

Mukosale Genexpression während der porcinen postnatalen Darmentwicklung und Einfluss einer Probiotikagabe

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

Jutta Sharbati

geb. Scholven
aus Duisburg

Januar, 2010

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit vom Januar 2005 bis April 2008 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Einspanier am Institut für Veterinär-Biochemie der Freien Universität Berlin.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ronald Gust

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier

Tag der Disputation: 15.03.2010

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Die postnatale Darmentwicklung | 1 |
| 1.2. Probiotika | 2 |
| 1.3. Das darmassoziierte Immunsystem | 3 |
| 1.4. Das Darmepithel als mukosale Barriere | 5 |
| 1.5. Trefoil factor family (TFF) Peptide | 6 |
| 1.6. Die Rolle von Wachstumsfaktoren und Cytokinen in der intestinalen Mukosa | 8 |
| 1.7. MicroRNA | 10 |
| 2. Zielsetzung | 13 |
| 3. Darstellung der Arbeit | 17 |
| 3.1. Manuskript: „Intestinal expression of TFF and related genes during postnatal development in a piglet probiotic trial” | 18 |
| 3.2. Manuskript „miR-Q: a novel quantitative RT-PCR approach for the expression profiling of small RNA molecules such as miRNAs in a complex sample“ | 22 |
| 3.3. Manuskript „Concatameric cloning of porcine microRNA molecules after assembly PCR” | 24 |
| 4. Diskussion | 26 |
| 5. Zusammenfassung | 32 |
| 6. Abstract | 34 |
| 7. Referenzen | 36 |
| 8. Lebenslauf | 42 |
| 9. Publikationsliste | 43 |
| 9.1. Publikationen | 43 |
| 9.2. Vorträge | 43 |
| 9.3. Poster-Präsentationen | 44 |
| 10. Danksagungen | 45 |
| 11. Anhang - Publikationen | 46 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|---|
| cDNA | complementary deoxyribonucleic acid |
| CED | Chronisch entzündliche Darmerkrankungen |
| cfu | colony forming units |
| COX-2 | Cyclooxygenase-2 |
| CSR | class-switch recombination |
| Ct | cycle threshold |
| d | day |
| DC | dendritic cells |
| DNA | deoxyribonucleic acid |
| ds-RNA | double-stranded RNA |
| DSS | Dextransulfat |
| EGF | Epidermal Growth Factor |
| EGF-R | EGF Rezeptor |
| EU | Europäische Union |
| FAE | Follikel-assoziiertes Epithel |
| FAO | Food and Agriculture Organization |
| fM | Femtomol |
| GALT | gut-associated lymphoid tissue |
| GC | germinal center |
| HEV | Hochendotheliale Venolen |
| IEL | Intraepitheliale Lymphozyten |
| IgA | Immunglobulin A |
| IL-10 | Interleukin 10 |
| ILF | Isolierte Lymphfollikel |
| Lat. | Lateinisch |
| LNA | locked nucleic acid |
| miRNA | microRNA |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mRNA | messenger RNA |
| N | Anzahl |

| | |
|---------------|---|
| NCIMB | National Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria |
| NF κ B | Nuclear Factor kappaB |
| nt | Nukleotide |
| PACT | protein kinase R-activating protein |
| PAMP | pathogen-associated molecular patterns |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PP | Peyersche Platten |
| pre-miRNA | precursor miRNA |
| pri-miRNA | primary miRNA |
| qRT-PCR | quantitative RT-PCR |
| RNA | ribonucleic acid |
| RNApol | RNA Polymerase |
| RNase | Ribonuklease |
| rRNA | ribosomale RNA |
| RT | Reverse Transkriptase |
| S | Svedberg |
| SC | somatic cells |
| SHM | somatic hypermutation |
| TFF | Trefoil-factor family Peptide |
| TGF α | Transforming Growth Factor-alpha |
| TGF β | Transforming Growth Factor-beta |
| TLR | Toll-like Receptor |
| TNF α | Tumor Necrosis Factor-alpha |
| TRBP | HIV-1 TAR RNA-binding protein |
| UC | Ulcerative Colitis |
| UK | United Kingdom |
| UTR | Untranslatierte Region |
| UV-VIS | ultraviolett-visible |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| WHO | World Health Organization |

1. Einleitung

1.1. Die postnatale Darmentwicklung

Während der postnatalen Entwicklung finden im Schweinedarm grundlegende strukturelle, sowie funktionelle Veränderungen statt. Vor allem sind diese Veränderungen mit dem Absetzen der Ferkel von den Muttertieren assoziiert. Das Aufrechterhalten der Integrität der epithelialen Barriere des Darms und die Entwicklung einer adäquaten mukosalen Immunantwort sind kritische Prozesse für die Prävention intestinaler Infektionen und Krankheiten. Die Untersuchung potenzieller Regulatoren, die an der intestinalen Entwicklung beteiligt sind, ist aufgrund der hohen Anzahl an Darmerkrankungen bei Ferkeln von großer Bedeutung.

Die kritischste Phase der postnatalen Darmentwicklung konzentriert sich auf die Absetzphase, in der die Ferkel von Muttermilch auf feste Nahrung umgestellt werden. In dieser Phase werden die Ferkel massiv neuen Nahrungsantigenen ausgesetzt, denn dieser Übergang erfolgt in der Schweinezucht nicht allmählich, sondern abrupt ohne Möglichkeit der langsamen Adaptation des Darms. Um die Geburtenrate der Sauen zum Zwecke einer Produktivitätssteigerung zu erhöhen, ist es aktuell üblich Ferkel bereits im Alter von 3-4 Wochen abzusetzen. An diesem frühen Zeitpunkt sind die Darmmotilität, Nährstoffaufnahme und die Verdauungsfunktionen weder ausgereift noch auf feste Nahrung abgestimmt und häufig äußert sich dies als Diarrhoe und erhöhte Infektanfälligkeit [1]. Zudem ist das Immunsystem in Absetzferkeln noch nicht voll entwickelt. Krankheiten, die mit dem Absetzen der Ferkel assoziiert sind, stellen die schwerwiegendsten Probleme in der Schweinehaltung dar und bedingen maßgeblich die Mortalität der Ferkel. Diese liegt bei der Schweineproduktion in EU Nationen immer noch bei 17% [2]. Ein substantieller Teil davon kann auf Infektionen zurückgeführt werden, die über die mukosale Barriere den Organismus befallen.

Die postnatale Darmentwicklung und wichtige assoziierte Ereignisse, wie die Umstellung auf feste Nahrung, benötigen ein komplexes Netzwerk molekularer Mechanismen, die eine Vielzahl parakriner und intrazellulärer regulatorischer Effektoren dirigieren. Im humanen oder porcinen System gibt es jedoch im Kontext der postnatalen Darmentwicklung nur limitierte Daten über molekulare Mechanismen und zeitliche Expressionsmuster solcher Faktoren. Zudem basieren vorhandene Arbeiten hauptsächlich auf dem adulten Organismus

und auf Tiermodellen mit Nagern, deren neonatale Darmbeschaffenheit sich grundlegend von Spezies mit langer Tragezeit (Mensch, Schwein) unterscheidet. So besitzen Nager nach der Geburt beispielsweise eine prämaturre und damit morphologisch wenig differenzierte mukosale Oberfläche. Auch postnatale Zellproliferationsmuster sind bis zur Umstellung auf feste Nahrung wenig ausgeprägt [3]. Dahingegen ist beim Schwein die Darmentwicklung bereits pränatal weit fortgeschritten [4] und daher repräsentativ für die humane neonatale Darmentwicklung. Eine frühzeitliche Ausbildung von Krypten ist beispielsweise charakteristisch für den humanen Darm [5], bzw. für Spezies wie das Schwein mit einer langen Trächtigkeit [6, 7], jedoch nicht für Nager, deren Ausprägung von Krypten erst nach der Geburt einsetzt [8]. Erst in der Absetzphase geht die intestinale Redifferenzierung von Nagern mit einer erhöhten Zellproliferation der Enterocyten einher, die zu einer erhöhten Kryptentiefe und Zottenlänge führt [9].

Bei der Differenzierung und Proliferation von Enterocyten ist die interzelluläre Kommunikation ein Schlüsselement. Epitheliale und subepitheliale Zellen produzieren extrazelluläre Moleküle, die ein lokales regulatorisches Netzwerk zur Initiierung und Steuerung der Genexpression bilden. Eine kontrollierte Proteinexpression benötigt zeitlich regulierte lokale Mechanismen auf transkriptionaler- und posttranskriptionaler Ebene, die spezifisch für Darmabschnitte und Lokalisation sind. Viele Studien beschreiben die Entwicklung intestinaler Transportfunktionen und Verdauungsenzyme. Obwohl Kenntnisse zur Reifung des parakrinen und zellulären regulatorischen Netzwerks im postnatalen Intestinaltrakt des humanen oder porcinen Systems für das Verständnis gastrointestinaler Störungen und Durchfallerkrankungen wesentlich sind, gibt es nur wenige Studien auf diesem Gebiet [10].

1.2. Probiotika

Eine der Möglichkeiten zur Behandlung und Prävention von Durchfallerkrankungen bei Absetzferkeln stellt die Fütterung von Probiotika dar. Probiotika sind von der World Health Organization (FAO/WHO 2001) definiert als “lebende Mikroorganismen, die, wenn sie in adäquaten Mengen verabreicht werden, einen gesundheitlichen Nutzen für den Wirtsorganismus erbringen“. Probiotika finden breite Anwendung bei der Prävention von Krankheiten sowohl im Menschen als auch im Tier. Es sind zahlreiche Eigenschaften von Probiotika belegt. Durch den Einfluss auf Wirtsmikrobiota und Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) wirken Probiotika anti-infektiös und immunmodulatorisch. Weiterhin unterstützen sie die epitheliale Barriere, sie besitzen positive metabolische Effekte

und können die intestinale Mobilität und Funktion beeinflussen [11, 12]. Es liegen zahlreiche wissenschaftliche Studien vor, die diese Thesen unterstützen, allerdings muss die Effizienz und Reproduzierbarkeit der probiotischen Wirkung durch weitere Arbeiten untermauert werden. Vor allem die molekularen Wirkmechanismen sind derzeit noch nicht umfassend ergründet.

In diesem Zusammenhang spielt das darmassoziierte Immunsystem des Schweins eine essenzielle Rolle in den beschriebenen Prozessen, wie das Absetzen und die Probiotikawirkung. Die molekularen Vorgänge in der postnatalen Darmentwicklung müssen im Kontext verschiedener Einheiten dieses Systems betrachtet werden, denn sie stellen durch immunassoziierte und regulatorische Funktionen wichtige Komponenten des intestinalen Abwehrsystems dar.

1.3. Das darmassoziierte Immunsystem

Das darmassoziierte Immunsystem des Schweins schützt den Organismus vor infektiösen und umweltbedingten Gefahren und ist in der Lage zwischen Nahrung, der symbiontischen sowie kommensalen Darmflora und Pathogenen zu unterscheiden. Die luminale Oberfläche des Darms besteht aus der Darmmukosa, deren einzellige Epithelzellschicht eine Barriere zwischen dem Darmlumen und der darunter liegenden Lamina propria und Muscularis mucosae bildet. Das mukosale Epithel hat wichtige Funktionen für die Nährstoffaufnahme, sowie als schützende Barriere gegen schädliche Substanzen und Pathogene. Die Differenzierung zwischen harmlosen und schädlichen luminalen Antigenen benötigt ein komplexes zelluläres System, um funktionale Störungen der Mukosa zu verhindern. Das Epithel des proximalen Dünndarms ist spezialisiert auf absorptive und sekretorische Funktionen, während die Plasmazellen der Lamina propria des Duodenums die überwiegende Masse an Immunglobulinen (hauptsächlich Immunglobulin A, IgA) bilden. Das Jejunum, Ileum und der distale Darm haben zudem immunologisch relevante Kompartimente. Eine sehr wichtige und hochspezialisierte Funktionseinheit des Immunsystems stellt das Darmassoziierte lymphatische Gewebe (GALT, gut-associated lymphoid tissue) dar, welches in enger Wechselwirkung mit dem Darmepithel und davon abgeleiteten M-Zellen steht und die größte Masse an Immunzellen im ganzen Organismus darstellt [12]. Wie in der Abbildung 1 dargestellt, kann das GALT antigenspezifische Immunantworten vermitteln, aber auch regulieren. Dies ist von zentraler Bedeutung für die Entwicklung einer oralen Toleranz, welche definiert werden kann als das Ausbleiben einer lokalen Entzündungsreaktion der Mukosa, bzw. einer systemischen Immunantwort nach oraler Aufnahme harmloser Antigene.

Die Peyerschen Platten (PP) sind abgeschlossene Einheiten von Lymphgewebe in der Mukosa und Submukosa, die ein follikel-assoziiertes Epithel (FAE) mit zahlreichen spezialisierten Epithelzellen, den sogenannten M-Zellen besitzen. Diese sind in der Lage Antigene durch Endozytose aufzunehmen, um sie den darunter liegenden B- und T-Lymphozyten, sowie Makrophagen zu präsentieren. PP sind neben isolierten Lymphfollikeln (ILF) und Appendix ein essenzieller Bestandteil des GALT. Diese stellen die Einheiten dar, in denen hauptsächlich die Aktivierung mukosaler B- und T-Zellen stattfindet [13]. Eine Migration der B-Zellen in die Mukosa findet dann durch hochendotheliale Venolen (HEV) der interfollikulären Region statt, die vor allem T-Zellen enthält. Die Lamina propria wiederum umfasst viele Immunglobulin A (IgA)-Plasmazellen, T- und B-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen (DC) und Bindegewebszellen (stromal cells, SC). In den PP enthält die Region unterhalb des Dom-Epithels der M-Zellen eine Reihe von antigen-prozessierenden und präsentierenden Zellen, und sie ist die wichtigste induzierbare Einheit für Immunität. Hier kommen zahlreiche dendritische Zellen und B-Zell Follikel vor, die Keimzentren (germinal centres, GC) enthalten und in welchen somatische Mutationen (somatic hypermutation, SHM) und sogenannte Klassenwechsel (class-switch recombination, CSR) stattfinden. Dendritische Zellen der PP sind wahrscheinlich in der Lage orale Toleranz gegenüber harmlosen intestinalen Antigenen zu vermitteln. Dies geschieht indem sie die T-Zell-Aktivität und Migration, sowie die IgA Produktion regulieren [14, 15].

