. 3.3 B). Der Ansatz, die PCR mit einer linearen Amplifikation mit dem genspezifischen Primern für 10 Zyklen zu beginnen, resultierte ebenfalls in einer verstärkten Spezifität in den folgenden 30 Zyklen exponentieller Amplifikation. Daher wurde dieses Protokoll sowohl für die erste, als auch für die zweite PCR der Nested PCR angewandt.

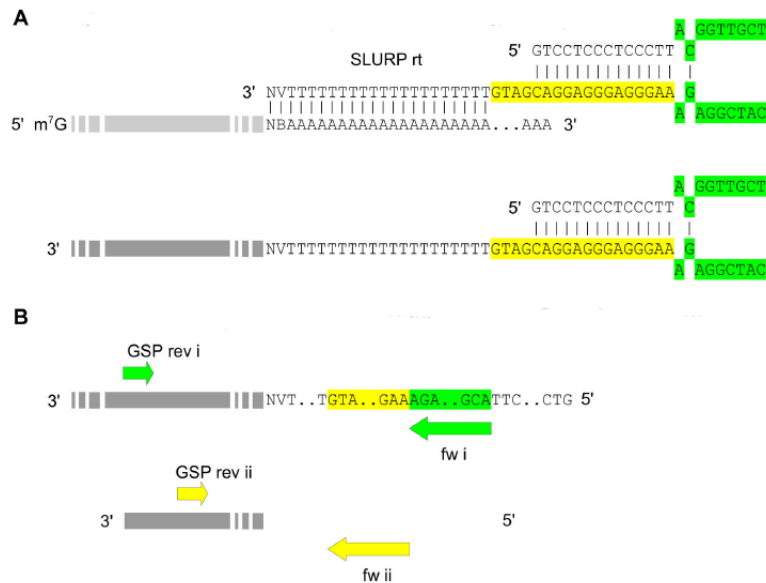


Abb. 3.3.: **Darstellung des Stem Loop RT Primers und des SLURP-Nested PCR Prinzips.** A: Die Abbildung zeigt die Bindung des Stem Loop RT Primers an die 3' UTR zur Generierung der cDNA. In Grün und Gelb sind die Bindestellen der Ankerprimer (fw i und fw ii) hervorgehoben. B: Die Verwendung von zwei genspezifischen Primern (GSP rev i und GSP rev ii) ermöglichte gemeinsam mit den Ankerprimern die anschließende Nested PCR.

3.2.1. Identifikation potentieller miRNA-Zielsequenzen innerhalb der 3' UTR von mRNAs durch SLURP

Mit der im vorigen Abschnitt beschriebenen Vorgehensweise konnten vier für die vorliegende Arbeit relevante 3' UTRs amplifiziert und sequenziert werden (Bohmer et al., 2013): DHH (445 bp, Accession No. HE651025), Selectin P Ligand (SELPLG) (768 bp, Accession No. HE651024), Transforming Growth Factor, β Receptor III (TGFB3) (1378 bp, Accession No. HF566399) und CASP7 (570 bp, Accession No. HF566398). Für die PCRs wurde ein Pool von RNAs aus dem porzinen Intestinaltrakt verwendet (Ileum und Kolon).

SLURP zur Amplifikation der Desert Hedgehog (DHH) 3' UTR

Die humane Sequenz der 3' UTR von DHH war bereits bekannt (NM_021044). Da die porzine Sequenz in keiner Datenbank hinterlegt war, wurde SLURP dazu verwendet um diese 3' UTR zu amplifizieren (Abb. 3.4). Die Sequenzierung der PCR-Amplifikate

ergab in Übereinstimmung mit der humanen 3' UTR-Sequenz keine Bindestelle für die miRNA-Familie. Zusätzlich wurde die SLURP auch für SHH eingesetzt. Es gelang aber weder die humane noch die porcine 3' UTR zu amplifizieren.

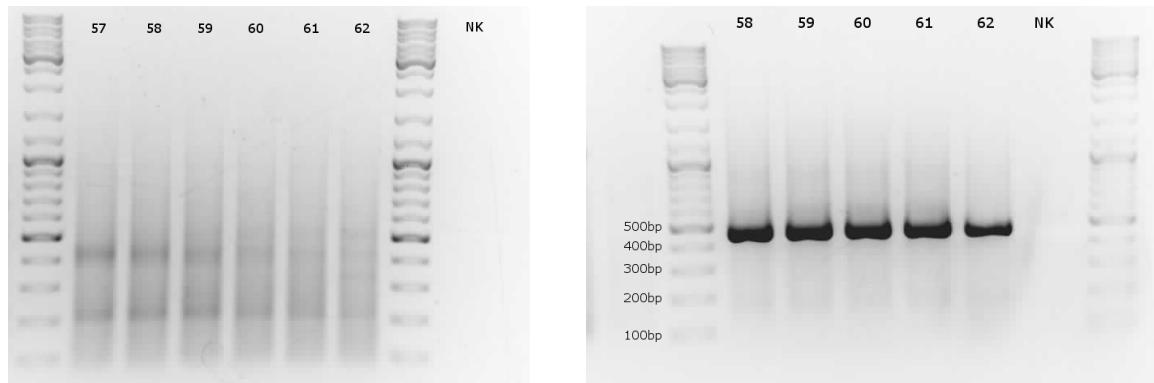


Abb. 3.4.: **Ergebnis der SLURP für die 3' UTR des porcinen DHH.** Es wurde ein Temperaturgradient verwendet (von links nach rechts: 57 – 62 °C). Links: 1. PCR. Rechts: Nested PCR, mit eindeutiger Bande zwischen 400 und 500 bp.

SLURP zur Amplifikation der Selectin P Ligand (SELPLG) und Transforming Growth Factor, β Receptor III (TGFB3) 3' UTR

Es konnte auch die ca. 800 bp große 3' UTR von SELPLG amplifiziert werden, diese 3' UTR wurde zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit des Protokolls für ein weiteres Projekt der Arbeitsgruppe sequenziert. Anhand der 3' UTR von TGFB3 konnte gezeigt werden, dass es mit SLURP möglich ist bis zu 1.500 bp lange 3' UTRs zu amplifizieren. Wie bereits in Abb.3.1 gezeigt, handelt es sich auch beim TGF- β Signalweg um ein Ziel der miRNA-Familie. Innerhalb der humanen 3' UTR von TGFB3 wurde von Targetscan eine, innerhalb der Gruppe der Vertebraten stark konservierte, Zielsequenz der miRNA-Familie vorhergesagt. Durch die Sequenzierung der porcinen 3' UTR konnte diese auch für *Sus scrofa* mit 93%iger Homologie nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Auf Grund der Verbindung von Hedgehog, Wnt und TGF- β Signalweg in der postnatalen Darmentwicklung wurden daher die Zielgen-Analysen auf die assoziierten Faktoren ausgeweitet.

SLURP zur Amplifikation der Caspase 7 (CASP7) 3' UTR

Wie bereits in Abschnitt 1.1.2 beschrieben, kann die Aktivierung von CASP7 sowohl durch miR-497, als auch die Inhibierung des Hedgehog Signalwegs erfolgen. Zusätzlich zeigten Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, dass die humane CASP7-mRNA direkt

durch miR-29a reguliert wird und dass sich zwei Zielsequenzen innerhalb der 3' UTR befinden (Sharbati et al., 2010). Daher sollten die potentiell regulativen Sequenzen innerhalb der 3' UTR der porzinen CASP7 näher untersucht werden. Mit SLURP wurden ca. 600 bp der 3' UTR von CASP7 amplifiziert und sequenziert (Abb. 3.5). In Bezug auf die miRNA miR-29a zeigte sich für Zielsequenz 1 zwischen *Homo sapiens* und *Sus scrofa* eine Homologie von 89% und für Zielsequenz 2 von 76% (Abb. 3.6). Die stärkere Homologie zwischen den beiden Spezies sowie die erhaltende Seed-Sequenz der 1. Zielsequenz wiesen diese als die evolutiv konservierte Zielsequenz von miR-29a aus. Eine weitere bioinformatische Targetscan Analyse bestätigte dieses Ergebnis. Die nähere Untersuchung der Funktionalität der humanen Zielsequenzen fand mittels Reporter-Gen-Assays statt.

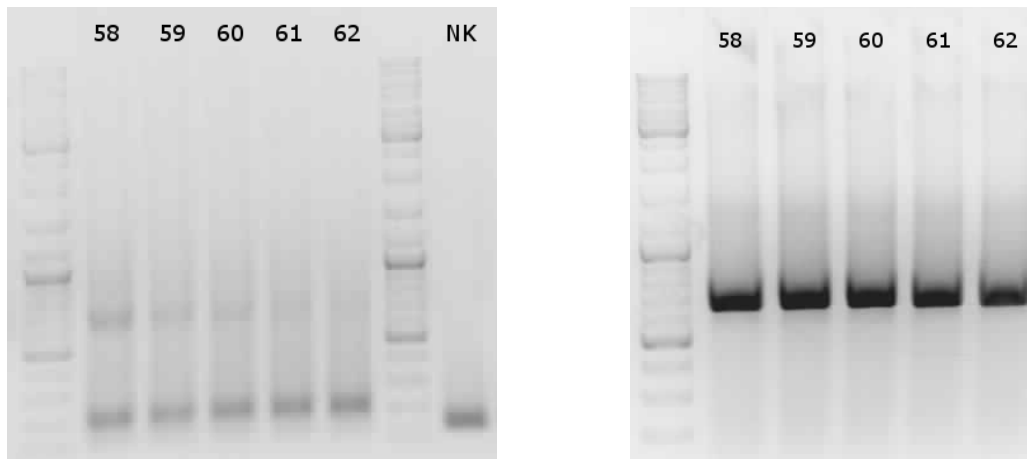


Abb. 3.5.: **Ergebnis der SLURP für die 3' UTR des porzinen CASP7.** Es wurde ein Temperaturgradient verwendet (von links nach rechts: 57 – 62 °C). Links: 1. PCR. Rechts: Nested PCR, mit eindeutiger Bande bei 600 bp.



Abb. 3.6.: **Interaktion der miRNA miR-29a mit der humanen und porzinen CASP7 3' UTR im direkten Vergleich.** Die *in silico* Interaktion der CASP7 3' UTR und der miRNAs wurde mit RNAhybrid durchgeführt. Links: Potentielle Sekundärstruktur zwischen miR-29a (rot) und den humanen CASP7-Zielsequenzen (grün). Rechts: Potentielle Sekundärstruktur zwischen miR-29a (rot) und den porzinen CASP7-Zielsequenzen (grün).

3.3. Herstellung von Reportergenplasmiden mittels SMAP

Zur Untersuchung der vorhergesagten potentiellen miRNA:mRNA Interaktionen sollten Reportergen-Assays durchgeführt werden. Hierzu wurden die benötigten Reporterplasmide hergestellt. Eine Möglichkeit war die Generierung der vorhergesagten Zielsequenzen mit kurzen Oligonukleotiden und die Klonierung dieser in das Ausgangsplasmid. Hierbei konnten die Oligonukleotide vom Hersteller direkt auch mit mutagenisierten Seed-Sequenzen bestellt werden. Vor allem, wenn sich mehrere Zielsequenzen innerhalb einer 3' UTR befanden, wurden dagegen ganze oder mehrere 100 bp lange Abschnitte der 3' UTRs kloniert. Um die darin enthaltenen Zielsequenzen für die miRNAs mutagenisieren zu können wurde das SMAP-Protokoll entwickelt und angewendet. Das Protokoll basierte auf der Generierung von Amplifikaten, deren mutagenisierte Enden überlappende Sequenzen aufwiesen. So konnten auch lange 3' UTRs aus mehreren kurzen Amplifikaten, mit mehreren mutagenisierten sowie Kombinationen aus mutagenisierten und nicht-mutagenisierten, Zielsequenzen assembliert und anschließend kloniert werden. Auch in diesem Fall wurden die Seed-Sequenzen in der mRNA mutagenisiert um die initiale Bindung der miRNA an ihr Ziel zu unterbinden (Bohmer et al., 2013).

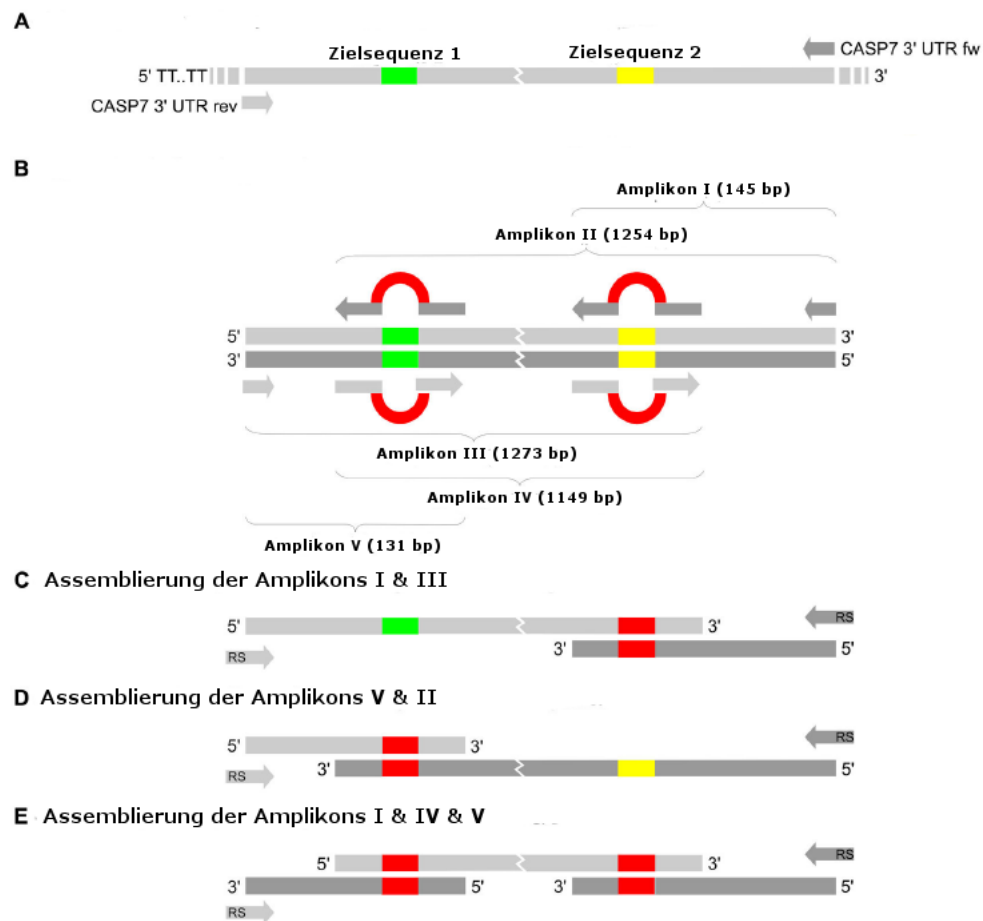


Abb. 3.7.: Schematische Darstellung der SMAP-Methode am Beispiel der CASP7 3' UTR. A: Amplifikation der kompletten CASP7 3' UTR, die Lokalisation der Zielsequenzen für miR-29a-3p sind in Grün und Gelb skizziert; B: Darstellung der zur Herstellung der mutagenisierten Reporterplasmide erforderlichen Amplikons; C-E: Die Assemblierung der Amplikons gemäß der überlappenden Enden ermöglichte die Generierung von drei Reporterplasmiden, mutagenisierte Zielsequenzen sind rot hervorgehoben.

3.4. Untersuchung der Interaktion von CASP7 und miR-29a durch Reporter-Gen-Assays

Für die Validierung der SMAP und Reporter-Gen-Assay Protokolle wurde die Untersuchung der Interaktion von CASP7 und der miRNA hsa-miR-29a-3p durchgeführt. Es wurden mittels SMAP vier unterschiedliche Reporterplasmide hergestellt. Ein Reporter-

plasmid enthielt die Wildtyp-Sequenz der humanen Caspase7 (pTKhCasp7), bei einem zweiten Reporterplasmid wurde die Zielsequenz 1 für miR-29a mutagenisiert (pTKhCasp7m1), bei einem dritten wurde die Zielsequenz 2 mutagenisiert (pTKhCasp7m2) und im vierten Reporterplasmid befand sich die 3' UTR von Caspase7 in der beide Zielsequenzen mutagenisiert waren (pTKhCasp7m1+2). Die Reporteragen-Assays wurden als Kotransfektionen der Reporter Plasmide (pTK-GLuc und pTK-CLuc) sowie einer synthetischen miR-29a und einer Kontroll-siRNA (Non Target siRNA) durchgeführt. Die Messung der Lumineszenz ergab, dass beide Zielsequenzen innerhalb der humanen 3' UTR zu einer Herabregulation der Reporteraktivität führten. Dabei zeigte sich, dass die Zielsequenz 1 mit einer Herabregulation um 40 % deutlich effektiver, als die Zielsequenz 2 mit einer Herabregulation von ca. 25 % war. Zusätzlich zeigten sich synergistische Effekte der beiden Zielsequenzen, da die Wildtyp-Zielsequenz mit ca. 50 % die stärkste messbare Reduktion der Luziferaseaktivität zeigte (Abb. 3.8).

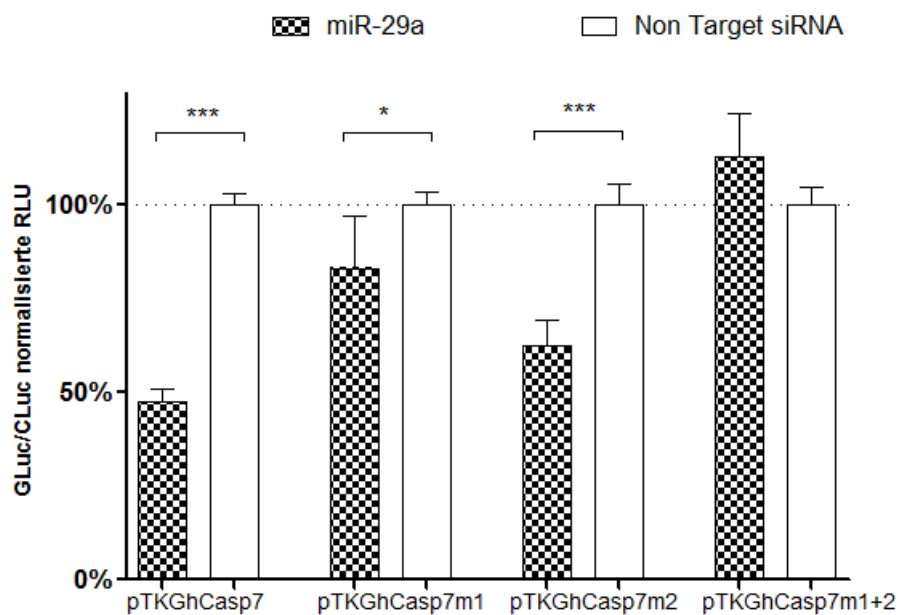


Abb. 3.8.: **Reporteragen-Assay für beide humane CASP7 Zielsequenzen gegen miRNA-Mimics.** Darstellung der normalisierten Relative Light Units (RLUs) von Kotransfektionen des Wildtyp- und der mutagenisierten Reporterplasmide mit miRNA-Mimics in Prozent. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Ergebnisse gemäß ungepaartem t-Test (*: $P < 0,05$, ***: $P < 0,001$).

3.5. Analyse der Interaktion der miRNA Familie mit der 3' UTR von IHH mit Reporter-Gen-Assays

Im Anschluss an die Validierung der Reporter-Gen-Assays wurde das Protokoll auf die Untersuchung der Interaktion der miRNA Familie mit der 3' UTR von IHH übertragen. Die Kotransfektion der porcinen IHH-Zielsequenz mit den miRNA-Mimics von hsa-miR-15-5p, hsa-miR-195-5p und hsa-miR-497-5p ergab eine Herabregulation des normalisierten Luziferase Reporters von 20-40 % verglichen mit einer Kontrolltransfektion (Non Target siRNA) und der mutagenisierten Zielsequenz von IHH (Abb.3.9). Die Kotransfektion der humanen IHH-Zielsequenz mit den miRNA-Mimics von hsa-miR-195-5p und hsa-miR-497-5p ergab eine Herabregulation des normalisierten Luziferase Reporters von 20 und 55 % verglichen mit einer Kontrolltransfektion (Non Target siRNA) und der mutagenisierten Zielsequenz von IHH (Abb.3.10). Die einzige miRNA, die sowohl für die porcine, als auch humane Zielsequenz eine statistisch signifikante Herabregulation des Reporters zeigte, war miR-497-5p.

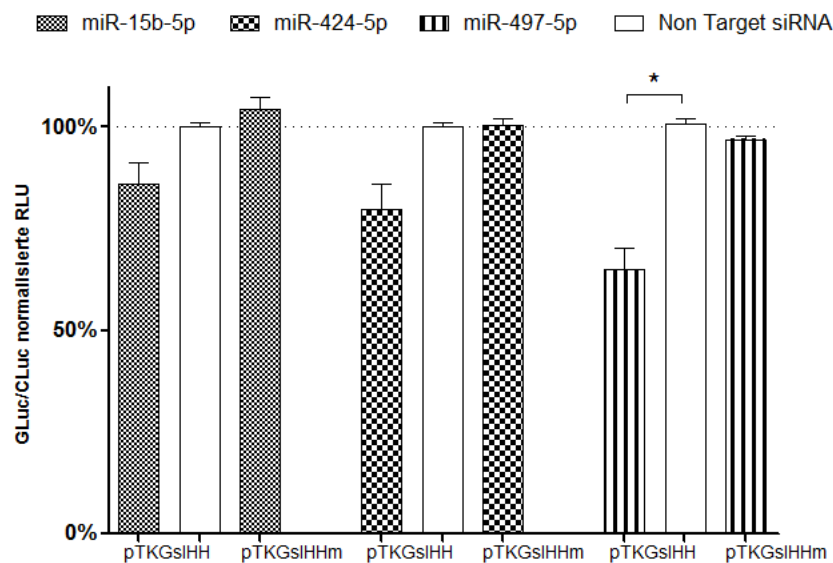


Abb. 3.9.: **Reporter-Gen-Assay für die porcine IHH Zielsequenz gegen miRNA-Mimics.** Darstellung der normalisierten RLUs von Kotransfektionen des Wildtyp- oder mutagenisierten Reporterplasmids mit miRNA-Mimics in Prozent. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Ergebnisse gemäß ungepaartem t-Test (*: $P < 0,05$).

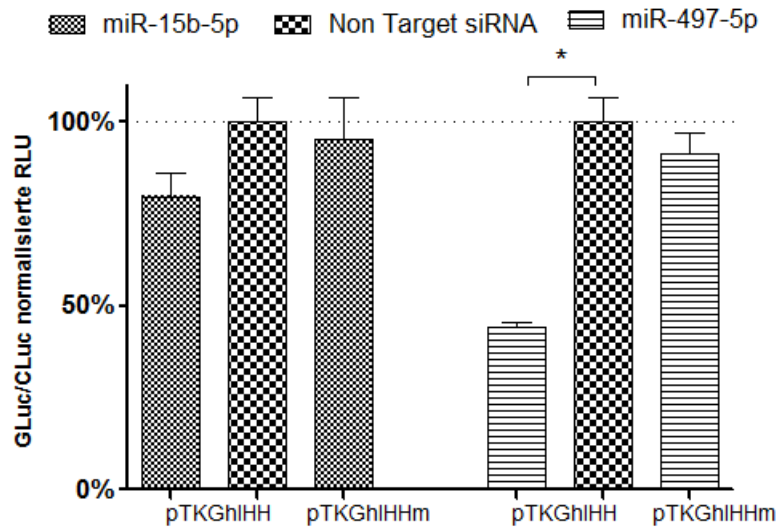


Abb. 3.10.: **Reportergen-Assay für die humane IHH Zielsequenz gegen miRNA-Mimics.** Darstellung der normalisierten RLUs von Kotransfektionen des Wildtyp- oder mutagenisierten Reporterplasmid mit miRNA-Mimics in Prozent. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Ergebnisse gemäß ungepaartem t-Test (*: $P < 0,05$).

3.5.1. Patched 1 (PTCH1) als weiteres potentiell Zielgen der miRNA-Familie

In Abbildung 3.1 ist zu erkennen, dass auch PTCH1 ein mögliches Zielgen der miRNA-Familie darstellt. Die *in silico* Analyse der humanen Zielsequenz mit RNAhybrid ergab ähnliche p- und mfe-Werte wie für IHH : hsa-miR-15a-5p (mfe: -21.4 kcal/mol; p-value: 0.084), hsa-miR-15b-5p (mfe: -20.9 kcal/mol; p-value: 0.114), hsa-miR-16 (mfe: -20.4 kcal/mol; p-value: 0.089), hsa-miR-195-5p (mfe: -19.1 kcal/mol; p-value: 0.090), hsa-miR-424-5p (mfe: -25.6 kcal/mol; p-value: 0.007) und hsa-miR-497-5p (mfe: -22.6 kcal/mol; p-value: 0.072). Daher wurden auch für diesen Faktor Reporterplasmide erstellt. Die Reportergen-Assays mit der Kotransfektion der Reporterplasmide mit hsa-miR-424-5p ergab keine signifikante Herabregulation des Reporters im Vergleich zum mutagenisierten Reporterplasmid und Non Target siRNA transfizierten Zellen (Daten nicht gezeigt).

3.6. Degradations-Assay zur Analyse der intrinsischen Regulation von IHH durch die miRNA-Familie

Aufbauend auf den Reporter-gen-Assays sollte im Anschluss der Einfluss der miRNA-Familie auf die intrinsisch exprimierte IHH-mRNA von HT-29 Zellen untersucht werden. Die Transfektion der Zellen mit miRNA-Mimics von hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-424-5p und hsa-miR-497-5p ergab in Übereinstimmung mit den Daten der Reporter-gen-Assays nach 24 h eine Herabregulation von IHH von 10-55 % und mit der IHH siRNA von 80 % im Vergleich zu einer Non Target siRNA transfizierten Kontrolle (Abb. 3.11). Die Daten wurden mittels der Referenzgene GAPDH und SDHA mit geNorm normalisiert.

