

Aus dem Department für Biomedizinische Wissenschaften
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Physiologie, Pathophysiologie und Biophysik
(Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. med. Reinhold Erben)

**Charakterisierung equiner intestinaler Organoide mittels
Immunfluoreszenzfärbung und Western Blot**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Anna Heckl

Wien, im Juli 2023

Betreuerin: Ass.-Prof. Dr. med. vet. Franziska Dengler

Institut für Physiologie, Pathophysiologie und Biophysik

Department für Biomedizinische Wissenschaften

Veterinärmedizinische Universität Wien

Gutachterin: Ao.Univ.-Prof. Mag.rer.nat. Dr.rer.nat. Ingrid Walter

Institut für Morphologie

Department für Pathobiologie

Veterinärmedizinische Universität Wien

Eigenständigkeitserklärung

Ich, Anna Heckl, erkläre hiermit, dass für die Erstellung dieser Diplomarbeit keine anderen als die erwähnten Hilfsmittel und Literaturstellen einbezogen wurden, die entscheidenden Arbeiten selbst durchgeführt und alle zuarbeitenden Tätigkeiten mit ihrem Beitrag zur Arbeit angeführt wurden. Die zur Beurteilung vorgelegte Arbeit wurde eigenständig verfasst und die Arbeit wurde nicht an anderer Stelle eingereicht oder veröffentlicht.

Wien, 21.07.23



Abstract

In der Forschung wird heutzutage unter Berücksichtigung des 3R-Prinzips zunehmend versucht von *in-vivo*-Modellen zu geeigneten *in-vitro*-Modellen überzugehen. In diesem Zusammenhang wurden sogenannte Organoide aus Stammzellen entwickelt, welche ganze Organe im Labormaßstab darstellen und Rückschlüsse auf pathophysiologische Vorgänge ermöglichen sollen. So wurden auch equine Darmorganoide etabliert, welche das Jejunumepithel *in vitro* widerspiegeln sollen, um somit pathophysiologische Mechanismen der Kolik genauer untersuchen zu können. In dieser Arbeit wurden eben jene equinen Darmorganoide, welche in verschiedenen Medien kultiviert wurden, untersucht und mit nativen equinen Jejunumepithelien in Bezug auf die Expression von Markerproteinen verglichen, um so Rückschlüsse darauf ziehen zu können, ob equine Jejunumenteroide ein geeignetes *in-vitro*-Modell darstellen. Zu diesem Zwecke wurden Transportproteine (Na^+ -Glukose-Cotransporter [SGLT-1] und Glukosetransporter 2 [GLUT-2]), ein Strukturprotein (VILLIN) und ein Tight-Junction-Protein (Claudin 1 [CLDN-1]) qualitativ mittels Immunfluoreszenzfärbung und quantitativ mittels Western Blot Analyse nachgewiesen. Die Untersuchungen ergaben, dass die Proteine SGLT-1, GLUT-2, VILLIN und CLDN-1 alle, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, in den equinen Jejunumenteroiden nachweisbar sind und diese somit wichtige Charakteristika des Jejunumepithels aufweisen. Die Ausdifferenzierung der Enterozyten in den equinen Jejunumenteroiden ist also schon so weit, dass die beschriebenen Proteine exprimiert werden, jedoch ist die spezifische Lokalisation der Proteine teilweise noch nicht vollständig ausgereift. Dies lässt darauf schließen, dass equine Darmorganoide auf gutem Wege sind ein geeignetes *in-vitro*-Modell des Jejunumepithels darzustellen, auch wenn sie noch nicht vollständig die Funktionen des Epithels *in vivo* widerspiegeln. In Zukunft sollte also unbedingt auf diesem Gebiet weiter geforscht werden, um ein noch besser ausgereiftes *in-vitro*-Modell zu erhalten.

Abstract

Nowadays, research is increasingly trying to move from *in vivo* models to suitable *in vitro* models, considering the 3R principle. In this context, so-called organoids have been developed from stem cells, which represent entire organs on a laboratory scale and are intended to facilitate the investigation of pathophysiological processes. Thus, equine intestinal organoids have been established to reflect the equine jejunum epithelium *in vitro*, in order to investigate pathophysiological mechanisms underlying colic in more detail. In this study, equine intestinal organoids cultured in different media were compared to native equine jejunum epithelia regarding the expression of marker proteins in order to determine whether equine jejunum enteroids represent a suitable *in vitro* model. For this purpose, transport proteins (Na^+ -glucose-cotransporter [SGLT-1] and glucose transporter 2 [GLUT-2]), a structural protein (VILLIN), and a tight junction protein (claudin 1 [CLDN-1]) were detected qualitatively by immunofluorescence staining and quantitatively by Western blot analysis. These analyses revealed that the proteins SGLT-1, GLUT-2, VILLIN, and CLDN-1 are all detectable, albeit to varying degrees, in equine jejunum enteroids, indicating that they exhibit important characteristics of the jejunum epithelium. Thus, enterocyte differentiation in equine jejunum enteroids has reached the stage where the described proteins are expressed, but the specific localization of some of the proteins is not yet fully mature. This suggests that equine intestinal organoids are well on their way to represent a suitable *in vitro* model of the jejunum epithelium, even if they do not yet fully reflect the functions of the epithelium *in vivo*. Therefore, further efforts should be made in this field to obtain an even more precise *in vitro* model.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	3
2.1 Aufbau und Funktion des Dünndarmepithels.....	3
2.2 Oberflächenvergrößerung durch Mikrovilli.....	4
2.3 Glukosetransport durch SGLT-1 und GLUT-2.....	5
2.4 Barrierefunktion durch Tight Junction Proteine.....	7
3. MATERIAL UND METHODEN	9
3.1 Probenmaterial	9
3.2 Immunfluoreszenzfärbung	10
3.2.1 Anfertigung der Kryoschnitte	10
3.2.2 Präinkubation.....	10
3.2.3 Primärantikörper	11
3.2.4 Sekundärantikörper	11
3.2.5 Zellkernfärbung.....	12
3.2.6 Mikroskopische Analyse	12
3.3 Western Blot	13
3.3.1 Proteinisolierung und Bestimmung der Proteingesamtkonzentration.....	13
3.3.2 Herstellung der Acrylamidgele.....	14
3.3.3 Aufbereitung der Proteinproben.....	14
3.3.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	15
3.3.5 Western Blotting	15
3.3.6 Präinkubation, Primärantikörper und Sekundärantikörper.....	16
3.3.7 Detektion.....	16
3.4 Statistische Auswertung	18

4. ERGEBNISSE	19
4.1 Immunfluoreszenzfärbung	19
4.1.1 SGLT-1	19
4.1.2 VILLIN	21
4.1.3 CLDN-1	23
4.2 Western Blot Analyse	26
4.2.1 SGLT-1	26
4.2.2 GLUT-2	27
4.2.3 VILLIN	28
4.2.4 CLDN-1	29
5. DISKUSSION	31
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	37
7. LITERATURVERZEICHNIS	38
8. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	42
9. ANHANG	45

1. Einleitung

Schon vor mehr als 60 Jahren suchten Forscherinnen und Forscher nach Möglichkeiten, Schmerzen und Qualen bei Versuchstieren zu verringern. Im Jahr 1959 erläuterten Russel und Burch erstmals das Prinzip der 3R, d.h. Replacement, Reduction und Refinement (dt. „Ersatz, Reduzierung und Verfeinerung“) bei Tierversuchen (1). Seitdem ist das 3R-Prinzip sowohl in den USA als auch in Europa in die Tierschutzgesetze aufgenommen worden und es wird zunehmend versucht Tierversuche durch geeignete *in-vitro*-Modelle zu ersetzen, welche die Modellierung komplexer Krankheiten erlauben (2). Derzeit geht man weltweit von der Verwendung klassischer Zellkulturmodelle zu anspruchsvolleren, dreidimensionalen Modellen über, um die verschiedensten pathophysiologischen Mechanismen in bestimmten Zellen/Organen von Menschen, Heimtieren und Nutztieren untersuchen zu können. In diesem Zusammenhang ist die Entwicklung von Miniorganen, so genannten „Organoiden“, von großer Bedeutung. Diese Organoide stellen ganze Organe im Labormaßstab dar und können aus Stammzellen hergestellt werden. Organoide können auf verschiedenste Weise für die Modellierung von Krankheiten eingesetzt werden, um sowohl physiologische als auch pathophysiologische Vorgänge zu erläutern (2).

In der Veterinärmedizin stellt die Kolik bei Pferden eine enorm wichtige Pathologie dar, welche auch noch viel Bedarf an Forschung aufweist. Koliken sind der häufigste Grund für eine tierärztliche Notfallbehandlung bei Pferden und einer der Hauptgründe für Tod oder Euthanasie (3). Der Tod bei Koliken ist mit einem Zusammenbruch der Schleimhautbarriere verbunden, wobei die Darmepithelzellen eine wichtige Rolle spielen (4). Um diese Pathologie genauer untersuchen zu können, wären equinen Darmorganoide von großer Bedeutung und ein wertvolles Werkzeug, um die pathophysiologischen Vorgänge bei der Kolik besser nachvollziehen zu können. Jüngste Entdeckungen auf dem Gebiet der Stammzellbiologie haben das Wachstumspotential und die Differenzierung von Stammzellen in Kultur aus dem Darmepithel von Menschen, Mäusen und Schweinen gezeigt - bislang wurden aber nur wenige Arbeiten auf dem Gebiet der Darmzellkulturen bei Pferden durchgeführt (5). Dadurch wird deutlich, dass auch die Forschung an equinen intestinalen Organoiden von immenser Bedeutung ist, um in Zukunft die Todeszahlen durch Koliken minimieren zu können. Dazu ist es essenziell, dass das *in-vitro*-Modell die *in-vivo*-Situation möglichst gut widerspiegelt, die

Organoiden also dieselben Charakteristika und denselben Differenzierungsgrad aufweisen wie das Darmepithel *in vivo*.

In dieser Arbeit wurde die Ausdifferenzierung equiner Jejunumorganoiden charakterisiert und vergleichend untersucht, inwiefern sie das Jejunumepithel *in vivo* widerspiegeln. Ziel war herauszufinden, ob equine Jejunumorganoiden ein geeignetes dreidimensionales *in-vitro*-Modell darstellen, das biologisch relevante Rückschlüsse auf pathophysiologische Vorgänge im Darmepithel von Pferden zulässt. Um den Differenzierungsgrad der Enterozyten zu vergleichen, wurden das Tight Junction Protein Claudin-1 (CLDN-1), das Strukturprotein VILLIN und die Glukosetransporter GLUT-2 (Glukosetransporter 2) und SGLT-1 (Na⁺-gekoppelter Glukosetransporter 1) qualitativ mittels Immunfluoreszenzfärbung und quantitativ mittels Western Blot nachgewiesen.

2. Literaturübersicht

2.1 Aufbau und Funktion des Dünndarmepithels

Der Darm ist ein komplexes Organ, dessen Wand sich aus mehreren Schichten zusammensetzt - die äußere Serosa, zwei Muskelschichten (eine innere zirkuläre Schicht und eine äußere Längsschicht, getrennt durch Faszien, welche das enterische Nervensystem enthalten), die Submukosa und eine innerste Schleimhautschicht (4). Die Mukosa wiederum besteht aus einer Epithelzellschicht, die auf einer azellulären Basalmembran sitzt, einer darunter liegenden lockeren Bindegewebsschicht (*Lamina propria*) und einer weiteren Muskelschicht (*Lamina muscularis mucosae*). Sowohl das Epithel als auch die *Lamina propria* tragen zur Zotten- und Kryptenarchitektur des Dünndarmes bei (6). Wie bereits beschrieben stellen Koliken eine der Hauptursachen für Morbidität und Tod bei Pferden dar. Der Tod dieser Patienten ist häufig die Folge eines Zusammenbruchs der Darmschleimhautbarriere (4).

Auf der gesamten Länge des Dünn- und Dickdarmes sind die Epithelien in Einstülpungen, den sogenannten Lieberkühn'schen Krypten, angeordnet. Der Dünndarm besteht außerdem aus fingerartigen Fortsätzen, den sogenannten Zotten, die in das Darmlumen hineinragen und so die Absorptionsoberfläche vergrößern (7). An der Basis jeder Krypte befinden sich undifferenzierte Stammzellen und teilweise differenzierte Vorläuferzellen. Insgesamt wird diese Region der Krypten als Stammzellnische bezeichnet. Um die kontinuierliche Barriere aufrechtzuerhalten, befinden sich die Zellen in einem dynamischen Zustand des Zellumsatzes. Dies erfordert ein streng reguliertes Gleichgewicht zwischen Zellverlust und Zellerneuerung und führt dazu, dass etwa alle fünf bis sieben Tage eine neue Darmauskleidung entsteht. Diese Fähigkeit zur Selbsterneuerung wird den adulten oder somatischen Stammzellen zugeschrieben, die sich in der Darmschleimhaut tief in der Basis jeder Krypte befinden (4,7).

Das Darmepithel ist eine einzelne Zellschicht, die das Darmlumen auskleidet, und zwei wichtige Funktionen hat. Erstens fungiert es als Barriere, die den Durchtritt schädlicher intraluminaler Agentien, wie fremder Antigene, Mikroorganismen und deren Toxinen verhindert. Die zweite Funktion ist der Transport von essenziellen Nährstoffen, Elektrolyten und Wasser aus dem Darmlumen in den Blutkreislauf (8). Diese zwei Funktionen des Darmepithels werden durch die koordinierte Aktion differenzierter Epithelzellen erfüllt, die auf die Nährstoffabsorption (Enterozyten), die Hormonsekretion (enteroendokrine Zellen), die

antimikrobielle Peptidsekretion (Paneth-Zellen) oder die Schleimsekretion (Becherzellen) spezialisiert sind. All diese differenzierten intestinalen Epithelzellen leiten sich von den in den Krypten befindlichen Stammzellen ab (9). Das Darmepithel vermittelt die selektive Permeabilität über zwei Hauptwege, den transepithelialen/transzellulären Weg und den parazellulären Weg (siehe Abb. 1). Die transzelluläre Permeabilität ist im Allgemeinen mit dem Transport von gelösten Stoffen durch die Epithelzellen verbunden und wird vorwiegend durch selektive Transporter für Aminosäuren, Elektrolyte, kurzkettige Fettsäuren und Zucker reguliert (8). Die parazelluläre Permeabilität steht im Zusammenhang mit dem Transport über den Raum zwischen den Epithelzellen und wird durch interzelluläre Komplexe reguliert, die an der apikal-lateralen Membrangrenze und entlang der lateralen Membran lokalisiert sind. Dieser Kontakt zwischen den Epithelzellen des Darms umfasst drei Komponenten: Desmosomen, Adhärenzverbindungen (engl. adherent junctions) und Tight Junctions (8).