Damit ist die Fähigkeit zur Entwicklung oraler Toleranz ein besonderes Kennzeichen der PP. Ein Verlust dieser Toleranz würde zu intestinaler Entzündung und allergischen Reaktionen

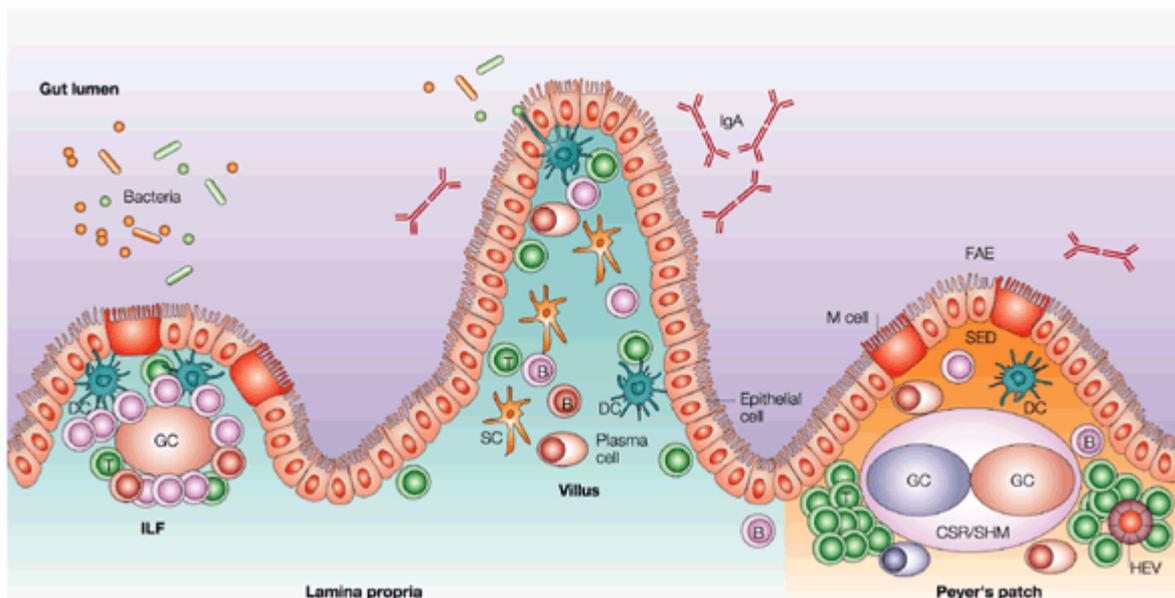


Abbildung 1. Schematische Darstellung des Darm-assoziierten Lymphatischen Gewebes. [16]

führen, wie es z.B. vorübergehend bei Absetzferkeln der Fall ist [17]. Beim Schwein gibt es zwei Kategorien von PP. Zum einen gibt es kleinere und separate, aber lebenslänglich vorhandene PP, die im proximalen Jejunum vorkommen. Die zweite Form, die große einzelne ileocaecale PP mit einer Länge von bis zu 2,5 m entwickelt sich erst mit einem Alter von etwa 4 Wochen ausgehend vom terminalen Ileum [18]. Diese zweite kontinuierliche ileale PP dient den Ferkeln als primäre Quelle von B-Zellen und diese Form der PP spielt anscheinend vor allem im ersten Lebensjahr der Tiere eine Rolle und verschwindet teilweise in älteren Tieren. Wegen Ihrer speziellen Struktur, ihrer Anpassung an Funktionen der Antigenaufnahme, ihrer Fähigkeit Immunantworten zu induzieren und Toleranz gegen Nahrungsantigene zu vermitteln, ist die Mukosa des distalen Jejunums und des Ileums ein ideales Gewebe, um die volle Breite der Immunfunktion des GALT experimentell zu erfassen [17].

1.4. Das Darmepithel als mukosale Barriere

Das mukosale Epithelium des Gastrointestinaltrakts stellt ein Schlüsselement der mukosalen Barriere gegen ein weites Spektrum potenziell schädlicher Substanzen wie Bakterien und Nahrungsbestandteile dar. Außerdem ist die epitheliale Integrität notwendig für die intestinale Immunität und Toleranz. Intestinale Epithelzellen sind miteinander durch eine Reihe von strukturellen Einheiten verbunden. Die apikalen „Tight Junctions“ (lat. Zona occludens) bilden eine parazelluläre Barriere aus Membranproteinen und verhindern die parazelluläre Invasion von Pathogenen, sowie das Durchdringen luminaler Bestandteile in die Mukosa. Eine weitere Spezialisierung der Epithelzellschicht ergibt sich durch deren Fähigkeit, die Immunfunktionen des Darms zu unterstützen. Dies geschieht z.B. durch die Sekretion von Cytokinen und die Expression von Cytokinrezeptoren, sowie durch intraepitheliale Lymphozyten (IEL) [19, 20].

Um die Kontinuität der Epitheldecke aufrecht zu erhalten bedarf es eines komplexen regulatorischen Netzwerks, welches nach Verletzung oder bei umweltbedingten Stressfaktoren essenzielle Reparaturmechanismen koordiniert und steuert. Prozesse wie Modulation der Genexpression, Zellmigration, Proliferation und Wiederaufbau von Zell-Zell-Kontakten spielen hier eine Rolle. Im Falle einer Störung der epithelialen Integrität (z.B. durch Entzündungsreaktionen) hat die gastrointestinale Mukosa eine bemerkenswerte Fähigkeit den Schaden effektiv zu beheben. Der rasche Wiederverschluss der Epithelzellschicht nach solchen Verletzungen wird durch einen Prozess bewerkstelligt, der in der Fachliteratur als „Restitution“ beschrieben wird und der durch eine Migration von

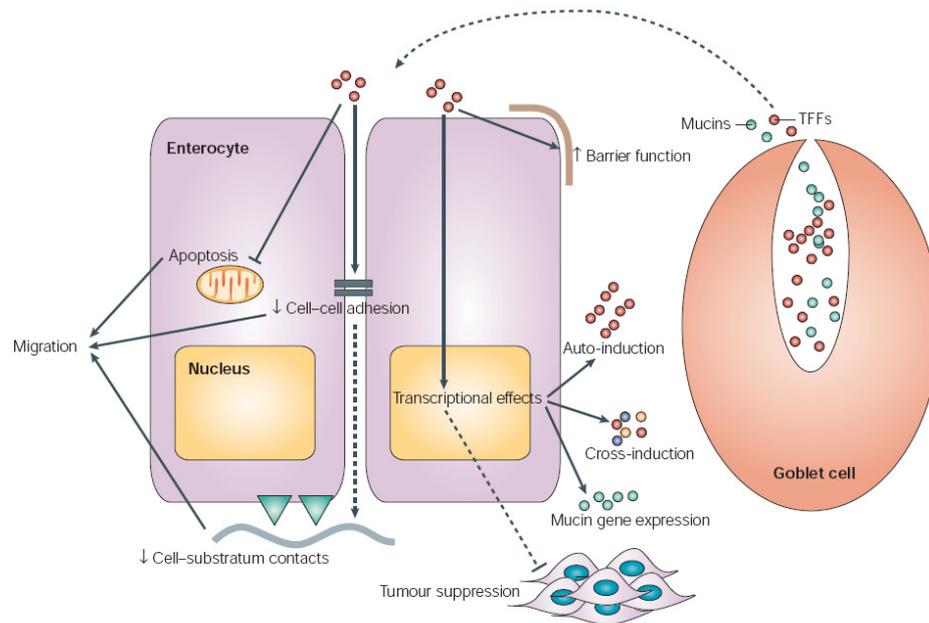


Abbildung 3. Bekannte und potenzielle TFF Funktionen (jeweils durch durchgezogene oder gestrichelte Pfeile gekennzeichnet). [25]

nach einer mukosalen Verletzung oder auch bei verschiedensten entzündlichen Darmerkrankungen verstärkt exprimiert [26, 27]. Regulatorische Sequenzen der TFF Promotoren erhöhen die TFF-Produktion durch Auto-Induktion oder Wechselwirkung mit anderen TFFs, induzieren die Mucinexpression und die Tumorsuppression. TFF-Peptide haben motogene Eigenschaften *in vitro*, reduzieren Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte und unterdrücken die Apoptose, die durch ein Ablösen der Zellen von der Basalmembran der Extrazellulären Matrix ausgelöst wird (Anoikis) [28]. Diese Vorgänge sind notwendig, um Reparaturprozesse mukosaler Epithelien durch Zellmigration zu fördern und stellen die initialen Reparaturprozesse der Mukosa dar, die zum Wiederaufbau der Oberflächenzellkontinuität führen (Abbildung 4). TFFs sind im Gegensatz zu anderen Motogenen nicht mitogen, und erstaunlicherweise wurde bisher kein TFF Rezeptor identifiziert [24, 29]. Die Tatsache, dass die TFF-Expression in mukosalen Epithelien vor allem des Gastrointestinaltrakts lokalisiert ist, lässt vermuten, dass TFFs an der Instandhaltung der Oberflächenintegrität dieser empfindlichen Schleimhäute entscheidend beteiligt sind.

Es wurden Nachweise erbracht, die belegen, dass TFFs auch protektive und heilende Effekte erzielen, wenn sie beispielsweise oral appliziert werden [29, 30]. Die therapeutische Effizienz ist durch die beschriebenen protektiven Eigenschaften, aber auch durch ihre Stabilität im Magen-Darm-Trakt sehr hoch. Auch in transgenen Tieren, die TFF1 überexprimieren, wurden solche Effekte beobachtet [31]. Ihr Einfluss auf die mukosale Heilung wurde deutlich

untermauert durch den Schweregrad der Kolitis bei TFF-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp, welche durch Gabe von Dextransulfat (DSS) experimentell ausgelöst wurde [32]. Verschiedenste Arbeiten haben die Wirksamkeit von TFFs zur Prävention und Behandlung mukosaler Verletzungen, bzw. Entzündungen belegt, und ihre Bioverfügbarkeit und Wirksamkeit wurden in unterschiedlichen Darreichungsformen (oral, rektal, parenteral) untersucht [25]. Vandenbrouke und Kollegen entwickelten einen gentechnisch modifizierten *Lactococcus lactis* zur Produktion von TFFs, der den Standards der Lebensmittelindustrie zur oralen Applikation entsprach. Durch diese Behandlung konnte ein deutlicher Schutz gegen akute, DSS-induzierte Kolitis sowie gegen fortgeschrittene oder chronische Kolitis in IL-10 defizienten Mäusen erzielt werden [29].

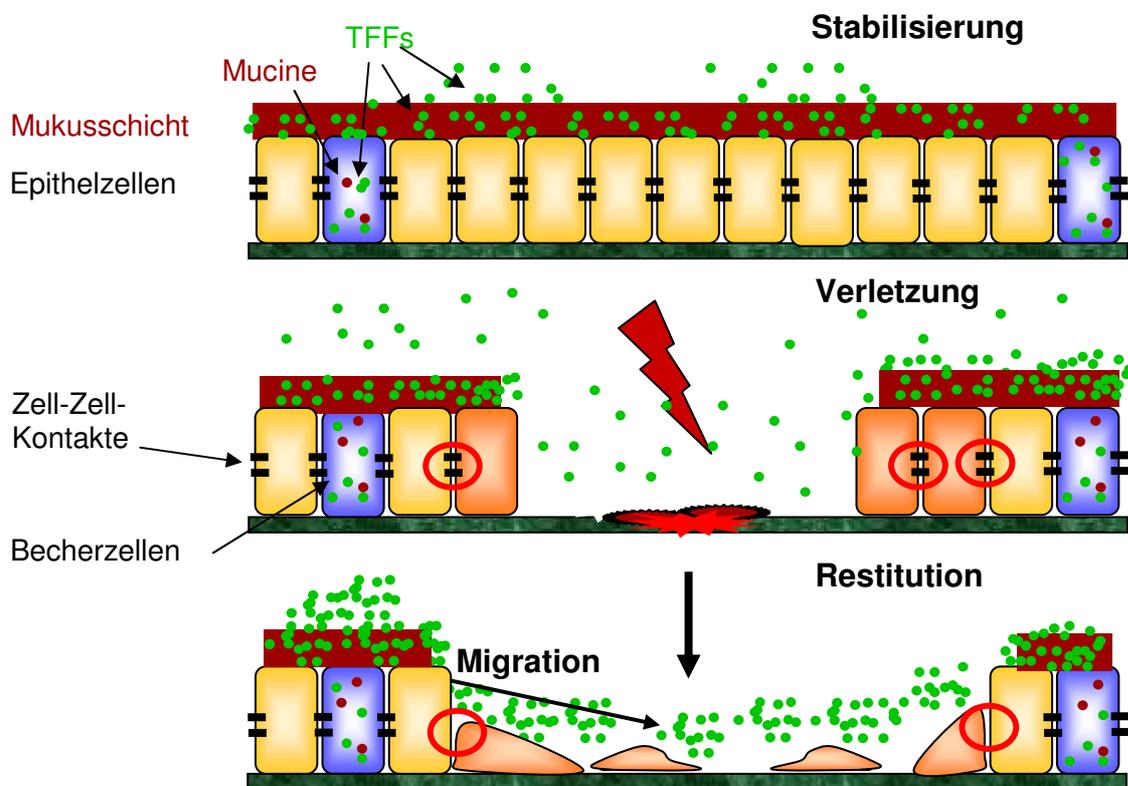


Abbildung 4. Epitheliale Reparatur durch Restitution, nach D. Meyer zum Büschenfelde

1.6. Die Rolle von Wachstumsfaktoren und Cytokinen in der intestinalen Mukosa

Intestinales Wachstum und epitheliale Erneuerung benötigen ein komplexes regulatorisches System, an dem bekanntermaßen biologisch aktive Peptide, Hormone und Wachstumsfaktoren beteiligt sind. Während die TFFs die epitheliale Restitution unter Beteiligung von Mucinen durch einen Transforming Growth Factor-beta (TGF β)-unabhängigen Mechanismus über die apikale Seite des Epithels zu stimulieren scheinen [33],

agieren einige regulatorische Peptide (Epidermal Growth Factor, EGF; Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) von der basolateralen Seite des Epithels und fördern die Reepithelialisierung durch TGF β -abhängige Signaltransduktionswege.