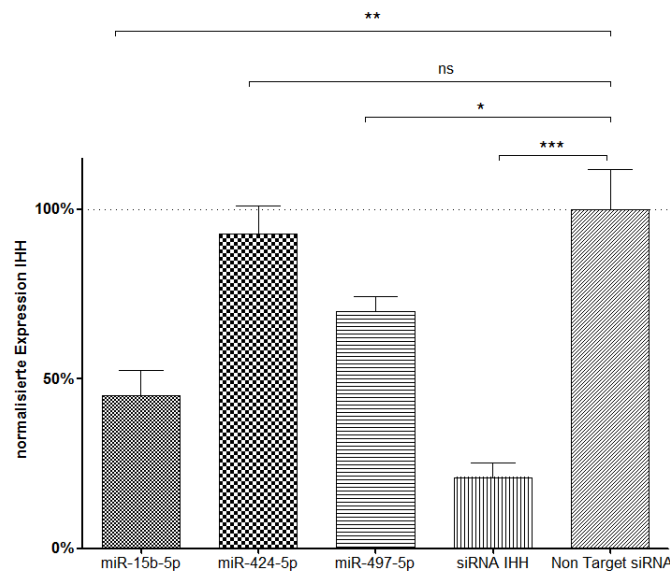


Abb. 3.11.: **IHH mRNA Degradations-Assay in HT-29 Zellen.** Es wurden die miRNA-Mimics hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-424-5p und hsa-miR-497-5p zur Transfektion verwendet. Als Kontrollen dienten eine IHH spezifische siRNA sowie eine Non Target siRNA. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Ergebnisse gemäß ungepaartem t-Test (ns: nicht signifikant, *: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$).

3.7. Langzeit-Kultivierung von HT-29/B6 zur Analyse der IHH-Expression

Die RT-qPCR-Analysen hatten eine niedrige Expression von IHH in HT-29 Zellen gezeigt. Daher erfolgte die Fortführung der Experimente in der Zelllinie HT-29/B6. Es handelt sich

dabei um einen Subklon der HT-29 Zellen, der bei Langzeit-Kultivierung morphologische Merkmale von epithelialen Darmzellen zeigt (Kreusel et al., 1991). Deshalb sollte der Expressionsverlauf von IHH über die Zeit untersucht werden. Sie wurden für drei Wochen ohne Passagieren kultiviert. Ein Medienwechsel erfolgte zweimal die Woche. Es wurden an vier Zeitpunkten (4d, 7d, 15d und 22d nach dem Aussäen der Zellen) sowohl RNA- als auch Proteinproben genommen, um die Expression von IHH und der beiden anderen Liganden DHH und SHH über die Zeit nachverfolgen zu können.

3.7.1. Ergebnis der RT-qPCR zur Analyse der IHH-Expression in langzeit-kultivierten HT-29/B6 Zellen

Die Messung der mRNA für IHH, SHH und die Hedgehog Acyltransferase (HHAT) zeigte einen Anstieg für alle drei Faktoren. DHH wurde ebenfalls innerhalb des Assays untersucht, konnte aber nicht detektiert werden. Die Expression stieg für IHH bis auf das 22-fache des 4-Tage Wertes. Für SHH und HHAT war der Anstieg moderater und erreichte das 4-fache sowie das 2-fache des Ausgangswertes. Die Expressiondaten wurden nach der $\Delta\Delta$ -Cq Methode mit den Referenzgenen GAPDH, ACTb und UBC normalisiert und als Fold Difference dargestellt (Abb. 3.12).

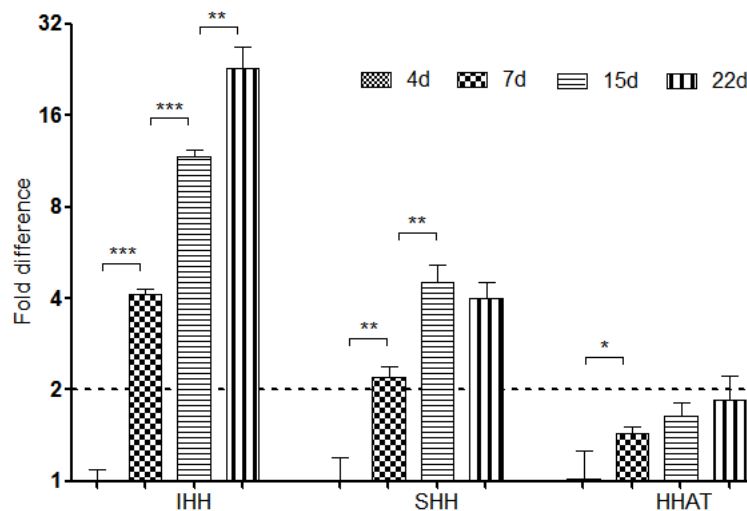


Abb. 3.12.: **Expression von IHH, SHH und HHAT bei langzeit (22 Tage) kultivierten HT-29/B6.** Für alle drei Probenahmen am 7., 15. und 22. Tag konnte in Relation zu Tag 4 für alle drei mRNAs ein Anstieg der Expression festgestellt werden. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Ergebnisse gemäß ungepaartem t-Test (*: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$).

Hierbei fiel aber auch auf, dass SHH ca. vier Cq-Stufen vor IHH den Treshold überschritt und damit insgesamt der am stärksten von HT-29/B6 Zellen exprimierte Hedgehog Ligand war (durchschnittliche Cqs von SHH: $\sim 22,5$ - $21,0$ und IHH: $\sim 26,4$ - $22,1$ (4-22 Tage)).

3.7.2. Ergebnis des Western Blots zur Analyse der IHH-Expression in langzeit-kultivierten HT-29/B6 Zellen

Die Expression von IHH in langzeit-kultivierten HT-29/B6 Zellen wurde neben der Messung der mRNA auch auf Proteinebene durchgeführt. Auch der Western Blot zeigte einen Anstieg von IHH im Zeitverlauf (Abb. 3.13). Die densitometrische Auswertung des Western Blots ergab einen Anstieg von IHH um das 2-fache (7d und 15d) sowie 3-fache (22d) der IHH-Konzentration verglichen mit der 4d Probe.

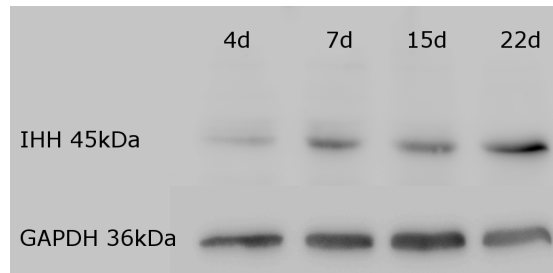


Abb. 3.13.: **Westernblot von IHH bei langzeit (22 Tage) kultivierten HT-29/B6.** IHH wurde in allen vier Proben (4d, 7d, 15d und 22d) nachgewiesen. Im Zeitverlauf zeigte sich ein Anstieg der Expression, während die Ladekontrolle gleiche GAPDH Proteinmengen aufwies.

3.8. IHH in HT-29/B6 Zellen transient transfiziert mit miRNA-Mimics

Die transiente Nukleofektion der HT-29/B6 Zellen mit miRNA-Mimics der miRNA-Familie sollte zeigen, ob ebenso wie im Fall der mRNA in Abschnitt 3.6, auch eine Herabregulation auf Proteinebene feststellbar war. Hierzu wurden die Zellen nukleofiziert und nach 48 h zur Gewinnung der Proteinproben lysiert. Der Western Blot wurde viermal mit Proteinproben aus insgesamt drei unabhängigen Transfektion wiederholt, zeigte aber weder bei den transfizierten miRNA-Mimics, noch bei der IHH spezifischen siRNA einen regulativen Effekt. Auch das mitgeführte Überexpressionsplasmid für IHH zeigte keine sichtbare Steigerung für IHH (Abb.3.14).

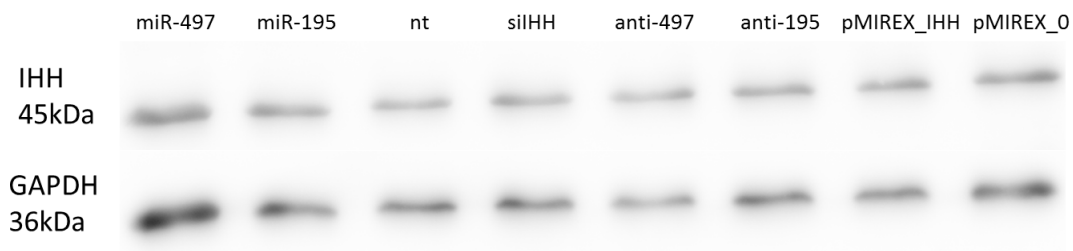


Abb. 3.14.: **Repräsentativer Western Blot für IHH und die Ladekontrolle GAPDH in transfizierten HT-29/B6 Zellen.** Es wurden die miRNA-Mimics hsa-miR-497-5p und hsa-miR-195-5p sowie zwei Inhibitoren zur Transfektion verwendet. Als Kontrollen dienten eine IHH spezifische siRNA, eine Non Target siRNA (nt) sowie ein Überexpressionplasmid + leeres Kontrollplasmid (pMIREX_IHH und 0).

3.9. Expressionsanalyse des Hedgehog Signalwegs im porzinen postnatalen Intestinalgewebe durch mRNA RT-qPCR Arrays

Die *in silico*-Analysen sowie die Ergebnisse der Reporter- und Degradations-Assays wiesen auf eine Verbindung zwischen der miR-15 Familie und dem Hedgehog Signalweg hin. Daher sollten Expressionsdaten aus porzinem Intestinalgewebe einen Einblick in die Regulation des Hedgehog Signalwegs in der postnatalen Darmentwicklung von Ferkeln geben. Mit Hilfe der mRNA RT-qPCR Arrays wurde die Expression von elf bekannten Faktoren des kanonischen Hedgehog Signalwegs im porzinen Kolon und Ileum untersucht. Hierbei konnten zwei Aspekte näher betrachtet werden. Der erste Parameter war die Expression der Faktoren über die Zeit der postnatalen Darmentwicklung zwischen dem 7. und 56. Tag p.p.. Die Probenahme erfolgte bei 7, 14, 28, 31, 35 und 56 Tage alten Tieren. Der zweite Faktor war der Einfluss einer Salmonelleninfektion bei 28 Tage alten Ferkeln im Vergleich zu nicht infizierten Kontrolltieren. Hierbei wurden die Proben 3 h, 71 h sowie 28 Tage p.i. genommen.

3.9.1. Der Hedgehog Signalweg in der porzinen postnatalen Darmentwicklung (Kolon und Ileum)

Die Analyse der Hedgehog-Faktoren in der postnatalen Darmentwicklung im Kolon ergab im Gesamtgewebe eine tendenzielle Abnahme der Expression beinahe aller Gene im Zeitverlauf. Besonders die drei Liganden IHH, DHH und SHH zeigten eine signifikante

graduelle Abnahme der Expression zwischen dem 28. und 31. Tag p.p. um mehr als das 2-fache im Vergleich zu den 7 Tage alten Tieren. Zwischen dem 35. und 56. Tag veränderte sich die Expression von IHH und DHH nicht weiter, während SHH über eine weitergehende Herabregulation um das 5,5-fache nach 35 Tagen und 8-fache nach 56 Tagen zeigte. Der Hedgehog-Rezeptor PTCH1 wies einen moderaten Anstieg über den Zeitverlauf auf, während der PTCH1 assoziierte Rezeptor SMO einen signifikanten Rückgang der Expression ($\approx 1,7$ -fach) zwischen dem 28 und 31 Tag p.p. zeigte (Abb.3.15).

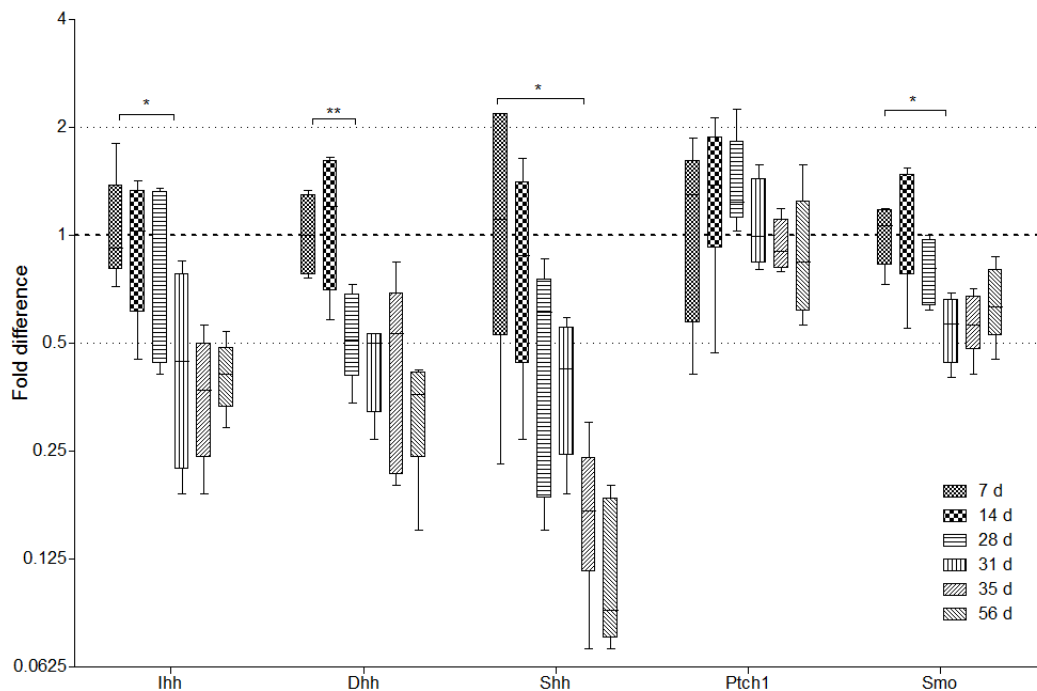


Abb. 3.15.: **Auswertung der mRNA RT-qPCR Arrays der Kontrollferkel (Kolon).** Die Darstellung zeigt die Expression von fünf Faktoren des Hedgehog Signalwegs im porzinen Kolon bei 7, 14, 28, 31, 35 und 56 Tage alten Ferkeln. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Sterne markieren statistisch signifikante Ergebnisse gemäß Man-Whitney- U-Test (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$).

Die beiden Inhibitoren *Suppressor of fused homolog* (SUFU) und *Hedgehog interacting protein* (HHIP) sowie *Dispatched homolog 2* (DISP2) und der Transkriptionsfaktor *GLI1* zeigten eine sehr ähnliche Regulation. Alle vier Faktoren wiesen einen leichten Expressionsanstieg bis zum Tag 28 p.p. mit anschließendem Abfall der Expression unter den Ausgangswert (7 Tage p.p.) auf. Der Transkriptionsfaktor *GLI2* zeigte ebenfalls

eine Reduktion. Der einzige Faktor, dessen Expression im Zeitverlauf vom 7. bis zum 56. Tag statistisch signifikant anstieg, war ein Modulator des Wnt-Signalwegs, Secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1) (Abb. 3.16).

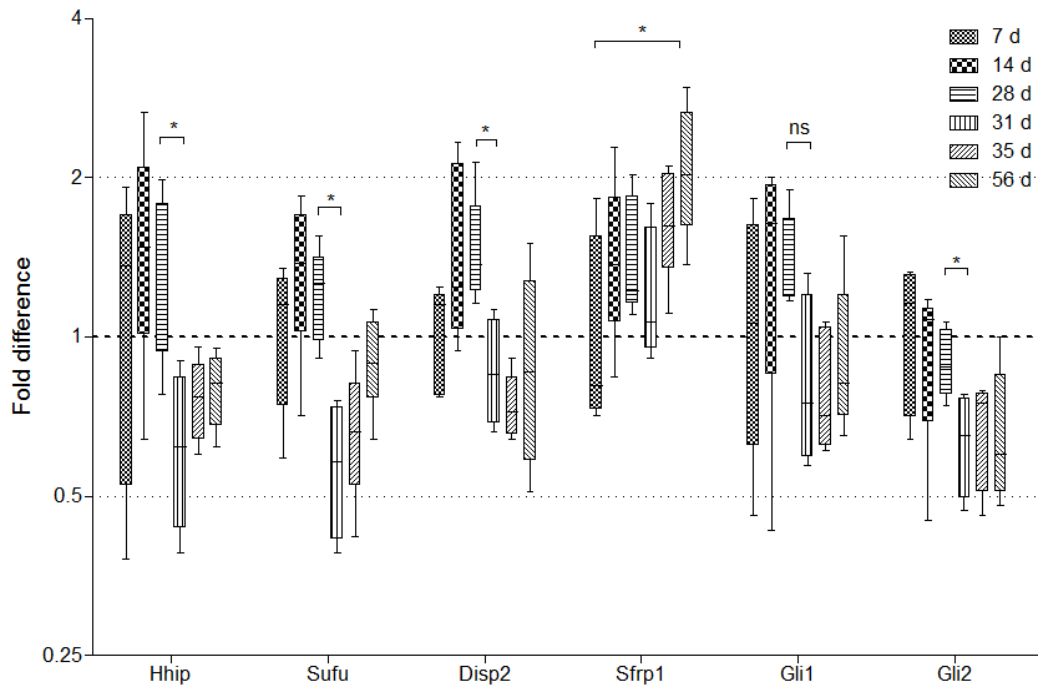


Abb. 3.16.: **Auswertung der mRNA RT-qPCR Arrays der Kontrollferkel (Kolon).** Die Darstellung zeigt die Expression von sechs Faktoren des Hedgehog Signalwegs im porcinen Kolon bei 7, 14, 28, 31, 35 und 56 Tage alten Ferkeln. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Sterne markieren statistisch signifikante Ergebnisse gemäß Man-Whitney- U-Test (ns: nicht signifikant, $*p \leq 0,05$).

Die Expression beinahe aller elf Faktoren zeigte ebenfalls einen Rückgang im Ileum über den Zeitverlauf. Hier zeigte sich der größte Abfall der Expression zwischen dem 14. und 28. Lebenstag der Ferkel. Die größte Herabregulation zeigten die drei Liganden sowie SMO. GLI1 und GLI2 zeigten einen Expressionsrückgang zwischen dem 14. und 28. Lebenstag, die mRNA von GLI2 stieg anschließend wieder leicht an. Der Hedgehog-Rezeptor PTCH1 sowie auch SUFU wiesen ebenfalls die Tendenz einer Reduktion auf, erreichten aber nicht so starke Unterschiede im Vergleich zu den 7 Tage alten Tieren wie die übrigen Faktoren. Erneut war ein Anstieg der Expression von SFRP1 zu erkennen. Zusätzlich konnte auch ein Anstieg der detektierbaren mRNA von DISP2 beobachtet werden (Abb. 3.17).

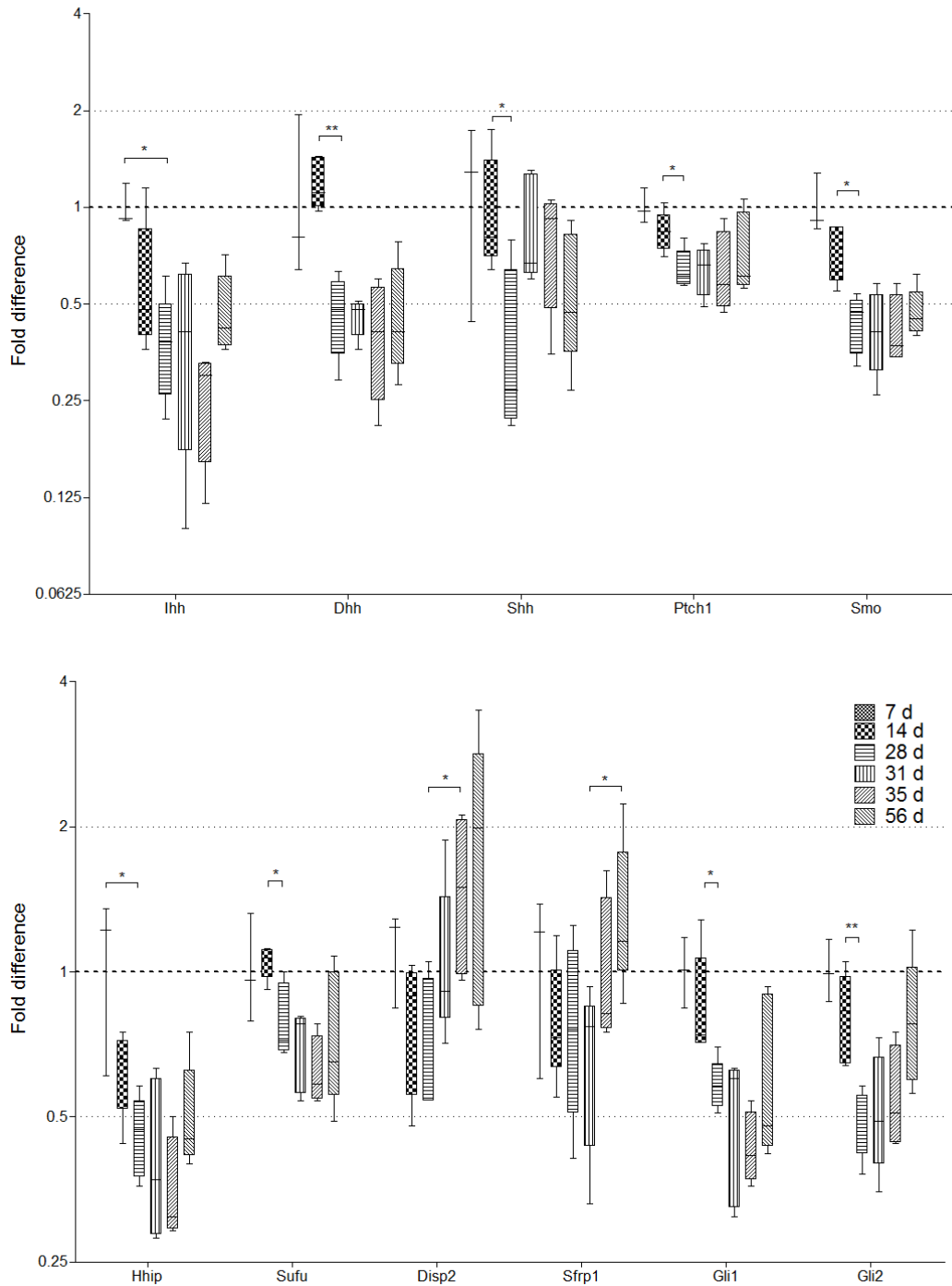


Abb. 3.17.: **Auswertung der mRNA RT-qPCR Arrays der Kontrollferkel (Ileum).** Die Darstellung zeigt die Expression von elf Faktoren des Hedgehog Signalwegs im porzinen Ileum bei 7, 14, 28, 31, 35 und 56 Tage alten Ferkeln. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Sterne markieren statistisch signifikante Ergebnisse gemäß Man-Whitney- U-Test (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$).

3.9.2. Der Hedgehog Signalweg in mit Salmonellen infizierten Ferkeln im Vergleich zu nicht infizierten Tieren (Kolon und Ileum)

Es wurden die bereits in der postnatalen Entwicklung betrachteten elf Faktoren untersucht. Hierbei wurden drei unterschiedliche Zeitpunkte betrachtet: 3 h, 71 h sowie 28 Tage p.i.. Die Proben der infizierten Tiere wurden jeweils im Vergleich mit gleichaltrigen Tieren ohne Infektion analysiert. Im Kolon der Tiere war auf diese Weise keine Regulation der elf Hedgehog-assoziierten Faktoren zu erkennen. Auf Grund von individuellen Unterschieden innerhalb der Stichprobe waren leichte Schwankungen zu erkennen, die aber keinen eindeutigen Trend aufwiesen und auch nicht statistisch signifikant waren (Abb. 3.18 und 3.19).

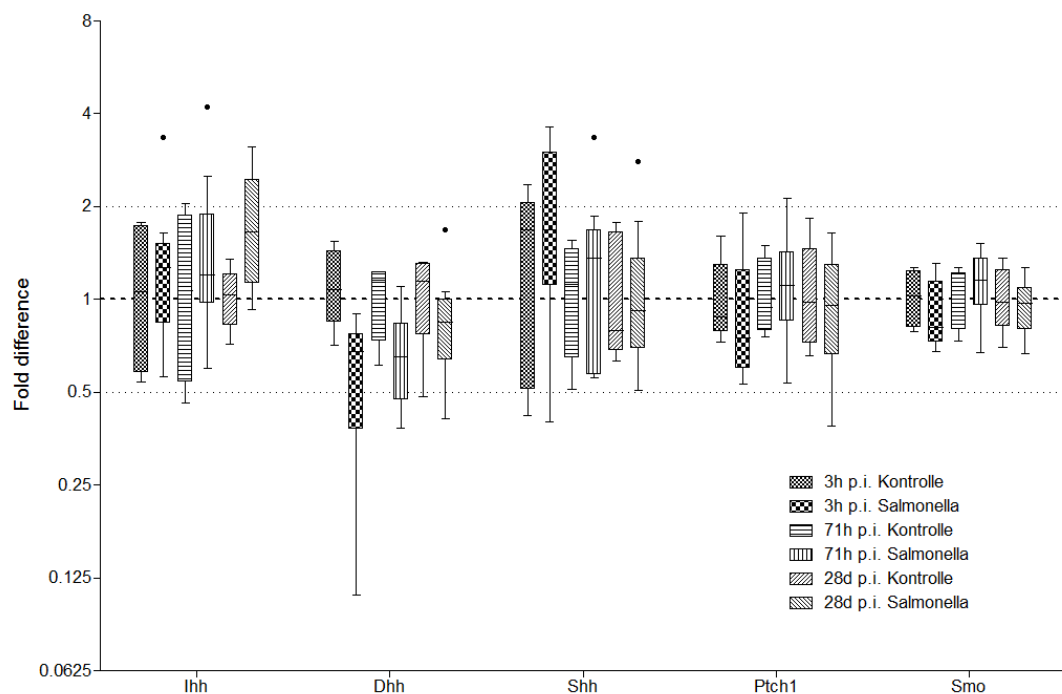


Abb. 3.18.: **Auswertung der mRNA RT-qPCR Arrays des Vergleichs von mit *Salmonella* infizierten sowie Kontrollferkeln (Kolon).** Die Darstellung zeigt die Expression von fünf Faktoren des Hedgehog Signalwegs im porzinen Kolon bei 28, 31 und 56 Tage alten Ferkeln. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Es konnten keine signifikanten Ergebnisse gemäß Man-Whitney- U-Test festgestellt werden. Extremwerte sind durch einen Punkt (●) gekennzeichnet.