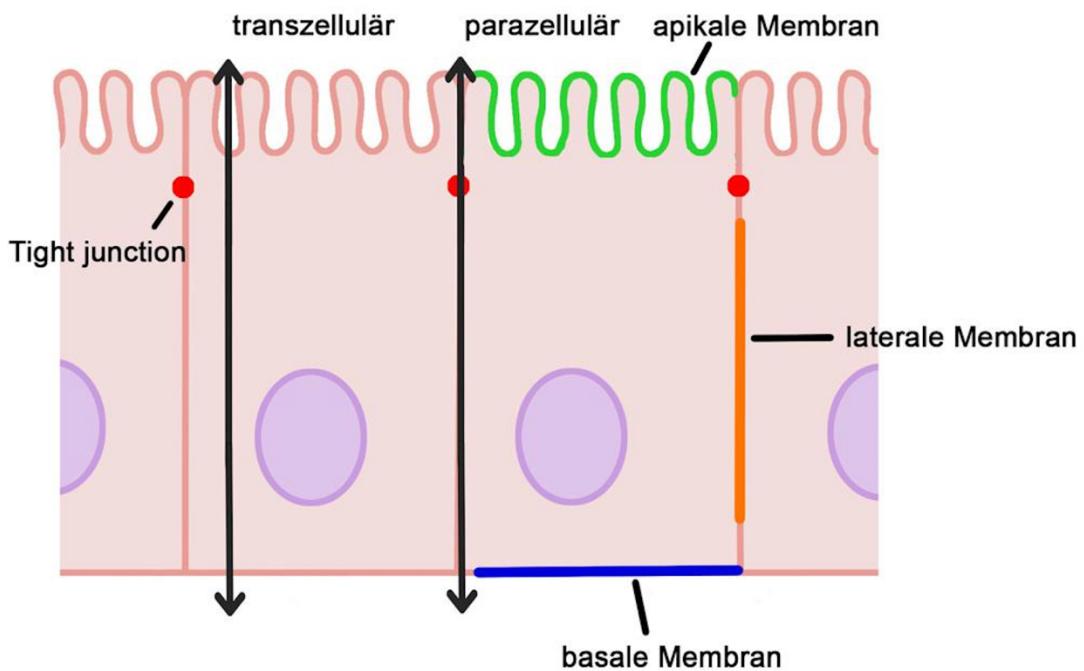


Abb. 1: Schematische Darstellung des Aufbaus von Enterozyten und deren selektiver Permeabilität über zwei Hauptwege (Abb.: Anna Heckl, modifiziert nach Groschwitz 2009 (8))

2.2 Oberflächenvergrößerung durch Mikrovilli

Mikrovilli sind apikale Zelloberflächenstrukturen von Epithelzellen – sie sind Fortsätze mit einem Kern aus vernetzten Aktinfilamenten, die sich von dem elektronendichten Material an der Spitze als Wurzelchen in den Zellcortex erstrecken. Die Mikrovilli von Nieren- und

Darmepithelzellen enthalten einen kompakten Kern aus rund 20 geordneten parallelen Mikrofilamenten, von denen man annimmt, dass sie die Zelloberfläche vergrößern und somit die Absorptionsfunktionen dieser Gewebe regulieren (10). Die Aktinfilamente wiederum sind Teil des Aktin-Zytoskeletts, die durch zahlreiche akzessorische Proteine in verschiedenen strukturellen Anordnungen in einem komplexen System organisiert sind. Das Aktin-Zytoskelett fungiert als zelluläre Maschinerie, die schiebende (protrusive), ziehende (kontraktile) und widerstandsfähige (formgebende) Kräfte erzeugen kann. Die protrusiven Kräfte werden durch die koordinierte Polymerisation mehrerer Aktinfilamente erzeugt, die kontraktile Kräfte durch das Gleiten der bipolaren Myosin-II-Filamente entlang der Aktinfilamente und die formgebenden Kräfte durch die Bildung von vernetzten membranassoziierten Filamentanordnungen. Aktin-abhängige Kräfte sind wesentlich für die Zellmigration, die Interaktion mit der Umwelt, die Form und die mechanischen Eigenschaften der Zelloberfläche sowie den Transport und die Morphogenese von Membranorganellen (11).

VILLIN ist ein Aktin-bindendes Protein, das in verschiedenen Epithelzellen mit einem Bürstensaum exprimiert wird, z.B. in Darmzotten, Nierentubuli, Eileitern und Samenleitern (10). VILLIN ist mit den mikrovillären Aktinfilamenten assoziiert und reguliert die Morphologie von Epithelzellen, die Reorganisation von Aktin sowie die Zellmotilität (12,13). Die Überexpression von VILLIN in Fibroblasten führt zum Wachstum von Mikrospikes auf der dorsalen Oberfläche jener Zellen, die gebündelte Aktinfilamente enthalten, an die VILLIN gebunden ist. Des Weiteren hemmt die Herrunterregulierung der endogenen VILLIN-mRNA durch Antisense-RNA reversibel den Aufbau der Bürstensaummembran. Diese Studien deuten darauf hin, dass VILLIN die Bildung von organisierten Aktinstrukturen, wie sie in den Mikrovilli zu finden sind, erleichtert. VILLIN ist einzigartig unter den Aktin-regulierenden Proteinen, da es Aktinfilamente abtrennen, kappen, nukleieren und bündeln kann (10).

2.3 Glukosetransport durch SGLT-1 und GLUT-2

Die Absorption von Monosacchariden im Dünndarm ist entscheidend für die Kalorienaufnahme von Monogastriern und wird in Abhängigkeit von Nahrungsangebot, Nahrungszusammensetzung und Energiebedarf in verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Situationen angepasst (14). Für die Kalorienaufnahme sind D-Glukose, D-Galaktose und D-Fruktose die wichtigsten Monosaccharide. Sie müssen zur Absorption die Epithelzellen durchqueren, welche aber durch Tight Junctions miteinander verbunden sind und

so die parazelluläre Permeation von Monosacchariden nicht zulassen. Da Monosaccharide hydrophil sind können sie Zellmembranen nicht passiv durchdringen. Daher sind für die Absorption dieser Monosaccharide Transporter in der luminalen Bürstensaummembran und der basolateralen Membran von Dünndarmepithelzellen erforderlich. Zu den wichtigsten dieser Transporter gehören der Na^+ -D-Glukose-Cotransporter SGLT-1 und der Glukosetransporter GLUT-2 (14). GLUT-2 ist für den passiven Transport von Glukose in Richtung des Konzentrationsgradienten verantwortlich. SGLT-1 hingegen ist für den „aktiven“ Transport von Glukose durch die Bürstensaummembran des Dünndarms verantwortlich (15).

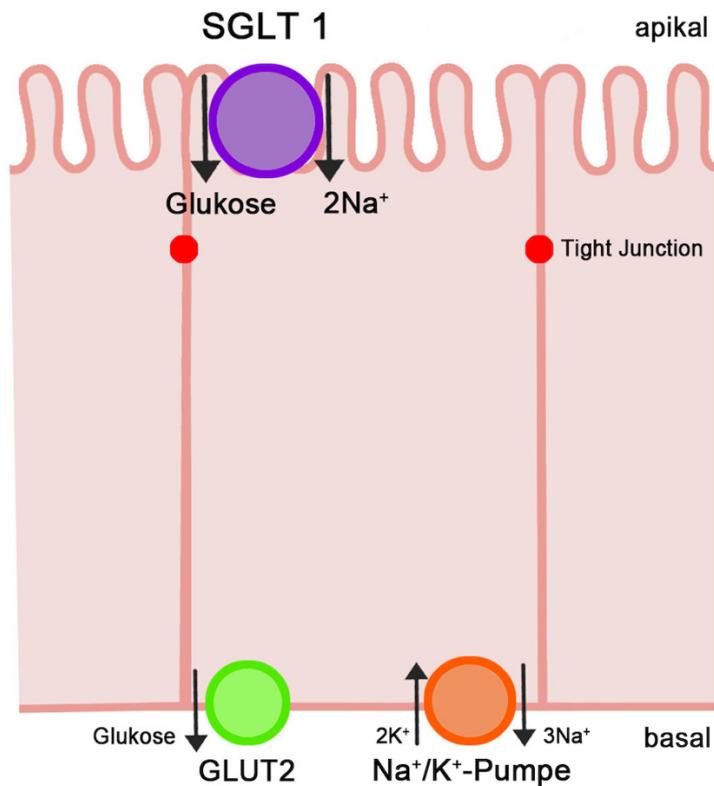


Abb. 2: Schematische Darstellung der Glukosetransporter SGLT-1 und GLUT-2 (Abb.: Anna Heckl, modifiziert nach Koepsell 2020 (14) und Wright 2007 (15))

SGLT-1 wird in der Bürstensaummembran des Enterozyten exprimiert, wo es den Transport von zwei Natriumionen und einem Glukosemolekül über die Bürstensaummembran koppelt. Die Energie, die in dem elektrochemischen Natrium-Potenzialgradienten gespeichert ist, ermöglicht es die Glukoseakkumulation im Enterozyten gegen den Konzentrationsgradienten anzutreiben. Natrium, das zusammen mit Glukose in die Zelle gelangt, wird dann durch die Na^+/K^+ -Pumpe in der basolateralen Membran ins Blut transportiert, wodurch die Antriebskraft für den Glukosetransport aufrechterhalten wird (14,15). Mit der Anhäufung des Zuckers in den

Enterozyten entsteht eine treibende Kraft für den Transport der Glukose aus den Zellen ins Blut über den in der basolateralen Membran exprimierten GLUT-2 (siehe Abb. 2). Das Ergebnis ist, dass ein Mol Glukose und zwei Mol Natrium durch den Enterozyten vom Darmlumen ins Blut transportiert werden, gefolgt von zwei Mol Anionen, um die Elektroneutralität zu gewährleisten, und Wasser. Die Energie für den gesamten Prozess stammt aus dem ATP, das von der basolateralen Na^+/K^+ -Pumpe verbraucht wird (15).

2.4 Barrierefunktion durch Tight Junction Proteine

Wie bereits erwähnt bildet das Darmepithel eine hochdynamische und selektive Barriere, die die Absorption von Flüssigkeit und gelösten Stoffen kontrolliert und gleichzeitig den Zugang von Pathogenen zu darunter liegenden Geweben verhindert (8). Die Barriereeigenschaften werden durch intrazelluläre Verbindungen erreicht zu denen apikale Tight Junctions und darunter liegende Adherens Junctions gehören, welche zusammen als apikaler Junctionskomplex (AJC) bezeichnet werden. Desmosomen und Gap Junctions, die unter den AJC liegen, vermitteln die interzelluläre Adhäsion und den Cross Talk zwischen benachbarten Epithelzellen (16). Die Tight Junction Proteine bilden Poren zwischen Epithelzellen, um den parazellulären Flüssigkeits- und Ionenfluss zu kontrollieren (16). Morphologisch gesehen erscheinen sie als eine Reihe von Anlagerungen zwischen den seitlichen Membranen benachbarter Zellen. Diese Anheftungen erstrecken sich in einem gürtelartigen Netzwerk, das jede Zelle umgibt und sich mit der Nachbarzelle verbindet, um eine kontinuierliche Abdichtung zu bilden (17) (siehe Abb. 3).

Die Familie der Claudine zählt zu den wichtigsten Vertretern der Tight Junction Proteine und umfasst 27 Subtypen (6). Ultrastrukturell gesehen befinden sich Claudine in Tight-Junction-Strängen und dienen dazu die Ladung und die größenselektiven Eigenschaften des parazellulären Raums zu kontrollieren und dadurch die Barriereeigenschaften zu regulieren. Neben der Regulierung der Barrierefunktion steuern die Claudine auch die epitheliale Homöostase. Claudine fungieren entweder als abdichtende Claudine oder als porenbildende Claudine. Zu den abdichtenden Claudinen zählen Cladin-1, -3, -4, -5, -6, -8, -12, -18 und -19, während Cladin-2 und Cladin-15 zu den porenbildenden Claudinen zählen, welche zu einer erhöhten parazellulären Permeabilität für Natrium und Wasser beitragen. Cladin-1 wird in großen Mengen im Darmepithel exprimiert, ist für seine barriereförmenden Fähigkeiten bekannt und soll eine wichtige Rolle für die Tight-Junction-Integrität spielen (16).

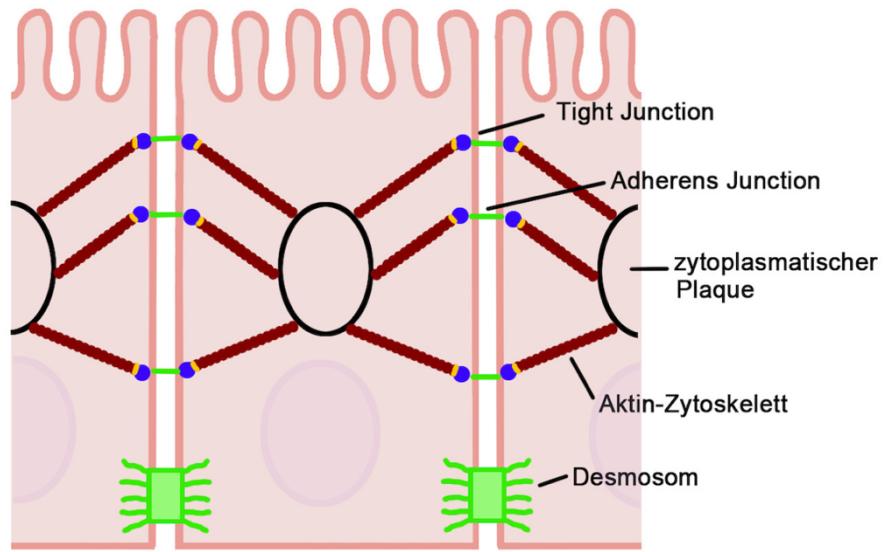


Abb. 3: Schematische Darstellung der intestinalen epithelialen Junctions-Komplexe (Abb.: Anna Heckl, modifiziert nach Buckley und Turner 2018 (6))

3. Material und Methoden

3.1 Probenmaterial

Die Versuche wurden am Institut für Physiologie, Pathophysiologie und Experimentelle Endokrinologie an der Veterinärmedizinischen Universität Wien durchgeführt. Die verwendeten Proben wurden im Zuge einer anderen Arbeit (PhD von Mag. med. vet. Christina Windhaber) entnommen bzw. kultiviert und für diese Diplomarbeit zur Verfügung gestellt. Die Gewebeproben wurden von toten Pferden, welche maximal eine Stunde zuvor an der Universitätsklinik für Pferde der Veterinärmedizinischen Universität Wien euthanasiert wurden, entnommen. Die Pferde wurden aus verschiedensten, nicht mit dem Projekt zusammenhängenden Gründen euthanasiert und wiesen eine intakte Darmgesundheit auf. Es wurde distales Jejunum (ca. 3 m proximal vom Ileum) entnommen und in 0,9 % NaCl gewaschen. Ein kleiner Teil der Darmwand wurde für die im Folgenden beschriebene histologische Charakterisierung fixiert, bzw. für die Extraktion von Gesamtprotein wurde das Epithel manuell von den darunter liegenden Muskelschichten abpräpariert und bis zur weiteren Verarbeitung sofort bei -80 °C eingefroren (s.u.). Um equine Jejunumenteroide (eqJE) zu kultivieren wurden die Stammzellen enthaltenden Krypten isoliert und in Proliferationsmedium (PM) inkubiert. Die resultierenden Enteroiden wurden dann mit verschiedenen Differenzierungsmedien (DM1-DM4) weiterkultiviert, um die Differenzierung der Enterozyten zu fördern. Die Bestandteile der verschiedenen Medien sind in Anhang 1 aufgelistet.