So ist auch die Untersuchung von bekannten Faktoren, die auftretende Entzündungszustände, aber auch umfassende strukturelle Veränderungen beeinflussen, hier von Interesse. Biologisch aktive Peptide, Hormone oder Wachstumsfaktoren sind Teil dieses regulatorischen Systems, wenn auch das Verständnis der Mechanismen, die intestinales Wachstum und epitheliale Erneuerung regulieren, immer noch lückenhaft erscheint.

Der Epidermal Growth Factor (EGF) Rezeptor und wichtige Liganden wie TGF α (Transforming Growth Factor-alpha) und EGF spielen bei den beschriebenen Prozessen eine wichtige Rolle. In der intestinalen Mukosa kontrollieren die Peptide TGF α und EGF durch Aktivierung ihres gemeinsamen Rezeptors (EGF-R) die Zellproliferation durch die Initiierung von Signaltransduktionskaskaden, die die Proliferation stimulieren [34]. Das luminales EGF wird im Dünndarm unter normalen Bedingungen von Brunnerschen Drüsen des proximalen Duodenums sekretiert. EGF-R dagegen wird basolateral in polarisierten Epithelzellen exprimiert, so dass EGF durch das geschlossene Epithel einer intakten, adulten Mukosa keine Bindung mit dem Rezeptor eingehen kann. Jedoch kann bei Gewebsverletzung auch luminal vorliegendes EGF den basolateralen Rezeptor erreichen und Reparaturprozesse initiieren. Da TGF α intrazellulär vorliegt, kann dieses Peptid die mukosale Integrität vor allem unter normalen Bedingungen im Zusammenspiel mit EGF-R fördern [35]. Während der Regeneration von verletztem Gewebe fördern diese Faktoren vor allem die Instandsetzung der beschädigten Epithelzellschicht, wobei TGF α bei akuter Verletzung die entscheidendere Rolle spielt als EGF. Zusätzlich zur Initiierung von Zellproliferation und Differenzierung können Wachstumsfaktoren wie EGF und TGF α andere unabhängige Vorgänge wie die Stimulation der Mukusproduktion oder eine Verminderung der Magensäuresekretion bewirken [36, 37].

TGF α ist ein wichtiges lokales Peptid, das wahrscheinlich sowohl TFF2 aber auch TFF3 während mukosaler Reparaturprozesse regulatorisch beeinflusst [26, 28]. Auch hat TFF3, vergleichbar zu EGF, motogene Eigenschaften und kann so eine Reepithelialisierung nach Gewebsschädigung aktiv fördern [38]. Im Zusammenhang mit *in vitro* proinvasiven Eigenschaften wurde eine indirekte Verknüpfung von TFF2 und TFF3 mit EGF-R durch die Cyclooxygenase-2 (COX-2)-abhängige Signaltransduktion beschrieben [39].

COX-2, ein Enzym, welches an der Prostaglandinsynthese beteiligt ist, spielt eine Rolle bei frühen mukosalen Reparaturprozessen [40, 41]. Die COX-2-Expression wird als Reaktion auf Verletzung oder Entzündungsreaktionen schnell hochreguliert, und die Aktivierung von

COX-2 durch TFF-Peptide wird als wichtige Komponente ihrer zytoprotektiven Eigenschaften betrachtet [41]. Zum anderen spielen proinflammatorische Cytokine wie Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF α) durch Induktion des Nuclear Factor kappaB (NF κ B) eine entscheidende Rolle bei Entzündungsreaktionen im Darm [42]. Diese Faktoren führen zu einer Verminderung der Transkription von TFF3 in gastrointestinalen Zelllinien [43].

1.7. MicroRNA

Neben der Genexpressionsanalyse von Signalmolekülen in der Darmmukosa, ist die Erforschung der Regulation der Genexpression von großer Bedeutung. Die Steuerung der Genexpression ist essenziell für normales Wachstum und Entwicklung, und es gibt zahlreiche bekannte Mechanismen der Genregulation auf transkriptioneller, post-transkriptioneller und post-translationaler Ebene.

MicroRNAs (miRNAs) zählen zu den wichtigsten eukaryotischen Genregulatoren, die erst kürzlich entdeckt wurden. Sie sind kleine, nicht kodierende und interferierende RNAs und spielen eine immense Rolle bei zellulären Prozessen wie Zelldifferenzierung, Apoptose oder der zeitlichen Regulation der Entwicklung. Sie sind einzelsträngige RNA-Moleküle mit einer Länge von ca. 20-25 Nukleotiden (nt), die aus einer doppelsträngigen Haarnadelschleife hervorgehen. Ihre regulatorische Rolle beruht hauptsächlich auf einer Inhibition der Translation der Ziel-mRNAs, indem sie gewöhnlich an die 3' untranslatierte Region (3' UTR) ihrer Ziel mRNA binden und dadurch die Proteinbiosynthese reprimieren [44]. Im Menschen wird angenommen, dass bis zu 90 % der Gene von miRNAs reguliert werden, so dass miRNAs eine der größten Klassen an Genregulatoren darstellen [45].

Abbildung 5 beschreibt die miRNA Biogenese und die Grundlagen der miRNA Interferenz. Sowohl miRNA als auch messenger RNA (mRNA) kodierende Gene werden durch die RNA Polymerase II (RNAPol II) transkribiert. MiRNA Gene kodieren allerdings untranslatierte RNA Transkripte, welche als primäre miRNA (pri-miRNA) bezeichnet werden. Dieses Molekül wird durch einen Mikroprozessorkomplex aus RNase III Droscha und dem dsRNA-Bindeprotein DGCR8 erkannt und zu einer etwa 70–80 Nukleotide großen precursor microRNA (pre-miRNA) prozessiert, welche die typische Haarnadelstruktur aufweist. Die pre-miRNA wird mittels des Exportin-5 Komplexes durch die Kernporen der Kernmembran in das Zytoplasma exportiert und durch einen pre-miRNA prozessierenden Komplex aus Dicer (RNase III), TRBP und PACT erkannt und zu einem miRNA:miRNA Duplex verarbeitet. Die miRNA wird in einen Ribonukleoproteinkomplex aufgenommen (miRNP),

die miRNA Doppelhelix entwunden, und es wird die reife einzelsträngige miRNA gebildet. Der miRNP Komplex kann, abhängig vom Grad der Komplementarität der miRNA zu ihren Zielgenen, eine mRNA durch verschiedene Mechanismen herabregulieren und letztlich zu den P-bodies (processing bodies) führen. Dies sind Zellstrukturen bestehend aus Enzymen und mRNA, deren Translation entweder durch Bindung an miRNP Komplexe oder Degradation gehemmt werden kann.

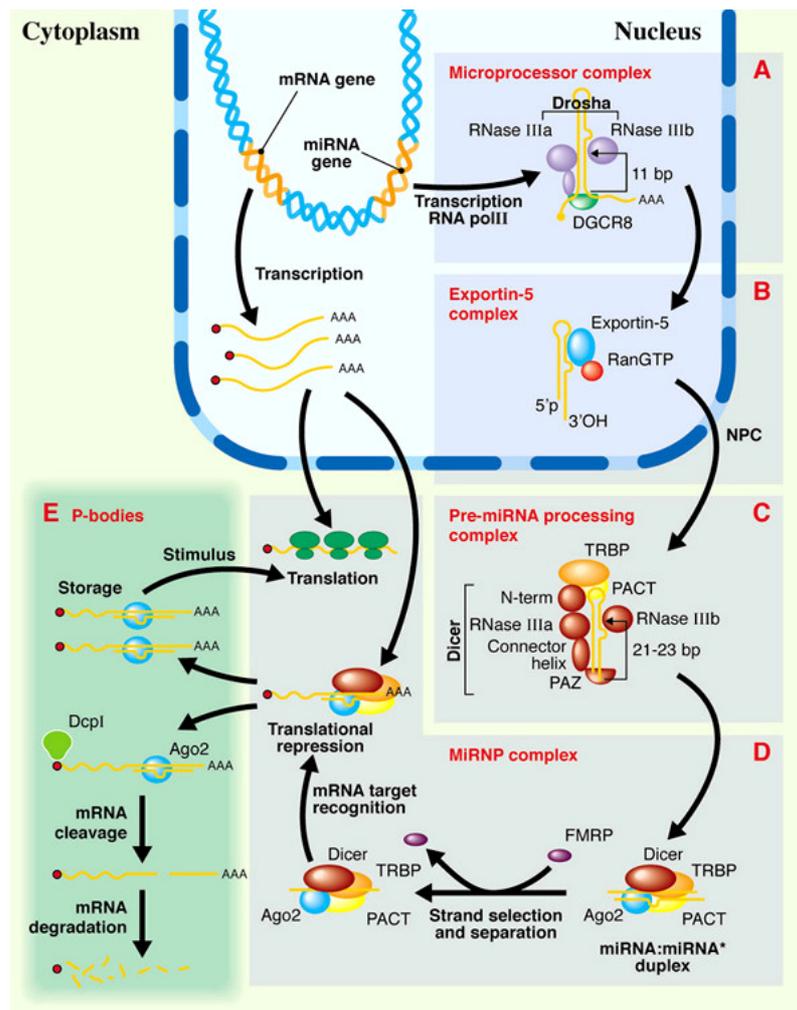


Abbildung 5. Biogenese und Wirkmechanismus von miRNAs. [45]

Neueste Studien haben gezeigt, dass miRNAs eine wichtige Rolle bei Krankheiten wie Krebs spielen. So ist bekannt, dass der Entwicklung verschiedener Krebsarten eine Aberration der Expression spezifischer miRNAs zugrunde liegt [46]. Monzo und Kollegen haben kürzlich von übereinstimmenden miRNA Expressionsprofilen in humanem embryonalem Colon und colorektalem Krebs berichtet [47]. Sie folgern, dass der miRNA-Signalweg eine wichtige Rolle sowohl bei der embryonalen Darmentwicklung als auch bei der Entartung des Colon-Epitheliums spielt. Während ihre Rolle bei der Differenzierung von Zellen früh erkannt wurde,

wurde erst in den letzten zwei Jahren ihr Einfluss auf die Entwicklung des Immunsystems belegt. So ist bekannt, dass z.B. miR-181a und miR-223 für die Ausdifferenzierung von Immunzellen zuständig sind. Andere miRNAs wiederum sind Hauptregulatoren des adaptiven Immunsystems. So ist miR-155 wichtig für die Antigenpräsentation, miR-146 für die TLR Signaltransduktion und die Cytokinantwort und miR-181a für die T-Zellrezeptor Signalwege [48]. Ihre immense Bedeutung für die Regulation der Zelldifferenzierung in verschiedenen Geweben sowie bei immunologischen Prozessen lässt die Hypothese zu, dass sie mit großer Wahrscheinlichkeit eine Hauptrolle in der postnatalen Darmentwicklung von Ferkeln und beim Aufbau des mukosalen Immunsystems insbesondere während der Absetzphase spielen. Aktuell sind porcine miRNAs und ihre Rolle noch wenig erforscht; eine Literaturrecherche ergab nur 23 Publikationen, die sich mit porcinen miRNAs befassen und vorwiegend deskriptiver Natur sind (Stand: Januar 2010, Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2. Zielsetzung

Während der postnatalen Darmentwicklung von Säugern findet ein struktureller und funktioneller Umbau der intestinalen Mukosa statt, der durch den massiven Kontakt mit neuen Nahrungsantigenen induziert wird, insbesondere in der Absetzphase. In dieser kritischen Phase stellen Störungen der Darmgesundheit bei Schweinen oft ein großes Problem dar und repräsentieren den überwiegenden Teil der nicht-infektiösen Ferkelkrankheiten. Um diese Vorgänge der postnatalen Darmentwicklung zu verstehen, bedarf es einer Studie komplexer regulatorischer Netzwerke, die wichtige Prozesse, wie z.B. den mukosalen Umbau, die epitheliale Integrität der Darmmukosa und die mukosale Immunantwort steuern. Da die Absetzphase in mehreren Studien mit einer mukosalen Entzündung assoziiert wurde, kann die Charakterisierung involvierter molekularer Effektoren Rückschlüsse auf Mechanismen entzündlicher Darmerkrankungen zulassen. Molekulare Regulatoren der postnatalen Darmentwicklung sind im porcinen, wie auch im humanen System allerdings wenig erforscht. Im Kontext von Durchfallerkrankungen oder entzündlichen Darmerkrankungen ist vor allem die Studie zugrunde liegender Mechanismen pathologischer Ereignisse in der Absetzphase von Ferkeln von Bedeutung. Sie kann Anhaltspunkte für neue Konzepte zur Förderung der Tiergesundheit, sowie neue therapeutische Zielmoleküle oder -strukturen aufdecken, welche eine Bedeutung sowohl für das humane System als auch das Tiermodell besitzen. Aufgrund der phylogenetischen Nähe des Schweins zum Menschen und da viele Ähnlichkeiten zwischen der humanen und porcinen Darmentwicklung bestehen, ist ein Ferkelmodell der postnatalen Darmentwicklung repräsentativ für das humane System. So werden Ferkel bereits als etablierte Modelle humaner chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED) herangezogen. TFF-Peptide wurden durch mehrere Studien als Mediatoren epithelialer Reparatur charakterisiert und sind im Kontext der postnatalen Darmentwicklung hochinteressante Kandidaten, die in beschriebene Prozesse regulatorisch eingreifen könnten. Das Potenzial von TFFs als Therapeutika oder therapeutische Targets in diesem Gebiet sollte im Rahmen dieser Arbeit durch die Erfassung physiologischer Expressionsdaten näher evaluiert werden.

Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Studie potenzieller und bekannter Regulatoren der postnatalen Darmentwicklung. Einen besonderen Stellenwert bei Versuchsaufbau und Versuchsplanung hatte die Absetzphase, die somit spezifisch studiert werden sollte. Eine erste Stufe dieser Arbeit umfasste die Analyse entwicklungsabhängiger intestinaler Expressionsmuster von TFFs. Dies sollte durch eine Quantifizierung der TFF-Transkripte

mittels der quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR) in verschiedenen Darmabschnitten und Entwicklungsstufen erreicht werden. Dabei sollten die Expressionsdaten aller einzelnen Tiere aufgezeichnet werden, um auch die biologische Variabilität zu erfassen und eine hohe statistische Präzision zu erzielen. Besonderes Augenmerk wurde auf die lokale Relevanz von TFFs in der intestinalen Mukosa während der Absetzphase gerichtet. Zuerst sollten dazu die Sequenzen der porcinen TFF1 und TFF2 Transkripte erstmalig ermittelt werden, so dass eine Genexpressionsanalyse dieser Faktoren möglich wurde.