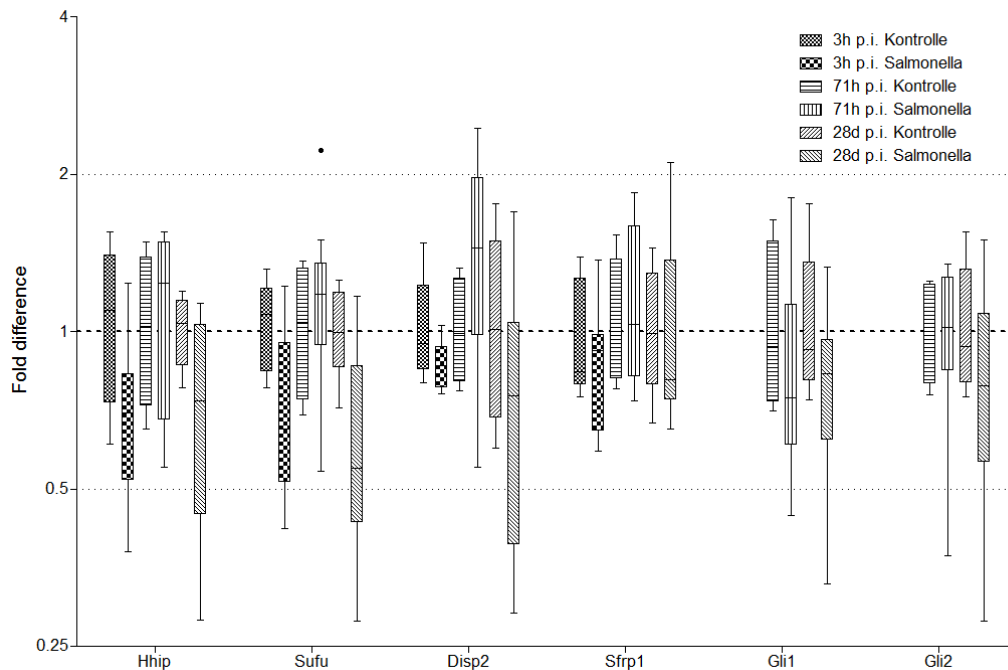


Abb. 3.19.: **Auswertung der mRNA RT-qPCR Arrays des Vergleichs von mit *Salmonella* infizierten sowie Kontrollferkeln (Kolon).** Die Darstellung zeigt die Expression von sechs Faktoren des Hedgehog Signalwegs im porzinen Kolon bei 28, 31 und 56 Tage alten Ferkeln. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Es konnten keine signifikanten Ergebnisse gemäß Man-Whitney- U-Test festgestellt werden. Extremwerte sind durch einen Punkt (●) gekennzeichnet.

Im Ileum dagegen waren regulative Prozesse zu beobachten. Die drei Hedgehog Liganden zeigten zwar keinen Trend für eine verstärkte oder abgeschwächte Expression aber die restlichen acht Faktoren (PTCH1, SMO, HHIP, SUFU, DISP2, SFRP1, GLI1 und GLI2) zeigten in den infizierten Tieren eine tendenzielle Herabregulation. Statistisch signifikant war für alle acht Faktoren bis auf PTCH1 der Unterschied der Expression zwischen Kontroll- und *Salmonella*-Gruppe bei 3 h und 28 Tage p.i.. Auch 71 h p.i. zeigte sich diese Tendenz, diese war aber nicht statistisch signifikant (Abb. 3.20). Eine weitere Beobachtung war, dass die Expressionsdaten der *Salmonella* infizierten Tiere teilweise eine erhöhte Heterogenität aufwiesen (markierte Extremwerte in den Abb. (3.18, 3.19 und 3.20). Zur Normalisierung der Expressionsdaten wurden drei Referenzgene verwendet: GAPDH, UBC und TBP. Diese zeigten bei allen vier Analysen (postnatale Darmentwicklung in Ileum und Kolon sowie Salmonelleninfektion in Ileum und Kolon) keine Auffälligkeiten oder regulierte Expression (Daten nicht gezeigt).

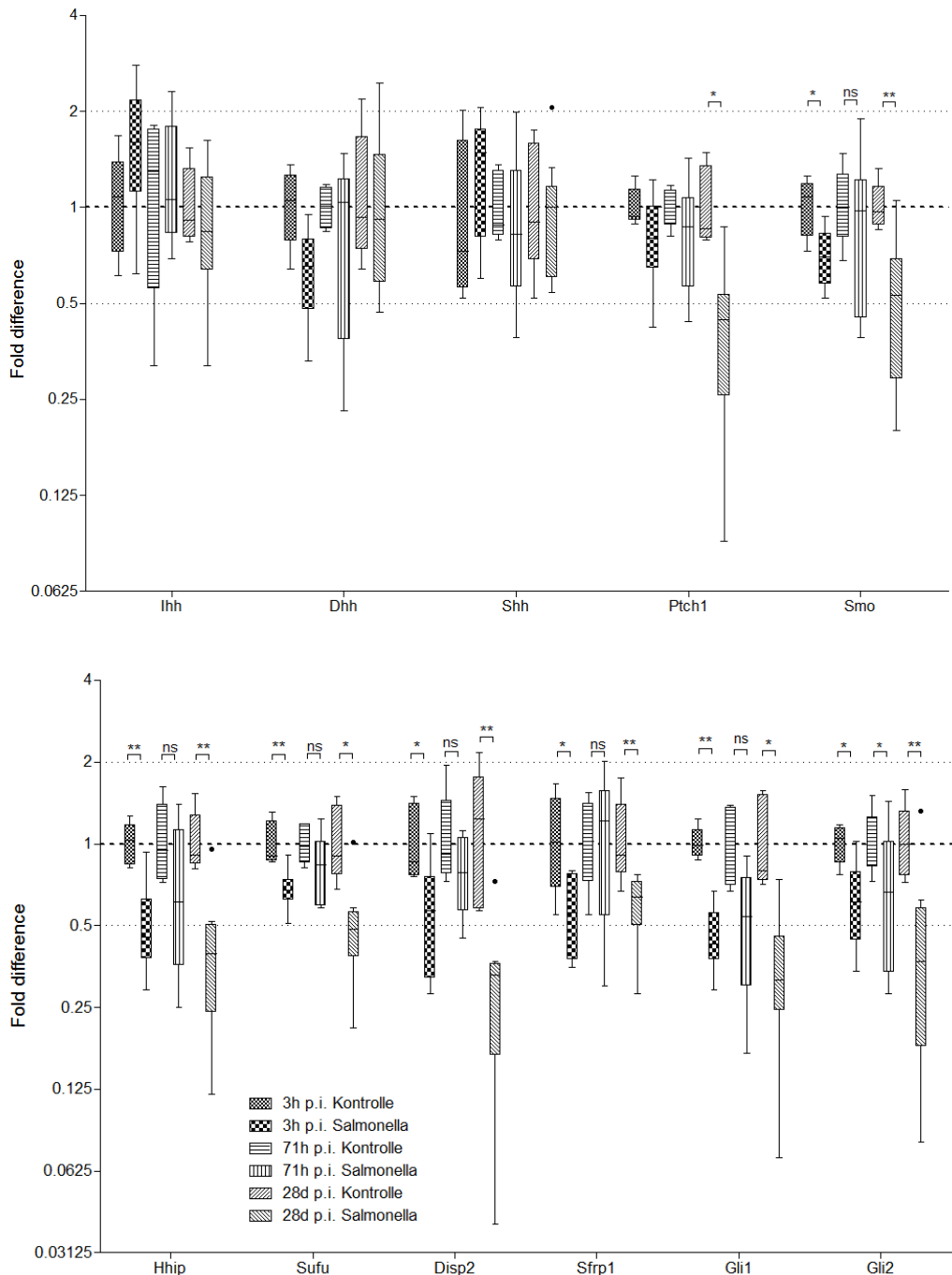


Abb. 3.20.: **Auswertung der mRNA RT-qPCR Arrays des Vergleichs von mit *Salmonella* infizierten sowie Kontroll- Ferkeln (Ileum).** Die Darstellung zeigt die Expression von elf Faktoren des Hedgehog Signalwegs im porzinen Ileum bei 28, 31 und 56 Tage alten Ferkeln. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Sterne markieren statistisch signifikante Ergebnisse gemäß Man-Whitney- U-Test (ns: nicht signifikant, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$). Extremwerte sind durch einen Punkt (●) gekennzeichnet.

3.10. Expressionsanalyse der miR-15 Familie im porzinen postnatalen Kolon durch miRNA RT-qPCR Arrays

Für die Expressionsanalyse der miRNA-Familie im Kolon bei 7 bis 56 Tage alten Ferkeln, wurden Oligonukleotide für alle Mitglieder der Familie entworfen. Die Amplifikation von ssc-miR-424 und ssc-miR-497 befand sich außerhalb der Detektionsgrenzen. Daher konnten diese beiden miRNAs nicht ausgewertet werden. Auf Grund der hohen Sequenzhomologie zwischen ssc-miR-15b und ssc-miR-15a wurden die beiden miRNAs gemeinsam gemessen. Die miRNAs miR-15a/b zeigten keinen statistisch signifikanten Anstieg der Expression bis zum Tag 28 p.p., aber eine auffällige Reduktion auf den Ausgangswert zwischen Tag 28 und 31. Die Expression stieg dann wieder graduell bis Tag 56 an. miR-16 zeigte keine deutliche Änderung der Expression. Signifikant erhöht war die Expression von ssc-miR-195 mit einem Anstieg bis zum 4-fachen des Ausgangswertes von Tag 7 bis Tag 56. Hierbei ereignete sich der Expressionsanstieg zwischen den Tagen 7, 14 und 28 mit einer Plateauphase zwischen den Tagen 28, 31 und 35 und einem erneuten Anstieg zwischen dem 35. und 56. Tag (Abb. 3.21).

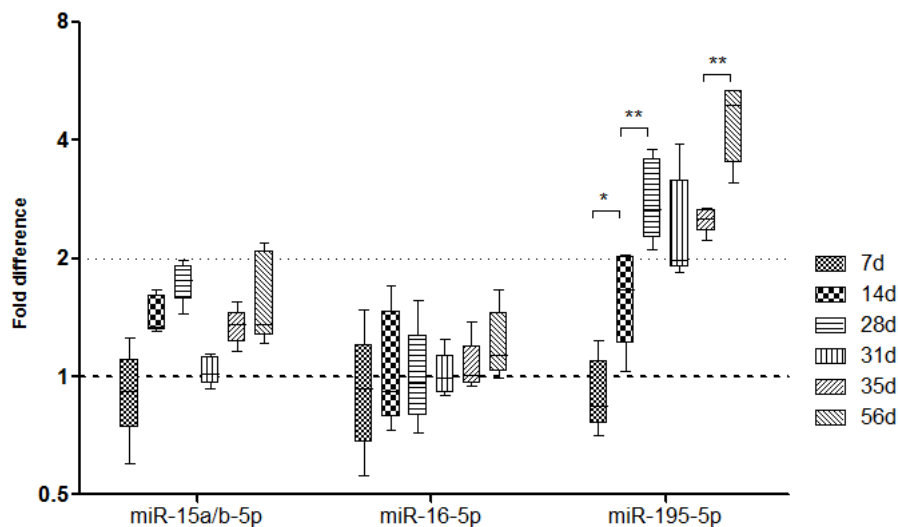


Abb. 3.21.: **Auswertung der miRNA RT-qPCR Arrays der Kontrollferkel (Kolon).** Die Darstellung zeigt die Expression der miRNAs ssc-miR-15a/b, ssc-miR-16 und ssc-miR-195 im porzinen Kolon bei 7, 14, 28, 31, 35 und 56 Tage alten Ferkeln. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung. Sterne markieren statistisch signifikante Ergebnisse gemäß Man-Whitney- U-Test (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$).

3.11. Lokalisierung der miRNA-Familie im porzinen postnatalen Kolongewebe durch *in situ* Hybridisierung

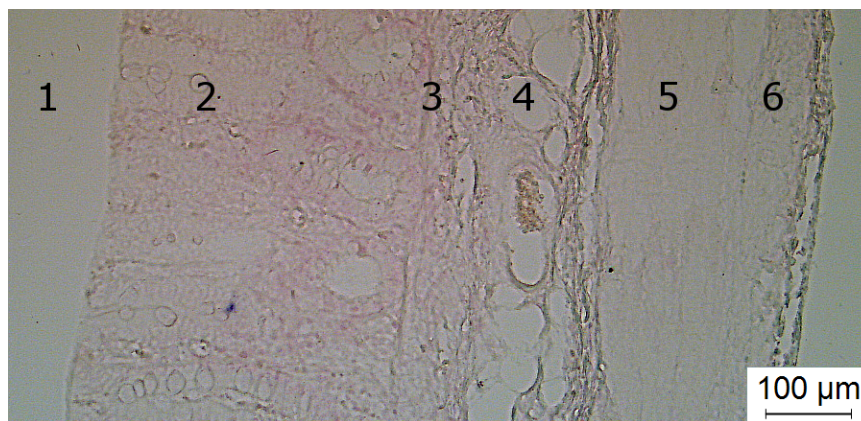


Abb. 3.22.: **Anatomische Nomenklatur für die *in situ* Hybridisierung.** Darstellung der Orientierung und verwendeten Nomenklatur für die intestinalen Gewebeschichten anhand eines repräsentativen Ausschnittes. 1: Darmlumen; 2: Tunica mucosa mit einschichtigem Säulenepithel, Becherzellen und der Lamina propria; 3: Lamina muscularis mucosae (Muskelschicht); 4: Tela submucosa mit Bindegewebe und Blutgefäßen; sowie die quer- und längsgestreifte Muskulatur (Tunica muscularis) mit 5: Stratum circulare; 6: Stratum longitudinale. Die Zellkerne sind durch die Verwendung von Nuclear Fast RedTM (Sigma Aldrich GmbH) rot gefärbt.

Im Anschluss an die Quantifizierung der Expression des Hedgehog Signalwegs und der miR-15 Familie sollte die Lokalisation von IHH und den miRNAs ssc-miR-15b, ssc-miR-195 und ssc-miR-497 im intestinalen Gewebe untersucht werden. Die ISH der Sektionen des Kolons von 14, 31 und 56 Tage alten Ferkeln ergab für miR-15b nur vereinzelt angefärbte Zellen im Gewebe. Hierbei war zu erkennen, dass die Muskelschichten des Darms nicht angefärbt waren (Lamina muscularis mucosae und Tunica muscularis). Die einzelnen angefärbten Zellen befanden sich besonders bei den 14 Tage alten Tieren im Bereich der Lamina propria und bei den 56 Tage alten Tieren in der Tela submucosa (Abb. 3.24). Die ISH für miR-195 zeigte dagegen ein stärkeres Signal. In Übereinstimmung mit der Quantifizierung von miR-195 in den miRNA-qPCR Arrays nahm auch bei der ISH die Intensität der Färbung im zunehmenden Alter des Tieres zu. Die Lokalisation der Expression erstreckte sich beinahe ubiquitär über alle Gewebeschichten des Kolon, wobei

die Färbung in den Muskelschichten nur einzelne Zellen umfasste und nicht das gesamte Gewebe (Abb. 3.25). Die ISH für miR-497 zeigte Parallelen zur ISH von miR-15b. Auch hier war nur eine relativ schwache Färbung für die miRNA zu erkennen. Dennoch war zu sehen, dass sie schwach in der Lamina propria und vor allem in der Tela submucosa detektiert werden konnte. Auch in der Tunica muscularis sind für miR-497 angefärbte Zellen zu erkennen. Ähnlich wie bei miR-195 erstreckt sich die Färbung aber nicht über das komplette Muskelgewebe, sondern ist auf einzelne Zellen beschränkt. Der Vergleich der Altersstufen ergab die intensivste Färbung im Alter von 31 Tagen, vor allem in der Tela submucosa (Abb. 3.26). Zur Kontrolle des ISH Protokolls wurde für jede Altersstufe eine Positivkontrolle in Form der miRNA miR-34a sowie eine scrambled miRNA als Negativkontrolle mitgeführt (Abb. 3.23). Die Positivkontrolle zeigte, abhängig vom Alter der Tiere, unterschiedliche Expressionsmuster und konnte in allen Schnitten detektiert werden.

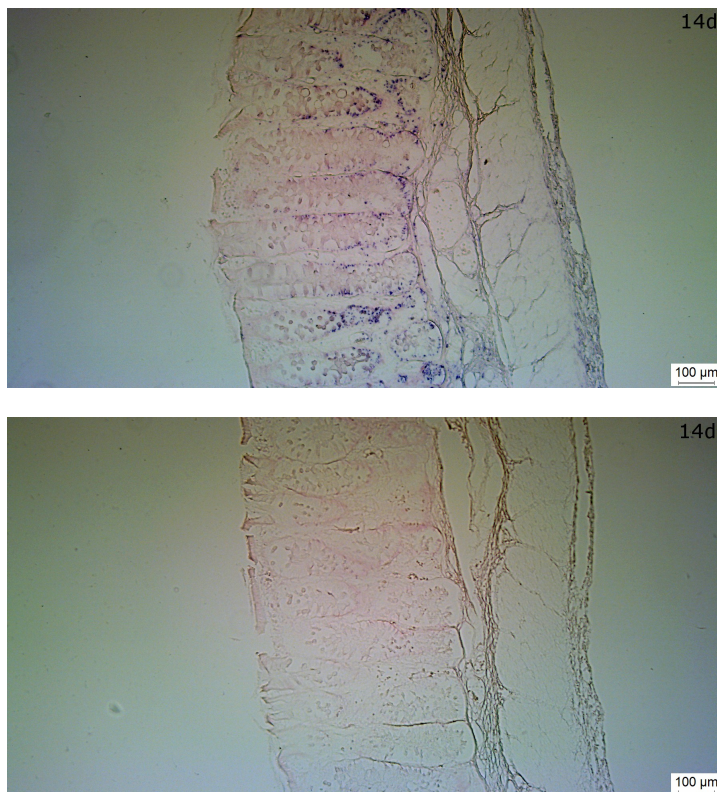


Abb. 3.23.: **Repräsentative Positivkontrolle sowie Negativkontrolle der ISH im Kolon von 14 Tage alten Ferkeln.** Die gefärbten Sektionen (100-fache Vergrößerung) zeigen eine repräsentative Auswahl der Positivkontrolle (oben) und der Negativkontrolle (unten). Detektierte miRNAs sind am blauen Präzipitat zu erkennen.

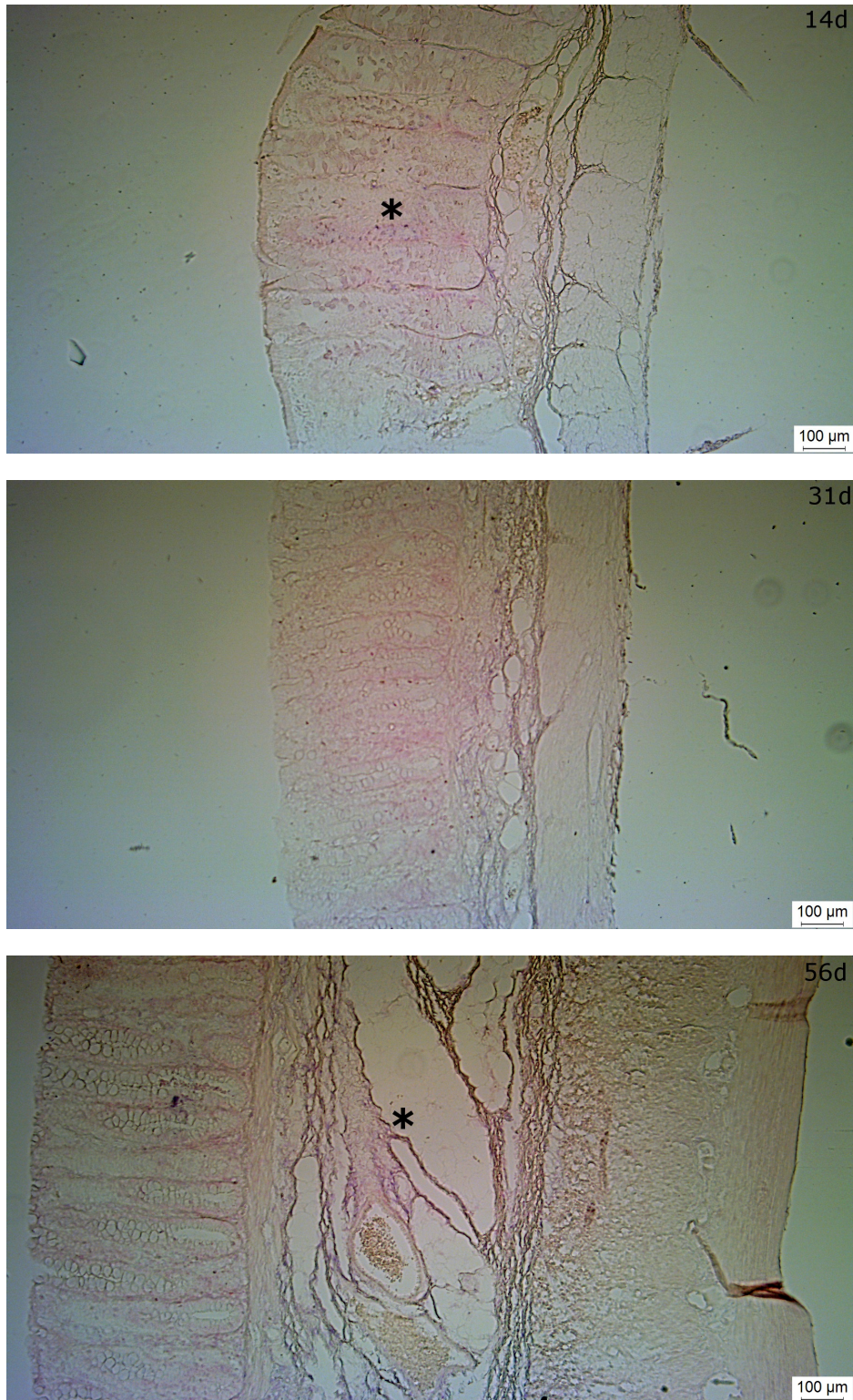


Abb. 3.24.: ISH von miR-15b im Kolon von 14, 31 und 56 Tage alten Ferkeln. Die gefärbten Sektionen (100-fache Vergrößerung) sind von oben nach unten nach ansteigendem Alter angeordnet. Detektierte miRNAs sind am blauen Präzipitat zu erkennen. Sterne markieren die gefärbten Gewebe (*).

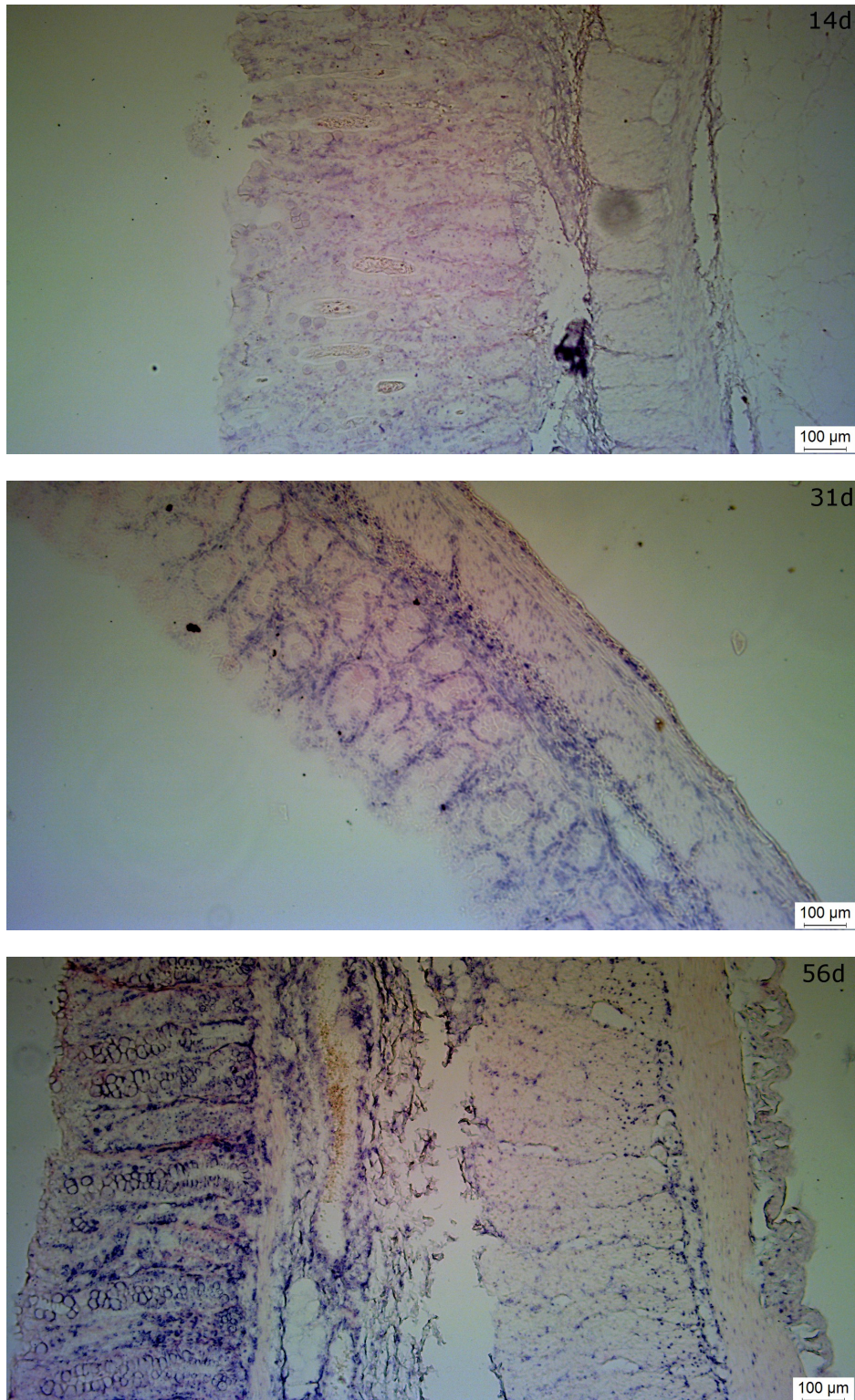


Abb. 3.25.: ISH von miR-195 im Kolon von 14, 31 und 56 Tage alten Ferkeln. Die gefärbten Sektionen (100-fache Vergrößerung) sind von oben nach unten nach ansteigendem Alter angeordnet. Detektierte miRNAs sind am blauen Präzipitat zu erkennen.

