

Aus dem Institut für Tierhaltung und Tierzucht
der Universität Hohenheim
Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie
(Prof. Dr. R. Claus)

vorgelegt über
Prof. Dr. M. Stangassinger
Institut für Physiologie,
Physiologische Chemie und Tierernährung
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Untersuchungen zur Expression und Lokalisation des epidermalen
Wachstumsfaktors (EGF) und seines Rezeptors (EGFR)
im Intestinaltrakt des Schweines**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Nadine Regina Hennes,
geb. Hengel
aus
Böblingen

München, 2008

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichtersteller:	Univ.-Prof. Dr. Stangassinger
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. Heinritzi

Tag der Promotion: 18. Juli 2008

1.	Einleitung	1
2.	Literaturübersicht	2
2.1	Bedeutung des Darmes für den Gesamtorganismus	2
2.2	Morphologie des Darmes.....	2
2.2.1	Makroskopische Anatomie des Schweinedarmes.....	2
2.2.2	Mikroskopische Anatomie.....	3
2.2.2.1	Feinbau des Dünndarmes.....	5
2.2.2.2	Feinbau des Dickdarmes.....	6
2.2.3	Histologische Aspekte der Darmmukosa und deren Regeneration	7
2.2.3.1	Morphologie der Dünndarmmukosa.....	9
2.2.3.1.1	Enterozyten	9
2.2.3.1.2	Goblet Zellen	10
2.2.3.1.3	Endokrine Zellen	10
2.2.3.1.4	Paneth Zellen	11
2.2.3.1.5	M-Zellen	11
2.2.3.2	Morphologie der Dickdarmmukosa.....	11
2.2.3.2.1	Enterozyten	12
2.2.3.2.2	Gobletzellen.....	12
2.2.3.2.3	Endokrine Zellen	12
2.2.3.2.4	Vakuolisierte Zellen	13
2.3	Morphologische Besonderheiten der fötalen und perinatalen Darmentwicklung	13
2.3.1	Fötale Darmentwicklung	13
2.3.1.1	Makroskopische Entwicklung des Darmes.....	13
2.3.1.2	Mikroskopische Entwicklung des Darmepithels	16
2.3.2	Morphologie des postnatalen Darmes in der Säugezeit bis zum Absetzen von der Muttersau.....	17
2.4	Regulatorische Aspekte der Darmentwicklung	19
2.4.1	Fötale Regulation der Darmentwicklung.....	22
2.4.2	Perinatale Regulation der Darmentwicklung und die Bedeutung des Kolostrums	24
2.4.2.1	Regulation des postnatalen Darmwachstums	24
2.4.2.2	Bedeutung der Kolostralmilchaufnahme für den Neonaten	25
2.4.2.3	Zusammensetzung von Sauenmilch und Kolostrum	25
2.4.2.4	Wirkungen des Kolostrums auf den Darm	27
2.4.3	Aufrechterhaltung des Funktionszustandes im reifen Darm	28
2.4.3.1	Gastrointestinale Peptide	29
2.4.3.2	Luminale Faktoren.....	29
2.4.3.3	Hormonale Signale	30
2.5	Allgemeine Bemerkungen zu den Wachstumsfaktoren.....	32
2.6	Bedeutung des epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)	33

2.6.1	Übersicht über das Vorkommen des EGF beim Schwein und anderen Spezies	33
2.6.2	Eigenschaften des EGF	34
2.6.3	Funktionen	36
2.6.3.1	Übersicht über die Funktionen des EGF	36
2.6.3.2	Funktionen des EGF im Darm	36
2.6.3.3	Wirkungsweise des EGF im Darm	42
2.7	Bedeutung des Rezeptors des epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR)	44
2.7.1	Vorkommen des EGFR im Darm	44
2.7.2	Rezeptoreigenschaften	47
2.7.3	Liganden des EGFR	49
2.8	Hormonale Regulation des EGF- und EGFR-Systems	49
3.	Fragestellung	51
4.	Material und Methoden	52
4.1	Probenherkunft	52
4.1.1	Übersicht über die Versuchstiere	52
4.1.2	Gewinnung der Fötalproben	53
4.1.3.1	Gewinnung der Gewebeproben für die Altersstufen der 9. und 18. Lebenswoche sowie der adulten Tiere	53
4.1.4	Kolostrumversuch	55
4.2	Histologische Techniken	56
4.2.1	Fixierung und Anfertigung der Paraffinschnitte	56
4.2.2	Immuncytochemische Färbung von EGF	56
4.2.3	Immuncytochemische Färbung des EGFR	58
4.2.4	Auswertung der Gewebeschnitte	59
4.3	Molekularbiologie	60
4.3.1	PCR	60
4.3.1.1	Isolierung von RNA aus Darmgewebe	60
4.3.1.2	Quantifizierung und Bestimmung der Qualität der RNA	61
4.3.1.3	Prinzip der Polymerase Kettenreaktion (PCR)	62
4.3.1.4	Reverse Transkription-PCR (RT-PCR)	62
4.3.1.5	Real-time PCR	63
4.3.1.5.1	Prinzip der quantitativen real-time PCR	63
4.3.1.5.2	Durchführung der quantitativen real-time PCR	64
4.3.1.5.3	Spezifität der PCR-Produkte: Schmelzkurvenanalyse, Gelelektrophorese	65
4.3.1.5.4	Datenanalyse	67
4.3.1.5.5	Effizienz	69
4.3.2	Western blot	69
4.3.2.1	Prinzip eines Western blot	69
4.3.2.2	Proteinisolierung	70
4.3.2.3	Proteinquantifizierung	70
4.3.2.4	EGFR-Western blot	71
4.3.2.4.1	SDS-Gelelektrophorese nach Lämmli (1970)	71

4.3.2.4.2	Proteintransfer	72
4.3.2.4.3	Detektion	73
4.3.2.5	EGF-Western blot.....	74
4.3.2.5.1	Tricingel-Elektrophorese nach Schägger und Jagow (1987).....	74
4.3.2.5.2	Proteintransfer	75
4.3.2.5.3	Detektion	75
4.3.3	In situ Hybridisierung des EGFR	76
4.4	Statistik	76
5.	Ergebnisse	77
5.1	Besonderheiten der Morphologie des Intestinaltraktes von Schweineföten.....	77
5.2	Ergebnisse der Expression des EGF	78
5.2.1	Zelluläre Lokalisation der EGF-Bildung.....	78
5.2.2	EGF-Bildung im Intestinaltrakt adulter Schweine	79
5.2.2.1	Immuncytochemische Nachweise	80
5.2.2.1.1	Bildung von EGF in unterschiedlichen Abschnitten des Intestinaltraktes adulter Tiere.....	80
5.2.2.1.2	Bildung von EGF im Zotten- und Kryptensystem adulter Tiere	80
5.2.2.1.2.1	Duodenum	81
5.2.2.1.2.2	Jejunum.....	82
5.2.2.1.2.3	Colon ascendens	85
5.2.2.1.2.4	Colon descendens	85
5.2.2.2	Nachweise auf mRNA-Ebene (PCR) in unterschiedlichen Abschnitten des Intestinaltraktes.....	86
5.2.2.3	Gegenüberstellung der Ergebnisse des EGF-Nachweises auf Proteinebene mit den Ergebnissen auf mRNA-Ebene adulter Tiere	87
5.2.3	Veränderungen der EGF-Expression entlang des Intestinaltraktes während der Ontogenese	87
5.2.3.1	Immuncytochemischer Nachweis.....	87
5.2.3.1.1	Vergleich des prozentualen EGF-Anteils an der Gesamtepithelzellzahl der Hemikrypten plus -zotten zwischen den untersuchten Darmabschnitten.....	88
5.2.3.1.2	Vergleich der Altersgruppen mit den adulten Tieren	88
5.2.3.2	Nachweise auf mRNA-Ebene.....	89
5.2.3.2.1	Vergleich der Expression der mRNA für EGF zwischen den untersuchten Darmabschnitten.....	90
5.2.3.2.2	Vergleich der Expression der mRNA für EGF der Altersgruppen mit den adulten Tieren	90
5.2.3.3	Gegenüberstellung der Ergebnisse des EGF-Nachweises auf Proteinebene mit den Ergebnissen auf mRNA-Ebene.....	91
5.2.4	Veränderungen der EGF-Expression im Zotten- und Kryptensystem während der Ontogenese: Immuncytochemische Untersuchungen	92
5.2.4.1	Bildung von EGF in den Krypten und Zotten	92
5.2.4.2	Bildung von EGF in den Krypten- und Zottenkompartimenten.....	92
5.3	Befunde zur Expression des EGFR	95
5.3.1	Zelluläre Lokalisation der EGFR-Bildung	95
5.3.2	EGFR-Bildung im Intestinaltrakt adulter Schweine.....	96
5.3.2.1	Immuncytochemische Nachweise	96

5.3.2.1.1	Bildung von EGFR in unterschiedlichen Abschnitten des Intestinaltraktes.....	96
5.3.2.1.2	Bildung von EGFR im Zotten- und Kryptensystem.....	96
5.3.2.2	Nachweise auf mRNA-Ebene (PCR) in unterschiedlichen Abschnitten des Intestinaltraktes.....	97
5.3.3	Veränderungen der EGFR-Expression im Verlauf der Ontogenese.....	97
5.3.3.1	Veränderungen entlang des Intestinaltraktes.....	98
5.3.3.1.1	Immuncytochemische Nachweise.....	98
5.3.3.1.2	Nachweise auf mRNA-Ebene.....	98
5.3.3.1.2.1	Vergleich der EGFR-Expression zwischen den Darmabschnitten innerhalb einer Altersgruppe.....	98
5.3.3.1.2.2	Vergleich der EGFR-Expression der untersuchten Altersgruppen mit den adulten Tieren.....	99
5.3.4	Ergebnisse des Proteinnachweises mittels Western blot.....	100
5.4	Einfluß des Kolostrums auf das EGF-System von Neonaten.....	100
5.4.1	Morphologischer Vergleich der Zottenlänge und Kryptentiefe.....	100
5.4.1.1	Duodenum.....	101
5.4.1.2	Jejunum.....	101
5.4.1.3	Colon.....	102
5.4.2	Weitere morphologische Besonderheiten der Neonaten.....	103
5.4.3	Expression des EGF.....	103
5.4.3.1	Bildung von EGF in unterschiedlichen Abschnitten des Intestinaltraktes: Immuncytochemische Nachweise.....	104
5.4.3.1.1	Vergleich des prozentualen Anteils an EGF-positiven Zellen zwischen den untersuchten Darmabschnitten.....	104
5.4.3.1.2	Vergleich des prozentualen Anteils an EGF-positiven Zellen zwischen den Neonaten mit und ohne Kolostrum.....	105
5.4.3.2	Bildung von EGF in unterschiedlichen Abschnitten des Intestinaltraktes: Nachweise auf mRNA-Ebene.....	105
5.4.3.2.1	Vergleich der Expression der mRNA für EGF zwischen den Darmabschnitten innerhalb einer Gruppe.....	106
5.4.3.2.2	Vergleich der Expression der mRNA für EGF zwischen den Neonaten mit und ohne Kolostrum.....	106
5.4.3.3	Gegenüberstellung der Ergebnisse des EGF-Nachweises auf Proteinebene mit den Ergebnissen auf mRNA-Ebene.....	107
5.4.3.4	Bildung von EGF im Krypten- und Zottensystem: Immuncytochemische Nachweise.....	107
5.4.3.4.1	Duodenum.....	107
5.4.3.4.2	Jejunum.....	108
5.4.3.4.3	Zusammenfassung der Befunde im Duodenum und Jejunum.....	109
5.4.3.5	Bildung von EGF in den Krypten- und Zottenkompartimenten: Immuncytochemische Nachweise.....	110
5.4.4	Expression des EGFR.....	111
5.4.4.1	Bildung von EGFR in unterschiedlichen Abschnitten des Intestinaltraktes: Immuncytochemische Nachweise.....	112
5.4.4.2	Bildung von EGFR in unterschiedlichen Abschnitten des Intestinaltraktes: Nachweise auf mRNA-Ebene.....	112
5.4.4.2.1	Vergleich der Expression der mRNA für EGFR zwischen den untersuchten Darmabschnitten.....	112
5.4.4.2.2	Unterschiede der mRNA-Expression für EGFR zwischen den Neonaten mit und ohne Kolostrum.....	113

5.4.4.3	Bildung von EGFR in unterschiedlichen Abschnitten des Intestinaltraktes: Nachweise auf Proteinebene mittels Western blot	113
5.5	Fotographische Darstellung der nachgewiesenen Parameter	115
5.5.1	EGF	115
5.5.2	EGFR	116
6.	Diskussion	117
6.1	Morphologische Befunde im Colon ascendens der Föten	117
6.2	Altersabhängige Expression des EGF und EGFR	117
6.2.1	EGF	117
6.2.2	EGFR	119
6.3	Zum Vorkommen des EGF und EGFR in den verschiedenen Darmabschnitten	119
6.3.1	EGF	119
6.3.2	EGFR	120
6.4	Zum Vorkommen des EGF und EGFR innerhalb der Krypten und Zotten....	121
6.4.1	EGF	121
6.4.1.1	Unterschiede zwischen Krypten und Zotten im Duodenum und Jejunum	121
6.4.1.2	Expressionsmuster in den Zotten- und Kryptenkompartimenten	122
6.4.1.3	Föten	123
6.4.2	EGFR	123
6.4.2.1	Expression in den Krypten und Zotten	123
6.5	Zur Expression des EGF und EGFR bei Neonaten in Abhängigkeit zur Aufnahme von Kolostrum	124
6.5.1	EGF	124
6.5.2	EGFR	125
6.6	Einflüsse des Kolostrums auf die Morphologie des Darmes	125
7.	Zusammenfassung	127
8.	Summary	129
9.	Anhang	131
10.	Literaturverzeichnis	139

Abkürzungen

AB-Komplex	Avidin-Biotin-Komplex
ANOVA	Analysis of variance
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	Amphiregulin
Asc	Colon ascendens
AT	Annealing-Temperatur
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
BTC	Betacellulin
cDNA	Complementary Desoxyribonukleinsäure
Ct	Threshold cycle
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Desc	Colon descendens
DMSO	Dimethylsulfoxide
DTT	1,4 Dithio-DL-threitol
Duo	Duodenum
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat,
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktor
EPI	Epigen
EPR	Epiregulin
FGF	Fibroblast Growth Faktor
GH	Wachstumshormon
GIT	Gastrointestinaltrakt
GW	Graviditätswoche
HB-EGF	Heparin-binding EGF like growth factor
HKG	Housekeeping gene
HMW-EGF	High molecular weight-EGF
HRP	Horseradish peroxidase
IGF's	Insulin like growth factors

IVF	In vitro fertilization
Jej	Jejunum
LW	Lebenswoche
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
ms	Multispecies
MW	Mittelwert
N ₂ O	Lachgas
NeoGlc	Neonaten ohne Kolostrum
NeoKol	Neonaten mit Kolostrum
NTC	Non template control
O ₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
ODC	Ornithin Decarboxylase
p	Porcine
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet derived growth factor
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute [1rpm=1(60s) ⁻¹]
RT-PCR	Reverse Transkriptions – PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard error of the mean / Standardfehler
T ₃ /T ₄	Triiodthyronin/Thyroxin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- α / β	Transforming growth factor- α / β
T _m	Spezifische Schmelztemperatur
TPE	Totale parenterale Ernährung
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UQ	Ubiquitin
WF	Wachstumsfaktoren
SCNT	Somatic cell nuclear transfer

Abbildungsverzeichnis	Seite
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Gastrointestinaltraktes beim Schwein.....	3
Abbildung 2.2: Längsschnitt durch die Wand des Darmes am Beispiel des Duodenums.....	5
Abbildung 2.3: Längsschnitt durch die Wand des Duodenums, Jejunums und Ileums.....	6
Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Schleimhaut des Colons.....	7
Abbildung 2.5: Darstellung der unterschiedlichen Kompartimente im Dün- und Dickdarm.....	8
Abbildung 2.6: Schematische Darstellungen der fötalen Darmentwicklung.....	15
Abbildung 2.7: Übersicht des Zellzyklus und die Wirkung von Kompetenz- und Progressionsfaktoren.....	21
Abbildung 2.8: Darstellung der indirekten GH-Wirkungen.....	31
Abbildung 2.9: Schematische Darstellung endokriner, parakriner, autokriner, intrakriner und juxtakriner Wirkungswege.....	33
Abbildung 2.10: Struktur des murinen EGF.....	35
Abbildung 2.11: Übersicht zu den verschiedenen Funktionen des EGF.....	37
Abbildung 2.12: Schematische Darstellung des EGFR.....	48
Abbildung 4.1: Entnahmestellen der Gewebeproben.....	55
Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der indirekten Avidin-Biotin-Methode.....	57
Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der Auswertung der immunocytochemischen Färbung des EGF.....	60
Abbildung 4.4: Beispielhafte Darstellung einer Schmelzkurve.....	66
Abbildung 4.5: Darstellung der Gelelektrophorese.....	67
Abbildung 4.6: Schematische Darstellung einer Amplifikationskurve.....	67
Abbildung 5.1: Bilder des Colon ascendens der 10., 13. und 15. Graviditätswoche.....	77
Abbildung 5.2: Anzahl der Epithelzellen der Hemikrypten plus -zotten im Jejunum und Colon ascendens der 10., 13. und 15. Graviditätswoche.....	78
Abbildung 5.3: Repräsentative Bilder der zellulären Lokalisation des EGF.....	79

Abbildung 5.4:	Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Gesamtepithelzellzahl der Hemikrypten plus -zotten der untersuchten Darmabschnitte adulter Tiere mit tabellarischer Darstellung der Signifikanzen...	80
Abbildung 5.5:	Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Epithelzellzahl der Hemikrypten bzw. -zotten des Duodenum adulter Tiere.....	81
Abbildung 5.6:	Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Epithelzellzahl der Kompartimente der Hemikrypten und -zotten des Duodenum adulter Tiere.....	82
Abbildung 5.7:	Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Epithelzellzahl der Hemikrypten bzw. -zotten des Jejunum adulter Tiere.....	83
Abbildung 5.8:	Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Epithelzellzahl der Kompartimente der Hemikrypten und -zotten des Jejunum adulter Tiere.....	84
Abbildung 5.9:	Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Epithelzellzahl der Kompartimente des Colon ascendens adulter Tiere.....	85
Abbildung 5.10:	Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Epithelzellzahl der Kompartimente des Colon descendens adulter Tiere.....	86
Abbildung 5.11:	Repräsentative Bilder der zellulären Lokalisation des EGFR.....	96
Abbildung 5.12:	Darstellung des EGFR-Western blot der 9. Lebenswoche und der adulten Tiere.....	100
Abbildung 5.13:	Vergleich der Anzahl an Epithelzellen der Hemikrypten und -zotten des Duodenum zwischen Neonaten mit und ohne Kolostrum.....	101
Abbildung 5.14:	Vergleich der Anzahl an Epithelzellen der Hemikrypten und -zotten des Jejunum zwischen Neonaten mit und ohne Kolostrum.....	102
Abbildung 5.15:	Vergleich der Anzahl an Epithelzellen der Hemikrypten des Colon ascendens und Colon descendens zwischen Neonaten mit und ohne Kolostrum.....	102
Abbildung 5.16:	Darstellung der Zottenrückbildung im Colon.....	103
Abbildung 5.17:	Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Epithelzellzahl der Hemikrypten bzw. -zotten des Duodenum der Neonaten mit und ohne Kolostrum.....	108

Abbildung 5.18:	Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Epithelzellzahl der Hemikrypten bzw. -zotten des Jejunums der Neonaten mit und ohne Kolostrum.....	109
Abbildung 5.19:	Darstellung des EGFR-Western blot der Neonaten.....	114
Abbildung 5.20:	Repräsentative Bilder der immuncytochemischen Färbung des EGF.....	115
Abbildung 5.21:	Repräsentative Bilder der immuncytochemischen Färbung des EGFR.....	116

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 2.1: Zellpopulationen des Darmepithels.....	8
Tabelle 2.2: Darstellung von Wachstumsfaktoren, die den Zellzyklus beeinflussen.....	22
Tabelle 2.3: Bestandteile der Sauenmilch.....	26
Tabelle 2.4: Konzentrationen (ng/ml) der Wachstumsfaktoren und Hormone im Kolostrum und in der reifen Sauenmilch.....	27
Tabelle 2.5: Hormonale Wirkungen auf die Gehalte des EGF- und EGFR- Systems bei Nagern.....	50
Tabelle 4.1: Verwendete Primer und ihre Eigenschaften.....	65
Tabelle 4.2: Darstellung der Steigung, Effizienz und Regression für die verschiedenen Primer.....	69
Tabelle 4.3: Zusammensetzung des Tricingels.....	75
Tabelle 5.1: Δ ct-Werte der mRNA für EGF der untersuchten Darmabschnitte adulter Tiere.....	86
Tabelle 5.2: Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Gesamtepithelzellzahl der Hemikrypten plus -zotten der untersuchten Darmabschnitte der Fötalstadien, der 9. und 18. Lebenswoche sowie der adulten Tiere.....	88
Tabelle 5.3: Δ ct-Werte der mRNA für EGF der untersuchten Darmabschnitte der Fötalstadien, der 9. Lebenswoche sowie der adulten Tiere.....	90
Tabelle 5.4: Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Epithelzellzahl der Hemikrypten bzw. -zotten des Duodenums und Jejunums der 9. und 18. Lebenswoche sowie der adulten Tiere.....	92
Tabelle 5.5: Anteil EGF-positiver Gobletzellen (%) an der Epithelzellzahl der Kompartimente der Hemizotten des Duodenums und Jejunums der 9. und 18. Lebenswoche sowie der adulten Tiere.....	93
Tabelle 5.6: Anteil EGF-positiver-Zellen (%) an der Epithelzellzahl der Kompartimente der Hemikrypten des Duodenums und Jejunums der 9. und 18. Lebenswoche sowie adulter Tiere.....	94

Tabelle 5.7:	Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Epithelzellzahl der Kompartimente der Hemikrypten des Colon ascendens und Colon descendens der 9. und 18. Lebenswoche sowie adulter Tiere.....	94
Tabelle 5.8:	Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Epithelzellzahl der Kompartimente der Hemizotten des Jejunums und Colon ascendens der Föten.....	95
Tabelle 5.9:	Δ ct-Werte der mRNA für EGFR der untersuchten Darmabschnitte adulter Tiere.....	97
Tabelle 5.10:	Δ ct-Werte der mRNA für EGFR der untersuchten Darmabschnitte der drei Fötalstadien, der 9. Lebenswoche und adulter Tiere.....	98
Tabelle 5.11:	Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Gesamtepithelzellzahl der Hemikrypten plus –zotten der untersuchten Darmabschnitte der Neonaten mit und ohne Kolostrum.....	104
Tabelle 5.12:	Δ ct-Werte der mRNA für EGF der untersuchten Darmabschnitte der Neonaten mit und ohne Kolostrum.....	105
Tabelle 5.13:	Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Epithelzellzahl der Kompartimente der Hemizotten des Duodenums und Jejunums der Neonaten mit und ohne Kolostrum.....	110
Tabelle 5.14:	Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Epithelzellzahl der Kompartimente der Hemikrypten des Duodenums und Jejunums der Neonaten mit und ohne Kolostrum.....	111
Tabelle 5.15:	Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Epithelzellzahl der Kompartimente der Hemikrypten des Colon ascendens und Colon descendens der Neonaten mit und ohne Kolostrum.....	111
Tabelle 5.16:	Δ ct-Werte der mRNA für EGFR der untersuchten Darmabschnitte der Neonaten mit und ohne Kolostrum.....	112

1. Einleitung

Der Darm ist ein Hohlorgan, das mit seiner enormen luminalen Oberfläche im engen Kontakt mit der Nahrung und somit der Außenwelt steht. Dies betrifft auch eine Vielzahl von exogenen Noxen und Antigenen. Aus diesem Grund ist die intakte Integrität der Darmmukosa als Schranke von besonderer Bedeutung. Die Integrität der Mukosa wird durch die hohe Zell-Turnoverrate des Darmepithels aufrechterhalten, wobei die grundlegenden Prinzipien, nämlich Stammzellmitosen und Apoptosen einer sorgfältigen Kontrolle unterliegen.

Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) ist ein Mitogen, das an dieser Funktion wesentlich beteiligt ist. EGF stimuliert die Proliferation sowie die Differenzierung von epithelialeem Gewebe (Cohen, 1965) und durch seine Funktion als Survivalfaktor greift EGF auch in die Apoptose ein. EGF scheint beim Schwein vorrangig durch Gobletzellen gebildet zu werden (Claus et al., 2001) und bildet zusammen mit dem Mukus eine Schutzschicht über die Mukosa. EGF spielt auch eine Rolle bei der perinatalen Darmentwicklung und wird dem Neonaten zusätzlich in hoher Konzentration über das Kolostrum zur Verfügung gestellt.

Da beim Schwein keine systematischen Untersuchungen zur Expression von EGF und seines Rezeptors im Darm existieren, soll die vorliegende Arbeit einen Einblick in dieses Thema geben. Im Literaturteil soll zunächst allgemein auf die Morphologie, Regeneration und Entwicklung des Darmes sowie auf die Regulation dieser Vorgänge eingegangen werden. Anschließend sollen die Erkenntnisse über das EGF- und EGFR-System dargestellt werden.

2. Literaturübersicht

2.1 Bedeutung des Darmes für den Gesamtorganismus

Beim Verdauungsapparat handelt es sich um ein komplexes Organsystem mit verschiedenen Funktionen bezüglich der Wasser- und Nährstoffbereitstellung. Die Nahrungsaufnahme ist der einzige Weg über den der Körper die notwendigen Nährstoffe beziehen kann. Dazu wird die Nahrung soweit in ihre Bestandteile zerlegt, dass eine Resorption durch das Darmepithel in den Organismus erfolgen kann. Neben der Verdauungsfunktion hat der Darm auch eine wichtige Barrierefunktion gegenüber einer Vielzahl von exogenen Noxen und Antigenen. Bedingt durch seine enorme Oberfläche ist die Angriffsfläche insbesondere für Mikroorganismen sehr hoch. Neben der mechanischen Integrität der Darmmukosa besitzt der Darm sowohl unspezifische als auch spezifische Schutzmechanismen wie z.B. die mechanische Barriere durch tight junctions zwischen den Mukosazellen (Darm-Blut-Schranke), die zelluläre Immunabwehr, die Antikörperproduktion und die Schleimbildung der Gobletzellen. Bedingt durch das aggressive Milieu des Darminhaltes (Chymus) weist das Darmepithel eine hohe Zell-Turnoverrate auf, um die Barrierefunktion aufrechterhalten zu können. So wird das gesamte Darmepithel durch kontinuierliche Zellerneuerung etwa alle drei Tage ersetzt. Auch als endokrines Organ spielt der Darm eine wichtige Rolle, so dass er eine Reihe gastrointestinaler Hormone und Wachstumsfaktoren bildet, die nicht nur die Darmfunktion steuern, sondern auch der Aufrechterhaltung einer intakten Mukosa dienen. Zudem sind intestinale Hormone wesentlich an der Stoffwechselregulation beteiligt.

2.2 Morphologie des Darmes

2.2.1 Makroskopische Anatomie des Schweinedarmes

Der Aufbau des Gastrointestinaltraktes ist in Abbildung 2.1 schematisch dargestellt. Das Darmkonvolut lässt sich in Dünndarm und Dickdarm gliedern. Der Dünndarm ist in die drei Abschnitte Duodenum, Jejunum und Ileum unterteilt. Dem Magenausgang folgt das Duodenum, welches beim Schwein etwa 70 – 95 cm lang ist. Das kraniale Ende der Plica duodenocolica markiert den Beginn des längsten Dünndarmabschnittes, dem Jejunum. Das Jejunum ist beim Schwein etwa 14 – 19 m lang und hängt in zahlreichen Schlingen an einer Gekröseplatte. Dem Jejunum folgt der letzte Dünndarmabschnitt - das Ileum. Dieses wird durch die Plica ileocaecalis definiert. Dieser Darmabschnitt misst beim Schwein etwa

70 – 100 cm und mündet an der Grenze des Caecum zum Colon ascendens in den Dickdarm. Das blind endende Caecum stellt einen stumpf-kegelförmigen Sack mit drei charakteristischen Tänen dar. Seine Länge beträgt etwa 30 – 40 cm. Dem Caecum folgt das Colon ascendens, der sogenannte Kolonkegel. Dies ist der längste Dickdarmabschnitt beim Schwein. Die Schlingen des Colon ascendens sind zu einer Spirale aufgerollt, wobei sie als Gyri centripetales in Richtung Kegelspitze ziehen, hier umdrehen und innerhalb des Kegels von der Spitze als Gyri centrifugales zur Kegelbasis laufen und anschließend ins kurze Colon transversum übergehen. Das Colon transversum befindet sich vor der kranialen Gekrösewurzel und geht ins Colon descendens über, welches im Rektum endet. Der gesamte Dickdarm misst beim Schwein etwa 3,5 – 6 m (Vollmerhaus & Roos, 1999).

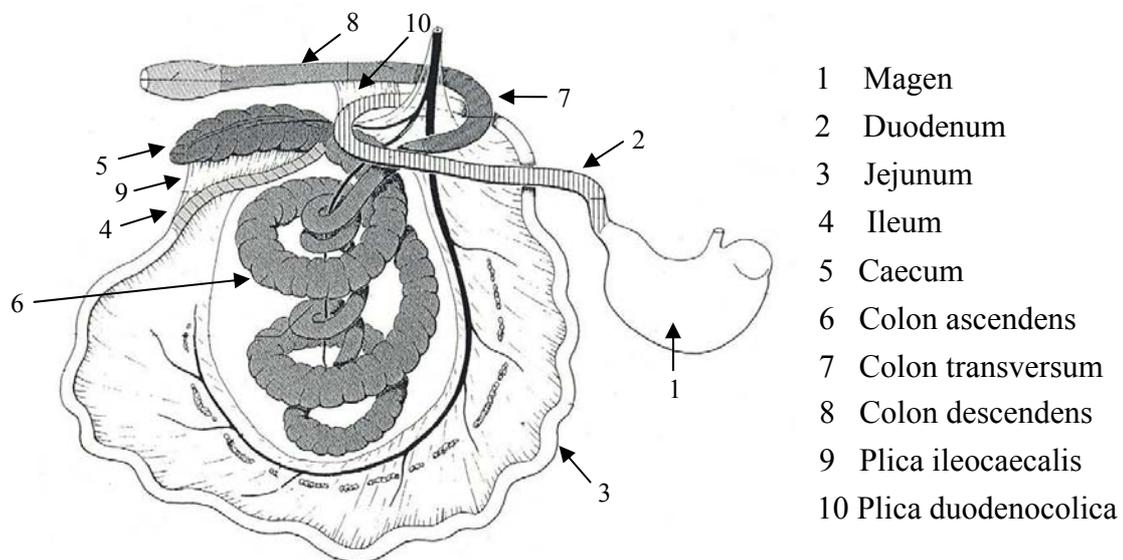


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Gastrointestinaltraktes beim Schwein

(nach Ghetie, 1958; aus König et al., 1999)

2.2.2 Mikroskopische Anatomie

Der gesamte Rumpfdarm (Speiseröhre bis After) weist einen einheitlichen Wandbau auf, wobei die einzelnen Abschnitte durch ihre jeweilige Funktion eine Spezialisierung zeigen. Abbildung 2.2 zeigt eine schematische Darstellung vom Wandbau des Rumpfdarmes im Längsschnitt am Beispiel des Duodenums. Die Wand des Rumpfdarmes weist vom Lumen nach außen folgende fünf Schichten auf:

Tunica mucosa, Tela submucosa, Tunica muscularis, Tela subserosa und Tunica serosa

Tunica mucosa

Bei der Tunica mucosa handelt es sich um die Schleimhautschicht, die den Rumpfdarm von innen auskleidet. Die Tunica mucosa besteht von innen nach außen aus folgenden drei Schichten: Epithelium mucosae, Lamina propria mucosae und Lamina muscularis mucosae. Beim *Epithelium mucosae* handelt es sich um lückenlos nebeneinander angeordnete Epithelzellen verschiedener Zelltypen. Die Epithelzellen liegen mit ihrer basolateralen Membran einer Basalmembran auf (Marsh & Trier, 1974), welche das Epithelium mucosae von der darunter gelegenen Lamina propria mucosae abgrenzt. Die Basalmembran bildet eine kontinuierliche Schicht, jedoch sind Fenestrationsen ausgebildet, welche z.B. von Chylomikronen (Tytgat et al., 1971) oder Lymphozyten passiert werden können. Die Basalmembran stellt eine geregelte Oberfläche für die Wanderung des Epithels sowohl im gesunden (Trier et al., 1990) als auch, während der Heilung, im geschädigten Gewebe (Moore et al., 1989) dar. Des Weiteren scheint die Basalmembran zur Regulation der Epithelzelldifferenzierung beizutragen (Hahn et al., 1990). Das Epithel dient dem Schutz und der Synthese von Verdauungsenzymen sowie der Nährstoffresorption. Bei der *Lamina propria mucosae* handelt es sich um eine Schicht aus lockerem Bindegewebe, welche Lymph- und Blutgefäße, Nervenfasern und Immunzellen beinhaltet. Sie dient als Trägerschicht der Schleimhaut und erfüllt unter anderem immunologische Funktionen. Des Weiteren versorgen ihre Blutgefäße das Epithelium mucosae (Madara & Trier, 1994). Die *Lamina muscularis mucosae* ist eine dünne Schicht aus glatten Muskelzellen und bildet die Grenze zur Tela submucosa.

Tela submucosa

Die Tela submucosa (Unterschleimhautgewebe) besteht aus lockerem Bindegewebe und schließt Lymph- und Blutgefäße sowie Nervengewebe ein. Außerdem findet man in diesem Gewebe reichlich freie Immunzellen. In der Tela submucosa des Duodenums befinden sich die Brunnerschen Drüsen.

Tunica muscularis

Die Tunica muscularis ist aus einer inneren Zirkulär- (Stratum circulare) und einer äußeren Längsschicht (Stratum longitudinale) aus glatten Muskelzellen aufgebaut. Zwischen den Muskelschichten befinden sich Lymph- und Blutgefäße sowie Nervengewebe. Diese Schicht dient dem Nahrungstransport entlang des Gastrointestinaltrakts und der Durchmischung des Futterbreis mit Verdauungsenzymen (Liebich, 1999).

Tela subserosa und Tunica serosa

Die Tunica serosa besteht aus der Lamina propria serosae, einer dünnen feinfasrigen Bindegewebsunterlage und aus einem einschichtigen Plattenepithel (Mesothel) (Bucher & Wartenberg, 1989). Ihre Funktion ist die Aufnahme von Stoffen aus der Körperhöhle und die Sekretion von serösen Flüssigkeiten. Die Tunica serosa ist über die bindegewebige Tela subserosa mit der Tunica muscularis verbunden (Liebich, 1999).

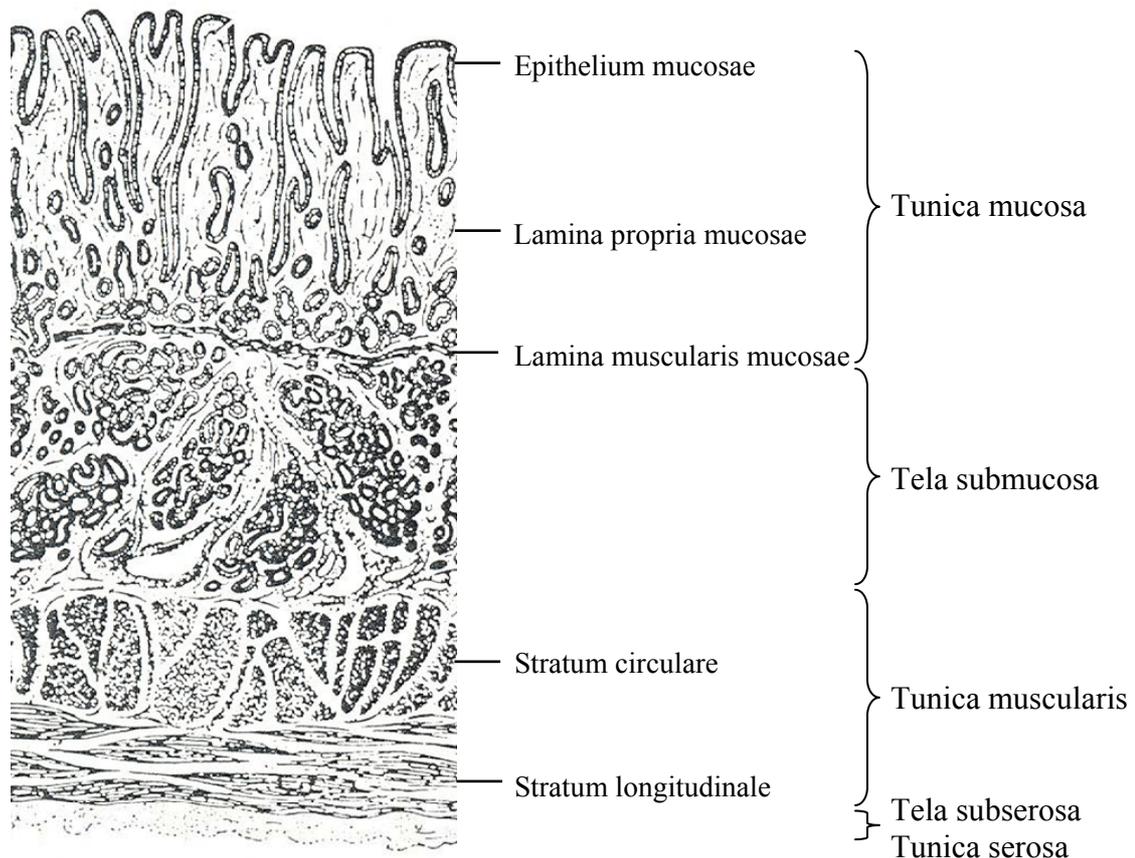


Abb. 2.2: Längsschnitt durch die Wand des Darmes am Beispiel des Duodenums (nach Young aus Romer & Parsons, 1991)

2.2.2.1 Feinbau des Dünndarmes

Der Feinbau des Dünndarmes ist in Abbildung 2.3 für die drei Dünndarmabschnitte dargestellt. Anhand des Feinbaus der Schleimhaut können die Dünndarmabschnitte voneinander abgegrenzt werden. Charakteristisch für den Dünndarm ist die Ausbildung von permanenten Falten (Plicae circulares), Zotten (Villi intestinales) und Krypten (Glandulae intestinales). Diese Strukturen und der Mikrovillibesatz der Epithelzellen führen zu einer relativen Oberflächenvergrößerung, um den Faktor 600 im Vergleich zu einem einfachen Rohr. Die Oberflächenvergrößerung ist Voraussetzung dafür, dass der

Dünndarm seine Funktionen wie Sekretion der Verdauungsenzyme und Nährstoffresorption optimal erfüllen kann. Die permanenten Falten befinden sich quer zur Längsachse des Darmrohrs. Als bindegewebige Grundlage dient die Tela submucosa. Im Duodenum und Jejunum befinden sich hohe Plicae circulares, im Ileum sind diese niedrig oder gar nicht ausgebildet (Bucher & Wartenberg, 1989). Die Dünndarmzotten stellen fingerförmige Ausstülpungen der Lamina propria mucosae dar. Je nach Dünndarmabschnitt sind die Zotten unterschiedlich ausgebildet. Im Bereich des Duodenums sind die Zotten dicht und breit. Im Jejunum findet man lange, fingerförmige Zotten. Im Ileum sind wieder kürzere und breitere Zotten als im Jejunum ausgebildet. Krypten sind Einstülpungen in die Lamina propria mucosae. Es handelt sich um nicht verzweigte, schlauchförmige Drüsen. Sie werden als Glandulae intestinales oder Lieberkühn-Drüsen bezeichnet. Im Bereich der Krypten findet die Epithelregeneration statt (siehe Kapitel 2.2.3). Weitere Funktionen der Krypten sind Sekretion von Makromolekülen, Ionen und Wasser sowie Hormone (Madara & Trier, 1994). Jede Zotte wird von 6-14 Krypten umgeben (Potten et al., 1982).