Um eine differenzielle Expression von TFFs auch auf Effektorebene abzubilden, sollten beobachtete Regulationen auf Proteinebene durch das semi-quantitative Western Blot-Verfahren überprüft werden. Um daraufhin eine zelluläre Zuordnung eines potenziellen TFF-regulatorischen Effekts zu evaluieren, sollte durch eine immunhistologische Analyse die Lokalisation von TFF2 im porcinen Darm belegt werden. Des Weiteren sollten mit TFF-Signaltransduktionswegen assoziierte Faktoren, die z. T. eine etablierte Relevanz für postnatal induzierte Ereignisse besitzen, in unserem Tiermodell quantitativ erfasst werden. In diesem Sinne wurden der Wachstumsfaktor $TGF\alpha$, dessen Rezeptor EGF-R, die pathogen-induzierbare-Oxygenase COX-2 und das proinflammatorische Cytokin $TNF\alpha$ in die quantitative Transkriptanalyse integriert. Durch Korrelationsanalysen der aufgezeichneten Expressionsmuster sollten Rückschlüsse auf potenzielle molekulare Interaktionen gezogen werden. Die lokale Relevanz dieser Faktoren sollte zudem durch Betrachtung der individuellen zeitlichen Regulation evaluiert werden. Dadurch sollten grundlegende Kenntnisse über molekulare Muster und zeitliche Expression regulatorisch aktiver Faktoren im Kontext der postnatalen Darmentwicklung erweitert werden. Dies ist von großer Bedeutung, da generell nur limitierte Daten dieser Art im porcinen oder auch humanen System existieren, bzw. bestehende Erkenntnisse hauptsächlich aus Studien mit Nagern stammen.

Besonders seit einem EU-weitem Verbot von antibiotischen Wachstumsförderern in der Schweinemast gilt die Verwendung probiotischer Zusätze in Futtermitteln als etablierter Ansatz, um die Tiergesundheit in der Absetzphase zu unterstützen. Daher sollte im Rahmen dieser Studie untersucht werden, ob sich eine probiotische Interaktion mit dem Wirtsepithel durch einen Einfluss auf die Genexpression der untersuchten Faktoren detektieren lässt. In verschiedenen Studien wurden wissenschaftliche Belege zum Einfluss diverser probiotischer Stämme auf einige der im Rahmen dieser Studie untersuchten Faktoren erbracht [49-51], jedoch muss eine probiotische Wirkung grundsätzlich stammspezifisch und natürlich im Kontext des verwendeten Modellorganismus evaluiert werden. In dem verwendeten

Tiermodell wurden die Tiere daher randomisiert zwei Gruppen zugeordnet und der probiotische Stamm *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 oder ein Placebo verabreicht. Ein statistischer Vergleich der Expressionswerte der untersuchten Faktoren in allen Darmabschnitten sollte einen potenziellen probiotischen Einfluss auf die Genexpression mukosaler und luminaler Effektoren erfassen.

Hierbei sollten alle betrachteten postnatalen Entwicklungsstufen analysiert werden, um neben Effekten in der Absetzphase auch Langzeiteffekte zu erfassen, bzw. solche, die bereits zu frühen Zeitpunkten, z.B. vor dem Hintergrund der postnatalen Darmbesiedlung, von Relevanz sein könnten.

Hierfür wurde ein Tiermodell eingesetzt, welches wichtige postnatale Zeitpunkte für die Darmentwicklung erfasst. Insgesamt wurden sechs Zeitpunkte bis zum Alter von 56d untersucht. Eine zeitlich engmaschige Probennahme unmittelbar vor (28d), sowie in der Absetzphase (31d und 35d) sollte es ermöglichen, auch die Effekte des Absetzens auf die Expression von TFFs und assoziierten intestinalen Effektorproteinen zu beobachten. Zudem wurden weitere Zeitpunkte gewählt, um frühe (7d, und 14d) und spätere (56d) Entwicklungsphasen der Ferkel und damit entwicklungsabhängige Genexpressionsmuster der Kandidatengene zu erfassen.

Um auch die Studie wichtiger Regulatoren der Genexpression realisieren zu können, sollten anhand der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Proben außerdem Werkzeuge für die Klonierung und quantitative Expressionsanalyse von kleinen RNAs entwickelt werden, die weitergehende Analysen im porcinen System ermöglichen.

Da valide Sequenzen porciner miRNAs in betreffenden Datenbanken immer noch rar sind (77 porcine Sequenzen im Gegensatz zu 706 humanen, Quelle: miRBase Release 14.0, <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>) sollte eine neue Klonierungsmethode angewand werden, um effektiv und kostengünstig eine porcine miRNA Datenbank zu erstellen. Hierfür wurde mit gewonnenen intestinalen aber auch anderen porcinen Geweben eine neue Klonierungsmethode validiert. Dieser neuartige Klonierungsansatz bietet auf der Basis der Synthese von Nukleinsäuren durch Assemblierung von fünf DNA-Molekülen in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) das gleichzeitige Klonieren von bis zu fünf miRNA-Molekülen. Diese Methode ermöglicht so die effektive und schnelle Erstellung von cDNA-Banken kleiner miRNAs.

Der Nachweis und die Quantifizierung von miRNAs werden derzeit anhand von Microarrays, einigen wenigen kommerziell erhältlichen qRT-PCRs und Northern Blots durchgeführt. Die

letztere Methode erweist sich als aufwändig und nicht geeignet für einen größeren Probendurchsatz. Der Nachweis anhand von Microarrays birgt den Nachteil, dass kaum spezifische Plattformen außer für die Spezies Mensch und Maus existieren. Weiterhin bietet diese Methode nur eine begrenzte Möglichkeit der Quantifizierung der Genexpression. Solchermaßen generierte Daten sollten zudem immer durch eine zweite Methode (z.B. qRT-PCR) verifiziert werden. Es sind bereits kommerziell erhältliche qRT-PCRs für miRNAs auf dem Markt, die jedoch sehr kostspielig sind und selten speziesübergreifend eingesetzt werden können. Aus diesem Grund wurde eine kostengünstige und flexible Alternativmethode zur quantitativen Analyse von miRNAs entwickelt und im Rahmen dieser Arbeit im porcinen System eingesetzt.

3. Darstellung der Arbeit

Folgende Publikationen wurden in dieser Arbeit zusammengefasst:

Scholven J, Taras D, Sharbati S, Schon J, Gabler C, Huber O, Meyer zum Buschenfelde D, Blin N, Einspanier R: Intestinal expression of TFF and related genes during postnatal development in a piglet probiotic trial. *Cell Physiol Biochem* 2009;23:143-156.

Sharbati-Tehrani S, Kutz-Lohroff B, Bergbauer R, Scholven J, Einspanier R: 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* 2008;9:34.

Sharbati-Tehrani S, Kutz-Lohroff B, Scholven J, Einspanier R: Concatameric cloning of porcine microRNA molecules after assembly PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;375:484-489.

Die vollständigen Publikationen sind dieser Arbeit als Anhang beigefügt.

3.1. Manuskript: „Intestinal expression of TFF and related genes during postnatal development in a piglet probiotic trial”

Um unsere Fragestellungen zu bearbeiten, wurde ein Tierversuch angesetzt, in dem die Tiere randomisiert zwei Gruppen zugeordnet wurden, und der probiotische Stamm *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (Cylactin, Charge E0231, Cerbios-Pharma, Barbengo, Schweiz) oder ein Placebo (Kontrolle) wurde verabreicht. Unmittelbar nach der Geburt bis zum Alter von 34 Tagen wurde 1 ml *E. faecium* NCIMB 10415 ($4,5 \times 10^9$ cfu/ml deionisiertes Wasser) ein Mal täglich oral verabreicht, während die Kontrolltiere ein entsprechendes Placebo erhielten. Zusätzlich hatten die Tiere freien Zugriff auf Futter, welches im Falle der Probiotikagruppe *E. faecium* NCIMB 10415 als Zusatz enthielt. Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit wurden die Entnahme der Gewebeprobe und deren Verarbeitung vorgenommen. Es wurden Gewebeprobe von unterschiedlichen Darmabschnitten genommen, um lokale Unterschiede der Expression erfassen zu können und da sich z.B. immunologische Funktionen in den Darmabschnitten unterscheiden. Im Alter von 7, 14, 28, 31, 35 und 56 Tagen wurden Proben des distalen Jejunum, Ileum und Colon ascendens untersucht, so dass 180 Gewebeprobe für diese Arbeit zur Verfügung standen (N = 5 Ferkel pro Zeitpunkt und Behandlungsgruppe bei 6 Zeitpunkten und 3 Darmabschnitten). Alle folgenden experimentellen Analysen und Arbeiten wurden ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Arbeit geplant, durchgeführt und ausgewertet. Jeweils drei Lumenquerschnitte eines Darmabschnitts wurden für eine Extraktion verarbeitet, um eine repräsentative Probe zu erhalten und eine gute Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Die Lumenquerschnitte wurden gepoolt, und aus dem Gewebe wurde RNA, bzw. Protein extrahiert. Die RNA Proben wurden anschließend mittels eines NanoDrop™ ND-1000 UV-VIS Spektrophotometers (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) bei 260nm quantifiziert und mittels einer denaturierenden Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung oder eines 2100 Bioanalyzers (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen) auf ihre Qualität getestet. Die Gesamt-RNA wurde schließlich durch eine Reverse Transkription Reaktion (RT-PCR) in cDNA konvertiert, damit die Expressionslevel der Kandidatengene mittels qRT-PCR in den jeweiligen Proben quantifiziert werden konnten. Es wurden die gesamten Proben der Entwicklungsstadien eines bestimmten Darmabschnitts innerhalb eines qRT-PCR Laufs analysiert, so dass jeweils fünf biologische Replikate pro Zeitpunkt und Behandlungsgruppe vorlagen. Gleichzeitig wurde unter identischen Bedingungen die Verdünnungsreihe eines Standards analysiert, um eine Quantifizierung der cDNA anhand einer Eichkurve durchführen

zu können. Zur Herstellung der Standards wurden PCR-Amplifikationen eines cDNA-Pools verschiedenster intestinaler Proben mit den jeweiligen qRT-PCR Primern durchgeführt. Die PCR Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die spezifischen Banden aus dem Gel isoliert. Die Spezifität der gereinigten PCR Produkte wurde mittels Sequenzierungsanalysen bestätigt. Zudem wurden erstmalig partielle Sequenzen der porcinen TFF1 und TFF2 Transkripte ermittelt. Dazu wurden Sequenzen verschiedener Spezies verglichen, konservierte Sequenzbereiche identifiziert und für das Primerdesign herangezogen. Die Sequenzermittlung aus resultierenden spezifischen PCR-Produkten wurden wie beschrieben durchgeführt. In den qRT-PCR Analysen wurde die Variation der Expressionslevel zwischen den Proben normalisiert, indem die 18S rRNA Level in jeder Probe unter gleichen Bedingungen quantifiziert wurden. Die Ratios der entsprechenden mRNA Konzentrationen und der 18S rRNA Konzentrationen wurden berechnet und für die weitergehende Datenanalyse verwendet. Die Expressionslevel der verschiedenen Entwicklungsstadien, sowie die Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen wurden statistisch mittels des Mann-Whitney-U-Tests und SPSS für Windows 12.0 (Chicago, USA) verglichen.

Die quantitativen Verhältnisse der TFF2-Transkriptlevel wiesen deutliche lokale und zeitliche Unterschiede auf. Mittlere Expressionswerte nahmen von proximal nach distal ab, so dass höchste Konzentrationen im distalen Jejunum gemessen wurden. Hier wurde zudem eine zeitliche Regulation mit höchsten Expressionswerten in der Absetzphase (35d) beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt waren mittlere TFF2-Werte um das 6-fache (Kontrollgruppe) oder 28-fache (Probiotikagruppe) im Vergleich zu frühen Entwicklungsstufen (7d) gesteigert. Im Ileum und Colon wurde ebenfalls ein gradueller Anstieg der TFF2-Expressionswerte ermittelt. Hier wies TFF2 höchste mittlere Werte zu späteren Entwicklungszeitpunkten auf (56d). In allen Darmabschnitten wurde die Hochregulation von TFF2 in der Absetzphase (31d, 35d) im Vergleich zu früheren Zeitpunkten statistisch signifikant ermittelt. Eine weniger deutlich ausgeprägte Erhöhung der Expressionswerte in der Absetzphase wurde für TFF3 ermittelt. Kurz nach dem Absetzen (31d) war die TFF3-Menge im Vergleich zu früheren Zeitpunkten (7d-28d) im Jejunum von Kontroll- sowie Probiotikatierten um das 2-fache erhöht. Im Ileum der Probiotikagruppe konnte eine entsprechende Hochregulation nach dem Absetzen (31d) im Vergleich zu dem Zeitpunkt unmittelbar vor dem Absetzen (28d) statistisch belegt werden. Aufgrund von Werten unterhalb der Detektionsgrenze der angewendeten Methode war die Analyse der TFF1-Expression im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

TFFs sind in der Literatur als regulatorische Peptide beschrieben, die verschiedenste epitheliale Reparaturmechanismen induzieren. Um eine Bedeutung von TFF Peptiden für die postnatale Darmentwicklung differenzierter betrachten zu können und mögliche Hinweise auf Interaktionen mit anderen regulatorischen Faktoren aufzuzeichnen, wurden weitere Faktoren quantitativ erfasst. Dies sind Wachstumshormone und deren Rezeptoren, Cytokine und Entzündungsmediatoren mit einer etablierten Relevanz für physiologische oder entzündliche Prozesse der Darmmukosa. Im porcinen Organismus liefern postnatale Expressionsmuster wichtige Daten zur zeitlichen Regulation intestinaler Effektoren, die das Schwein als etablierten Modellorganismus zur Studie humaner Erkrankungen weitergehend evaluieren. Eine molekulare Charakterisierung der Absetzphase bietet zudem Grundlagen für die Erforschung entzündlicher Prozesse des Darms unter veterinär- als auch humanmedizinischen Aspekten.

Der Wachstumsfaktor TGF α zeigte im Jejunum und Ileum höchste Expressionswerte an frühen Untersuchungszeitpunkten (7d, 14d) und konstant niedrige Werte bereits kurz vor und während der Absetzphase (28d – 56d). Beispielsweise war die TGF α -Expression zu einem frühen Zeitpunkt (7d) in der Kontrollgruppe um das 10-fache, in der Probiotikagruppe um das 14-fache signifikant erhöht im Vergleich zu späteren Zeitpunkten (28d – 56d). Keine Regulation konnte hingegen im Colon beobachtet werden.