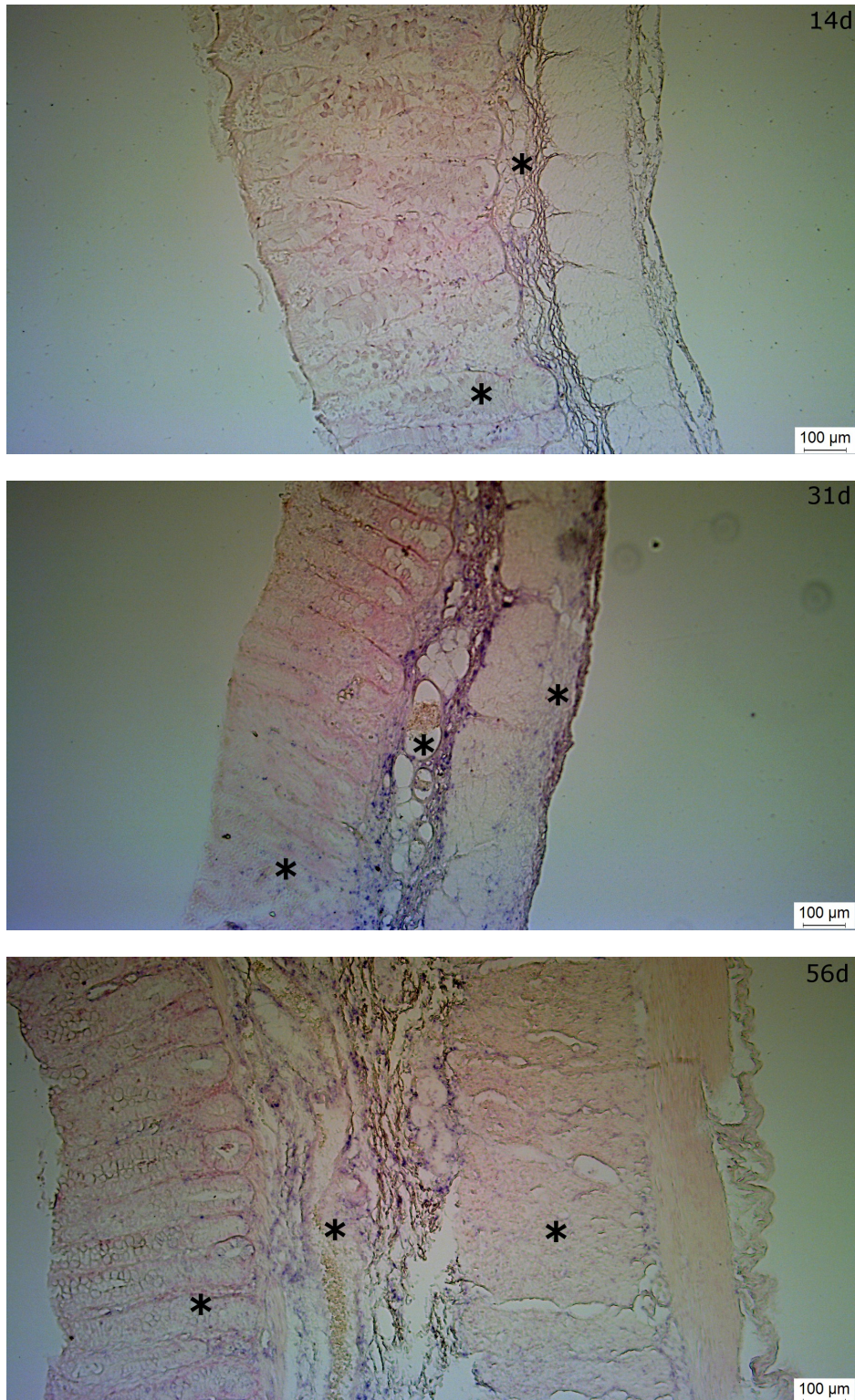


Abb. 3.26.: ISH von miR-497 im Kolon von 14, 31 und 56 Tage alten Ferkeln. Die gefärbten Sektionen (100-fache Vergrößerung) sind von oben nach unten nach ansteigendem Alter angeordnet. Detektierte miRNAs sind am blauen Präzipitat zu erkennen. Sterne markieren die gefärbten Gewebe (*).

3.12. Lokalisierung von IHH im porzinen, intestinalen Gewebe durch Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung von IHH im porzinen Kolon im Verlauf der Entwicklung von Tag 7 bis Tag 56 zeigte bei 100-facher Vergrößerung eine klare Färbung des muskulären Gewebes in allen Sektionen (Lamina muscularis mucosae und Tunica muscularis). Die Detektion von IHH beschränkte sich bei den 7 und 14 Tage alten Tieren auf diese Gewebeschichten. Ab dem 28. Lebensstag konnte zusätzlich eine Expression von IHH im darmlumennahen Gewebe der Lamina propria beobachtet werden (Abb. 3.29, gelbe Pfeile).

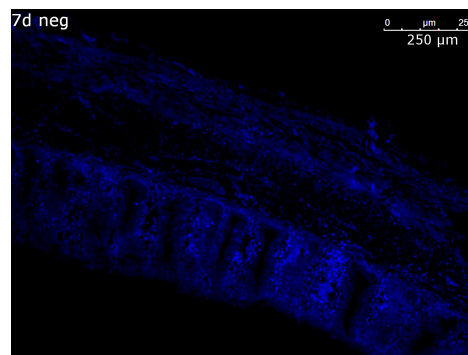


Abb. 3.27.: **Negativkontrolle für die immunhistochemische Detektion von IHH im Kolon von 7 Tage alten Ferkeln.** Repräsentatives Bild (100-fache Vergrößerung) einer Negativkontrolle bei der nur die blaue DAPI Färbung der Zellkerne zu erkennen ist.

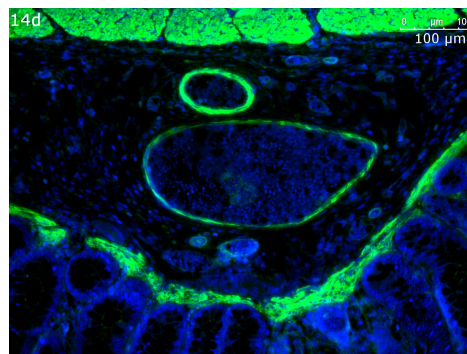


Abb. 3.28.: **IHH-Detektion in der Tela submucosa bei 14 Tage altem Ferkel.** Repräsentatives Bild (200-fache Vergrößerung) angefarbter Gefäße innerhalb der Tela submucosa des porzinen Kolons. Die Färbung von IHH ist in Grün und die DAPI-Färbung der Zellkerne in Blau dargestellt.

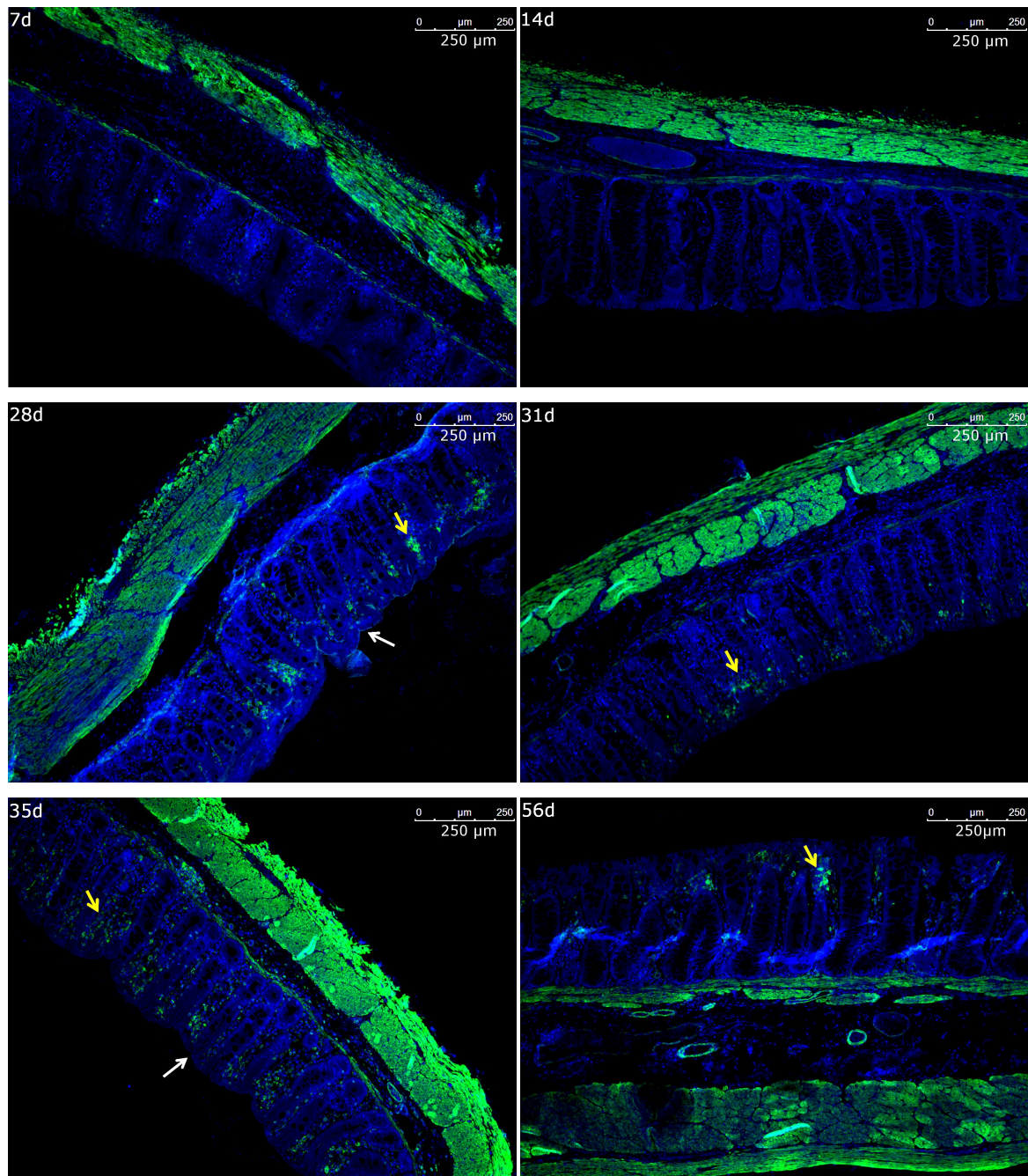


Abb. 3.29.: Immunhistochemische Detektion von IHH im Kolon von 7-56 Tagen alten Ferkeln. Die gefärbten Sektionen (100-fache Vergrößerung) sind von links nach rechts sowie von oben nach unten mit ansteigendem Alter angeordnet. Die Färbung von IHH ist in Grün und die DAPI-Färbung der Zellkerne in Blau dargestellt. Gelbe Pfeile markieren beispielhaft gefärbte mesenchymale Bereiche, weiße Pfeile gefärbtes Epithel.

Noch genauer war diese Entwicklung bei 200-facher Vergrößerung zu sehen. Hier war sehr deutlich die Färbung der mesenchymalen Zellen der Lamina propria erkennbar. Zusätzlich zeigte sich in allen Schnitten, dass die Gefäßwände innerhalb der Tela submucosa eine deutliche IHH-Färbung aufwiesen (Abb. 3.28). In einigen Schnitten konnte auch eine feine apikale Linie am einschichtigen Säulenepithel detektiert werden (weiße Pfeile). Während in Abb. 3.31 im Alter von 35 d die Färbung vor allem luminal zu sehen ist, zeigt sich besonders in Abb. 3.30 bei dem 14 d alten Tier eine apikale Anfärbung der Epithel- und Becherzellen innerhalb einer gespreizten Darmkrypte (weißer Stern).

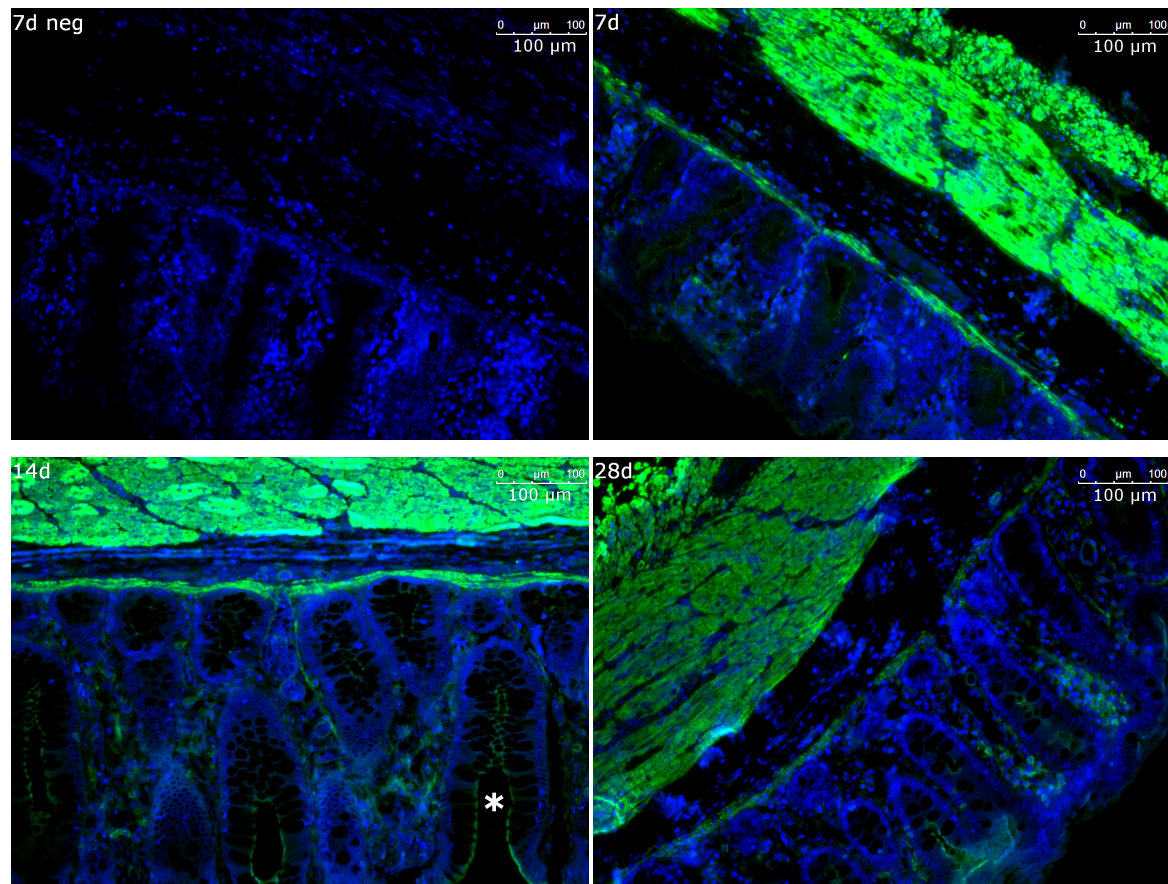


Abb. 3.30.: **Immunhistochemische Detektion von IHH im Kolon von 7-28 Tagen alten Ferkeln.** Die gefärbten Sektionen (200-fache Vergrößerung) sind von links nach rechts sowie von oben nach unten mit ansteigendem Alter angeordnet. Die Färbung von IHH ist in Grün und die DAPI-Färbung der Zellkerne in Blau dargestellt. Die Negativkontrolle oben links zeigte keine IHH-spezifische Färbung.

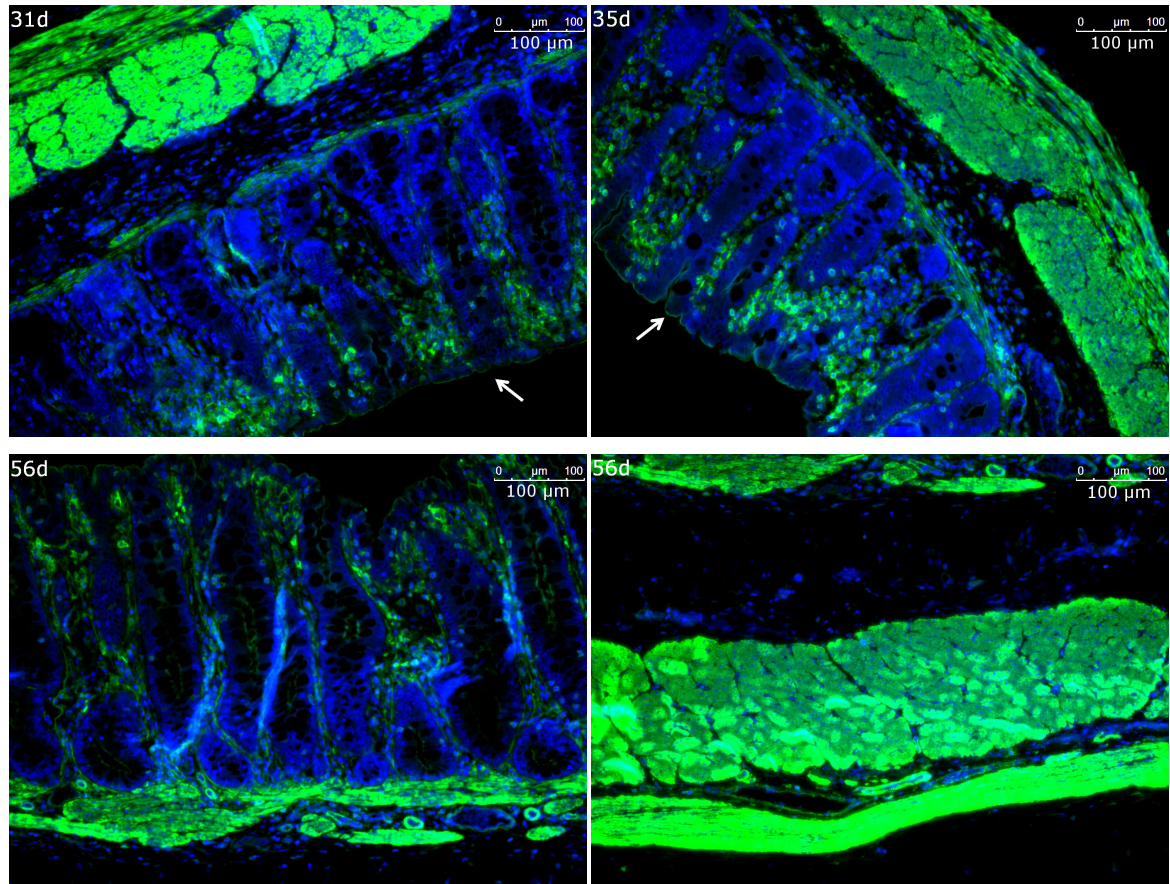


Abb. 3.31.: **Immunhistochemische Detektion von IHH im Kolon von 31-56 Tagen alten Ferkeln.** Die gefärbten Sektionen (200-fache Vergrößerung) sind von links nach rechts sowie von oben nach unten mit ansteigendem Alter angeordnet. Die Färbung von IHH ist in Grün und die DAPI-Färbung der Zellkerne in Blau dargestellt. Weiße Pfeile markieren beispielhaft gefärbtes Epithel.

4. Diskussion

Die molekularen Signalkaskaden und Netzwerke in der Ausbildung und Aufrechterhaltung eines gesunden Intestinaltraktes von Vertebraten sind bisher nur zum Teil entschlüsselt worden. In dieser Arbeit wurde die Lokalisation wichtiger Komponenten des Hedgehog Signalwegs sowie deren Regulation durch miRNAs in der postnatalen Darmentwicklung des Schweins untersucht. Die Interaktion der miRNA-Familie miR-15a/15b/16/195/424/497, mit der Zielsequenz innerhalb der IHH- 3' UTR, kann in zwei Kategorien unterteilt werden: Die Seed Sequenzen der miRNAs sind identisch, aber das erste 5'-Nukleotid der miRNAs unterscheidet sich. Das erste Nukleotid von miR-15a-5p, miR-15b-5p, miR-16-5p und miR-195-5p ist ein Adenin, während die miRNAs miR-424-5p und miR-497-5p mit einem Cytosin beginnen. Aus diesem Grund wird die Bindung der miRNAs mit Adenin als erstem Nukleotid als 8-mer Typus und die Bindung der miRNAs mit Cytosin als erstem Nukleotid als 7-mer-m8 Typus bezeichnet. Neben dem 8-mer Typus scheint der 7-mer-m8 Typus dabei die höchste Effizienz bei der Herabregulation eines Zielgens aufzuweisen. Zwei weitere Bindungstypen sind beschrieben: Der 7-mer-A1 und der 6-mer Typus, die mit geringer Wahrscheinlichkeit eine Regulation bewirken (Grimson et al., 2007). Ein weiteres Kriterium für die Spezifität der miRNA-Familienmitglieder ist die 3'-Region der miRNA (Brennecke et al., 2005). Die errechneten Bindungsmuster der miR-15 Familie zur IHH-3' UTR in Abbildung 3.2 weisen offensichtliche Unterschiede auf. Auf Grund der verschiedenen 3'-Regionen der miRNA-Familienmitglieder entstehen bei der Bindung zur IHH-3' UTR unterschiedlich positionierte Schlaufen mit ebenfalls unterschiedlichen Größen. Dies wirkt sich auf die Stabilität der miRNA:mRNA Bindung und die Initiation des assoziierten Proteinkomplexes RISC aus (Haley and Zamore, 2004). Die daraus resultierenden tatsächlichen regulativen Effizienzen der miRNAs sind schwer vorherzusagen, werden sich aber zwischen den miRNAs unterscheiden. Dennoch können alle sechs Bindungen als kanonisch betrachtet werden, da sowohl die Seed- als auch die 3'-Regionen der miRNAs eine ausreichende Komplementarität zur Zielsequenz aufweisen (Filipowicz et al., 2008).

Die exakte Zielsequenz innerhalb einer mRNA hat also distinkte Auswirkungen auf die Bindung von miRNAs. Um für den Modellorganismus Schwein die benötigten 3' UTR-

Sequenzen zu erhalten wurde die neue 3' RACE Methode SLURP im Rahmen dieser Arbeit entwickelt. Hierdurch konnten komplette 3' UTRs amplifiziert und sequenziert werden. Auf Grund der Kombination aus Stem Loop-Primer, linearer Anfangsamplifikation und der Verwendung eines Nested PCR Protokolls war es möglich, spezifisch auch schwach exprimierte Transkripte mit einer Länge bis zu 1500 bp zu amplifizieren. Da für die cDNA-Synthese und zur Amplifikation der PCR-Produkte eine übliche M-MuLV Reverse Transkriptase sowie eine Taq-Polymerase verwendet wurden, ist die Amplifikation deutlich längerer 3' UTRs mit entsprechend spezialisierten Enzymen möglich. Die vollständige Sequenzierung einer 3' UTR ist von Bedeutung, da sich darin mehrere Zielsequenzen einer oder mehrerer miRNAs befinden können.

Zur Analyse multipler Interaktionen einer miRNA mit der 3' UTR einer mRNA wurde das SMAP-Protokoll entwickelt. Durch diese Methode war es möglich, schnell und effizient, lange Sequenzen zu amplifizieren und die darin enthaltenen miRNA-Zielsequenzen gezielt zu mutagenisieren. Am Beispiel der humanen und porzinen CASP7 konnte anschaulich gezeigt werden, dass unterschiedliche Zielsequenzen voneinander abweichende regulative Effizienzen aufweisen. Ebenfalls wurden hier synergistische Effekte der beiden humanen Zielsequenzen deutlich. Während die erste Zielsequenz evolutiv konserviert zu sein scheint, konnte die zweite humane Zielsequenz nur schwach erhalten in der porzinen 3' UTR wiedergefunden werden (Bohmer et al., 2013). Auf diese Weise können sich die regulativen Effekte einer miRNA auf Zielgene und Signalwege deutlich unterscheiden.

Die für die Regulation von Proliferation, Apoptose und Zelldifferenzierung verantwortlichen Signalwege spielen eine wichtige Rolle beim Aufbau und der Aufrechterhaltung eines gesunden Gleichgewichts im Intestinaltrakt. Vorläuferzellen unterlaufen auf ihrer Wanderung von den Darmkrypten zum Lumen differenzierende Prozesse. Ausdifferenzierte Epithelzellen verbleiben nicht lange an der Villusspitze, sondern werden von nachrückenden proliferierenden Zellen verdrängt und durchlaufen eine Apoptose (Heerdt et al., 1994). Der aktive Hedgehog Signalweg besitzt eine wichtige anti-proliferative und differenzierungsfördernde Wirkung. Seine Hemmung bewirkt die Aktivierung der Caspasen 3/7, wodurch apoptotische Prozesse eingeleitet werden (Sicklick et al., 2005; Yang et al., 2008). Interessanterweise ist die miR-15 Familie als Regulator von Zellzyklus und Apoptose-assoziierten Faktoren wie BCL2, CCND2 und CDC42 bekannt (Yadav et al., 2011; Zhu et al., 2012; Fu et al., 2013). Daher stellte sich die Frage, ob der Hedgehog Signalweg ebenfalls durch die miRNA-Familie reguliert wird.

