

Inhaltsverzeichnis

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

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

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

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