Auch der Rezeptor für Wachstumsfaktoren EGF-R wies in allen Darmabschnitten höchste Expressionswerte zu einem frühen Zeitpunkt auf (7d), mit einer bis zu 4-fachen Reduktion der Expressionslevel im Jejunum der Probiotikagruppe. Eine singular erhöht Expression war im Ileum von Probiotikatieren bei dem Vergleich von Zeitpunkten unmittelbar vor (28d) und nach dem Absetzen (31d) zu beobachten.

Expressionsmuster der Dioxygenase COX-2 waren durch höchste initiale Transkriptlevel charakterisiert (7d, 14d), und die Expressionsleistung war in späteren Entwicklungsphasen (28d – 56d) konstant und signifikant reduziert. Die Expression im Jejunum war auf das bis 7- und 8-fache in Kontroll- und Probiotikagruppe reduziert (56d). Die postnatalen Expressionsmuster von TGF α , EGF-R und COX-2 wiesen zudem eine negative Korrelation zu beschriebenen TFF2 Expressionsmustern auf.

Das proinflammatorische Cytokin TNF α zeigte im Ileum keine statistisch signifikante Regulation. Im Jejunum waren Werte der Probiotikagruppe auf einer späten Entwicklungsstufe (56d) um das 3-fache erhöht im Vergleich zu Jungtieren (7d). Ein deutliches Expressionsmuster wurde allerdings im Colon deutlich, wo 2- und 4-fach erhöhte Werte in der Absetzphase (31d, 35d) im Vergleich zu Jungtieren (7d, 14d) vorlagen.

Die statistische Analyse belegte, dass die Probiotikabehandlung keinen signifikanten Einfluss auf Expressionswerte sämtlicher Faktoren ausübte, mit Ausnahme einer schwachen Regulation von TNF α im Ileum.

Die Validität der quantitativen Verhältnisse der TFF2-Expression wurde durch eine entsprechende Analyse auf Proteinebene belegt. Für die Proteinanalyse wurden die Gewebeproben ebenfalls lysiert, quantifiziert und anschließend mittels Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Dazu wurden die Proteinproben des distalen Jejunums in den beiden Behandlungsgruppen für die unterschiedlichen Zeitpunkte gepoolt, um die direkte Vergleichbarkeit aller Zeitpunkte in jeweils einem Versuchsdurchlauf zu gewährleisten. Mittels Western Blotting konnte die Expression von TFF2 und TFF3 in bestimmten Gewebeproben belegt werden. Hierzu wurde ein polyklonaler TFF2 Antikörper aus dem Kaninchen verwendet, der gegen Mauspeptide gerichtet ist [52]. Für TFF3 Analysen wurde ein monoklonaler Antikörper aus der Maus verwendet, der gegen humane TFF3 Peptide gerichtet ist [53]. Die Spezifität der Signale wurde mittels der jeweiligen rekombinanten humanen TFF-Peptide und TFF positiven Gewebeproben bestätigt. Die parallele Analyse von Negativkontrollen erfolgte durch das Ersetzen des spezifischen Antikörpers mit Präimmenserum des Kaninchens (Dako, Hamburg, Deutschland) für TFF2, bzw IgG1 der Maus (Dako) für TFF3. Eine semiquantitative Auswertung wurde nach densitometrischer Analyse von drei Western Blots mittels der GeneTools Software (Syngene, Cambridge, UK) durchgeführt. Dadurch wurden die quantitativen Verhältnisse der TFF-Expressionslevel bestätigt, die bereits durch qRT-PCR belegt waren. Auch auf Proteinebene beobachteten wir einen graduellen Anstieg der Expression beim Vergleich verschiedener Entwicklungsstadien (7d, 35d, 56d).

Eine Lokalisierungsstudie der TFF-Expression erfolgte mittels Immunhistochemie. Paraffinschnitte wurden nach einer Vorbehandlung mit dem primären TFF2 Antikörper inkubiert und durch einen Sekundärantikörper mit Meerrettichperoxidase markiert. Die Färbung wurde mit DAB+ (Dako) und Hämalaun als Gegenfärbung durchgeführt. Die Färbungen zeigten, dass TFF2 ausschließlich in den Enterocyten der intestinalen Mukosa nachzuweisen war. Das Peptid war vor allem im Oberflächenepithel der Zotten, sowie in tieferen Bereichen der Krypten lokalisiert. Eine Ausnahme bildete das Ileum, welches nur in lumennahen Enterocyten der Zotten einen positiven TFF2 Nachweis vorwies.

Die vorliegende Arbeit umfasste alle grundlegenden Laborarbeiten, die Erstellung und Korrektur des Manuskripts, zugehöriger Tabellen und Abbildungen.

3.2. Manuskript „miR-Q: a novel quantitative RT-PCR approach for the expression profiling of small RNA molecules such as miRNAs in a complex sample“

Zurzeit existieren kommerzielle miRNA-spezifische qRT-PCR Assays, die hauptsächlich bekannte humane und murine miRNAs abdecken und sehr kostspielig sind. Es sollte daher eine neue hochsensitive qRT-PCR Methode entwickelt werden, mit der man miRNAs detektieren und quantifizieren kann. Diese Methode sollte speziesübergreifend sein und flexibel angewendet werden können, so dass eine Quantifizierung im porcinen biologischen Material möglich ist. Um ein kostengünstiges Verfahren zu entwickeln wurde zudem auf den Einsatz von Hybridisierungssonden oder LNA-modifizierten Oligonukleotiden verzichtet. Das porcine biologische Material wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit gesammelt, und bei der Versuchsplanung wurde eine Auswahl der zu untersuchenden intestinalen Gewebeproben (Darmabschnitt, Alter der Tiere) für laborexperimentelle Arbeiten getroffen. Hierfür wurden zehn gesunde 31 Tage alte Ferkel der Rasse EUROOC x Pietrain wie folgt beprobt: Abschnitte des Jejunums und Ileums (ca. 3 cm) wurden nach Euthanasierung entnommen und in flüssigen Stickstoff überführt. Aus diesen Proben wurde anschließend mit dem miRVana miRNA Isolation Kit (Applied Biosystems Inc, CA, USA) die RNA isoliert, die die miRNA Fraktion beinhaltet. Die Quantitäts- und Qualitätsanalyse der gewonnenen RNA Proben wurde wie unter Punkt 3.1 beschrieben anhand von Nanodrop und Agilent Bioanalyzer durchgeführt. Die miRNAs wurden dann mittels eines miRNA-spezifischen 5'-Überhangs (RT6-miR-x) durch Reverse Transkription in cDNA konvertiert. Anschließend wurden die cDNA Moleküle durch eine neuartige PCR Methode quantifiziert, die auf den Einsatz dreier DNA-Oligonukleotide verschiedener Konzentrationen basiert. Ein erstes Oligonukleotid (short-miR-x-rev) besaß eine Sequenzhomologie zu der entsprechenden miRNA mit einem zusätzlichen 5'-Überhang. Die somit eingeführten 5'-Überhänge dienten sowohl zur Verlängerung des Amplicons, als auch beherbergten sie Bindungsdomänen für universelle Primer (MP-fw & MP-rev). Diese ermöglichten den exponentiellen Zuwachs des Produkts während der quantitativen PCR mittels SYBR green Technologie. Ein großer Vorteil dieser neuen Methode liegt im Einsatz universeller Primer für den Nachweis verschiedener miRNAs. Sie ist durch hohe Sensitivität (Nachweis von bis zu 0,2 fM synthetische miRNA pro qRT-PCR Reaktion) und einfache Detektion kleiner RNAs gekennzeichnet. Der Messbereich und die Empfindlichkeit der miR-Q Methodik wurde zunächst in unabhängigen RT-Reaktionen ermittelt. Dazu wurden 50ng bakterielle Gesamt-RNA, die einen komplexen RNA-

Hintergrund darstellen sollte, mit jeweils einem synthetischen miRNA-Molekül versetzt. Verschiedene Konzentrationen synthetischer miRNA (10nM – 1fM pro RT-Reaktion) wurden zur Ermittlung des messbaren Bereichs eingesetzt. Für 10 Assays wurde repräsentativ eine hohe Linearität über einen Bereich von 6-8 Zehnerpotenzen ermittelt mit einer Erfassung von bis zu 0,2 fM synthetischer miRNA, mindestens jedoch 20 fM synthetischer miRNA.

Die Eignung der entwickelten Methode zwischen verwandten miRNAs mit hoher Sequenzhomologie zu unterscheiden wurde anhand des Beispiels der let-7 Familie belegt. Die Mitglieder (let-7a, let-7b und let-7c) unterscheiden sich nur um 1-2 Nukleotide. Über den gesamten dynamischen Bereich wurde eine Quantifizierung jeweils mit den spezifischen und unspezifischen miRNAs durchgeführt. Nur bei sehr hohen miRNA-Konzentrationen von über 200 fM wurden geringe unspezifische Signale (0% - 0,37% des spezifischen Signals) ermittelt, so dass eine hohe Spezifität belegt werden konnte. Schließlich wurde ein kommerzielles Verfahren (mirVana™ qRT-PCR miRNA Detection Kit, Ambion) eingesetzt, um die vorliegende Methode zu validieren. Im Vergleich mit dem kommerziellen Produkt wurde für die miR-Q Methodik unter verschiedenen getesteten Versuchsbedingungen eine höhere Empfindlichkeit und Linearität der Messwerte bestimmt, die sich über einen höheren dynamischen Bereich erstreckten und die etwas geringere Ct-Werte aufwiesen. Um die Methodik weiterhin zu validieren wurde die Expression der bekannten humanen miRNA let-7b in verschiedenen etablierten Zelllinien bestimmt.

Die beschriebenen porcinen Proben wurden dafür benutzt, um in dem wenig erforschten intestinalen Schweinemodell die Expression von relevanten miRNAs nachzuweisen und den universellen Einsatz dieser Methode zu belegen. Nach initialer Musterung der miRNA-Expression in den genannten Loci anhand von heterologen miRNA-Microarrays (unveröffentlichte Daten) wurden zwei Kandidaten (miR-21 und miR-145), die eine individuell unabhängige und valide Expression zeigten, exemplarisch ausgesucht um die etablierte miR-Q Methodik auf komplexe Säugerproben anzuwenden. Nach der quantitativen Erfassung der miRNA Expression in unterschiedlichen biologischen Materialien (beschriebene porcine Proben und diverse humane Zelllinien) wurden im Rahmen dieser Arbeit und in Zusammenarbeit mit Soroush Sharbati die Analyse der Daten und Auswertung der Ergebnisse durchgeführt, sowie Korrelationen mit bereits im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten erfasst und zum Schreiben des Manuskripts beigetragen.

3.3. Manuskript „Concatameric cloning of porcine microRNA molecules after assembly PCR”

Im Fokus dieser Arbeit stand die Entwicklung einer Methode zur Identifizierung porciner miRNAs. Für die Etablierung der Methode wurde die kleine Fraktion der RNA (< 40 nt) aus verschiedenen porcinen Geweben eingesetzt, die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen und für die Experimente ausgewählt wurden. Hierfür wurden jeweils zehn gesunde 31 Tage alte Ferkel der Rasse EUROCC x Pietrain wie unter Punkt 3.2 beschrieben beprobt. Um eine einheitliche Probenmatrix zu realisieren, wurde die RNA wie oben erwähnt aus den Proben isoliert und Pools der jeweiligen Organe gebildet. Da viele miRNAs gewebespezifisch exprimiert werden, wurden zusätzlich zu intestinalen Geweben weitere Organe ausgewählt. Zum einen wurden Gewebeproben der Milz gewonnen und eingesetzt, um ein lymphatisches und damit immunologisch bedeutendes Gewebe in die Analysen zu integrieren. Um die Bandbreite der Gewebe zu erweitern wurden noch Gewebeproben der Niere und Leber bearbeitet. So konnten funktionale Gewebe mit Stoffwechselaktivität, Hormonproduktion und Ausscheidung von Stoffwechselprodukten in die Analyse integriert werden. Mit den beschriebenen Proben wurde dann eine Methode für die Klonierung von kleinen RNAs entwickelt, die es ermöglichte, Sequenzen porciner miRNAs zu ermitteln und weitergehende Analysen im porcinen System durchzuführen. Dieser neuartige Klonierungsansatz ermöglicht auf der Basis der Synthese von Nukleinsäuren durch Assemblierung von fünf DNA-Molekülen in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) das gleichzeitige Klonieren von bis zu fünf miRNA-Molekülen. Zunächst wurden aus einer Gesamt-RNA Probe die kleinen RNA Moleküle (< 40 nt) mittels einer Polyacrylamid Gelelektrophorese anhand der Apparatur Flashpage (Applied Biosystems) gewonnen. Anschließend wurden diese Moleküle polyadenyliert. Nach der Reinigung wurden verschiedene 5'-DNA Adaptoren an die Moleküle in unabhängigen Reaktionen ligiert. Nach einer Reversen Transkription durch Oligo-dT Primer mit 5'-Überhängen und anschließenden PCRs mit biotinylierten Primern wurde der sense-Strang durch Streptavidin-konjugierte magnetische Beads gewonnen. Die Verwendung komplementärer 5'-DNA Adaptoren und 5'-Überhängen in separaten Reaktionen ermöglichte den Einbau von fünf sense-Strängen in ein einziges Molekül in der darauf folgenden Assembly-PCR. Die Produkte wurden kloniert und die isolierten Plasmide, die Inserts der korrekten Größe enthielten, sequenziert. Außer der Leber konnten aus allen Organen miRNAs kloniert werden und es wurden mehrere neue porcine miRNAs beschrieben.

Die Expression der neuartigen porcinen miRNAs wurde anhand der miR-Q Methode wie unter Punkt 3.2. beschrieben in allen eingesetzten Organen analysiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Gewebeproben ausgesucht und gewonnen, die RNA aus diesen Geweben isoliert, die Auswertung der Sequenz- und miR-Q Daten vorgenommen sowie zur Erstellung des Manuskripts beigetragen.