Innerhalb der 3' UTR des Hedgehog Signalpeptids IHH wurde eine einzelne Zielsequenz für die miR-15 Familie vorhergesagt. Daher wurden die im Folgenden durchgeführten Reporter-gen-Assays für IHH nicht mit der kompletten porzinen und humanen 3' UTR

durchgeführt. Stattdessen wurden kurze Oligonukleotide zur Herstellung der Reporterplasmide verwendet. Die Analyse der Zielsequenz mittels Targetscan zeigte eine hohe evolutive Konservierung dieser DNA-Sequenz innerhalb der Mammalia. Bei hochkonservierten Sequenzen wie dieser wird eine starke Wahrscheinlichkeit als *bona fide* Ziel der entsprechenden miRNA vermutet (Lewis et al., 2005). In Übereinstimmung mit den bioinformatischen Vorhersagen konnte im Luziferase Reporter-Gen-Assay für miR-424-5p, miR-15b-5p, miR-195-5p und miR-497-5p ein regulativer Einfluss auf IHH gezeigt werden. Auf diese Weise wurden je zwei Vertreter der miRNA-Familie von 8-mer und 7-mer-m8 Interaktionstypen getestet. Die miRNA miR-497-5p wies die bioinformatisch höchste Affinität zur Zielsequenz auf und zeigte auch in den Reporter-Gen-Assays die höchste Herabregulation des Reporterkonstruktes. Die Verwendung dieses Versuchsansatzes zur Identifizierung und Validierung von miRNA-Zielsequenzen innerhalb einer mRNA 3' UTR ist ein vielfach angewandtes und anerkanntes Verfahren (Jin et al., 2013).

Interessanterweise konnte für die Hedgehog Acyltransferase (HHAT) eine vielversprechende Interaktion mit dem 3'-Strang des miR-497-Vorläufermoleküls (miR-497-3p) bioinformatisch ermittelt werden. Die drei Hedgehog Signalproteine unterlaufen innerhalb der exprimierenden Zelle eine autoproteolytische Spaltung (Kornberg, 2011). Das dabei entstehende N-terminale Peptid muss zur Interaktion mit der Zellmembran und der anschließenden Sekretion durch die Hedgehog Acyltransferase modifiziert werden (Palmitoylierung). Bleibt diese Modifikation aus, kann kein aktives Hedgehog Signalpeptid sekretiert werden und der Signalweg ist unterbrochen (Chamoun et al., 2001). Obwohl meist nur ein Strang des miRNA-Vorläufermoleküls präferiert in den RISC aufgenommen wird, kann bisweilen auch der zweite Strang in physiologisch relevanter Konzentration in der Zelle vorgefunden werden (Okamura et al., 2008; Yang et al., 2011). So könnte es sich um einen synergistischen Regulationseffekt von IHH, HHAT und den beiden reifen miRNAs (miR-497-5p und miR-497-3p) handeln, wie es in wenigen Publikationen für andere Moleküle bereits gezeigt werden konnte (Wu et al., 2013). Innerhalb dieser Studie konnte die Untersuchung dieser Interaktion nicht weiter vertieft werden.

Die weitere *in vitro* Untersuchung des regulativen Effekts einzelner Mitglieder der miRNA-Familie fand ebenfalls in der Zellkultur statt. Es ist umstritten, ob Kolonkrebzelllinien einen intakten Hedgehog Signalweg vorweisen. Chatel et al. (2007) untersuchten die Expression der Hedgehog Faktoren SHH, IHH, PTCH1, SMO, GLI1, GLI2, GLI3, SUFU und HHIP in den Zelllinien HCT116, Colo205, WiDr, Sw480, Colo320, Caco-2 und HT-29. Sie konnten zeigen, dass in keiner dieser kolorektalen Krebszelllinien die komplette Auswahl der Hedgehog Faktoren exprimiert war. Dennoch lässt sich in einigen dieser Zelllinien der Hedgehog Signalweg durch Inhibitoren und Stimulatoren wie Cyclopamin

oder Natriumbutyrat regulieren. Vorangegangene Arbeiten konnten zeigen, dass die Kolonkarzinomzelllinie HT-29 einen aktiven und modulierbaren Hedgehog Signalweg aufweist (Mazumdar et al., 2011a,b; Yoshimoto et al., 2012). Um den Einfluss der miRNAs auf die intrinsische Expression von IHH weiter zu untersuchen, wurden HT-29 Zellen mit den unterschiedlichen miRNA Mimics transfiziert. Die Quantifizierung der mRNA nach 24 Stunden ergab in Übereinstimmung mit den Reporter-gen-Assays eine Herabregulation von IHH. Anschließend wurde anstelle der herkömmlichen HT-29 Zellen ein Subklon dieser Zellen, die HT-29/B6 Zellen, als Modellsystem für weitere Versuche verwendet. Diese Zellen zeigen bei längerer und ununterbrochener Kultivierung Anzeichen von Differenzierung, im Gegensatz zu vielen anderen Krebszelllinien inklusive der HT-29 Zellen. So konnten Kreusel et al. (1991) zeigen, dass HT-29/B6 Zellen dazu in der Lage sind, Monolayer aus komplett polarisierten Zellen zu bilden, welche apikal Mukusgranula zeigen und deren Nuklei basolateral angeordnet sind. Die Merkmale differenzierter Epithelzellen in Verbindung mit den Studien zur Modulierbarkeit des Hedgehog Signalwegs in der Ausgangszelllinie HT-29 machte die HT-29/B6 Zellen zu einem geeigneten Modellsystem für die *in vitro* Experimente. Zur Bestätigung dieser Charakteristika wurden Langzeitkulturversuche mit den HT-29/B6 Zellen durchgeführt. Durch die Langzeitkultivierung dieser Zellen über einen Zeitraum von drei Wochen konnte sowohl auf mRNA- wie auch auf Proteinebene gezeigt werden, dass der Hedgehog Signalweg in diesen Zellen aktiv ist und die Expression von IHH, SHH sowie HHAT moduliert werden kann. Die Messung der Expression der miR-15 Familienmitglieder über denselben Zeitraum zeigte einen deutlichen Trend antikorrelierter Expression der miRNAs miR-195-5p, miR-424-5p und miR-497-5p im Vergleich zu IHH (Daten nicht gezeigt). Dies wies darauf hin, dass Indian Hedgehog auch in HT-29/B6 Zellen durch die intrinsische Expression der Mitglieder der miRNA-Familie reguliert wird.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde untersucht, ob eine messbare Reduktion von IHH durch die Transfektion der HT-29/B6 Zellen mit miRNA-Mimics der miRNA-Familie erreicht werden konnte. Hierzu wurden die beiden vielversprechenden miRNAs miR-195-5p (8-mer Typus) und miR-497-5p (7mer-8m Typus) ausgewählt. Es zeigte sich allerdings keine detektierbare Herabregulation des Proteins in den Western Blot Experimenten. Auch der Versuch die Transfektion in der Ursprungszelllinie HT-29 oder in der Zelllinie HeLa durchzuführen führte zu keinem veränderten Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Auch die Transfektion einer IHH spezifischen siRNA sowie eines IHH-Überexpressionsplasmids führten zu keiner messbar veränderten IHH-Konzentration. Die Kontrolle der Transfektionseffizienz mittels GFP-exprimierendem Kontrollplasmid sowie einer Fluorophor-markierten Kontroll-siRNA ergab für Plasmide eine mehr als

50 %ige und für siRNAs beinahe 100 %ige Effizienz. Daher ist davon auszugehen, dass es sich um ein assay-spezifisches Problem handeln könnte. Es wurden insgesamt fünf verschiedene Anti-IHH Antikörper getestet. Drei dieser Antikörper waren nicht dazu geeignet IHH innerhalb der Zellysate zu detektieren. Der fünfte Antikörper detektierte in den durchgeführten Western Blots ausschließlich das IHH-Vorläufermolekül bei 49 kDa. Das etwa halb so große, aktive und sekretierbare Spaltprodukt konnte nicht beobachtet werden. Sollte die Konzentration von IHH in der Zelle konstant bleiben, die Menge an sekretiertem Protein aber abnehmen, wäre dies nicht durch übliche Western Blots nachvollziehbar. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, müsste innerhalb des zellfreien Überstandes des Kulturmediums die Konzentration von IHH ermittelt werden. Die Detektion von sekretierten Proteinen in Zellkulturmedium stellt allerdings eine große Herausforderung dar und ist häufig nur durch Anreicherung des Zielproteins, wie in Peter et al. (2007) beschrieben, zu erreichen. Da hierbei zudem keine Möglichkeit besteht über eine Ladekontrolle die geladene Gesamtproteinmenge zu bestimmen, wäre eine Quantifizierung des sekretierten IHH schwer durchzuführen. Des Weiteren ist nicht auszuschließen, dass die Spezifität des verwendeten Antikörpers nicht ausreicht, um zwischen den drei Hedgehog Liganden zu differenzieren. Nach persönlicher Mitteilung des Herstellers besitzt die exakte Aminosäuresequenz des IHH-Immunoogens eine Homologie von unter 50 %, verglichen mit humanem Sonic und Desert Hedgehog Protein. Innerhalb dieser Sequenz sind fünf aufeinanderfolgende homologe Aminosäuren enthalten. Eine Kreuzreaktion wurde vom Hersteller experimentell nicht ausgeschlossen. Ein Sequenzvergleich der humanen Hedgehog Liganden ergab für das N-terminale Spaltprodukt eine Ähnlichkeit von 89 % für SHH und 76 % für DHH verglichen mit IHH. Der Vergleich der porcinen Liganden mit dem humanen IHH zeigte ebenfalls eine starke Homologie der N-terminalen Hedgehog Peptide: IHH (100 %), SHH (94 %) und DHH (89 %). Die verglichene Aminosäuresequenz besaß eine Länge von 175 Aminosäuren und zeigt sowohl die hohe Konservierung der N-terminalen Domäne innerhalb der drei Signalproteine, als auch zwischen den Spezies Mensch und Schwein. Dies rechtfertigt den heterologen Einsatz der Antikörper zur Detektion von IHH in humanen Zellysaten und porcinen Gewebeschnitten.

Eine Möglichkeit, die Kreuzreaktion des N-Terminus-spezifischen Antikörpers zu umgehen, wäre die Verwendung eines Antikörpers, der das C-terminale Spaltprodukt von IHH detektiert. Sequenzvergleiche zwischen den humanen C-terminalen Peptiden IHH, SHH und DHH ergaben eine Homologie von 38 % für SHH sowie 47 % für DHH. Der Sequenzvergleich des porcinen C-terminus mit humanem IHH ergab eine Homologie von 98 % für IHH, 39 % für SHH und 46 % für DHH. Daher ist davon auszugehen, dass ein

spezifischer Antikörper für das humane C-terminale Peptid von IHH sowohl die Detektion des porzinen IHHs, als auch die Differenzierung von IHH, SHH und DHH ermöglichen könnte. Eine Fortführung der Western Blot Experimente mit einem IHH-C-Terminus detektierenden Antikörper könnte somit zur Vervollständigung der *in vitro* Daten führen. Zusammengefasst zeigten die *in silico* und *in vitro* Daten, dass der Hedgehog Signalweg durch die Kontrolle der miR-15 Familie über das Signalpeptid IHH reguliert werden kann. Auf Grund des in der Einleitung beschriebenen essentiellen Einflusses des Hedgehog Signalwegs auf die Darmentwicklung und die Homöostase des Gewebes, wurden im Anschluss *in vivo* Proben von 7-56 Tage alten Ferkeln ausgewertet. Die Expression der Hedgehog Signalproteine erfolgt im Epithel. Die Proteine werden sekretiert und gelangen in parakriner Weise zu ihren Zielzellen. Hier lösen sie eine Reduktion der Proliferation, sowie eine verstärkte Differenzierung der mesenchymalen Zellen aus (Büller et al., 2012). Dieser Einfluss auf die Zielzellen steht in Konkurrenz mit den Signalen des Wnt Signalwegs, der die Differenzierung unterdrückt und die Proliferation fördert. Die Faktoren des Wnt Signalwegs werden zum Großteil innerhalb der Darmkrypten exprimiert, diese bauen einen Hedgehog entgegengesetzten Konzentrationsgradienten im Gewebe auf. Das Zusammenspiel dieser beiden Signalwege ist demnach für die Aufrechterhaltung eines Differenzierungs- und Proliferationsgleichgewichts im Intestinaltrakt von hoher Bedeutung (Watt, 2004). Gerade in der postnatalen Darmentwicklung durchläuft der Darm starke morphologische Veränderungen. Innerhalb des betrachteten Zeitraums von 7-56 Tagen ereignet sich zudem das Absetzen der Ferkel nach vier Wochen p.p.. Für die Darmentwicklung ist dies eine besonders sensible Phase, da eine sehr abrupte Anpassung an Nahrungsbeschaffenheit und Komponenten notwendig ist.

Über die Expression und Regulation des Hedgehog Signalwegs im Modellorganismus Schwein ist bisher erst wenig bekannt. Daher stellte sich die Frage, wie die Hedgehog Liganden und andere wichtige Faktoren der Signalkaskade im Verlauf der postnatalen Darmentwicklung des Schweins exprimiert sind. Die Charakterisierung des Hedgehog Signalweges im porzinen Intestinaltrakt erfolgte durch mRNA-Arrays aus dem Ileum und Kolon. Im Entwicklungsverlauf der Ferkel von Tag 7-56 zeigte sich eine Reduktion der mRNA-Menge von IHH, SHH und DHH in beiden Darmabschnitten. Dieser Trend war nicht nur für die drei Liganden, sondern für beinahe alle 11 untersuchten Faktoren zu beobachten. Auf Grund des graduellen Charakters dieses Trends, scheinen dieser Entwicklung physiologische Prozesse zu Grunde zu liegen. Darüber hinaus ist zu bemerken, dass sich ein offensichtlicher Abfall der detektierbaren mRNA zwischen dem 28. und 31. Tag feststellen lässt. Da es sich hierbei um den Zeitraum des Absetzens der Ferkel handelt, ist dies möglicherweise ein Vorgang, der den physiologischen Reifungsprozess

des Intestinaltrakts schneller vorantreibt. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung wurde bereits beschrieben, dass im Kolon von Ferkeln durch das Absetzen die größten morphologischen Veränderungen des Epithels zu erkennen sind. Wie von Brunsgaard (1997) beschrieben besitzen nicht-abgesetzte Ferkel eine hohe Anzahl verzweigter Darmkrypten im Kolon. In der Phase des Absetzens verstärkt sich die Proliferationsrate innerhalb der Krypten, wodurch diese noch verzweigter und tiefer werden. Ein ähnlicher Effekt kann auch in den unterschiedlichen Abschnitten des Dünndarms (Jejunum und Ileum) beobachtet werden. Auch hier vertiefen sich die Darmkrypten und die im Kolon fehlenden Darmzotten verkürzen sich. Diese morphologischen Veränderungen erfordern eine verstärkte Proliferation innerhalb der Darmkrypten und bewirken eine reduzierte Anzahl reifer Enterozyten im Epithel (Gu et al., 2002). Die molekularbiologischen Daten der RT-qPCR-Arrays können zur Aufklärung der morphologischen Beobachtungen beitragen. Eine reduzierte Aktivität des Hedgehog Signalwegs hat die verstärkte Wirksamkeit des Wnt Signalwegs zur Folge. Somit erfolgt eine verstärkte Proliferation vor allem kryptennaher Zellen und, mit abnehmender Präsenz der Hedgehog Signalpeptide, auch der kryptenfernen Zellen. Die Umstellung der Ernährung während der Absetzphase sowie die zunehmende Konfrontation mit pathogenen Mikroorganismen erhöht zudem die Notwendigkeit nachrückender Zellen, was den verstärkten Rückgang der Expression der Hedgehog Faktoren notwendig macht. Zusammengefasst ist die Reduktion der Expression der Komponenten des Hedgehog Signalwegs ein physiologischer Prozess, der zur Anpassung des jungen Verdauungsapparates notwendig ist. Äußere Einflüsse, wie das abrupte Absetzen der Ferkel von der Mutter und die damit einhergehende Notwendigkeit schneller Adaptation, verstärken diesen Effekt zusätzlich.

Die weiteren Analysen wurden, auf Grund der deutlichen Regulation der Hedgehog Liganden sowie der wichtigen Rolle von IHH im Kolon, auf dieses Gewebe beschränkt. Die rein quantitativen Transkript-Daten der RT-qPCR-Arrays wurden durch die Untersuchung der Lokalisation des IHH-Proteins vervollständigt. Die Analyse der IHH Lokalisierung im porzinen Kolon von 7-56 Tage alten Ferkeln ergab ein deutliches Signal von IHH innerhalb der glatten Muskelzellschichten. Die konstant starke Detektion von IHH in diesen Gewebsschichten weist auf eine wichtige Rolle des Hedgehog Signalwegs bei der Ausbildung der intestinalen Muskulatur im porzinen postnatalen Darm hin. Hierzu ist bekannt, dass der Hedgehog Signalweg sowohl für die Entwicklung als auch für die Homöostase des Muskelgewebes im murinen Intestinaltrakt notwendig ist (Ramalho-Santos et al., 2000; Zacharias et al., 2011). Nicht nur die Ring- und Längsmuskulatur des Darms zeigte eine IHH-positive Färbung, sondern auch größere Bereiche innerhalb des Mesenchyms unterhalb des Epithels. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich hierbei

um die Vorläuferzellen der Muskulatur, die Myofibroblasten, handelt. Bereits van Dop et al. (2009) konnten zeigen, dass diese Zellpopulation sensitiv für IHH im murinen Kolon ist. Um diesen Zelltypus eindeutig zu identifizieren, wären weitere Versuche mit einem muskelzelltypischen Markerprotein, wie α -Smooth Muscle Actin (α -SMA) sowie einer IHH- Kofärbung im porzinen Kolon, notwendig. Deutlich zu erkennen war auch eine Färbung im Bereich der Blutgefäße innerhalb des Bindegewebes zwischen den muskulären Gewebeschichten. Auch diese Beobachtung stimmt überein mit Studien, denen zufolge die Bildung der Blutgefäßsysteme zum Teil durch den Hedgehog Signalweg organisiert wird (Vokes et al., 2004). Dabei kämen ebenfalls glatte Muskelzellen als rezepptive Zellen des Hedgehog Signalwegs in Frage.

Das Epithel ist in der Literatur als Ort der Expression und Sekretion der Hedgehog Liganden beschrieben (van Dop et al., 2009). In Übereinstimmung mit diesen Berichten konnte, auch in den immunhistochemischen Anfärbungen des Kolongewebes, IHH im Epithel detektiert werden. Die Anfärbung des Epithels fällt schwächer aus als die der Muskelschichten. Das liegt zum einen an der geringen Größe des Epithels in Relation zur Muskulatur und zum anderen kann bei der Präparation das lumenale Epithel leicht zerstört werden. So ist die IHH-Detektion, vor allem in den weniger empfindlichen Schnitten von älteren Tieren, gut zu erkennen. Eine Quantifizierung von IHH war daher, im Gegensatz zu den RT-qPCR-Arrays, mit der Methode der Immunhistochemie nicht möglich.

Die Expression der miR-15 Familie im porzinen Kolon wurde über denselben Zeitraum (7-56 Tage p.p.) wie die der Hedgehog Faktoren, durch RT-qPCR-Arrays, untersucht. Die miRNAs miR-15a/b-5p und miR-195-5p zeigten eine antikorrelierte Expression im Vergleich zu den Hedgehog Liganden. Die miRNAs miR-15a/b-5p wiesen interessanterweise einen Rückgang der Expression während der Absetzphase (Tag 28-31) auf. Die Expression stieg dann von Tag 31-56 wieder an. Dies unterstützt erneut die Daten von Sharbati et al. (2010), deren Ergebnisse eine, im Vergleich zu Ileum und Jejunum, schwache Expression von miR-15b-5p im Kolon während des Absetzens zeigen konnten. Da die Expression von miR-15a/b-5p innerhalb der in dieser Arbeit durchgeführten Arrays anschließend wieder anstieg, ist ein Zusammenhang zwischen dem Absetzen und der Regulation der miRNA wahrscheinlich. Eine Differenzierung zwischen miR-15a-5p und miR-15b-5p war auf Grund der sehr hohen Sequenzhomologie der beiden miRNAs nicht möglich. Der Anstieg der Expression von miR-195-5p war zwischen den Tagen 7-14, 14-28 sowie 35-56 statistisch signifikant. Die antikorrelierte Expression der miRNA zu IHH war deutlich und legt nahe, dass sie in der physiologischen Regulation des Hedgehog Signalwegs durch die Herabregulation von porzinem IHH eine Rolle spielt. Ähnlich wie bei miR-15a/b-5p gab es keinen Anstieg der Expression während der Absetzphase. Die gemeinsame Betrachtung

der Expressionsdaten des Hedgehog Signalwegs und den Mitgliedern der miR-15 Familie zeigen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine antikorrelierte Expression. Die in Zellkultur gezeigte Herabregulation von IHH durch die miR-15 Familie lässt somit die Hypothese zu, dass die Interaktion des Hedgehog Signalwegs und der miRNA-Familie Auswirkungen auf die postnatale Darmentwicklung hat. Dabei ermöglicht die kontrollierte Regulation des Hedgehog Signalwegs, durch die miR-15 Familienmitglieder, die physiologische Reifung des Intestinaltrakts. Plötzliche Änderungen in der natürlichen Entwicklung, wie das Absetzen der Ferkel, haben sofortige Auswirkungen auf diesen Prozess. Durch den starken Rückgang der Hedgehog Signalproteine und damit einhergehend der reduzierten Aktivität der gesamten Hedgehog Signalkaskade, wird die Enterozytenreifung reduziert und die Wnt vermittelte Proliferation im Gewebe des Intestinaltrakts verstärkt. Hierdurch ergeben sich morphologische Veränderungen innerhalb des intestinalen Gewebes, die durch erneute Regulation der beteiligten Signalkaskaden reversibel sein können. Auch in den RT-qPCR-Arrays ist nach der drastischen Reduktion der Hedgehog-Expression eine Stagnationsphase zwischen den Tagen 31-35 und 35-56 zu erkennen. Auf diese Weise wird möglicherweise schrittweise das physiologische Gleichgewicht zwischen Zell-Proliferation und Differenzierung der postnatalen Darmentwicklung wieder hergestellt. Da eine Fehlregulation von Hedgehog und Wnt Signalweg in Verbindung mit der Entwicklung von kolorektalem Krebs gebracht wird, ist die starke regulatorische Balance zwischen diesen Signalkaskaden von entscheidender Bedeutung für die intestinale Gesundheit (Taipale and Beachy, 2001).

Im Anschluss an die quantitativen qPCR Analysen wurden die Transkripte ausgesuchter miR-15 Familienmitglieder (miR-15b-5p, miR-195-5p und miR-497-5p) im porzinen Kolon lokalisiert. Hierzu wurden *in situ* Hybridisierungen durchgeführt. Die Expression dieser miRNAs im gesunden Intestinaltrakt wurde bisher noch nicht untersucht. Um einen repräsentativen Überblick über die postnatalen Entwicklungsstadien der Tiere zu erhalten, wurden Gewebeschnitte von 14, 31 und 56 Tage alten Tieren verwendet. Alle drei untersuchten miRNAs wiesen ein unterschiedliches Expressionsmuster im Kolongewebe auf. Dabei zeigte sich eine geringe Expression von miR-15b über diesen Zeitverlauf. Die Expression konnte in der Lamina propria sowie den Bindegewebszellen der Tela submukosa festgestellt werden. Auch miR-497 zeigte eine eher geringe Expression. Vor allem innerhalb der Kolonschnitte 31 Tage alter Tiere war eine verstärkte Detektion dieser miRNA möglich. Auch hier trat das deutlichste Signal innerhalb der Lamina propria auf. In Übereinstimmung mit den RT-qPCR Array Daten, wurde miR-195 im Gesamtgewebe mit zunehmendem Alter verstärkt detektiert. Die Expression war ubiquitär im Gewebe zu beobachten. Eine klare Kolo-kalisation der miRNAs und den IHH-Protein exprimierenden

Zellen kann nicht sicher festgestellt werden. Die Regulation der untersuchten miR-15 Familienmitglieder sowie ihre Präsenz innerhalb des postnatalen porzinen Intestinaltrakts machen daher weitere Versuche notwendig.