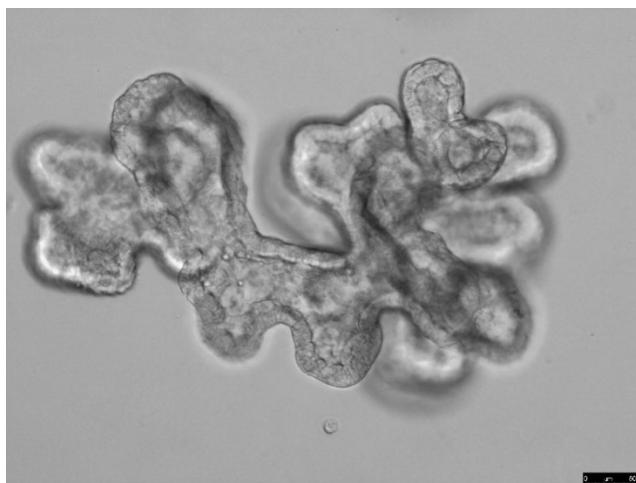


Abb. 4: eqJE in Kultur, Größenbalken 50 µm (Abb.: Franziska Dengler)

3.2 Immunfluoreszenzfärbung

Um den Differenzierungsgrad der Enterozyten in eqJE vergleichend zu ex-vivo-Gewebe zu eruieren, wurden die Proteine SGLT-1, VILLIN und CLDN-1 mit der folgend beschriebenen Methode sowohl im Jejunumepithel als auch in eqJE detektiert. Die Immunfluoreszenzfärbung erlaubt die Darstellung gewisser Markerproteine durch Kombinationen spezifischer Antikörper, welche mit fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelt sind (18). Es wurde stets eine Sekundärantikörperkontrolle (SAKK) mitgefärbt, bei der die Schnitte nur mit Sekundär- nicht aber mit Primärantikörper inkubiert wurden, um unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers auszuschließen.

3.2.1 Anfertigung der Kryoschnitte

Die Organoide wurden nach der Fixierung mit 4,5%igem Formaldehyd (Roti[®] Histofix, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) bei 4 °C gelagert. Um die Organoide möglichst unbeschadet in Kryoblöcke zu verbringen, müssen sie so gut wie wasserfrei in einem wasserlöslichen Einbettmedium auf Glycerinbasis (OCT Embedding Matrix, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) eingebettet werden. Dazu wurden die Organoide zuerst in einer Glycin-Lösung eingelegt und später in eine aufsteigende Sucrose-Lösungsreihe. Zuletzt verblieben die Organoide in der OCT-Lösung und wurden anschließend schockgefroren. Aus den Blöcken wurden mit einem Kryostat (Leica CM3050 S, Leica Biosystems GmbH, Nußloch, Deutschland) Gefrierschnitte (0,6 µm) angefertigt, welche bei -80 °C gelagert wurden.

Im Gegensatz dazu wurden die Gewebeproben direkt nach der Entnahme mit 4,5%igem Formaldehyd 24 h lang fixiert und in 70 % Ethanol bei 4 °C gelagert. Vor der Entwässerung musste hierbei noch der Alkohol ausgespült werden, daher wurde das Gewebe zuerst mit 40 % Ethanol, dann mit Aqua dest. und anschließend mit PBS gespült. Die weitere Vorgehensweise entsprach jener der eqJE.

3.2.2 Präinkubation

Als Erstes wurden die fertigen Schnitte mit einer Präinkubationslösung, bestehend aus PBS, 4 % Esel- (Abcam[®], Cambridge, UK) bzw. Ziegenserum (MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege, Deutschland) und 0,1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich[®], Inc., St. Louis, USA), überschichtet und dann eine Stunde lang bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer

inkubiert. Die Präinkubationslösung dient dazu unspezifische Bindungen zu sättigen. Das zur Präinkubationslösung zugesetzte Triton X-100 erzielt eine Permeabilisierung der Zellmembran (19).

3.2.3 Primärantikörper

Nach der einstündigen Inkubation wurde die Präinkubationslösung von den Schnitten abgekippt und die Schnitte vorsichtig trockengewischt. Die Organoid- bzw. Gewebeschnitte wurden folgend mit einem Fettstift (Mini PAP Pen, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA) umrandet, um ein Verbleiben der Antikörperlösungen auf den Schnitten zu gewährleisten. Anschließend wurden die Schnitte mit dem entsprechenden Primärantikörper (PAK) überschichtet (siehe Tabelle 1) und wiederum zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Schnitte in drei Waschschritten zu jeweils fünf Minuten mit PBS gereinigt.

3.2.4 Sekundärantikörper

Darauffolgend wurden die Schnitte mit dem jeweiligen Sekundärantikörper (siehe Tab. 1) beschichtet und erneut für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Da die Sekundärantikörper bereits fluoreszenzmarkiert sind, fand die Inkubation in einer dunklen Kammer statt um die spätere Leuchtkraft nicht zu beeinträchtigen.

Tab. 1: Protokoll für die Immunfluoreszenzfärbung der einzelnen Proteine

	SGLT-1	VILLIN	CLDN-1
Präinkubation	Ziegenserum	Ziegenserum	Eselserum
Primärantikörper	Rabbit anti-SGLT-1	Rabbit anti-VILLIN	Mouse anti-Claudin-1 (A-9)
Verdünnung	1:100	1:100	1:100
Hersteller	Nicht kommerziell hergestellt, großzügiges Geschenk von Professor George Kellett,	Thermo Fisher Scientific™, Wien, Österreich	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland

(Bestellnummer)	University of York	(PA5-78222)	(sc-166338)
Sekundärantikörper	Goat anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor™ 488	Goat anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor™ 488	Donkey anti-Mouse IgG, Alexa Fluor™ 488
Verdünnung	1:200	1:200	1:200
Hersteller (Bestellnummer)	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific™, Wien, Österreich (A-11034)	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific™, Wien, Österreich (A-11034)	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific™, Wien, Österreich (A-21202)

3.2.5 Zellkernfärbung

Zusätzlich wurden alle Schnitte am Ende der Sekundärantikörper-Inkubation noch mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, Sigma-Aldrich®/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:500 inkubiert. Dieser Fluoreszenzfarbstoff färbt die Zellkerne an und sorgt somit für eine bessere Übersicht am Präparat. Nach einer Inkubationszeit von drei Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten und dunklen Kammer wurden die Schnitte erneut in drei Waschschritten zu je fünf Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Deckmedium Vectashield Vibrance (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) eingedeckt.

3.2.6 Mikroskopische Analyse

Die fertig fluoreszenzmarkierten Schnitte wurden dann vorerst mit einem Weitfeldmikroskop (Zeiss Axioskop 2 plus, Carls Zeiss Werk, Göttingen, Deutschland) begutachtet. Die Sekundärantikörper wurden hierbei bei einer Wellenlänge von 490 nm angeregt und emittierten eine Wellenlänge von 525 nm. Bei der DAPI-Kernfärbung hingegen wurde mit einer Wellenlänge von 359 nm angeregt, die Emission lag bei 461 nm. Danach wurden die Schnitte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM 880, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland; VetCore Facility (Imaging) der Veterinärmedizinischen Universität Wien) genauer untersucht. Die Bedingungen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop wurden immer gleich gewählt, um die Vergleichbarkeit innerhalb eines Proteins zu

ermöglichen. Die Methode der Bilderzeugung in einem konfokalen Mikroskop unterscheidet sich grundlegend von der eines herkömmlichen Weitfeldmikroskopes, bei dem das gesamte Objekt beleuchtet und das Bild direkt vom Auge erfasst werden kann. Im Gegensatz dazu wird die Beleuchtung in einem konfokalen Mikroskop durch das Scannen eines oder mehrerer fokussierter Lichtstrahlen, in der Regel von einem Laser ausgehend, über das Präparat erreicht. Das erlaubt eine weitaus detailreichere Beurteilung (20,21).

3.3 Western Blot

Neben der qualitativen Beurteilung des Epithels durch die Immunfluoreszenzfärbung wurde mittels Western Blot noch eine quantitative Untersuchungsmethode zum Nachweis der Proteine SGLT-1, VILLIN und CLDN-1 herangezogen. Des Weiteren wurde das Protein GLUT-2 und zur Normalisierung der Daten β -Actin (ACTB) mit dieser Methode detektiert. Western Blotting bezieht sich auf die Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran, die dann später auf der Grundlage einer Antigen-Antikörper-Interaktion nachgewiesen und analysiert werden können. Es umfasst die Extraktion und Quantifizierung des Gesamtproteins jeder Probe, die Gelelektrophorese, das Blotting und die anschließende Detektion (22). Die im Zuge des Western Blottings verwendeten Chemikalien stammen, falls nicht gesondert angegeben, von der Firma Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) oder der Firma Carl Roth (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland).

3.3.1 Proteinisolierung und Bestimmung der Proteingesamtkonzentration

Für die Gesamtproteinextraktion wurde jeweils ein 12-well eqJE in 4 °C PBS mechanisch geerntet und als Zellpellet wie das native Epithel bei -80 °C gelagert. Daraufhin wurden die Proben in Radioimmunpräzipitations-Assay-Puffer (RIPA-Puffer) (siehe Tab. 2) mit einem Protease- (cOmplete™-ULTRA-Mini-Tabletten, Roche Österreich, Wien, Österreich) und Phosphataseinhibitor (PhosSTOP™ Easypack, Roche Österreich, Wien, Österreich) unter Verwendung einer Rührwerksmühle (Retsch MM200, Merck, Sigma-Aldrich®, Wien, Österreich) homogenisiert. Die Proteingesamtkonzentration wurde dann mittels Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay, Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific™, Rockford, IL, USA) und dem EnSpire™ 2300 Multilabel Reader (PerkinElmer LAS-GmbH, Rodgau, Deutschland) gegen einen Standard aus bovinem Serumalbumin (Sigma-Aldrich®/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) quantifiziert. Der BCA-Assay ist eine

biochemische Methode zur quantitativen Messung des Gesamtproteins und basiert auf der Kombination der Biuret-Reaktion mit BCA, die den kolorimetrischen Nachweis von Proteinen ermöglicht (23).

Tab. 2: Zusammensetzung RIPA-Puffer

RIPA-Puffer
0,05 mol/l Tris (pH 7,4/HCl)
0,15 mol/l NaCl
1 M EDTA
1 % Triton X-100
1 % Natriumdeoxycholat
0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS)

3.3.2 Herstellung der Acrylamidgele

Für die Gelektrophorese wurden selbst angemischte und gegossene Polyacrylamid-Gele verwendet (siehe Tab. 3).

Tab. 3: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele (Mengenangaben für jeweils ein Gel)

Trenngel 10 %	Sammelgel 3,75 %
1 ml Tris 2	0,5 ml Tris 1
1,34 ml Acrylamid	250 µl Acrylamid
0,54 ml Bisacrylamid	100 µl Bisacrylamid
1,14 ml <i>Aqua dest.</i>	1,15 ml <i>Aqua dest.</i>
5,34 µl TEMED	2,6 µl TEMED
40 µl 10 % APS	20 µl 10 % APS

3.3.3 Aufbereitung der Proteinproben

Als Nächstes wurden die Proteinproben je nach Proteinkonzentration mit NaCl verdünnt, um in jeder Probe die gleiche Menge an Protein/µl zu erreichen. Außerdem wurde jeder Probe 3 µl Loading Dye (siehe Tab. 4) hinzugefügt. Dann wurden die Proben zur Proteindenaturierung für zehn Minuten auf einem Heizblock (HLC Heating-ThermoMixer MKR 13, DITABIS AG, Pforzheim, Deutschland) auf 97 °C erhitzt, kurz zentrifugiert und gevortext.

Tab. 4: Zusammensetzung Loading Dye

Loading Dye
0,1 mol/l Tris (pH 6,8)
10 % Glycin
4 % SDS
4 % β -Mercaptoethanol
0,2 % Bromphenolblau

3.3.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Anschließend wurden die Gele für die Elektrophorese vorbereitet, indem die Geltaschen mit je 10 μ l Probe, zu je 20 μ g Gesamtprotein, beladen wurden. Jedes der Gele wurde auch zusätzlich mit einem Marker beladen (Precision Plus ProteinTM Dual Color Standards, Bio-Rad Laboratories, USA) um so die Schätzung der Proteingröße der Banden zu ermöglichen. Die SDS-Page wurde im „Mini PROTEAN-Tetra System“ (Bio-Rad Laboratories, USA) in Elektrophoresepuffer (siehe Tab. 5) zunächst 20 Minuten lang bei 80 Volt und dann ungefähr 90 Minuten lang bei 120 Volt durchgeführt.

Tab. 5: Zusammensetzung Elektrophoresepuffer

10x Elektrophoresepuffer (2L)
60,58 g Tris
288,24 g Glycin
20 g SDS
Auffüllen mit <i>Aqua dest</i>

3.3.5 Western Blotting

Nach der SDS-PAGE wurden die Gele und das Filterpapier (Thermo Fisher Scientific, USA) in Nitrocellulose-Blotting-Puffer (siehe Tab. 6) eingelegt und dann mit dem EasyPhor Semi Dry Blotter (Biozyme, Wien, Österreich) bei 14 Volt für 30 Minuten auf eine Nitrocellulosemembran (Nitropure 0,45 μ m, Osmonics, Westborough, USA) übertragen.

Tab. 6: Zusammensetzung Blotting-Puffer

Blotting-Puffer (2L)
6,06 g Tris
28,84 g Glycin
400 ml Methanol
Auffüllen mit <i>Aqua dest</i>

3.3.6 Präinkubation, Primärantikörper und Sekundärantikörper

Nach der Übertragung auf die Membranen wurden diese zunächst bei Raumtemperatur in EveryBlot Blocking Buffer (Bio-Rad Laboratories GmbH, Vienna, Austria) präinkubiert. Danach wurden die Membranen in die entsprechenden Primärantikörper eingelegt und über Nacht bei 4 °C inkubiert (siehe Tab. 7). Am nächsten Tag wurden die Membranen über drei Waschschritte zu jeweils zehn Minuten mit Tris-gepufferter Salzlösung + Tween (TBST) gewaschen (siehe Tab. 8). Als Nächstes wurden die Membranen eine Stunde lang bei Raumtemperatur im Sekundärantikörper inkubiert (siehe Tab. 7). Dann wurden die Membranen wiederum über drei Waschschritte in TBST gewaschen.

3.3.7 Detektion

Um die Signale sichtbar zu machen, wurden die Membranen anschließend für fünf Minuten mit Clarity™ Western ECL Blotting Substrate (Bio-Rad Laboratories GmbH, Wien, Österreich) inkubiert, das mit der an den Sekundärantikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase (engl. Horse radish peroxidase, HRP) reagiert. Für den Nachweis von ACTB wurden die Membranen aufgrund des starken Signals nur drei Minuten lang in derselben Lösung inkubiert. Das Signal wurde mit einem UVP ChemStudio Series - Western Blot Imager mit der Vision Works® Analysis Software (Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland) nachgewiesen und mit Fiji (ImageJ64, NIH) analysiert (24). Die Proteinexpression der Zielproteine wurde auf ACTB normalisiert.

Tab. 7: Primär- und Sekundärantikörper Western Blot

	SGLT-1	VILLIN	CLDN-1	GLUT-2	ACTB
Primär- antikörper	Rabbit anti- SGLT-1	Rabbit anti- VILLIN	Mouse anti- Claudin-1 (A- 9)	Rabbit anti- GLUT-2	Anti-β-Actin
Verdünnung	1:200	1:200	1:200	1:200	1:5000
Hersteller (Bestell- nummer)	Bioss Antibodies Inc., Woburn, MA, USA; (bs-1128R- TR)	Thermo Fisher Scientific™, Wien, Österreich (PA5- 78222)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland (sc-166338)	Avia Systems Biology, San Diego, USA (ARP41706 P050-100µl)	UniProtKB (P60710)
Größe	65 kDa	90 kDa	17-22 kDa	58 kDa	42 kDa
Sekundär- antikörper	Anti-Rabbit IgG	Anti-Rabbit IgG	Goat Anti- Mouse IgG	Anti-Rabbit IgG	Goat Anti- Mouse IgG
Verdünnung	1:5000	1:5000	1:5000	1:5000	1:5000
Hersteller (Bestell- nummer)	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande (7074)	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande (7074)	Sigma- Aldrich®/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland (AP181P)	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande (7074)	Sigma- Aldrich®/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland (AP181P)

Tab. 8: Zusammensetzung Waschpuffer (TBST)

Waschpuffer	10x TBS (1L)
100 ml 10x TBS	60,58 g Tris
500 µl Tween 20	87,66 g NaCl
900 ml Aqua dest	Auffüllen mit <i>Aqua dest.</i>

3.4 Statistische Auswertung

Die quantitativ erhobenen Daten wurden mit Microsoft Excel und SigmaPlot 14.5 (Systat Software, Erkrath, Germany) verarbeitet und ausgewertet. Dabei wurde das arithmetische Mittel (\pm Standardabweichung) aller technischen Replikate für jedes biologische Replikat berechnet. Die Proteinexpression im nativen Jejunumepithel wurde als Kalibrator genutzt und die Expressionlevel der eqJE relativ dazu berechnet. Diese Werte wurden für die statistische Analyse verwendet. Die Daten wurden auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test) und -varianz (Brown Forsythe Test) überprüft und dementsprechend mittels One Way ANOVA mit post-hoc Holm-Sidak-Test bzw. One Way ANOVA on Ranks mit post-hoc Dunn's Test auf statistische Unterschiede zum nativen Jejunumepithel überprüft. Statistische Signifikanz wurde ab $p < 0,05$ angenommen.