4. Diskussion

Neben der Geburt ist das Absetzen der Ferkel eine Periode, in der sie einer maximalen Belastung mit neuen Antigenen ausgesetzt sind. Dies bezieht sich auf neue Nahrungsantigene, aber auch auf die daraus resultierende Kolonisierung mit neuen Bakterienspezies. Das Absetzen ist demnach ein kritischer Punkt bei der Entwicklung einer adäquaten Immunantwort auf Pathogene zum einen, und kommensale und diätische Antigene zum anderen. In der Absetzphase können Antikörper gegen gefütterte Proteine detektiert werden, so dass hier eine aktive Immunantwort vorliegt (sowohl beim Mensch, als auch beim Schwein). Trotz dieser initialen Reaktion auf Nahrungsantigene entwickelt sich normalerweise letztlich eine Toleranz [1]. Es entstehen dann Probleme, wenn sich eine unangemessene Immunantwort auf harmlose Nahrungsantigene manifestiert (Allergie), oder eine unzureichende Immunreaktion auf Pathogene erfolgt (Infektanfälligkeit). In der Lebensmittelindustrie stellen Darminfektionen und Durchfälle in der Absetzphase von Ferkeln ein schwerwiegendes Problem mit hohen finanziellen Verlusten dar. Sie gehen mit einer Wachstumsdepression und einer hohen Sterblichkeitsrate einher. Bis vor einigen Jahren wurden den Futtermitteln daher Antibiotika als Wachstumsförderer zugesetzt. Im Jahre 2006 wurde allerdings ein EU-weites Verbot von antibiotischen Zusätzen durchgesetzt, um einer Resistenzbildung enteropathogener Mikroorganismen entgegenzuwirken. Dies ist von enormer Relevanz für die Selektion möglicher neuer Substanzen und Therapieansätze, da nach diesem Verbot dringend nach alternativen Behandlungen gesucht wird, die die Ferkel bei den hohen Anforderungen in der Absetzphase unterstützen.

Die Fütterung von Probiotika findet bereits in der Praxis Anwendung und ist ein etablierter Ansatz zur Vorbeugung und Behandlung von Darmstörungen, die mit der Absetzphase von Ferkeln assoziiert sind. Es gibt Hinweise in der Literatur, dass Probiotika die epitheliale Barrierefunktion unterstützen, indem sie die Synthese von Mucinen fördern [54, 55]. In einem Rattenmodell wurde nach Probiotikabehandlung eine Erhöhung des basalen luminalen Mucingehalts um 60% ermittelt [54]. TFF-Peptide sind koexprimiert und assoziiert mit bestimmten Mucinen [56, 57], so dass ein Einfluss einer Probiotikafütterung auf die TFF-Expression in der vorliegenden Arbeit von Interesse war. In den untersuchten Darmabschnitten wurde jedoch kein signifikanter Einfluss des probiotischen Stammes *E. faecium* NCIMB 10415 auf die TFF-Expression nachgewiesen. Auch alle weiteren beschriebenen Faktoren wiesen keinen statistisch signifikanten Expressionsunterschied zwischen den Behandlungsgruppen auf, so dass der Einfluss einer Probiotikawirkung auf

Genexpressionsebene in dieser Studie nicht nachweisbar war. Generell wurden Leistungsparameter der Ferkel nach einer Probiotikabehandlung mit *E. faecium* im Rahmen verschiedener Teilprojekte dieser Studie (DFG Forschergruppe 438) erfasst. Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen dokumentiert werden, so dass gegebenenfalls die gewählten Versuchsbedingungen (insgesamt geringe Durchfallinzidenz, ideale Haltungsbedingungen) zur Erfassung einer möglichen Probiotikawirkung nicht geeignet waren (unveröffentlichte Daten). Da jeder probiotische Stamm bezüglich Eigenschaften und Wirkung unabhängig evaluiert werden muss, könnten möglicherweise andere Ergebnisse mit anderen probiotischen Stämmen erzielt werden.

Vielversprechende Kandidaten für ein neues und innovatives Behandlungskonzept sind in diesem Kontext TFF-Peptide, die durch ihre heilende Wirkung im Gastrointestinaltrakt und ihre Fähigkeit diverse Komponenten epithelialer Reparaturprozesse zu fördern gekennzeichnet sind. Dies könnte von Relevanz für die Absetzphase bei Ferkeln sein, die durch hohe Infektanfälligkeit und mukosale Entzündung gekennzeichnet ist. Bisher lagen keine Untersuchungen vor, die die Expression dieser Peptide im Kontext der postnatalen Darmentwicklung und wichtigen assoziierten Ereignissen wie der Absetzphase beschreiben. Die in unserer Arbeit beschriebene physiologische Hochregulation der Genexpression von TFF2 im distalen Dünndarm der Ferkel könnte ein natürlicher mukosaler Mechanismus sein, den Herausforderungen in der Absetzphase zu begegnen. Das macht sie zu interessanten Kandidaten für die Entwicklung eines Futtermittelzusatzes. Auch weist vor allem die Expression von TFF2 in allen Darmabschnitten der Ferkel ein deutliches entwicklungsabhängiges Expressionsmuster auf. Dies unterstreicht das Potenzial dieser Peptide als luminale Reparaturmediatoren, die möglicherweise auch als Therapeutika Einsatz finden könnten.

Die immunhistologischen Arbeiten im Jejunum und Ileum bestätigen und erweitern bereits publizierte Daten zur TFF2-Expression im Schwein [58]. Eine Lokalisation der TFF2-Expression im Colon des Schweins wurde bisher nicht publiziert, so dass in dieser Arbeit gewonnene Daten die Kenntnisse auf diesem Gebiet erweitern. Ebenso wurde bisher eine exzeptionell geringe TFF2-Expression im Magen des Schwein angenommen [58], die von quantitativen Verhältnissen in allen anderen bisher untersuchten Spezies abweicht. Beim Menschen findet man die höchsten TFF2-Expressionslevel im Magen und die Daten der vorliegenden Arbeit spiegeln einen vergleichbar hohen Expressionsgrad im porcinen Magen wieder, so dass bisherige Annahmen durch die vorliegende Studie neu überdacht werden müssen.

Weitere wichtige Mediatoren in der postnatalen Entwicklung des Dünndarms sind Wachstumsfaktoren wie TGF α und EGF, beides Mitglieder einer großen Familie von Liganden des EGF-Rezeptors. Einfach dargestellt kann man sagen, dass die primäre Funktion von EGF die Initialisierung von Reparaturprozessen (Re-epithelialisierung, anti-apoptotisch in Enterocyten) als Reaktion auf akute Verletzungen hin darstellt, während TGF α eher zu der Aufrechterhaltung der epithelialen Homöostase beiträgt [35]. Dieses System von Wachstumsfaktoren ist an der globalen und intrinsischen Kontrolle der Morphogenese und Homöostase des Darms entscheidend beteiligt. Im adulten Organismus verschiedener Spezies sind weitreichende Kenntnisse bezüglich der wachstumsfördernden Effekte von EGF-R Liganden im Darmepithel bekannt [59, 60]. In fetalen und postnatalen Entwicklungsstadien ist jedoch ein großer Unterschied zwischen Menschen und Nagern bezüglich der EGF-R Expression und Funktion zu vermerken. Während etwa im Menschen die Expression an EGF-R bereits vor der Geburt vermutlich durch fortgeschrittene Organreife des Intestinaltrakts zurückgeht [61, 62], haben wir im porcinen Jejunum eine hohe EGF-R-Konzentration zu frühen Entwicklungszeitpunkten beobachtet (7d), die im Laufe der weiteren Entwicklung abnimmt. Wiederum wurde bei Nagern eine niedrige EGF-R-Konzentration bei der Geburt beschrieben, die hingegen beim Absetzen der Tiere ansteigt [63]. Das von uns beschriebene Expressionsmuster im Schwein kann auf eine lokale Relevanz von EGF-R bei der frühen postnatalen Entwicklung des Darms hinweisen und ist eine interessante Ergänzung zu bereits publizierten Daten in Mensch und Maus. Im Dickdarm der Ferkel dagegen ist in unserer Studie nur ein Trend zu erhöhten Expressionswerten an frühen Entwicklungszeitpunkten übereinstimmend mit einer Studie in Mäusen [64] zu erkennen.

TGF α wird hochgradig im gesamten Gastrointestinaltrakt exprimiert. Es liegen bereits Untersuchungen in Ratten vor, in denen die TGF α -Expression während der postnatalen Entwicklung in Colon und Duodenum quantifiziert wurde [65, 66]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch andere zeitliche Expressionsverhältnisse als in den erwähnten Arbeiten. Im Dünndarm der Ferkel wurden zu frühen Zeitpunkten (7d, 14d) hohe TGF α -Konzentrationen beobachtet, was weitere Anhaltspunkte für eine Beteiligung von EGF-R und seinem wichtigsten Liganden TGF α an frühen postnatalen Entwicklungsprozessen liefert. Eine in Ratten beschriebene erhöhte TGF α -Expression zwischen der Absetzphase und dem adulten Stadium im proximalen Colon wurde im Schwein nicht beobachtet. Generell wurde in dieser Arbeit eine erhöhte TGF α -Expression zum Zeitpunkt des Absetzens in keinem Darmabschnitt gemessen.

Bei der Untersuchung der Konzentrationsverhältnisse von COX-2 wurde ein ähnliches Expressionsmuster gemessen wie bei TGF α . Die somit in dieser Arbeit erstmalig beschriebene physiologisch erhöhte COX-2-Genexpression in Jungtieren kann auf eine Relevanz für die neonatale mukosale Entwicklung hinweisen, die allerdings durch weitergehende Arbeiten näher charakterisiert werden sollte. Eine in der Literatur vielfach beschriebene rasche Induktion der COX-2 Expression als Konsequenz einer luminalen Irritation soll der mukosalen Abwehr dienen und Reparaturprozesse initiieren [67]. Eine Relevanz für die Absetzphase konnte jedoch nicht aus entsprechenden Expressionsmustern während der postnatalen Darmentwicklung in unserem Tiermodell abgeleitet werden. Tan et al. postulierten außerdem, dass eine Hochregulation von COX-2 zumindest teilweise für die zytoprotektiven Eigenschaften von TFFs verantwortlich sein könnte [41], jedoch wurde dies in dieser Arbeit nicht durch einander entsprechende differenzielle Genexpressionsmuster gestützt.

Die Expressionsstudie bekannter Effektoren intestinaler Funktionen, die mit der Absetzphase assoziiert sind, wurden negativ mit der TFF2-Expression korreliert (TGF α , EGF-R und COX-2). Sie wiesen höchste Expressionswerte an frühen Entwicklungszeitpunkten auf, an denen der Gastrointestinaltrakt der Ferkel beispielsweise durch die erstmalige Nahrungsaufnahme und Kolonisierung des Darms strukturell und funktionell modifiziert wird. Das proinflammatorische Cytokin TNF α dahingegen hatte ausschließlich im Colon leicht erhöhte Expressionswerte in der Absetzphase und gilt als ein molekularer Marker für viele Formen der mukosalen Entzündung. Eine in der Literatur beschriebene Assoziation der Absetzphase mit einer temporären mukosalen Entzündung im Darm [68] wird somit durch die hier aufgezeichnete Expressionsteigerung im Colon unterstützt.

Damit weisen die in dieser Arbeit beschriebenen quantitativen Expressionsmuster von TGF α und seinem Rezeptor EGF-R in Ferkeln deutliche Unterschiede zu Verhältnissen in Nagern auf, deren neonatale Darmbeschaffenheit sich grundlegend von Spezies mit Langer Tragezeit (Mensch, Schwein) unterscheidet. Der bei der Geburt prämature Darm der Nager spiegelt sich durch in der Literatur beschriebene niedrige neonatale TGF α und EGF-R Expressionslevel mit erhöhten Werten in der Absetzphase wider. Im Vergleich dazu ist bei Spezies wie Mensch oder Schwein die Darmentwicklung bereits pränatal weit fortgeschritten [4, 10], so dass eine ausgeprägte neonatale Zelldifferenzierung mit den beschriebenen hohen Expressionswerten der Jungtiere in unserer Studie kausal assoziiert werden konnte. Diese Daten bekräftigen die These, dass das Schwein durch eine vergleichbar ausgereifte neonatale Darmbeschaffenheit und lange Trächtigkeitsperiode ein repräsentatives Modell darstellt, um die humane neonatale

Darmentwicklung auch auf molekularer Ebene zu studieren. Bisher gibt es nur wenige Studien, die sich mit der Reifung des molekularen und parakrinen regulatorischen Netzwerks im postnatalen Intestinaltrakt des humanen oder porcinen Systems befassen. Dies beruht darauf, dass Daten hauptsächlich aus dem adulten Darm vorliegen und auf Transport- und Verdauungsfunktionen fokussiert sind. Kenntnisse auf diesem Gebiet sind allerdings wesentlich für das Verständnis gastrointestinaler Störungen und Durchfallerkrankungen.

In diesem Sinne ist das Schwein nicht nur von großer Bedeutung in der Lebensmittelindustrie, sondern auch als etabliertes Tiermodell. Neben den beschriebenen Korrelationen in der humanen und porcinen postnatalen Darmentwicklung, gibt es große Übereinstimmung bezüglich der Anatomie, Physiologie, Biochemie, Pathologie und Pharmakologie [69]. So ist das Schwein auch als Omnivor bezüglich des Gastrointestinaltrakts dem Menschen weitaus näher als andere gängige Versuchstiere wie Nager. Da die Absetzphase bei Ferkeln durch intestinale Entzündungsreaktionen gekennzeichnet ist, dienen die Erkenntnisse über eine differenzielle Genexpression in dem beschriebenen Tiermodell auch als Hinweis für die mögliche Relevanz dieser Gene bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) beim Menschen [70, 71]. So wurde in einer Studie ein Schweinmodell mit DSS-induzierter Kolitis verwendet, um die Modulation der mukosalen Immunantwort und des Ansprechens auf Therapeutika durch Nahrungsergänzungsmittel bei humanen Patienten mit CED zu untersuchen [72]. Interessanterweise wurde eine Dysregulation von miRNAs in Ulcerativer Kolitis (UC), einer Form von CED, im humanen System belegt [73]. Generell wurden in den letzten Jahren kleine interferierende RNA-Moleküle, wie miRNAs, als Hauptregulatoren der eukaryotischen Genexpression festgestellt. Wie bereits oben erwähnt, reguliert diese Klasse der RNAs extrem wichtige zelluläre Vorgänge. Daher gewinnt die Analyse ihrer Organ- und Gewebe-spezifischen Expression immer mehr an Bedeutung. Um solche regulatorischen Netzwerke auch im Schweinmodell studieren zu können bedarf es allerdings einer effektiven und vollständigen Erfassung des porcinen miRNA Transkriptom. Auch kann die Identifizierung und Quantifizierung porciner miRNAs neue Erkenntnisse über die posttranskriptionale Genregulation von Prozessen liefern, die mit der postnatalen Darmentwicklung verknüpft sind.