Nicht nur miRNAs sind an der Regulation von Signalwegen beteiligt. Auch externe Faktoren wie eine bakterielle Infektion können kurz- oder langfristige Effekte hervorrufen. Für den Hedgehog Signalweg wurde bereits beschrieben, dass die *in vitro* Infektion von Magen-Krebszelllinien mit *Helicobacter pylori* zu einem Anstieg der SHH-Expression führt. Diese Signalkaskade scheint dabei durch den Virulenzfaktor *cagA* von *Helicobacter pylori* sowie die Aktivierung der NF- κ B Signalkaskade ausgelöst zu werden (Kim et al., 2010). Weitere *in vivo* Untersuchungen im Mäusemagen wiesen SHH als Lockstoff (Chemoattraktant) für Makrophagen in der frühen Infektionsphase von *Helicobacter pylori* nach (Schumacher et al., 2012). Untersuchungen zur Reaktion des Hedgehog Signalwegs auf die Infektion der Darmmukosa mit *Salmonella* Typhimurium existieren derzeit noch nicht. Salmonellen besitzen, wie bereits in der Einleitung beschrieben, ein Typ III Sekretionssystem, welches dem Bakterium das Einschleusen von Effektorproteinen ermöglicht. Diese Effektoren beeinflussen zu Gunsten der Salmonellen, sowohl das Transkriptom der Zelle, als auch die Funktion einiger Proteine (Finlay and Brumell, 2000). Die Initiation der Salmonelleninfektion im Intestinaltrakt erfolgt am mukosalen Epithel. Dabei begünstigt die zottenreiche Morphologie des Ileums die Invasion des Epithels durch *Salmonella* Typhimurium. Die Expression der 11 Hedgehog Faktoren wurde durch RT-qPCR Arrays gemessen und zeigte im Kolon keine signifikante Regulation im Vergleich von infizierten und nicht-infizierten Tieren. Diese Beobachtung stimmt mit Versuchen an der Kolonkrebiszelllinie HT-29 überein. Diese zeigten, dass die Expression der Faktoren IHH, SHH, PTCH1, GLI1 und GLI2 nicht durch bakterielle Lipopolysaccharide oder Interferone beeinflusst wird (Yoshimoto et al., 2012). Im Ileum dagegen konnten klare Unterschiede beobachtet werden. Die Liganden selbst zeigten keine Veränderung, dafür waren alle übrigen acht Faktoren (PTCH1, SMO, HHIP, SUFU, DISP2, SFRP1, GLI1 und GLI2) 3 Stunden sowie 28 Tage nach der Infektion klar reduziert exprimiert im Vergleich zu den Kontrolltieren. Auch 71 Stunden nach der Infektion war dieser Trend messbar. Diese Ergebnisse lassen eine akute sowie auch eine dauerhafte Reaktion des kanonischen Hedgehog Signalwegs auf eine *Salmonella* Typhimurium Infektion erkennen. Weitere *in vivo* Studien sind erforderlich, um die potentielle immunregulatorische Rolle des Hedgehog Signalwegs funktionell zu belegen.

4.1. Ausblick

Auf Grund der in dieser Arbeit erworbenen neuen Erkenntnisse, erschließen sich interessante weiterführende Fragestellungen. So sind fortführende Experimente notwendig, um die regulativen Prozesse im postnatalen Intestinaltrakt durch den Hedgehog Signalweg sowie die miR-15 Familie genauer aufzuklären. Es muss *in vitro* durch weitere Western Blot Analysen gezeigt werden, dass das IHH-Protein durch Mitglieder der miRNA-Familie reguliert wird. Weitere Versuche können dazu beitragen, die Verknüpfung einzelner Signalkaskaden, wie dem Hedgehog, TGF- β , BMP und Wnt-Signalweg, zu verstehen. Von besonderem Interesse ist dabei die Verknüpfung der Faktoren miR-497, BCL2 und β -catenin. Yadav et al. (2011) konnten zeigen, dass die Inhibierung des Wnt-Signalwegs zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors β -catenin und damit zu einer erhöhten Expression der miRNA miR-497 führt. Diese Signalkaskade hatte zur Folge, dass BCL2 herabreguliert, die Caspase 3 aktiviert und damit eine Apoptose in den betroffenen Zellen eingeleitet wurde. Die Herabregulation von IHH, sowie die damit einhergehende Aufhebung der von Yang et al. (2008) beschriebenen Wirkung auf die Caspasen 3/7, hätten somit einen synergistischen Effekt auf apoptotische Prozesse (Abb. 4.1).

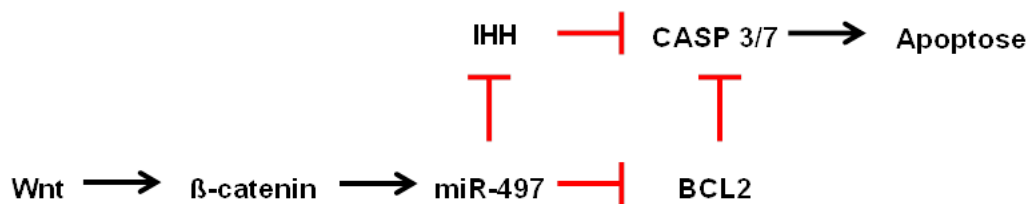


Abb. 4.1.: **Schematische Darstellung der hypothetischen Verknüpfung der Wnt und Hedgehog Signalkaskade mit Apoptose.** Aufbauend auf den von Yadav et al. (2011) und Yang et al. (2008) sowie den *in vitro* Ergebnissen dieser Arbeit, wurde diese Signalkaskade zur Apoptose-Regulation skizziert.

Um die sehr komplexen Vorgänge innerhalb des intestinalen Gewebes zu verstehen, werden vereinfachende *in vitro* Zellkultur-Systeme benötigt. Daher wurden in unserer Arbeitsgruppe Kokultur-Experimente von Hedgehog exprimierenden Epithelzellen und den rezeptiven Fibroblasten begonnen. Auf diese Weise können später gezielt rezeptive Zelltypen untersucht und deren zelluläre Antworten auf die Hedgehog Signale betrachtet werden. Hierbei wäre die bereits erwähnte mögliche Koregulation von IHH und HHAT durch miR-497-5p und miR-497-3p ebenfalls ein interessantes Forschungsobjekt. Auch *in vivo* Versuche sollten fortgeführt werden, um die Regulation des Hedgehog Signalwegs

durch die miR-15 Familie näher zu untersuchen. Zusätzlich zu der immunhistochemischen Detektion von IHH-Protein im Gewebe können *in situ* Hybridisierungen der mRNA dazu beitragen, die exprimierenden Zellen zu identifizieren und von den rezeptiven Zellen zu differenzieren. Die beobachteten Effekte des Absetzens der Ferkel auf die Expression der miR-15 Familie sowie der Hedgehog Faktoren könnten zusätzlich durch den Vergleich mit Tieren untersucht werden, die zu einem späteren Zeitpunkt abgesetzt wurden.

Das Verständnis der einzelnen Signalkaskaden und ihres komplexen Zusammenspiels in der postnatalen Darmentwicklung wird dazu beitragen, Krankheitsprozesse besser zu verstehen und kurative, sowie präventive Maßnahmen zur Verbesserung der intestinalen Gesundheit zu entwickeln. So wäre es denkbar, chronische inflammatorische Prozesse im Darm und auch bakterielle Infektionen ausgelöst durch Pathogene wie *Helicobacter pylori* oder *Salmonella Typhimurium* durch den Einsatz therapeutischer siRNAs zu behandeln.

5. Zusammenfassung

Die Liganden des Hedgehog Signalwegs sind als Morphogene in der embryonalen und postnatalen Darmentwicklung bekannt und regulieren im adulten Intestinaltrakt die Aufrechterhaltung der Homöostase im Gewebe. Sie werden vom mukosalen Epithel exprimiert und gelangen in parakriner Weise zu ihren Zielzellen im Mesenchym. Dort haben sie eine anti-proliferative und differenzierungsfördernde Wirkung.

Die miRNA-Familie miR-15a/15b/16/195/424/497 wurde in diesem Kontext als möglicher Regulator des Signalproteins Indian Hedgehog (IHH) identifiziert. Zu Beginn der Arbeit sollten Methoden für die effiziente und exakte Identifizierung der beteiligten regulatorischen RNA-Sequenzen und der miRNA-mRNA Interaktionen entwickelt werden. Zu diesem Zweck wurde ein Stem Loop 3' UTR RACE PCR Protokoll (SLURP) sowie ein Protokoll zur Amplifikation, Mutagenese und Assemblierung von miRNA-Zielsequenzen in 3' UTRs (SMAP) etabliert. Diese Methoden ermöglichten die schnelle Amplifikation und Sequenzierung relevanter 3' UTRs, sowie die Herstellung von Reporterplasmiden zur *in vitro* Verifikation der Interaktion von miRNA und mRNA. Die Luziferase Reporter-Gen-Assays zeigten eine deutliche Herabregulation von IHH durch ausgewählte Mitglieder der miR-15 Familie (miR-15b, miR-195, miR-424 und miR-497). Auch in mRNA-Degradationsassays konnte dieser Effekt beobachtet werden.

Im Anschluss an den Nachweis der Interaktion von miR-15 Familie und IHH *in vitro* wurden *in vivo* Proben von 7-56 Tage alten Ferkeln auf die Expression und Regulation von 11 wichtigen Faktoren des Hedgehog Signalwegs durch RT-qPCR-Arrays untersucht. In Ileum und Kolon zeigte sich im Entwicklungsverlauf der Tiere eine Reduktion der Expression beinahe aller Hedgehog Faktoren zwischen den Tagen 7 und 56. Vor allem in der Absetzphase der Tiere (Tag 28-31), besonders im Kolon, war dieser Effekt deutlich zu erkennen. Die Absetzphase bedeutet für den porzinen Intestinaltrakt eine sehr abrupte Umstellung von der Muttermilch auf eine neue Ernährung sowie die Konfrontation des mukosalen Epithels mit einer neuen Zusammensetzung der Mikrobiota und neuen Pathogenen. Die hierdurch erforderlichen morphologischen Anpassungen involvieren somit auch Signalkaskaden wie den Hedgehog Signalweg.

Die Analyse der Expression der miR-15 Familienmitglieder im Kolon zeigte für die

miRNAs miR-15a/b und miR-195 eine im Vergleich zu IHH antikorrelierte Expression mit einem deutlichen Anstieg von Tag 7-28 sowie von Tag 31-56. Auch für diese miRNAs war ein Effekt durch die Absetzphase der Ferkel zu verzeichnen. Zusammengefasst deuteten somit auch die *in vivo* Expressionsdaten auf eine Regulation von IHH durch Mitglieder der miR-15 Familie hin.

Die erstmalige Lokalisation ausgewählter miRNA-Familienmitglieder durch *in situ* Hybridisierungen im Kolon fand bei 14, 31 und 56 Tage alten Tieren statt. Dabei zeigten sich unterschiedliche Expressionsmuster der miRNAs im porzinen Gewebe. Die immunhistochemische Detektion von IHH konnte ebenfalls gewebsspezifische Abhängigkeiten aufdecken. So wurde IHH am Epithel, im mukosalen Mesenchym sowie innerhalb der glatten Muskulatur detektiert. Da eine Kolo-kalisation der ausgewählten miR-15 Familienmitglieder mit IHH nicht klar festgestellt werden konnte, müssen fortführende Experimente durchgeführt werden.

Der porzine Darm stellt ein wichtiges Modellsystem zur Erforschung der postnatalen Darmentwicklung von Säugetieren dar. Die in dieser Arbeit vorgestellten Methoden und Ergebnisse geben Einblick in die komplexe Verknüpfung der Hedgehog Signalkaskade sowie der miR-15 Familie in diesem multifaktoriellen Prozess. Darüber hinaus können sich hieraus therapeutische Ansätze zur Behandlung chronischer inflammatorischer Darmerkrankungen sowie Infektionen mit bakteriellen Pathogenen durch den gezielten Einsatz von siRNAs ergeben.

6. Summary

The ligands of the hedgehog signaling pathway are known as morphogens in the embryonic and postnatal development of the intestine. In the adult intestinal tract they are responsible for maintaining the homeostasis in the tissue. They are expressed by the mucosal epithelium and arrive in a paracrine manner to their target cells in the mesenchyme with an anti-proliferative and differentiation-promoting effect.

The miRNA family miR-15a/15b/16/195/424/497 was identified as a possible regulator of the signaling protein Indian Hedgehog (IHH). The first aim of the study was to develop methods for the efficient and accurate identification of the involved regulatory RNA sequences and the miRNA-mRNA interactions. For this purpose, a Stem Loop 3' UTR RACE PCR protocol (SLURP), and a protocol for the amplification, mutagenesis and assembly of miRNA targetsites in 3' UTRs (SMAP) was established. These methods allowed the rapid amplification and sequencing of relevant 3' UTRs and the production of reporterplasmids for the *in vitro* verification of the interaction between miRNA and mRNA. Luciferase reporter gene assays showed a significant downregulation of IHH by selected members of the miR-15 family (miR-15b, miR-195, miR-424 and miR-497). This effect was observed in mRNA Degrationsassays as well.

Following the confirmation of the interaction between IHH and the miR-15 family *in vitro*, we examined *in vivo* samples of 7-56 day old piglets on the expression and regulation of 11 important Hedgehog signaling factors by using RT-qPCR arrays. In the ileum and colon, we found a reduction in the expression of almost all Hedgehog factors between days 7 and 56. Especially in the period of weaning (days 28-31), particularly in the colon, this effect was clearly visible. During weaning a very abrupt transition from breast milk to a new diet takes place, as well as the confrontation of the mucosal epithelium with a new microbiota and pathogens in the porcine intestinal tract. The necessary morphological adaptations also involve signaling cascades such as the Hedgehog pathway .

The expression analysis of the miR-15 family members in the colon showed for the miRNAs miR-15a/b and miR-195, compared to IHH, an anti-correlated expression with a significant increase from day 7-28 and from day 31-56. A weaning effect was also visible for these miRNAs. In summary, the *in vivo* expression data indicate a regulation of IHH

by members of the miR-15 family.

The first-time localization of selected miRNA family members with *in situ* hybridizations in the colon was done in 14, 31 and 56 days old animals. The miRNAs showed different expression patterns in the porcine tissues. The immunohistochemical detection of IHH could also reveal tissue-specific dependencies. So IHH was detected on epithelia, in mucosal mesenchyme and within the smooth muscle tissue. As a co-localization of the selected miR -15 family members with IHH could not be clearly discovered, additional experiments are required.

The porcine intestine is an important model for the study of postnatal development of the mammalian intestine. The results and methods presented in this study give insights into the complex linkage of the Hedgehog signaling pathway and the miR-15 family in this multifactorial process. The use of specific siRNAs in a therapeutic approach for the treatment of chronic inflammatory bowel diseases and infections with bacterial pathogens in the gut could be a future goal.

Literaturverzeichnis

- Alcedo, J., Ayzenzon, M., Ohlen, T. V., Noll, M., and Hooper, J. E. (1996). The drosophila smoothed gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal. *Cell*, 86(2):221–232.
- Alexiou, P., Maragkakis, M., Papadopoulos, G. L., Reczko, M., and Hatzigeorgiou, A. G. (2009). Lost in translation: an assessment and perspective for computational microRNA target identification. *Bioinformatics*, 25(23):3049–3055.
- Anastasilakis, C. D., Ioannidis, O., Gkiomisi, A. I., and Botsios, D. (2013). Artificial nutrition and intestinal mucosal barrier functionality. *Digestion*, 88(3):193–208.
- Bailey, M., Haverson, K., Inman, C., Harris, C., Jones, P., Corfield, G., Miller, B., and Stokes, C. (2005). The development of the mucosal immune system pre- and post-weaning: balancing regulatory and effector function. *Proc Nutr Soc*, 64(4):451–457.
- Batts, L. E., Polk, D. B., Dubois, R. N., and Kulesa, H. (2006). Bmp signaling is required for intestinal growth and morphogenesis. *Dev Dyn*, 235(6):1563–1570.
- Bøe, K. (1991). The process of weaning in pigs: when the sow decides. *Applied Animal Behaviour Science*, 30:47–59.
- Bohmer, M., Sharbati, J., Bruegge, J. Z., Einspanier, R., and Sharbati, S. (2013). Structural analysis of microRNA-target interaction by sequential seed mutagenesis and stem-loop 3' race. *PLoS One*, 8(11):e81427.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B., and Cohen, S. M. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*, 3(3):e85.
- Brunsgaard, G. (1997). Morphological characteristics, epithelial cell proliferation, and crypt fission in cecum and colon of growing pigs. *Dig Dis Sci*, 42(11):2384–2393.
- Büller, N. V. J. A., Rosekrans, S. L., Westerlund, J., and van den Brink, G. R. (2012). Hedgehog signaling and maintenance of homeostasis in the intestinal epithelium. *Physiology (Bethesda)*, 27(3):148–155.
-

- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., and Wittwer, C. T. (2009). The miqe guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time pcr experiments. *Clin Chem*, 55(4):611–622.
- Chamoun, Z., Mann, R. K., Nellen, D., von Kessler, D. P., Bellotto, M., Beachy, P. A., and Basler, K. (2001). Skinny hedgehog, an acyltransferase required for palmitoylation and activity of the hedgehog signal. *Science*, 293(5537):2080–2084.
- Chatel, G., Ganef, C., Boussif, N., Delacroix, L., Briquet, A., Nolens, G., and Winkler, R. (2007). Hedgehog signaling pathway is inactive in colorectal cancer cell lines. *Int J Cancer*, 121(12):2622–2627.
- Croce, C. M. (2009). Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet*, 10(10):704–714.
- de Santa Barbara, P., van den Brink, G. R., and Roberts, D. J. (2003). Development and differentiation of the intestinal epithelium. *Cell Mol Life Sci*, 60(7):1322–1332.
- den Hove, D. L. V., Kompotis, K., Lardenoije, R., Kenis, G., Mill, J., Steinbusch, H. W., Lesch, K.-P., Fitzsimons, C. P., Strooper, B. D., and Rutten, B. P. F. (2013). Epigenetically regulated micrnas in alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging*, 35:731–745.
- Didiano, D. and Hobert, O. (2006). Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for mirna-target interactions. *Nat Struct Mol Biol*, 13(9):849–851.
- Domínguez, M., Brunner, M., Hafen, E., and Basler, K. (1996). Sending and receiving the hedgehog signal: control by the drosophila gli protein cubitus interruptus. *Science*, 272(5268):1621–1625.
- Dong, J., Carey, W. A., Abel, S., Collura, C., Jiang, G., Tomaszek, S., Sutor, S., Roden, A. C., Asmann, Y. W., Prakash, Y. S., and Wigle, D. A. (2012). MicroRNA-mrna interactions in a murine model of hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia. *BMC Genomics*, 13:204.
- Ferguson, D. R., James, P. S., Paterson, J. Y., Saunders, J. C., and Smith, M. W. (1979). Aldosterone induced changes in colonic sodium transport occurring naturally during development in the neonatal pig. *J Physiol*, 292:495–504.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by micrnas: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*, 9(2):102–114.

- Finlay, B. B. and Brummell, J. H. (2000). Salmonella interactions with host cells: in vitro to in vivo. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 355(1397):623–631.
- Fu, M.-G., Li, S., Yu, T.-T., Qian, L.-J., Cao, R.-S., Zhu, H., Xiao, B., Jiao, C.-H., Tang, N.-N., Ma, J.-J., Hua, J., Zhang, W.-F., Zhang, H.-J., and Shi, R.-H. (2013). Differential expression of mir-195 in esophageal squamous cell carcinoma and mir-195 expression inhibits tumor cell proliferation and invasion by targeting of cdc42. *FEBS Lett*, 587(21):3471–3479.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R. J., van Dongen, S., Bateman, A., and Enright, A. J. (2006). mirbase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res*, 34(Database issue):D140–D144.
- Grimson, A., Farh, K. K.-H., Johnston, W. K., Garrett-Engele, P., Lim, L. P., and Bartel, D. P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*, 27(1):91–105.
- Gu, X., Li, D., and She, R. (2002). Effect of weaning on small intestinal structure and function in the piglet. *Arch Tierernahr*, 56(4):275–286.
- Haley, B. and Zamore, P. D. (2004). Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat Struct Mol Biol*, 11(7):599–606.
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404(6775):293–296.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166(4):557–580.
- Heerdt, B. G., Houston, M. A., and Augenlicht, L. H. (1994). Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines. *Cancer Res*, 54(12):3288–3293.
- Hoeke, L., Sharbati, J., Pawar, K., Keller, A., Einspanier, R., and Sharbati, S. (2013). Intestinal salmonella typhimurium infection leads to mir-29a induced caveolin 2 regulation. *PLoS One*, 8(6):e67300.
- Huang, D. W., Sherman, B. T., and Lempicki, R. A. (2009a). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res*, 37(1):1–13.

- Huang, D. W., Sherman, B. T., and Lempicki, R. A. (2009b). Systematic and integrative analysis of large gene lists using david bioinformatics resources. *Nat Protoc*, 4(1):44–57.
- Huang, H., Li, J., Hu, L., Ge, L., Ji, H., Zhao, Y., and Zhang, L. (2013). Bantam is essential for drosophila intestinal stem cell proliferation in response to hippo signaling. *Dev Biol*, 385:211–219.
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A. E., Bálint, E., Tuschl, T., and Zamore, P. D. (2001). A cellular function for the rna-interference enzyme dicer in the maturation of the let-7 small temporal rna. *Science*, 293(5531):834–838.
- Jin, Y., Chen, Z., Liu, X., and Zhou, X. (2013). Evaluating the microrna targeting sites by luciferase reporter gene assay. *Methods Mol Biol*, 936:117–127.
- Karasov, W. H., Solberg, D. H., Chang, S. D., Hughes, M., Stein, E. D., and Diamond, J. M. (1985). Is intestinal transport of sugars and amino acids subject to critical-period programming? *Am J Physiol*, 249(6 Pt 1):G770–G785.
- Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S. D. (2003). Functional sirnas and mirnas exhibit strand bias. *Cell*, 115(2):209–216.
- Kim, J.-H., Choi, Y. J., Lee, S. H., Shin, H. S., Lee, I. O., Kim, Y. J., Kim, H., Yang, W. I., Kim, H., and Lee, Y. C. (2010). Effect of helicobacter pylori infection on the sonic hedgehog signaling pathway in gastric cancer cells. *Oncol Rep*, 23(6):1523–1528.
- Kornberg, T. B. (2011). Barcoding hedgehog for intracellular transport. *Sci Signal*, 4(200):pe44.
- Kreusel, K. M., Fromm, M., Schulzke, J. D., and Hegel, U. (1991). Cl- secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (ht-29/b6). *Am J Physiol*, 261(4 Pt 1):C574–C582.
- Kumar, S., Balczarek, K. A., and Lai, Z. C. (1996). Evolution of the hedgehog gene family. *Genetics*, 142(3):965–972.
- Lallés, J.-P., Bosi, P., Smidt, H., and Stokes, C. R. (2007). Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proc Nutr Soc*, 66(2):260–268.
- Lambert, N. J., Gu, S. G., and Zahler, A. M. (2011). The conformation of microrna seed regions in native micrornps is prearranged for presentation to mrna targets. *Nucleic Acids Res*, 39(11):4827–4835.

- Lee, J. J., Ekker, S. C., von Kessler, D. P., Porter, J. A., Sun, B. I., and Beachy, P. A. (1994). Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. *Science*, 266(5190):1528–1537.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. (1993). The *c. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small rnas with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5):843–854.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., and Kim, V. N. (2003). The nuclear rnase iii *drosha* initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956):415–419.
- Lewis, B. P., Burge, C. B., and Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120(1):15–20.
- Mao, J., Kim, B.-M., Rajurkar, M., Shivdasani, R. A., and McMahon, A. P. (2010). Hedgehog signaling controls mesenchymal growth in the developing mammalian digestive tract. *Development*, 137(10):1721–1729.
- Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Lührmann, R., and Tuschl, T. (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target rna cleavage in rai. *Cell*, 110(5):563–574.
- Mazumdar, T., DeVecchio, J., Agyeman, A., Shi, T., and Houghton, J. A. (2011a). The *gli* genes as the molecular switch in disrupting hedgehog signaling in colon cancer. *Oncotarget*, 2(8):638–645.
- Mazumdar, T., DeVecchio, J., Shi, T., Jones, J., Agyeman, A., and Houghton, J. A. (2011b). Hedgehog signaling drives cellular survival in human colon carcinoma cells. *Cancer Res*, 71(3):1092–1102.
- McKenna, L. B., Schug, J., Vourekas, A., McKenna, J. B., Bramswig, N. C., Friedman, J. R., and Kaestner, K. H. (2010). MicroRNAs control intestinal epithelial differentiation, architecture, and barrier function. *Gastroenterology*, 139(5):1654–64, 1664.e1.
- McLamb, B. L., Gibson, A. J., Overman, E. L., Stahl, C., and Moeser, A. J. (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(4):e59838.
- Monzo, M., Navarro, A., Bandres, E., Artells, R., Moreno, I., Gel, B., Ibeas, R., Moreno, J., Martinez, F., Diaz, T., Martinez, A., Balagué, O., and Garcia-Foncillas, J. (2008). Overlapping expression of microRNAs in human embryonic colon and colorectal cancer. *Cell Res*, 18(8):823–833.

- Niewold, T. A., Veldhuizen, E. J. A., van der Meulen, J., Haagsman, H. P., de Wit, A. A. C., Smits, M. A., Tersteeg, M. H. G., and Hulst, M. M. (2007). The early transcriptional response of pig small intestinal mucosa to invasion by salmonella enterica serovar typhimurium dt104. *Mol Immunol*, 44(6):1316–1322.
- Nüsslein-Volhard, C. and Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in drosophila. *Nature*, 287(5785):795–801.
- Okamura, K., Phillips, M. D., Tyler, D. M., Duan, H., ting Chou, Y., and Lai, E. C. (2008). The regulatory activity of microrna* species has substantial influence on microrna and 3' utr evolution. *Nat Struct Mol Biol*, 15(4):354–363.
- Parys, A. V., Boyen, F., Leyman, B., Verbrugge, E., Haesebrouck, F., and Pasmans, F. (2011). Tissue-specific salmonella typhimurium gene expression during persistence in pigs. *PLoS One*, 6(8):e24120. Kolonisierung und Persistenz von Salmonella im Schwein: Koloniesierung: Tag 1-3 und Persistenz ab 20 Tagen.
- Peter, J. F., Otto, A. M., and Wolf, B. (2007). Enrichment and detection of molecules secreted by tumor cells using magnetic reversed-phase particles and lc-maldi-tof-ms. *J Biomol Tech*, 18(5):287–297.
- Ramalho-Santos, M., Melton, D. A., and McMahon, A. P. (2000). Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development*, 127(12):2763–2772.
- Rehmsmeier, M., Steffen, P., Hochsmann, M., and Giegerich, R. (2004). Fast and effective prediction of microrna/target duplexes. *RNA*, 10(10):1507–1517.
- Rhoades, M. W., Reinhart, B. J., Lim, L. P., Burge, C. B., Bartel, B., and Bartel, D. P. (2002). Prediction of plant microrna targets. *Cell*, 110(4):513–520.
- Schumacher, M. A., Donnelly, J. M., Engevik, A. C., Xiao, C., Yang, L., Kenny, S., Varro, A., Hollande, F., Samuelson, L. C., and Zavros, Y. (2012). Gastric sonic hedgehog acts as a macrophage chemoattractant during the immune response to helicobacter pylori. *Gastroenterology*, 142(5):1150–1159.e6.
- Schwarz, D. S., Hutvágner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the assembly of the rna interference enzyme complex. *Cell*, 115(2):199–208.
- Sharbati, S., Friedländler, M. R., Sharbati, J., Hoeke, L., Chen, W., Keller, A., Stähler, P. F., Rajewsky, N., and Einspanier, R. (2010). Deciphering the porcine intestinal microrna transcriptome. *BMC Genomics*, 11:275.