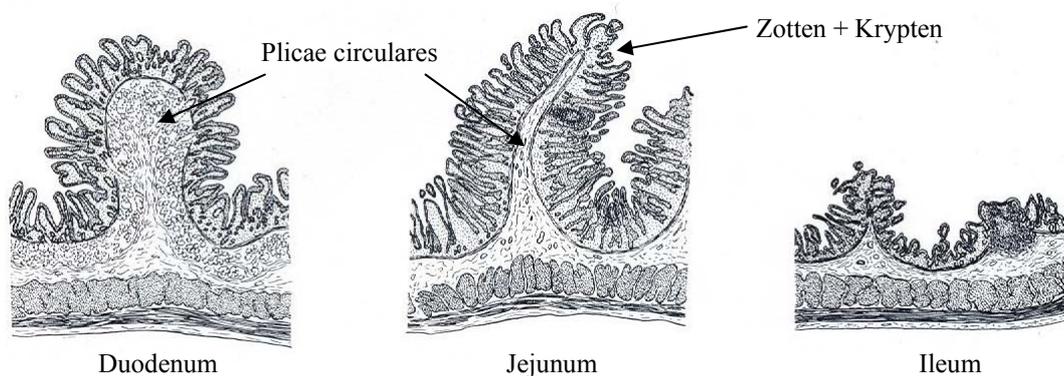


Abb. 2.3: Längsschnitt durch die Wand des Duodenums, Jejunums und Ileums (Bucher & Wartenberg, 1989)

2.2.2.2 Feinbau des Dickdarmes

Der Feinbau des Dickdarmes ist in Abbildung 2.4 dargestellt. Die Schleimhaut des Dickdarmes unterscheidet sich von der des Dünndarmes durch das Fehlen der Zotten. Somit sind im Dickdarm lediglich Krypten ausgebildet. Das Fehlen der Zotten spiegelt die Funktionen des Dickdarmes wider. Im Dickdarm werden vor allem Wasser und Elektrolyte reabsorbiert, was zu einer Eindickung des Darminhaltes führt. Die Resorptionstätigkeit ist in diesem Darmabschnitt nicht mehr groß. Des Weiteren wird im Dickdarm Schleim aus den Gobletzellen sezerniert um den Darminhalt gleitfähig zu machen. Die Krypten im

Bereich des Dickdarmes sind lang, nicht verzweigt und liegen dicht nebeneinander (Liebich, 1999). Von proximal nach distal nehmen die Krypten an Tiefe zu (Bucher & Wartenberg, 1989). Auch im Dickdarm findet die Epithelregeneration in den Krypten statt (siehe Kapitel 2.2.3).

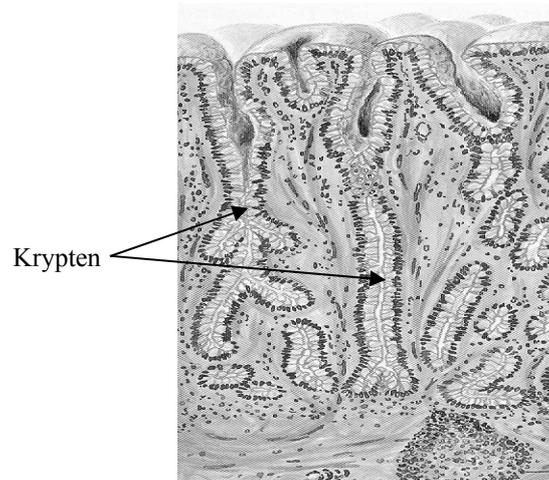


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Schleimhaut des Colons (Liebich, 1999)

2.2.3 Histologische Aspekte der Darmmukosa und deren Regeneration

Die Darmmukosa weist einen sehr hohen Zelldurchsatz auf. Die Mukosazellen entstehen durch Proliferation der Stammzellen am Kryptengrund. Anschließend findet während der Wanderung im Zellverband entlang der Zotten- und Kryptenachse die Differenzierung zu reifen Zellen statt und letztendlich unterliegen die Epithelzellen im Bereich der Zottenspitze bzw. im luminalen Kryptenbereich der Apoptose und werden ins Darmlumen abgestoßen (Anoikis) (Leblond & Stevens, 1948; Leblond & Messier, 1958; Quastler & Sherman 1959; Moss et al., 1996). Somit können drei Zellpopulationen unterschieden werden: Stammzellen, Transitzellen und reife Zellen (Potten & Löffler, 1990) (siehe Tabelle 2.1). Unter der Turnoverrate oder Turnoverzeit versteht man die Zeit, die benötigt wird um die Zellzahl in einer Population vollständig zu ersetzen. Die Mukosa des Darmgewebes hat eine der höchsten Zell-Turnoverraten aller Körpergewebe. Nach Cheng & Leblond (1974C) beträgt die Turnoverzeit für die Enterozyten des Duodenums 3,3 Tage und für die des Jejunums 3,4 Tage. Für das Colon sind 3 Tage angegeben (Johnson & McCormack, 1994). Die Zellproliferation in den Krypten erfolgt durch mitotische Teilung einer Stammzelle, das heißt, dass es sich bei den Zellen einer Krypte und Zotte um monoklonale Zellen handelt. Die Darmstammzellen sind multipotente Stammzellen

(=pluripotent) (Cheng & Leblond, 1974C), d.h. die Nachkommen dieser multipotenten Stammzelle können zu den verschiedenen Zelltypen der Mukosa differenzieren.

Tab. 2.1: Zellpopulationen des Darmepithels (Potten & Löffler, 1990)

Stammzellen	Transitzellen	Reife Zellen
<ul style="list-style-type: none"> – teilungsfähig – unterliegen nicht der Differenzierung – etwa 4 – 16 Zellen oberhalb der Panethzellen im Dünndarm 	<ul style="list-style-type: none"> – teilungsfähig – beginnende Differenzierung – 120 – 130 proliferative Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> – Differenzierung

Entsprechend der verschiedenen Funktionsbereiche kann das Darmepithel in unterschiedliche Kompartimente eingeteilt werden. So unterscheidet man ein Stammzellkompartiment, ein Proliferationskompartiment, ein Reifungskompartiment und ein funktionales Kompartiment (Alison & Sarraf, 1994). In der Abbildung 2.5 sind die verschiedenen Kompartimente für den Dünndarm und Dickdarm schematisch dargestellt.

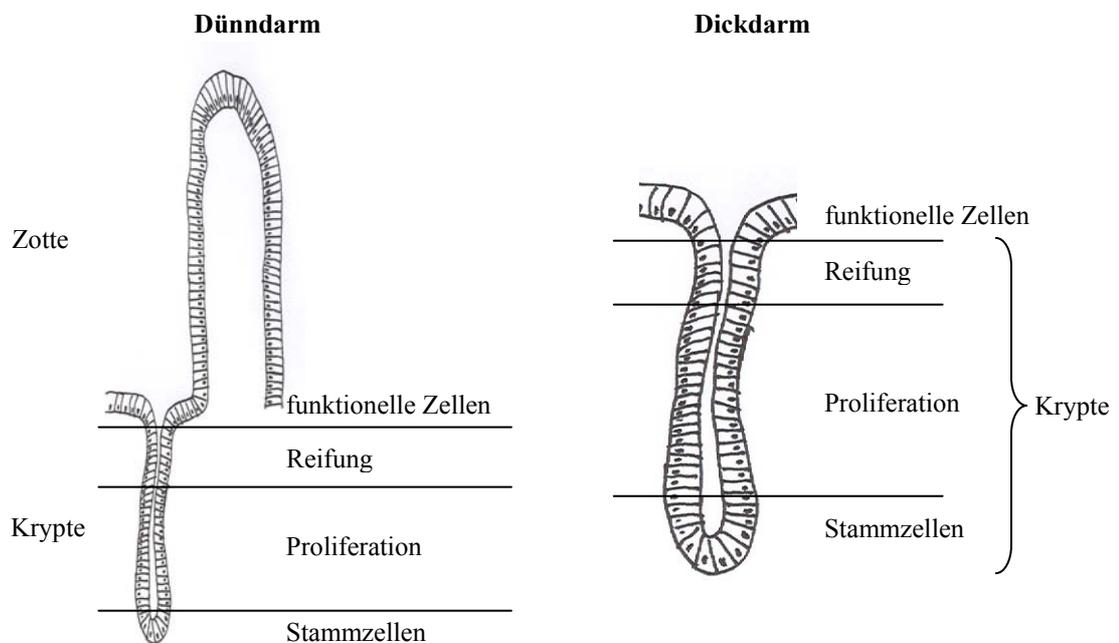


Abb. 2.5: Darstellung der unterschiedlichen Kompartimente im Dünndarm und Dickdarm

2.2.3.1 Morphologie der Dünndarmmukosa

Beim Epithel der Krypten und Zotten handelt es sich um ein einschichtig, hochprismatisches Epithel, welches von unterschiedlichen Zelltypen gebildet wird.

Das Epithel der Krypten wird durch folgende Zellen gebildet:

undifferenzierte Kryptenzellen sowie multipotente Stammzellen, Goblet Zellen, Endokrine Zellen und Paneth Zellen.

Im Epithel der Zotten sind folgende Zellen zu finden:

Enterozyten, Goblet Zellen, Endokrine Zellen und im Bereich des Ileums M-Zellen.

2.2.3.1.1 Enterozyten

Bei den Enterozyten handelt es sich um hochprismatische Zellen, welche über Halbdesmosomen mit der Basalmembran verbunden sind. Apikal sind die Zellen durch Zonulae occludentes und Haftkomplexe verbunden, um ein Austreten von Interzellulärsubstanz zu verhindern. Der Stoffaustausch zwischen den Zellen erfolgt über Nexus (gap junctions). Apikal tragen die Enterozyten Microvilli zur Oberflächenvergrößerung (Liebich, 1999). Die undifferenzierten Zellen spielen eine Schlüsselrolle für die Sekretion von Wasser und Ionen ins Lumen des Dünndarms.

Untersuchungen an Mäusen zeigen vier Enterozyten-Untergruppen je nach Lokalisation der Zellen (Cheng & Leblond, 1974A):

1. **Enterozyten der Kryptenbasis:** hierbei handelt es sich um die unreifen und proliferativen Vorläuferzellen der vier Epithelzelltypen (Enterozyten, Gobletzellen, enteroendokrine Zellen und Paneth Zellen) (Cheng & Leblond, 1974A). Die Enterozyten der Kryptenbasis befinden sich im unteren Kryptenbereich und weisen beträchtliche Mitoseaktivität auf (Madara & Trier, 1994). Sie gehen aus der Teilung der Stammzellen hervor. Somit stammen alle Zellen einer Krypte von einer monoklonalen Stammzelle ab (Ponder et al, 1985). Die Tochterzellen der Kryptenbasisenterozyten wandern in Richtung Darmlumen, teilen sich dabei noch mehrfach und differenzieren stufenweise in die anderen Zelltypen.
2. **Enterozyten der Kryptenmitte:** in diesem Bereich sieht man den Übergang von undifferenzierten zu differenzierten Zellen.
3. **Enterozyten des luminalen Kryptenkompartiment:** Diese Zellen zeigen keine Zellteilung mehr und differenzieren weiter.

4. **Enterozyten der Zotte:** hierbei handelt es sich um die voll differenzierte, nicht mehr teilungsfähige Enterozytenzelle (Cheng & Leblond, 1974A).

2.2.3.1.2 Goblet Zellen

Bei den Gobletzellen handelt es sich um monozelluläre Drüsenzellen, die einen glykoprotein- und glykolipidreichen Schleim produzieren und diesen auf die Oberfläche der Schleimhaut sezernieren. Der sezernierte Schleim besitzt vielfältige Schutzfunktionen: zum einen wird enzymatischer Eigenverdau verhindert und zum anderen schützt er vor pathogenen Keimen, indem er Rezeptoren besetzt, die von Mikroorganismen zur Anheftung an die Epitheloberfläche genutzt werden könnten. Des Weiteren enthält der Schleim Lysozym, welches direkt bakterizid wirkt. Die Anzahl der Gobletzellen nimmt vom Dünn- zum Dickdarm zu (Liebich, 1999). Gobletzellen weisen keine Mikrovilli auf (Potten, 1995).

Je nach Differenzierungsgrad treten unterschiedliche Gobletzellen auf (Cheng & Leblond, 1974B). Im unteren Kryptenbereich und im unteren Bereich der Kryptenmitte findet man die Oligomukuszellen. Bei diesen Zellen handelt es sich um teilungsfähige Precursorzellen der Gobletzellen, die durch Teilung aus den Enterozyten in der Kryptenbasis entstehen. Die Oligomukuszelle differenziert während ihrer Wanderung in Richtung Darmlumen zur reifen Gobletzelle. Ab dem oberen Bereich der Kryptenmitte kann man differenzierte, nicht mehr teilungsfähige Gobletzellen finden. Nicht alle Gobletzellen entstehen aus Oligomukuszellen, sondern die Hälfte der gesamten Gobletzellpopulation geht direkt aus den Enterozyten der Kryptenbasis hervor.

2.2.3.1.3 Endokrine Zellen

Die enteroendokrinen Zellen sind Zellen des gastrointestinalen Hormonsystems und befinden sich vor allem im Bereich der Krypten. Endokrine Zellen stellen nur einen kleinen Teil der Epithelzellpopulation dar. Von diesen Zellen werden Hormone sezerniert, die an der Regulation der Magen- und Pankreassekretion sowie an der Kontraktion der Gallenblase beteiligt sind (Liebich, 1999). Die endokrinen Zellen bilden auch eine Vielzahl an stoffwechselregulierenden Hormonen, die auch im Hypothalamus-Hypophysensystem entstehen. Es ist davon auszugehen, dass der GIT, der ja als erster die „Information“ über Art und Menge der demnächst zu verarbeitenden Nährstoffe erhält, wesentlich an der

Regulation des Gesamtstoffwechsels beteiligt ist. Auch diese Zellpopulation entsteht durch Transformation aus den Enterozyten der Kryptenbasis (Cheng & Leblond, 1974C).

2.2.3.1.4 Paneth Zellen

Bei manchen Säugetieren findet man Paneth Zellen, diese Zellpopulation ist histologisch beim Schwein jedoch nicht zu finden (Madara & Trier, 1994). Paneth Zellen kommen ausschließlich im Dünndarm im Bereich des Kryptengrundes in den ersten vier bis fünf Zellpositionen (Potten, 1995) vor. Diese Zellen weisen apikal lysozymhaltige Granula auf, die antimikrobiell wirken (Potten, 1995). Paneth Zellen entstehen auch aus den Enterozyten der Kryptenbasis; diese Zellen wandern aber nicht in Richtung Darmlumen, sondern degenerieren nach einer Lebensdauer von zwei bis drei Wochen im Kryptenbasisbereich und werden hier vermutlich von den Enterozyten der Kryptenbasis phagozytiert (Cheng, 1974; Cheng & Leblond 1974C).

2.2.3.1.5 M-Zellen

Innerhalb der Lamina propria des Darmkanals befinden sich Lymphknötchen. Im Bereich des Ileums sind die Immunzellen in zusammengelagerten Lymphfollikeln (Peyer-Plaques) organisiert. Über den Lymphknötchen bzw. Peyer-Plaques sitzen im Epithel die M-Zellen (membranous cells). Diese Zellen tragen keine Mikrovilli. Sie nehmen Antigene aus dem Darmlumen auf und präsentieren diese den unter den M-Zellen gelegenen Lymphozyten und Makrophagen (Sinowatz, 2000). Vermutlich entstehen auch die M-Zellen aus den Stammzellen im Kryptengrund (Bye et al., 1984).

2.2.3.2 Morphologie der Dickdarmmukosa

Die innere Darmsoberfläche des Dickdarmes weist ein einschichtiges, hochprismatisches Epithel auf, welches reich an Gobletzellen ist. Man unterscheidet das Oberflächenepithel und das Epithel der Krypten. Im Oberflächenepithel besitzen die Enterozyten einen Mikrovillibesatz (Hees, 2000). Die Colonozyten werden durch folgende Zelltypen repräsentiert (Studien an Mäusen: Chang & Leblond, 1971):

Enterozyten, Gobletzellen, endokrine Zellen, vakuolisierte Zellen und Stammzellen.

Alle Colonozyten stammen von einer langsam proliferierenden Stammzelle ab. Diese Stammzelle produziert einen schnell proliferierenden Zellpool, welcher sich im unteren Kryptenbereich befindet. Beim proliferierenden Zellpool handelt es sich um die vakuolisierten Zellen. Die Zellen wandern innerhalb der Krypten nach oben, verlieren dabei ihre Teilungsfähigkeit und differenzieren zu reifen Zellen. Luminal werden die Zellen ins Darmlumen abgestoßen (siehe auch Kapitel 2.2.3). Die Lokalisation der Stammzellen und das Wanderungsmuster variiert in den verschiedenen Colonabschnitten (Sata & Ahnen, 1992). Im Colon ascendens befinden sich die Stammzellen im Bereich der Kryptenmitte, dies bedingt, dass die Zellwanderung in Richtung Darmlumen und in Richtung Kryptenbasis erfolgt. Im Colon descendens befinden sich die Stammzellen im Kryptenbasisbereich und die Zellen wandern nur in Richtung Darmlumen.

2.2.3.2.1 Enterozyten

Die Enterozyten der Colonmukosa entsprechen denen im Bereich der Dünndarmmukosa. Sie sind im oberen Drittel der Krypte sowie im Oberflächenepithel zu finden. Diese Zellen sind differenziert und nicht teilungsfähig (Chang & Leblond, 1971).

2.2.3.2.2 Gobletzellen

Diese mukushaltigen Zellen findet man in der ganzen Krypte und im Oberflächenepithel. Im Bereich der Kryptenbasis handelt es sich um kleine Zellen mit wenig Mukus (Oligomukuszellen), diese Zellpopulation ist noch zur Zellteilung fähig. Gobletzellen entstehen sowohl aus den Oligomukuszellen als auch aus den vakuolisierten Zellen. Im mittleren Kryptenbereich ist der Mukusgehalt höher und Zellteilungen finden nicht mehr statt. Gobletzellen im oberen Kryptenbereich und im Oberflächenepithel besitzen dann die typische Becherform (Chang & Leblond, 1971).

2.2.3.2.3 Endokrine Zellen

Diese Zellen befinden sich im mittleren und oberen Kryptenbereich sowie im Oberflächenepithel. Mengenmäßig machen diese Zellen den kleinsten Anteil der Colonozyten aus. Diese Zellen zeigen aufgrund der Differenzierung keine Zellteilung (Chang & Leblond, 1971).

2.2.3.2.4 Vakuolisierte Zellen

Vakuolisierte Zellen findet man in den unteren zwei Dritteln der Krypte. Es handelt sich um die undifferenzierte Vorläuferzelle aller Colonozyten. Diese Zellen entstehen somit direkt aus den Stammzellen. Der Name vakuolisierte Zelle ist durch das Auftreten von apikalen Vakuolen in den Zellen bedingt (Chang & Leblond, 1971).

2.3 Morphologische Besonderheiten der fötalen und perinatalen Darmentwicklung

Die Morphologie des Darmes steht in direktem Zusammenhang mit dem Funktionszustand. In der Fötalzeit entwickelt sich der Darm, ohne jedoch die volle Funktionalität zu erreichen. So sind Barrierefunktionen und die Verdauungs- und Resorptionsfunktionen noch nicht ausgereift. Des Weiteren besteht im fötalen Darm noch kein Bedarf an Zellregenerationen. Kurz vor der Geburt kommt es im Darm, vermittelt durch Glucocorticoide, zur erstmaligen Funktionsaufnahme. In der Säugezeit wird die morphologische Entwicklung des Darmes, vor allem durch vorgegebene Signale in der Milch, gesteuert. Während dann nach dem Absetzen im reifen Darm eine Anpassung an die durch die Nahrungszufuhr zugeführten Nahrungsbestandteile im Vordergrund steht. Details dieser drei Entwicklungs- bzw. Funktionsstadien sind nachfolgend näher charakterisiert.

2.3.1 Fötale Darmentwicklung

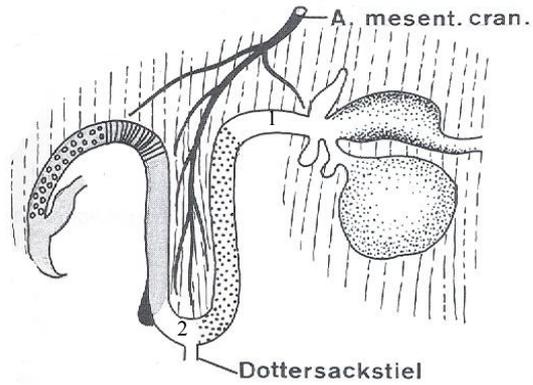
2.3.1.1 Makroskopische Entwicklung des Darmes

Bei der Abfaltung der Darmscheibe vom Dottersack entsteht aus dem Entoderm die Darmrinne, welche sich vorne und hinten zum primitiven Darmrohr schließt. Aus den verschiedenen Abschnitten des primitiven Darmrohrs geht der gesamte Darm hervor. Das primitive Darmrohr gliedert sich in drei Abschnitte: Vorder-, Mittel- und Hinterdarm. Aus dem Vorderdarm entsteht der Anfangsteil des Duodenums bis zur Einmündung des Gallengangs. Der Mitteldarm differenziert sich zum restlichen Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum, Colon ascendens und bis zur Mitte des Colon transversum. Aus dem Hinterdarm entsteht die linke Hälfte des Colon transversum und das Colon descendens (Sinowatz, 1991; Schnorr, 1996). Die Abbildung 2.6 A-C zeigt schematisch die Vorgänge der Darmdrehung und die Entwicklung der Darmabschnitte (Sinowatz, 1991; Schnorr, 1996).

Die primitive Darmschleife (siehe Abbildung 2.6 A) entsteht durch Längenwachstum des Darmrohrs mit gleichzeitiger Verlängerung des Gekröses. Beginnend am Magen verläuft das Duodenum horizontal und das Jejunum bildet den absteigenden Schenkel der Darmschleife. Der Scheitel der Darmschleife wird vom Jejunum und Ileum gebildet. Caecum, Colon ascendens und Colon transversum bilden den aufsteigenden Schenkel der Schleife, das Colon descendens und Rektum den letzten horizontalen Abschnitt.

Durch das weitere Längenwachstum beginnt in der vierten Trächtigungswoche die Drehung des Darmes um die Arteria mesenterialis cranialis um insgesamt 360° . Bei der ersten Drehung um 180° (siehe Abbildung 2.6 B) wird der absteigende Schenkel der Darmschleife von kranial über rechts nach kaudal verlagert und der aufsteigende Schenkel von kaudal über links nach kranial verlagert.

Das weitere Längenwachstum führt zur Bildung der einzelnen Darmabschnitte und gleichzeitig wird die Drehung um weitere 180° abgeschlossen (siehe Abbildung 2.6 C).



A: Primitive Darmschleife

□ 1 Duodenum / 2 Ileum

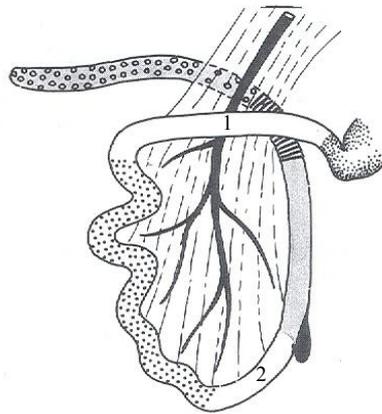
▨ Jejunum

■ Caecum

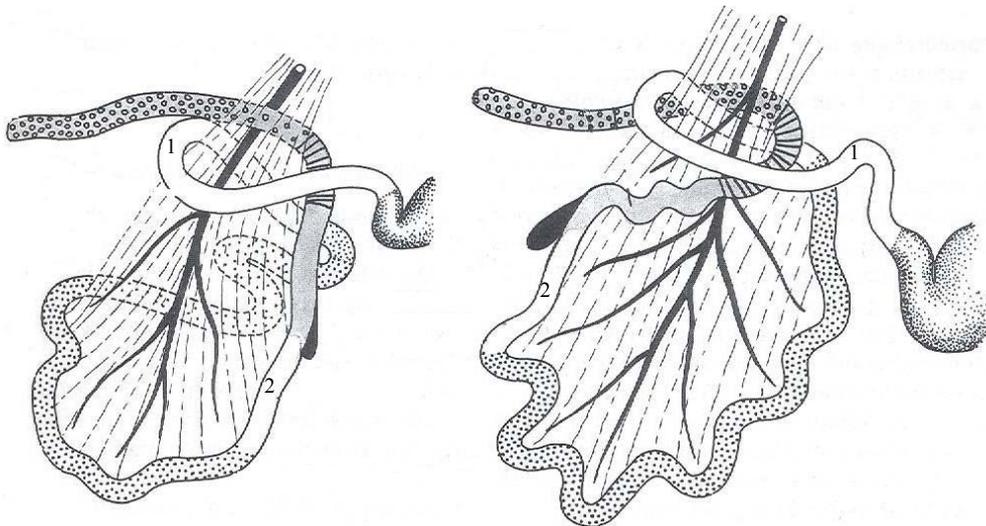
▤ Colon ascendens

▧ Colon transversum

▩ Colon descendens



B: Halbe Drehung um 180°



C: Dreivierteldrehung um 270° und ganze Drehung um 360°

Abb. 2.6 A-C: Schematische Darstellungen der fötalen Darmentwicklung

(Schnorr, 1996)

Durch das starke Wachstum des Darmes wird die Peritonealhöhle zu eng, um das ganze Darmkonvolut zu beherbergen. Aus diesem Grund werden Teile der Darmschlingen vorübergehend außerhalb der Peritonealhöhle angetroffen. Bei diesem Phänomen spricht man vom physiologischen Nabelbruch.

Beim Schwein kommt es im Laufe der weiteren Entwicklung zur sekundären Linksverlagerung des Caecums und das Colon ascendens bildet die typische kegelförmige Spirale aus (Schnorr, 1996). Drei bis vier Wochen ante partum zeigt der Dünndarm ein stark ausgeprägtes Gewebewachstum, es kommt zu einer Zunahme des relativen Gewichtes um 70-80% (Sangild, 2001).

2.3.1.2 Mikroskopische Entwicklung des Darmepithels

Alle Wandschichten des Darmes, mit Ausnahme des Darmepithels, sind mesodermaler Herkunft. Das Epithel ist entodermaler Herkunft. Bei der Entwicklung des Darmepithels findet man zunächst eine einschichtige Epitheltapete in der Mesenchymknospe (Behnke, 1963). Durch Epithelproliferation entsteht ein mehrschichtiges Epithel (Kollmann, 1898). Solange das mehrschichtige Epithel vorhanden ist, scheint das Darmlumen geschlossen zu sein bzw. besitzt nur ein schlitzförmiges Lumen. Intraepithelial sind in dieser Phase der Entwicklung Höhlen ausgebildet, diese fusionieren miteinander und mit dem Darmlumen. Durch die Fusion dieser Höhlen und durch die Invasion des Mesenchyms ins Endoderm kommt es zur Primärzottenbildung und zur Eröffnung des Darmlumens (Chen & Kataoka, 1991). Im Dünndarm sind beim Schwein ab Tag 40 der Gravidität Primärzotten zu finden. Diese sind zunächst unverzweigt, später treten auch dünn verzweigte Zotten auf. Zu diesem Zeitpunkt ist das Epithel an der Zottenspitze einschichtig und nur noch im Bereich der Zottenbasis mehrschichtig (Georgiva & Gerov, 1975; Karlsson, 1972). Mit der weiteren Entwicklung nimmt die Anzahl und Länge der einzelnen Zotten zu, etwa ab Tag 60 der Gravidität ist beim Schwein das gesamte Darmepithel einschichtig (Karlsson, 1972). Ab Tag 65 der Gravidität senkt sich das Epithel in die Lamina propria ein und die Bildung der Lieberkühnschen Krypten beginnt (Georgiva & Gerov, 1975). Die Entwicklung der Mikrovilli beginnt beim Schwein im Dünndarm ab Tag 40 der Gravidität, zuvor sieht man Vorstufen der Mikrovilli als unregelmäßige Projektionen an der apikalen Zellmembran. Diese Projektionen sind zunächst nur spärlich vorhanden, sind breit und kurz geformt. Im Laufe der weiteren Entwicklung nehmen sie an Länge und Anzahl zu. Die Mikrovilli entsprechen etwa zwei bis drei Wochen ante partum denen von Neonaten

(Karlsson, 1972). Die undifferenzierten Epithelzellen besitzen große Kerne und werden im Laufe der Entwicklung durch differenzierte Zellen mit apikalen Mikrovilli ersetzt (Karlsson, 1972). Die Differenzierung der Enterozyten, Gobletzellen und enteroendokrinen Zellen beginnt im Jejunum im zweiten Monat der Gravidität (Georgiva & Gerov, 1975). Die Entwicklung des Dün- und Dickdarmes entspricht sich. Im gesamten Darmrohr werden im Verlaufe der Entwicklung Zotten ausgebildet, diese bilden sich beim Säugetier im Dickdarm jedoch zurück (Schnorr, 1996). Untersuchungen bei menschlichen Föten zeigen, dass ab der 10. Graviditätswoche Zotten im Colon auftreten, wobei diese weniger weit entwickelt sind als die Zotten im Dünndarm. Diese Zotten persistieren während des mittleren Trimesters der Gravidität und werden immer kleiner bis dann bei der Geburt keine Zotten mehr vorhanden sind (Lev & Orlic, 1974). Die Entwicklung der Krypten im Colon beginnt beim Menschen in der 12. (Patzelt, 1931) bzw. 13. (Neubart, 1983) Graviditätswoche.

2.3.2 Morphologie des postnatalen Darmes in der Säugezeit bis zum Absetzen von der Muttersau

Unmittelbar postnatal unterliegt der Gastrointestinaltrakt starkem Gewebewachstum, morphologischen Veränderungen und funktioneller Reifung. Das Darmepithel erfährt zahlreiche Modifikationen, so geht z.B. die Fähigkeit des Makromolekültransports verloren und der Dickdarmenterozyt verliert die Fähigkeit Verdauungsenzyme zu produzieren sowie Aminosäuren und Glucose zu resorbieren.

Das Gewebewachstum des Darmes unmittelbar postnatal ist enorm. Das Dünndarmgewicht steigt beim Schwein in den ersten drei Tagen postnatal um 72%. Das Gewicht des Dickdarmes steigt innerhalb des ersten Tages um 33% und hat sich am Tag 3 post partum verdoppelt (Xu et al., 1992). Diese Gewichtszunahme ist weitgehend auf die Mukosa beschränkt. Im Zusammenhang mit der Zunahme der Gewebemasse nimmt auch die Darmlänge zu, so ist der Dünndarm zehn Tage post partum etwa doppelt so lang wie bei der Geburt. Die Darmoberfläche zeigt eine Zunahme der Fläche um etwas mehr als das Doppelte (Smith & Jarvis, 1978). Das Wachstum kommt einerseits durch die steigende Zellproliferationsrate (Widdowson et al., 1976) und andererseits durch die Akkumulation von Kolostrumproteinen im Epithel (Xu et al., 2002) zustande. Die Kolostrumproteine akkumulieren in Zytoplasmavakuolen der fötalen Enterozyten, hierbei handelt es sich um Transport- und Verdauungsvakuolen (Baintner, 1986). Kurz nach der Geburt werden die

Transportvakuolen mit Proteinen aufgefüllt (Hardy et al., 1971). Diese Vakuolen sind in den ersten zwei Tagen post partum im gesamten Dünndarm zu finden. Die Transportvakuolen sind am Transfer der Makromoleküle beteiligt. Die Verdauungsvakuolen kommen mehr im hinteren Dünndarbereich vor und dienen dem intrazellulären Nährstoffverdau (Baintner, 1994). Die vakuolisierten Zellen werden nur im Zottenbereich angetroffen, hier sind 70-80% der Zellen vakuolisiert. In den folgenden Tagen postnatal nimmt die Anzahl der vakuolisierten Zellen bedingt durch den Zusatz reifer Enterozyten ab. Etwa ab der 3. Woche postnatal werden keine Vakuolen mehr gefunden (Clarke & Hardy, 1971). Nach Moon (1972) ist diese Vakuolisierung Teil der Differenzierung des pinozytierenden Epithels.

Morphologisch zeigen sich im Duodenum bei der Geburt fingerförmige Zotten mit Transversalfurchen, diese Furchen werden mit steigendem Alter und steigender Zottenlänge flacher und weniger zahlreich (Skrzypek et al., 2005). Ab Tag 38 post partum zeigen sich kürzere, blattförmige Zotten. Im Jejunum sind ab der Geburt dünne, fingerförmige Zotten ausgebildet, wobei kürzere und längere Vertreter vorkommen (Skrzypek et al., 2005). Die Höhe der Zotten steigt am ersten Tag post partum um 33-90% (Xu et al., 1992). Nach einer Woche post partum werden die Zotten flach und blattförmig, weisen aber immer noch unterschiedliche Längen auf. 38 Tage post partum zeigen die Zotten eine große Variabilität der Form. Auch im Jejunum werden Transversalfurchen gefunden, die mit steigendem Alter seichter und weniger zahlreich werden bis sie dann ab etwa Tag 38 post partum ganz verschwunden sind (Skrzypek et al., 2005). Xu et al. (1992) finden am Tag der Geburt sowie einen Tag danach im Caecum und Colon ascendens rudimentäre Zotten, die in den folgenden drei Tagen verschwinden. Die Zotten, vor allem im proximalen Colon, sind fähig zur Verdauung und Resorption und könnten eine zusätzliche Kapazität bei der Verdauung, zur Unterstützung des Dünndarms darstellen (Xu, 1996). Zotten im Dickdarm wurden neben dem Schwein auch beim Menschen und der Ratte gefunden (Colony et al., 1989; Wooding et al., 1978).

Das Darmepithel der Neonaten zeigt in den ersten zwei Lebenstagen eine erhöhte Mitoserate und eine erniedrigte Apoptoserate (Biernat et al., 2003); diese Veränderung der Mitose-Apoptose Rate führt zum Gewebewachstum. Im Gegensatz zum adulten Tier findet man beim Neonaten im Kryptenbereich und entlang der ganzen Zotte apoptotische Zellen. Diese werden in Gruppen oder als gesamte Zottenspitze abgestoßen bzw. unter der Epithelschicht phagozytiert (Godlewski et al., 2005). Der Abstoß apoptotischer Zellen in Gruppen spricht für eine auto- oder parakrine Kontrolle dieses Prozesses (Godlewski et al.,

2005). In den ersten Tagen post partum findet wenig bis kein Zellverlust statt, erst 21 Tage post partum unterliegen Gruppen an Enterozyten der Apoptose (Godlewski et al., 2005). Nach Moon (1971) dauert die komplette Erneuerung des Dünndarmepithels bei Neonaten 7-10 Tage und bei einem drei Wochen alten Ferkel 2-4 Tage. Auch im Dickdarmepithel geht der komplette Epithelersatz beim Neonaten viel langsamer vor sich verglichen zum drei Wochen alten Tier.

Das Absetzen der Ferkel von der Muttersau führt durch das veränderte Milieu bei der Umstellung auf festes Futter zu strukturellen und funktionellen Veränderungen des Darmes, vor allem der Mukosa (Xu et al., 1996; Pluske et al., 1997). So findet man einen Tag nach dem Absetzen eine um 75% und 5 Tage danach eine um 50% reduzierte Zottenhöhe (Hampson, 1986A). Diese Abnahme der Zottenhöhe ist durch einen steigenden Zellverlust zu erklären, welcher wiederum zu einer erhöhten Zellproduktion in den Krypten führt. Die erhöhte Kryptenzellproduktion führt zu einer ansteigenden Kryptentiefe (Pluske et al., 1997). Funktionell kommt es, als Antwort auf die Futterumstellung, entsprechend der Verdauungsfunktion, zu einer Änderung des Phänotyps der Enterozyten; infolgedessen sinkt die Aktivität der Laktase, Saccharase und Peptidase, die Aktivität der Maltase hingegen steigt (Hampson, 1986B; Kelly et al., 1991; Le Huërou-Luron et al., 2000).

2.4 Regulatorische Aspekte der Darmentwicklung

An der Regulation des Darmwachstums sind genetische Kontrollmechanismen sowie endokrine Regulationssysteme beteiligt. Die Verfügbarkeit von Nährstoffen bzw. regulatorisch wirksamen Inhaltsstoffen der Nahrung sind weitere Steuerungsmechanismen (Karg, 1994). Zwischen diesen drei Bereichen kommt es zu vielfältigen Interaktionen.