Eine Methode, die der Sequenzierung neuer porciner miRNAs dienen kann und die im Rahmen dieser Arbeit erstmalig eingesetzt und validiert wurde, ist die Klonierung konkatamerisierter miRNA-Moleküle. Der Vorteil dieses neuen Verfahrens liegt in der Schnelligkeit aufgrund der Klonierung von bis zu fünf miRNA-Molekülen in nur einem Insert.

Die hergestellten Klone dienen der Generierung einer porcinen cDNA-Bank kleiner RNAs, die dann effektiv sequenziert werden kann.

Aufgrund des hohen Maßes an Sensitivität, Genauigkeit und Praktikabilität wird die qRT-PCR als Goldstandard für die Quantifizierung der Genexpression angesehen. Da jedoch die Größe der miRNAs (20-25 nt) den Einsatz konventioneller PCR-Systeme nicht erlaubt, wurde auch ein neues Verfahren zur Quantifizierung kleiner RNAs (miR-Q) entwickelt, validiert und im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt. Die entwickelte Plattform miR-Q bietet hierfür eine sehr komfortable und hochsensitive Nachweismethode, die auf den Einsatz von Hybridisierungs sonden [74] oder LNA-modifizierten Oligonukleotide [75] verzichtet. Gleichzeitig bietet sie jedoch höhere Spezifität und Sensitivität als kommerziell erhältliche Methoden. Diese Reaktion kann darüber hinaus aufgrund ihrer Flexibilität speziesübergreifend eingesetzt werden, so dass Limitierungen kommerzieller Assays überwunden werden können.

Diese genannten Werkzeuge sind ideal angepasst für die Analyse neuer miRNAs in wenig studierten Spezies. Die Klonierungstechnik bietet neue miRNA-Sequenzdaten, anhand dieser wiederum können neue miR-Q Assays entwickelt werden, die die Expressionsanalytik von neu entdeckten miRNAs z.B. im Schwein erlaubt. Die Kombination aus den gewonnenen porcinen Proben und den beiden entwickelten molekularen Werkzeugen bieten die Basis für zukünftige funktionelle Analysen ohne den Einsatz von kostspieligen Analysemethoden. Diese Arbeit stellt eine wichtige Grundlage dar, um im Rahmen eines Folgeprojektes basierend auf hier beschriebenen Daten die Rolle von miRNAs z.B. während der postnatalen Entwicklung des porcinen Gastrointestinaltrakts erforschen zu können.

5. Zusammenfassung

Während der postnatalen Darmentwicklung und Absetzphase bei Schweinen sind eine epitheliale Oberflächenintegrität und eine angemessene mukosale Immunantwort kritisch für den Schutz vor Darmkrankheiten und Infektionen, so dass die Erforschung potenzieller Regulatoren von großer Bedeutung ist. Im Darm werden Trefoil Factor Family Peptide (TFF1, TFF2 und TFF3) nach mukosaler Verletzung hochreguliert und regenerieren die Oberflächenintegrität durch Induktion zellulärer Restitution. Eine Regulation der mukosalen Immunantwort durch TFFs könnte bei Entzündungen in der Absetzphase relevant sein. Ein Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der postnatalen TFF Expression im Ferkeldarm unter Einfluss einer Probiotikabehandlung. Das Probiotikum *E. faecium* NCIMB 10415 oder ein Placebo (N=5) wurde verabreicht und Intestinalproben an sechs Zeitpunkten gewonnen (7-56d). Sowohl auf Transkriptions-, als auch auf Translationsebene wurde die Genexpression mittels qRT-PCR und Western Blotting analysiert. Eine Lokalisationsstudie wurde immunhistochemisch durchgeführt. In frühen Entwicklungsphasen wurden niedrige TFF2-Konzentrationen gemessen, während bis zu 28-fach erhöhte Expressionwerte nach dem Absetzen vorlagen. Die Absetzphase wurde mit einer erhöhten TFF3-Expression assoziiert, während die TFF1-Expression unterhalb der Detektionsgrenze der angewendeten Methode lag. TFF2-Expressionsmuster korrelierten mit der Expression von Genen, die in TFF-Signaltransduktionswege involviert sind. Die Probiotikaapplikation hatte keinen Einfluss auf die TFF-Expression.

Die Steuerung der Genexpression ist essenziell für normales Wachstum und Entwicklung. Erst seit kurzer Zeit ist die Bedeutung von MicroRNAs (miRNAs) als wichtige eukaryotische Genregulatoren aufgedeckt worden. Jedoch ist nur wenig über miRNA Sequenzen des Schweinegenoms bekannt. Die Identifizierung und Quantifizierung porciner miRNAs kann neue Erkenntnisse über die post-transkriptionale Genregulation von Prozessen liefern, die mit der postnatalen Darmentwicklung verknüpft sind. Ein weiteres Ziel war daher eine schnelle und zuverlässige Methode für die Klonierung von kleinen RNAs zu entwickeln, die weitergehende Analysen im porcinen System in dieser Arbeit ermöglichte. Dieser neuartige Klonierungsansatz ermöglicht auf der Basis der Synthese von Nukleinsäuren durch Assemblierung von fünf DNA-Molekülen in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) das gleichzeitige Klonieren von bis zu fünf miRNA-Molekülen. Mit dieser Methode konnten mehrere neue porcine miRNAs erstmalig beschrieben werden.

Methoden zur Quantifizierung von miRNAs wurden hauptsächlich für die Spezies Mensch und Maus verwendet. Aus diesem Grund wurde eine neue hochempfindliche Alternativmethode entwickelt, die eine speziesübergreifende miRNA Analyse auf der Basis der quantitativen PCR ermöglicht, so dass eine valide miRNA Expressionsanalyse im porcinen Gewebe im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden konnte.

6. Abstract

The postnatal period of pigs poses many challenges mostly associated with weaning. Maintaining integrity of the intestinal epithelial surface and an appropriate mucosal immune response are critical processes in preventing digestive disorders and infections. Because of the high incidence of enteric diseases in animal health, the study of potential regulators of intestinal development is of great importance. Trefoil factor family peptides (TFF1, TFF2 and TFF3) are expressed in specific regions of the gastrointestinal tract. TFFs are rapidly up-regulated in response to mucosal damage, enhancing the surface integrity of gastrointestinal mucosa by cell restitution. TFFs presumably regulate mucosal immune response, which is critical at weaning. Our aim was to evaluate porcine mucosal TFF expression during the postnatal period. In addition, the influence of a probiotic treatment was investigated. Piglets were treated with the probiotic strain *E. faecium* NCIMB 10415 or a placebo (n=5) and weaned at 28 days of age. Intestinal tissue samples were collected at 6 time points (7-56d). Total RNA and protein were isolated and gene expression analyzed by qRT-PCRs and Western Blotting. A localization study of TFF2 was performed using immunohistochemistry. TFF2 levels were low during early maturation stages, while TFF2 expression increased up to 28-fold after weaning. Weaning could be associated with increased TFF3 levels, while TFF1 expression was below the detection limit of the applied assay. However, TFF expression remained unaffected by probiotic treatment. Interestingly, expression of TFF2 correlated with TFF pathway-related genes. These results indicate that TFF might play a role in regulating intestinal immune response and enhancing mucosal repair after weaning in pigs.

Regulation of gene expression is essential for growth and development. Recently, the role of single-stranded small noncoding RNAs called microRNAs (miRNAs) as major regulators in eukaryotic gene expression has been revealed. However, only few porcine miRNAs are discovered to date. Identification and quantitation of miRNAs can provide a broader knowledge of post-transcriptional gene regulation influencing processes linked to postnatal intestinal development. In this context, another aim was to develop a novel tool for cloning of small RNA molecules in order to create a miRNA library for pigs. This method is based on simultaneous cloning of up to five molecules within the same clone. Using this method, we have discovered several novel porcine miRNAs.

Quantification methods for miRNAs currently include assays that mainly cover miRNAs from humans and mice. Consequently, our aim was to develop a new and highly sensitive and

specific quantitative PCR method, which enables the analysis of various species such as pigs in order to quantify miRNA expression in porcine tissues of our present project.

7. Referenzen

1. Bailey M, Haverson K, Inman C, Harris C, Jones P, Corfield G, Miller B, Stokes C: **The development of the mucosal immune system pre- and post-weaning: balancing regulatory and effector function.** *The Proceedings of the Nutrition Society* 2005, **64**(4):451-457.
2. Lalles JP, Bosi P, Smidt H, Stokes CR: **Nutritional management of gut health in pigs around weaning.** *The Proceedings of the Nutrition Society* 2007, **66**(2):260-268.
3. Henning SJ: **Postnatal development: coordination of feeding, digestion, and metabolism.** *Am J Physiol* 1981, **241**(3):G199-214.
4. Smith MW: **Postnatal development of transport function in the pig intestine.** *Comparative biochemistry and physiology* 1988, **90**(4):577-582.
5. Moxey PC, Trier JS: **Specialized cell types in the human fetal small intestine.** *The Anatomical record* 1978, **191**(3):269-285.
6. Trahair J, Robinson P: **The development of the ovine small intestine.** *The Anatomical record* 1986, **214**(3):294-303.
7. Hampson DJ: **Alterations in piglet small intestinal structure at weaning.** *Research in veterinary science* 1986, **40**(1):32-40.
8. Hirano S, Kataoka K: **Histogenesis of the mouse jejunal mucosa, with special reference to proliferative cells and absorptive cells.** *Archivum histologicum Japonicum* 1986, **49**(3):333-348.
9. Weaver LT, Carrick BM: **Changes in upper intestinal epithelial morphology and kinetics in the growing guinea pig.** *Pediatr Res* 1989, **26**(1):31-33.
10. Pacha J: **Development of intestinal transport function in mammals.** *Physiological reviews* 2000, **80**(4):1633-1667.
11. Rolfe RD: **The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health.** *J Nutr* 2000, **130**(2S Suppl):396S-402S.
12. Isolauri E, Sutas Y, Kankaanpaa P, Arvilommi H, Salminen S: **Probiotics: effects on immunity.** *The American journal of clinical nutrition* 2001, **73**(2 Suppl):444S-450S.
13. Brandtzaeg P, Pabst R: **Let's go mucosal: communication on slippery ground.** *Trends in immunology* 2004, **25**(11):570-577.
14. Haverson K, Riffault S: **Antigen presenting cells in mucosal sites of veterinary species.** *Veterinary research* 2006, **37**(3):339-358.

15. Sato A, Iwasaki A: **Peyer's patch dendritic cells as regulators of mucosal adaptive immunity.** *Cell Mol Life Sci* 2005, **62**(12):1333-1338.
16. Fagarasan S, Honjo T: **Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences.** *Nature reviews* 2003, **3**(1):63-72.
17. Dvorak CM, Hirsch GN, Hyland KA, Hendrickson JA, Thompson BS, Rutherford MS, Murtaugh MP: **Genomic dissection of mucosal immunobiology in the porcine small intestine.** *Physiological genomics* 2006, **28**(1):5-14.
18. Scharek L, Tedin K: **The porcine immune system--differences compared to man and mouse and possible consequences for infections by Salmonella serovars.** *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift* 2007, **120**(7-8):347-354.
19. Stokes CR, Bailey M, Wilson AD: **Immunology of the porcine gastrointestinal tract.** *Vet Immunol Immunopathol* 1994, **43**(1-3):143-150.
20. Oswald IP: **Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defence of the pig intestine.** *Veterinary research* 2006, **37**(3):359-368.
21. Hoffmann W: **Trefoil factor family (TFF) peptides: regulators of mucosal regeneration and repair, and more.** *Peptides* 2004, **25**(5):727-730.
22. Thim L, May FE: **Structure of mammalian trefoil factors and functional insights.** *Cell Mol Life Sci* 2005, **62**(24):2956-2973.
23. Thim L: **Trefoil peptides: from structure to function.** *Cell Mol Life Sci* 1997, **53**(11-12):888-903.
24. Hoffmann W, Jagla W, Wiede A: **Molecular medicine of TFF-peptides: from gut to brain.** *Histology and histopathology* 2001, **16**(1):319-334.
25. Taupin D, Podolsky DK: **Trefoil factors: initiators of mucosal healing.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, **4**(9):721-732.
26. Cook GA, Yeomans ND, Giraud AS: **Temporal expression of trefoil peptides in the TGF-alpha knockout mouse after gastric ulceration.** *Am J Physiol* 1997, **272**(6 Pt 1):G1540-1549.
27. Hoffmann W: **Trefoil factors TFF (trefoil factor family) peptide-triggered signals promoting mucosal restitution.** *Cell Mol Life Sci* 2005, **62**(24):2932-2938.
28. Baus-Loncar M, Giraud AS: **Multiple regulatory pathways for trefoil factor (TFF) genes.** *Cell Mol Life Sci* 2005, **62**(24):2921-2931.
29. Vandenbroucke K, Hans W, Van Huysse J, Neiryneck S, Demetter P, Remaut E, Rottiers P, Steidler L: **Active delivery of trefoil factors by genetically modified**