- Sharbati, S., Sharbati, J., Hoeke, L., Bohmer, M., and Einspanier, R. (2012). Quantification and accurate normalisation of small rnas through new custom rt-qpcr arrays demonstrates salmonella-induced micrnas in human monocytes. *BMC Genomics*, 13:23.
- Sharbati-Tehrani, S., Kutz-Lohroff, B., Bergbauer, R., Scholven, J., and Einspanier, R. (2008). mir-q: a novel quantitative rt-pcr approach for the expression profiling of small rna molecules such as mirnas in a complex sample. *BMC Mol Biol*, 9:34.
- Shi, H., liang Sun, B., Zhang, J., Lu, S., Zhang, P., Wang, H., Yu, Q., Stetler, R. A., Vosler, P. S., Chen, J., and Gao, Y. (2013). mir-15b suppression of bcl-2 contributes to cerebral ischemic injury and is reversed by sevoflurane preconditioning. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 12(3):381–391.
- Sicklick, J. K., Li, Y.-X., Choi, S. S., Qi, Y., Chen, W., Bustamante, M., Huang, J., Zdanowicz, M., Camp, T., Torbenson, M. S., Rojkind, M., and Diehl, A. M. (2005). Role for hedgehog signaling in hepatic stellate cell activation and viability. *Lab Invest*, 85(11):1368–1380.
- Smith, F., Clark, J. E., Overman, B. L., Tozel, C. C., Huang, J. H., Rivier, J. E. F., Blikslager, A. T., and Moeser, A. J. (2010). Early weaning stress impairs development of mucosal barrier function in the porcine intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 298(3):G352–G363.
- Staedel, C. and Darfeuille, F. (2013). Micrnas and bacterial infection. *Cell Microbiol*, 15(9):1496–1507.
- Taipale, J. and Beachy, P. A. (2001). The hedgehog and wnt signalling pathways in cancer. *Nature*, 411(6835):349–354.
- Tao, X. and Xu, Z. (2013). Micrna transcriptome in swine small intestine during weaning stress. *PLoS One*, 8(11):e79343.
- Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P., and Sharp, P. A. (1999). Targeted mrna degradation by double-stranded rna in vitro. *Genes Dev*, 13(24):3191–3197.
- van den Brink, G. R. (2007). Hedgehog signaling in development and homeostasis of the gastrointestinal tract. *Physiol Rev*, 87(4):1343–1375.
- van den Brink, G. R., Bleuming, S. A., Hardwick, J. C. H., Schepman, B. L., Offerhaus, G. J., Keller, J. J., Nielsen, C., Gaffield, W., van Deventer, S. J. H., Roberts, D. J.,

- and Peppelenbosch, M. P. (2004). Indian hedgehog is an antagonist of wnt signaling in colonic epithelial cell differentiation. *Nat Genet*, 36(3):277–282.
- van Dop, W. A., Heijmans, J., Büller, N. e. V. J. A., Snoek, S. A., Rosekrans, S. L., Wassenberg, E. A., van den Bergh Weerman, M. A., Lanske, B., Clarke, A. R., Winton, D. J., Wijgerde, M., Offerhaus, G. J., Hommes, D. W., Hardwick, J. C., de Jonge, W. J., Biemond, I., and van den Brink, G. R. (2010). Loss of indian hedgehog activates multiple aspects of a wound healing response in the mouse intestine. *Gastroenterology*, 139(5):1665–76, 1676.e1–10.
- van Dop, W. A., Uhmans, A., Wijgerde, M., Sleddens-Linkels, E., Heijmans, J., Offerhaus, G. J., van den Bergh Weerman, M. A., Boeckxstaens, G. E., Hommes, D. W., Hardwick, J. C., Hahn, H., and van den Brink, G. R. (2009). Depletion of the colonic epithelial precursor cell compartment upon conditional activation of the hedgehog pathway. *Gastroenterology*, 136(7):2195–2203.e1–7.
- van Kuppeveld, F. J., Johansson, K. E., Galama, J. M., Kissing, J., Bölske, G., van der Logt, J. T., and Melchers, W. J. (1994). Detection of mycoplasma contamination in cell cultures by a mycoplasma group-specific pcr. *Appl Environ Microbiol*, 60(1):149–152.
- Vandesompele, J., Preter, K. D., Pattyn, F., Poppe, B., Roy, N. V., Paepe, A. D., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative rt-pcr data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3(7):RESEARCH0034.
- Vokes, S. A., Yatskievych, T. A., Heimark, R. L., McMahon, J., McMahon, A. P., Antin, P. B., and Krieg, P. A. (2004). Hedgehog signaling is essential for endothelial tube formation during vasculogenesis. *Development*, 131(17):4371–4380.
- Wang, L., Li, B., Li, L., and Wang, T. (2013). Microrna-497 suppresses proliferation and induces apoptosis in prostate cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14(6):3499–3502.
- Watt, F. M. (2004). Unexpected hedgehog-wnt interactions in epithelial differentiation. *Trends Mol Med*, 10(12):577–580.
- Winer, J., Jung, C. K., Shackel, I., and Williams, P. M. (1999). Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem*, 270(1):41–49.
- Wu, X., Bhayani, M. K., Dodge, C. T., Nicoloso, M. S., Chen, Y., Yan, X., Adachi, M., Thomas, L., Galer, C. E., Jiffar, T., Pickering, C. R., Kupferman, M. E., Myers, J. N.,

- Calin, G. A., and Lai, S. Y. (2013). Coordinated targeting of the egfr signaling axis by microrna-27a*. *Oncotarget*, 4(9):1388–1398.
- Yadav, S., Pandey, A., Shukla, A., Talwelkar, S. S., Kumar, A., Pant, A. B., and Parmar, D. (2011). mir-497 and mir-302b regulate ethanol-induced neuronal cell death through bcl2 protein and cyclin d2. *J Biol Chem*, 286(43):37347–37357. Regulation von miR-497 durch Wnt pathway Aktivierung + BCL2 + CCND2 target von miR-497.
- Yang, J.-S., Phillips, M. D., Betel, D., Mu, P., Ventura, A., Siepel, A. C., Chen, K. C., and Lai, E. C. (2011). Widespread regulatory activity of vertebrate microrna* species. *RNA*, 17(2):312–326.
- Yang, L., Wang, Y., Mao, H., Fleig, S., Omenetti, A., Brown, K. D., Sicklick, J. K., Li, Y.-X., and Diehl, A. M. (2008). Sonic hedgehog is an autocrine viability factor for myofibroblastic hepatic stellate cells. *J Hepatol*, 48(1):98–106.
- Ye, W., Lv, Q., Wong, C.-K. A., Hu, S., Fu, C., Hua, Z., Cai, G., Li, G., Yang, B. B., and Zhang, Y. (2008). The effect of central loops in mirna:mre duplexes on the efficiency of mirna-mediated gene regulation. *PLoS One*, 3(3):e1719.
- Yoshimoto, A. N., Bernardazzi, C., Carneiro, A. J. V., Elia, C. C. S., Martinusso, C. A., Ventura, G. M., Castelo-Branco, M. T. L., and de Souza, H. S. P. (2012). Hedgehog pathway signaling regulates human colon carcinoma ht-29 epithelial cell line apoptosis and cytokine secretion. *PLoS One*, 7(9):e45332.
- Yu, Y.-H., Zhang, L., Wu, D.-S., Zhang, Z., Huang, F.-F., Zhang, J., Chen, X.-P., Liang, D.-S., Zeng, H., and Chen, F.-P. (2013). Mir-223 regulates human embryonic stem cell differentiation by targeting the igf-1r/akt signaling pathway. *PLoS One*, 8(11):e78769.
- Zacharias, W. J., Li, X., Madison, B. B., Kretovich, K., Kao, J. Y., Merchant, J. L., and Gumucio, D. L. (2010). Hedgehog is an anti-inflammatory epithelial signal for the intestinal lamina propria. *Gastroenterology*, 138(7):2368–77, 2377.e1–4.
- Zacharias, W. J., Madison, B. B., Kretovich, K. E., Walton, K. D., Richards, N., Udager, A. M., Li, X., and Gumucio, D. L. (2011). Hedgehog signaling controls homeostasis of adult intestinal smooth muscle. *Dev Biol*, 355(1):152–162.
- Zhang, H., Malo, C., Boyle, C. R., and Buddington, R. K. (1998). Diet influences development of the pig (sus scrofa) intestine during the first 6 hours after birth. *J Nutr*, 128(8):1302–1310.

Zhu, W., Zhu, D., Lu, S., Wang, T., Wang, J., Jiang, B., Shu, Y., and Liu, P. (2012).
mir-497 modulates multidrug resistance of human cancer cell lines by targeting bcl2.
Med Oncol, 29(1):384–391.

A. Anhang

A.1. Abkürzungsverzeichnis

ACTb	β -Aktin
AG	Aktiengesellschaft
α-SMA	α -Smooth Muscle Actin
bp	Basenpaare
BCIP/NBT	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat/Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
BMELV	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz
BSA	bovines Serumalbumin
ca.	circa
CASP7	Caspase7
CCND2	Cyclin D2
CDC42	Cell Division Cycle 42
cDNA	complementary DNA
cm	Zentimeter
Cq	Quantitation Cycle
Ct	Cycle Threshold
d	Tage
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DHH	Desert Hedgehog
DIG	Digoxigenin
DISP2	Dispatched homolog 2
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dT	Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol

dNTP	Desoxyribonukleosid-triphosphat
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
etc.	Et cetera
f	femto
FBS	fetales bovines Serum
fw	forward
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLI	GLI-Kruppel family member
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GSP	genspezifischer Primer
h	Stunde
H₂O	Wasser
HCl	Salzsäure
HHAT	Hedgehog Acyltransferase
HHIP	Hedgehog interacting protein
hsa	Homo sapiens
IHC	Immunhistochemie
IHH	Indian Hedgehog
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
KCl	Kaliumchlorid
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Na₂HPO₄	Natriumdihydrogenphosphat
kcal	Kilokalorien
kDa	Kilodalton
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
l	Liter
LB	Lysogeny Broth
LNA	Locked Nucleic Acid
mA	Milliampere
mfe	minimum free energy
MgCl₂	Magnesiumchlorid
μ	mikro
min	Minute

ml	Milliliter
mM	Millimol
M	Mol
miRNA	microRNA
mRNA	messenger RNA
MCS	Multiple Cloning Site
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
nt	Nukleotid
p	piko
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
p.i.	<i>post infectionem</i>
p.p.	<i>post partum</i>
PTCH1	Patched1
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative PCR
RACE	Rapid Amplification of cDNA-Ends
REN	Restriktionsendonukleasen
rev	reverse
RISC	RNA-Induced-Silencing-Complex
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay
RLU	Relative Light Unit
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
RT-qPCR	Reverse Transkription- quantitative PCR
RNU6	U6 small nuclear RNA
SDHA	succinate dehydrogenase complex, subunit A
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SELPLG	Selectin P Ligand
SFRP1	Secreted frizzled-related protein 1
SHH	Sonic Hedgehog

siRNA	small interfering RNA
SLURP	Stem Loop 3' UTR RACE PCR
SMAP	Seed Mutagenesis Assembly PCR
SMO	Smoothened homolog
SSC	Saline Sodium Citrate
SUFU	Suppressor of fused homolog
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBP	TATA box binding protein
TBS-T	Tris-Buffered Saline
TGFBR3	Transforming Growth Factor, β Receptor III
U	Unit
UBC	Ubiquitin
3' UTR	3' untranslatierte Region
z.B.	zum Beispiel

A.2. Plasmidkarten

A.2.1. Reporter Plasmide

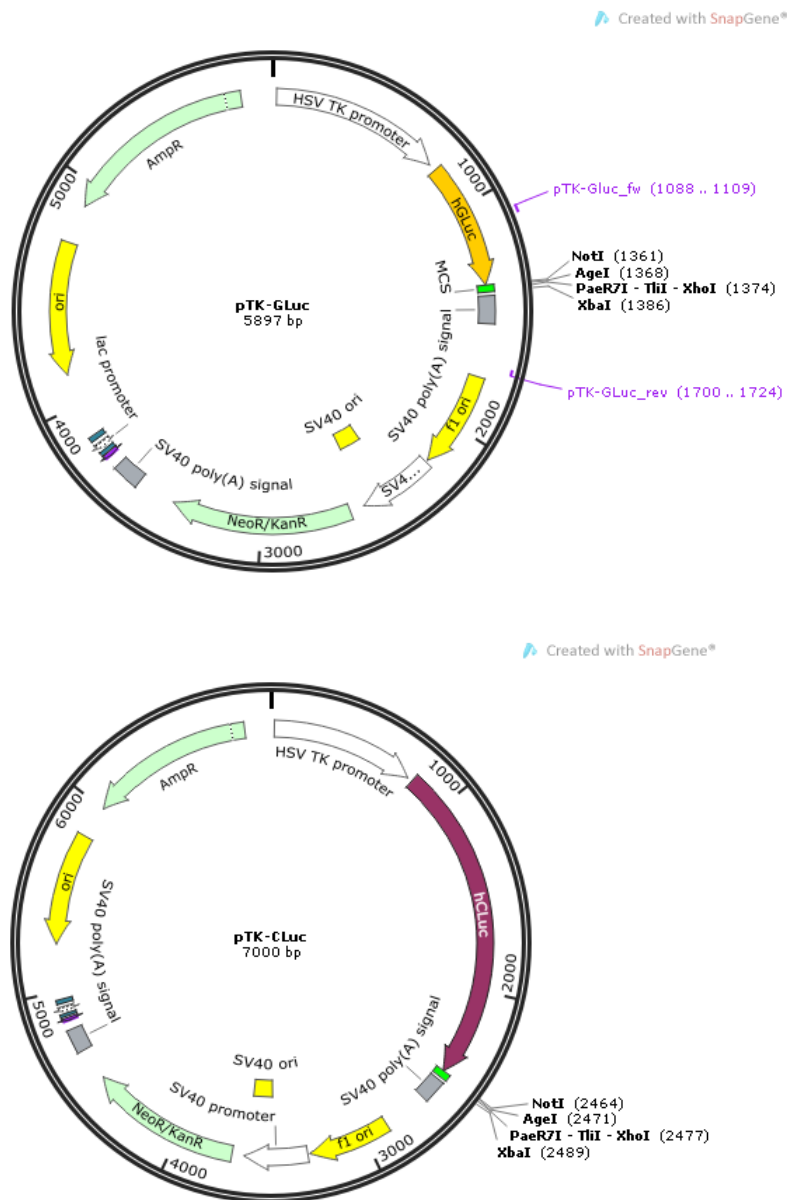


Abb. A.1.: Oben: pTK-GLuc (New England Biolabs, Gmbh) mit der *Gaussia princeps* Luziferase und der MCS innerhalb der 3' UTR. Unten: pTK-CLuc (New England Biolabs, Gmbh) mit der *Cypridina noctiluca* Luziferase und der MCS innerhalb der 3' UTR.

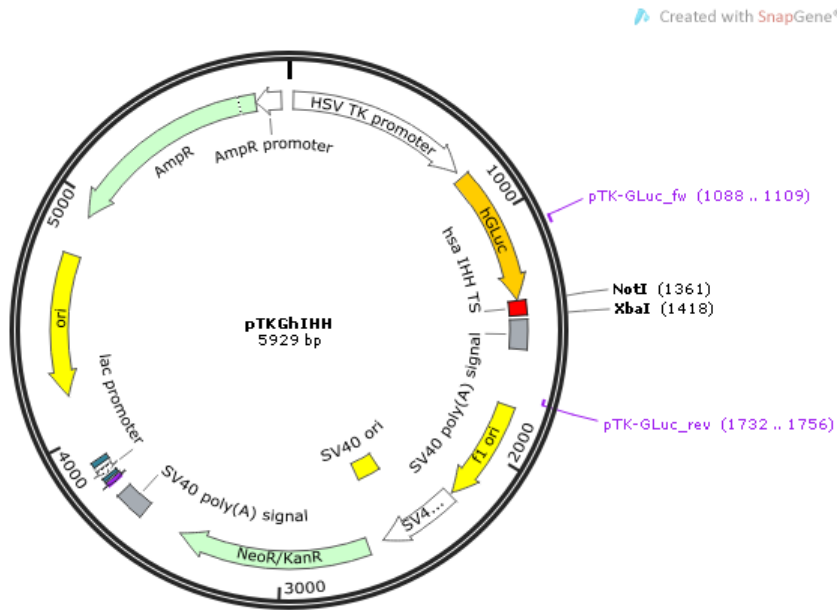


Abb. A.2.: pTKGhIHH mit der humanen IHH Zielsequenz, erstellt in dieser Arbeit.

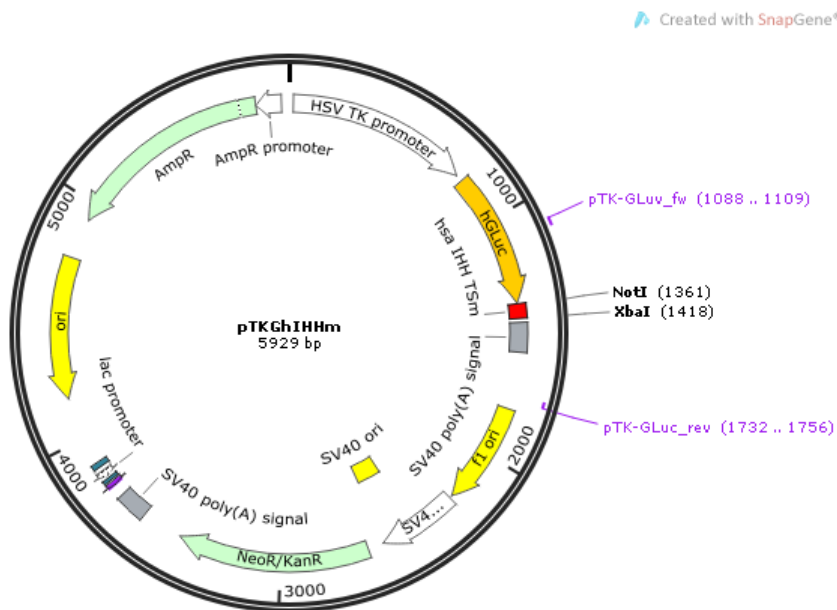


Abb. A.3.: pTKGhIHHm mit der mutagenisierten humanen IHH Zielsequenz, erstellt in dieser Arbeit.

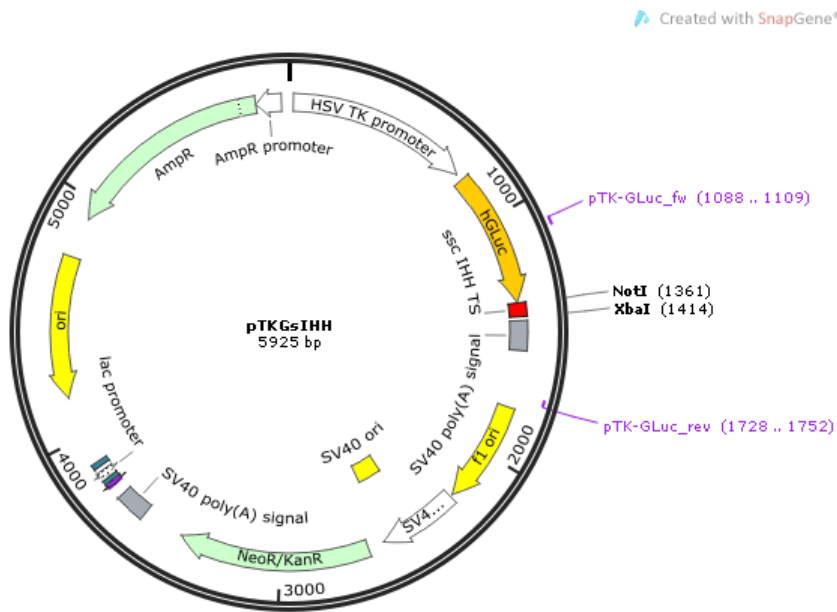


Abb. A.4.: pTKGsIHH mit der porzinen IHH Zielsequenz, erstellt in dieser Arbeit.

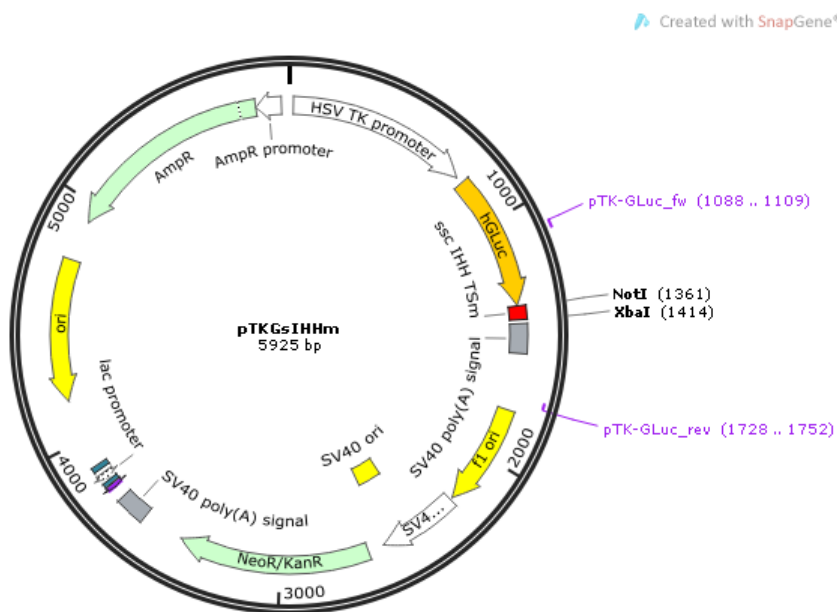


Abb. A.5.: pTKGsIHHm mit der mutagenisierten porzinen IHH Zielsequenz, erstellt in dieser Arbeit.

A.2.2. Expressionsplasmid

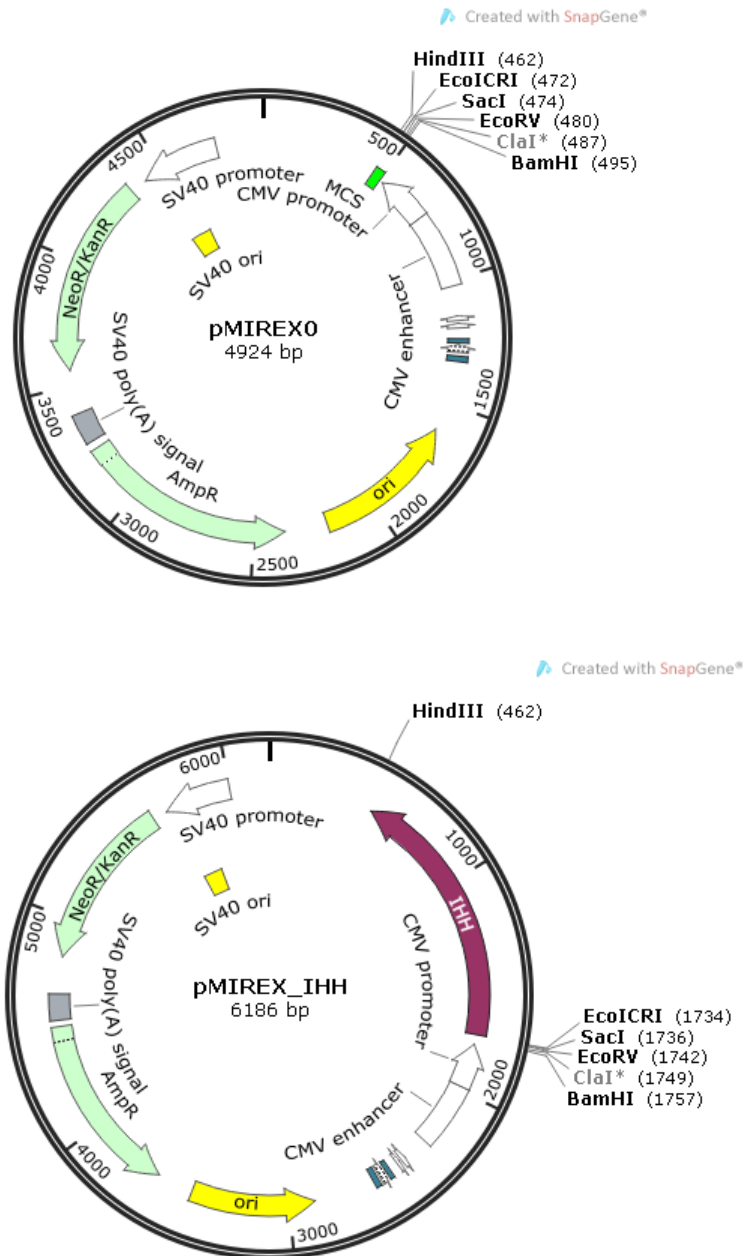


Abb. A.6.: Oben: pMIREX0, (Hoeke et al., 2013). Unten: Expressionsplasmid für humanes IHH, erstellt in dieser Arbeit. Die CDS von IHH wurde aus dem Plasmid hsaIHH-pMA-T (GeneArt, Life technologies GmbH) kloniert.