Das Wachstum stellt einen anabolen Prozess dar. Voraussetzung hierfür ist, dass über den Erhaltungsbedarf hinaus Energie und Substrate zugeführt werden. Wachstum erfolgt durch Zellvermehrung (Hyperplasie bzw. Zellproliferation) und durch Zellvergrößerung (Hypertrophie). Beim Darmwachstum handelt es sich, wie beim Wachstum der meisten anderen Organe, um ein Gleichgewicht zwischen auf- und abbauenden Prozessen (Que & Gores, 1996). Auf zellulärer Ebene werden die aufbauenden Prozesse durch mitotische Zellteilungen und der Zellabbau durch die Apoptose bewerkstelligt. Das Wachstum ist durch das Überwiegen der Zellteilung gegenüber dem Zellverlust gekennzeichnet. Somit beinhaltet die Regulation des Darmwachstums die Einstellung der Gleichgewichtslage mit

Hilfe von Signalen, welche die Mitose fördern (z.B. Wachstumsfaktoren). Auf der Ebene der gegensteuernden Prozesse handelt es sich um Mechanismen, die den programmierten Zelltod auslösen sowie den sogenannten Survivalfaktoren, die den Eintritt der Apoptose verzögern. Häufig haben Wachstumsfaktoren neben ihrer im Vordergrund stehenden mitogenen Wirkung auf Stammzellen zugleich auch Survivalfunktion, indem sie die Apoptose hemmen.

Die dem Wachstum zugrunde liegende Mitose stellt eine Phase des Zellzyklus dar. Der Zellzyklus wird von sich teilenden Zellen zur Zellvermehrung wiederholt durchschritten (Sinowatz, 2000). Man unterscheidet im Zellzyklus die Mitosephase (M-Phase) und die Interphase, welche wiederum in verschiedene Unterphasen eingeteilt wird. Während der M-Phase kommt es zur mitotischen Teilung der Mutterzelle in zwei identische Tochterzellen. Die Interphase wird weiter in die G₁-Phase, S-Phase und G₂-Phase unterteilt. Die G₁-Phase liegt zwischen Ende der M-Phase und Beginn der Synthese-Phase (S-Phase). In der G₁-Phase wächst die Zelle und erfüllt Aufgaben im Rahmen des Gewebeverbandes. Wenn keine mitotischen Signale eintreffen, geht die Zelle in die G₀-Phase über und differenziert. Eine teilungsfähige Zelle kann aus der G₀-Phase wieder in den Zellzyklus zurückkehren. Voraussetzung hierfür ist eine Stimulation durch mitotische Wachstumsfaktoren, die so genannten Kompetenzfaktoren wie z.B. EGF. Die Kompetenzfaktoren wirken in der G₀-Phase wobei sie den Übergang in die G₁-Phase induzieren (Simmons et al., 1995; Reddy, 1994), des Weiteren fördern sie die Synthese des c-myc Proteins, welches für den Übergang der G₁-Phase in die S-Phase wichtig ist (Skouteris, 1994). Die Zellen durchlaufen den Zyklus weiter bis zum V-Punkt. Zur Überwindung des V-Punkt werden die Progressionsfaktoren benötigt. Bei den Progressionsfaktoren handelt es sich ebenfalls um Wachstumsfaktoren. Diese verhindern die Ausdifferenzierung der Zelle und sorgen dafür, dass die Zelle über den Restriktionspunkt R (hier wird entschieden, ob die Zelle differenziert oder sich weiter teilt) hinaus in die S-Phase eintritt. Die S-Phase dient der Synthese neuer DNA, wobei eine Duplikation der Chromosomen der Zelle erfolgt. Die G₂-Phase folgt nach der S-Phase und dauert bis zur M-Phase an, es werden Vorbereitungen für die Mitose getroffen und die neu synthetisierte DNA wird auf Fehler überprüft.

Eine Übersicht über den Zellzyklus zeigt die Abbildung 2.7 (Reddy, 1994; Pimentel, 1994).

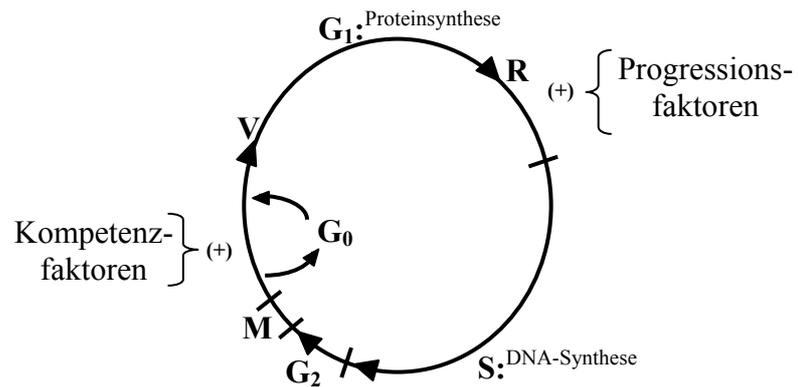


Abb. 2.7: Übersicht des Zellzyklus und die Wirkung von Kompetenz- und Progressionsfaktoren (nach Reddy, 1994)

G₁: Gap-1-Phase; S: DNA-Synthesephase; G₂: Gap-2-Phase; M: Mitose; V: V-Punkt; R: Restriktionspunkt.

In Tabelle 2.2 sind Beispiele für Wachstumsfaktoren dargestellt, die nach obigem Mechanismus wirken.

Tab. 2.2: Darstellung von Wachstumsfaktoren, die den Zellzyklus beeinflussen (nach Hill, 1989)

Wachstumsfaktor (WF)	Abkürzung	Funktionen
Insulin-like growth factors / Somatomedine	IGF-I IGF-II	<ul style="list-style-type: none"> – mitogen – Stimulation der Differenzierung von Zellen
Epidermal growth factor / Transforming growth factor α	EGF / TGF- α	<ul style="list-style-type: none"> – mitogen für epitheliale und mesodermale Gewebe
Fibroblast growth factor	FGF	<ul style="list-style-type: none"> – mitogen für mesodermale und entodermale Zellen – Auslösung der Angiogenese.
Platelet derived growth factor	PDGF	<ul style="list-style-type: none"> – mitogen für mesodermale Zellen – Chemotaxie für Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Monozyten und neutrophile Granulozyten
Transforming growth factor β	TGF- β	<ul style="list-style-type: none"> – Inhibitor für epitheliale Zellproliferation – Inhibitor für Muskelzellendifferenzierung – Stimulation von Fibronektin und Kollagensynthese

2.4.1 Fötale Regulation der Darmentwicklung

In der Frühträchtigkeit erfolgt die Regulation des Fötalwachstums primär durch genetische Faktoren, somit ist eine Beeinflussung durch exogene Faktoren gering. Im weiteren Verlauf der Trächtigkeit nimmt jedoch die Bedeutung exogener Faktoren zu. Hormone und andere parakrine Faktoren beeinflussen die Beziehung zwischen den genetischen und exogenen Faktoren. In der Spätträchtigkeit spielt die Plazenta eine zentrale Rolle bei der Wachstumsregulation des Fötus, indem sie das fötale Wachstum limitiert und der Fötus sein genetisches Potential nicht voll ausschöpfen kann (Gluckmann, 1986). Die Plazenta steuert das Wachstum durch Regulation der Substratbereitstellung und durch die

Produktion sowie den Transport von Hormonen (z.B. plazentäres Laktogen) und anderen Substanzen zum Fötus (Ferrell, 1989).

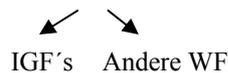
Für das normale Darmwachstum und die –differenzierung wird eine angemessene endokrine Umgebung (z.B. basale Glucocorticoidspiegel, Schilddrüsenhormone und Wachstumshormon) benötigt (Cooke et al., 1986).

Folgende Hormone sind unter anderem an der Regulation des Fötalwachstums beteiligt:

Wachstumshormon (GH):

Beim fötalen Wachstum besitzt GH keine zentrale Bedeutung (Gluckman, 1986) trotz hoher GH Konzentrationen im fötalen Blut. Ursache für die fehlende Wirkung scheint das Fehlen der Rezeptoren im fötalen Gewebe zu sein, die für die IGF-Produktion wichtig sind (Elsaesser & Parvizi, 1994).

Wachstumsfaktoren:



Insulin-like growth factors (IGF's):

Da die IGF-II Konzentration im Blut des Fötus im Vergleich zu IGF-I sehr hoch ist (Zapf et al., 1981), kann für IGF-II die bedeutendere endokrine Rolle im Fötalwachstum angenommen werden. Die Sekretion der IGF's erfolgt unabhängig vom Wachstumshormon. Die Bildung der IGF's erfolgt im Bindegewebe fötaler Organe und in Zellen mesenchymalen Ursprungs (Elsaesser & Parvizi, 1994). Die Wirkungen sind metabolischer, mitogener und differenzierungsfördernder Natur (Fowden, 2003). IGF-II sorgt für die grundlegende Steuerung des intrauterinen Wachstums, wobei die Wirkung indirekt über das plazentäre Wachstum oder direkt parakrin vermittelt wird (Fowden, 2003). Insbesondere die IGF-II Sekretion im Fötus könnte durch das plazentäre Laktogen reguliert werden, hierbei handelt es sich um eine dem GH strukturell ähnliche Substanz (Gluckman, 1986; Elsaesser & Parvizi, 1994).

Andere Wachstumsfaktoren:

Da das pränatale Wachstum in erster Linie mitogener Natur ist, lässt sich für die Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle ableiten. Wachstumsfaktoren werden schon sehr früh in der Entwicklung angetroffen und kontrollieren vermutlich lokal das pränatale Wachstum (Wittmann, 2005). Sie sind unter anderem wichtig für die Zellproliferation und Zelldifferenzierung.

Insulin:

Beim Insulin handelt es sich pränatal um das eigentlich anabole Hormon (Wittmann, 2005). Die Insulinsynthese erfolgt im Fötus. Insulinrezeptoren werden in der Plazenta und in der fötalen Leber gefunden. Insulin wirkt wachstums- und entwicklungsfördernd. Die Beeinflussung des Wachstums erfolgt durch die Förderung der Glucose- und Aminosäureaufnahme der Zellen (Gluckman, 1986).

Schilddrüsenhormone:

Der Fötus produziert unabhängig vom Muttertier Trijodthyronin (T₃) und Thyroxin (T₄), die das Wachstum des Fötus stimulieren. Die Schilddrüsenhormone sind vor allem für die Entwicklung des peripheren und zentralen Nervensystems von Bedeutung. Die Wirkungsweise auf das fötale Wachstum ist nur unzureichend bekannt (Elsaesser & Parvizi, 1994). Vor der Geburt kommt es zu einem Anstieg des T₃ und T₄ (Herbein et al., 1977). Dieser Anstieg könnte mit der perinatalen Veränderung der Darmfunktion in Zusammenhang stehen (Henning et al., 1994).

Glucocorticoide:

Fötale Nebennierenrindenhormone sind an der Entwicklung verschiedener Organsysteme (Gastrointestinaltrakt, Lunge, Leber und Niere; Sangild et al., 2000) beteiligt. So ist Cortisol an der Enzyminduktion, unter anderem im Gastrointestinaltrakt, an der Lungenreifung und an der Glykogenspeicherung in der Leber beteiligt (Elsaesser & Parvizi, 1994). Bezüglich der Enzyminduktion reguliert Cortisol im Darm den pränatalen Anstieg der Laktase und der Aminopeptidase (Sangild et al., 1995). Des Weiteren ist Cortisol im Darm während bestimmter Phasen der Entwicklung wichtig für die Entwicklung der Zottenhöhe (Trahair et al., 1987). Die Synthese des Cortisol findet in der fötalen Nebennierenrinde statt. Beim Schwein steigen die Cortisolkonzentrationen in der späten Trächtigkeit an, höchste Cortisolkonzentrationen werden zum Zeitpunkt der Geburt angetroffen (Liggins, 1976).

2.4.2 Perinatale Regulation der Darmentwicklung und die Bedeutung des Kolostrums

2.4.2.1 Regulation des postnatalen Darmwachstums

Kurz nach der Geburt findet ein Übergang der pränatalen Regulation, bei der das Wachstumshormon und IGF-I nur schwache Wirkungen ausüben, zur postnatalen Regulation statt, bei der das Wachstumshormon eine Schlüsselrolle für das Wachstum

spielt. Das Wachstumshormon vermittelt nun die Freisetzung von IGF-I. Das lokal produzierte IGF-I ist ein Hauptregulator des postnatalen Wachstums. Das endokrine IGF-I sowie das IGF-II spielen keine Rolle beim postnatalen Wachstum (Hossner, 2005). Bei den Neonaten der Nutztiere spielen auch die Schilddrüsenhormone eine wichtige Rolle als Wachstumsstimulatoren. Sie fördern die DNA- und RNA-Synthese im Darmepithel, Leber, Knochen und Gehirn (Ślebodziński, 1994). Auch Insulin ist postnatal ein wichtiger Wachstumsstimulator. Die Glucocorticoidkonzentration nimmt beim Schwein postnatal ab und zeigt lediglich zum Zeitpunkt des Absetzens minimale Schwankungen (Sangild et al., 1991). Es gibt beim Schwein keinen Hinweis, dass Glucocorticoide postnatal eine Rolle bei der funktionellen Darmreifung, so wie es beim Föten der Fall ist, spielen (Henning et al., 1994). So führt z.B. eine exogene Glucocorticoidzufuhr an Ferkeln zu keinen bis wenigen Auswirkungen auf die Aktivität der Verdauungsenzyme (Smith, 1988; Chapple et al., 1989; Kreikemeier et al., 1990). Nach Gutscher (2002) sind Glucocorticoide an der Regulation des Zell-Turnovers im Darm beteiligt.

2.4.2.2 Bedeutung der Kolostralmilchaufnahme für den Neonaten

Die Kolostralmilch wird in den ersten Tagen nach der Geburt sezerniert. Sie versorgt das Neugeborene mit leicht verdaulichen Nährstoffen, die optimal auf die Bedürfnisse des noch unreifen Darmes der Neonaten abgestimmt sind. Neben der Nährstoffbereitstellung werden auf das Jungtier Wachstumsfaktoren, verschiedene bioaktive Substanzen, Hormone, hydrolytische Enzyme und Immunglobuline übertragen. Die bioaktiven Substanzen können z.B. vor Infektionen schützen und die Enzyme dienen der Verdauung. Die Immunglobuline dienen dem Aufbau einer passiven Immunität. Des Weiteren könnten diese Substanzen eine Wirkung auf die postnatale Entwicklung verschiedener Organe haben (Xu, 2003).

2.4.2.3 Zusammensetzung von Sauenmilch und Kolostrum

Im Vergleich zur reifen Milch besitzt das Kolostrum eine andere Zusammensetzung. So findet man im Kolostrum einen höheren Gehalt an Gesamtprotein, Casein, Milchserumprotein und Mineralstoffen. Die Konzentration an Laktose ist jedoch in der reifen Milch höher. Des Weiteren findet man im Kolostrum hohe Konzentrationen an fettlöslichen Vitaminen (A und E), β -Carotin, Hormonen und Wachstumsfaktoren (Gürtler

& Schweigert, 2005). In den folgenden Tagen post partum verändert sich die Zusammensetzung des Kolostrums sehr rasch, wobei es zu einem Abfall des Gehalts an Wachstumsfaktoren, Immunglobulinen, Vitaminen und Mineralstoffen kommt. Der Gehalt an Laktose und Fett steigt. Die genaue Zusammensetzung der Sauenmilch zeigt die Tabelle 2.3.

Tab. 2.3: Bestandteile der Sauenmilch (Xu, 2003)

Bestandteile	Beispiele
Proteine	Casein, Immunglobuline, Enzyme, Hormone, Wachstumsfaktoren, Lysozym, α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin, Lactoferrin
Nicht-Protein Stickstoffverbindungen	Nukleinsäuren, Nukleotide, Polyamine, Harnstoff, Harnsäure, Glucosamine
Kohlenhydrate	Lactose, Oligosaccharide, Glycoproteine
Lipide	Fettlösliche Vitamine (A, Carotin, D, E, K), Fettsäuren, Phospholipide, Triglyceride
Mineralstoffe und Ionen	Kalzium, Chlorid, Magnesium, Phosphat, Sulfat, Natrium, Kalium
Spurenelemente	Cobalt, Eisen, Mangan, Molybdän, Nickel, Selen, Zink
Wasserlösliche Vitamine	Biotin, Folsäure, Niacin, Panthotensäure, Riboflavin, Thiamin, Vitamin B ₁₂ , Vitamin B ₆ , Vitamin C
Zellen	Epithelzellen, Neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Eosinophile Granulozyten

Die im Kolostrum in höherer Konzentration vertretenen Wachstumsfaktoren könnten eine Reihe physiologischer Funktionen im Ferkel ausüben, inklusive einer wichtigen Funktion bei der Reifung des Gastrointestinaltraktes (James et al., 1987). In Tabelle 2.4 sind die Gehalte der in der Sauenmilch enthaltenen Wachstumsfaktoren und Hormone des Kolostrums und der reifen Milch aufgelistet.

Tab. 2.4: Konzentrationen (ng/ml) der Wachstumsfaktoren und Hormone im Kolostrum und in der reifen Sauenmilch (Xu, 2003)

	Kolostrum	reife Milch	Quellenangabe
EGF	1572	190	Jaeger et al., 1987
IGF-I	301	10	Simmen et al., 1988
	136	12	Donovan et al., 1994
	541	nicht gemessen	Xu et al., 1996
IGF-II	291	15	Donovan et al., 1994
Insulin	12,4 ^a	2,5 ^a	Jaeger et al., 1987
	17 ^a	2,4 ^a	Weström et al., 1987
	16,5 ^a	nicht gemessen	Wang & Xu, 1996
TGF-β	190	nicht messbar	Xu et al., 1999

^aDie Werte der Publikationen wurden in ng/ml umgerechnet

2.4.2.4 Wirkungen des Kolostrums auf den Darm

Die Aufnahme der Kolostralmilch führt neben der lebensnotwendigen Energie- und Immunglobulinzufuhr auch zu einer Beeinflussung des Gewebewachstums und zur funktionellen Reifung des Gastrointestinaltraktes. So ist die Aufnahme des Kolostrums mit schnellem Wachstum des Darmes, erhöhter Pinozytoseaktivität der Darmmukosa sowie mit einer Veränderung der Bürstensaumenzyme assoziiert (Sangild et al., 2000). Schon lange ist bekannt, dass Milchdrüsensekret (vor allem Kolostrum) in vitro das Wachstum von Zellkulturen (Cera et al., 1987) und in vivo das Wachstum des Gastrointestinaltraktes (steigendes GIT Gewicht, Länge und DNA-Konzentration), unter anderem des Schweines (Widdowson et al., 1976) stimuliert. Da die Konzentration der in der Milch identifizierten Wachstumsfaktoren (siehe Kapitel 2.4.2.3) in der Kolostralmilch besonders hoch ist und auch Rezeptoren im Darm vorhanden sind, könnten diese Faktoren einen Einfluss auf die frühe postnatale Entwicklung haben (Zumkeller, 1992; Baumrucker & Blum, 1993; Donovan & Odle, 1994). Jedoch sind die Faktoren des Kolostrums nicht die alleinigen wachstumssteuernden Faktoren, es müssen auch die Wirkungen des endogenen Insulin und der GH-IGF-Achse berücksichtigt werden (Odle et al., 1996). Wachstum und Reifung des Gastrointestinaltraktes werden also durch kombinierte Wirkungen der verschiedenen Wachstumsfaktoren und Hormone beeinflusst, welche vor allem im ersten Kolostrum in hoher Konzentration vorhanden sind (Blum & Baumrucker, 2002). Beim Schwein scheint

EGF ein primär wichtiger Wachstumsfaktor mit Wirkungen auf den Gastrointestinaltrakt zu sein (Kelly, 1994). Damit eine trope Wirkung auf den Darm möglich ist, müssen die Wachstumsfaktoren der Milch die Magen-Darm-Passage überleben, um in ausreichender Konzentration an den Rezeptor binden zu können. Da beim Neonaten die Sekretion von Magensäure und die Fähigkeit zur proteolytischen Verdauung noch nicht vollständig ausgebildet sind, können die Wachstumsfaktoren mit Peptidstruktur den Dünndarm in aktiver Form erreichen. Zusätzlich weisen z.B. EGF und IGF noch eine Säurestabilität auf, was sich positiv auf die Passage durch den Magen auswirkt (Hartman et al., 1961). Untersuchungen beim säugenden Ferkel zeigen, dass EGF die Magen-Darm-Passage überlebt und seine biologische Aktivität erhalten bleibt (Shen & Xu, 1998). Somit ist eine lokale und systemische Wirkung der Wachstumsfaktoren aus der Milch möglich (Gauthier et al., 2006). Wie auch für die postnatale Verfügbarkeit für maternale Antikörper diskutiert, spielt die Schließung der Darmschranke auch für die Wachstumsfaktoren eine Rolle. Beim Schwein endet diese Makromolekülresorption innerhalb der ersten ein bis zwei Tage post partum (Weström et al., 1985). Für diesen Verschluss der Darmschranke gibt es unterschiedliche Theorien. Nach Smith (1988) beruht diese Schließung auf dem Ersatz der fötalen Darmzellen durch Darmzellen, die die Fähigkeit dieser Resorption nicht besitzen. Die andere Theorie besagt, dass die Induktion der Schließung durch Veränderungen der Enterozyten selbst im Laufe ihrer Reifung geschieht, wobei diese Veränderungen an der basolateralen Membran beginnen und somit hier der Makromolekültransport innerhalb von 12 bis 36 Stunden eingestellt wird (Shen & Liechty, 2003). Apikal können die Makromoleküle für etwa drei Wochen in die Zellen aufgenommen werden (Lecce & Broughton, 1973; Shen & Xu, 2000). Die Mechanismen, die für die Schließung der Darmschranke verantwortlich sind bleiben ungeklärt, jedoch scheint das Kolostrum selbst eine wichtige Rolle bei der Schließung der Darmschranke zu spielen (Weström et al., 1985). So bewirkt eine Kolostruminfusion bei Föten eine sinkende Makromolekülresorption (Sangild et al., 1999).

2.4.3 Aufrechterhaltung des Funktionszustandes im reifen Darm

Im gesunden, reifen Darm befinden sich die auf- und abbauenden Vorgänge zunächst im Gleichgewicht. Es ist kein Überwiegen der Zellteilung notwendig um ein Wachstum zu erzielen. Lediglich die entstehenden Zellverluste im Rahmen des normalen Zell-Turnovers werden durch eine entsprechend hohe Mitoserate ausgeglichen (Potten et al., 1997). Jedoch

handelt es sich beim normalen Zell-Turnover aufgrund der sehr hohen Turnoverrate (siehe auch Kapitel 2.2.3) um einen beträchtlichen Zelldurchsatz. Allerdings kann die Gleichgewichtslage sehr wohl verändert werden, so dass sich der Darm an höchst variable Anforderungen durch Menge und Zusammensetzung der Nahrung anzupassen vermag.

Neben klassischen wachstumsfördernden Hormonen reagiert die Mukosa des Darmes auch auf zahlreiche andere Faktoren, die durch die Nahrungsaufnahme und die Verdauung bereitgestellt werden.

Das Wachstum der Mukosa wird durch drei Hauptfaktoren stimuliert:

Gastrointestinale Peptide, Luminale Faktoren und hormonale Signale.

2.4.3.1 Gastrointestinale Peptide

Die gastrointestinalen Peptide werden von den Mukosazellen des Gastrointestinaltrakts sezerniert. Sie regulieren das Wachstum im Dün- und Dickdarm (Johnson, 1986). Zu den gastrointestinalen Peptiden gehört das Gastrin, Somatostatin, Bombesin, Enteroglucagon, Sekretin und das EGF.

2.4.3.2 Luminale Faktoren

Hierbei handelt es sich um Substanzen, die vom Organismus oder von Bakterien synthetisiert werden oder um Nahrungsbestandteile. Als Beispiele können die Polyamine, Purine oder die aus der Rohfaserfermentation entstehenden kurzkettigen Fettsäuren genannt werden.

Polyamine werden als intrazelluläre Mediatoren der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung angesehen (Johnson & McCormack, 1994; Heby et al., 1992; Seiler, 1990). Bei der Polyaminsynthese muss Ornithin decarboxyliert werden, dies geschieht mit Hilfe des Enzyms Ornithin Decarboxylase (ODC). Die Aktivität der ODC steht unter der Kontrolle von gastrointestinalen Peptiden wie Gastrin und Wachstumsfaktoren wie EGF. So erhöht EGF die ODC-Aktivität sowohl im Dün- als auch im Dickdarm (Ulshen et al., 1986; Johnson et al., 1992). Weitere Polyaminquellen sind z.B. die Nahrungsbestandteile und die Polyaminsynthese durch Bakterien.

Bei den Purinen handelt es sich um Bausteine der Nukleotide. Die Nukleotide wiederum sind Bausteine der Nukleinsäuren (DNA und RNA). Das heißt, dass die Bereitstellung von Purinen eine Voraussetzung für den Ablauf der Mitose ist. Somit besitzen Organe mit

einem schnellen Turnover wie z.B. das Darmgewebe einen hohen Bedarf an Nukleotiden (Griffith & Jarvis, 1996). Quellen der Nukleotide sind einerseits die Nahrung und andererseits auch eine Neusynthese aus Aminosäuren oder eine Wiederverwertung von Nukleotiden und Basen (Vizzotto et al., 1996; Veerabagu et al., 1996).

Die wachstumsstimulierende Wirkung auf die Darmmukosa durch die im Dickdarm aus Rohfaser fermentierten kurzkettigen Fettsäuren könnte auf der Beeinflussung des pH-Wertes des Darminhaltes beruhen (Jacobs & Lupton, 1982).

2.4.3.3 Hormonale Signale

Das endokrine System stellt eine wichtige regulatorische Komponente des Stoffwechsels und des Wachstums dar.

Klassische, das Wachstum beeinflussende Hormone sind:

Wachstumshormon (GH) / Insulin-like growth factors (IGF-I und II):

Die Wachstumsprozesse des GH's werden im adulten Tier auch indirekt durch die Wachstumsfaktoren IGF-I und II vermittelt (Karg, 1994). GH wirkt anabol und ist in die Wachstumsregulation verschiedener Gewebe involviert. Hauptzielorgane sind die Leber, der Skelettmuskel, der Knochen (und Knorpel) und das Fettgewebe. GH-Rezeptoren werden beim Schwein in vielen Geweben wie Muskulatur, Fettgewebe und Leber gefunden (Breier et al, 1989; Gluckman & Breier, 1989; Etherton, 1989). Bei anderen Spezies werden GH Rezeptoren auch im Dünndarm gefunden (Herington et al, 1991). Die GH Wirkung beruht unter anderem auf der Beeinflussung des Protein-, Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsels. Die Abbildung 2.8 zeigt die indirekten Wirkungen des GH. Die IGF's besitzen zum einen die Eigenschaften von endokrinen Hormonen und zum anderen die Eigenschaften von mitoseinduzierenden Wachstumsfaktoren, die autokrin oder parakrin vermittelt werden. Beim adulten Tier ist vor allem IGF-I biologisch aktiv. Dem lokal unter GH Stimulation produzierten IGF kommt größere Bedeutung zu als dem endokrinen IGF. So besitzt IGF vor allem mitogene und differenzierungsfördernde Wirkungen der Wachstumsfaktoren und nur in hohen Konzentrationen endokrin vermittelte insulinähnliche Effekte. Die Produktion erfolgt in der Leber und in vielen anderen Organen. IGF-II wird unabhängig vom GH sezerniert und spielt vor allem beim fötalen Wachstum (siehe Kapitel 2.4.1) eine Rolle (Hossner, 2005).

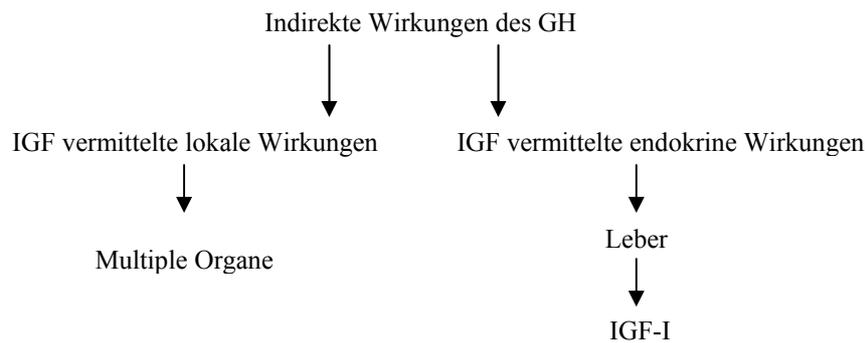


Abb. 2.8: Darstellung der indirekten GH-Wirkungen

Insulin:

Dieses Hormon zeigt durch Erhöhung des Glucose- und Aminosäuretransport in die Zellen in beinahe allen Geweben eine anabole Wirkung.

Schilddrüsenhormone:

Schilddrüsenhormone spielen eine wichtige Rolle beim Wachstum, wobei das T₃ eine stärkere Wirkung zeigt als das T₄. Fehlen die Schilddrüsenhormone wird weniger GH produziert und allgemeine Wachstumsstörungen entstehen.

Glucocorticoide:

Bei den Glucocorticoiden handelt es sich um Steroidhormone, von welchen beim Schwein das Cortisol der wichtigste Vertreter ist. Ihre Wirkung entfalten sie über Glucocorticoidrezeptoren, die in beinahe allen Geweben lokalisiert sind. Glucocorticoide spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation des Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsels, wobei sie eine proteinkatabole Wirkung besitzen. Glucocorticoide sind im Darm außerdem an der Regulation des Zell-Turnover beteiligt (Gutscher, 2002).

Sexualhormone:

Postnatal greifen die Sexualhormone deutlicher in das Wachstum ein und zeigen ihre Wirkungen (Wittmann, 2005). Sowohl Androgene als auch Östrogene besitzen anabole Wirkungen und beeinflussen so das Wachstum und den Proteinansatz. Androgene wirken direkt anabol über den Androgenrezeptor. Sie stimulieren vermutlich direkt die Proteinsynthese und begünstigen die Aminosäureaufnahme in die Zelle (Claus & Weiler, 1994). Des Weiteren wirken Androgene antikatabol durch Interaktionen mit dem Glucocorticoidsystem (Mayer & Rosen, 1975). Östrogene wirken schwächer anabol, indem sie durch Beeinflussung der GH-IGF-I-Achse sowie Insulin die Protein- und Fettsynthese fördern (Claus & Weiler, 1994).

Andere Wachstumsfaktoren (WF):

Die unter anderem für die Zellproliferation und Zelldifferenzierung wichtigen WF spielen natürlich auch im ausgereiften Darm eine wichtige Rolle. Im Rahmen des Zell-Turnovers im Darm wird die Mitose z.B. durch die Wachstumsfaktoren IGF, EGF, FGF und TGF- α reguliert (Pimentel, 1994).

2.5 Allgemeine Bemerkungen zu den Wachstumsfaktoren

Bei den Wachstumsfaktoren handelt es sich um eine Gruppe von Polypeptiden, die als Botenstoffe dienen und so Informationen von Zelle zu Zelle weiterleiten. Sie binden an spezifische Zellrezeptoren um das Zellwachstum, -differenzierung und -funktion zu modulieren (Cross & Dexter, 1991; Uribe & Barrett, 1997). Auch die Expression von Transkriptionsfaktoren wie z.B. c-jun, fog und erg, die wichtig sind für die Aktivierung oder Inaktivierung von Wachstums- und Proliferationsgenen wird durch Wachstumsfaktoren moduliert (Podolsky, 1994). So führt der Entzug von Wachstumsfaktoren zur Apoptose von Zellen in Zellkultur und die Zugabe von Wachstumsfaktoren führt zur Proliferation und/oder zum Survival von Zellen (Collins et al., 1993). Hormone, die in spezifischen endokrinen Organen synthetisiert werden dienen auch als Botenstoffe und gelangen über das Blut (endokrin) an ihren spezifischen Wirkort, wo sie an ihren Rezeptor binden und so ihre Information ans Zellinnere weitergeben. Im Zellinneren entsteht ein Signal, das über weitere Signalübertragungen zur Aktivierung oder Abschaltung von Genen führt und so z.B. auf das Wachstum oder die Differenzierung der Zelle Einfluss nimmt. Im Gegensatz zu den Hormonen ist die Synthese der Wachstumsfaktoren nicht an ein spezifisches Organ gebunden und die Wirkung auch nicht auf bestimmte Organe beschränkt.

Wachstumsfaktoren wirken lokal. Hierbei unterscheidet man parakrine, autokrine, intrakrine und juxtakrine Wirkungswege. Autokrin bedeutet, dass die Zelle auf Substanzen reagiert, die sie selbst produziert hat. Die Substanzen werden freigesetzt und wirken über Rezeptoren an der Zelloberfläche. Bei der parakrinen Signalübertragung wirken die freigesetzten Botenstoffe auf unmittelbar benachbarte Zellen und bei der intrakrinen Signalübertragung werden die Botenstoffe nicht in den Extrazellulärraum abgegeben, sondern binden an einen intrazellulären Rezeptor. Eine weitere Möglichkeit interzellulär Informationen weiterzugeben ist die juxtakrine Signalübertragung, diese wurde erstmals für TGF- α festgestellt (Anklesaria et al., 1990). Bei dieser Signalübertragung sind die

Liganden noch als Präpromoleküle an der Zelloberfläche lokalisiert und binden so an ihren Rezeptor auf unmittelbar benachbarten Zellen. In der Abbildung 2.9 sind die Wirkungswege endokrin, parakrin, autokrin, intrakrin und juxtakrin schematisch dargestellt.

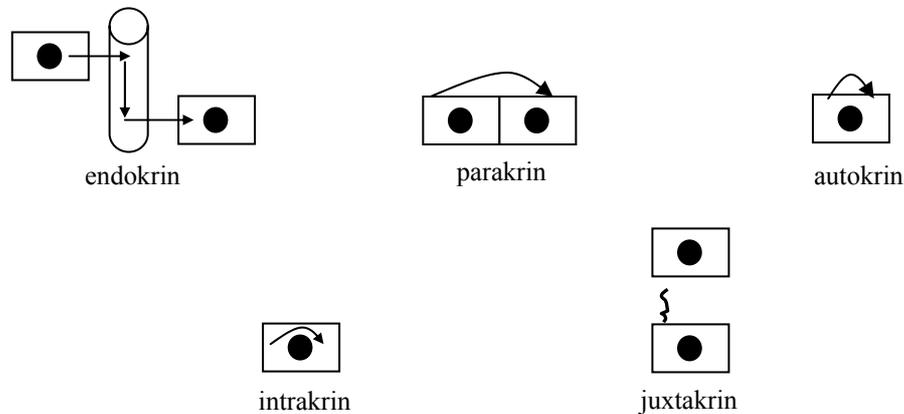


Abb. 2.9: Schematische Darstellung endokriner, parakriner, autokriner, intrakriner und juxtakriner Wirkungswege (modifiziert nach Meinecke, 2005)

2.6 Bedeutung des epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)

2.6.1 Übersicht über das Vorkommen des EGF beim Schwein und anderen Spezies

EGF wurde in vielen Geweben und verschiedenen Körperflüssigkeiten von mehreren Tierarten beschrieben. Bei der Maus wurde EGF z.B. in der Glandula mandibularis (Gresik & Barka, 1978), im Uterus (Huet-Hudson et al., 1990), in der Milchdrüse (Brown et al., 1989), im Gastrointestinaltrakt (Schaudies et al., 1989), in der Niere (Rall et al., 1985) und im Pankreas (Rall et al., 1985) nachgewiesen. Beim Mensch konnte EGF unter anderem im Uterus (Haining et al., 1991), im Eileiter (Lei & Rao, 1992), im Urin (Gregory, 1975), im Blutserum (Nexo et al., 1992), in Brunner Drüsen des Duodenums und in der Submandibulardrüse (Heitz et al., 1978) nachgewiesen werden. Wobei die Speicheldrüsen die Hauptquellen des EGF beim Menschen darstellen (Murphy, 1998). Des Weiteren wurden in der Nachbarschaft von Magen-Darmulzera Gobletzell-ähnliche Zellen entdeckt, die den EGF produzieren (Wright et al., 1990). Die EGF Konzentrationen im Plasma sind im Vergleich zu anderen Körperflüssigkeiten, wie Speichel oder Milch, beim Mensch und Nager sehr gering (Fisher & Lakshmanan, 1990). Auch die Quellen des zirkulierenden EGF sind noch unbekannt, eine mögliche Quelle könnte die Resorption von EGF aus dem

Darm sein (Rao et al., 1991). Poulsen et al. (1986) wiesen den EGF bei Ratte und Mensch noch in den Panethzellen des Dünndarms, in serösen Drüsen der Nase und in Tubuluszellen der Niere nach. Auch im Milchdrüsensekret von Maus (Byyny et al., 1974), Mensch (Carpenter, 1980) und Schwein (Vaughan et al., 1992A) sowie in der Milch und im Kolostrum verschiedener anderer Spezies (Koldovsky & Thornburg, 1987) ist EGF zu finden. Beim Schwein wird EGF in den Gobletzellen des Dünndarmes (Claus et al., 2001) synthetisiert. Innerhalb des GIT wurde EGF bei Schweinen im Alter von 4 – 28 Tagen postnatal in den Krypten und Zotten des Dünndarmes nachgewiesen (Jaeger & Lamar, 1992). Andere Gewebe des Schweines in denen EGF nachweisbar ist, sind z.B. die Niere und Pankreas (Vaughan et al., 1992A), im weiblichen Genitaltrakt das Endometrium und Eileiter (Kennedy et al., 1994) sowie die Speicheldrüsen (Jaeger & Lamar, 1992). Des Weiteren wird der EGF im Kolostrum und im Urin des Schweines gefunden (Vaughan et al., 1992A). Die EGF Konzentration im Kolostrum des Schweines ist um ein vielfaches höher als in der reifen Milch. So zeigen Messergebnisse von Jaeger et al. (1987) im Kolostrum einen EGF Gehalt von 1572 ng/ml und in der reifen Milch von 190 ng/ml (siehe auch Kapitel 2.4.2.3). Auch in Schweineembryonen konnte EGF nachgewiesen werden (Vaughan et al., 1992B).