-
- Lactococcus lactis prevents and heals acute colitis in mice.** *Gastroenterology* 2004, **127**(2):502-513.
30. Poulsen SS, Thulesen J, Christensen L, Nexø E, Thim L: **Metabolism of oral trefoil factor 2 (TFF2) and the effect of oral and parenteral TFF2 on gastric and duodenal ulcer healing in the rat.** *Gut* 1999, **45**(4):516-522.
31. Playford RJ, Marchbank T, Goodlad RA, Chinery RA, Poulsom R, Hanby AM: **Transgenic mice that overexpress the human trefoil peptide pS2 have an increased resistance to intestinal damage.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**(5):2137-2142.
32. Mashimo H, Wu DC, Podolsky DK, Fishman MC: **Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor.** *Science* 1996, **274**(5285):262-265.
33. Sturm A, Dignass AU: **Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease.** *World J Gastroenterol* 2008, **14**(3):348-353.
34. Jones MK, Tomikawa M, Mohajer B, Tarnawski AS: **Gastrointestinal mucosal regeneration: role of growth factors.** *Front Biosci* 1999, **4**:D303-309.
35. Howarth GS, Shoubridge CA: **Enhancement of intestinal growth and repair by growth factors.** *Curr Opin Pharmacol* 2001, **1**(6):568-574.
36. Coffey RJ, Gangarosa LM, Damstrup L, Dempsey PJ: **Basic actions of transforming growth factor-alpha and related peptides.** *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995, **7**(10):923-927.
37. Coffey RJ, Romano M, Polk WH, Dempsey PJ: **Roles for transforming growth factor-alpha in gastric physiology and pathophysiology.** *The Yale journal of biology and medicine* 1992, **65**(6):693-704; discussion 621-693.
38. Durer U, Hartig R, Bang S, Thim L, Hoffmann W: **TFF3 and EGF induce different migration patterns of intestinal epithelial cells in vitro and trigger increased internalization of E-cadherin.** *Cell Physiol Biochem* 2007, **20**(5):329-346.
39. Rodrigues S, Attoub S, Nguyen QD, Bruyneel E, Rodrigue CM, Westley BR, May FE, Thim L, Mareel M, Emami S *et al*: **Selective abrogation of the proinvasive activity of the trefoil peptides pS2 and spasmolytic polypeptide by disruption of the EGF receptor signaling pathways in kidney and colonic cancer cells.** *Oncogene* 2003, **22**(29):4488-4497.
40. Rodrigues S, Nguyen QD, Faivre S, Bruyneel E, Thim L, Westley B, May F, Flatau G, Mareel M, Gespach C *et al*: **Activation of cellular invasion by trefoil peptides and**

-
- src is mediated by cyclooxygenase- and thromboxane A2 receptor-dependent signaling pathways.** *Faseb J* 2001, **15**(9):1517-1528.
41. Tan XD, Chen YH, Liu QP, Gonzalez-Crussi F, Liu XL: **Prostanoids mediate the protective effect of trefoil factor 3 in oxidant-induced intestinal epithelial cell injury: role of cyclooxygenase-2.** *J Cell Sci* 2000, **113** (Pt 12):2149-2155.
42. Dinarello CA: **Proinflammatory cytokines.** *Chest* 2000, **118**(2):503-508.
43. Loncar MB, Al-azzeah ED, Sommer PS, Marinovic M, Schmehl K, Kruschewski M, Blin N, Stohwasser R, Gott P, Kayademir T: **Tumour necrosis factor alpha and nuclear factor kappaB inhibit transcription of human TFF3 encoding a gastrointestinal healing peptide.** *Gut* 2003, **52**(9):1297-1303.
44. Jackson RJ, Standart N: **How do microRNAs regulate gene expression?** *Sci STKE* 2007, **2007**(367):re1.
45. Perron MP, Provost P: **Protein interactions and complexes in human microRNA biogenesis and function.** *Front Biosci* 2008, **13**:2537-2547.
46. Calin GA, Croce CM: **MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale.** *Cancer Res* 2006, **66**(15):7390-7394.
47. Monzo M, Navarro A, Bandres E, Artells R, Moreno I, Gel B, Ibeas R, Moreno J, Martinez F, Diaz T *et al*: **Overlapping expression of microRNAs in human embryonic colon and colorectal cancer.** *Cell research* 2008, **18**(8):823-833.
48. Pedersen I, David M: **MicroRNAs in the immune response.** *Cytokine* 2008, **43**(3):391-394.
49. Chen X, Fruehauf J, Goldsmith JD, Xu H, Katchar KK, Koon HW, Zhao D, Kokkotou EG, Pothoulakis C, Kelly CP: **Saccharomyces boulardii inhibits EGF receptor signaling and intestinal tumor growth in Apc(min) mice.** *Gastroenterology* 2009, **137**(3):914-923.
50. Nanda Kumar NS, Balamurugan R, Jayakanthan K, Pulimood A, Pugazhendhi S, Ramakrishna BS: **Probiotic administration alters the gut flora and attenuates colitis in mice administered dextran sodium sulfate.** *J Gastroenterol Hepatol* 2008, **23**(12):1834-1839.
51. Salminen SJ, Gueimonde M, Isolauri E: **Probiotics that modify disease risk.** *J Nutr* 2005, **135**(5):1294-1298.
52. Baus-Loncar M, Schmid J, Lalani el N, Rosewell I, Goodlad RA, Stamp GW, Blin N, Kayademir T: **Trefoil factor 2 (TFF2) deficiency in murine digestive tract influences the immune system.** *Cell Physiol Biochem* 2005, **16**(1-3):31-42.

-
53. Meyer zum Buschenfelde D, Hoschutzky H, Tauber R, Huber O: **Molecular mechanisms involved in TFF3 peptide-mediated modulation of the E-cadherin/catenin cell adhesion complex.** *Peptides* 2004, **25**(5):873-883.
 54. Caballero-Franco C, Keller K, De Simone C, Chadee K: **The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007, **292**(1):G315-322.
 55. Mack DR, Michail S, Wei S, McDougall L, Hollingsworth MA: **Probiotics inhibit enteropathogenic E. coli adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression.** *Am J Physiol* 1999, **276**(4 Pt 1):G941-950.
 56. Longman RJ, Douthwaite J, Sylvester PA, Poulsom R, Corfield AP, Thomas MG, Wright NA: **Coordinated localisation of mucins and trefoil peptides in the ulcer associated cell lineage and the gastrointestinal mucosa.** *Gut* 2000, **47**(6):792-800.
 57. Hoffmann W, Jagla W: **Cell type specific expression of secretory TFF peptides: colocalization with mucins and synthesis in the brain.** *Int Rev Cytol* 2002, **213**:147-181.
 58. Rasmussen TN, Raaberg L, Poulsen SS, Thim L, Holst JJ: **Immunohistochemical localization of pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP) in the pig.** *Histochemistry* 1992, **98**(2):113-119.
 59. Goodlad RA, Wright NA: **Epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha actions on the gut.** *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995, **7**(10):928-932.
 60. Alison MR, Sarraf CE: **The role of growth factors in gastrointestinal cell proliferation.** *Cell biology international* 1994, **18**(1):1-10.
 61. Chailier P, Menard D: **Ontogeny of EGF receptors in the human gut.** *Front Biosci* 1999, **4**:D87-101.
 62. Oliver AM: **Epidermal growth factor receptor expression in human foetal tissues is age-dependent.** *British journal of cancer* 1988, **58**(4):461-463.
 63. Gallo-Payet N, Pothier P, Hugon JS: **Ontogeny of EGF receptors during postnatal development of mouse small intestine.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1987, **6**(1):114-120.
 64. Menard D, Pothier P, Gallo-Payet N: **Epidermal growth factor receptors during postnatal development of the mouse colon.** *Endocrinology* 1987, **121**(4):1548-1554.
 65. Schaeffer C, Habold C, Martin E, Lignot JH, Kedinger M, Foltzer-Jourdainne C: **Cytokine expression in rat colon during postnatal development: regulation by glucocorticoids.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006, **43**(4):439-450.

-
66. Schaeffer C, Diab-Assef M, Plateroti M, Laurent-Huck F, Reimund JM, Keding M, Foltzer-Jourdainne C: **Cytokine gene expression during postnatal small intestinal development: regulation by glucocorticoids.** *Gut* 2000, **47**(2):192-198.
 67. Wallace JL, Devchand PR: **Emerging roles for cyclooxygenase-2 in gastrointestinal mucosal defense.** *British journal of pharmacology* 2005, **145**(3):275-282.
 68. Pie S, Lalles JP, Blazy F, Laffitte J, Seve B, Oswald IP: **Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets.** *J Nutr* 2004, **134**(3):641-647.
 69. Patterson JK, Lei XG, Miller DD: **The pig as an experimental model for elucidating the mechanisms governing dietary influence on mineral absorption.** *Exp Biol Med (Maywood)* 2008, **233**(6):651-664.
 70. Nabuurs MJ: **Weaning piglets as a model for studying pathophysiology of diarrhea.** *Vet Q* 1998, **20 Suppl 3**:S42-45.
 71. Sartor RB: **Probiotic therapy of intestinal inflammation and infections.** *Curr Opin Gastroenterol* 2005, **21**(1):44-50.
 72. Bassaganya-Riera J, Hontecillas R: **CLA and n-3 PUFA differentially modulate clinical activity and colonic PPAR-responsive gene expression in a pig model of experimental IBD.** *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)* 2006, **25**(3):454-465.
 73. Wu F, Zikusoka M, Trindade A, Dassopoulos T, Harris ML, Bayless TM, Brant SR, Chakravarti S, Kwon JH: **MicroRNAs are differentially expressed in ulcerative colitis and alter expression of macrophage inflammatory peptide-2 alpha.** *Gastroenterology* 2008, **135**(5):1624-1635 e1624.
 74. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR *et al*: **Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR.** *Nucleic acids research* 2005, **33**(20):e179.
 75. Raymond CK, Roberts BS, Garrett-Engele P, Lim LP, Johnson JM: **Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs.** *RNA (New York, NY)* 2005, **11**(11):1737-1744.

8. Lebenslauf

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

9. Publikationsliste

9.1. Publikationen

Rodríguez-Alvarez L, **Sharbati J**, Sharbati S, Einspanier R, Castro FO: Differential gene expression in bovine elongated (Day-17) embryos produced by somatic cell nuclear transfer and in vitro fertilization. *Theriogenology* 2009 (Zur Publikation akzeptiert)

Scholven J, Taras D, Sharbati S, Schon J, Gabler C, Huber O, Meyer zum Buschenfelde D, Blin N, Einspanier R: Intestinal expression of TFF and related genes during postnatal development in a piglet probiotic trial. *Cell Physiol Biochem* 2009, 23(1-3):143-156.

Sharbati-Tehrani S, Kutz-Lohroff B, Bergbauer R, **Scholven J**, Einspanier R: miR-Q: a novel quantitative RT-PCR approach for the expression profiling of small RNA molecules such as miRNAs in a complex sample. *BMC molecular biology* 2008, 9:34.

Sharbati-Tehrani S, Kutz-Lohroff B, **Scholven J**, Einspanier R: Concatameric cloning of porcine microRNA molecules after assembly PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 2008, 375(3):484-489.

9.2. Vorträge

Scholven J, Einspanier R, Gabler C: Impact of probiotic treatment on gene expression profile in porcine epithelial cells in vivo.

16. Symposium DVG-Fachgruppe Physiologie und Biochemie, Gießen, 19.-21.2.2006, S. 41

Scholven J, Gabler C, Holder C, Filter M, Einspanier R: Differential expression of trefoil factor family (TFF) genes in pig small intestine during postnatal development.

International Conference: Sustainable Animal Health through Eubiosis - Relevance for Man. Centro Stefan Franscini, Ascona, Switzerland, 8.-13.10.2006, S. 22

Scholven J, Einspanier R, Filter M, Gabler C: Integrative analysis of the modes of action of probiotics in pigs - influence on the expression pattern of intestinal mucosal cells.

International Conference: Sustainable Animal Health through Eubiosis - Relevance for Man. Centro Stefan Franscini, Ascona, Schweiz, 8.-13.10.2006, S. 36

9.3. Poster-Präsentationen

Scholven J, Filter M, Hoeke L, Taras D, Gabler C, Einspanier R: Influence of *Enterococcus faecium* on the expression profile of porcine intestinal mucosal cells in vivo.

ISAPP Open Forum Conference. London, UK, 27.6.-28.6.2007

Scholven J, Sharbati-Tehrani S, Taras D, Holder C, Gabler C, Blin N; Meyer zum Bueschenfelde D, Huber O, Einspanier R: Differential expression of trefoil factor family (TFF) genes in pig small intestine during postnatal development.

GBM Fall Meeting - Molecular Life Sciences 2007. Hamburg, 16.9.-19.9.2007

doi:10.1240/sav_gbm_2007_h_001876

Scholven J, Filter M, Holder C, Gabler C, Taras D, Einspanier R: Validation of a cDNA Microarray platform for gene expression analysis in pigs.

Genomes to Systems 2008. Manchester, UK, 17.3.-19.3.2008

10. Danksagungen

Zuerst möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Prof. Einspanier für die Betreuung und die konsequente Unterstützung meiner Arbeit bedanken. Er hat mir ein Umfeld geboten, in dem es möglich war kreativ und selbstständig zu arbeiten. Er hat durch die Vermittlung von innovativem Denken ein Arbeitsumfeld geschaffen, das zukunftsorientiert ist und sich am aktuellen Stand der Forschung bewegt.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Gust, der als Gutachter dieser Arbeit mit sehr konstruktiven und freundlichen Ratschlägen zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen hat.

Der gesamten Forschergruppe (DFG-FOR438) möchte ich für ihre Unterstützung, die interessanten Diskussionen und eine tolle Zeit in Askona danken. Matthias Filter danke ich außerdem für die Unterstützung bei statistischen Fragen.

Dem ganzen Laborteam des Instituts für Veterinär-Biochemie danke ich außerdem für das nette und kollegiale Umfeld, die Hilfsbereitschaft und viele schöne gemeinsame Stunden.

Herrn Dr. Gabler danke ich für die Hilfe bei der Einarbeitung in die Laborarbeit. Auch Christoph Holder bin ich dankbar für die viele Zeit, die er für die Hilfe bei der Probennahme investiert hat. Bei diesen unzähligen Fahrten und Terminen war er ein wirklich „dufter“ Kollege.

Jennifer Schön und Katharina Topp danke ich vielmals für die Unterstützung bei den Laborarbeiten auf Proteinebene und für eine wirklich schöne Zusammenarbeit.

Simone Odau und Claudia Fischer danke ich für die schöne gemeinsame Doktorandenzeit und ein sehr harmonisches Arbeiten. Vielen Dank auch an Lena Hoeke für die Durchsicht der Arbeit und die gute Zusammenarbeit.

Meinen Schwiegereltern danke ich für die viele Zeit und den großen Einsatz, ohne den die Fertigstellung dieser Arbeit kaum möglich gewesen wäre. Durch ihre liebevolle Art mit unserer Tochter konnte ich mich stets mit einem gutem Gefühl der Arbeit widmen.

Ganz besonders möchte ich Soroush danken. Durch sein anspruchsvolles und analytisches Denken hat er mir kreatives und ergebnisorientiertes Forschen vermittelt. Ich danke ihm für die Anerkennung und Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeit. Vor allem aber danke ich ihm für die schönsten und unvergesslichen Momente meiner Promotionszeit, nicht nur im Labor.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern meine tiefste Dankbarkeit aussprechen. Sie haben mich in all den Jahren unterstützt und waren immer für mich da. Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.

11. Anhang - Publikationen