4. Ergebnisse

Ziel der Arbeit war, eqJE, die in verschiedenen Medien kultiviert wurden, mit nativen equinen Jejunumepithelien in Bezug auf die Expression von Markerproteinen zu vergleichen und so festzustellen, welche Medienkomposition das beste *in-vitro*-Modell für die Untersuchung von Pathomechanismen im equinen Jejunumepithel hervorbringt. Dies erfolgte einerseits qualitativ mittels Immunfluoreszenzfärbungen und andererseits quantitativ mittels Western Blot Analysen.

4.1 Immunfluoreszenzfärbung

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung dargestellt. Das native Jejunum dient hierbei immer als Referenz, da sich die eqJE idealerweise so wie das Jejunumepithel darstellen sollten.

4.1.1 SGLT-1

Abb. 5 zeigt die Immunfluoreszenzmarkierung von SGLT-1 sowohl im Jejunum als auch in den mit verschiedenen Differenzierungsmedien inkubierten eqJE. Schon bei dieser Übersichtsdarstellung wird deutlich, dass das Fluoreszenzsignal und somit die Expression von SGLT-1 in den eqJE fortschreitend von PM hin zu DM4 zunimmt (siehe Abb. 5b-f). SGLT-1 wird an der apikalen Membran von Enterozyten (Bürstensaummembran) exprimiert (15), welche sich bei den kugelförmigen eqJE an der Innenseite befindet (siehe Abb. 5). Diese spezifische Lokalisation der SGLT-1 Proteine ist in den eqJE nicht eindeutig erkennbar, doch scheint das Fluoreszenzsignal zumindest an manchen Stellen der Bürstensaummembran stärker ausgeprägt zu sein.

Abb. 6 zeigt sowohl das native Jejunum als auch eqJE in DM4 in stärkerer Vergrößerung, um eine Detailbetrachtung zu ermöglichen, sowie den Vergleich zu den jeweiligen SAKKs, bei welchen kein Primärantikörper eingesetzt wurde. Da bei den Kontrollen sowohl im Jejunum als auch im eqJE kein grünes Fluoreszenzsignal im Bereich des Epithels erkennbar ist, kann man eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers ausschließen. Im Zotteninneren des Jejunums (Abb. 5a und 6a) ist eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers anzunehmen.

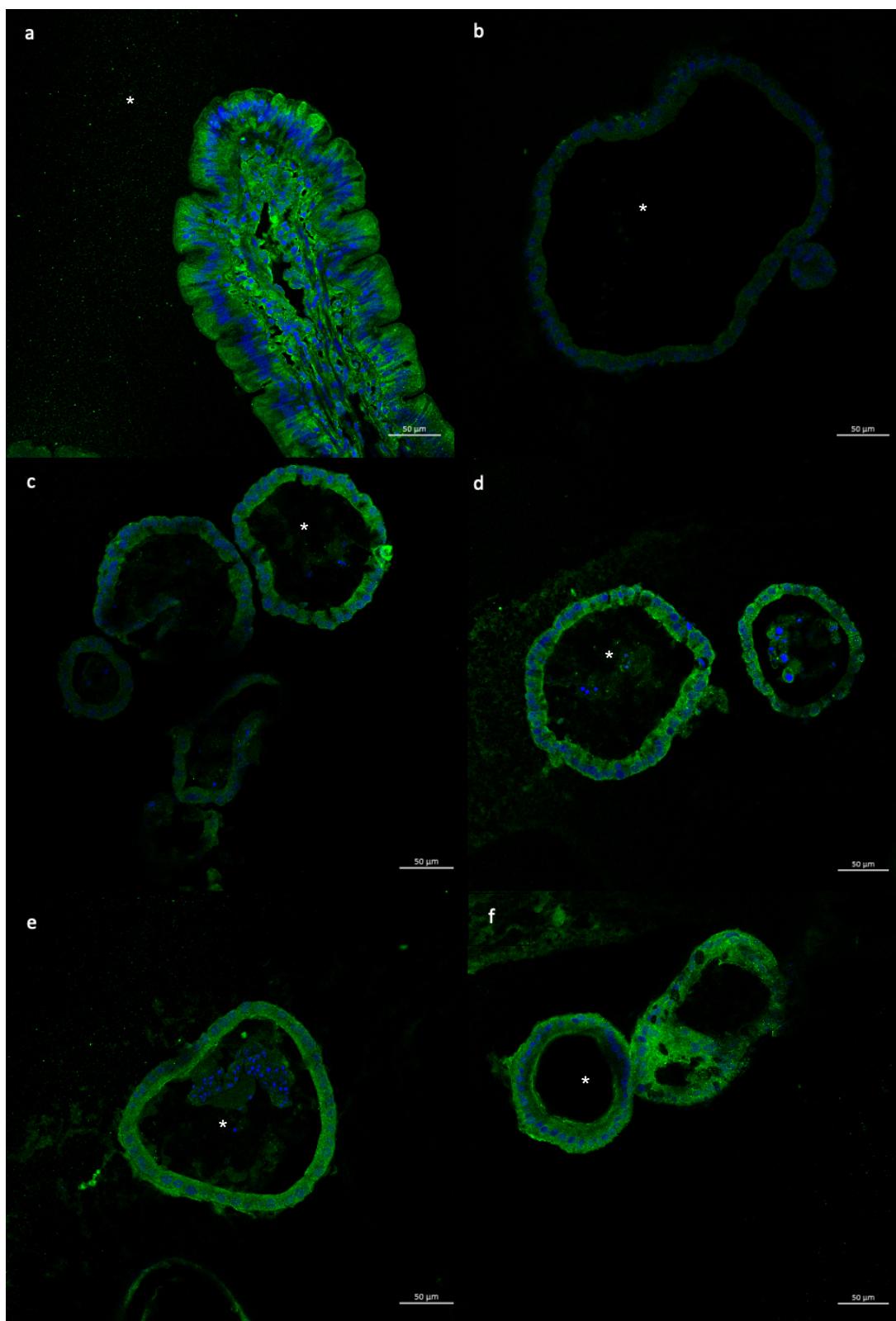


Abb. 5: Konfokalmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen von SGLT-1 (grün): **a** Jejunum, **b** eqJE PM, **c** eqJE DM1, **d** eqJE DM2, **e** eqJE DM3, **f** eqJE DM4, die Zellkerne sind blau angefärbt, das Lumen ist mit einem * markiert, Maßstabskala 50 μ m

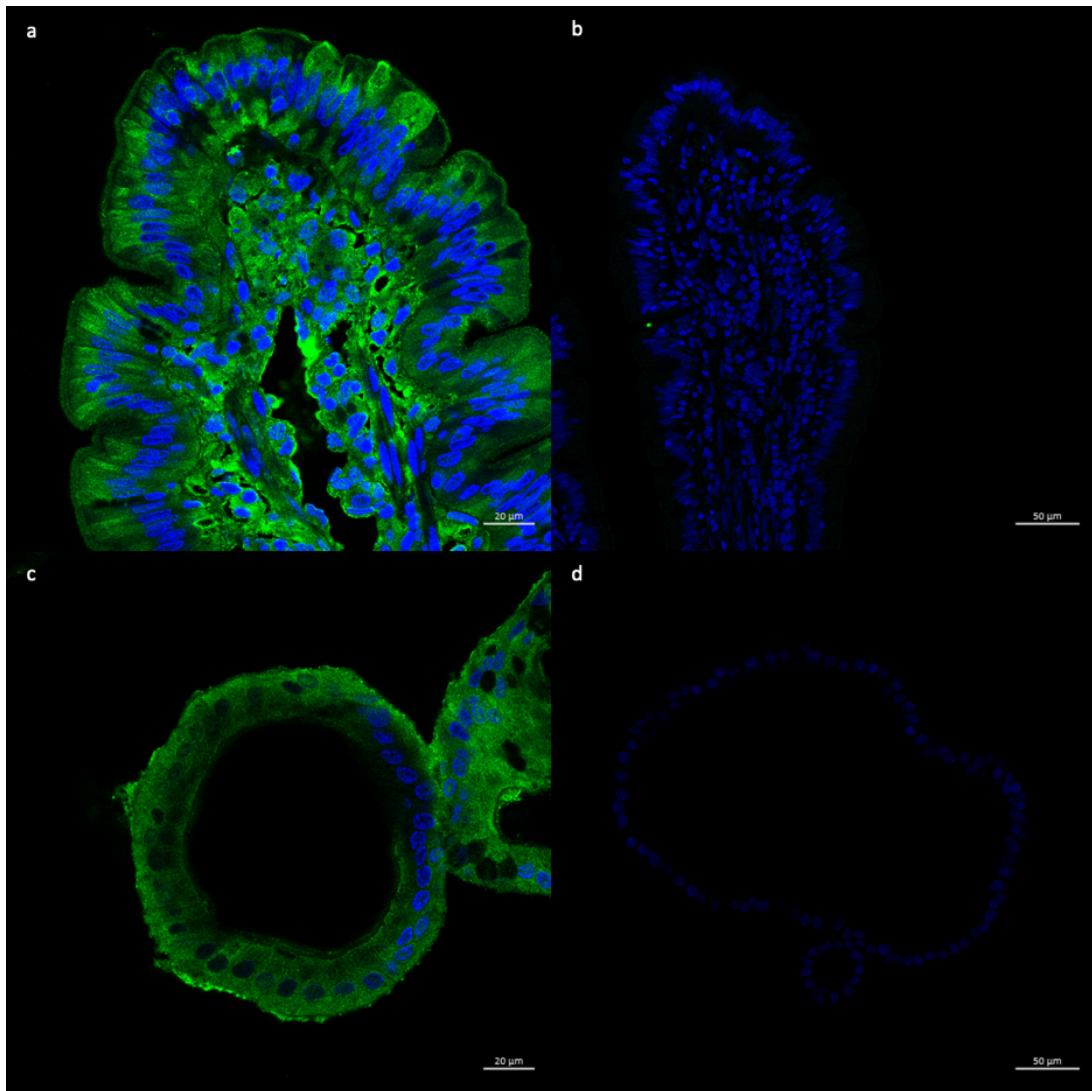


Abb. 6: Konfokalmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen von SGLT-1 (grün) sowie SAKKs: **a** Jejunum, **b** SAKK Jejunum, **c** eqJE DM4, **d** SAKK eqJE PM, die Zellkerne sind blau angefärbt, Maßstabskala **a, c** 20 μm , **b, d** 50 μm

4.1.2 VILLIN

VILLIN wird ebenfalls an der apikalen Zellmembran der Enterozyten exprimiert (4). Abb. 7 zeigt konfokalmikroskopische Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung von VILLIN sowohl im Jejunum als auch in den eqJE. Auf ersten Blick scheint die spezifische Lokalisation von VILLIN weder im nativen Epithel noch in den eqJE an der Bürstensaummembran ausgeprägt zu sein, das Fluoreszenzsignal leuchtet eher diffus im Bereich der Epithelzellen auf (Abb. 7a-e). Betrachtet man aber Abb. 7f sowie 8c, welche ein eqJE aus DM4 zeigen, wird eine apikale Lokalisation von VILLIN deutlich erkennbar. Auch hier zeigen die Kontrollfärbungen (Abb. 8b und d), dass es sich um eine spezifische Bindung des Sekundärantikörpers handeln muss.

Die Zellkerne wurden bei der Detektion dieses Antikörpers in Abbildung 7 nicht mit herausprojiziert, um eine bessere Darstellung des Fluoreszenzsignals von VILLIN zu ermöglichen.

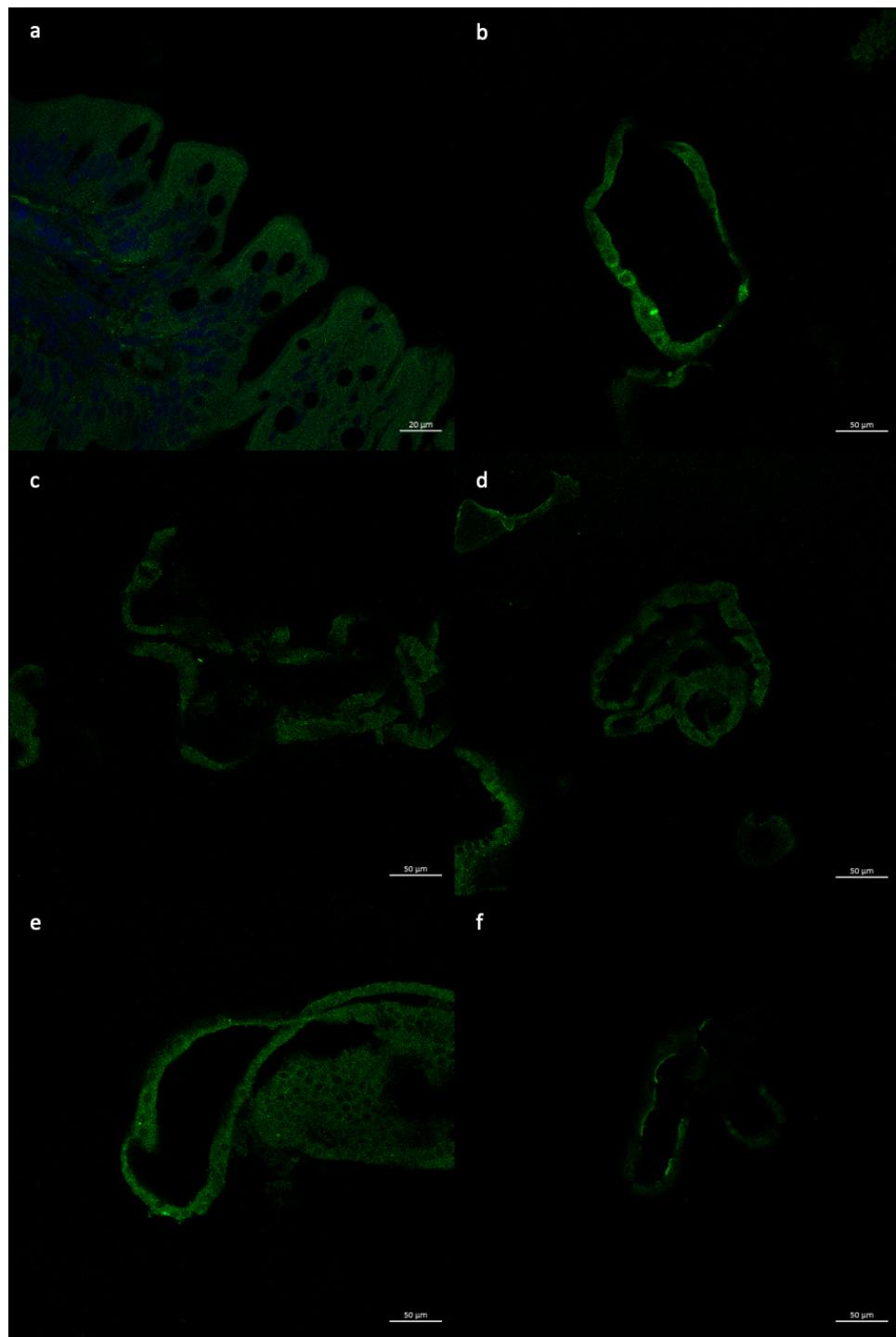


Abb. 7: Konfokalmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen von VILLIN (grün): **a** Jejunum, **b** eqJE PM, **c** eqJE DM1, **d** eqJE DM2, **e** eqJE DM3, **f** eqJE DM4, Maßstabskala **a** 20 µm, **b, c, d, e, f** 50 µm