2.6.2 Eigenschaften des EGF

Beim epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) handelt es sich um ein Polypeptid aus 53 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von etwa 6045 Da (Savage et al., 1972). Die Polypeptidkette weist drei typische Disulfidbrücken auf, die für die Funktion des EGF von Bedeutung sind (Taylor et al., 1972). EGF wurde erstmals 1962 von Cohen als hitzestabiles Protein aus Mäusespeicheldrüsen isoliert und als Zahn-Lid-Faktor bezeichnet (Cohen, 1962). Nachdem *in vitro* Studien zeigten, dass dieser Faktor das Epithelwachstum beeinflusst, wurde er als epidermal growth factor (EGF) bezeichnet (Cohen, 1964). Anschließend erfolgte die Isolierung aus menschlichem Urin (Gregory, 1975) und aus Speicheldrüsen von Ratten (Simpson et al., 1985). Die Aminosäuresequenzen des EGF sind von Maus, Ratte, Meerschweinchen, Mensch, Schwein (Pascall et al., 1991) und Pferd (Stewart et al., 1994) bekannt. Die Abbildung 2.10 zeigt das EGF Molekül der Maus mit Angabe der beim Schwein unterschiedlichen Aminosäuren. 64% der Aminosäuren des EGF Moleküls sind zwischen Schwein, Mensch, Ratte und Maus identisch (Jorgensen et al., 1998). EGF wird als großes membrangebundenes Präpromolekül, das aus etwa 1200

Aminosäuren besteht synthetisiert (Gray et al., 1983; Scott et al., 1983). Das Präpromolekül enthält neben der Sequenz des EGF noch die Sequenzen von acht EGF-ähnlichen Molekülen sowie nahe am Carboxylende eine hydrophobe Sequenz, die die Charakteristika von membranären Proteinen zeigt. Das Präpromolekül enthält Sequenzen, die zu einem hohen Prozentsatz zwischen den Spezies Mensch, Ratte, Maus und Schwein übereinstimmen (Jorgensen et al., 1998). Das EGF-Präpromolekül des Schweines besteht aus 1214 Aminosäuren und stimmt zu 81% mit dem humanen und zu 66% mit dem murinen Präpromolekül überein (Kim et al., 2001). In der Niere findet man EGF als membrangebundenes Präpromolekül in distalen Tubuluszellen. In anderen Geweben, wie z.B. der Submandibulardrüse wird das EGF-Präpromolekül intrazellulär zum 53 Aminosäuren großen EGF-Molekül gespalten (Jorgensen, 1997). Auch das Präpromolekül zeigt biologische Aktivität. In Homogenaten von Mäusespeicheldrüsen findet man Komplexe aus EGF mit EGF-Bindeproteinen (HMW-EGF) (Taylor et al., 1970). Der HMW-EGF (74 kDa) besteht aus zwei EGF-Bindeproteinen (je 29 kDa) und aus zwei EGF Molekülen (je 6,4 kDa). Sowohl EGF als auch HMW-EGF besitzen EGF-Aktivität, jedoch ist die Aktivität des HMW-EGF geringer als die von EGF. Die Freisetzung von EGF aus dem HMW-EGF Komplex erfolgt durch proteolytische Spaltung mit Hilfe des EGF-Bindeprotein (Taylor et al., 1973). Beim EGF-Bindeprotein handelt es sich um eine Arginin-Esterase (Byyny et al., 1972). Diese HMW-EGF Komplexe wurden auch im Urin und Serum des Menschen gefunden (Nexo et al., 1992).

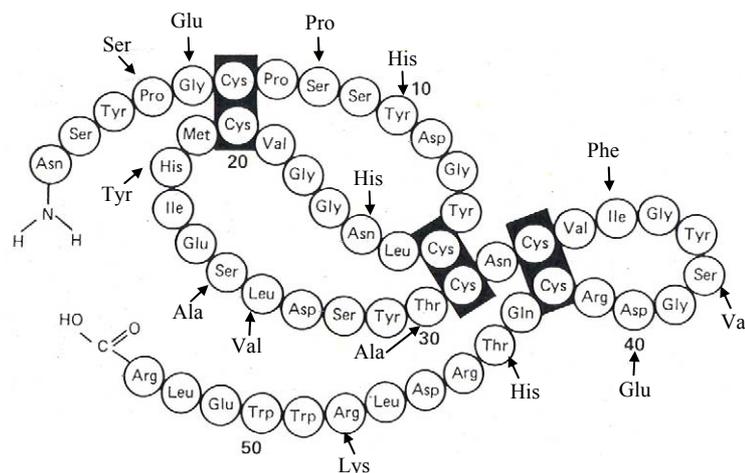


Abb. 2.10: Struktur des murinen EGF (Brown & Blay, 1986), mit Angabe der beim Schwein unterschiedlichen AS (Pascall et al., 1991)

2.6.3 Funktionen

2.6.3.1 Übersicht über die Funktionen des EGF

Bei der erstmaligen Isolierung von EGF stellte Cohen (1962) bei neugeborenen Mäusen, die Extrakte von Speicheldrüsen verabreicht bekamen, fest, dass unter anderem eine frühzeitige Öffnung der Augen, sowie ein frühzeitiger Durchbruch der Schneidezähne erfolgte. In Zellkultur stimuliert EGF die Synthese von DNA in verschiedenen Zelltypen (Carpenter & Cohen, 1979). In Organkulturen führt EGF z.B. zu beschleunigter Proliferation und Differenzierung von epithelalem Gewebe, wie z.B. Haut (Cohen, 1965; Bertsch & Marks, 1974), Korneaepithel (Savage & Cohen, 1973) und Mammaepithelgewebe (Turkington, 1969). In vivo zeigt EGF eine stimulatorische Wirkung auf die Proliferation von epidermalem Gewebe (Cohen & Elliott, 1963), wie Haut und Epithel der Lunge, Trachea, Kornea und des Gastrointestinaltraktes (Yates et al., 1991). Des Weiteren stimuliert EGF die DNA-Synthese der Magen- und Duodenalmukosazellen (Dembinski et al., 1982). Im Magen inhibiert EGF die Sekretion der Magensäure und schützt so die Magenschleimhaut vor Schäden, die durch die Säure bedingt sind (Kirkegaard et al., 1983; Olsen et al., 1984). EGF ist zudem ein Regulator des prä- und postnatalen Wachstums, indem er die Zellteilung und Differenzierung verschiedener Zelltypen beeinflusst (Carpenter & Wahl, 1990). So beschleunigt der EGF bei fötalen Lämmern die Entwicklung der Haut (Dolling et al., 1983) und der Lunge (Sundell et al., 1980). Die Beeinflussung der Zellteilung erfolgt durch Wirkungen auf den Zellzyklus (siehe Kapitel 2.4).

Die Tatsache, dass EGF lokal z.B. in der Speicheldrüse, Niere und Milchdrüse produziert wird und direkt in die Sekrete gelangt, spricht dafür, dass die Hauptrolle des EGF bei adulten Spezies die physiologische Aufrechterhaltung der Funktionen von epithelialen Flächen ist (Fisher & Lakshmanan, 1990).

Oka & Orth (1983) fanden nur niedrige Konzentrationen von EGF im Plasma, daraus kann abgeleitet werden, dass eine para- oder autokrine Wirkungsweise vorherrschend ist (Bradshaw & Sporn, 1983).

2.6.3.2 Funktionen des EGF im Darm

Die Regulation der Proliferation und des Gleichgewichtes zwischen Zellerneuerung, Differenzierung und Zelleralterung wird durch die Interaktionen vieler Faktoren bewerkstelligt. Hierzu zählen unter anderem Nährstoffe, andere luminal Bestandteile,

Hormone und Sekretionsprodukte des Gastrointestinaltraktes. In diesem Zusammenhang spielen auch die Wachstumsfaktoren mit Peptidstruktur, wie EGF eine wichtige Rolle. Bedingt durch die weite Verteilung der EGFR im Gastrointestinaltrakt (siehe Kapitel 2.7.1) besitzt EGF neben seiner mitotischen Aktivität, die zur erhöhten Zellproliferation führt, noch zahlreiche andere Funktionen. So erhöht EGF z.B. im Darm die Aktivität von Dissaccharidasen und neonatale Reifevorgänge, sowie das fötale Wachstum. Vermutlich spielt das ins Darmlumen sezernierte EGF eine wichtige Rolle beim Erhalt der normalen Darmstruktur und -funktion (Bragg et al., 1990).

Die Abbildung 2.11 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen Funktionen von EGF und EGF-ähnlichen Peptiden im GIT.

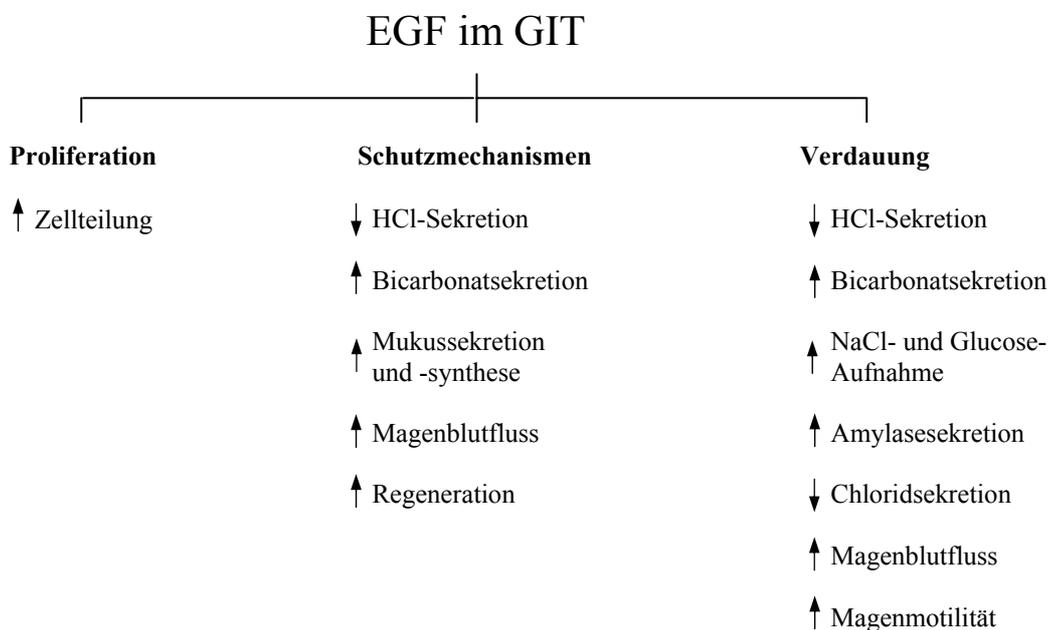


Abb. 2.11: Übersicht zu den verschiedenen Funktionen des EGF

(nach Uribe & Barrett, 1997)

Nachfolgend werden einige Funktionen des EGF genauer erläutert:

EGF stimuliert die Proliferation des Darmepithels bei adulten Tieren (Goodlad et al, 1985; Goodlad et al., 1987A) und Menschen (Walker-Smith et al., 1985). Diese proliferative Wirkung beruht unter anderem auf der Induktion der Polyaminsynthese. In diesem Zusammenhang führt EGF zu einer erhöhten Produktion des Enzyms ODC (Fitzpatrick et al., 1987; Daniele & Quaroni, 1991) (siehe auch Kapitel 2.4.3). Die Regulation des Enzyms ODC zeigt, dass EGF auch die Fähigkeit besitzt die Expression von Enzymen, die mit Wachstum assoziiert sind, zu erhöhen.

Die proliferationsfördernde Wirkung des EGF spielt z.B. bei der Heilung gastrointestinaler Ulzera eine Rolle. Die Heilung der Mukosa umfasst die Reepithelisierung der entblößten

Basalmembran durch Zellteilung in der Kryptenregion. In diesem Zusammenhang führt EGF zu einer Erhöhung der Epithelzellteilung (Marti et al., 1989), somit ist die Zellproliferation eine wichtige Komponente bei der durch EGF induzierten Heilung von gastrointestinalen Ulzera (Konturek et al., 1988). Studien von Konturek et al. (1981) bei Ratten zeigen, dass EGF acetylsalicylsäureinduzierte Magenulzera - unabhängig von der Hemmung der Magensäuresekretion - verhindern kann. EGF kehrt hierbei die durch die acetylsalicylsäurebedingte Abnahme der DNA-Synthese um. Diese Studie zeigt, dass EGF nach topikaler Gabe auf die Magenmukosa zytoprotektive Wirkungen zeigt, wachstumsfördernd auf die Mukosa wirkt und somit einen Schutzfaktor der Mukosa gegen verschiedene Noxen darstellt (Konturek et al., 1981). Gleiche Ergebnisse zeigen Studien von Skov-Olsen et al. (1984), hier wurde bei Ratten die zytoprotektive Wirkung von EGF auf Magenulzera bestätigt. So konnte EGF-haltiger Speichel die Entwicklung von Magenläsionen nach Entfernung der Speicheldrüsen und Verabreichung von ulzerogenem Cysteamin verhindern. Diese EGF-Wirkungen könnten auch durch die Erzeugung von Polyaminen vermittelt werden, da eine Hemmung der ODC den protektiven Effekt des EGF reduziert (Uribe & Barrett, 1997).

EGF spielt auch eine Rolle bei der strukturellen und funktionellen gastrointestinalen Adaptation an neue Gegebenheiten z.B. nach totaler parenteraler Ernährung (TPE) oder nach chirurgischer Resektion von Darmanteilen. In diesem Zusammenhang ist sowohl die proliferationsfördernde als auch die differenzierungsfördernde Wirkung des EGF von Bedeutung. Die TPE oder Darmresektion führt zu einer Hypoplasie der Zotten und Krypten und zu verminderter Verdauungs- und Resorptionskapazität. Die Adaptation ist durch Zunahme der Länge und des Durchmessers des Darmes, durch Hyperplasie und Hypertrophie aller Darmwandschichten sowie durch eine erhöhte Resorptions- und Verdauungskapazität gekennzeichnet. Untersuchungen bei Ratten zeigen, dass die Verabreichung von EGF das Wachstum von hypoproliferativem Darmepithel nach TPE stimuliert (Goodlad et al., 1987B). Auch nach erfolgter Dünndarmresektion erhöht EGF die Proliferation der Kryptenzellen und hemmt die zunehmende Apoptoserate, die nach einer Darmresektion auftritt (Stern et al., 2000). Untersuchungen von O'Loughlin et al. (1994) zeigen bei Kaninchen den Einfluss des EGF auf die Funktionalität des Darmes nach massiver Resektion des Jejunums, so erhöht die Verabreichung von oralem EGF die Maltaseaktivität und die Glucoseresorption. Auch nach erfolgter Dünndarmtransplantation bei Ratten fördert EGF die Adaptation des Darmes, indem er die Wiederherstellung der Mukosastruktur sowie ihre Funktionalität (Anstieg der Glucose Resorption und Induktion

der Dissaccharidaseaktivität) erhöht (Nakai et al., 2004). Somit ist EGF für den Erhalt der proliferativen Aktivität der Mukosa sowie durch Beeinflussung der weiteren Epithelzellreifung im Zottenbereich für die Bürstensaumenzymaktivität von Bedeutung.

Auch im mikrobiell infizierten und dadurch geschädigten Darm ist EGF funktionell von Bedeutung. So zeigen Untersuchungen von Zijlstra et al. (1994), dass oral verabreichtes EGF die Laktase-Aktivität im Dünndarm von rotavirusinfizierten Ferkeln erhöht, jedoch konnte das Auftreten von Durchfall nicht verhindert werden.

Oral verabreichtes EGF könnte auch die Besiedlung des Darmes durch Pathogene beeinflussen. Bei Untersuchungen an Kaninchen (Buret et al., 1998), welche mit enteropathogenen E.coli infiziert wurden, konnte durch die orale Gabe von EGF eine Durchfallerkrankung verhindert werden. Die Tiere zeigten eine Hemmung der Darmbesiedlung durch E.Coli, eine Verminderung der Beeinträchtigung der Dissaccharidasen und eine reduzierte Schädigung der Mikrovilli. Die Mechanismen dieser Wirkungen sind nicht bekannt, jedoch kann eine direkte antibakterielle Wirkung des EGF gegen E.coli durch in vitro Untersuchungen ausgeschlossen werden (Buret et al., 1998). Des Weiteren sind diese EGF-Wirkungen unabhängig von einer kompetitiven Bindung an den EGFR, welcher z.B. von Reoviren genutzt wird, um in die Zellen zu gelangen (Strong et al., 1993). Auch bei der Zellinvasion von Salmonella typhimurium (Galan et al., 1992) und Vacciniaviren (Eppstein et al., 1985) ist der EGFR beteiligt. Die Untersuchungen von Eppstein et al. (1985) zeigen, dass eine Besetzung des EGFR durch EGF die Infektion von Zellen durch das Vacciniavirus inhibiert.

EGF ist als Survivalfaktor auch in der Lage Enterozyten vor Apoptose zu schützen bzw. die Apoptose zu verzögern (O'Brien et al., 2001; Hague et al., 1997).

EGF beeinflusst die Mukusproduktion und -sekretion der Gobletzellen und trägt somit zum Schutz der Mukosa bei. Der Mukus dient dabei als Barriere gegenüber zytotoxischen Wirkungen. Studien zeigen, dass eine Inkubation von Mukosazellen mit EGF zu einer ansteigenden Mukussynthese (Kelly & Hunter, 1990) und -sekretion (Yoshida et al., 1987) im Magen und im Duodenum (Yoshikawa, 1993) führt. Auch Studien von Ishikawa et al. (1994) zeigen, dass luminales EGF durch erhöhte Mukussekretion der Gobletzellen die Dünndarmmukosa gegen lipid-induzierte Schäden schützt (Ishikawa et al., 1994). Die Beeinflussung der Mukussekretion scheint zumindest in vitro, durch die Produktion von Prostaglandinen vermittelt zu sein (Shimamoto et al., 1993).

Aufgrund des Vorkommens des EGF in verschiedenen Körperflüssigkeiten inklusive der Milch und der Amnionflüssigkeit wird vermutet, dass EGF eine Rolle bei der Entwicklung des GIT spielt. Dies trifft sowohl für die prä- als auch die postnatale Entwicklung zu. Wachstumsfaktoren mit Peptidstruktur bzw. deren mRNA konnten schon in frühen Embryonalstadien nachgewiesen werden (Whitman & Melton, 1989). Dies lässt vermuten, dass diese Faktoren eine Rolle bei der pränatalen Regulation der Zellproliferation und/oder Zelldifferenzierung spielen. Studien von Werb (1990) an Mäuseembryonen zeigen, dass die EGF-mRNA *in vivo* erst ab Tag 9 nachweisbar ist und dann kontinuierlich ansteigt. EGF wird also nicht vor der Implantation exprimiert. Vor der Implantation wird EGF lediglich im Uterus exprimiert. Dieses maternale EGF scheint auch auf den Embryo zu wirken. Sobald die Organogenese beginnt, exprimiert der Embryo selbst EGF. Untersuchungen zur Expression des EGF beim Schweineembryo zeigen, dass EGF erst nach der Elongation etwa ab Tag 15 der Trächtigkeit nachweisbar ist und bis zum Tag 22 ansteigt (Vaughan et al., 1992B). Die Implantation beim Schwein beginnt etwa am Tag 12 der Trächtigkeit (Rüsse, 1994), somit ist eine Parallelität der EGF-Expression zwischen Maus und Schwein erkennbar. Andere Untersuchungen konnten jedoch sowohl EGF- als auch EGFR-mRNA in IVF- (*in vitro* fertilization) und SCNT- (somatic cell nuclear transfer) Schweineembryonen schon vor der Implantation nachweisen (Gab et al., 2005). Bei diesen Untersuchungen konnte außerdem eine Wirkung auf die Zellzahl der Blastocyste bei den SCNT-Embryonen durch Zugabe von EGF zum Kulturmedium festgestellt werden. Auch bei anderen Spezies wirkt EGF mitogen und stimuliert die Differenzierung des Embryos (Maus: Wood & Kaye, 1989; Mensch: Martin et al., 1998; Ratte: Tamada et al., 1999) vor der Implantation. Im Darm des Schweineembryos wurde EGF vor allem an der apikalen Fläche der embryonalen Darmschleife gefunden (Vaughan et al., 1992B). Somit könnte EGF eine wichtige Rolle bei der Regulation der Organogenese des Darmes spielen. So zeigen Untersuchungen von Abud et al. (2005), dass EGF während der frühen Entwicklung für das Wachstum des Darmepithels von Bedeutung ist. Bei diesen Untersuchungen führte die Inhibition der EGFR-Funktion zu einer reduzierten Proliferation und zu einer geringeren Überlebensrate der Darmepithelzellen in Organkultur. Weitere Untersuchungen an Mäusen mit inaktiviertem EGFR-Gen zeigen auch eine Beeinträchtigung der Darmepithelentwicklung (Miettinen et al. 1995). Diese Untersuchungen zeigen, dass das EGF-System eine wichtige Rolle bei der Regulation der Darmepithelzellproduktion spielt sowie für eine normale Entwicklung des Darmes von Bedeutung ist. Bei der Entwicklung ist die Fähigkeit der Wachstumsfaktoren die

Zellproliferation zu stimulieren und somit wachstumsfördernd zu wirken natürlich von besonderer Bedeutung (Whitman & Melton, 1989). So stimuliert die topische Gabe von EGF auf fötale Organkulturen der Darmmukosa die DNA- und Proteinsynthese (Conteas et al., 1986). Andere Untersuchungen an Organkulturen zeigen, dass EGF die Regulation der Reifung der embryonalen Zotten-Krypten-Achse und die Gobletzellreifung beeinflusst (Duh et al., 2000). Auch in menschlichen Dünndarmkulturen beeinflusst EGF die Proliferation und Differenzierung des fötalen Gewebes (Ménard et al., 1988). Funktionell beeinflusst EGF die Entwicklung von einigen Bürstensaumenzymen in Organkulturen des Duodenums von Mäusen (Beaulieu et al., 1985) und auch in vivo beschleunigt EGF die Reifung dieser Enzyme, wenn es an trächtige Mäuse intraperitoneal verabreicht wird (Calvert et al., 1982).

Bei der postnatalen Entwicklung scheint EGF ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen. Der GIT der Neonaten unterliegt markanten funktionellen und strukturellen Veränderungen, diese scheinen unter anderem im Zusammenhang mit der Kolostrumaufnahme zu stehen. Die in der Milch in hoher Konzentration enthaltenen Hormone und Wachstumsfaktoren spielen diesbezüglich eine wichtige Rolle (Xu, 1996). Das apikale und basolaterale Vorkommen des EGFR an den Darmepithelzellen spricht zum einen für die direkte Wirkung des EGF von der luminalen Seite und zum anderen für eine Wirkung an den basolateralen Rezeptoren nach der Resorption des EGF bzw. könnte auch zirkulierendes EGF eine Rolle spielen (Kelly et al., 1992). Die mitogene Aktivität des Kolostrum-EGF könnte somit für das postnatale Darmwachstum von Bedeutung sein. So zeigen Untersuchungen an neonatalen Ratten, dass EGF trophisch auf den Darm wirkt (Berseth, 1987). Auch in vitro Untersuchungen zeigen, dass EGF in der humanen Milch für die Stimulation der DNA-Synthese von Bedeutung ist (Carpenter, 1980). Auch Sauenmilch besitzt in vitro wachstumsfördernde Eigenschaften (Cera et al., 1987). Neben der wachstumsfördernden Wirkung scheint EGF auch postnatal die Enterozytendifferenzierung zu modulieren und somit Einfluss auf die funktionelle Entwicklung des Darmes zu nehmen. So führt beim neonatalen Schwein die subkutane Injektion von EGF zu einem Anstieg der Saccharase- und Maltaseaktivität im mittleren und distalen Dünndarm (James et al., 1987). Auch Untersuchungen an säugenden Mäusen zeigen, dass die Injektion von EGF zu einer beschleunigten Reifung der Verdauungsfunktionen und zu einer ansteigenden Zellproliferation im Dünndarm führt (Malo & Ménard, 1982). Studien von O'Loughlin et al. (1985) an Kaninchen zeigen, dass intraperitoneal verabreichtes EGF die frühzeitige Entwicklung der Pankreasamylase fördert und orales EGF zur frühzeitigen

Reifung der Disaccharidaseaktivität führt (Anstieg der Saccharase, Abfall der Laktase). Bei dieser Studie wurden abhängig von der Art der Gabe des EGF unterschiedliche Wirkungen erzielt, dies könnte bedeuten, dass zirkulierendes und luminales EGF verschiedene Funktionen wahrnehmen. Neben der Beeinflussung der Enzymaktivitäten werden auch Resorptionsfunktionen durch die Gabe von EGF beeinflusst, so führt entweder die intraperitoneale oder orale Gabe von EGF an Kaninchen 3 Tage postnatal zu einem signifikanten Anstieg der Wasser-, Natrium- und Glucose-Resorption (Opleta-Madsen et al., 1991). Neben der Beeinflussung der Darmentwicklung könnte der EGF noch die Adaptation ans extrauterine Leben vermitteln (Weaver & Walker, 1988). Während dieser Anpassung an extrauterine Bedingungen könnten vor allem die mitogenen, antisekretorischen und zytoprotektiven Wirkungen des EGF von Bedeutung sein, da es in dieser Phase zu einer Beschleunigung der Epithelzellerneuerung und der Magensäuresekretion kommt (Weaver & Walker, 1988).

Die beschriebenen Wirkungen des EGF differieren je nach Spezies, Dosis und Art der Verabreichung des EGF. Deshalb ist keine allgemein gültige Aussage über die Funktionen des EGF möglich.

2.6.3.3 Wirkungsweise des EGF im Darm

Ob EGF seine Wirkungen im Darm von der luminalen Zellseite ausübt oder nicht wird in der Literatur viel diskutiert, genauso wie über die Lokalisation der EGF-Rezeptoren (siehe Kapitel 2.7.1).

Bei säugenden Tieren und Menschen herrscht die Meinung, dass EGF von der luminalen Seite aus seine Wirkung entfalten kann. So wirkt intraluminal verabreichtes EGF bei neugeborenen Ratten trophisch auf den Darm (Berseth, 1987). Laut Thompson et al., (1994) spielt das intraluminale EGF nur im unreifen Rattendarm eine Rolle, da hier bedingt durch die höhere Permeabilität des Darmes ein Transport zu den basolateralen Rezeptoren möglich sein könnte. Auch Rao et al. (1990) kommt zu den gleichen Ergebnissen und stellt fest, dass der transepitheliale Transport bei säugenden Ratten höher ist als bei adulten Ratten. Auch weitere Studien an Ratten zeigen bei luminal verabreichtem EGF proliferative (Reeves et al., 1991) und mukosaprotektive (Olsen et al., 1984) Wirkungen. Bei säugenden Nagern stimuliert auch parenteral verabreichtes EGF das Darmwachstum und die -reifung (Malo & Ménard, 1982; Oka et al., 1983; Feldman et al., 1978). Beim

Schwein wurden derartige Versuche zur Wirkung des EGF an rotavirusinfizierten Ferkeln durchgeführt. Diesen Tieren wurde oral EGF in hohen physiologischen Dosen mit der Milch verabreicht, wobei hier die Genesung des durch die Rotaviren geschädigten Darmes durch EGF im proximalen und mittleren Dünndarm im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe gefördert wurde (Zijlstra et al., 1994).

Die Entfaltung der EGF Wirkung von der luminalen Seite aus ist außerdem nur möglich wenn EGF die Magen-Darm-Passage in ausreichender Menge übersteht. Hierzu wurden zahlreiche Studien bei verschiedenen Tierarten und beim Menschen durchgeführt. Diese Studien zeigen, dass EGF im Magensaft von Kindern (Britton et al., 1989) und im Lumen des Gastrointestinaltraktes von säugenden Ratten (Britton et al., 1988) und Mäusen (Rao, 1995) stabil ist. Shen & Xu (1996) führten diese Untersuchungen bei säugenden Ferkeln durch und konnten feststellen, dass auch bei diesen Tieren EGF im Magen und proximalen Dünndarmlumen stabil ist. Generell ist der Abbau des EGF bei säugenden Tieren geringer ausgeprägt als bei älteren Tieren. Gründe dafür sind zum einen, dass z.B. bei säugenden Ferkeln die EGF spaltenden Enzyme Trypsin und Chymotrypsin nur geringe Aktivitäten aufweisen und zum anderen, dass sich im Kolostrum noch Proteaseinhibitoren, die eine potente inhibitorische Aktivität gegenüber Trypsin und Chymotrypsin aufweisen, befinden und so den Abbau von EGF markant reduzieren (Shen & Xu, 1996). Proteaseinhibitoren konnten auch in der Milch von Menschen (Lindberg et al., 1982) und Ratten (Weström & Carlsson, 1976) nachgewiesen werden. Nach Untersuchungen von Playford et al. (1995) beim Menschen und Rao (1995) bei der Maus ist bekannt, dass EGF im sauren Milieu des Magens unter Beteiligung von Pepsin einer Spaltung am C-terminalen Ende unterliegt. Die dabei entstehenden gekürzten Formen von EGF sind jedoch noch biologisch aktiv.

Bei adulten Tieren wird die luminal Wirkung des EGF kontrovers diskutiert. Untersuchungen von Ulshen et al. (1986) zeigen bei intraluminaler Verabreichung von EGF an adulte Ratten eine stimulierende Wirkung auf die Mukosaproliferation des Dünndarmes. Die Untersucher folgerten daraus, dass EGF einer von mehreren endogen wirkenden Faktoren im Dünndarm ist. Studien von Dembinski et al. (1982) zeigen auch, dass intragastral verabreichtes EGF die DNA-Synthese der Magen- und Duodenalmukosa bei der Ratte erhöht. Genauso sprechen die Untersuchungen von Montaner & Perez-Tomas (1999) für eine luminal Wirkung des EGF bei der Epithelerneuerung im Duodenum der adulten Ratte, da sie im apikalen Zellbereich EGF-Rezeptoren finden konnten. Im Gegensatz zu den obigen Studien kamen andere Untersucher zu dem Ergebnis, dass intraluminales EGF keine Wirkungen bei der adulten Ratte zeigt, sondern nur intravenös

verabreichtes EGF die Mitoserate im geschädigten Colon auf Normalniveau erhält (Foster & Whitehead, 1990). Die durch totale parenterale Ernährung auftretende Hypoplasie und Atrophie im Darm von adulten Ratten konnte durch die intravenöse Verabreichung von EGF umgekehrt werden. Luminales EGF zeigte bei diesen Untersuchungen keine Wirkung (Goodlad et al., 1987A und B, Goodlad et al., 1992). Diese Untersuchungen sprechen dafür, dass luminales EGF keine Wirkung zeigt, da möglicherweise die apikalen Rezeptoren fehlen (Alison & Sarraf, 1994).

Wenn luminales EGF keine Wirkung zeigt kommt die Frage auf weshalb sich EGF im gesunden adulten Darmlumen befindet. Playford (1995) vermutet, dass die Hauptfunktion von kontinuierlich in den Darm sezerniertem EGF im gesunden Darm darin besteht, die Reparatur von geschädigtem Darm zu stimulieren und somit als ein luminales Überwachungspeptid („luminal surveillance peptide“) dient und weniger wichtig ist für die Aufrechterhaltung des Darmwachstums. Da sich die Rezeptoren ausschließlich basolateral befinden, ist EGF nur wenn eine Schädigung der Mukosa vorliegt in der Lage an die basolateralen Rezeptoren zu gelangen (Playford et al., 1996).

2.7 Bedeutung des Rezeptors des epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR)

2.7.1 Vorkommen des EGFR im Darm

Untersuchungen von Pothier & Ménard, (1988) können die Rezeptoren des EGF sowohl im Dün- als auch im Dickdarm nachweisen. Bei diesen Untersuchungen war die spezifische Bindung von markiertem EGF im Colon höher als im jeweiligen Dünndarm, dieser Unterschied könnte zumindest teilweise durch eine höhere Konzentration an EGFR im Colon bedingt sein. Gleiche Ergebnisse fanden Ménard et al., (1987) bei Mäusen post partum, auch hier war die spezifische Bindung von EGF im Colon höher als im Dünndarm und innerhalb des Colons im distalen Colon höher.

Der EGFR konnte beim fötalen (Ménard & Pothier, 1991) und adulten (Hormi & Lehi, 1994) Menschen im Bereich der Epithelzellen des GIT gefunden werden. Ménard & Pothier (1991) fanden die Rezeptoren bei menschlichen Föten vor allem in undifferenzierten Kryptenzellen und in Zellen der Zottenbasis; in Richtung Zottenspitze nahmen die Rezeptoren ab und waren nur noch vereinzelt auszumachen. Auch Mietinen (1993) konnte bei menschlichen Föten den EGFR immunhistochemisch im Bereich der Zotten und Krypten nachweisen. Adulte Menschen zeigen EGFR-positive Zellen auch im Bereich der Krypten und Zotten (Hormi & Lehy, 1994). Auch andere Untersuchungen

fanden EGFR-positive Zellen bei Adulten im Zottenbereich und bei der Hälfte der Zellen auch im Kryptenbereich. Chabot et al. (1987) und Gallo-Payet & Hugon (1985) wiesen den EGFR ebenfalls bei adulten Ratten bzw. Mäusen im Zotten- und Kryptenbereich nach, wobei bei den Untersuchungen von Gallo-Payet & Hugon die Anzahl der Rezeptoren im Kryptenbereich höher war. Im Gegensatz hierzu fanden Playford et al. (1996) den EGFR im Duodenum und Colon im gesamten Kryptenbereich. In den Zotten des Duodenums waren jedoch nur die Gobletzellen EGFR-positiv. Diese Nachweise der EGFR zeigen, dass diese Rezeptoren sowohl im Proliferationskompartiment als auch im Bereich der reifen Epithelzellen des Darmes nachweisbar sind (Hormy & Lehi, 1994).

Der EGFR scheint auch je nach Alter der Föten unterschiedlich exprimiert zu werden. Untersuchungen hierzu zeigen divergierende Ergebnisse. So fanden Pothier & Ménard (1988), dass Föten in einem früheren Entwicklungsstadium höhere Bindungsraten aufwiesen und somit mehr EGFR exprimieren. Andere immunhistochemische Untersuchungen von Hormi & Lehy (1994) beim Menschen zeigen im Dünndarm bei Föten, dass die Immunfärbung mit steigendem Alter etwas intensiver wird. Auch bei Mäuseföten nimmt die Anzahl der EGFR während der Trächtigkeit zu (Adamson & Meek, 1984). Bei anderen Untersuchungen menschlicher Föten nimmt die Anzahl der EGFR vor der Geburt ab, dies reflektiert vermutlich den weiter fortgeschrittenen Reifegrad der Organe des Menschen im Uterus (Oliver, 1988).

Bezüglich des Vorkommens des EGFR gibt es auch Untersuchungen bei Schweinen. Jaeger & Lamar, (1992) konnten den EGFR bei Schweinen im Alter von 1-28 Tagen postnatal in den Krypten und Zotten des Dünndarmes lokalisieren. Auch Kelly et al., (1992) wies EGF Bindungsstellen mit Hilfe von markiertem EGF im Darm von Ferkeln nach. In dieser Studie wurden Rezeptoren bei neugeborenen und bei abgesetzten Ferkeln vor allem im Bereich der Krypten und im basalen Zottenbereich nachgewiesen; bei säugenden Ferkeln konnten jedoch keine Bindungsstellen gefunden werden. Dieses Nichtvorhandensein der EGFR bei säugenden Tieren wurde auch von Thompson (1988) bei Ratten nachgewiesen. Dieses Phänomen könnte durch eine Rezeptorunterregulation im Zusammenhang mit der Milchaufnahme stehen (Carpenter & Cohen, 1979; Thompson, 1988). Der EGF Gehalt im Kolostrum der Sau ist ausreichend hoch, um einen Großteil der Rezeptoren zu besetzen, was nachfolgend zu einer erhöhten Endocytose, zu vermindertem Rezeptor-Recycling und/oder zum Abbau des EGFR-Proteins führen könnte (Kelly et al., 1992). In der Studie von Gallo-Payet et al. (1987) wurde das Vorkommen von EGFR im

Dünndarm von Mäusen post partum untersucht. Diese Arbeitsgruppe stellte fest, dass die EGFR postnatal stetig ansteigen, jedoch zwischen Tag 8 und 12 post partum zeigt die Bindung von markiertem EGF geringe Werte, die anschließend wieder ansteigen. Auch hier wurde an einen Zusammenhang mit der Milchaufnahme gedacht, da die abnehmende Bindung des markierten EGF in Beziehung zum hohen Gehalt an Wachstumsfaktoren in der Milch stand. Genauso stand die Hochregulation der EGFR nach 14 Tagen post partum mit dem sinkenden Gehalt an Wachstumsfaktoren in der Milch im Zusammenhang.