A.3. Material

Substanz	Hersteller
2-Propanol	Carl Roth GmbH
3 x Blue Loading Buffer	Cell Signaling Technology
5x RT Puffer	Fermentas GmbH
Acid-Phenol:CHCl ₃ 5:1 Lösung	Ambion
BCIP/NBT	Roche GmbH
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich GmbH
Bromphenolblau	Merck KGaA
BSA	Sigma Aldrich GmbH
Cryomaxx	PAA Laboratories GmbH
DAPI 2,5 mg/ml	Roche GmbH
DEPC	Sigma Aldrich GmbH
dNTP Mix, 10mM	Bioline GmbH
DTT (1,25 M)	Cell Signaling Technology
EDTA, 50 mM	Fermentas GmbH
Ethanol Rotisolv HPLC Gradient Grade	Carl Roth GmbH
Ethidiumbromidlösung 10 mg/ml	Carl Roth GmbH
FBS Superior	Biochrom AG
Formaldehyd	Carl Roth GmbH
Gentamicin 10 mg/ml	Biochrom AG
Glycerin	Carl Roth GmbH
Glycin	Carl Roth GmbH
HCl 1 mol/l	Carl Roth GmbH
ISH Puffer	Enzo Life Sciences
KCl	Merck KGaA
LB Medium	Carl Roth GmbH
LE Agarose	Biozym GmbH
Levamisol	Dako GmbH
Methanol	Carl Roth GmbH
Milchpulver	Carl Roth GmbH
NaCl	Carl Roth GmbH
NaOH	Carl Roth GmbH
Nuclear Fast Red TM	Sigma Aldrich GmbH
PBS	PAA Laboratories GmbH
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich GmbH
Random Hexamer Primer 0,2 μ g/ μ l	Fermentas GmbH
Reaktionspuffer für DNase I mit MgCl ₂	Fermentas GmbH
RIPA Puffer	Cell Signaling Technology
RNase Away	Thermo Scientific GmbH

Roticlear [®]	Carl Roth GmbH
Roti [®] -Histokitt	Carl Roth GmbH
Roti [®] -Mount FluorCare PI	Carl Roth GmbH
Rotiphorese Gel 40	Carl Roth GmbH
RPMI 1640 (F 1215)	Biochrom AG
SDS	Carl Roth GmbH
Sheep serum (sc-2488)	Santa Cruz Biotechnology
SSC Puffer 20x concentrate	Carl Roth GmbH
TAE Puffer 50x Rotiphorese	Carl Roth GmbH
TEMED	Merck KGaA
TRIS Pufferan	Carl Roth GmbH
Triton-X-100	Sigma Aldrich GmbH
Trypanblau 0,5 %	Serva Heidelberg
Tween 20	Sigma Aldrich GmbH
Enzyme	Hersteller
AccuSure [™] DNA Polymerase	Bioline GmbH
Accutase	Sigma-Aldrich GmbH
Immolase [™] DNA Polymerase	Bioline GmbH
Proteinase K 20 mg/ml	Life Technologies GmbH
RevertAid [™] Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific GmbH
Restriktionsendonukleasen XbaI, NotI, XhoI, SacI, HindIII	New England Biolabs GmbH
RNase freie DNase	Thermo Fisher Scientific GmbH
SensiMix [™] SYBR Hi-ROX	Bioline GmbH
T4 DNA Ligase	New England Biolabs GmbH
Kits	Hersteller
2-D Quant	GE Healthcare Europe GmbH
BioLux [®] Luziferase Assay (GLuc und CLuc)	New England Biolabs GmbH
CloneJET [™] PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH
ECL Advance Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare Europe GmbH
miRVana miRNA Isolierungskits	Life Technologies GmbH
NucleoBond Xtra Midi Plus EF	Macherey und Nagel GmbH
Nucleofector [™] Kit R + L	Lonza Cologne AG
NucleoSpin [®] Plasmid QuickPure	Macherey und Nagel GmbH
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Verbrauchsmaterialien	Hersteller
6 Well Zellkultur Platten	Greiner Bio-One GmbH
25 cm ² Kulturflaschen mit Belüftung	Sarstedt AG
75 cm ² Kulturflaschen mit Belüftung	Sarstedt AG
175 cm ² Kulturflaschen mit Belüftung	Sarstedt AG
MicroAmp [®] Fast96-Well Reaction Plates	Life Technologies GmbH
Mikroreaktionsgefäße 0,2 und 1,5 ml	Sarstedt AG

Petrischalen	Sarstedt AG
Pipettenspitzen 2,5, 10, 100, 1000 μ l	Sarstedt AG
PVDF Membran Amersham Hybond TM -P	GE Healthcare Europe GmbH
Roti [®] -Store Cryoröhrchen	Carl Roth GmbH
Serologische Pipetten 10 und 25 ml	Sarstedt AG
50 ml Zentrifugenröhren	Sarstedt AG
Antikörper	Hersteller
Anti-IHH Antikörper	ab52919, Abcam
ECL-Anti-rabbit IgG Antikörper	GE Healthcare Europe GmbH
Mouse Anti-GAPDH (1D4) Antikörper	NB300-221, Novus Biologicals
ECL Anti-mouse IgG Antikörper	GE Healthcare Europe GmbH
Anti-Rabbit IgG (Alexa Fluor [®] 488) preadsorbed	ab150085, Abcam
Sheep anti-DIG-AP	11 093 274 910, Roche, GmbH

A.4. Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' - 3')
SMAP	
NotIhCASP7-3UTR fw	tagcggccgcgctgagaagcaatgggtcac
XhoIhCASP7-3UTR rev	ggctcgagaggaattaagcaaccacat
hCASP7 SDM2 f rev	tcaagaattcaaaagaggtgttggtgtgaaaacaaagtcca
hCASP7 SDM2 r fw	tggcactttgttttcacaccaaacaccttttgaattcttga
hCASP7 SDM1 f rev	ttcagagaacaaaagaggcgtgtgaaagttcttccctg
hCASP7 SDM1 r fw	caggaagaaactttccacacgcctctttgttctctgaa
SLURP	
SLURP rt	gtcctccctcccttacggttgctcatcgagaaag- ggaggaggacgatgtttttttttttttttttvn
fw i	acggttgctcatcgaga
fw ii	aaggaggaggacgatg
sscDHH rev i	atgcggttctggagagtcac
sscDHH rev ii	tcggttcctctatcgtttgg
sscSELPLG rev i	gccaccaccaatggagtc
sscSELPLG rev ii	gaaggcagagcctcagaagg
sscTGFBR3rev i	gttcgcagcgtttgtgat
sscTGFBR3rev ii	ggggccttgtgtacatct
sscCASP7rev i	tgtattgcaggcagtgaggta
sscCASP7fw ii	tgcccttaggtgtgtagg
qPCR	
ssc/hsaIHHfw	ctcgcNtacaagcagttcagcc
ssc/hsaIHHrev	cgagttcaggcggctccttgca
hsaDHHfw	cccacatcatcttcaagga
hsaDHHrev	ggccttcgtagtgagtgaa
sscDHHfw	gggacctggtgcctaactac
sscDHHrev	cgtttaccgctccttacac
hsaSHHfw	gtggccgagaagacccta
hsaSHHrev	caaagcgttcaactgtcctta
sscSHHfw	cctacaagcagtttatcccca
sscSHHrev	aggcattcagctgtccttg
sscSFRP1fw	tgctcaagtgtgacaagttcc
sscSFRP1rev	tcttcatcctcaggcgaact
sscPTCH1fw	ccttctttatggccgatta
sscPTCH1rev	acacaggggctcgtaaaaca
sscSMOfw	cgtgagtgatctgtttg
sscSMOrev	tggtctcgttgatcttgctg

sscGLI1fw	ctgcaccaaacgctacacag
sscGLI1rev	ccctctggcacagtcagtct
sscGLI2fw	aggccgaggtggtcatctat
sscGLI2rev	atgtgcaccaccagcatgta
sscHHIPfw	tacttgccgaggccatattc
sscHHIPrev	tgctttctgctaattgtctcca
sscSUFUfw	atggcgacaacagagtcacat
sscSUFUrev	ctgcagaaggtgttctctgact
sscDISP2fw	ccccctgagaagagctacg
sscDISP2rev	aagtgggtatgggagcgaat
hsaHHATfw	tcaccgggatgtggaggtat
hsaHHATrev	gcaccagaggtagtcgtagc
sscHHATfw	tgcaaaaaccgtccatccag
sscHHATrev	tggccagccttgaatgaaga
hsaGAPDHfw	ccatcttccaggagcgagat
hsaGAPDHrev	ctaagcagttggtggtgcag
sscGAPDHfw	attccaccacgcaagttc
sscGAPDHrev	aaggggcagagatgatgacc
hsaACTBfw	ggacttcgagcaagagatgg
hsaACTBrev	agcactgtgttggcgtacag
sscACTBfw	caactgggacgacatggag
sscACTBrev	gagtccatcacgatgccag
sscTBPfw	ataagagaaccccgaccac
sscTBPrev	ctcccaccatgttctgaat
hsaUBCfw	agaaagaccaccagtgac
hsaUBCrev	tgccagtgagtgcttcacg
sscUBCfw	cagtcgcttctgaacactgc
sscUBCrev	aggagcagaacaacctggaa
hsaSDHfw	tgggaacaagagggcatctg
hsaSDHrev	ccaccactgcatcaaattcatg

Name	Sequenz (5' - 3')
	miR-Q qPCR
MP-fw	tgtcaggcaaccgtattcacc
MP-rev	cgtcagatgtccgagtagagg
RT6-miR-15a-5p	tgtcaggcaaccgtattcaccgtgagtggtcacaac
miR-15a/b-5p-rev	cgtcagatgtccgagtagagggggaacggcgtagcagcacatmatggtt
miR-15a/b-5p-cDNA	tgtcaggcaaccgtattcaccgtgagtggtcacaacatmatgtgctgcta
RT6-miR-15b-5p	tgtcaggcaaccgtattcaccgtgagtggtgtaaac
RT6-miR-16-5p	tgtcaggcaaccgtattcaccgtgagtggtcgccaat

miR-16-5p-rev	cgtcagatgtccgagtagagggggaacggcgtagcagcacgtaaatt
miR-16-5p-cDNA	tgtcaggcaaccgtattcaccgtgagtggtcgccaatatttacgtgctgcta
RT6-miR-195-5p	tgtcaggcaaccgtattcaccgtgagtggtgccaat
miR-195-5p-rev	cgtcagatgtccgagtagagggggaacggcgtagcagcacagaaatt
miR-195-5p-cDNA	tgtcaggcaaccgtattcaccgtgagtggtcgccaatatttctgtgctgcta
RT6-miR-424-5p	tgtcaggcaaccgtattcaccgtgagtggtttcaaaa
miR-424-5p-rev	cgtcagatgtccgagtagagggggaacggcgcagcagcaattcatgttt
miR-424-5p-cDNA	tgtcaggcaaccgtattcaccgtgagtggtttcaaaacatgaattgctgctg
RT6-miR-497-5p	tgtcaggcaaccgtattcaccgtgagtggtacaaac
miR-497-5p-rev	cgtcagatgtccgagtagagggggaacggcgcagcagcacactgtggtt
miR-497-5p-cDNA	tgtcaggcaaccgtattcaccgtgagtggtacaaaccacagtgtgctgctg
RT6-miR-21	tgtcaggcaaccgtattcaccgtgagtggttcaaca
miR-21-rev	cgtcagatgtccgagtagagggggaacggcgtagcttatcagactga
RT6-miR-145	tgtcaggcaaccgtattcaccgtgagtggttaaggga
miR-145	cgtcagatgtccgagtagagggggaacggcgggtccagtttcccaggaa
RT6-RNU6	tgtcaggcaaccgtattcaccaaaaatat
RNU6-rev	cgtcagatgtccgagtagaggggtgctgcttcggcagc
	Reporterplasmide
hsaIHHst	ggccgccttaggccctttgggtgggcttgcgcctcagttgatgctgctaaat
hsaIHHat	ctagatttagcagcatcaactgagggcgaagcccacccaaagggcctaaggc
hsaIHHmst	ggccgccttaggccctttgggtgggcttgcgcctcagttgaactgaagcaat
hsaIHHmat	ctagattgcttcagttcaactgagggcgaagcccacccaaagggcctaaggc
sscIHHst	ggccgccttaggcccttttagatgggcttgacactcagttgatgctgctagt
sscIHHat	ctagacttagcagcatcaactgaggtgcaagcccatctaagaggggcttacggc
sscIHHmst	ggccgccttaggcccttttagatgggcttgacactcagttgaactgaagcgt
sscIHHmat	ctagacgcttcagttcaactgaggtgcaagcccatctaagaggggcttacggc
sscPTCH1st	ggccgcaaaatttcagcatatgttgctgctgct
sscPTCH1at	ctagagcagcagcaacatagctgaaattttgc
sscPTCH1mst	ggccgcaaaatttcagcatattcgagatgcct
sscPTCH1mat	ctagaggcatcctcgaatatgctgaaattttgc

A.5. Nukleotidsequenzen

A.5.1. DHH 3' UTR

>gi|441478414|emb|HE651025.1| Sus scrofa partial mRNA for DHH gene 3' UTR

```
1 TCGGTTCCCTC TATCGTTTGG CAGAGGAGCT GCTGGACTGA GCGCTCCAGG CATGGAAACC
61 TCGAGGCGCC CGCCTAAACG GGGGCGTGCA GGCCGAGACC TGGGGTTGTG GACTGGGAGG
121 GAGGGAGGGA TGAGGAGAAA AATGGATGCG ATGGTTTAGG GGTCACCTCT AACTGAGAGG
181 TTGGGTCCTA GGTCGGTGGG GTTGATGATG GGTACTCCCT GACGGGGACT ATTTTGCCTC
241 TTCTGCCCCA GTGCCTCAGC CCCACCCGAT TATTTTATTT TATTTTCTAT TTATAAATTG
301 TAATATAATG ACCTACTTGC CCAGCCTGGC AAGATGAGGA GCTGGGGCAC AGCGTTAACA
361 CTGTCTGACA CAGGAGCCAA TCTGACATTT TCCTACAGGT GGGCTAATAA AGGGAAAAC
421 TCCAGGAAAA AAAAAAAAAA AAAAA
```

A.5.2. SELPLG 3' UTR

>g|441478413|emb|HE651024.1| Sus scrofa partial mRNA for SELPLG gene 3' UTR

```
1 GAAGGCAGAG CCTCAGAAGG ACCGTGAAGG GGATGATCTC ACCCTGCACA TCGTCCTCCC
61 TCCCTTAGCT CCCAGCCCCT GCTTGAGCAG GACCAGCCCC CAGGCTGCCT CTGTGGCCTC
121 TGCTTCCTCC AGGTCTGGGT TCCTTGGAGC CCCTGGGGAT GGGGATCTTT AGGGCCAGGA
181 CCCTGGCCAC CCTACACAAG ACTGAGAGCA GCCAGGGTCC AGGCCCCAGA GCAGGCCTGG
241 CAAACGGAAC CTCCAGGAGA GGCTGGAGAG ACCTCCTCCA CCTCCAGCC TCCCATCTGT
301 TGTGGGCTCC CTCCTGCGGC TGTCTCCCC CTCCCCAAG CCCTGCCGA CCCCTCCCC
361 CCCTGGCTGG GAGGCCAAG CACCCAGGAA GATGGGAAAA TTCCTGCCGC CACCCCACT
421 GCCATTTTCT TCTGGTTGCC ATGGTCACTA CAAGGAAGGG GCACTTTTGA GGGGACTGCC
481 AGATTCCTGA GTTCATTTCT TATTAATTCC CCGTTTGGGG TGTCTTTCTG GGGAACCTGG
541 GGTGAGGGCT GGGCCTGTGG GGGCTGGGCA GGCAGAAAGC CCAAAGCCAA GGGCTTCCTT
601 CGGATCAACG AGCTTCCATC TGGCCACTGA GTAACCCTGT CCTGTCCTCC CCCGCCGCC
661 CCTGTGGCCA GGGTCTGCC TGTTCATGGG AGTTTCCAGA GGCCAGCCTG AGCCTTGAA
721 CATCACAGAC ACTTAGTAAA TGTGGGAAC AAAAAAAAAA AAAAA
```

A.5.3. TGFBR3 3' UTR

>gi|449714622|emb|HF566399.1| Sus scrofa partial mRNA for TGFBR3 gene, 3' UTR region

```

 1 GGGGCCTTGT GGTACATCTA CTCTCACACA GGAGACAGCG CAGGAAGGCA GCCCGTGCCC
 61 ACCTCGCCGC CAGCCTCGGA GAACAGCAGC GCGGCGCACA GCCTGGGCAG CACGCAGAGC
121 ACCCCCTGCT CCAGCAGCAG CGCCGCCTAG CCCGCCGCCG GGATGCCCGC GCGTCCCCGT
181 CGAGAGCCAA CGGCAGTGGA ACGGGCACCT GCTGTGCTCA CCCCCCTCCC AGGGCGAGGC
241 TAACTACGAC CCCGGGCTTC TGTAACACCC TAGATCCATA CGAGAAAGCT AAGGTGGTGG
301 GTTTCTCCAC CAGCCCCTCA CAGGCCTGGG GCTTTCAATG TGAAACGCAT GCCAGTCTT
361 AAAATGCTGC TTTGTCCAGG TAAGAACATC CATAAGCTGG GGCCCTGCGT TTGACTCGGA
421 TGCAAGGAGC TGGTAAAAGT GTAACAGCCA GGTTCGTAGAA CCAGGGAGGG GAAAGTGCCC
481 AACACTCTCT TATAACCAAC GGAACCAAGG CGTAAAACGA AAGAAGCGTG GCAAGACTTT
541 CCGCGTGTGT CCCTCCCCGG CTCCTTTGCA CCTTCTGGAT GCACACGTCC CACCTTGCTG
601 GTACACGGGT GGGGACCCGT GTGTCGGCTC GATGGCTGCA GCCCTGGCGG GCTGCATCCT
661 GACACACAGC CAGGTGACAT TCCTTTCGTG CGCCCTGGGC CAAAACCAGC GCCCGGCGCC
721 ATGTCCGTTT CCTCCTCCCC GCCCTTGTGT ACCCACTGCA GACACGTCTG AATGCAAATT
781 TTGTATTTCT TTATAGGCTT TGGGAAAGCG AAAGTGGCCC ACATCGGGGA CTGCAGATTC
841 ATGCCCATTT ATGACATTGT GTTCTAATAA ATGAATGTAT CCATGGGGGC ACCATTGAGC
901 TGTAAGTCA AGGAGGAATT TGCACAGTGA TGGACGTGCC AGTCCAAGTA GGTAATTTGT
961 CATCTGGCAC ATTTGTTTTT TCAGTTGAAG AGAAAATTC TCCCGTTTTT AAATATCCTA
1021 CCCTTTCAGA GTTGAATTTT ATTCTTAAAT ATTTTTGGGA GAATTAGTGT TTCCCCGCAC
1081 AACGCGTCAA GCGTTTGAAT AGACTCTTTT GTAGAAACCA AGCTCTTGTA AGATGCCAAC
1141 GCATGGCAGA TCCTTTGGGA TTCCAGTTGG TTATCTGAAC AGTGTACCA GCTCTGCCAA
1201 GAAAGCCGTG AGGTATGGCA GAGGGCCCTC TTTGGGATTT TACTTTCCTT CTTTGCTTAA
1261 ACGTATTCCC CAAACTCAAA AAGGATTTGA GGTGAATTTT AATTAATAATG GAATAATACG
1321 ATGCCACTTT GCAGCTAAAA TAAGCTCAAC TGGTACCTCT CTGTAAAAAA AAAAAAAAAA

```

A.5.4. CASP7 3' UTR

>gi|449714621|emb|HF566398.1| Sus scrofa partial mRNA for CASP7 gene, 3' UTR region

```

 1 ACACCGGATG ACTCAGACAT GGAAATATAC CCTGGTTTCC CCTCTCCTTC TGGCCTTTAG
 61 TCTTTGTCCA GGACCTTGGC CCTTTCAGCC CCAGCTGGGA GGGATCTGGC AAGGGCCCTG
121 GGAAGTCTGG TTTCTGCAG TACAGAGCAC AGCAAGGGGC AGTGAGTCAG GGGAGGAACA
181 GGAAATAGGC CGGGCTTACA AAGTGAAGAG AAGGAATCCT TTTCCCTGTG TTCAGTGATT
241 CATCCATTCA TTCCTTATT CATTGAGTTG TCAGATAATC TGTGTATTGC CGACCATGTG
301 CCAAATAATT TGTTTCAGCT GGAAGATATA TCTGAACTT TTTAGGTTAT TCCAAGCCTT
361 ATTCTGGAGT AAAATTTTTG TTATCTCTAG TTCTCTAAAT TGGGGAGGGT TGATGGCGAA
421 GATATTTGCA CTGTGTCCC AAAGTGGTGG TATCTTTTGA ATTCCTGATA AATTACTGTT
481 TTATTCTGCC TAATAACTTG TTAACAAACA TTTATATTTA TTGATTAATA TGCGATTGCT
541 TAATTCCTAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

```

A.6. Publikationsliste

A.6.1. Publikationen

Sharbati, S.; Sharbati, J.; Hoeke, L.; **Bohmer, M.**; Einspanier, R. (2012): Quantification and accurate normalisation of small RNAs through new custom RT-qPCR arrays demonstrates Salmonella-induced microRNAs in human monocytes. *BMC genomics*; 13(1), S. 23

Bohmer, M.; Sharbati, J.; Zur Bruegge, J.; Einspanier, R.; Sharbati, S. (2013): Structural Analysis of microRNA-Target Interaction by Sequential Seed Mutagenesis and Stem Loop 3' RACE. *PLoS one*; 8(11), S. e81427

A.6.2. Poster

Bohmer, M.; Sharbati, J.; Hoeke, L.; Friedländer, M.; Chen, W.; Keller, A.; Stähler, P.; Rajewsky, N.; Einspanier, R.; Sharbati, S. (2010): Regulative function of an ileal porcine microRNA cluster. ISAG 2010 Edinburgh – 26.07.-30.07.2010.

Bohmer, M.; Sharbati, J.; Hoeke, L.; Einspanier, R.; Sharbati, S. (2011): A porcine microRNA and its targets. 62. Mosbacher Kolloquium Mechanism of RNA-mediated Regulation Mosbach/Baden – 07.04.-09.04.2011.

Bohmer, M.; Einspanier, R.; Sharbati, S. (2012): Indian Hedgehog Signalling is regulated by the miR-15/16/195/424/497 family. Complex Life of mRNAs, EMBL Heidelberg – 07.10.-10.10.2012.

Hoeke, L.; Sharbati, J.; **Bohmer, M.**; Einspanier, R.; Sharbati, S. (2012): The microRNA-34a targets Selectin P Ligand upon intestinal Salmonella infection. National Symposium on Zoonoses Research 2012 Berlin – 11.10.-12.10.2012.

Bohmer, M.; Sharbati, J.; Hahn, E.; Steiner, C.; Einspanier, R.; Sharbati, S. (2013): The Hedgehog pathway: regulating microRNAs in the porcine intestinal development. 1st International Workshop on Nutrition and Intestinal Microbiota Host Interaction in the Pig Berlin Berlin – 24.10.-25.10.2013. In: Book of Abstracts – SFB 852 (Hrsg.) S. 85 ISBN: 978-3-00-043962-9

A.7. Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle all denjenigen, die es mir ermöglicht haben am Institut für Veterinär-Biochemie meine Doktorarbeit zu schreiben. Herrn Prof. Dr. Dr. Einspanier möchte ich für die freundliche Aufnahme am Institut und die jederzeitige Beratung und Unterstützung während meiner Promotion sowie die Begutachtung der Dissertation danken. Auch Prof. Dr. Rupert Mutzel möchte ich dafür danken, dass er sich sowohl dazu bereitgefunden hat meine Promotion zu unterstützen, als auch Teil meiner Mentorengruppe innerhalb der Dahlem Research School war.

Für die mannigfaltigen Hilfestellungen, Tipps und allseits exzellente direkte Betreuung durch PD Dr. Soroush Sharbati bin ich sehr dankbar. Ich habe den Austausch von Ideen und Visionen jederzeit sehr genossen und fühlte mich häufig dazu inspiriert auch über mein Projekt hinaus neue Perspektiven zu betrachten.

Ich möchte mich auch bei der gesamten Arbeitsgruppe bedanken, da mit meinen Kollegen Barbara Kutz-Lohroff, Hannah Lögering, Jennifer zur Brügge, Jutta Sharbati und Lena Hoeke der Laboralltag sehr angenehm war. So möchte ich ebenso die gesprächigen Kaffeepausen mit meinen Kollegen des gesamten Instituts nicht missen, bei denen auch das eine oder andere Laborproblem diskutiert und gelöst werden konnte.

Für die fachliche wie auch finanzielle Unterstützung gilt mein Dank dem Sonderforschungsbereich 852, durch deren Ein-Jahres-Stipendium ich mit meiner Promotion beginnen konnte. Ebenso danke ich für die anschließende finanzielle Unterstützung durch das Elsa-Neumann-Stipendium des Landes Berlin.

Meinen Eltern möchte ich für die in jeglicher Hinsicht jahrelange Unterstützung danken, durch die ich mein Studium und die anschließende Promotion realisieren konnte. Ich möchte auch meinem Bruder für die langen Telefonate und Gespräche danken, bei denen wir uns über Labor-, Alltags- und Zukunftsperspektiven austauschen konnten.

Der wertvollste Rückhalt in meinem Leben war und ist meine Frau. Melissa ich danke dir von ganzem Herzen für dein entgegenwärtiges Verständnis und deine Liebe.

A.8. Selbstständigkeitserklärung

Die dieser Dissertation zugrunde liegenden Arbeiten wurden am Institut für Veterinär-Biochemie der Freien Universität Berlin, im Zeitraum März 2010 bis Januar 2014 durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, 30.01.2014 _____ Marc Bohmer