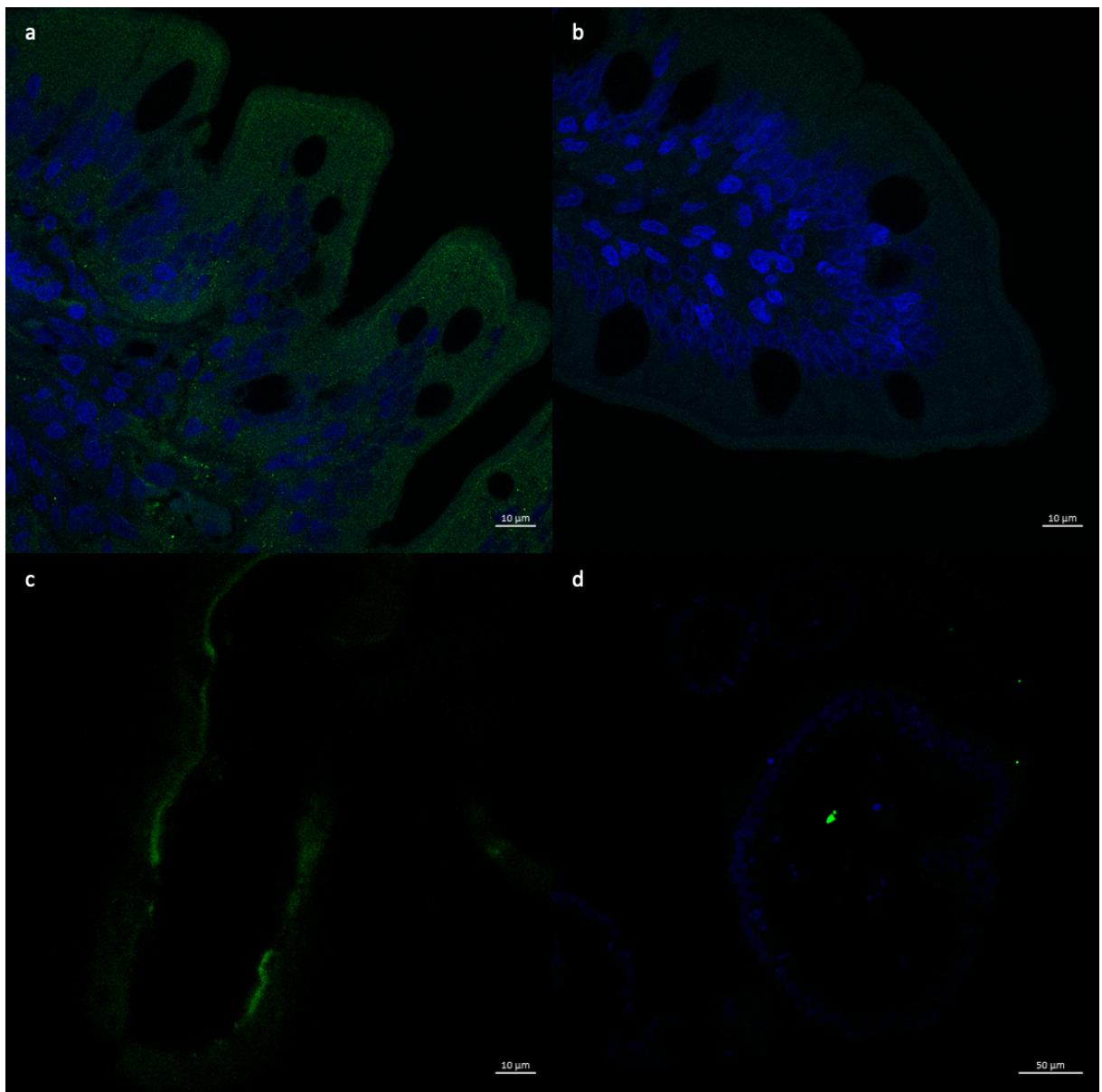


Abb. 8: Konfokalmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen von VILLIN (grün) sowie SAKKs: **a** Jejunum, **b** SAKK Jejunum, **c** eqJE DM4, **d** SAKK eqJE DM2, die Zellkerne sind blau angefärbt, Maßstabskala **a**, **b**, **c** 10 μ m, **d** 50 μ m

4.1.3 CLDN-1

Das Protein CLDN-1 befindet sich zwischen den Epithelzellen an der lateralen Membran (16). Betrachtet man die konfokalmikroskopischen Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen von CLDN-1 sowohl im Jejunum als auch in den eqJE (Abb. 9), fällt auf, dass das Fluoreszenzsignal allgemein sehr schwach erscheint.

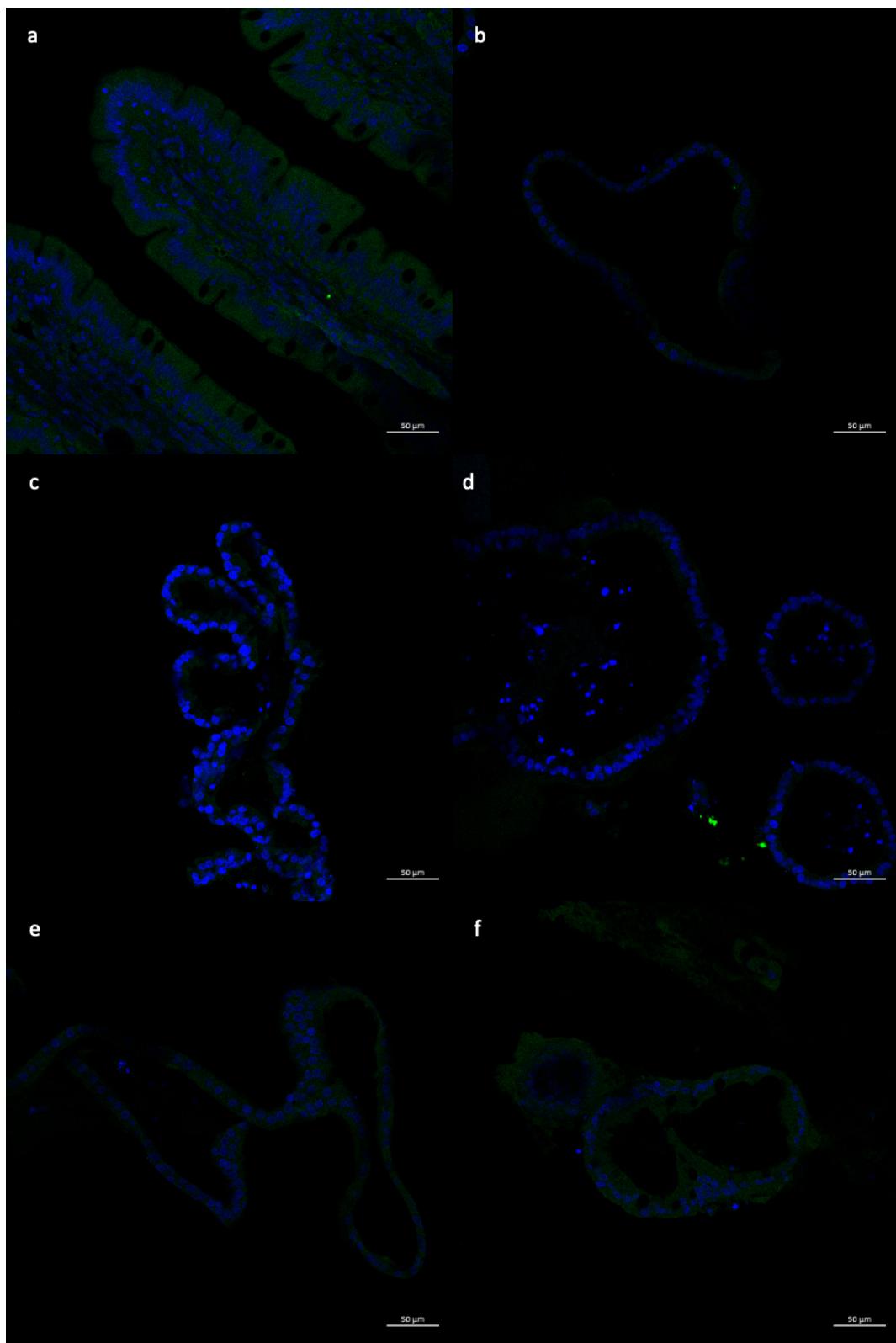


Abb. 9: Konfokalmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen von CLDN-1 (grün): **a** Jejunum, **b** eqJE PM, **c** eqJE DM1, **d** eqJE DM2, **e** eqJE DM3, **f** eqJE DM4, die Zellkerne sind blau angefärbt, Maßstabskala 50 μ m

Lediglich bei Abb. 9a (Jejunum) sowie Abb. 9e und f (eqJE DM3 und DM4) ist ein schwaches grünes Fluoreszenzsignal von CLDN-1 erkennbar. Betrachtet man nun diese in größerer Vergrößerung (Abb. 10) wird deutlich, dass sich das Signal von CLDN-1 in den eqJE ähnlich verhält wie das im nativen Jejunum, jedoch schwächer ausgeprägt ist.

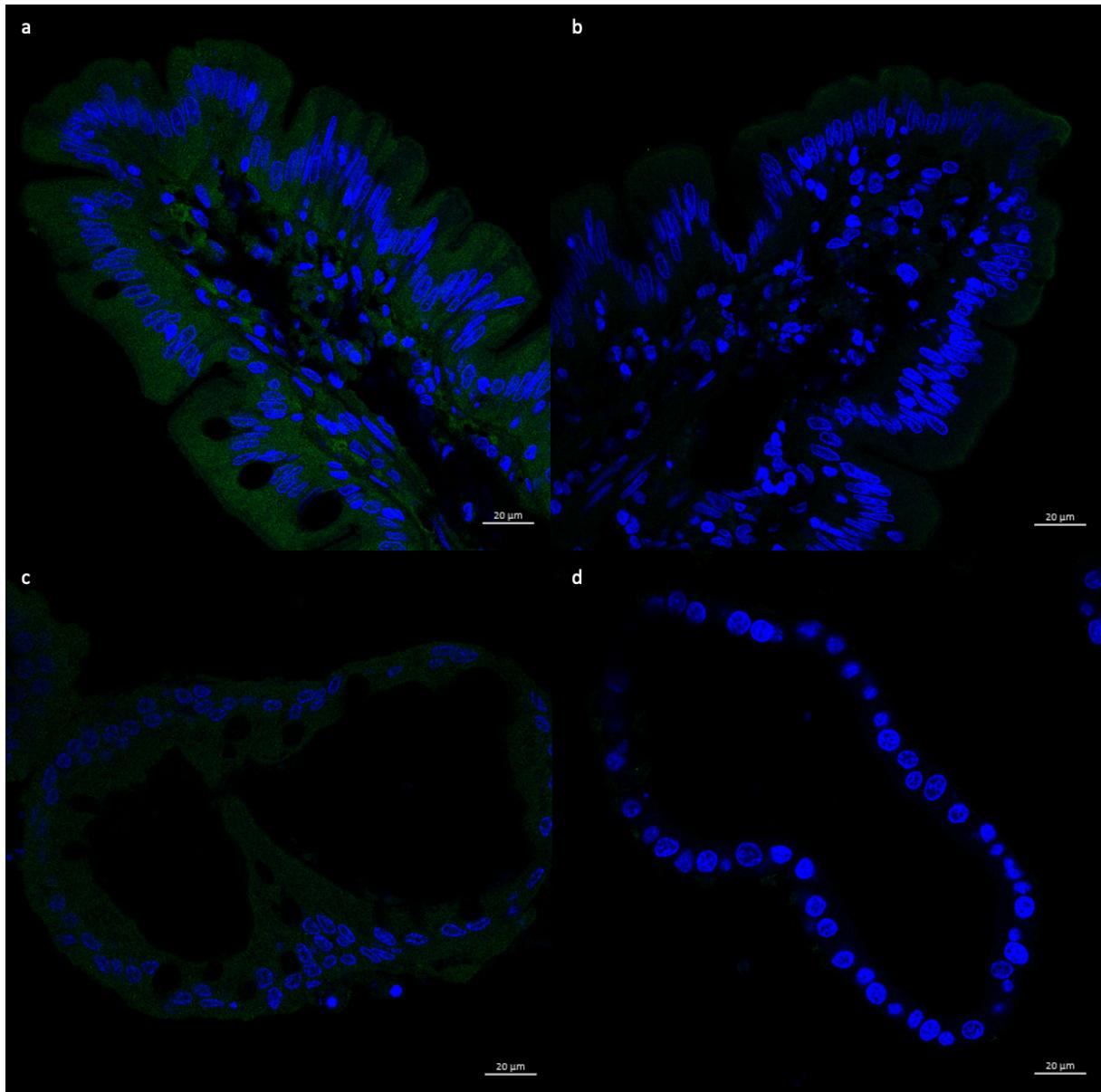


Abb. 10: Konfokalmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen von CLDN-1 (grün) sowie SAKKs: **a** Jejunum, **b** SAKK Jejunum, **c** eqJE DM4, **d** SAKK eqJE PM, die Zellkerne sind blau angefärbt, Maßstabskala 20 μ m

Die Kontrollen (Abb. 10b und d) beweisen erneut die spezifische Bindung des Sekundärantikörpers. Bei der SAKK (Abb. 10b) ist an der Spitze der Zotte an der apikalen Membran ein schwaches unspezifisches Fluoreszenzsignal zu erkennen. Aufgrund der allgemein schwachen Fluoreszenz und der diffusen Farbstoffverteilung ist die Aussagekraft dieser Färbungen allerdings begrenzt und die Spezifität muss hinterfragt werden.

4.2 Western Blot Analyse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Western Blot Analyse dargestellt. Nachdem sich in der Immunfluoreszenzfärbung bereits angedeutet hatte, dass v.a. die stärker wachstumsfaktorreduzierten Medien eine Differenzierung induzieren, wurden diese Versuche nur mit PM, DM3 und DM4 durchgeführt. Wie bereits erwähnt wurde die Expression der Zielproteine auf ACTB normalisiert. Um die Vergleichbarkeit der Proteinexpression der eqJE und des nativen Jejunumepithels zu ermöglichen, sind die Werte prozentual zur nativen Probe angegeben, wobei die Expression des jeweiligen Zielproteins im nativen Jejunumepithel immer gleich 100 % gesetzt und die Expression in den eqJE relativ dazu berechnet wurde. Es wurden immer mindestens drei technische Replikate ($n \geq 3$) durchgeführt, die Anzahl der biologischen Replikate (N) ist in der Legende unter der jeweiligen Abbildung angegeben.