Die zelluläre Lokalisation des Rezeptors wird kontrovers diskutiert. So fanden einige Untersucher die Rezeptoren im basolateralen Membranbereich der Epithelzellen und andere im apikalen Membranbereich oder sowohl apikal als auch basolateral. Bei der Ratte wies Scheving et al. (1989) den EGFR basolateral an den Epithelzellen des Dünndarms nach. Auch Chabot et al. (1987) konnten apikal keine Rezeptoren lokalisieren. Auch Untersuchungen bei adulten und fötalen Menschen zeigen den EGFR lediglich im basolateralen Membranbereich der Epithelzellen (Playford et al., 1996; Ménard & Pothier, 1991). Gonnella et al. (1987) fanden bei säugenden Ratten im Ileum, dass EGF apikal bindet und dann transepithelial transportiert wird. Thompson (1988) wies über Bindungsstudien mit markiertem EGF die EGFR bei der fötalen und adulten Ratte an der Mikrovillimembran nach. Auch Montaner & Perez-Tomas (1999) konnten im Duodenum der adulten Ratte Rezeptoren immunhistochemisch im apikalen Membranbereich der Zellen nachweisen. Schweiger et al. (2003) lokalisierten den EGFR immunhistochemisch im Duodenum von Schweinen vor und nach dem Absetzen und konnten den EGFR im apikalen Zellkompartiment sowie im Zytoplasma von Gobletzellen lokalisieren. Bei immunhistochemischen Untersuchungen von Hormi & Lehy (1994) im menschlichen Dickdarm zeigten die Epithelzellen der Föten sowohl im apikalen als auch im basolateralen Membranbereich der Zellen und diffus im Zytoplasma der Krypten und falls noch vorhandenen Zotten, EGFR-positive Zellen. Auch Miettinen (1993) und Gallo-Payet & Hugon (1985) fanden bei adulten Mäusen den EGFR im apikalen und basolateralen Membranbereich der Epithelzellen. Bei der Studie von Kelly et al. (1992) konnten EGF Rezeptoren auch bei Ferkeln sowohl im apikalen als auch im basolateralen Membranbereich der Epithelzellen nachgewiesen werden. Den Unterschied zu den Studien von Scheving et al. (1989) und Ménard & Pothier (1991), die nur im basolateralen Bereich Rezeptoren fanden begründen sie zum einen durch die Variation der Spezies und des Alters der Tiere und zum anderen durch die eingesetzten Methoden. Bezüglich der

Methodik könnte es sein, dass die Rezeptoren in diesen beiden Studien apikal nicht vorhanden sind, weil es zu einem Transport des markierten EGF nach basolateral kam. So vermuten Gonnella et al. (1987) und Weaver et al. (1990), dass bei säugenden und fötalen Ratten die EGF Rezeptoren im apikalen Zellbereich bei der Transcytose von luminalem EGF beteiligt sind.

2.7.2 Rezeptoreigenschaften

Der EGF-Rezeptor gehört zur EGF-Rezeptor Familie. Hierbei handelt es sich um Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Zu dieser Familie gehören neben dem EGFR (ErbB1 oder Her1) noch der ErbB2 (Her2), ErbB3 (Her3) und der ErbB4 (Her4) (Ullrich et al., 1984). Alle diese Rezeptoren weisen auf Proteinebene strukturelle Gemeinsamkeiten auf und werden in einer Vielzahl von epithelialen, mesenchymalen und neuronalen Geweben exprimiert. Der EGFR wird in verschiedenen fötalen und adulten Geweben exprimiert. Die EGFR-Familie spielt eine fundamentale Rolle bei der Entwicklung, Proliferation und Differenzierung (Singh & Harris, 2005). So zeigen mehrere Versuche an Mäusen, dass diese Rezeptoren eine wichtige Rolle während der Entwicklung verschiedener Organe spielen. Der Verlust der EGFR Funktion führt zu Fehlentwicklungen verschiedener Organe, wie GIT, Gehirn, Haut und Lunge (Miettinen et al., 1995). Des Weiteren wird eine fehlregulierte Expression (z.B. Überexpression), vor allem des EGFR und ErbB2 mit der Entwicklung und der Bösartigkeit vieler humaner Tumoren in Zusammenhang gebracht (Thompson & Gill, 1985; Salomon et al., 1995; Kondapaka et al., 1997; Herbst & Langer, 2002; Arteaga, 2003).

Die Struktur und Funktionsweise des EGFR ist in der Abbildung 2.12 schematisch dargestellt. Beim EGFR handelt es sich um ein transmembranäres Glycoprotein mit einer Molekülmasse von 170 kDa. Es besteht aus einer Polypeptidkette aus etwa 1200 Aminosäuren, an der 3 verschiedene Domänen unterschieden werden können. Die extrazelluläre Domäne besteht aus vier Subdomänen. Zwei dieser Subdomänen sind cysteinreich und dienen als Bindungsstelle für die Liganden (Thompson & Gill, 1985). Die anderen beiden Subdomänen vermitteln die Rezeptor Dimerisierung und die Interaktionen mit anderen Membranproteinen (Lax et al., 1989). Die transmembranäre Domäne besteht vorwiegend aus hydrophoben Aminosäuren und verbindet die beiden anderen Domänen miteinander. Die intrazelluläre Domäne weist die typische Tyrosin-Kinase-Aktivität auf (Ullrich et al., 1984). Nach der Bindung eines Liganden kommt es durch

Konformationsänderung zunächst zur Bildung von Rezeptor-Dimeren, was die Tyrosin-Kinase Aktivität stimuliert. Dadurch kommt es zur Autophosphorylierung der Tyrosinreste der Rezeptoren. Die phosphorylierten Tyrosinreste des Rezeptors sind Bindestellen für verschiedene Proteine und Enzyme, welche wiederum verschiedene Signalkaskaden initiieren, um letztlich im Zellkern verschiedene Transkriptionsfaktoren zu aktivieren. Die Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression von Genen, die für verschiedene Zellfunktionen wie Wachstum, Differenzierung, Apoptose und Migration von Bedeutung sind (Yarden & Sliwkowski, 2001). Die zuvor angesprochene Dimerbildung kann auch zwischen EGFR Familienmitgliedern erfolgen. Es sind eine Reihe verschiedener Signalwege in Abhängigkeit von den beteiligten Monomeren, vom gebundenen Liganden, vom phosphorylierten Tyrosinrest und vom Signalprotein möglich (Olayioye et al., 1998). Nach der Bindung eines Liganden sammeln sich die Ligand-Rezeptor-Komplexe rasch in bestimmten Bereichen der Zellmembran und werden durch Endozytose internalisiert. Während der Passage der verschiedenen endosomalen Kompartimente kommt es entweder zur proteolytischen Spaltung des EGF und EGFR in Lysosomen oder sie gelangen zurück zur Zellmembran, um wieder als Rezeptoren zu dienen (Sorkin, 2001). Auf der Zelloberfläche sind die EGFR's verstreut lokalisiert und keinem bestimmten Bereich zuzuweisen (Haigler et al., 1979).

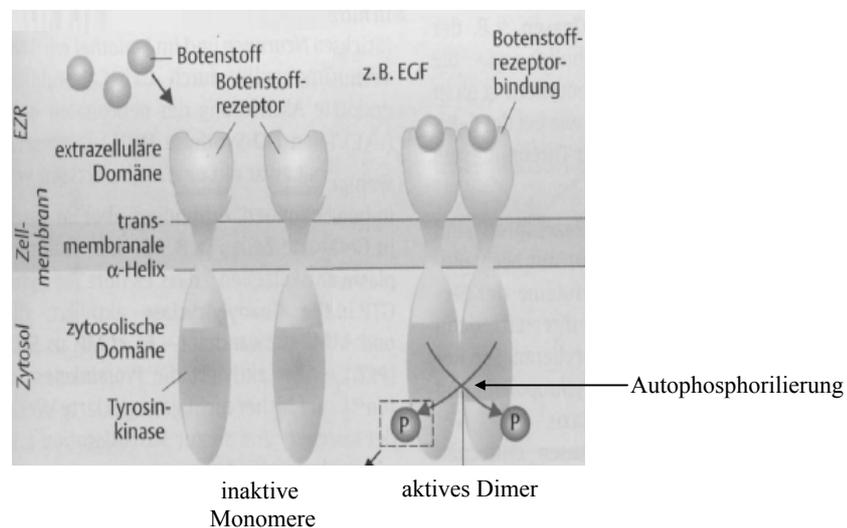


Abb. 2.12: Schematische Darstellung des EGFR (Silbernagl & Despopoulos, 2001)

2.7.3 Liganden des EGFR

Bei den Liganden des EGFR handelt es sich um stukturverwandte Peptide des EGF. Alle diese Peptide besitzen sechs Cysteinreste, unter denen es zur Bildung von drei intramolekularen Disulfidbrücken kommt (Harris et al., 2003). Im Säugetier wurden sieben Liganden des EGFR nachgewiesen: EGF, Transforming growth factor- α (TGF- α), Heparin binding EGF like growth factor (HB-EGF), Amphiregulin (AR), Betacellulin (BTC), Epiregulin (EPR) und Epigen (EPI) (Shoyab et al., 1988; Massague, 1990; Higashiyama et al., 1992; Toyoda et al., 1995; Strachan et al., 2001). Alle diese Liganden werden aus einem transmembranären Precursor-Protein, welches in der Plasmamembran verankert ist durch Zelloberflächenproteasen abgespalten (Harris et al., 2003). EGF, TGF- α und AR binden nur an den EGFR, während EPR, HB-EGF und BTC auch eine Affinität zum ErbB4-Rezeptor zeigen (Olayioye et al., 2000). Die Expression der ErbB1 Proteine erfolgt in Zellen mesodermalen und ektodermalen Ursprungs (Yarden & Sliwkowski, 2001).

2.8 Hormonale Regulation des EGF- und EGFR-Systems

Sowohl EGF als auch EGFR werden durch Hormone moduliert. Vor allem Hormone mit Rezeptoren der Steroid Superfamilie sind an dieser Modulation beteiligt (Evans, 1988). Die frühen Anstiege von EGF und EGFR bei der Entwicklung sind durch Schilddrüsenhormone bedingt. Die Sexualsteroiden wirken während der Pubertät. Retinolsäure spielt wahrscheinlich während der Fötalzeit eine wichtige Rolle. Auch das Wachstumshormon und Insulin wirken direkt oder indirekt auf das EGF- und EGFR-System in verschiedenen Geweben (Perheentupa et al., 1984; Ekberg et al., 1989; Johansson et al., 1989; Kasayama et al., 1989; Reddy & Kahn, 1989). Die Wirkungen der Hormone auf die Gehalte von EGF und EGFR verschiedener Gewebe und auf den Gehalt im Urin, bei Nagern sind in Tabelle 2.5 dargestellt.

Tab. 2.5: Hormonale Wirkungen auf die Gehalte des EGF- und EGFR-Systems bei Nagern (modifiziert nach Fisher & Lakshaman, 1990)

	Schilddrüsen- hormone	Androgene	Östrogene	Glucocorticoide	Retinolsäure
Niere	↑ EGF*		↑ EGF		↑ EGFR*
Urin	↑ EGF		↑ EGF		
Leber	↑ EGFR*	↑ EGFR			
Haut	↑ EGF/EGFR				
Milchdrüse	↑ EGFR				
Lunge				↓ EGFR	↑ EGFR*
Uterus			↑ EGF/EGFR*		

*Nachweis der hormonalen Wirkungen auch auf mRNA-Ebene

Bei anderen Spezies ist über die hormonale Regulation des EGF- und EGFR-Systems noch nicht soviel bekannt. Beim weiblichen Schwein zeigen Studien, dass steigende Östrogenspiegel während der Ovulation verantwortlich sind für steigende EGFR Konzentrationen im Eileiter und im Endometrium am ersten Tag des Zyklus (Wollenhaupt et al., 1997). Auch in vitro Studien bei Menschen zeigen, dass Östrogene und Progesteron die Anzahl an EGFR erhöhen und somit EGF die Wirkungen dieser Steroide im Endometrium vermittelt (Watson et al., 1996). Im Gastrointestinaltrakt des Menschen scheint die Freisetzung des EGF unter neurohormonaler Kontrolle zu stehen (Konturek et al., 1989).

3. Fragestellung

Beim Schwein existieren bislang keine systematischen Untersuchungen über die Expression des EGF im Darm. Da der EGF aber dennoch eine wichtige Funktion unter anderem für die Integrität der Darmmukosa und bei der Darmentwicklung hat, sollte im Rahmen dieser Arbeit das EGF- und EGFR-System näher untersucht werden. Hierzu wurde die Expression des EGF und des EGFR auf Protein- und mRNA-Ebene bei verschiedenen prä- und postnatalen Altersgruppen untersucht. Neben der Expression in unterschiedlichen Entwicklungsstadien, sollte auch untersucht werden, ob sich die Expression des EGF und EGFR in verschiedenen Darmabschnitten unterscheidet. Des Weiteren sollte der Einfluß des im Kolostrum enthaltenen EGF auf das EGF- und EGFR-System sowie gegebenenfalls auf die Mukosamorphologie untersucht werden.

4. Material und Methoden

4.1 Probenherkunft

4.1.1 Übersicht über die Versuchstiere

Die Untersuchungen umfassen zwei Versuchsteile. Zum einen die Ontogenese des EGF- und EGFR-Systems. Ziel dieses Versuchsteils war es die Entwicklung des EGF- und EGFR-Systems im Darm hinsichtlich zellulärer Verteilung in der fötalen und postnatalen Entwicklung zu erfassen. Dieser Projektteil wird nachfolgend mit „Ontogenese“ bezeichnet. Neben dieser „Bestandsaufnahme“ sollte weiterführend geklärt werden, ob die Aufnahme des Kolostrums Auswirkungen auf den Nachweis von EGF bzw. dessen Rezeptors hat. Dieser Versuchsteil wird nachfolgend als „Kolostrumversuch“ bezeichnet. Alle Tiere der postnatalen Altersgruppen gehörten der Deutschen Landrasse an. Die Tiere wurden von der Versuchsstation unterer Lindenhof bezogen und entsprechend ihrem Alter bedarfsgerecht gefüttert. Im Fall der Föten waren die Sauen entsprechend ihrem Trächtigkeitsstadium bedarfsgerecht versorgt. Bei den Föten handelte es sich um Einfachkreuzungen der Deutschen Landrasse (Sauen) x Pietrain (Eber).

Ontogenese des EGF- und EGFR-System:

Um den alters- bzw. entwicklungsabhängigen Verlauf der EGF- und EGFR-Expression zu erfassen, kamen Gewebe folgender Entwicklungsstufen zur Untersuchung:

- je 4 männliche Föten der 10., 13. und 15. Graviditätswoche (GW)
- 4 männliche, nicht kastrierte Tiere der 9. Lebenswoche (LW)
- 4 männliche, nicht kastrierte Tiere der 18. Lebenswoche, diese Gewebe wurden aus einem anderen Projekt entnommen (Dr. A. Wagner)
- 4 adulte Eber zwischen der 26. und 30. Lebenswoche

Kolostrumversuch:

Um die mögliche Beeinflussung des EGF- und EGFR-Systems durch die Aufnahme von Kolostrum zu erfassen, wurden zwei Gruppen mit je 4 Tieren von Neonaten entweder nach 6 stündiger Gabe von 5% Glucose Lösung (NeoGlc) oder nach 6 stündiger Kolostrumaufnahme (NeoKol) untersucht. Die Zeit wurde auf 6 Stunden begrenzt, da die nicht mit Kolostrum versorgten Tiere von der Muttersau getrennt werden mussten, somit bezüglich der Stoffwechselsituation „benachteiligt“ waren und nicht über einen längeren Zeitraum in einer artifiziellen Umwelt gehalten werden sollten. Bei den Neonaten handelte es sich um männliche Tiere der Deutschen Landrasse.

4.1.2 Gewinnung der Fötalproben

Die Gewinnung der Föten und die Gewebekonservierung für histologische bzw. molekularbiologische Auswertungen erfolgte im Rahmen der Dissertation von Dr. S. Häussler. Sie sind dort detailliert dargestellt und daher nachfolgend nur kurz skizziert. Das Gewebematerial konnte auch für die hier untersuchten Parameter verwendet werden. Für die Entnahme der Föten wurde in der jeweils gewünschten Trächtigungswoche unter Anästhesie (O₂/N₂O: 2:1,5, Isofluran: ratio 0,5-1; Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) eine Sectio caesera durchgeführt. Nach Durchtrennung des Nabelstranges wurden die Föten mit 0,3 ml T61 (Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) pro kg Körpergewicht euthanasiert. Die Gewebeentnahme (Jejunum und Colon ascendens) für die molekularbiologischen Untersuchungen (PCR) wurde unmittelbar nach der Bestimmung der Fötengewichte durchgeführt. Die Gewebe wurden steril entnommen, um eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden. Das Darmgewebe für die molekularbiologischen Bestimmungen wurde in RNA Stabilization Solution (Herstellung nach Clarke & Amaral, 2003; Zusammensetzung siehe Kapitel 9) gelagert. Bei der RNA Stabilization Solution handelt es sich um eine wässrige Lösung, welche Gewebe schnell durchdringt und die enthaltene RNA vor Endonucleasen schützt. Dabei wurde das Gewebe, um eine vollständige Durchtränkung zu erreichen, zunächst für 24 Stunden bei 4° C aufbewahrt und anschließend folgte die Lagerung bei -20°C. Parallel hierzu wurden die Gewebe für die immunocytochemischen Bestimmungen in 4% Formaldehyd fixiert und bis zur weiteren Bearbeitung (siehe Kapitel 4.2.1) bei Raumtemperatur gelagert.

4.1.3.1 Gewinnung der Gewebeproben für die Altersstufen der 9. und 18.

Lebenswoche sowie der adulten Tiere

Die Euthanasie dieser Tiere zur Gewebeprobeentnahme erfolgte mit dem Wirkstoff Pentobarbital (Narkodorm®, CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland). Sofort nach Eintritt des Todes wurde der Bauchraum in der Medianen eröffnet und das Darmkonvolut im ganzen entfernt. Anschließend wurde von den Darmabschnitten Duodenum, Jejunum, Colon ascendens und Colon descendens (Entnahmestellen siehe Abbildung 4.1) jeweils ein ausreichend großes Gewebestück entfernt und bis zur weiteren Verarbeitung in physiologische Kochsalzlösung eingelegt. Es wurden sowohl Gewebeproben für molekularbiologische (PCR und Western blot) und für immunocytochemische Untersuchungen gewonnen. Lediglich bei den Tieren der 18.

Lebenswoche wurden keine molekularbiologischen Proben gewonnen, da zu diesem Zeitpunkt diese Untersuchungen noch nicht vorgesehen waren. Unmittelbar nach der Gewebeentnahme wurden die Proben für die PCR gewonnen. Dazu wurden die Gewebestücke nach der Eröffnung des Darmrohrs und Entfernung der Kotreste zunächst von umgebendem Binde- und Fettgewebe befreit und anschließend in kleinere Stücke von etwa 0,5 x 0,5 cm geschnitten. Anschließend wurde das Gewebe zur Lagerung in mit RNA Stabilization Solution gefüllte Kunststoffgefäße überführt. Diese wurden zunächst für 24 Stunden bei 4° C aufbewahrt um eine ausreichende Durchdringung des Gewebes zu erreichen und anschließend bei -20° C gelagert. Parallel dazu wurden die Proben für den Western blot und die Immunzytologie gewonnen. Auch diese Proben wurden innerhalb von 10 Minuten nach der Organentnahme konserviert, um eine Degradierung der Proteine durch Endopeptidasen zu vermeiden. Zunächst wurde auch bei diesen Proben das Darmrohr längs geöffnet und von Kotresten befreit. Das Gewebe für den Western blot kam anschließend flach in eine Gefriertüte und wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Sobald das Gewebe durchgefroren war, wurde es mit einem Hammer in kleine Stücke geklopft und zur weiteren Lagerung in kleine Metalldöschen gegeben. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C. Das Gewebe für die immunzytologischen Untersuchungen wurde mit der Mukosaseite nach oben mit 4 Nadeln auf einer Korkplatte fixiert. Anschließend wurde die Korkplatte mit der Darm anhaftenden Seite nach unten in ein verschließbares Gefäß, gefüllt mit 4% Formalin (Formaldehyd \geq 37%, Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland), gegeben. Auf diese Weise wurden die Proben 24 Stunden schwimmend fixiert. Sinn der Korkplatten war zu verhindern, dass der Darm sich einrollt und somit die Zotten beschädigt werden könnten. Nach der Fixierdauer von 24 Stunden wurden die Proben bis zur weiteren Verarbeitung (siehe Kapitel 4.2.1) in 0,1 molarem Phosphatpuffer gelagert.

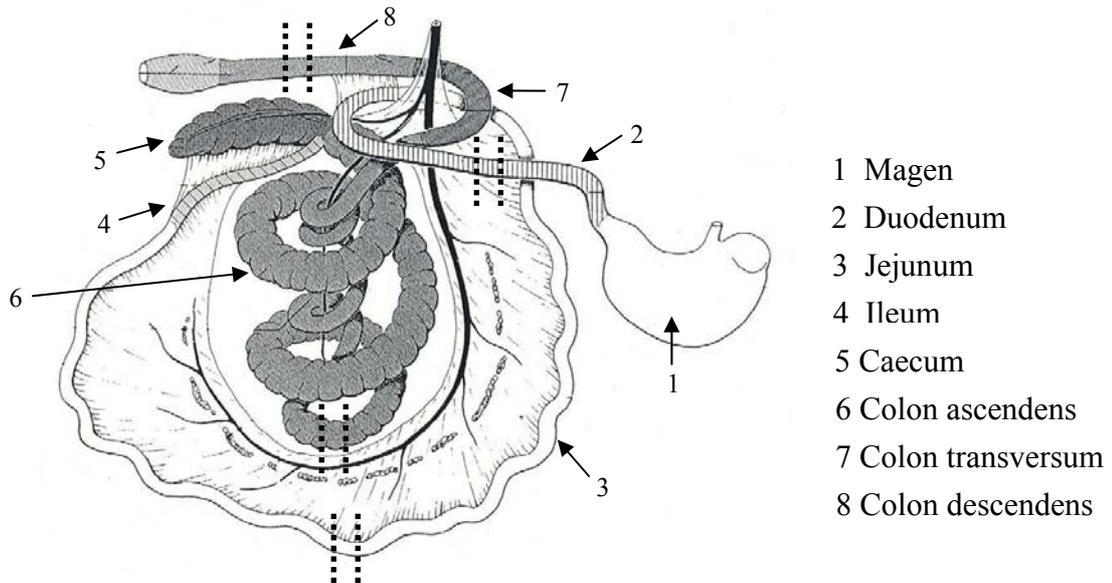


Abb. 4.1: Entnahmestellen (⋮) der Gewebeproben (nach Ghetie, 1958; aus König et al., 1999)

4.1.4 Kolostrumversuch

Der Kolostrumversuch wurde durchgeführt, um zu untersuchen ob die Kolostrumaufnahme bzw. die Aufnahme von im Kolostrum in hoher Konzentration enthaltenem EGF Einfluss auf das EGF- und EGFR-System im Darm hat. Der Versuch wurde mit zwei Tiergruppen durchgeführt, von denen eine Gruppe Kolostrum aufnahm und die andere Gruppe als Kontrollgruppe kein Kolostrum erhielt. Um den Geburtszeitraum einzugrenzen, wurde bei zwei trächtigen Sauen am Tag 114 der Gravidität die Geburt mit 0,7 ml Cloprostenol-Natrium (PGF Veyx forte®, Veyx-Pharma GmbH, Schwarzenborn, Deutschland) eingeleitet. Es sollte sichergestellt werden, dass der genaue Geburtszeitpunkt erfasst werden kann und die Tiergruppe, die kein Kolostrum bekommen sollte unmittelbar nach der Geburt von der Mutter separiert werden konnte. Dazu wurden die Tiere in regelmäßigen Abständen auf den Beginn der Geburt kontrolliert.

Glucose Gruppe (Neonaten mit Glucose = NeoGlc): diese Tiere wurden sofort nach der Geburt vom Muttertier separiert und in eine eingestreuete Kiste mit Rotlicht verbracht. Sie erhielten kein Kolostrum. Um die Thermoregulation aufrechtzuerhalten wurde den Tieren 6 Stunden bis zur Euthanasie eine körperwarme Glucoselösung mit dem Fläschchen verabreicht.

Kolostrum Gruppe (Neonaten mit Kolostrum = NeoKol): diese Tiere wurden für 6 Stunden bis zur Euthanasie beim Muttertier belassen und konnten ad libitum Kolostrum aufnehmen. Nach den jeweiligen 6 Stunden erfolgte bei beiden Gruppen die Euthanasie. Zunächst wurden die Neonaten mit 2 mg/kg Körpergewicht Azaperon (Stresnil®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) und mit 15 mg/kg Körpergewicht Ketamin (Ursotamin®, Serum-Werk-Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) sediert. Die Euthanasie erfolgte mit 0,3 ml T61 (Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland). Die anschließende Probenahme und Konservierung erfolgte analog zu den Tieren der 9., 18. Lebenswoche und der adulten Tiere.

4.2 Histologische Techniken

4.2.1 Fixierung und Anfertigung der Paraffinschnitte

Für die immunocytoologischen Untersuchungen wurden die in Formaldehyd fixierten Proben zunächst mit Hilfe einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert. Dazu wurden die Proben jeweils für eine Stunde in 50%, 70%, 96% und 3 x 100% Ethanol gegeben und anschließend noch für eine Stunde in Xylol. Nach der Entwässerung folgte die Einbettung in Paraffin (Romeis, 1989).

Anfertigen der Gewebeschnitte:

Nach Abkühlen und Aushärten der Paraffinblöckchen wurden aus diesen mit Hilfe eines Schlittenmikrotomes (Leica Mikrosystems GmbH, Nussloch, Deutschland) 4 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden im 35°C warmen Wasserbad gestreckt, anschließend auf Objektträger aufgezogen und im Wärmeschrank bei 37° C getrocknet.

4.2.2 Immuncytochemische Färbung von EGF

Das Prinzip dieser Färbung beruht darauf, dass ein Protein (z.B. EGF) mithilfe eines Antikörpers detektiert wird. Hierzu wird die sogenannte indirekte Biotin-Avidin-Methode eingesetzt. Bei dieser Methode kommt EGF als Primärantikörper und ein biotinylierter Sekundärantikörper zum Einsatz. Der Sekundärantikörper ist gegen den Primärantikörper gerichtet und bindet dort. Das Biotin des Sekundärantikörpers bindet mit hoher Affinität das Avidin (oder Streptavidin) des AB-Komplex. Der AB-Komplex besteht aus Streptavidin und aus biotinylierter Peroxidase. Die Farbentwicklung erfolgt durch Zugabe des Farbstoffs DAB (Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid Dihydrat), welcher mit Hilfe der

Peroxidase des AB-Komplex umgesetzt wird, wodurch ein brauner Farbstoff an der Stelle entsteht, an welcher der Sekundärantikörper gebunden hat. Die Abbildung 4.2 zeigt die Avidin-Biotin-Methode schematisch.

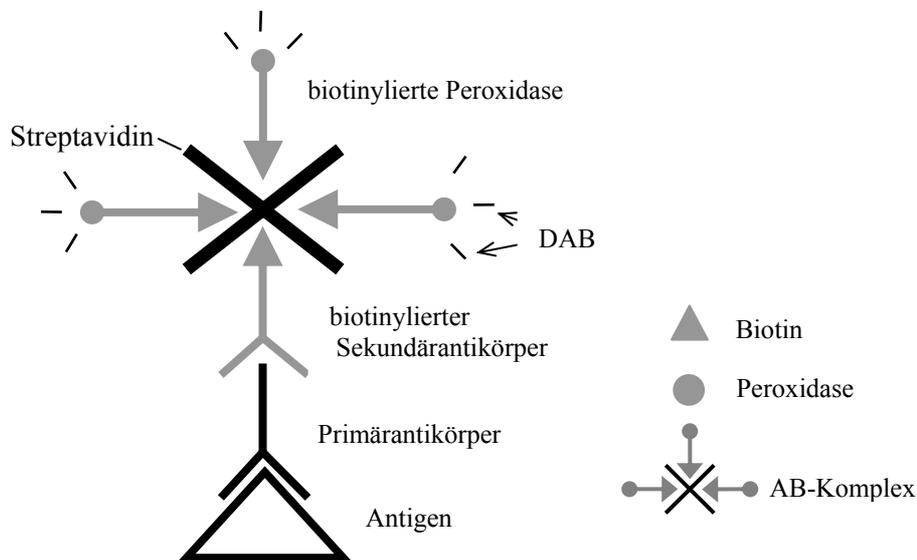
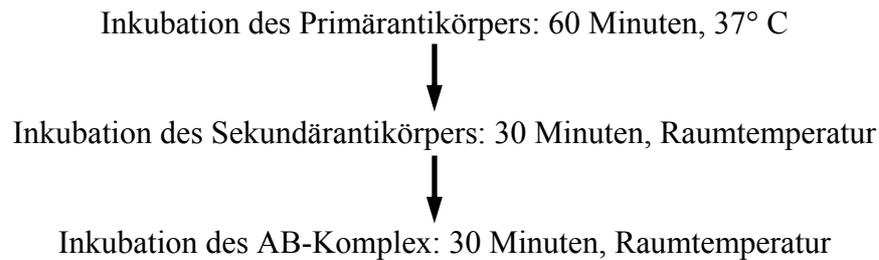


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der indirekten Avidin-Biotin-Methode

Durchführung der immunocytochemischen Färbung des EGF:

Die immunocytochemische Färbung erfolgte in Anlehnung an Claus et al. (2001). Die Paraffinschnitte wurden zunächst in Chloroform entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe hydriert. Anschließend erfolgte die Demaskierung der vernetzenden Methylenbrücken dadurch, dass die Schnitte für 5 x 5 Minuten in Citratpuffer im Mikrowellenofen gekocht wurden. Diese Methylenbrücken bilden sich beim Fixieren mit Formalin und würden die Anlagerung des Antikörpers behindern. Im Anschluss daran wurde die endogene Peroxidase blockiert. Diese Blockade ist wichtig, da endogene Peroxidase in fast allen Zellen vorkommt und somit zu falsch positiven Ergebnissen führen würde. Die Blockade erfolgte durch Einlegen der Schnitte in 7,4%ige Wasserstoffperoxidlösung. Nach der Blockade der endogenen Peroxidase müssen noch die unspezifischen Bindungen mit Hilfe von Schaf-Serum für 20 Minuten bei Raumtemperatur blockiert werden. Unspezifische Bindungen können aus dem Schafserum entstehen, welches zur Herstellung des Sekundärantikörpers verwendet wird. Durch das Blockieren werden diese besetzt, so dass keine falsch positiven Ergebnisse entstehen. Anschließend wurden drei Inkubationsschritte durchgeführt:



Beim Primärantikörper handelt es sich um einen Anti-EGF Antikörper, der gegen das schweinespezifische, rekombinant hergestellte EGF erzeugt wurde (Claus et al., 2001). Der Primärantikörper bindet das gesuchte Protein. Im Anschluß an die drei Inkubationsschritte folgte die Entwicklung in DAB-Lösung, in welcher die Paraffinschnitte unter Stichprobenkontrolle 2-3 Minuten verblieben. Anschließend wurden die Schnitte mit Hämalaun gegengefärbt, in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert, zweimalig in Xylol inkubiert und abschließend mit Depex eingedeckt.

Zwischen den Inkubationen wurden die Schnitte jeweils für 5 Minuten in TBS-Puffer inkubiert, lediglich vor der Inkubation des Primärantikörpers wurde darauf verzichtet.

Bei jedem Färbedurchgang wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Bei dieser wurde anstatt des Primärantikörpers Kaninchenserum aufgetragen.

Einzelheiten zu den bei der Immuncytochemischen Färbung verwendeten Reagenzien und Antikörper finden sich im Anhang (Kapitel 9).

4.2.3 Immuncytochemische Färbung des EGFR

Das Antiserum, das gegen den EGFR erzeugt wurde ist ein humanspezifischer, polyclonaler Antikörper. Er ist gegen die intrazelluläre Domäne des EGFR gerichtet. Die immuncytochemische Färbung des EGFR wurde in gleicher Weise durchgeführt wie die Färbung des EGF. Der einzige Unterschied zur immuncytochemischen Färbung des EGF liegt darin, dass der Primärantikörper für zwei Stunden bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubierte.

Da nur ein Überblick über die Lokalisation des EGFR gegeben werden sollte, wurde diese Färbung nur bei einem Tier pro Altersgruppe durchgeführt. Aufgrund des Vorkommens des Rezeptors und da nur ein Tier pro Gruppe untersucht wurde, konnte auf die Vorgehensweise der Auswertung des EGF verzichtet werden.

4.2.4 Auswertung der Gewebeschnitte

Die Auswertung der Gewebeschnitte des EGF erfolgte mit einem Lichtmikroskop bei 200 bzw. 400 facher Vergrößerung.

Von den Tieren der postnatalen Altersgruppen wurden die Darmabschnitte Duodenum, Jejunum, Colon ascendens und Colon descendens, von den Föten wurde das Jejunum und Colon ascendens untersucht. Pro Objektträger wurden 2 Schnitte aufgezogen, davon wurden pro aufgezogenem Schnitt je 10 Hemizotten und Hemikrypten im Dünndarm bzw. 10 Hemikrypten im Dickdarm ausgezählt. Bei einer Hemikrypte handelt es sich um eine in der vertikalen an der Zottenspitze bzw. am Kryptengrund in zwei Teile geteilte Zotte bzw. Krypte (siehe Abbildung 4.3). Es wurden nur vollständig erhaltene Zotten und Krypten, die bis zum Kryptengrund reichten zur Auswertung herangezogen. Gezählt wurde zunächst die Gesamtzellzahl der Lamina epithelialis mucosae pro Hemikrypte bzw. Hemizotte. Um eine möglicherweise unterschiedliche Verteilung der EGF-Expression entlang der Krypten- bzw. Zottenachse zu erfassen, wurden die Epithelzellen jeweils dem unteren, mittleren und oberen Drittel der Zotte bzw. Krypte zugeordnet. Diese „Kompartimente“ wurden in der Krypte als lumbales, mittleres und basales Kryptenkompartiment und in der Zotte als Zottenspitze, Zottenmitte und Zottenbasis bezeichnet (siehe Abbildung 4.3). Dargestellt sind die Ergebnisse als prozentualer Anteil der EGF-positiv gefärbten Zellen an der Gesamtepithelzellzahl der jeweiligen Bereiche Hemikrypten plus -zotten, Hemikrypten, Hemizotten und die einzelnen Kompartimente. Die Ergebnisse sind jeweils als Mittelwert \pm SEM angegeben. Bei den Föten konnte keine eindeutige Grenze zwischen Zotte und Krypte gezogen werden, aus diesem Grund wurde nicht zwischen Zotte und Krypte unterschieden, sondern nur die Dreiteilung der vorhandenen Zotte vorgenommen.

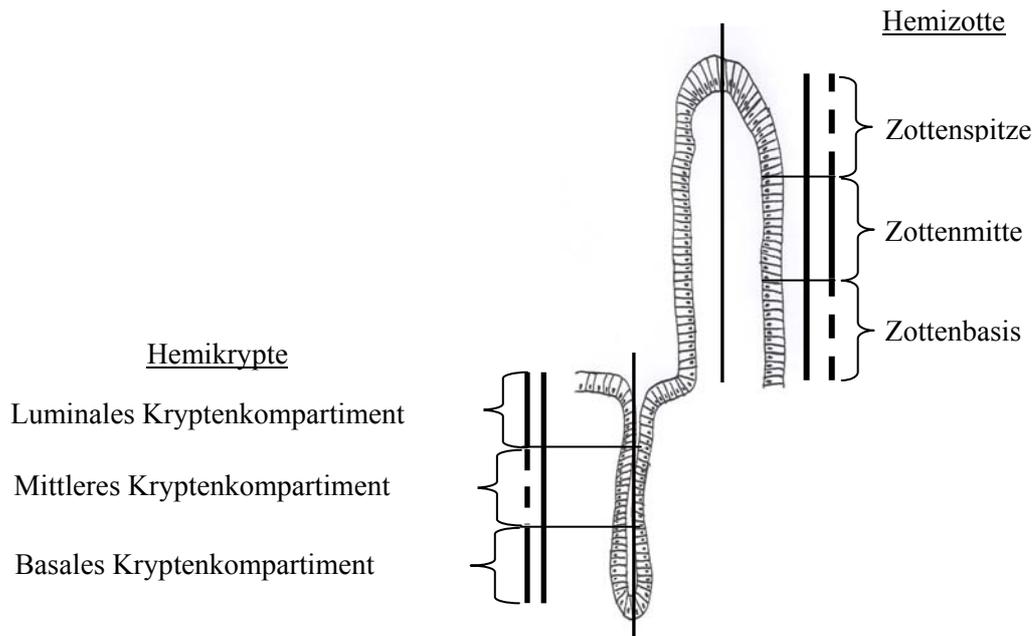


Abb. 4.3: Schematische Darstellung der Auswertung der immunocytochemischen Färbung des EGF

4.3 Molekularbiologie

4.3.1 PCR

4.3.1.1 Isolierung von RNA aus Darmgewebe

Die Isolation der RNA aus dem Darmgewebe wurde mit Hilfe des NucleoSpin® RNA II Kit von Macherey & Nagel (Macherey-Nagel GmbH&CoKG, Düren, Deutschland) durchgeführt. Nachfolgend soll kurz das Prinzip dieser Methode erläutert werden:

Die homogenisierten Gewebeproben werden in einer Lösung mit hohem Gehalt an chaotropen Salzen inkubiert. Diese Salze führen zur Zellyse, inaktivieren RNAsen und begünstigen bzw. ermöglichen das Anlagern der RNA an eine Silikamembran. Kontaminierende DNA, welche auch an die Membran bindet, wird durch den Einsatz von DNase-Lösung entfernt. Nachfolgende Waschschriffe entfernen Salze, Metaboliten und makromolekulare Zellinhaltsstoffe. Hierbei werden auch die chaotropen Salze entfernt, somit verliert die RNA ihre Affinität zur Silikamembran und kann als letzten Schritt mit RNase freiem Wasser eluiert werden.