4.2.1 SGLT-1

Abb. 11 zeigt die Ergebnisse der Western Blot Analyse von SGLT-1. Es wird deutlich, dass die Expression in eqJE im PM am höchsten ist und mit 1071,14 % die Expression im nativen Jejunum bei weitem übersteigt. Die Expression von SGLT-1 im DM3 liegt bei 683,58 % und im DM4 bei 274,57 %. Die Menge des Proteins nimmt also von PM über DM3 und DM4 kontinuierlich ab, übersteigt aber weiterhin die Menge im Jejunum. Es liegt ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den eqJE in PM und DM3, nicht aber DM4, zum nativen Jejunumepithel vor ($p = 0,002$, One Way ANOVA + Dunn's test).

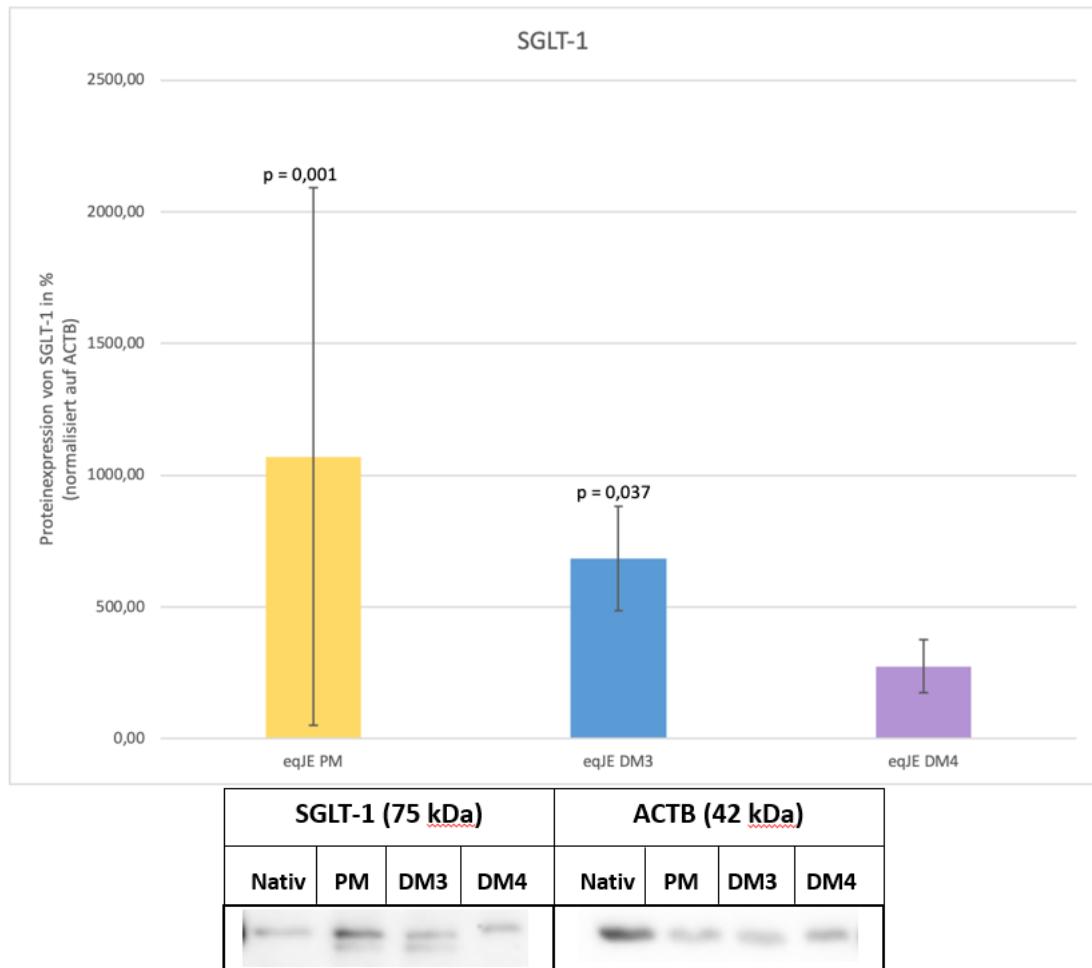


Abb. 11: Proteinexpression von SGLT-1 in den eqJE sowie Ausschnitte repräsentativer Blots von SGLT-1 und ACTB. Nativ = 100 %. N = 6 (nativ, PM)/ 2 (DM3)/ 5 (DM4). One Way ANOVA mit *post hoc* Dunn's-Test.

4.2.2 GLUT-2

Abb. 12 zeigt die Ergebnisse der Western Blot Analyse von GLUT-2. Die mittlere Proteinmenge ist in den eqJE sowohl in PM, DM3 als auch DM4 deutlich höher als im nativen Jejunumepithel. GLUT-2 ist hier in den mit DM3 kultivierten eqJE am höchsten ausgeprägt und liegt bei 6961,55 %. Die Expression von GLUT-2 in eqJE des DM4 liegt bei 4588,44 %, die des PM bei 3925,28 %. Hier liegt ebenfalls ein statistisch signifikanter Unterschied in den eqJE zum nativen Jejunumepithel vor ($p = 0,04$, One Way ANOVA), der zwar im *post hoc* Test (Dunn's) nicht näher einzugrenzen ist, aber jedenfalls nicht in DM4 kultivierte eqJE betrifft.

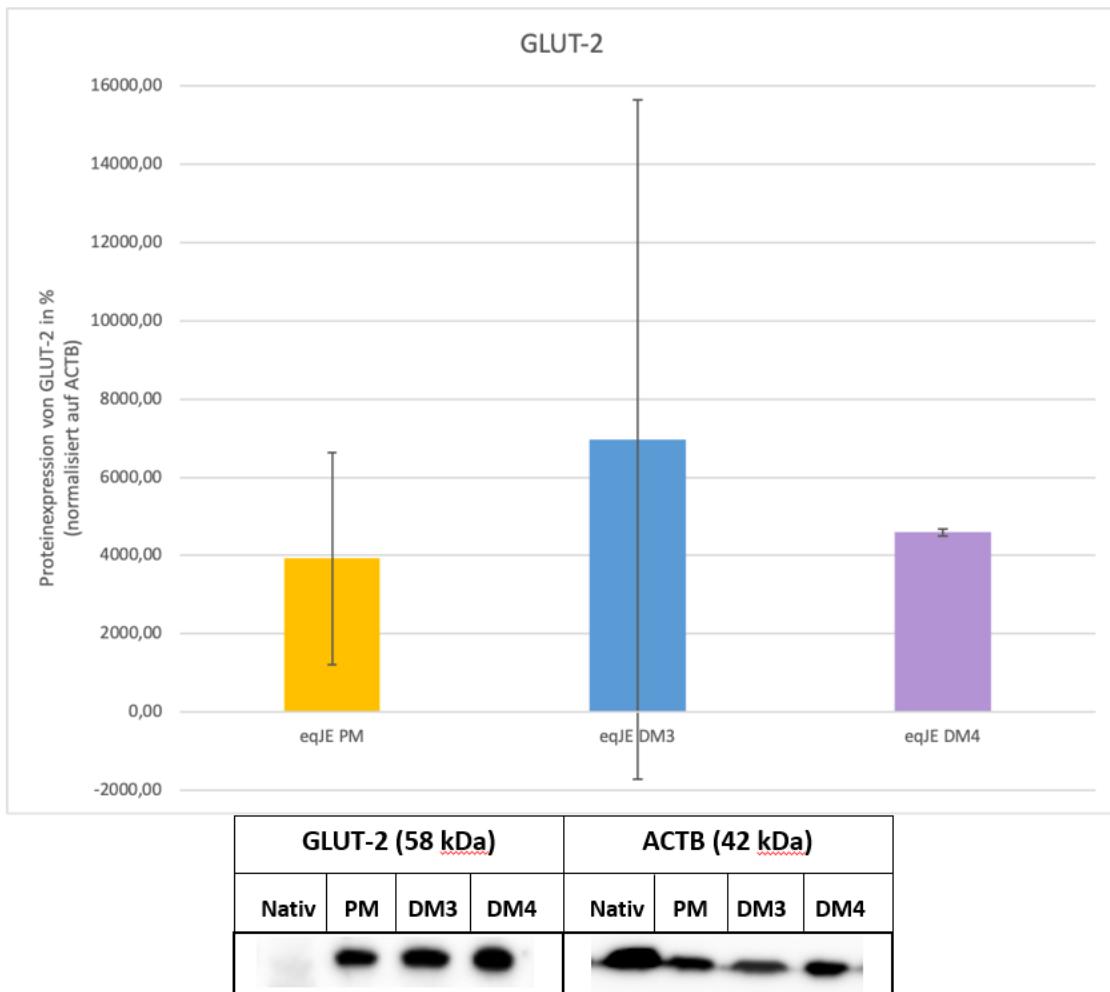


Abb. 12: Proteinexpression von GLUT-2 in den eqJE sowie Ausschnitte repräsentativer Blots von GLUT-2 und ACTB. Nativ = 100 %. N = 4 (nativ, PM)/ 3 (DM3)/ 2 (DM4). One Way ANOVA mit *post hoc* Dunn's-Test.

4.2.3 VILLIN

Abb. 13 zeigt die Ergebnisse der Western Blot Analyse von VILLIN. Im Gegensatz zu den Proteinen SGLT-1 und GLUT-2 ist hier die Expression von VILLIN in den eqJE niedriger als im nativen Jejunumepithel und nimmt von PM zu DM4 hin zu. Die mittlere Proteinmenge von VILLIN der eqJE im PM liegt bei 17,43 %, im DM3 bei 23,81 % und im DM4 bei 44,96 %. Auch hier liegt ein statistisch signifikanter Unterschied vor, der alle eqJE im Vergleich zum Jejunumepithel betrifft ($p < 0,001$, One Way ANOVA + Holm-Sidak-Test).

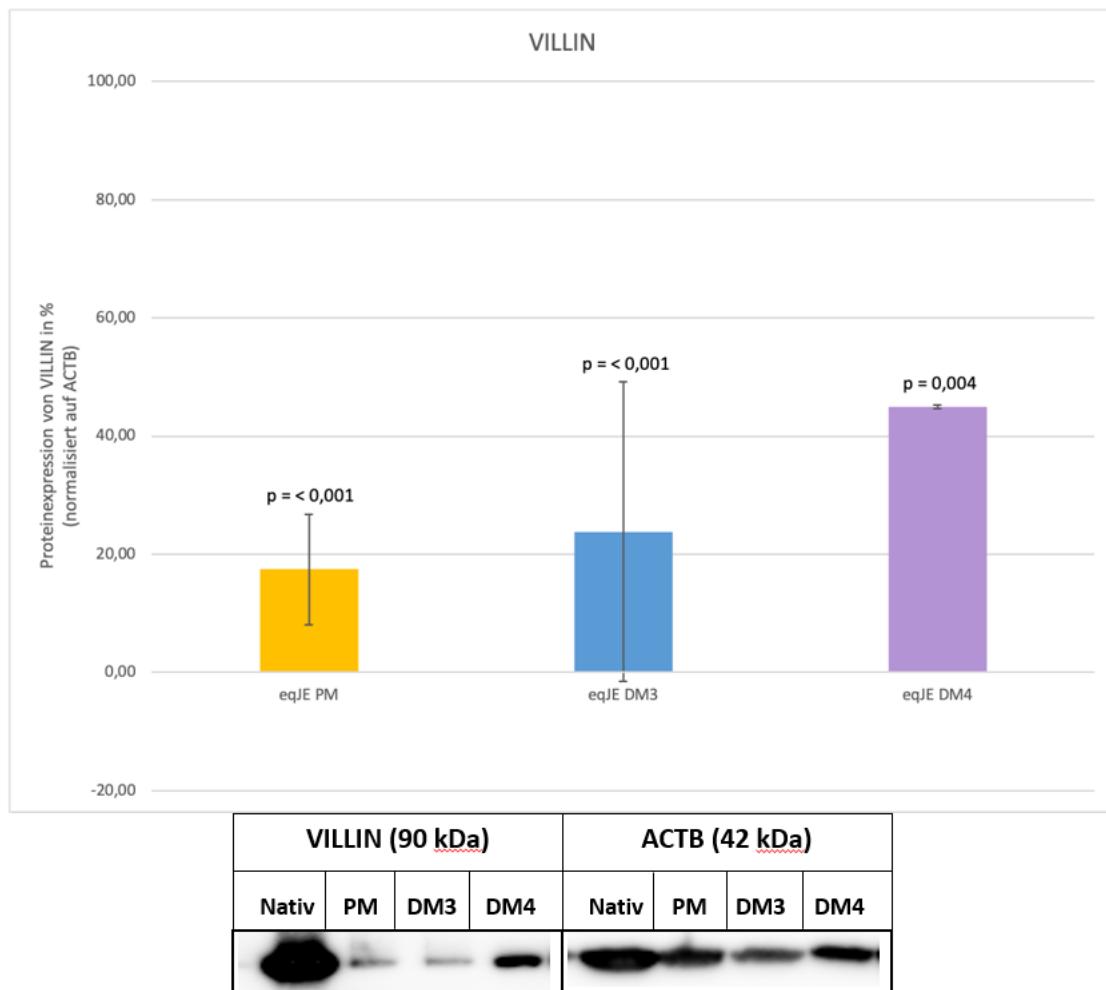


Abb. 13: Proteinexpression von VILLIN in den eqJE sowie Ausschnitte repräsentativer Blots von VILLIN und ACTB. Nativ = 100 %. N = 3 (nativ, PM, DM3)/ 2 (DM4). One Way ANOVA mit post hoc Holm-Sidak-Test.

4.2.4 CLDN-1

Die Proteinexpression von CLDN-1 in den eqJE ist in Abb. 14 ersichtlich. Die mittlere Proteinmenge von CLDN-1 der eqJE im PM liegt bei 106,59 %, im DM3 bei 89,38 % und im DM4 bei 69,65 % vom nativen Jejunumepithel. Statistisch gesehen liegt hier kein signifikanter Unterschied vor ($p = 0,843$, One Way ANOVA).