Durchführung der RNA-Isolation:

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt, um eine Degradierung der RNA zu vermeiden. Das Gewebe wurde auf einer Kühlplatte mit sterilem Besteck zugeschnitten und etwa 30 mg in zuvor vorbereitete Fast Prep® Tubes (Eppendorf GmbH,

Hamburg, Deutschland) eingewogen. In diese Tubes wurden 0,1 g Matrix-Green® Kügelchen (Q-BioGene, Heidelberg, Deutschland), 350 µl Lyse Puffer (RA1) und 3,5 µl β-Mercaptoethanol (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) vorgelegt. Anschließend kamen die Tubes für 20 Sekunden in das Fast Prep® Gerät (FP 120, Q.Biogene, Illkirch, Frankreich), um das Gewebe bei der Geschwindigkeitsstufe 6 zu homogenisieren. Durch Zugabe des Lyse Puffers kommt es zur Zelllyse. Nach dem Homogenisieren wurde das Lysat über eine Vorsäule mit Filter in ein Reaktionsgefäß pipettiert und 1 Minute bei 11000 g zentrifugiert. Um die RNA-Bindung zu verbessern, wurden zum Lysat 350 µl Ethanol gegeben und gründlich gevortext. Anschließend wurde das Lysat in eine Säule, welche die Silikamembran enthält überführt und für 30 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert. Bei diesem Arbeitsschritt kommt es zur Bindung der RNA an die Silikamembran. Danach wurden 350 µl Entsalzungspuffer auf die Membran gegeben und für 1 Minute bei 11000 g zentrifugiert. Nach dem Entsalzen der Membran wurden 95 µl DNase Lösung (10 µl DNase + 90 µl Puffer pro Probe) aufgetragen und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, dieser Reaktionsschritt führt zum Verdau der DNA. Im nun folgenden ersten Waschschrift wurde 200 µl Waschpuffer (RA2) auf die Membran gegeben und dann zur Trocknung der Membran 30 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert. Dabei inaktiviert der Waschpuffer die DNase. Beim zweiten Waschschrift wurden 600 µl eines anderen Waschpuffers (RA3) zugegeben und 30 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert. Danach folgte der letzte Waschschrift mit 250 µl desselben Puffers (RA3) und Zentrifugation für 2 Minuten bei 11000 g. Als letzter Schritt wurde die Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt und die RNA unter 1 minütiger Zentrifugation bei 11000 g mit 35 µl DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat 1:1000, ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) eluiert. Die auf diese Weise gewonnene RNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

4.3.1.2 Quantifizierung und Bestimmung der Qualität der RNA

Quantität und Qualität der RNA wurden spektroskopisch mit einem Biophotometer (Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland) bestimmt. Um die Bestimmung durchzuführen, wurde jede Probe 1:50 mit DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat 1:1000, ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) verdünnt. Anschließend wurde die Extinktion bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm gemessen. Die optische Dichte (OD) von 260 nm entspricht dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren und die OD von 280

nm dem Absorptionsmaximum der Proteine. Die Berechnung der RNA-Konzentration erfolgte anhand der OD_{260} . Bei dieser Berechnung entspricht eine OD von 1 einer RNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$. Unter Berücksichtigung der Verdünnung wird die Konzentration der RNA in $\mu\text{g/ml}$ berechnet. Der Quotient OD_{260} / OD_{280} zeigt die Proteinkonzentration in der Lösung an und somit die Qualität der RNA. Dieser Wert sollte zwischen 1,7 und 2 liegen.

4.3.1.3 Prinzip der Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR beruht auf der Amplifizierung einer DNA-Vorlage mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase. Neben der DNA-Polymerase werden für diese Amplifizierung noch die Ausgangs-DNA, 2 Oligonukleotidprimer, Nukleotide und Puffer benötigt. Während der PCR kommt es zu einer mehrfachen Abfolge von Zyklen. Ein PCR-Zyklus besteht aus 3 Reaktionsschritten \rightarrow 1. Denaturierung, 2. Annealing, 3. Elongation

Bei der Denaturierung trennt sich der DNA-Doppelstrang bei einer Temperatur von 95°C in 2 Einzelstränge. Anschließend sinkt die Temperatur auf ca. $50\text{-}60^{\circ}\text{C}$, wobei die genaue Temperatur je nach Primerzusammensetzung variiert. Während dieser Annealingphase kommt es zur Hybridisierung der im Überschuss vorhandenen Primer an die Einzelstränge. Im letzten Schritt, der Elongation beträgt die Temperatur um 72°C (je nach Polymerase verschieden). Hierbei handelt es sich um das Temperaturoptimum der DNA-Polymerase, die durch die Anlagerung der Nucleotide zu einer Verlängerung der Primer führt und schließlich eine DNA entsteht, die der Ausgangs-DNA entspricht. Dieser Zyklus wird bis zu 40mal wiederholt, wobei jedesmal die Zahl der Ausgangs-DNA verdoppelt wird, es handelt sich also um eine exponentielle Amplifizierung. Durch die Wahl der Primer kann eine gewünschte DNA-Sequenz vervielfältigt werden.

4.3.1.4 Reverse Transkription - PCR (RT-PCR)

Durch Anwendung der reversen Transkriptions-PCR wird die isolierte RNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die so gewonnene cDNA dient später als Ausgangs-DNA (template) für die real-time PCR.

Es wurde immer eine konstante Menge an RNA (1 μg) eingesetzt. Anhand der Konzentrationsbestimmung der RNA nach der RNA-Isolierung kann berechnet werden, wieviel RNA in μl aus dem Isolat entnommen werden musste, um 1 μg RNA zu erhalten.

Insgesamt wurden 50 µl Volumen pro Reaktionsgefäß verwendet. Die 50 µl setzen sich aus 15 µl RNA und 35 µl Mastermix zusammen. In den 15 µl RNA befindet sich die jeweilige Menge reine RNA aus der RNA-Isolation (Menge je nach RNA-Konzentration), das Restvolumen wird mit DEPC-Wasser auf 15 µl aufgefüllt. Um Sekundärstrukturen aufzulösen wurde dieser Ansatz 3 Minuten bei 70°C inkubiert und anschließend sofort wieder auf Eis gelagert.

Die 35 µl Mastermix setzen sich wie folgt zusammen:

- 19,5 µl DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat 1:1000, ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- 10 µl RT Reaktionspuffer (Promega corporation, Madison, USA)
- 2,5 µl Hexamere (50µM) (ABgene®, Epsom, UK)
- 2,5 µl dNTPs (10mM) (Promega corporation, Madison, USA)
- 0,5 µl RT – Enzym (Promega corporation, Madison, USA)

RNA und Mastermix wurden in ein gemeinsames Reaktionsgefäß pipettiert und zur Synthese der cDNA in einen Thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf AG, Hamburg) gestellt.

Der Thermocycler arbeitete nach folgendem Protokoll:

- 5 Minuten bei 30 °C
- 45 Minuten bei 42°C
- 2 Minuten bei 90°C, um die Reaktion abzustoppen

Bei jedem Durchlauf der cDNA-Synthese wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Diese bestand aus einem RNAPool der Proben. Die Negativkontrolle wurde mit 0,5 µl DEPC-Wasser anstatt mit RT-Enzym angesetzt.

Nach Ablauf der Reaktionsschritte wurden die cDNA Proben bei –20°C gelagert.

4.3.1.5 Real-time PCR

4.3.1.5.1 Prinzip der quantitativen real-time PCR

Die real-time PCR beruht auf dem Prinzip einer herkömmlichen PCR, jedoch wird dem PCR-Ansatz ein Farbstoff (Fluoreszenzfarbstoff SYBR®Green) zugegeben, der die Eigenschaft besitzt in DNA-Doppelstränge zu interkalieren, d.h. sich zwischen benachbarte Basenpaare im DNA-Strang einzulagern. Er emittiert eine Fluoreszenz, die bei 560 nm gemessen wird. Mit steigender Anzahl an DNA-Doppelsträngen kann sich mehr Fluoreszenzfarbstoff einlagern und die Fluoreszenz nimmt zu. Somit wird die Detektion

von amplifizierten PCR-Produkten während des Reaktionsablaufes möglich. Da sich SYBR®Green jedoch unspezifisch in jeden DNA-Doppelstrang einlagert, also auch in Primerdimere und andere unspezifische Produkte, ist bei Anwendung dieser Methode unter anderem eine Schmelzkurvenanalyse durchzuführen (siehe Kapitel 4.3.1.5.3).

4.3.1.5.2 Durchführung der quantitativen real-time PCR

Für die real-time PCR kamen folgende Primer zum Einsatz: Ubiquitin (UQ) als Haushaltsgen (housekeeping gene) und EGF bzw. EGFR als Zielgene (Einzelheiten siehe Tabelle 4.1). Die real-time PCRs wurden mit Hilfe des QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Als Reaktionsgefäße wurden 0,2 ml Thermo-Strips (ABgene®, Epsom, UK) verwendet. Pro Ansatz wurde 1 µg cDNA (Endkonzentration 20 ng) eingesetzt. Zu jeder Probe von 1 µl cDNA kamen 10,7 µl qPCR-Wasser, je 0,4 µl forward und reverse Primer (0,32 µM) sowie 12,5 µl Quanti-Tect-Mix. Der Quanti-Tect-Mix enthält die Nukleotide, die Taq-Polymerase und das SYBR® Green. Die cDNA sowie alle Reagentien wurden auf Eis zwischengelagert. Als Cycler diente das ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Folgendes Programm lief in der real-time PCR-Maschine ab:

95°C 15 Minuten (Aktivierung der Taq-Polymerase)	}	UQ: 25 Zyklen EGF: 40 Zyklen EGFR: 35 Zyklen
95°C 15 Sekunden (Denaturierung)		
59°C/60°C 20 Sekunden (Annealing)		
72 °C 30 Sekunden (Elongation)		

Nach jedem Elongationsschritt wurden die Fluoreszenzdaten durch Einlagerung des SYBR® Greens in die amplifizierte DNA bei 72°C für 5 Sekunden erfasst.

Zusätzlich wurde bei jedem PCR-Lauf eine Negativkontrolle (NTC = no template controls) mitgeführt. Bei der Negativkontrolle wurde qPCR-Wasser anstatt cDNA zugegeben. Zur Kontrolle der RT-PCR wurde auch die Negativkontrolle dieser Läufe nach dem gleichen Schema wie für die Negativkontrolle mitgeführt.

Tab. 4.1: Verwendete Primer und ihre Eigenschaften

Name	Sequenz	Größe	AT	Bezug
msUQ	For 5'-AGATCCAGGATAAGGAAGGCAT-3' Rev 5'-GCTCCACCTCCAGGGTGAT-3'	198 bp	60°C	MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
pEGF	For 5'-TCTCAGCCACGAGGAATTG-3' Rev 5'-AATTGTTATTCCGCTGGGC-3'	156 bp	59°C	
pEGFR	For 5'-GGAGAAGAAATTTGCCAAGG-3' Rev 5'-GATCCCTTTGAAAACCTGC-3'	236 bp	60°C	Thermo Electron GmbH, Ulm, Deutschland

AT = Annealing-Temperatur; bp = Basenpaare; ms = multispecies; p = porcine

4.3.1.5.3 Spezifität der PCR-Produkte: Schmelzkurvenanalyse, Gelelektrophorese

Zur Absicherung der Spezifität wurden Schmelzkurvenanalysen und die Gelelektrophorese durchgeführt.

Schmelzkurvenanalyse:

Eine Schmelzkurvenanalyse (ABI Prism 7000 SDS Software) wurde bei jedem PCR-Lauf nach dem letzten PCR-Zyklus durchgeführt. Jede doppelsträngige DNA besitzt eine spezifische Schmelztemperatur (T_m), diese wird unter anderem durch die Anzahl der Basenpaare und durch den Anteil der Basen Guanin und Cytosin bestimmt. Somit besitzt jedes PCR-Produkt eine spezifische T_m . Bei der Durchführung der Schmelzkurvenanalyse wird die Temperatur um 0,5°C/Sekunde von 60°C auf 95°C erhöht und zuletzt auf 40°C gekühlt. Gleichzeitig wird kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen. Das Fluoreszenzsignal fällt bei der spezifischen Schmelztemperatur des gewünschten Produkts stark ab, weil hier die amplifizierten Sequenzen als Einzelstränge vorliegen. Trägt man die erste negative Ableitung der Schmelzkurve auf, erhält man eine Darstellung der spezifischen Schmelztemperatur (T_m) als peak. Die Abbildung 4.4 zeigt beispielhaft eine Schmelzkurve.

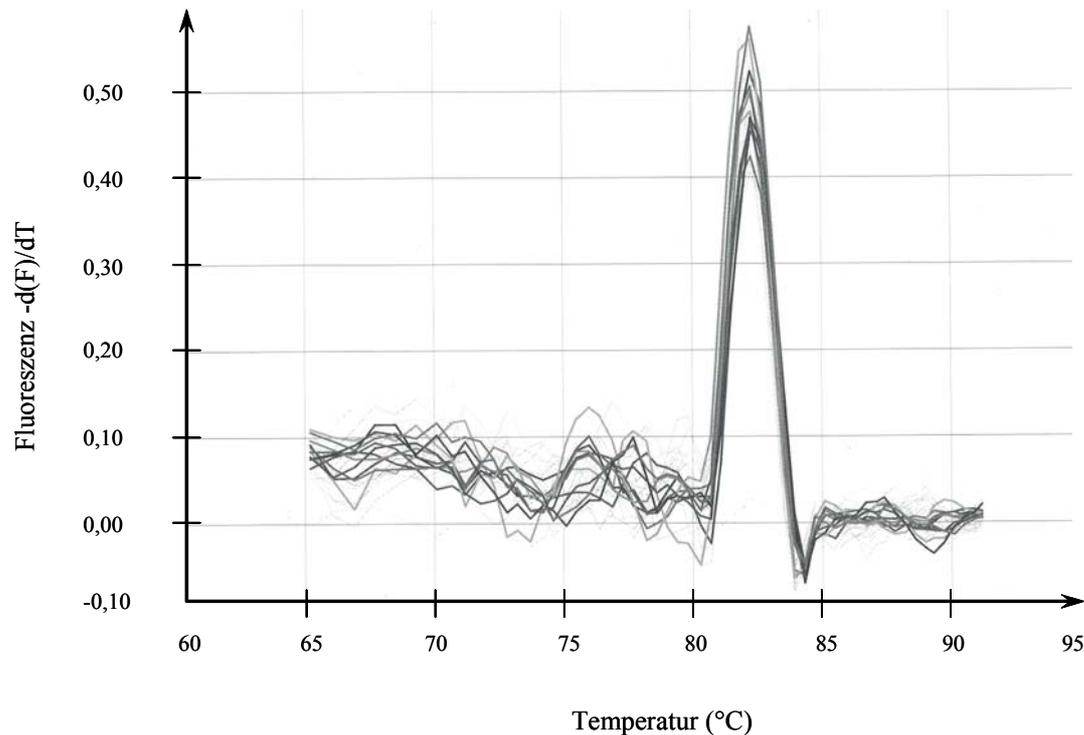


Abb. 4.4: Beispielhafte Darstellung einer Schmelzkurve (EGFR)

Gelelektrophorese:

Mithilfe der Gelelektrophorese wurde die Spezifität der PCR-Produkte anhand der Größe der Amplifikate überprüft (siehe Abbildung 4.5). Hierfür wurde für jeden Primer und Darmabschnitt eine Poolprobe angefertigt.

Um die PCR-Produkte zu trennen, wird die Agarose-Gelelektrophorese (1,2 prozentiges Agarosegel) angewendet. Hierbei werden die Nukleinsäurestränge nach ihrer Größe getrennt. Durch Anwendung einer DNA-Leiter (DNA-Ladder, eine Mischung aus verschiedenen DNA-Strängen bekannter Länge) kann durch Vergleich der Bandenhöhe die Größe des PCR-Produkts bestimmt werden. Zur Sichtbarmachung befindet sich im Gel Ethidiumbromid, welches sich in die DNA einlagert und im ultravioletten Licht fluoresziert. Die Beurteilung erfolgte unter einer UV-Lampe.

Durchführung:

Die Agarose (ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) wurde in TAE-Puffer (Zusammensetzung siehe Kapitel 9) durch mehrmaliges Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nachdem das Gel (Gesamtvolumen 70ml) auf 60°C abgekühlt war wurden 10 µl Ethidiumbromid (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben. Danach wurde das Gel in die Gelkammer (Apelex, Massy, Frankreich) mit eingelegtem Taschenkamm gefüllt. Nach Aushärtung des Gels wurde es in die Elektrophoresekammer

(Apelex, Massy, Frankreich) gesetzt und der Taschenkamm vorsichtig gezogen. Die Elektrophoresekammer wurde zuvor mit TAE-Puffer aufgefüllt. 15 μl des PCR-Produkts wurden mit 2 μl Ladepuffer (Zusammensetzung siehe Kapitel 9) gemischt und in die Taschen pipettiert. Als Größenstandard wurden 2 μl DNA-Ladder (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) mitgeführt. Innerhalb von 30 Minuten wurden die Proben bei einer Spannung von 10 bis 12 V/cm getrennt und anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Abbildung 4.5 zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese der PCR-Produkte.

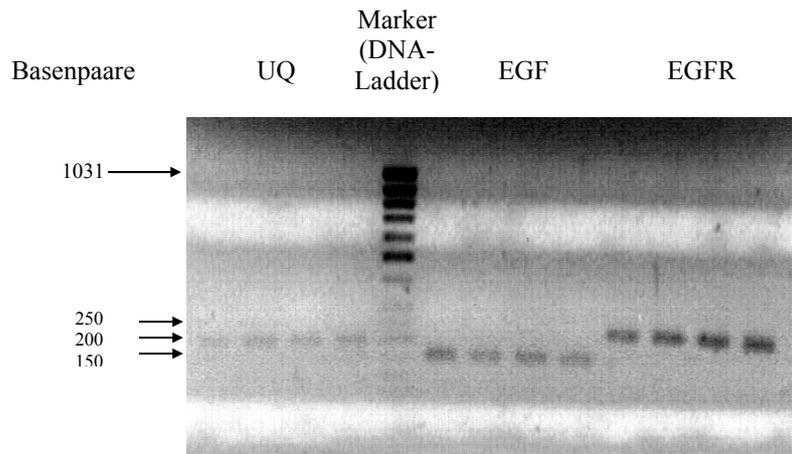


Abb. 4.5: Darstellung der Gelelektrophorese

4.3.1.5.4 Datenanalyse

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der ABI Prism 7000 SDS Software. Die Software stellt die Fluoreszenzmessung der PCR graphisch dar, anhand dieser Darstellung kann die quantitative Auswertung erfolgen. Eine Amplifikationskurve stellt sich schematisch wie folgt dar:

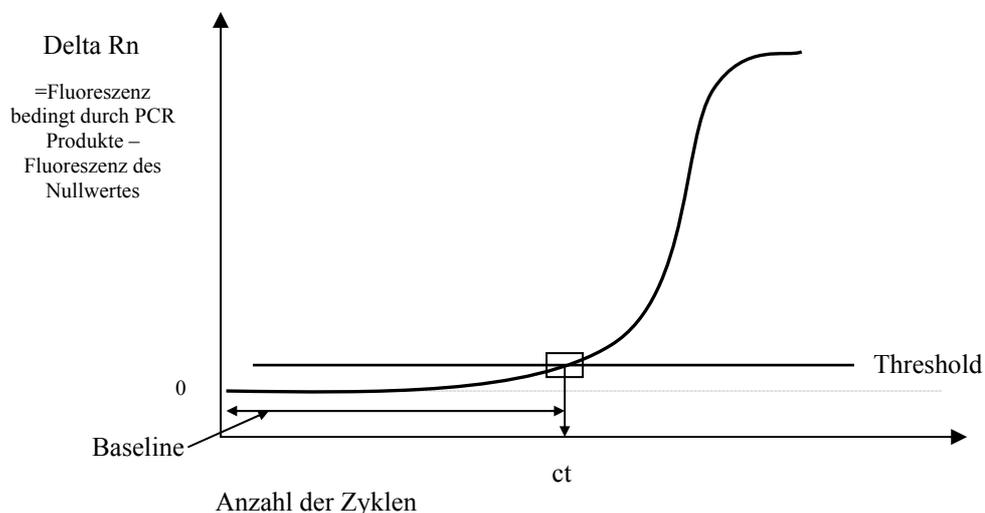


Abb. 4.6: Schematische Darstellung einer Amplifikationskurve

Die Auswertung der Analyse erfolgt über den ct-Wert („threshold cycle“). Am Anfang einer PCR-Reaktion kommt es kaum zu Veränderungen des Fluoreszenzsignals, hierbei handelt es sich um eine Hintergrundfluoreszenz, dieser Bereich wird als Baseline bezeichnet. Wenn sich die Fluoreszenz von der Hintergrundfluoreszenz abhebt werden PCR-Produkte detektiert. Der Schwellenwert (threshold) wird oberhalb der Baseline gesetzt und liegt in der exponentiellen Phase der Amplifikation. Der ct-Wert ist der Zyklus, an dem das Fluoreszenzsignal den threshold schneidet. Am ct-Wert befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an PCR-Produkt. Je mehr Ausgangs Ziel-DNA vorhanden war, umso schneller ist der ct-Wert erreicht, d.h. je kleiner der ct-Wert, umso mehr Ziel-DNA befand sich in der Probe.

Relative Quantifizierung:

Die Analyse der ct-Werte erfolgte mit Hilfe der relativen Quantifizierung. Bei dieser Methode wird die Genexpression des Zielgens (EGF und EGFR) auf ein Referenzgen, das sogenannte „Housekeeping Gen“ (HKG) bezogen. Dieses Vorgehen wird als Normalisierung der Expressionsergebnisse bezeichnet (Rasmussen, 2001). HKG sind nicht-regulierte Gene, die in jeder Zelle gleichbleibend exprimiert werden, unabhängig vom Zelltyp oder Zellstadium. Sie sind meist am Grundstoffwechsel der Zellen beteiligt. Als Referenzgen sind sie wichtig, um sicherzustellen, dass die Unterschiede bei den ct-Werten durch unterschiedliche Mengen an RNA verursacht sind und nicht durch Pipetierungenauigkeiten oder unterschiedliche RNA-Qualität. Somit kommt es zu einer Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse. In dieser Arbeit diente Ubiquitin (UQ) als HKG, dieses wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung, d.h. auf die konstante Expression in allen Proben überprüft.

Die Formel der Berechnung für die relative Quantifizierung lautet:

$$\Delta ct = ct_{\text{Zielgen}} - ct_{\text{Ubiquitin}}$$

Für jede Altersgruppe wurde dann der Mittelwert der delta ct-Werte berechnet. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Da die Vermehrung der DNA in der PCR logarithmisch erfolgt, liegt zwischen zwei ct-Werten eine logarithmische Zunahme der Anzahl der DNA-Kopien. Bei einer theoretisch angenommenen Effizienz von 2 werden also die PCR-Produkte nach jedem Zyklus verdoppelt (siehe auch Kapitel 4.3.1.5.5 Effizienz).

4.3.1.5.5 Effizienz

Theoretisch wird die DNA-Menge bei jedem PCR-Zyklus verdoppelt, dies entspricht aber nicht der Realität; meist werden geringere Vermehrungsraten erzielt. Faktoren, die die Effizienz beeinflussen, sind z.B. die Länge des Amplifikats oder das Primerdesign. Um die wahre Effizienz zu berechnen, wurde für jeden Primer eine Standardkurve aus unterschiedlichen Verdünnungsstufen erstellt. Hierzu wurde ein cDNA-Pool aus allen Proben zusammengestellt und folgende Verdünnungen kamen zum Einsatz: 40 ng, 20 ng, 2,5 ng, 0,312 ng, 0,039 ng. Jede Verdünnungsstufe wurde im dreifachen Ansatz angesetzt. Aus der Steigung der Standardkurve lässt sich dann die Effizienz nach folgender Formel berechnen: $E = 10^{-1/\text{Steigung}}$ (Rasmussen, 2001).

Unter optimierten Reaktionsbedingungen beträgt die Effizienz 1,7 – 1,9 und weist Schwankungen von 1,5 bis über 2,0 auf (Pfaffl, 2004).

Aus den resultierenden Standardkurven konnte dann die Effizienz, die Steigung und die Regression berechnet werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.2 dargestellt.

Tab. 4.2: Darstellung der Steigung, Effizienz und Regression für die verschiedenen Primer

	Steigung (m)	Effizienz (E)	Regression (R ²)
Ubiquitin	-3,527	1,92	0,9924
EGF	-3,441	1,95	0,988
EGFR	-3,552	1,91	0,992

4.3.2 Western blot

4.3.2.1 Prinzip eines Western blot

Beim Western blot handelt es sich um ein immunologisches Verfahren, bei dem ein Protein in einem Proteingemisch mit Hilfe eines Antikörpers detektiert wird. Zunächst werden die Proteine durch die Anwendung einer Gelelektrophorese nach Molekulargewicht getrennt und anschließend zur Detektion des gesuchten Proteins auf eine Membran geblotet. Auf diese Membran wird der Primärantikörper und danach der Sekundärantikörper gegeben

und anschließend das detektierte Protein mithilfe einer enzymatischen Reaktion durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht.

4.3.2.2 Proteinisolierung

Mit Hilfe eines hypertonen Lysispuffer wird das Gesamtprotein aus den Gewebeproben isoliert. Die Hypertonie des Puffers führt zum Platzen der Zellen und somit zur Freisetzung der Zellkompartimente und Proteine. Zum Schutz der Proteine sind im Puffer Proteaseinhibitoren enthalten.

Durchführung:

500 mg Gewebe wurden in doppeltes Volumen Lysispuffer (1ml) eingewogen und mit einem Dispergiergerät (Ultra-Turrax T25, IKA® Werke GmbH & Co KG, Staufen, Deutschland) in ca. 30 Sekunden zerkleinert und anschließend bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert (18000 g). Der Überstand der Zentrifugation wurde in kleine Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C gelagert.

Zusammensetzung des Lysis-Puffers siehe Kapitel 9.

4.3.2.3 Proteinquantifizierung

Um für die Gelelektrophorese des Western blots für jede Probe die gleiche Menge an Protein auftragen zu können, wurde bei den Proben die Proteinkonzentration in der Gesamtzellfraktion bestimmt. Zum Einsatz kam die Proteinquantifizierung nach Bradford (1976). Das Bradford Reagenz (Coomassie) bildet mit Proteinen Komplexe, hierdurch ändert sich das Absorptionsspektrum der Substanz. Die optische Dichte (OD) wurde photometrisch bei 595 nm bestimmt. Zur Berechnung der Proteinkonzentration wurde eine Standardkurve benötigt. Zum Einsatz kam die Standardkurve für BSA (bovines Serumalbumin), diese wurde mit Konzentrationen von 100µg/ml bis 1000µg/ml erstellt, wobei sich folgende Formel ergab:

$$\text{Proteinkonzentration} = \frac{\text{OD} - 0,0816}{0,0008} \mu\text{g/ml}$$

Durchführung:

Die Proben wurden 1:10 mit Aqua bidest verdünnt und von jeder Probe wurden 38 µl in eine PS-Halbmikroküvette (Plastibrand®, Brand GmbH, Wertheim, Deutschland) pipettiert. Für den Leerwert wurden 38 µl Aqua bidest verwendet. Die Proben wurden dann

mit 962 µl Bradford Reagenz versetzt und für 5 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß folgte die Messung der OD gegen den Blindwert.

Zusammensetzung des Bradford Reagenz siehe Kapitel 9.

4.3.2.4 EGFR-Western blot

4.3.2.4.1 SDS-Gelelektrophorese nach Lämmli (1970)

Prinzip:

Bei dieser Gelelektrophorese dient ein Polyacrylamidgel, welches SDS (Natriumdodecylsulfat) enthält, als Trennmedium. Beim SDS handelt es sich um ein anionisches Tensid (Detergens), welches die Eigenladung der Proteine überdeckt, so dass alle Proteine eine negative Ladung erhalten. Somit dient bei der Elektrophorese nur noch die Masse des Proteins als Trennkriterium. Das Gel besteht aus einem weitporigen Sammelgel, in welchem sich die Taschen für die Proben befinden und aus einem engmaschigen Trenngel.

Die Proben werden nach der Zugabe von Aqua bidest und Ladepuffer auf 95 °C erhitzt, um die Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzubrechen. Durch die Zugabe von β-Mercaptoethanol zum Ladepuffer kommt es noch zur Zerstörung der Quartärstrukturen. Die Elektrophorese wird in einem Tris-HCl/Tris-Glycin Puffersystem durchgeführt. Nach Anlegen der Spannung kommt es zur Wanderung der Proteine. Die negativ geladenen Proteine wandern zur Anode, wobei sich kleine Moleküle schneller durch die Maschen des Gels bewegen können. Zusätzlich zu den Proben wird ein Größenmarker aufs Gel geladen.

Durchführung:

Zuerst wurde das Trenngel hergestellt, hierzu wurden pro Gel folgende Lösungen in angegebener Reihenfolge unter Rühren in einem Becherglas gemischt:

- 4,9 ml Aqua Bidest
- 6,0 ml 30% Acrylamid (Serva GmbH & Co, Heidelberg, Deutschland)
- 3,8 ml Trenngelpuffer (Zusammensetzung siehe Kapitel 9)
- 150 µl 10% SDS (Natriumdodecylsulfat, ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- 150 µl 10% APS (Ammoniumperoxodisulfat, Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland)
- 6 µl TEMED (Tetramethylethylendiamin, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)

Diese Lösung wurde anschließend bis zur Markierung in die Gelkammer (Mighty Small Gelkammer, Hoefer Scientific Instrument, San Francisco, USA) gegossen und mit 500 μ l Isopropanol überschichtet. Nach etwa einer halben Stunde war das Gel polymerisiert und das Isopropanol wurde mit einem dünnen Blotpapier wieder abgesaugt. Dann wurde die Sammelgellösung nach gleicher Vorgehensweise wie das Trenngel gemischt. Für die Sammelgellösung wurden folgende Lösungen benötigt:

- 2,7 ml Aqua bidest
- 670 μ l 30% Acrylamid (Serva Deutschland), Heidelberg, Deutschland)
- 500 μ l Sammelgelpuffer (Zusammensetzung siehe Kapitel 9)
- 40 μ l 10% SDS (Natriumdodecylsulfat, ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- 40 μ l 10% APS (Ammoniumperoxodisulfat, Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland)
- 4 μ l TEMED (Tetramethylethylendiamin, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)

Die Sammelgellösung wurde bis zur oberen Kante in die Kammer gefüllt und die Kämme zur Taschenbildung eingesetzt. Nach dem Aushärten wurde das Gel in die Elektrophoresekammer (Mighty Small II, Hoefer Scientific Instrument, San Francisco, USA) überführt und mit Elektrodenpuffer aufgefüllt. Der Taschenkamm wurde gezogen und die Taschen mit Elektrodenpuffer gespült. Die Proben wurden mit Ladepuffer und Aqua bidest gemischt, wobei der Ladepuffer 1/5 des Gesamtvolumens betragen muss. Das Aqua bidest dient dazu, das fehlende Volumen auszugleichen, damit in jede Tasche das gleiche Volumen gegeben werden kann. Pro Tasche wurden 20 μ l einpipettiert. In diesen 20 μ l befinden sich jeweils 35 μ g Gesamtprotein. Die Proben wurden dann für 5 Minuten bei 95°C denaturiert, anschließend sofort auf Eis zwischengelagert und in die Taschen pipettiert. In die mittlere Tasche wurden 4 μ l Marker pipettiert. Zum Schluß wurde die Spannung angelegt, diese betrug 20 mA bis das Trenngel erreicht ist und danach 30 mA. Die Laufdauer betrug eine Stunde.

Verwendete Lösungen und Substanzen siehe Kapitel 9.

4.3.2.4.2 Proteintransfer

Beim Proteintransfer wandern die Proteine durch das Anlegen eines senkrecht zum Gel gerichteten elektrischen Feldes aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran (Whatman®, Schleicher & Schuell, Dassel). Dieser Vorgang erfolgt in einer Blot Kammer (Semi-

Phor™, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA). Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 15 Minuten in Towbin-Puffer gewaschen. Die 0,45 µm dicke Nitrocellulosemembran wurde für 5 Minuten in Aqua bidest, anschließend für 10 Minuten in Towbin-Puffer gewaschen und die Blotpapiere (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) in Towbin-Puffer getränkt. Nach dem Waschen wurde das Blot Sandwich in der Blot Kammer in folgender Reihenfolge aufgebaut:

1. zwei dünne Blotpapiere
2. ein dickes Blotpapier
3. Nitrocellulosemembran
4. Gel
5. ein dickes Blotpapier
6. zwei dünne Blotpapiere

Die Kammer wurde geschlossen und Spannung (38 mA) angelegt. Der Proteintransfer dauerte eine Stunde.

4.3.2.4.3 Detektion

Prinzip:

Die bei der Elektrophorese getrennten und gebloteten Proteine müssen nun noch über eine Antigen-Antikörper-Bindungsreaktion detektiert werden. Der Primärantikörper bindet an das passende Antigen und der Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper. An den Sekundärantikörper ist das Enzym HRP (horseradish peroxidase) gekoppelt, dieses katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, dabei kann Chemilumineszenz detektiert werden. Diese zweistufige Detektion hat den Vorteil, dass mehrere Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden können, was eine Signalverstärkung zur Folge hat.

Durchführung:

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran zunächst bei 4 °C über Nacht im Blockingreagenz auf einem Schüttler inkubiert. Dieser Schritt dient der Blockade der freien Bindungsstellen auf der Membran, um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Antigene zu verhindern. Nach zwölf Stunden wurde das Blockingreagenz abgekippt und die Membran zweimal für 10 Minuten in PBS-T-Puffer gewaschen. Danach wurde der Primärantikörper (Anti-EGFR, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) 1:60 mit 5 % Milchpulver in PBS-T-Puffer verdünnt auf die Membran gegeben und über Nacht

bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Der Primärantikörper wurde durch drei folgende Waschschrte wieder entfernt, wobei einmal fünf, zehn und fünfzehn Minuten in PBS-T-Puffer gewaschen wurde. Danach wurde der Sekundärantikörper (ECL™ Anti-rabbit IgG, Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, England) in einer Verdünnung von 1:5000 in 5 % Milchpulver in PBS-T-Puffer aufgetragen und für eine Stunde inkubiert. Dieser wurde in gleicher Weise wie der Primärantikörper durch drei Waschschrte entfernt. Nun wurde die Membran mit 2,5 ml ECL-Detektionsreagenz + 0,76 µl Wasserstoffperoxid (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) überschichtet und eine Minute inkubiert. Bei diesem Arbeitsschritt wurde das Substrat Luminol zum Enzym HRP gegeben. In der Dunkelkammer wurde auf die Membran ein Röntgenfilm (Kodak GmbH, Stuttgart, Deutschland) gelegt und für 30 Sekunden belichtet. Anschließend folgte die Entwicklung des Films für 2 Minuten im Entwicklerbad. Um den Entwickler zu entfernen wurde mit Aqua bidest gespült und danach zwei Minuten im Fixierbad (Superfix Plus, Tetenal Photowerk GmbH & Co KG, Norderstedt, Deutschland) fixiert und nochmals unter Leitungswasser gespült.

Verwendete Lösungen siehe Kapitel 9.

4.3.2.5 EGF-Western blot

4.3.2.5.1 Tricingel-Elektrophorese nach Schägger und Jagow (1987)

Prinzip:

Der Western blot wurde grundsätzlich wie für EGFR beschrieben durchgeführt. Jedoch kam aufgrund der kleineren Molekülmasse des EGF ein Tricingel zum Einsatz. Hierbei handelt es sich auch um eine SDS-Gelelektrophorese, bei der Tricin anstelle von Glycin eingesetzt wird. Des Weiteren handelt es sich um ein dreischichtiges Gelsystem und eine kontinuierliche Elektrophorese, d.h. dass sich die Puffer von Trenn- und Sammelgel nicht unterscheiden.

Durchführung:

Wie beim SDS-Gel wurden die einzelnen Gele aufeinandergegossen, als erstes wurde das Trenngel, danach das Spacergel und als letztes das Sammelgel in die Gießkammer gegossen. Tabelle 4.3 zeigt die Zusammensetzung des Tricingels.

Tab. 4.3: Zusammensetzung des Tricingels

	Trenngel	Spacergel	Sammelgel
Aqua bidest	3,8 ml	4,8 ml	3,3 ml
Acrylamid	6,7 ml	3,1 ml	0,4 ml
Gel Puffer	6,7 ml	5 ml	1,24 ml
Glycerol (ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)	2,7 g	2 g	-
APS (Ammoniumperoxodi- sulfat, Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland)	66,7 µl	75 µl	60 µl
TEMED (Tetramethylethylen- diamin, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)	6,7 µl	7,5 µl	2,5 µl

Die Probenvorbereitung und Berechnung entspricht der Vorgehensweise beim EGFR. Der Elektrophoreselauf wird bei 90 V für 4 – 5 Stunden durchgeführt.

Verwendete Lösungen siehe Kapitel 9.

4.3.2.5.2 Proteintransfer

Entspricht der Vorgehensweise beim EGFR (siehe Kapitel 4.3.2.4.2).

4.3.2.5.3 Detektion

Auch hier entspricht die Vorgehensweise im Prinzip der des EGFR. Als Primärantikörper kommt ein Anti EGF Antikörper (Anti-porcines-EGF, polyclonal, Institut für Tierhaltung und Tierzucht, Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie) zum Einsatz. Der Western blot des EGF wurde bei einer Antikörperverdünnung von 1:5000 durchgeführt. Zur Optimierung wurden verschiedene Varianten an Membranen (Nitrocellulose und PVDF) und Blotzeiten überprüft. Weiterhin wurde nach der Blockierung der freien Bindungsstellen mit dem Blockingreagenz eine weitere Blockade mit Kaninchenserum durchgeführt, um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers zu verhindern. Keiner

der durchgeführten Versuche führte zu spezifischen Banden auf dem Blot, daraufhin wurde der Schluß gezogen, dass der Primärantikörper nicht für den Western blot geeignet ist.

4.3.3 In situ Hybridisierung des EGFR

Die in situ Hybridisierung des EGFR wurde freundlicherweise vom Institut für Tieranatomie, -histologie und -embryologie der Justus-Liebig-Universität Giessen, Prof. Dr. M. Bergmann, durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode wurde das Duodenum und das Colon ascendens bei je einem Tier der 9. Lebenswoche und der beiden Neonatengruppen untersucht. Die in situ Hybridisierung konnte den immuncytologischen Nachweis des EGFR weitergehend bestätigen.

4.4 Statistik

Die Daten der Immuncytochemie und der PCR sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (MW \pm SEM) dargestellt. Mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS (Version 11, SPSS, IL, USA) wurden die Mittelwerte auf Signifikanzen geprüft.

Zuerst wurden alle Daten mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung sowie mittels Levene-Test auf Varianzhomogenität getestet. Daraufhin wurden bei den normalverteilten Daten Mehrfachvergleiche mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) und Zweifachvergleiche mit dem t-Test bei unabhängigen Stichproben durchgeführt.

Es wurden folgende Wahrscheinlichkeitsgrenzen festgelegt:

$p > 0,05$: nicht signifikant

$p \leq 0,05$: signifikant (*)

$p \leq 0,01$: hoch signifikant (**)

$p \leq 0,001$: höchst signifikant (***)

5. Ergebnisse

5.1 Besonderheiten der Morphologie des Intestinaltraktes von Schweineföten

Die Abbildung 5.1 zeigt Beispiele für histologische Schnitte des Colon ascendens der drei untersuchten Fötalstadien.

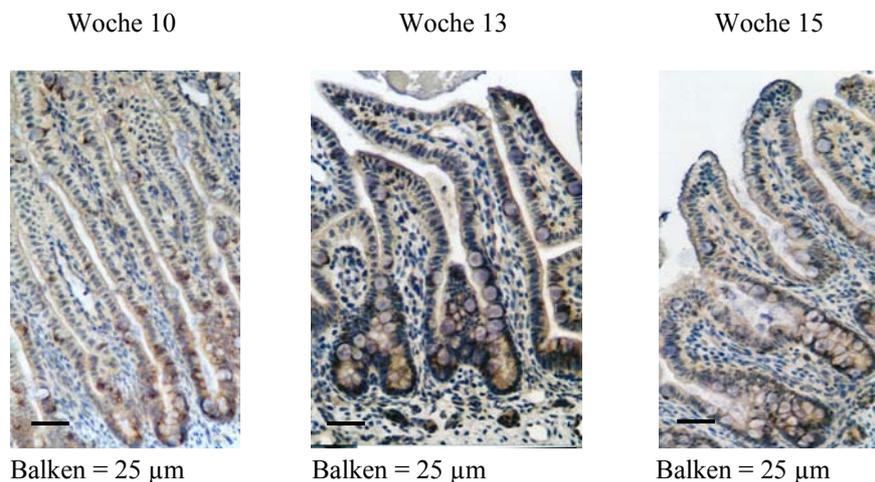


Abb. 5.1: Bilder des Colon ascendens der 10., 13. und 15. Graviditätswoche (immuncytochemische Färbung EGF)

Für adulte Tiere ist davon auszugehen, dass im Colon ascendens nur Krypten und keine Zotten vorliegen. In der Abbildung 5.1 ist jedoch eine Zottenbildung in allen drei Graviditätswochen zu sehen. Mit fortschreitender Fötalentwicklung nahm die Zottenlänge im Colon ascendens ab, während die Kryptenbildung allmählich zunahm. So konnte in der 10. Woche die Krypte noch nicht abgegrenzt werden bzw. war noch nicht vorhanden. In der 13. Graviditätswoche waren die Krypten zum Teil bereits deutlich sichtbar und wurden bis zur 15. Graviditätswoche tiefer. Jedoch war auch bei diesen beiden Stadien nicht immer eine deutliche Grenze zwischen Krypten und Zotten zu erkennen.

Um die Zottenlänge zwischen Jejunum und Colon ascendens sowie zwischen den Fötalstadien zu beurteilen, wurde die Anzahl der Epithelzellen der Hemikrypten und -zotten ermittelt. Da keine sichere Trennung zwischen Zotten und Krypten erfolgen konnte, sind die Epithelzellzahlen als Gesamtzellzahl der Hemikrypten plus -zotten dargestellt. In Abbildung 5.2 ist die Gesamtzahl der Epithelzellen der Hemikrypten plus -zotten der drei Fötalstadien im Jejunum und Colon ascendens vergleichend dargestellt.

Anhand der Klammern sind die signifikanten Unterschiede innerhalb bzw. zwischen den Altersgruppen dargestellt.

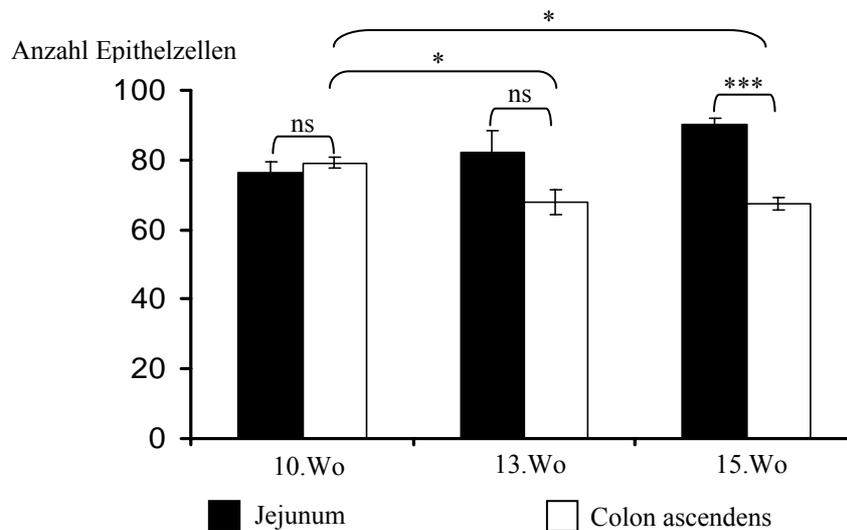


Abb. 5.2: Anzahl der Epithelzellen der Hemikrypten plus -zotten im Jejunum und Colon ascendens der 10., 13. und 15. Graviditätswoche

In der 10. und 13. Graviditätswoche unterschied sich die Anzahl der Epithelzellen zwischen Jejunum und Colon ascendens nicht signifikant. Mit zunehmendem Alter war im Jejunum zu erkennen, dass die Zellzahl zunahm und gleichzeitig im Colon ascendens abnahm, so dass in der 15. Woche die Zellzahl im Jejunum signifikant höher war als im Colon ascendens ($p \leq 0,001$). Die Abnahme der Zellzahl im Colon ascendens von der 10. Woche zur 13. Woche und von der 10. Woche zur 15. Woche war ebenfalls signifikant ($p \leq 0,05$). Die geringer ausgeprägte Zunahme der Zellzahl von der 10. Woche zur 15. Woche im Jejunum zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Fötalstadien.

5.2 Ergebnisse der Expression des EGF

5.2.1 Zelluläre Lokalisation der EGF-Bildung

Die immunocytochemische Färbung des EGF erfolgte bei allen Altersgruppen bei allen vier Tieren. Die Abbildung 5.3 zeigt die zelluläre Lokalisation des EGF beispielhaft bei einem Föten der 13. Woche und bei einem adulten Tier.

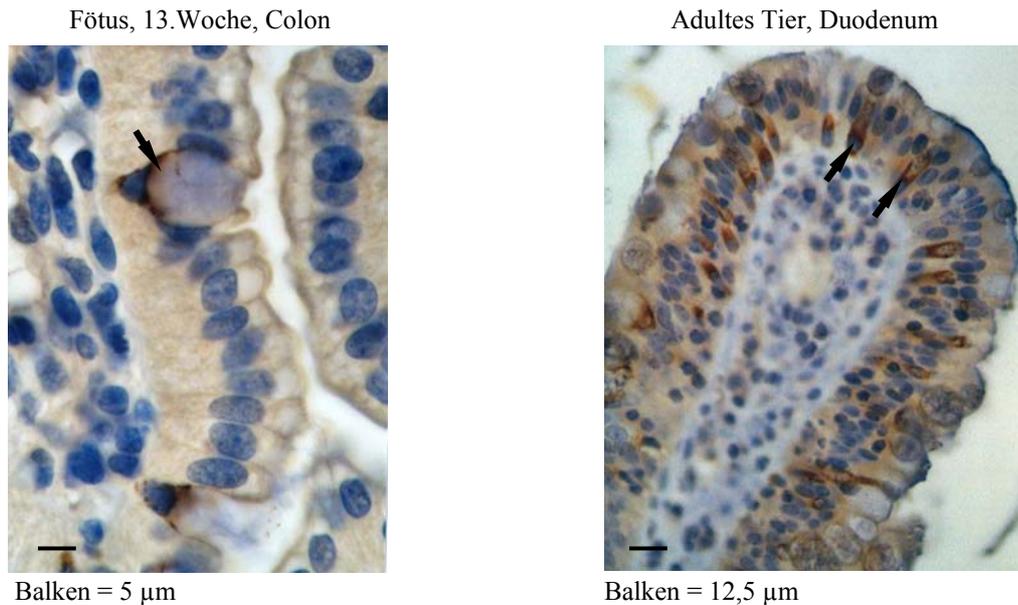


Abb. 5.3: Repräsentative Bilder der zellulären Lokalisation des EGF (immuncytochemische Färbung EGF)

Links: Bildausschnitt aus dem Colon eines Fötus der 13. Graviditätswoche

Rechts: Bildausschnitt aus dem Duodenum eines adulten Tieres

Pfeile markieren EGF-positive Zellen

EGF war im Zytoplasma der Gobletzellen lokalisiert, wobei alle aufgefundenen Gobletzellen ausnahmslos positiv gefärbt waren. Andere Zellen der Lamina epithelialis mucosae waren negativ, das heißt eine EGF-Expression konnte auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden. Auch die noch undifferenzierten Epithelzellen in den Krypten schienen EGF zu produzieren. Im Bereich der Schleimgranula war zu erkennen, dass EGF aus dem Zytoplasma in die Schleimgranula hineindiffundiert (Pfeil, linkes Bild). Die Schleimgranula selbst zeigten durch den Verdünnungseffekt nur eine schwache Anfärbung.

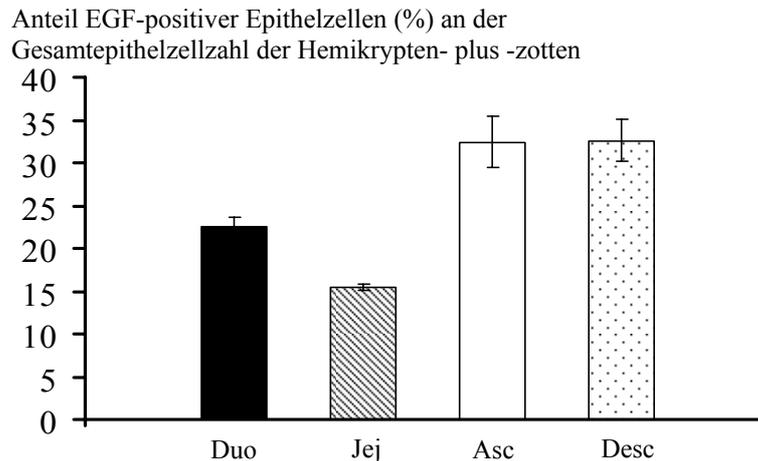
5.2.2 EGF-Bildung im Intestinaltrakt adulter Schweine

Zunächst werden die Ergebnisse der Immuncytochemie und der mRNA-Bestimmung der adulten Tiere dargestellt. Diese Tiergruppe soll später als Referenzgruppe zum Vergleich zu den anderen Altersgruppen dienen.

5.2.2.1 Immuncytochemische Nachweise

5.2.2.1.1 Bildung von EGF in unterschiedlichen Abschnitten des Intestinaltraktes adulter Tiere

In Abbildung 5.4 ist der Anteil an EGF-positiv gefärbten Zellen (%) an der Gesamtepithelzellzahl der Hemikrypten plus -zotten der adulten Tiere aller vier untersuchten Darmabschnitte dargestellt.



	Duodenum	Jejunum	C.ascendens	C.descendens
MW ± SEM	22,45 ± 1,07 ^a	15,40 ± 0,38 ^a	32,45 ± 2,95 ^a	32,61 ± 2,44 ^a

Unterschiedliche Buchstaben ^{ab} zwischen den Spalten weisen auf signifikante Unterschiede hin.

Abb. 5.4: Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Gesamtepithelzellzahl der Hemikrypten plus -zotten der untersuchten Darmabschnitte adulter Tiere mit tabellarischer Darstellung der Signifikanzen (Mittelwerte ±SEM)

Beim Vergleich der Darmabschnitte zeigten sich durch die hohe individuelle Schwankungsbreite keine signifikanten Unterschiede im prozentualen Anteil der EGF-positiven Zellen. Immerhin zeigte sich im Bereich des Dünndarmes anhand der Mittelwerte, dass das Duodenum einen um Faktor 1,5 höheren Wert aufwies als das Jejunum. Auch war der prozentuale Anteil an EGF-positiven Zellen im Dickdarm höher als im Dünndarm. So war z.B. im Dickdarm der prozentuale Anteil der EGF-positiven Zellen etwa doppelt so hoch wie im Jejunum.

5.2.2.1.2 Bildung von EGF im Zotten- und Kryptensystem adulter Tiere

Um die prozentuale Verteilung der EGF-positiven Zellen zwischen den Hemikrypten und -zotten zu vergleichen, wurden die Darmabschnitte bei der Auszählung der immuncytochemischen Färbung in Hemikrypten und Hemizotten geteilt. Diese wurden

zum Vergleich des prozentualen EGF-Anteils in den Kompartimenten weiter unterteilt (siehe Kapitel 4.2.4). Nachfolgend sind diese Ergebnisse für die untersuchten Darmabschnitte der adulten Tiere dargestellt.

5.2.2.1.2.1 Duodenum

Die Abbildung 5.5 zeigt den Vergleich des prozentualen Anteils an EGF-positiven Zellen an der Epithelzellzahl der Hemikrypten bzw. -zotten zwischen Hemikrypten und -zotten des Duodenums der adulten Tiere. Anhand der Klammer sind die signifikanten Unterschiede dargestellt.

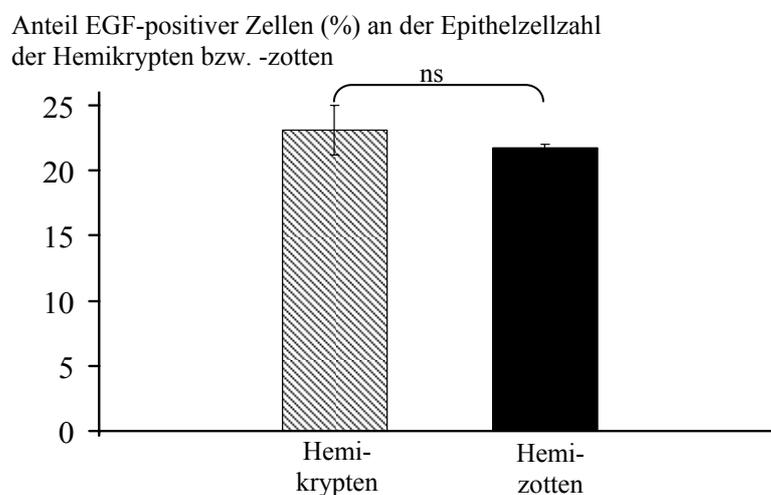


Abb. 5.5: Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Epithelzellzahl der Hemikrypten bzw. -zotten des Duodenums adulter Tiere (Mittelwerte \pm SEM)

Im Duodenum zeigte sich bei den adulten Tieren kein signifikanter Unterschied des prozentualen Anteils an EGF-positiven Zellen an der Epithelzellzahl der Hemikrypten bzw. -zotten zwischen Krypten und Zotten. Beide wiesen einen nahezu identischen prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen auf.

Die folgende Abbildung 5.6 zeigt schematisch für jedes Kompartiment den prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen an der Epithelzellzahl der jeweiligen Kompartimente für das Duodenum der adulten Tiere. Dieses Schema wird weiterhin für jeden Darmabschnitt entsprechend verwendet. Anhand der Klammern sind die signifikanten Unterschiede zwischen den Kompartimenten dargestellt.

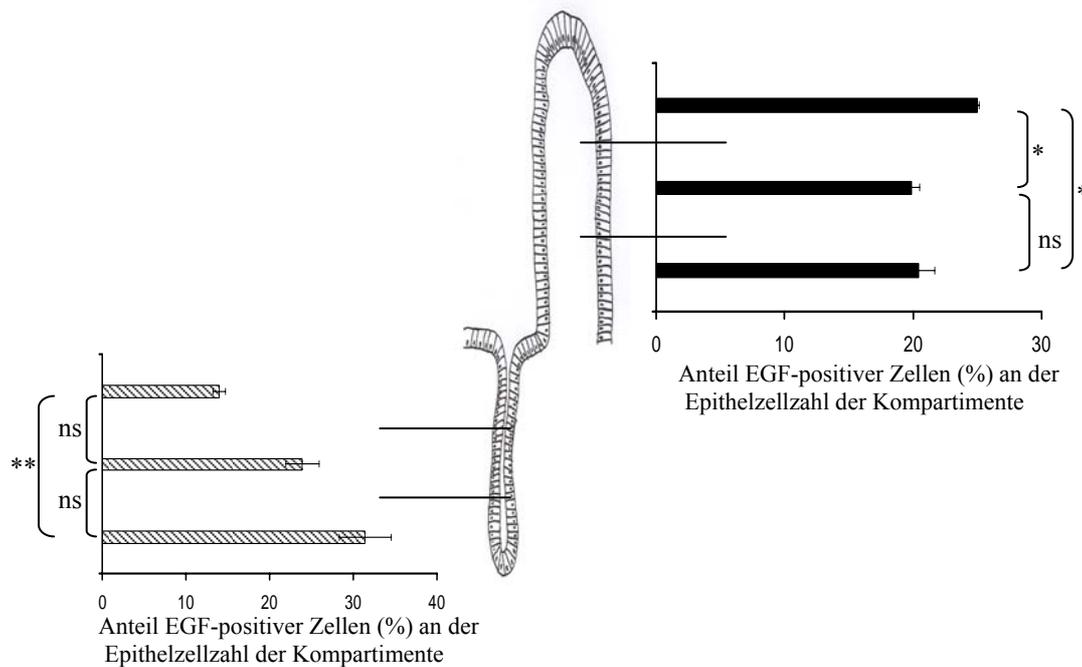


Abb. 5.6: Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Epithelzellzahl der Kompartimente der Hemikrypten und -zotten des Duodenums adulter Tiere (Mittelwerte \pm SEM)

Hemikrypten:

Der prozentuale Anteil an EGF-positiven Zellen an der Epithelzellzahl des entsprechenden Kompartiments nahm vom basalen zum luminalen Kryptenkompartiment kontinuierlich ab. Das basale Kompartiment wies somit den größten prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen auf, unterschied sich jedoch nicht signifikant zum mittleren Kryptenkompartiment. Auch das mittlere Kompartiment unterschied sich nicht signifikant vom luminalen Kompartiment. Das basale Kryptenkompartiment wies jedoch einen um den Faktor 2,2 signifikant höheren prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen auf als das luminalen Kryptenkompartiment ($p \leq 0,05$).

Hemizotten:

Im Zottenbereich des Duodenums konnte man den höchsten prozentualen Anteil an EGF-positiven Gobletzellen im Zottenspitzenbereich finden. Hier war der prozentuale Anteil an EGF-positiven Zellen signifikant höher als im mittleren und basalen Bereich ($p \leq 0,05$). Der prozentuale EGF-Anteil in der Zottenmitte und Zottenbasis war beinahe identisch.

5.2.2.1.2.2 Jejunum

Die Abbildung 5.7 zeigt den Vergleich des prozentualen Anteils an EGF-positiven Zellen an der Epithelzellzahl der Hemikrypten bzw. -zotten zwischen Krypten und Zotten des

Jejunums der adulten Tiere. Anhand der Klammer sind die signifikanten Unterschiede dargestellt.

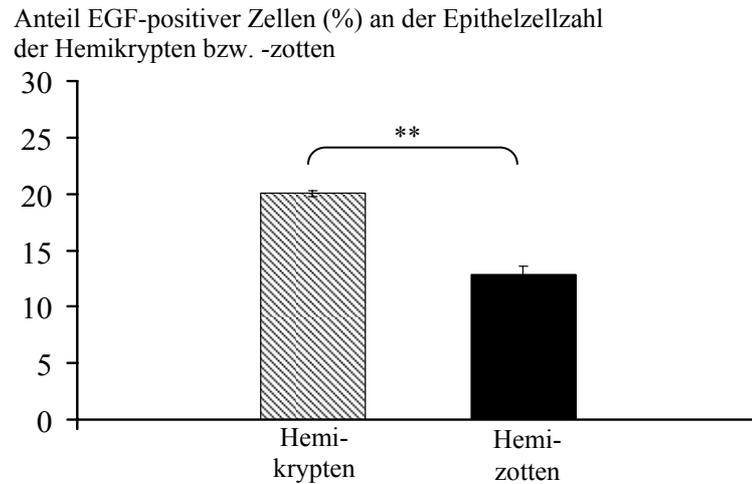


Abb. 5.7: Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Epithelzellzahl der Hemikrypten bzw. -zotten des Jejunums adulter Tiere (Mittelwerte \pm SEM)

Im Jejunum zeigte sich in der Hemikrypte ein um den Faktor 1,6 signifikant höherer prozentualer Anteil an EGF-positiven Zellen im Vergleich zur Hemizotte ($p \leq 0,05$).

In Abbildung 5.8 ist für jedes Kompartiment der prozentuale Anteil an EGF-positiven Zellen an der Epithelzellzahl der Kompartimente für das Jejunum der adulten Tiere zu sehen. Anhand der Klammern sind die signifikanten Unterschiede zwischen den Kompartimenten dargestellt.

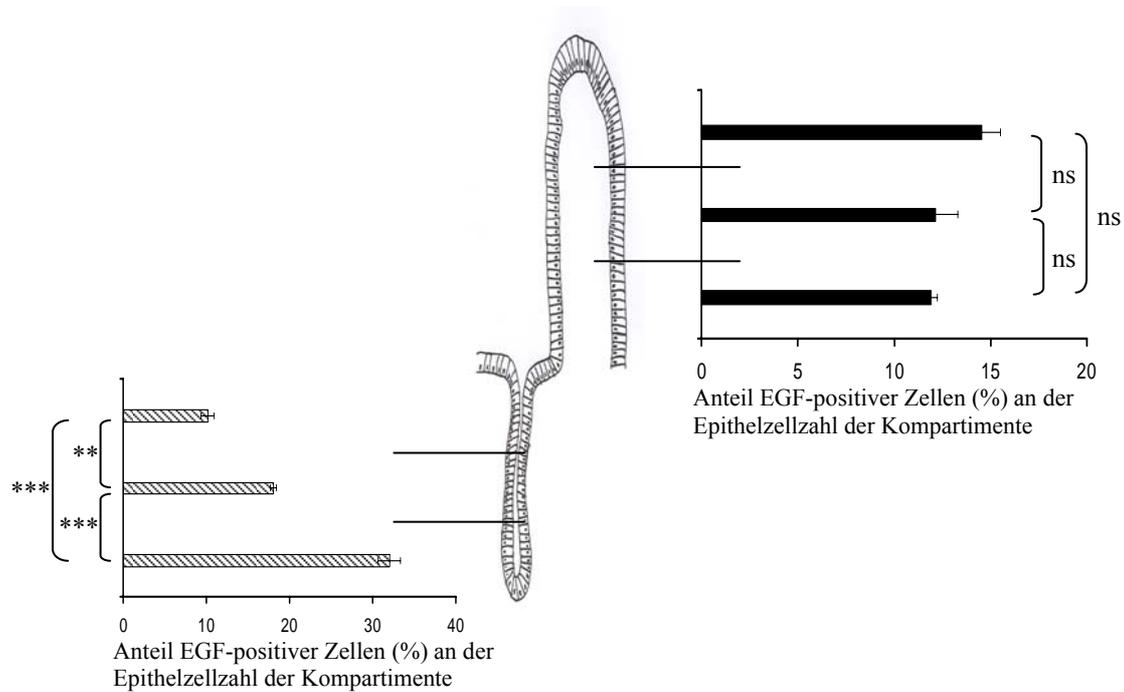


Abb. 5.8: Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Epithelzellzahl der Kompartimente der Hemikrypten und -zotten des Jejunums adulter Tiere (Mittelwerte \pm SEM)

Hemikrypten:

Grundsätzlich ergab sich eine ähnliche Verteilung wie im Duodenum. In den Kryptenkompartimenten des Jejunums war eine Abnahme des Prozentteils EGF-gefärbter Zellen vom basalen zum luminalen Kryptenkompartiment zu verzeichnen. Den höchsten prozentualen EGF-Anteil wies das basale Kryptenkompartiment auf, welches sich signifikant vom mittleren ($p \leq 0,001$) und luminalen ($p \leq 0,001$) Kompartiment unterschied. Im basalen Kompartiment war der prozentuale EGF-Anteil um den Faktor 1,8 höher als im mittleren Kryptenkompartiment und um den Faktor 3,2 höher als im luminalen Kryptenkompartiment. Das mittlere Kryptenkompartiment wies einen um den Faktor 1,8 signifikant höheren prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen auf als das luminalen Kompartiment ($p \leq 0,05$).

Hemizotten:

In der Zotte traten zwischen den Kompartimenten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des prozentualen Anteils an EGF-positiven Zellen auf. Immerhin wies die Zottenspitze den höchsten Anteil auf (Mittelwert).

5.2.2.1.2.3 Colon ascendens

Die Abbildung 5.9 zeigt den prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen an der Epithelzellzahl der Kompartimente der Hemikrypten des Colon ascendens. Anhand der Klammern sind die signifikanten Unterschiede zwischen den Kompartimenten dargestellt. Entsprechend der morphologischen Besonderheit im Colon sind für diese Darmabschnitte nur die Krypten schematisch dargestellt.

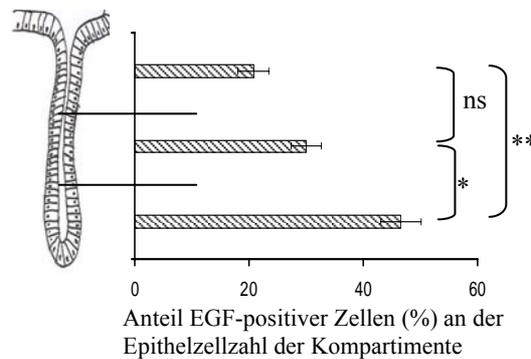


Abb. 5.9: Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Zellzahl der Kompartimente des Colon ascendens adulter Tiere (Mittelwerte \pm SEM)

Im Colon ascendens nahm der prozentuale Anteil an EGF-positiven Zellen an der Epithelzellzahl der Kompartimente in Richtung Darmlumen ab. Den höchsten prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen besaß das basale Kryptenkompartiment. Hier waren die EGF-positiven Zellen um den Faktor 1,6 signifikant höher als im mittleren Kompartiment ($p \leq 0,05$) und um den Faktor 2,2 signifikant höher als im luminalen Kompartiment ($p \leq 0,05$). Das luminale und mittlere Kompartiment wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.

5.2.2.1.2.4 Colon descendens

Die Abbildung 5.10 zeigt den prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen an der Epithelzellzahl der Kompartimente der Hemikrypten des Colon descendens. Anhand der Klammern sind die signifikanten Unterschiede zwischen den Kompartimenten dargestellt.

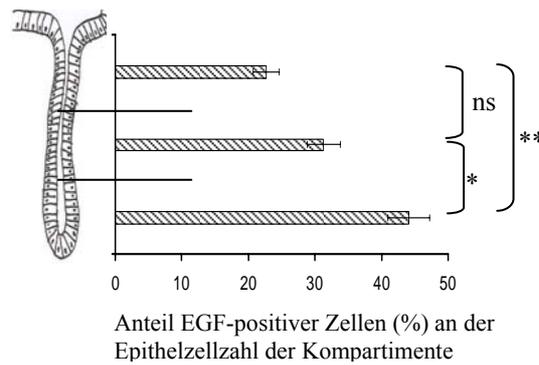


Abb. 5.10: Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Epithelzellzahl der Kompartimente des Colon descendens adulter Tiere (Mittelwerte \pm SEM)

Der prozentuale Anteil an EGF-positiven Zellen an der Epithelzellzahl der Kompartimente nahm auch hier vom basalen zum luminalen Kompartiment kontinuierlich ab. Den höchsten prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen besaß das basale Kompartiment. Hier war der prozentuale Anteil an EGF-positiven Zellen um den Faktor 1,4 signifikant höher als im mittleren Kompartiment ($p \leq 0,05$) und um den Faktor 1,9 signifikant höher als im luminalen Kompartiment ($p \leq 0,05$). Zwischen luminalen und mittlerem Kompartiment bestand kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des prozentualen Anteils an EGF-positiven Zellen.

5.2.2.2 Nachweise auf mRNA-Ebene (PCR) in unterschiedlichen Abschnitten des Intestinaltraktes

Die Expression des EGF wurde auf mRNA-Ebene mittels quantitativer real-time PCR ermittelt. Die Ergebnisse der untersuchten Darmabschnitte sind als Delta (Δ) ct-Werte dargestellt, diese wurden durch Normalisierung gegen das Haushaltsgen Ubiquitin errechnet. Die Δ ct-Werte der adulten Tiere sind in Tabelle 5.1 dargestellt.

Tab. 5.1: Δ ct-Werte der mRNA für EGF der untersuchten Darmabschnitte adulter Tiere

	Duodenum	Jejunum	Colon ascendens	Colon descendens
MW \pm SEM	6,49 \pm 0,67 ^a	10,84 \pm 0,30 ^b	6,64 \pm 0,22 ^a	6,67 \pm 0,30 ^a

Unterschiedliche Buchstaben^{ab} zwischen den Spalten weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den Darmabschnitten hin.

Das Jejunum wies den niedrigsten EGF-mRNA-Gehalt auf, wobei sich die Werte signifikant von den drei anderen Darmabschnitten unterschieden. Der mRNA-Gehalt war

im Duodenum etwa um den Faktor 20 höher ($p \leq 0,05$), im Colon ascendens und descendens etwa um den Faktor 18 höher ($p \leq 0,05$) als im Jejunum. Duodenum und Colon, sowie Colon ascendens und Colon descendens wiesen keine signifikanten Unterschiede zueinander auf.

5.2.2.3 Gegenüberstellung der Ergebnisse des EGF-Nachweises auf Proteinebene mit den Ergebnissen auf mRNA-Ebene adulter Tiere

Für den Vergleich der Ergebnisse der Immuncytologie mit denen der PCR werden für die Immuncytologie die Ergebnisse aus Kapitel 5.2.2.1.1 verwendet.

Bei beiden Untersuchungsmethoden wies das Jejunum die geringste EGF-Aktivität auf. Unterschiede zeigen sich in den Darmabschnitten Duodenum und Colon. Bei der Immuncytologie war der prozentuale Anteil an EGF-positiven Zellen in den beiden Colonabschnitten höher als im Duodenum, während sich die Expression der mRNA zwischen Duodenum und Colon kaum unterschied.

5.2.3 Veränderungen der EGF-Expression entlang des Intestinaltraktes während der Ontogenese

Um zu untersuchen, ob das EGF-System während der Entwicklung eine unterschiedliche Expression bzw. EGF-Aktivität zeigt, wurden verschiedene prä- und postnatale Altersgruppen untersucht. Pränatal wurden Föten der 10., 13. und 15. Graviditätswoche untersucht und postnatal Tiere der 9. und 18. Lebenswoche sowie adulte Tiere.

5.2.3.1 Immuncytochemischer Nachweis

In nachfolgender Tabelle sind die Ergebnisse des prozentualen Anteils an EGF-positiven Zellen an der Gesamtepithelzellzahl der Hemikrypten plus -zotten für die untersuchten Darmabschnitte sowie der Vergleich jeder Altersgruppe mit den adulten Tieren zusammengestellt.

Tab. 5.2: Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Gesamtepithelzellzahl der Hemikrypten plus -zotten der untersuchten Darmabschnitte der Fötalstadien, der 9. und 18. Lebenswoche sowie der adulten Tiere (Mittelwerte \pm SEM)

	Duodenum	Jejunum	Colon ascendens	Colon descendens
10. GW		11,98 \pm 0,80 ^{a/*}	23,23 \pm 0,99 ^{b/**}	
13. GW		8,97 \pm 0,52 ^{a/***}	23,24 \pm 1,22 ^{b/**}	
15. GW		9,72 \pm 0,48 ^{a/***}	27,10 \pm 1,92 ^{b/*}	
9. LW	27,79 \pm 1,62 ^{a/ns}	17,89 \pm 0,51 ^{b/*}	33,24 \pm 0,93 ^{c/ns}	27,72 \pm 0,79 ^{a/ns}
18. LW	18,33 \pm 2,04 ^{a/ns}	12,66 \pm 1,42 ^{b/ns}	25,53 \pm 1,60 ^{c/**}	27,79 \pm 0,93 ^{c/ns}
adult	22,54 \pm 1,07	15,40 \pm 0,38	32,45 \pm 2,95	32,61 \pm 2,44

Buchstaben^{abc} zwischen den Spalten weisen auf signifikante Unterschiede hin.

Sternchen^{***} zwischen den Zeilen weisen auf signifikante Unterschiede zu den adulten Tieren hin.

5.2.3.1.1 Vergleich des prozentualen EGF-Anteils an der Gesamtepithelzellzahl der Hemikrypten plus -zotten zwischen den untersuchten Darmabschnitten

Wie in Tabelle 5.2 ersichtlich, waren bei allen Tiergruppen die immunocytochemisch erfassten prozentualen Anteile an EGF-positiven Zellen im Dickdarm höher als im Dünndarm. Eine Ausnahme bildet die 9. Lebenswoche, hier war der prozentuale Anteil an EGF-positiven Zellen im Colon descendens und Duodenum etwa gleich hoch und somit war der prozentuale EGF-Anteil im Colon ascendens signifikant höher als im Colon descendens. Bei allen Gruppen wies das Jejunum den niedrigsten prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen auf. Zwischen Colon ascendens und Colon descendens war bei der 18. Lebenswoche und den adulten Tieren kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen, diesbezüglich bildete wieder die 9. Lebenswoche eine Ausnahme (siehe oben). Leider waren nicht alle Unterschiede immer signifikant, jedoch war ein eindeutiger Trend dahingehend zu verzeichnen, dass der prozentuale EGF-Anteil im Dickdarm höher war, im Vergleich zum Dünndarm. Die untersuchten Fötalstadien zeigten im Colon ascendens einen signifikant höheren prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen als im Jejunum.

5.2.3.1.2 Vergleich der Altersgruppen mit den adulten Tieren

Im Folgenden werden die Ergebnisse aus Tabelle 5.2 für die jeweiligen Darmabschnitte einzeln besprochen.

Duodenum:

Die 9. und 18. Lebenswoche zeigten keinen signifikanten Unterschied bezüglich des prozentualen Anteils an EGF-positiven Zellen zu den adulten Tieren.

Jejunum:

Der prozentuale Anteil an EGF-positiven Zellen war bei den adulten Tieren signifikant höher als bei den Föten ($p \leq 0,05$). Die 10. Graviditätswoche zeigte einen um den Faktor 1,3 niedrigeren prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen und die 13. und 15. Graviditätswoche einen etwa um den Faktor 1,7 niedrigeren Anteil an EGF-positiven Zellen. Die 9. Lebenswoche zeigte einen signifikant höheren prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen als die adulten Tiere ($p \leq 0,05$). Die 18. Lebenswoche unterschied sich nicht signifikant von den adulten Tieren.

Colon ascendens:

Auch im Colon ascendens war der prozentuale Anteil an EGF-positiven Zellen bei den adulten Tieren etwa um den Faktor 1,3 höher als bei den Föten ($p = \leq 0,05$). In der 9. Lebenswoche war etwa der gleiche prozentuale Anteil an EGF-positiven Zellen wie bei den adulten Tieren zu verzeichnen. In der 18. Lebenswoche war ein um den Faktor 1,3 geringerer prozentualer Anteil an EGF-positiven Zellen nachzuweisen ($p \leq 0,05$).

Colon descendens:

Im Colon descendens traten keine signifikanten Unterschiede zu den adulten Tieren auf.

5.2.3.2 Nachweise auf mRNA-Ebene

In Tabelle 5.3 sind die Δct -Werte der mRNA für EGF der drei Fötalstadien, der 9. Lebenswoche und der adulten Tiere dargestellt. Die adulten Tiere wurden in die Tabelle mit aufgenommen, um die Altersgruppen mit den adulten Tieren vergleichen zu können. Für die Darmabschnitte Duodenum und Colon descendens ist kein Vergleich mit den Föten möglich, da für diese Tiere von diesen Darmabschnitten kein Probenmaterial vorhanden war. Der Vergleich der adulten zur 18. Lebenswoche musste auch entfallen, da auch von dieser Gruppe kein Probenmaterial für die PCR zur Verfügung stand.

Tab. 5.3: Δ ct-Werte der mRNA für EGF der untersuchten Darmabschnitte der Fötalstadien, der 9. Lebenswoche sowie der adulten Tiere (Mittelwerte \pm SEM)

	Duodenum	Jejunum	Colon ascendens	Colon descendens
10. GW		10,30 \pm 0,24 ^{a / ns}	9,73 \pm 0,10 ^{a / ***}	
13. GW		10,13 \pm 0,19 ^{a / ns}	10,14 \pm 0,22 ^{a / ***}	
15. GW		11,19 \pm 0,35 ^{a / ns}	10,38 \pm 0,30 ^{a / ***}	
9. LW	6,05 \pm 0,81 ^{a / ns}	12,09 \pm 0,35 ^{b / *}	6,62 \pm 0,39 ^{a / ns}	7,64 \pm 0,39 ^{a / ns}
adult	6,49 \pm 0,67 ^a	10,84 \pm 0,30 ^b	6,64 \pm 0,22 ^a	6,67 \pm 0,30 ^a

Unterschiedliche Buchstaben^{ab} zwischen den Spalten weisen auf signifikante Unterschiede hin.

Sternchen^{***} zwischen den Zeilen weisen auf signifikante Unterschiede zu den adulten Tieren hin.

5.2.3.2.1 Vergleich der Expression der mRNA für EGF zwischen den untersuchten Darmabschnitten

Wie in Tabelle 5.3 ersichtlich, zeigten die Föten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Expression der mRNA für EGF zwischen Jejunum und Colon ascendens.

In der 9. Lebenswoche war die Expression der mRNA für EGF im Jejunum am geringsten und unterschied sich signifikant von den anderen Darmabschnitten ($p \leq 0,001$). Das Duodenum unterschied sich vom Colon nicht signifikant, wies jedoch eine geringgradig höhere Expression des EGF auf.

Zusammenfassend konnte man bei den postnatalen Tieren im Duodenum und in den beiden Colonabschnitten eine sich annähernd entsprechende Expression der mRNA für EGF sehen, die signifikant höher war als die des Jejunums.

5.2.3.2.2 Vergleich der Expression der mRNA für EGF der Altersgruppen mit den adulten Tieren

Im Folgenden werden die Ergebnisse aus Tabelle 5.3 für die jeweiligen Darmabschnitte einzeln besprochen.

Duodenum:

Die Expression der EGF-mRNA der 9. Lebenswoche unterschied sich nicht signifikant von den adulten Tieren.