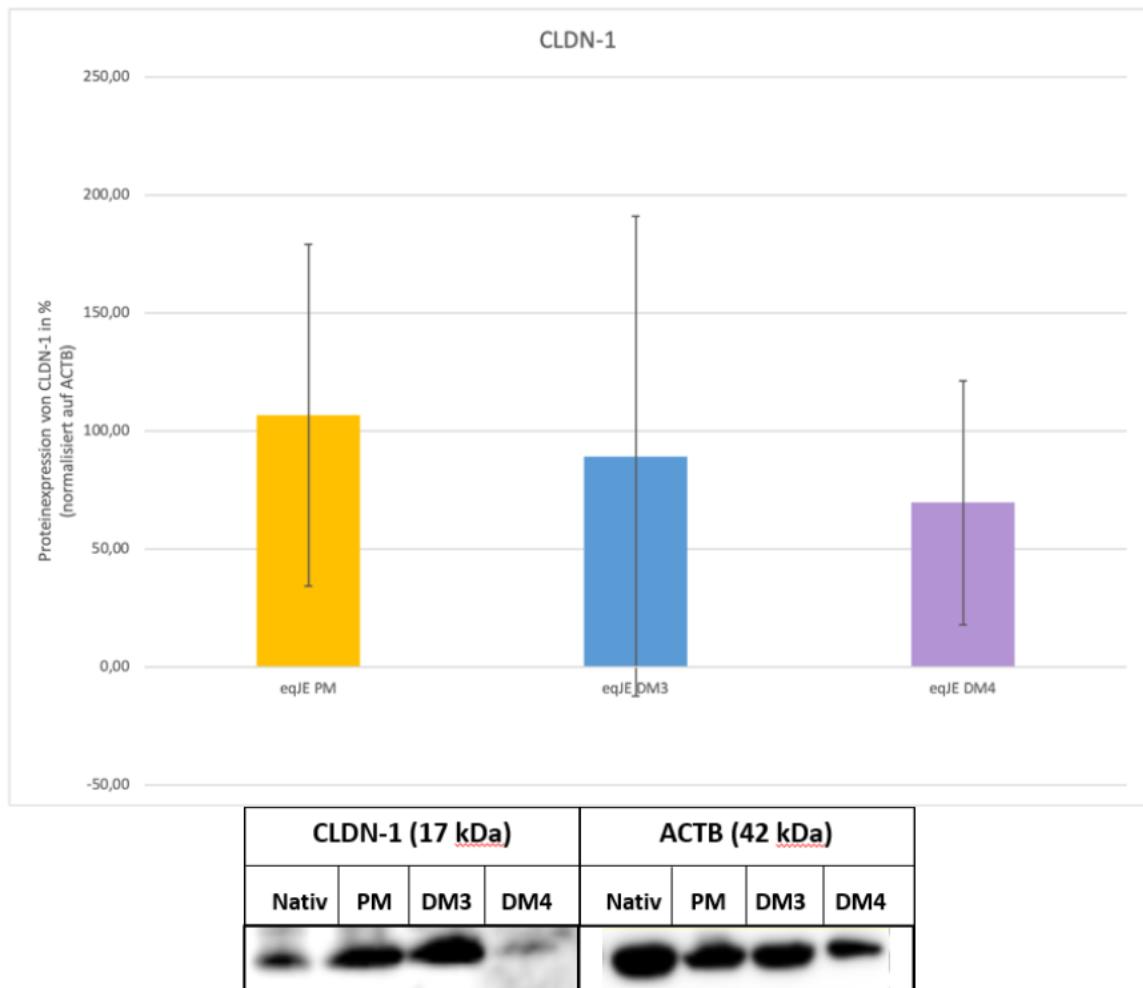


Abb. 14: Proteinexpression von CLDN-1 in den eqJE sowie Ausschnitte repräsentativer Blots von CLDN-1 und ACTB. Nativ = 100 %. N = 6 (nativ, PM)/ 4 (DM3)/ 5 (DM4). One Way ANOVA.

5. Diskussion

Unter Berücksichtigung des 3R-Prinzips wird in der Forschung zunehmend versucht von *in-vivo*-Modellen zu geeigneten *in-vitro*-Modellen überzugehen. Eines dieser neuen *in-vitro*-Modelle ist jenes der Organoide. Da in der Veterinärmedizin die Untersuchung der pathophysiologischen Vorgänge im Darm eines Pferdes bei Koliken eine große Rolle spielt, wird auch in diesem Bereich versucht mit equinen Darmorganoiden ein geeignetes Modell für die Forschung zu etablieren. Ziel dieser Arbeit war es mithilfe von Markerproteinen vergleichend zu untersuchen, ob eqJE das native Jejunumepithel widerspiegeln bzw. welche der Medienkompositionen die beste Ausdifferenzierung der Enterozyten in den eqJE induziert.

Zu diesem Zwecke wurden die Proteine SGLT-1, GLUT-2, VILLIN und CLDN-1 in eqJE aus unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen sowie im nativen Jejunumepithel qualitativ mittels Immunfluoreszenzfärbung und quantitativ mittels Western Blot nachgewiesen. Zu Beginn soll gleich erwähnt werden, dass sich diese beiden Methoden zwar als geeignet herausstellten, aber durchaus auch einige Einschränkungen mit sich bringen. Eine dieser Limitationen liegt im Allgemeinen darin, dass es sich bei den verwendeten Antikörpern (siehe Tab. 1 und 7) um Antikörper handelt, welche nicht gegen das equine Protein, sondern in den meisten Fällen gegen humane oder murine Proteine gerichtet sind (4,5). Um den daraus resultierenden Zweifeln an der Spezifität der Antikörper entgegenzuwirken, wurde ein Sequenz-Alignment (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) für jedes der gesuchten Proteine durchgeführt (25). Hierbei handelt es sich um den Vergleich der humanen Proteinsequenz mit jener Proteinsequenz, welche in dieser Arbeit untersucht wurde (Pferd). Das Sequenz-Alignment ergab folgende Übereinstimmung der Sequenzen zwischen Pferd und Mensch: 87 % bei SGLT-1, 88 % bei GLUT-2, 89 % bei VILLIN und 98 % bei CLDN-1. Diese hohen prozentuellen Übereinstimmungen suggerieren, dass die PAK für die Untersuchung von Proteinen der Spezies *Equus caballus* geeignet sind, auch wenn sie nicht 100 % übereinstimmen und somit einen gewissen Unsicherheitsfaktor mit sich tragen. Zumindest im Western Blot deutet aber die korrekte Bandengröße darauf hin, dass die PAK spezifisch für das Zielprotein sind. Anders stellt sich die Situation bei der Immunfluoreszenzfärbung dar.

Betrachtet man die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen fällt auf, dass eine spezifische und genaue Lokalisation des Fluoreszenzsignals entsprechend des gesuchten Proteins sowohl im Jejunum als auch in den eqJE ist nicht immer eindeutig gegeben ist. Dies kann – neben einer bereits erwogenen mangelhaften Spezifität der PAK – diverse andere

Gründe haben: zum einen ist es möglich, dass das Epithel der eqJE nicht genügend ausdifferenziert ist und noch keine vollständige Polarisierung der Zellen stattgefunden hat. Das würde bedeuten, dass das Protein zwar exprimiert ist, aber die Ausrichtung in der Zelle und damit die Proteinlokalisation noch nicht korrekt ist (26). Ein weiterer Grund könnte sein, dass ein Teil der Proteine bereits am Weg vom Golgi-Apparat zur Bürstensaummembran (im Falle von SGLT-1 und VILLIN) angefärbt wurde, und somit auch an anderen Stellen der Zelle ein Fluoreszenzsignal aussendet (27). Generell ist noch zu erwähnen, dass optimal für die Immunfluoreszenzfärbung Paraffinschnitte wären. Jedoch zeigen Paraffinschnitte des equinen Jejunums eine zu hohe Autofluoreszenz, sodass diese nicht beurteilbar sind, weshalb die Verwendung der Kryoschnitte als nächstbeste Möglichkeit angesehen wird.

Bei Betrachtung der Western Blot Analyse in dieser Arbeit fällt auf, dass die Werte der Proteinexpression in den eqJE teilweise sehr hoch sind und die Proteinexpression im nativen Jejunumepithel bei Weitem übersteigen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass es sich bei den eqJE im Gegensatz zu den nativen Proben um reines Epithel handelt. Beim Prozess des Abpräparierens des Epithels von der *Lamina muscularis* (siehe Kapitel 3.1) ist es beinahe unmöglich, reines Epithel zu ernten, da in den meisten Fällen auch etwas Bindegewebe am Epithel verbleibt. Des Weiteren reifen die eqJE unter artifiziellen Kultivierungsbedingungen mit zugesetzten Wachstumsfaktoren, was eine höhere Proteinexpression erklären könnte. Weiterhin fallen die teilweise hohen Standardabweichungen der Mittelwerte auf, welche die Aussage erschweren. Dies ist einerseits durch die geringe Probenanzahl und andererseits durch die Herkunft der biologischen Replikate aus unterschiedlichen Spendertieren zu erklären und limitiert zwar die Genauigkeit dieser Untersuchung, jedoch nicht die generelle Aussagekraft über das Vorhandensein der Proteine in den eqJE.

Um die Ausdifferenzierung der Enterozyten, und somit die Vergleichbarkeit der eqJE gegenüber dem Jejunumepithel *in vivo* beurteilen zu können, werden im Folgenden die Ergebnisse der einzelnen Proteine diskutiert und in Relation zueinander gesetzt. Die Ergebnisse der Untersuchungen von SGLT-1 beweisen die Expression dieses Proteins in den eqJE. Vorangegangene Studien haben ebenso das Vorhandensein von SGLT-1 in Enteroiden von Schweinen, Kaninchen, Hühnern und Rindern mit der entsprechenden zellulären Lokalisation nachgewiesen (9). Quantitativ betrachtet wird in den eqJE mehr SGLT-1 exprimiert als im nativen Jejunumepithel, was wie oben beschrieben evtl. an der Reinheit des Epithels in den eqJE sowie an den artifiziellen Kultivierungsbedingungen mit Wachstumsfaktoren liegen könnte. Im Falle von SGLT-1 wird deutlich, dass Qualität und Quantität der Proteinexpression nicht immer korrelieren müssen, was sich bei den

verschiedenen Differenzierungsmedien widerspiegelt. Betrachtet man die quantitative Western Blot Analyse ist eindeutig ersichtlich, dass in eqJE im PM am meisten SGLT-1 exprimiert wird und im DM4 am wenigsten. Qualitativ betrachtet hingegen fällt auf, dass das Fluoreszenzsignal in der Bürstensaummembran in eqJE in PM am schwächsten ist und über DM1 bis hin zu DM4 zunimmt. Aber auch in eqJE in DM4 ist die apikale Lokalisation des Proteins nicht eindeutig erkennbar, lediglich an manchen Stellen lässt sich apikal ein stärkeres Fluoreszenzsignal vermuten. Die teilweise vorkommende Bindung des PAKs im Interstitium des nativen Jejunums kann nicht eindeutig zugeordnet werden, da aber bis dato keine SGLT-1 Proteine im Interstitium nachgewiesen wurden, kann man davon ausgehen, dass es sich hier um unspezifische Bindungen handelt. An dieser Stelle muss jedoch erwähnt werden, dass die Herkunft des für die Immunfluoreszenzfärbung verwendeten SGLT-1 Antikörpers fragwürdig ist, da dieser im Gegensatz zu dem bei der Western Blot Analyse verwendeten PAK nicht kommerziell hergestellt wurde. Bei der Western Blot Analyse ist außerdem auffällig, dass die Bande für SGLT-1 nicht wie im Datenblatt des Herstellers beschrieben bei 65 kDa, sondern bei 75 kDa auftritt. Dieses Phänomen wurde aber bereits mehrfach auch von anderen Autoren beschrieben (28,29). Kombiniert man nun die Ergebnisse der Western Blot Analyse mit jener der Immunfluoreszenzfärbung, kann man festhalten, dass in eqJE im DM4 zwar eine geringere Proteinmenge vorliegt als im PM, nicht aber im Vergleich zum nativen Jejunumepithel. Auch qualitativ betrachtet liefern eqJE in DM4 das vielversprechendste Ergebnis in Bezug auf eine Vergleichbarkeit mit dem nativen Jejunumepithel.

Das Transportprotein GLUT-2 wurde lediglich quantitativ mittels Western Blot nachgewiesen, da der Versuch des Anfärbens für die Immunfluoreszenz sowohl im nativen Jejunum als auch den eqJE mit zwei unterschiedlichen PAK ergebnislos war. Um zu einem zufriedenstellenden Ergebnis der Proteinlokalisierung zu kommen, müsste man hier in Zukunft also eine Reihe von verschiedenen, gegen GLUT-2 gerichteten Antikörpern testen, um einen geeigneten zu finden, was im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war. Zudem zeigen verschiedene Untersuchungen, dass die Lokalisation von GLUT-2 einer gewissen Fluktuation unterliegt und durch Stimuli wie die luminaire Glukosekonzentration oder Stressoren von der basolateralen in die apikale Membran verlegt werden kann (30). Daher wäre die Aussagekraft einer qualitativen Untersuchung möglicherweise ohnehin begrenzt. Auch hier ergaben die Ergebnisse der Western Blot Analyse, dass GLUT-2 in allen eqJE exprimiert wird. Die Werte in den eqJE sind deutlich höher als im nativen Gewebe, was wieder auf die bereits im vorangegangenen Absatz beschriebenen Gründe zurückzuführen sein könnte. Im Falle des GLUT-2 scheint der höchste mittlere Wert der Proteinexpression in eqJE in DM3 vorzuliegen, wobei die

Standardabweichung aber sehr hoch ist. Statistisch betrachtet liegt hier ein signifikanter Unterschied zwischen den eqJE und dem nativen Jejunum vor, welcher mit dem *post hoc* Test nicht weiter eingrenzbar war, jedoch die eqJE in DM4 nicht betrifft. Das unterstützt weiterhin die These, dass eqJE in DM4 dem nativen Jejunumepithel am ähnlichsten sind. Insgesamt lässt sich also festhalten, dass die eqJE auf jeden Fall so weit ausdifferenziert sind, dass die wichtigen Glukosetransporter SGLT-1 und GLUT-2 exprimiert sind.

VILLIN verhält sich im Gegensatz zu den Glukosetransportern etwas anders. Quantitativ betrachtet lässt sich feststellen, dass das Protein in den eqJE ausnahmslos geringer exprimiert wird als im nativen Jejunumepithel. Qualitativ hingegen scheint VILLIN insbesondere in eqJE in DM3 und DM4 aber unter den untersuchten Proteinen hinsichtlich Lokalisation und Ausprägung dem nativen Epithel am ähnlichsten zu sein. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung zeigen, dass das Fluoreszenzsignal in den eqJE von PM bis hin zu DM4 immer stärker wird und vor allem die apikale Lokalisation an der Bürstensaummembran der Enterozyten immer deutlicher wird. Im DM4 ist das Fluoreszenzsignal einzig an der Bürstensaummembran zu erkennen. Im Falle des VILLINs korrelieren die Ergebnisse der Western Blot Analyse und der Immunfluoreszenzfärbung also miteinander und zeigen, dass die eqJE des DM4 am weitesten ausdifferenziert sind. Es ist zwar quantitativ betrachtet nicht so viel Protein in den eqJE exprimiert wie im nativen Jejunumepithel, aber dafür ist die Ausrichtung und Lokalisation umso genauer. Der Nachweis von VILLIN wird außerdem auch als Indikator für die Polarisation der Enterozyten in den Organoiden angesehen (9).

Bei der Untersuchung des Proteins CLDN-1 kam es bei der Immunfluoreszenzfärbung nicht zu eindeutig aussagekräftigen Ergebnissen. Das Fluoreszenzsignal ist allgemein sehr schwach, sowohl im nativen Jejunum als auch in den eqJE, wodurch eine korrekte Beurteilung erschwert wird. Im eqJE des DM4 lässt sich ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal erkennen, eine laterale Lokalisation des Tight-Junction-Proteins an den Zellgrenzen ist aber nicht belegbar (16). Da das Fluoreszenzsignal aber im nativen Jejunum ebenso schwach ist und keine laterale Lokalisation erkennbar ist, kann man davon ausgehen, dass das Problem nicht in einer fehlenden Proteinexpression in den eqJE liegt, sondern in der Methodik der Untersuchung. Für eine höhere Aussagekraft müsste man also die Untersuchungen mit einer höheren Probenanzahl wiederholen und evtl. mit anderen PAK arbeiten, um möglicherweise bessere Ergebnisse erzielen zu können. Zur Validierung der Funktionstüchtigkeit des PAK könnte außerdem noch eine Kontrollfärbung mit murinen oder humanen Jejunumproben durchgeführt werden, da der Primärantikörper laut Hersteller für die Detektion des Proteins in

diesen Spezies gezogen ist. Trotzdem beweisen die Ergebnisse der Western Blot Analyse das Vorhandensein des Proteins CLDN-1 in den eqJE, wie auch in vorangegangen Studien bereits epitheliale Zelladhäsionsmoleküle in equinen Organoiden nachgewiesen werden konnten (31). Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den eqJE aller untersuchten Medien und dem nativen Jejunumepithel nachgewiesen werden, was für die Ähnlichkeit der eqJE zum nativen Jejunumepithel spricht.

Betrachtet man nun alle Ergebnisse der verschiedenen Proteine in den eqJE gemeinsam, und versucht somit, das Epithel als Ganzes zu charakterisieren, lassen sich definitiv Parallelen zum nativen Jejunumepithel ziehen. Alle gesuchten Proteine waren in den eqJE, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, nachweisbar. Die Medienkomposition des DM4 scheint am vielversprechendsten zu sein, da hier in den meisten Fällen, vor allem qualitativ betrachtet, die am weitesten fortgeschrittene Ausdifferenzierung der Enterozyten stattgefunden hat. Man kann davon ausgehen, dass eine geringere Expression des gesuchten Proteins bei genauerer Lokalisation auf ein höheres Maß an Ausdifferenzierung hinweist als umgekehrt, da auch die Funktion der Proteine an die korrekte Position innerhalb des Epithels gekoppelt ist (26). Somit ist anzunehmen, dass das Protein VILLIN in den eqJE in DM4 am ehesten funktionstüchtig ist, gefolgt von SGLT-1. Die Proteine GLUT-2 sowie CLDN-1 scheinen zwar ausgeprägt zu sein, die spezifische Lokalisation und damit Funktionstüchtigkeit sind aber fraglich, wobei hier, wie bereits erwähnt, auch andere, nicht mit den eqJE *per se* zusammenhängende, limitierende Faktoren in Betracht gezogen werden müssen.

In dieser Arbeit wurden lediglich die Enterozyten untersucht und als Charakteristika für das Jejunumepithel herangezogen – im Jejunumepithel befinden sich aber selbstverständlich noch andere Zelltypen, die ebenfalls wichtige Funktionen tragen. Einige dieser Zelltypen, nämlich sekretorische enteroendokrine Zellen, Becherzellen und Paneth-Zellen, konnten bereits in einer vorangegangenen Arbeit ebenfalls durch Immunfluoreszenzfärbung in eqJE nachgewiesen werden (5). Außerdem wurde in einer weiteren Studie versucht mit einer anderen Methode als der Immunfluoreszenzfärbung oder Western Blot Analyse eqJE zu charakterisieren, und zwar mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR). Dadurch konnten genetische Marker, die in Darmstammzellen, Paneth-Zellen, proliferativen Zellen, Epithelzellen, enteroendokrinen Zellen, Becherzellen und Bürstenzellen vorkommen, nachgewiesen werden (31). Es wird also deutlich, dass obwohl in dieser Arbeit der Fokus auf die Ausdifferenzierung der Enterozyten gelegt wurde, in den eqJE bereits auch andere für das Jejunumepithel charakteristische Zelltypen nachgewiesen werden konnten.

Durch die vorliegende Arbeit konnte also bestätigt werden, dass eqJE zum Teil das Jejunumepithel *in vivo* widerspiegeln. Wie auch bereits in vorangegangen Studien durch andere Methoden suggeriert wurde, stellen eqJE ein vielversprechendes *in-vitro*-Modell dar, welches zwar noch nicht auf allen Ebenen dem Jejunumepithel *in vivo* gleicht, aber bereits einige wichtige Charakteristika aufweist (5,31). In Zukunft sollte also unbedingt auf diesem Gebiet weiter geforscht werden, um somit im Sinne des 3R-Prinzipes die Tore zu einer möglichst tierversuchsfreien Forschung zu öffnen.

6. Abkürzungsverzeichnis

ACTB	β -Actin
AJC	Apikaler Junctionskomplex
BCA-Assay	Bicinchoninsäure-Assay
CLDN-1	Claudin-1
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DM1	Differenzierungsmedium 1
DM2	Differenzierungsmedium 2
DM3	Differenzierungsmedium 3
DM4	Differenzierungsmedium 4
eqJE	Equine Jejunumenteroide
GLUT-2	Glukosetransporter 2
n	Anzahl technische Replikate
N	Anzahl biologische Replikate
NaCl	Natrium-Chlorid
p	Statistischer Signifikanzwert
PAK	Primärantikörper
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PM	Proliferationsmedium
RIPA-Puffer	Radioimmunpräzipitations-Assay-Puffer
SAKK	Sekundärantikörperkontrolle
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SGLT-1	Na^+ -gekoppelter Glukosetransporter 1
TBST	Tris-gepufferter Salzlösung + Tween
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR

7. Literaturverzeichnis

1. Russell W, Burch R. The Principles of Humane Experimental Technique [Internet]. John Hopkins Bloomberg School of Public Health. 1959 [zitiert 7. Mai 2023]. Verfügbar unter: <https://caat.jhsph.edu/principles/the-principles-of-humane-experimental-technique>
2. Csukovich G, Pratscher B, Burgener IA. The World of Organoids: Gastrointestinal Disease Modelling in the Age of 3R and One Health with Specific Relevance to Dogs and Cats. *Animals*. September 2022;12(18):2461.
3. Curtis L, Burford JH, England GCW, Freeman SL. Risk factors for acute abdominal pain (colic) in the adult horse: A scoping review of risk factors, and a systematic review of the effect of management-related changes. *PLOS ONE*. Juli 2019;14(7):e0219307.
4. Gonzalez LM, Kinnin LA, Blikslager AT. Characterization of discrete equine intestinal epithelial cell lineages. *Am J Vet Res*. April 2015;76(4):358–66.
5. Stewart AS, Freund JM, Gonzalez LM. Advanced three-dimensional culture of equine intestinal epithelial stem cells. *Equine Vet J*. März 2018;50(2):241–8.
6. Buckley A, Turner JR. Cell Biology of Tight Junction Barrier Regulation and Mucosal Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. Januar 2018;10(1):a029314.
7. Blikslager A, Gonzalez L. Equine Intestinal Mucosal Pathobiology. *Annu Rev Anim Biosci*. Februar 2018;6(1):157–75.
8. Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*. Juli 2009;124(1):3–20.
9. Beaumont M, Blanc F, Cherbuy C, Egidy G, Giuffra E, Lacroix-Lamandé S. Intestinal organoids in farm animals. *Vet Res*. Dezember 2021;52(1):33.

10. George SP, Wang Y, Mathew S, Srinivasan K, Khurana S. Dimerization and Actin-bundling Properties of Villin and Its Role in the Assembly of Epithelial Cell Brush Borders. *J Biol Chem.* September 2007;282(36):26528–41.
11. Svitkina TM. Ultrastructure of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* Oktober 2018;54:1–8.
12. Friederich E, Vancompernolle K, Louvard D, Vandekerckhove J. Villin Function in the Organization of the Actin Cytoskeleton. *J Biol Chem.* September 1999;274(38):26751–60.
13. Wang Y, Srinivasan K, Siddiqui MR, George SP, Tomar A, Khurana S. A Novel Role for Villin in Intestinal Epithelial Cell Survival and Homeostasis. *J Biol Chem.* April 2008;283(14):9454–64.
14. Koepsell H. Glucose transporters in the small intestine in health and disease. *Pflüg Arch - Eur J Physiol.* September 2020;472(9):1207–48.
15. Wright EM, Hirayama BA, Loo DF. Active sugar transport in health and disease. *J Intern Med.* Januar 2007;261(1):32–43.
16. Garcia-Hernandez V, Quiros M, Nusrat A. Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation: Intestinal epithelial claudins. *Ann N Y Acad Sci.* Juni 2017;1397(1):66–79.
17. Günzel D, Yu ASL. Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability. *Physiol Rev.* April 2013;93(2):525–69.
18. Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. In: Yong WH, Herausgeber. *Biobanking* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2019 [zitiert 13. Januar 2023]. Verfügbar unter: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-8935-5_26

19. Piña R, Santos-Díaz AI, Orta-Salazar E, Aguilar-Vazquez AR, Mantellero CA, Acosta-Galeana I. Ten Approaches That Improve Immunostaining: A Review of the Latest Advances for the Optimization of Immunofluorescence. *Int J Mol Sci.* Januar 2022;23(3):1426.
20. Paddock SW. Principles and Practices of Laser Scanning Confocal Microscopy. *Mol Biotechnol.* 2000;16(2):127–50.
21. Földes-Papp Z, Demel U, Tilz GP. Laser scanning confocal fluorescence microscopy: an overview. *Int Immunopharmacol.* Dezember 2003;3(13–14):1715–29.
22. Hnasko TS, Hnasko RM. The Western Blot. In: Hnasko R, Herausgeber. *ELISA* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2015 [zitiert 1. Mai 2023]. Verfügbar unter: https://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2742-5_9
23. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, u. a. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* Oktober 1985;150(1):76–85.
24. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* Juli 2012;9(7):671–5.
25. Ye J, McGinnis S, Madden TL. BLAST: improvements for better sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 1. Juli 2006;34:W6–9.
26. Nejsum L N. Epithelial cell surface polarity: the early steps. *Front Biosci.* 2009;Volume(14):1088.
27. Presley JF, Smith C, Hirschberg K, Miller C, Cole NB, Zaal KJM, u. a. Golgi Membrane Dynamics. *Mol Biol Cell.* Juli 1998;9(7):1617–26.
28. Sabolić I, Škarica M, Gorboulev V, Ljubojević M, Balen D, Herak-Kramberger CM. Rat renal glucose transporter SGLT1 exhibits zonal distribution and androgen-dependent gender differences. *Am J Physiol-Ren Physiol.* April 2006;290(4):F913–26.

29. Balen D, Ljubojević M, Breljak D, Brzica H, Žlender V, Koepsell H, u. a. Revised immunolocalization of the $\text{Na}^+ - \text{D}$ -glucose cotransporter SGLT1 in rat organs with an improved antibody. *Am J Physiol-Cell Physiol*. August 2008;295(2):C475–89.
30. Kellett GL, Brot-Laroche E. Apical GLUT2. *Diabetes*. 1. Oktober 2005;54(10):3056–62.
31. Hellman S. Generation of equine enteroids and enteroid-derived 2D monolayers that are responsive to microbial mimics. *Vet Res*. Dezember 2021;52(1):108.

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des Aufbaus von Enterozyten und deren selektiver Permeabilität über zwei Hauptwege (Abb.: Anna Heckl, modifiziert nach Groschwitz 2009 (8))	4
Abb. 2: Schematische Darstellung der Glukosetransporter SGLT-1 und GLUT-2 (Abb.: Anna Heckl, modifiziert nach Koepsell 2020 (14) und Wright 2007 (15))	6
Abb. 3: Schematische Darstellung der intestinalen epithelialen Junctions-Komplexe (Abb.: Anna Heckl, modifiziert nach Buckley und Turner 2018 (6))	8
Abb. 4: eqJE in Kultur, Größenbalken 50 µm (Abb.: Franziska Dengler)	9
Abb. 5: Konfokalmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen von SGLT-1 (grün): a Jejunum, b eqJE PM, c eqJE DM1, d eqJE DM2, e eqJE DM3, f eqJE DM4, die Zellkerne sind blau angefärbt, das Lumen ist mit einem * markiert, Maßstabskala 50 µm	20
Abb. 6: Konfokalmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen von SGLT-1 (grün) sowie SAKKs: a Jejunum, b SAKK Jejunum, c eqJE DM4, d SAKK eqJE PM, die Zellkerne sind blau angefärbt, Maßstabskala a, c 20 µm, b, d 50 µm	21
Abb. 7: Konfokalmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen von VILLIN (grün): a Jejunum, b eqJE PM, c eqJE DM1, d eqJE DM2, e eqJE DM3, f eqJE DM4, Maßstabskala a 20 µm, b, c, d, e, f 50 µm	22
Abb. 8: Konfokalmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen von VILLIN (grün) sowie SAKKs: a Jejunum, b SAKK Jejunum, c eqJE DM4, d SAKK eqJE DM2, die Zellkerne sind blau angefärbt, Maßstabskala a, b, c 10 µm, d 50 µm	23
Abb. 9: Konfokalmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen von CLDN-1 (grün): a Jejunum, b eqJE PM, c eqJE DM1, d eqJE DM2, e eqJE DM3, f eqJE DM4, die Zellkerne sind blau angefärbt, Maßstabskala 50 µm	24

Abb. 10: Konfokalmikroskopische Aufnahmen repräsentativer Immunfluoreszenzfärbungen von CLDN-1 (grün) sowie SAKKs: a Jejunum, b SAKK Jejunum, c eqJE DM4, d SAKK eqJE PM, die Zellkerne sind blau angefärbt, Maßstabskala 20 µm.....	25
Abb. 11: Proteinexpression von SGLT-1 in den eqJE sowie Ausschnitte repräsentativer Blots von SGLT-1 und ACTB. Nativ = 100 %. N = 6 (nativ, PM)/ 2 (DM3)/ 5 (DM4). One Way ANOVA mit post hoc Dunn's-Test.....	27
Abb. 12: Proteinexpression von GLUT-2 in den eqJE sowie Ausschnitte repräsentativer Blots von GLUT-2 und ACTB. Nativ = 100 %. N = 4 (nativ, PM)/ 3 (DM3)/ 2 (DM4). One Way ANOVA mit post hoc Dunn's-Test.....	28
Abb. 13: Proteinexpression von VILLIN in den eqJE sowie Ausschnitte repräsentativer Blots von VILLIN und ACTB. Nativ = 100 %. N = 3 (nativ, PM, DM3)/ 2 (DM4). One Way ANOVA mit post hoc Holm-Sidak-Test.	29
Abb. 14: Proteinexpression von CLDN-1 in den eqJE sowie Ausschnitte repräsentativer Blots von CLDN-1 und ACTB. Nativ = 100 %. N = 6 (nativ, PM)/ 4 (DM3)/ 5 (DM4). One Way ANOVA.....	30

Tab. 1: Protokoll für die Immunfluoreszenzfärbung der einzelnen Proteine.....	11
Tab. 2: Zusammensetzung RIPA-Puffer	14
Tab. 3: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele (Mengenangaben für jeweils ein Gel) .	14
Tab. 4: Zusammensetzung Loading Dye	15
Tab. 5: Zusammensetzung Elektrophoresepuffer	15
Tab. 6: Zusammensetzung Blotting-Puffer	16
Tab. 7: Primär- und Sekundärantikörper Western Blot	17
Tab. 8: Zusammensetzung Waschpuffer (TBST).....	17

9. Anhang

Anhang 1: Zusammensetzung des Proliferationsmediums und der Differenzierungsmedien

Basalmedium besteht aus Advanced DMEM/F12, 10 mM HEPES, 2 mM GlutaMAX™, 100 U/ml Pen/Strep. Wnt- und R-spondin-konditionierte Medien wurden selbst hergestellt. Die übrigen aufgelisteten Chemikalien stammen von der Firma Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) oder der Firma Carl Roth (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland).

Komponente	PM	DM1	DM2	DM3	DM4
Basalmedium	+	+	+	+	+
B-27	1 x	1 x	1 x	1 x	1 x
N-2	1 x	1 x	1 x	1 x	1 x
NAM	10 mM	-	-		
NAC	1 mM	-	-		
A 83-01	500 nM	500 nM	500 nM		
SB 202190	10 µM	10 µM	10 µM		
hGastrin	10 nM	-	-		
hHGF	50 ng/ml	-	-		
mEGF	50 ng/ml	50 ng/ml	50 ng/ml	50 ng/ml	50 ng/ml
CHIR-99021	-	-	2.5 µM		
LY2157299	-	-	500 nM		
hNoggin	100 ng/ml	100 ng/ml	100 ng/ml	100 ng/ml	
Wnt3a c.m.	43 % v/v	43 % v/v	43 % v/v		
R-spo c.m.	10 % v/v	10 % v/v	10 % v/v	10 % v/v	
Gentamicin	20 µg/ml	20 µg/ml	20 µg/ml	20 µg/ml	20 µg/ml
DAPT					5 µM
Y-27632	10 µM	10 µM	10 µM	10 µM	