Jejunum:

Im Jejunum unterschied sich die 9. Lebenswoche mit einer um den Faktor 2,4 niedrigeren Expression der mRNA für EGF ($p \leq 0,05$) von den adulten Tieren. Die drei Fötalstadien zeigten keine signifikanten Unterschiede zu den adulten Tieren.

Colon ascendens:

In diesem Darmabschnitt war die Expression der EGF-mRNA der adulten Tiere und der 9. Lebenswoche nahezu identisch. Die drei Fötalstadien besaßen jedoch eine signifikant ($p \leq 0,001$) niedrigere EGF-Expression als die adulten Tiere. Die 10. Graviditätswoche wies eine 8fach niedrigere Expression der EGF-mRNA auf, bei der 13. Graviditätswoche war die Expression um den Faktor 11 niedriger und bei der 15. Graviditätswoche um den Faktor 13 niedriger als bei den adulten Tieren.

Colon descendens:

Die EGF-Expression der 9. Lebenswoche war um die Hälfte geringer als bei den adulten Tieren, jedoch unterschieden sich diese Werte nicht signifikant.

5.2.3.3 Gegenüberstellung der Ergebnisse des EGF-Nachweises auf Proteinebene mit den Ergebnissen auf mRNA-Ebene

Die Ergebnisse der drei Fötalstadien zeigten keine Übereinstimmung beider Untersuchungsmethoden. Der in der Immuncytologie deutlich höhere prozentuale Anteil an EGF-positiven Zellen im Colon ascendens war in dieser Weise bei der mRNA-Bestimmung nicht zu sehen. Die Bestimmungen der 9. Lebenswoche zeigten teilweise Übereinstimmungen beider Methoden, so war jeweils die Expression des EGF im Jejunum am geringsten ausgeprägt. Die mRNA-Bestimmung des EGF zeigte jedoch keine Unterschiede zwischen Duodenum und den beiden Colonabschnitten, während die immuncytochemische Bestimmung im Colon ascendens einen signifikant höheren prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen zeigte als im Duodenum und Jejunum.

Der Vergleich der adulten Tiere mit den Föten zeigte im Colon ascendens übereinstimmende Ergebnisse des Nachweises auf Proteinebene mit dem Nachweis auf mRNA-Ebene, so zeigten bei beiden Methoden die Föten geringere Werte. Im Jejunum zeigten die Nachweise auf mRNA-Ebene keinen Unterschied zwischen diesen Gruppen, während die immuncytochemische Untersuchung bei den adulten Tieren höhere Werte zeigte.

5.2.4 Veränderungen der EGF-Expression im Zotten- und Kryptensystem während der Ontogenese: Immunocytochemische Untersuchungen

5.2.4.1 Bildung von EGF in den Krypten und Zotten

Um das Maß der Expression des EGF-Proteins in den Hemikrypten mit dem der Hemizotten vergleichen zu können, wurden die jeweiligen prozentualen Anteile in diesen Bereichen getrennt ermittelt. In folgender Tabelle sind die Ergebnisse für die Tiere der 9. und 18. Lebenswoche dargestellt, sowie nochmals die Ergebnisse der adulten Tiere, um diese mit den anderen Gruppen vergleichen zu können.

Tab. 5.4: Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Epithelzellzahl der Hemikrypten bzw. -zotten des Duodenums und Jejunums der 9. und 18. Lebenswoche sowie der adulten Tiere (Mittelwerte \pm SEM)

	Duodenum		Jejunum	
	% Hemikrypte	% Hemizotte	% Hemikrypte	% Hemizotte
9. LW	28,28 \pm 2,02 ^a	27,72 \pm 0,92 ^a	23,00 \pm 1,16 ^c	14,56 \pm 1,10 ^d
18. LW	17,52 \pm 3,13 ^a	19,19 \pm 1,31 ^a	16,63 \pm 2,87 ^c	10,79 \pm 1,02 ^c
adult	23,11 \pm 1,91 ^a	21,77 \pm 0,28 ^a	20,06 \pm 0,26 ^c	12,87 \pm 0,73 ^d

Buchstaben ^{ab} (Duodenum) bzw. ^{cd} (Jejunum) zwischen den Spalten weisen auf signifikante Unterschiede hin.

Im Duodenum zeigte der Vergleich des prozentualen Anteils an EGF-positiven Zellen zwischen Hemikrypten und -zotten bei allen drei Tiergruppen keinen signifikanten Unterschied. Im Jejunum jedoch zeigten die 9. Lebenswoche und die adulten Tiere einen signifikant höheren prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen im Bereich der Krypten. Auch bei der 18. Lebenswoche war im Jejunum der Trend zu höheren prozentualen Anteilen an EGF in den Krypten zu sehen.

5.2.4.2 Bildung von EGF in den Kripten- und Zottenkompartimenten

Um Unterschiede in der prozentualen Verteilung des EGF innerhalb der Hemikrypten bzw. -zotten darzustellen, wurde die Anzahl an EGF-positiven Zellen in den Kompartimenten separat ermittelt und jeweils der prozentuale Anteil an EGF-positiven Zellen an der Epithelzellzahl der Kompartimente errechnet.

Tabelle 5.5 zeigt den prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen an der Epithelzellzahl der Kompartimente der Hemizotten im Duodenum und Jejunum.

Tab. 5.5: Anteil EGF-positiver Gobletzellen (%) an der Epithelzellzahl der Kompartimente der Hemizotten des Duodenums und Jejunums der 9. und 18. Lebenswoche sowie der adulten Tiere (Mittelwerte \pm SEM)

	Duodenum Hemizotte			Jejunum Hemizotte		
	% Basis	% Mitte	% Spitze	% Basis	% Mitte	% Spitze
9. LW	29,43 \pm 1,89 ^a	22,83 \pm 0,05 ^a	30,90 \pm 1,46 ^a	17,91 \pm 0,67 ^d	13,65 \pm 1,24 ^d	12,13 \pm 2,65 ^d
18. LW	21,76 \pm 1,90 ^a	15,52 \pm 1,01 ^b	20,29 \pm 1,45 ^{ab}	12,95 \pm 1,77 ^d	10,02 \pm 0,55 ^d	9,39 \pm 1,95 ^d
adult	20,43 \pm 1,27 ^a	19,89 \pm 0,65 ^a	25,00 \pm 0,14 ^b	11,91 \pm 0,31 ^d	12,17 \pm 1,14 ^d	14,54 \pm 0,97 ^d

Buchstaben^{abc} (Duodenum) bzw. ^{de} (Jejunum) zwischen den Spalten weisen auf signifikante Unterschiede hin.

Der Vergleich der prozentualen Verteilung des EGF in den Hemizottenkompartimenten zwischen den Altersgruppen im Duodenum bzw. Jejunum zeigte kein einheitliches Verteilungsmuster. So konnte man im Duodenum der 9. Lebenswoche und der adulten Tiere den höchsten prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen in der Zottenspitze finden, welcher im Falle der adulten Tiere signifikant war. Den geringsten prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen wies die Zottenmitte auf. Während in der 18. Lebenswoche die Zottenbasis den höchsten prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen aufwies und der niedrigste prozentuale EGF-Anteil im Bereich der Zottenmitte zu finden war. Im Jejunum der 9. Lebenswoche und der 18. Lebenswoche zeigte sich ein abnehmender prozentualer Anteil an EGF-positiven Zellen von der Zottenbasis zur Zottenspitze. Diese Werte unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die adulten Tiere zeigten auch keine signifikanten Unterschiede bei der Verteilung innerhalb der Zotte, dennoch findet man die umgekehrten Verhältnisse im Vergleich zur 9. und 18. Lebenswoche, hier befand sich der höchste prozentuale Anteil an EGF-positiven Zellen im Zottenspitzenbereich und im Zottenbasisbereich der niedrigste. Generell ist die Verteilung des prozentualen Anteils an EGF-positiven Zellen in den Zottenkompartimenten sehr inhomogen und nur vereinzelt waren signifikante Unterschiede festzustellen.

Die Tabellen 5.6 und 5.7 zeigen den prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen an der Epithelzellzahl der Kompartimente der Hemikrypten im Duodenum, Jejunum und Colon.

Tab. 5.6: Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Epithelzellzahl der Kompartimente der Hemikrypten des Duodenums und Jejunums bei Tieren der 9. und 18. Lebenswoche sowie adulter Tiere (Mittelwerte \pm SEM)

	Duodenum Hemikrypte			Jejunum Hemikrypte		
	% basal	% mittig	% luminal	% basal	% mittig	% luminal
9. LW	39,43 \pm 2,48 ^a	27,35 \pm 1,67 ^b	18,05 \pm 1,94 ^c	34,65 \pm 1,42 ^d	20,64 \pm 1,30 ^e	13,70 \pm 0,83 ^f
18. LW	30,66 \pm 4,68 ^a	13,40 \pm 2,67 ^b	8,50 \pm 2,18 ^b	30,22 \pm 3,43 ^d	13,62 \pm 3,17 ^e	6,04 \pm 2,03 ^e
adult	31,43 \pm 3,31 ^a	23,91 \pm 2,00 ^{ab}	13,98 \pm 0,72 ^b	32,01 \pm 1,36 ^d	18,02 \pm 0,37 ^e	10,15 \pm 0,75 ^f

Buchstaben ^{abc} (Duodenum) bzw. ^{def} (Jejunum) zwischen den Spalten weisen auf signifikante Unterschiede hin.

Tab. 5.7: Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Epithelzellzahl der Kompartimente der Hemikrypten des Colon ascendens und Colon descendens der 9. und 18. Lebenswoche sowie adulter Tiere (Mittelwerte \pm SEM)

	Colon ascendens			Colon descendens		
	% basal	% mittig	% luminal	% basal	% mittig	% luminal
9. LW	45,02 \pm 1,09 ^a	29,50 \pm 1,04 ^b	25,31 \pm 1,59 ^b	39,38 \pm 0,52 ^d	24,72 \pm 1,42 ^e	19,25 \pm 0,69 ^f
18. LW	41,67 \pm 0,92 ^a	23,99 \pm 2,17 ^b	10,89 \pm 2,15 ^e	44,97 \pm 1,50 ^d	25,50 \pm 0,57 ^e	13,07 \pm 1,03 ^f
adult	46,55 \pm 3,53 ^a	30,00 \pm 2,66 ^b	20,80 \pm 2,68 ^b	44,06 \pm 3,12 ^d	31,29 \pm 2,52 ^e	22,69 \pm 1,94 ^e

Buchstaben ^{abc} (Colon ascendens) bzw. ^{def} (Colon descendens) zwischen den Spalten weisen auf signifikante Unterschiede hin.

Im Bereich der Hemikrypten des Dün- und Dickdarmes zeigte die prozentuale Verteilung des Anteils an EGF-positiven Zellen bei allen Tiergruppen ein einheitliches Verteilungsmuster. So befand sich der höchste prozentuale Anteil an EGF-positiven Zellen im basalen Kryptenkompartiment und nahm in Richtung Darmlumen kontinuierlich ab. Nicht alle Unterschiede waren signifikant. Der Unterschied zwischen basalem und mittlerem Kryptenkompartiment wies mit Ausnahme des Duodenums der adulten Tiere immer signifikante Unterschiede auf. Generell war auch zu sehen, dass die prozentualen Anteile an EGF-positiven Zellen innerhalb einer Altersgruppe im Dickdarm immer höhere Werte aufwiesen als im Dünndarm.

In nachfolgender Tabelle sind die Ergebnisse des prozentualen Anteils an EGF-positiven Zellen an der Epithelzellzahl der Hemizottenkompartimente im Jejunum und Colon ascendens der Föten dargestellt. Auf Grund der besonderen Morphologie des fötalen Dickdarmes und der noch nicht vollständig entwickelten Krypten sind die drei Fötalstadien separat dargestellt.

Tab. 5.8: Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Epithelzellzahl der Kompartimente der Hemizotten des Jejunums und Colon ascendens der Föten (Mittelwerte \pm SEM)

	Jejunum			Colon ascendens		
	% Basis	% Mitte	% Spitze	% Basis	% Mitte	% Spitze
10. Wo	18,02 \pm 1,30 ^a	7,97 \pm 0,61 ^b	9,96 \pm 0,45 ^b	34,83 \pm 0,86 ^d	17,30 \pm 1,03 ^e	17,57 \pm 1,26 ^e
13. Wo	14,17 \pm 0,62 ^a	6,04 \pm 0,40 ^b	6,70 \pm 0,49 ^b	33,38 \pm 2,08 ^d	18,67 \pm 0,91 ^e	17,67 \pm 0,78 ^e
15. Wo	15,44 \pm 0,60 ^a	6,35 \pm 0,62 ^b	7,36 \pm 0,43 ^b	43,06 \pm 1,46 ^d	23,34 \pm 2,06 ^e	14,89 \pm 1,80 ^f

Buchstaben ^{abc}(Jejunum) bzw. ^{def}(Colon ascendens) zwischen den Spalten weisen auf signifikante Unterschiede hin.

Der Vergleich der Kompartimente der Föten zeigte sowohl im Jejunum als auch im Colon ascendens einen signifikant höheren prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen im Bereich der Zottenbasis im Vergleich zur Zottenspitze und -mitte. Die Zottenspitze unterschied sich zum mittleren Zottenkompartiment nicht signifikant. Eine Ausnahme bildete das Colon ascendens der 15. Graviditätswoche, bei welcher das mittlere Zottenkompartiment einen signifikant höheren prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen aufwies als die Zottenspitze. Generell konnte man also bei den Föten sehen, dass der prozentuale Anteil an EGF-positiven Zellen im Bereich der späteren Kryptenregion signifikant höher war.

5.3 Befunde zur Expression des EGFR

Grundsätzlich befindet sich der EGFR membranständig. Dies schließt jedoch einen Nachweis von neu gebildetem Rezeptor, der noch nicht in die Zellmembran integriert ist, nicht aus.

5.3.1 Zelluläre Lokalisation der EGFR-Bildung

Der EGFR wurde bei jeder Altersgruppe immunocytochemisch nachgewiesen. Da lediglich ein Überblick über die EGFR-Lokalisation gegeben werden sollte, wurde nur ein Tier pro Altersgruppe immunocytochemisch untersucht.



Balken = 12,5 μm

Abb. 5.11: Repräsentative Bilder der zellulären Lokalisation des EGFR
(immuncytochemische Färbung EGFR)

Pfeile markieren EGFR-positive Zellen

Die immuncytochemische Detektion des EGFR-Proteins zeigte bei allen Epithelzellen eine braune Färbung des Zytoplasmas. Diese Lokalisation des EGFR wurde bei jeder Altersgruppe nachgewiesen.

5.3.2 EGFR-Bildung im Intestinaltrakt adulter Schweine

Zunächst werden wieder die Ergebnisse der adulten Tiere dargestellt, die später erneut als Referenzgruppe zum Vergleich mit den anderen Altersgruppen dienen sollen.

5.3.2.1 Immuncytochemische Nachweise

5.3.2.1.1 Bildung von EGFR in unterschiedlichen Abschnitten des Intestinaltraktes

Die immuncytochemische Färbung zeigte die Expression des EGFR in allen vier untersuchten Darmabschnitten. Dabei zeigten alle Zellen des Epithelium mucosae im Krypten- und Zottenbereich eine positive Anfärbung.

5.3.2.1.2 Bildung von EGFR im Zotten- und Kryptensystem

Da der EGFR in allen Darmepithelzellen exprimiert wurde, konnte auf eine Unterteilung in Krypten und Zotten sowie auf eine weitere Unterteilung in Kompartimente verzichtet werden.

5.3.2.2 Nachweise auf mRNA-Ebene (PCR) in unterschiedlichen Abschnitten des Intestinaltraktes

Die Expression des EGFR wurde im Darmgewebe mit Hilfe der quantitativen real-time PCR untersucht. Nach der Normalisierung gegen das Haushaltsgen Ubiquitin wurden die Expressionsunterschiede mit Hilfe des ΔAct -Wertes dargestellt. Die Tabelle 5.9 zeigt die erhaltenen ΔAct -Werte der untersuchten Darmabschnitte der adulten Tiere.

Tab. 5.9: ΔAct -Werte der mRNA für EGFR der untersuchten Darmabschnitte adulter Tiere (Mittelwerte \pm SEM)

	Duodenum	Jejunum	C.ascendens	C.descendens
MW \pm SEM	5,31 \pm 0,48 ^a	5,96 \pm 0,26 ^a	3,5 \pm 0,31 ^b	3,35 \pm 0,13 ^b

Unterschiedliche Buchstaben ^{ab} zwischen den Spalten weisen auf signifikante Unterschiede hin.

Bei den adulten Tieren konnte man eine signifikant höhere Expression der EGFR-mRNA im Dickdarm im Vergleich zum Dünndarm sehen. Im Colon ascendens wurde um den Faktor 3,5 ($p \leq 0,001$) mehr EGFR-mRNA, im Colon descendens wurde etwa viermal ($p \leq 0,001$) soviel EGFR-mRNA exprimiert als im Duodenum. Im Jejunum konnte man die geringste Expression der EGFR-mRNA sehen, hier trat um den Faktor 5,5 weniger auf als im Colon ascendens ($p \leq 0,001$) und um den Faktor 6 weniger als im Colon descendens ($p \leq 0,001$). Das Duodenum wies eine um den Faktor 1,5 höhere Expression der EGFR-mRNA auf als das Jejunum, diese Differenz war aber nicht signifikant. Colon ascendens und Colon descendens zeigten keine signifikant unterschiedliche Expression des EGFR.

5.3.3 Veränderungen der EGFR-Expression im Verlauf der Ontogenese

Um zu prüfen, ob sich bei Tieren unterschiedlicher Altersgruppen die Expression des EGFR während der Entwicklung verändert, wurden sowohl prä- als auch postnatale Tiere herangezogen. Pränatal kamen Föten der 10., 13. und 15. Graviditätswoche zum Einsatz und postnatal wurden Tiere der 9. Lebenswoche, 18. Lebenswoche sowie adulte Tiere untersucht.

5.3.3.1 Veränderungen entlang des Intestinaltraktes

5.3.3.1.1 Immuncytochemische Nachweise

Bei allen Tieren waren in allen vier Darmabschnitten 100 % der Zellen des Epithelium mucosae EGFR-positiv gefärbt. Zellulär wurde das Protein im Zytoplasma der Epithelzellen nachgewiesen. Da alle Epithelzellen positiv gefärbt waren, konnte auf eine Unterteilung in Krypten und Zotten sowie auf eine weitere Unterteilung in Kompartimente verzichtet werden.

5.3.3.1.2 Nachweise auf mRNA-Ebene

Die bei der quantitativen PCR gewonnenen Ergebnisse der unterschiedlichen Altersgruppen nach Normalisierung gegen das Haushaltsgen Ubiquitin sind in Tabelle 5.10 als Δ ct-Werte dargestellt. Beim Vergleich der verschiedenen Altersgruppen mit den adulten Tieren muss im Duodenum und im Colon descendens auf einen Vergleich mit den Föten verzichtet werden. Die Untersuchungen der 18. Lebenswoche mussten entfallen, da für diese Altersgruppen kein Probenmaterial für die PCR vorlag.

Tab. 5.10: Δ ct-Werte der mRNA für EGFR der untersuchten Darmabschnitte der drei Fötalstadien, der 9. Lebenswoche und adulter Tiere (Mittelwerte \pm SEM)

	Duodenum	Jejunum	Colon ascendens	Colon descendens
10. GW		3,56 \pm 0,23 ^{a/*}	3,29 \pm 0,30 ^a	
13. GW		2,72 \pm 0,38 ^{a/*}	2,43 \pm 0,29 ^{a/*}	
15. GW		3,34 \pm 0,31 ^{a/*}	3,18 \pm 0,55 ^a	
9. LW	4,43 \pm 0,61 ^a	4,82 \pm 0,41 ^{ac}	3,21 \pm 0,28 ^{ad}	3,76 \pm 0,18 ^a
adult	5,31 \pm 0,48 ^a	5,96 \pm 0,26 ^a	3,50 \pm 0,31 ^b	3,35 \pm 0,13 ^b

Unterschiedliche Buchstaben ^{abc} zwischen den Spalten weisen auf signifikante Unterschiede hin.
Sternchen ^{***} zwischen den Zeilen weisen auf signifikante Unterschiede zu den adulten Tieren hin.

5.3.3.1.2.1 Vergleich der EGFR-Expression zwischen den Darmabschnitten innerhalb einer Altersgruppe

Wie in Tabelle 5.10 ersichtlich, traten bei den Föten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Expression der EGFR-mRNA zwischen Dünn- und Dickdarm auf. Jedoch war die Expression der mRNA für EGFR im Dickdarm immer geringfügig höher.

Bei den postnatalen Tieren wies das Jejunum der 9. Lebenswoche die geringste Expression der EGFR-mRNA auf, diese war um den Faktor 3 signifikant geringer als im Colon

ascendens. Im Vergleich zu den Darmabschnitten Duodenum und Colon descendens trat kein signifikanter Unterschied auf. Weitere signifikante Unterschiede zwischen den Darmabschnitten bestanden nicht. Zusammenfassend war die EGFR-Expression im Dickdarm höher als im Dünndarm.

Bei der Expression der mRNA für EGFR zeigte sich bei den postnatalen Tiergruppen insgesamt ein Trend zu höheren Gehalten des EGFR im Dickdarmbereich. Die niedrigsten Werte wurden im Jejunum gefunden.

5.3.3.1.2.2 Vergleich der EGFR-Expression der untersuchten Altersgruppen mit den adulten Tieren

Im Folgenden werden die Ergebnisse aus Tabelle 5.10 für die jeweiligen Darmabschnitte einzeln besprochen.

Duodenum:

Die 9. Lebenswoche unterschied sich nicht signifikant von den adulten Tieren.

Jejunum:

Die 9. Lebenswoche zeigte auch hier keinen signifikanten Unterschied zu den adulten Tieren. Die Föten wiesen jedoch alle eine signifikant höhere Expression der mRNA für EGFR auf als die adulten Tiere. Die 10. Graviditätswoche zeigte eine um den Faktor 5, die 13. Graviditätswoche eine um den Faktor 9,5 und die 15. Graviditätswoche eine um den Faktor 6 höhere EGFR-Expression als die adulten Tiere.

Colon ascendens:

In diesem Darmabschnitt wiesen auch die Föten keinen signifikanten Unterschied zu den adulten Tieren auf. Eine Ausnahme bildete die 13. Graviditätswoche, welche eine doppelt so hohe EGFR-Expression aufwies als die adulten Tiere. Die 9. Lebenswoche zeigte keinen signifikanten Unterschied zu den adulten Tieren.

Colon descendens:

Auch im Colon descendens unterschied sich die 9. Lebenswoche nicht signifikant von den adulten Tieren.

5.3.4 Ergebnisse des Proteinnachweises mittels Western blot

Der EGFR wurde zur Absicherung bei der 9. Lebenswoche und bei den adulten Tieren auch mittels Western blot nachgewiesen. Dieser Nachweis ist in Abbildung 5.12 dargestellt.

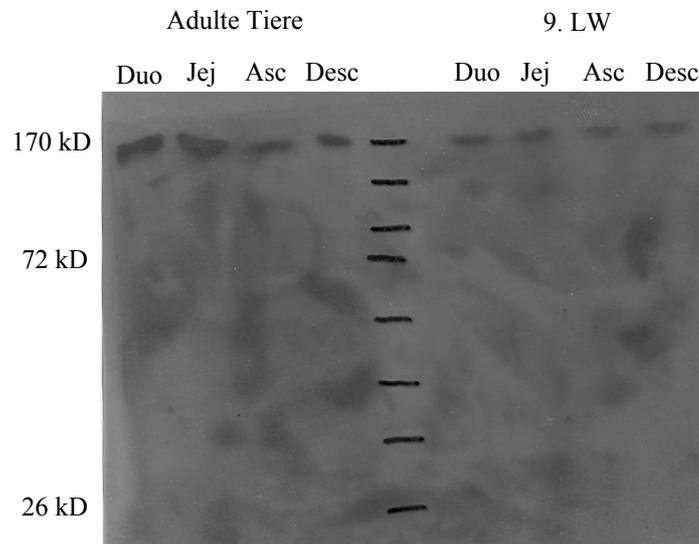


Abb. 5.12: Darstellung des EGFR-Western blot der 9. Lebenswoche und der adulten Tiere

Der Nachweis des EGFR-Proteins im Gesamthomogenat des Darmes zeigte in jedem Darmabschnitt der zwei Tiergruppen spezifische Banden im Molekulargewichtsbereich des EGFR (170 kD).

5.4 Einfluß des Kolostrums auf das EGF-System von Neonaten

Um festzustellen, ob das Kolostrum Auswirkungen auf die Darmmorphologie zeigt oder ob das im Kolostrum in hoher Konzentration enthaltene EGF das EGF- und EGFR-System beeinflusst, wurden zwei Neonatengruppen vergleichend untersucht. Die eine Gruppe konnte Kolostrum aufnehmen (NeoKol) und die andere Gruppe (NeoGlc) erhielt lediglich eine Glucoselösung.

5.4.1 Morphologischer Vergleich der Zottenlänge und Kryptentiefe

Um eine mögliche Beeinflussung der Zotten- und Kryptenmorphologie durch die Kolostrumaufnahme festzustellen, wurde die Anzahl der Epithelzellen in den Hemikrypten und -zotten der untersuchten Darmabschnitte zwischen beiden Gruppen verglichen.

5.4.1.1 Duodenum

In Abbildung 5.13 ist die Hemikryptentiefe und Hemizottenlänge im Duodenum bei den Neonaten mit und ohne Kolostrum anhand der Epithelzellzahlen vergleichend dargestellt. Anhand der Klammern sind die signifikanten Unterschiede zwischen den Tiergruppen dargestellt.

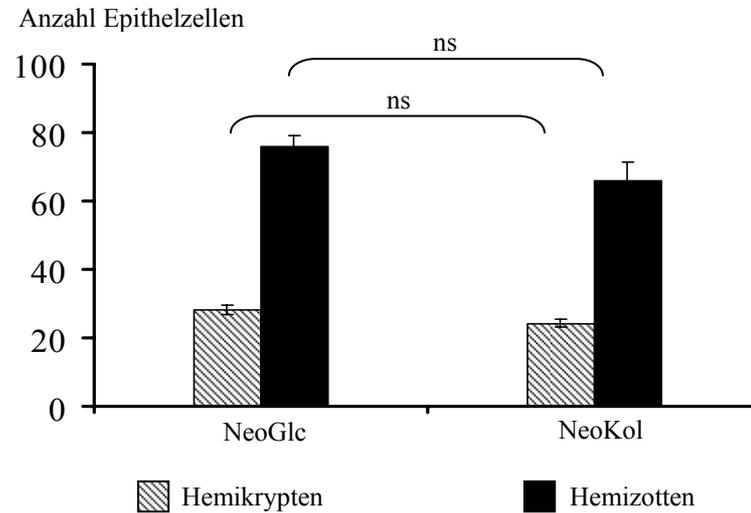


Abb. 5.13: Vergleich der Anzahl an Epithelzellen der Hemikrypten und -zotten des Duodenums zwischen Neonaten mit und ohne Kolostrum (Mittelwerte \pm SEM)

Im Duodenum zeigten sich weder im Zottenbereich noch im Bereich der Krypten signifikante Unterschiede der Epithelzellzahlen zwischen den beiden Tiergruppen.

5.4.1.2 Jejunum

In Abbildung 5.14 ist die Hemikryptentiefe und Hemizottenlänge im Jejunum bei den Neonaten mit und ohne Kolostrum anhand der Epithelzellzahlen vergleichend dargestellt. Anhand der Klammern sind die signifikanten Unterschiede zwischen den Tiergruppen dargestellt.

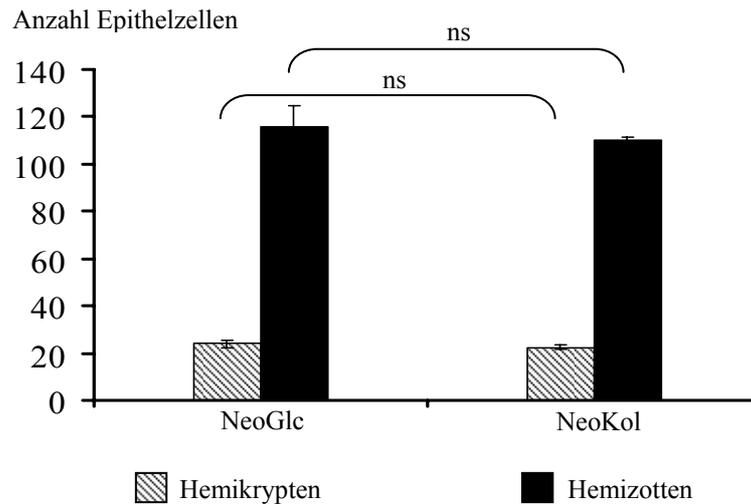


Abb. 5.14: Vergleich der Anzahl an Epithelzellen der Hemikrypten und -zotten des Jejunums zwischen Neonaten mit und ohne Kolostrum (Mittelwerte \pm SEM)

Auch im Jejunum zeigte die Morphologie der Zotten und Krypten keine signifikanten Unterschiede zwischen mit Kolostrum versorgten und nicht mit Kolostrum versorgten Tieren.

5.4.1.3 Colon

In Abbildung 5.15 ist der Vergleich der Hemikryptentiefe in Anzahl an Epithelzellen im Colon ascendens und Colon descendens der zu vergleichenden Neonatengruppen dargestellt. Anhand der Klammern sind die signifikanten Unterschiede zwischen den Tiergruppen dargestellt.

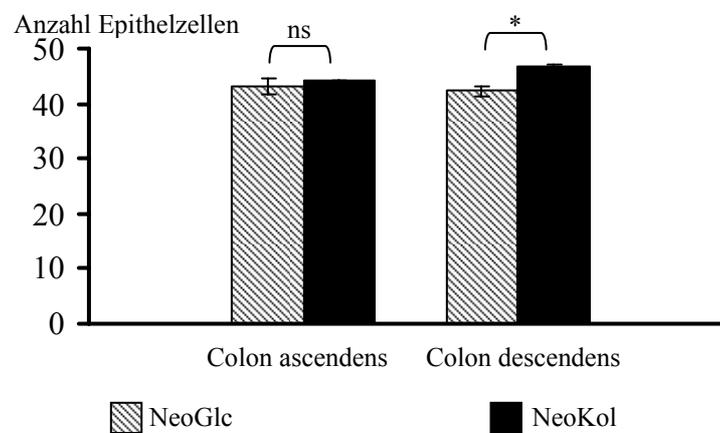


Abb. 5.15: Vergleich der Anzahl an Epithelzellen der Hemikrypten des Colon ascendens und Colon descendens zwischen Neonaten mit und ohne Kolostrum (Mittelwerte \pm SEM)

Im Colon ascendens konnte keine unterschiedliche Kryptentiefe zwischen den beiden Tiergruppen festgestellt werden. Im Colon descendens jedoch zeigte sich bei den Neonaten mit Kolostrum eine um den Faktor 1,1 signifikant tiefere Krypte ($p \leq 0,05$).

5.4.2 Weitere morphologische Besonderheiten der Neonaten

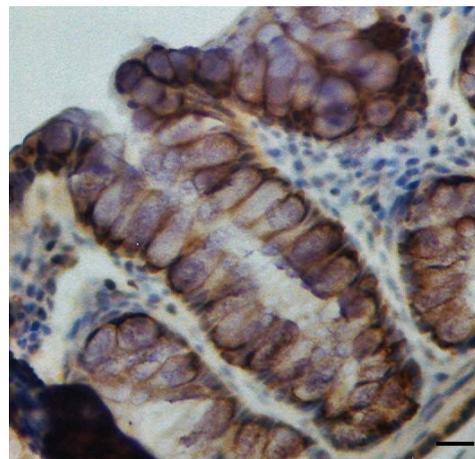
Die Kryptenbildung im Colon war weitgehend abgeschlossen, es waren keine Zotten mehr vorhanden. Bei einigen Einzeltieren war ab und zu noch zu erkennen, dass ehemals eine Zotte vorhanden war. So war festzustellen, dass es sich beim luminalen Kompartiment um eine ehemalige Zottenspitze handelte. Die Abbildung 5.16 A zeigt am Beispiel eines NeoKol im Colon ascendens wie sich eine noch nicht vollständig zurückgebildete Zotte darstellt. Es ist zu erkennen, dass sich über das Niveau der Krypten noch Zottenreste erheben. Im Vergleich dazu sieht man in Abbildung 5.16 B eine Aufnahme des Colon descendens eines NeoGlc, bei dem sich die Zotte schon vollständig zurückgebildet hat.

A: NeoKol, Colon ascendens



Balken = 25 μ m

B: NeoGlc, Colon descendens



Balken = 25 μ m

Abb. 5.16: Darstellung der Zottenrückbildung im Colon

(immuncytochemische Färbung A: EGF; B: EGFR)

5.4.3 Expression des EGF

Bezüglich der Expression des EGF sollte untersucht werden, ob das im Kolostrum in hoher Konzentration enthaltene EGF Auswirkungen auf die Produktion des endogenen EGF hat und ob es folglich zu veränderter Expression in den Darmabschnitten oder im Krypten- und Zottensystem kommt.

5.4.3.1 Bildung von EGF in unterschiedlichen Abschnitten des Intestinaltraktes: Immuncytochemische Nachweise

In Tabelle 5.11 sind die Ergebnisse des prozentualen Anteils an EGF-positiven Zellen an der Gesamtepithelzellzahl der Hemikrypten plus -zotten der Neonaten mit und ohne Kolostrum dargestellt. Des Weiteren sind die signifikanten Unterschiede zwischen den Darmabschnitten innerhalb einer Gruppe und zwischen den beiden Gruppen zu sehen.

Tab. 5.11: Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Gesamtepithelzellzahl der Hemikrypten plus -zotten der untersuchten Darmabschnitte der Neonaten mit und ohne Kolostrum (Mittelwerte \pm SEM)

	Duodenum	Jejunum	Colon ascendens	Colon descendens
NeoGlc	19,36 \pm 0,97 ^{a/x}	16,12 \pm 0,75 ^{b/x}	36,52 \pm 0,79 ^{c/x}	38,04 \pm 0,75 ^{c/x}
NeoKol	19,55 \pm 0,43 ^{a/x}	16,18 \pm 0,78 ^{b/x}	31,12 \pm 0,97 ^{c/y}	33,04 \pm 0,44 ^{c/y}

Unterschiedliche Buchstaben^{abc} zwischen den Spalten weisen auf signifikante Unterschiede hin.
Unterschiedliche Buchstaben^{xy} zwischen den Zeilen weisen auf signifikante Unterschiede hin.

Insgesamt fiel auf, dass die Streuung der Mittelwerte relativ gering war und auch zwischen den Behandlungsgruppen mit Ausnahme des Colons einheitliche Werte ermittelt wurden.

5.4.3.1.1 Vergleich des prozentualen Anteils an EGF-positiven Zellen zwischen den untersuchten Darmabschnitten

Neonaten ohne Kolostrum:

Wie in Tabelle 5.11 zu sehen, besaß das Colon ascendens und Colon descendens den höchsten Anteil an EGF-positiven Zellen. Diese Darmabschnitte unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Im Dickdarm war der prozentuale Anteil an EGF-positiven Zellen beinahe doppelt so hoch wie im Duodenum ($p \leq 0,001$). Im Jejunum war der Anteil an EGF-positiven Zellen um den Faktor 2,3 signifikant geringer als im Colon ($p \leq 0,001$). Im Duodenum war der EGF-Anteil um den Faktor 1,2 höher als im Jejunum ($p \leq 0,05$).

Neonaten mit Kolostrum:

Auch bei dieser Gruppe wies das Colon den höchsten prozentuale Anteil an EGF-positiven Zellen auf, wobei hier im Colon nur etwa das 1,7fache an EGF zu finden war im Vergleich zum Duodenum ($p \leq 0,001$). Im Jejunum war der Anteil an EGF-positiven Zellen um den Faktor 2 signifikant geringer als im Colon ($p \leq 0,001$). Im Duodenum war der EGF-Anteil um den Faktor 1,2 höher als im Jejunum ($p \leq 0,05$).

Man konnte bei beiden Gruppen übereinstimmend den höchsten prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen im Colon sehen. Der Dünndarm wies bei beiden Gruppen einen signifikant niedrigeren prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen auf, wobei wiederum innerhalb des Dünndarmes das Duodenum einen signifikant höheren prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen aufwies als das Jejunum.

5.4.3.1.2 Vergleich des prozentualen Anteils an EGF-positiven Zellen zwischen den Neonten mit und ohne Kolostrum

Wie in Tabelle 5.11 ersichtlich, zeigten die beiden Gruppen im Bereich des Dünndarmes keine Unterschiede hinsichtlich des prozentualen Anteils an EGF-positiven Zellen an der Gesamtepithelzellzahl. Sowohl im Colon ascendens als auch im Colon descendens wiesen die Neonaten ohne Kolostrum einen um den Faktor 1,2 höheren prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen auf als die Neonaten mit Kolostrum ($p \leq 0,05$).

5.4.3.2 Bildung von EGF in unterschiedlichen Abschnitten des Intestinaltraktes: Nachweise auf mRNA-Ebene

Der mRNA-Gehalt des EGF wurde mittels quantitativer real-time PCR aus dem Gesamthomogenat des Darmes bestimmt. Die Berechnung des Δ ct-Wertes erfolgte durch Normalisierung gegen das Haushaltsgen Ubiquitin. Die Ergebnisse dieser Messung bei den Neonaten mit und ohne Kolostrum sind in Tabelle 5.12 dargestellt.

Tab. 5.12: Δ ct-Werte der mRNA für EGF der untersuchten Darmabschnitte der Neonaten mit und ohne Kolostrum (Mittelwerte \pm SEM)

	Duodenum	Jejunum	Colon ascendens	Colon descendens
NeoGlc	6,21 \pm 0,38 ^{a/x}	11,45 \pm 0,21 ^{b/x}	9,05 \pm 0,18 ^{c/x}	10,28 \pm 0,41 ^{d/x}
NeoKol	8,06 \pm 0,51 ^{a/x}	12,41 \pm 0,30 ^{b/y}	9,05 \pm 0,30 ^{a/x}	10,57 \pm 0,25 ^{c/x}

Unterschiedliche Buchstaben^{abc} zwischen den Spalten weisen auf signifikante Unterschiede hin.
Unterschiedliche Buchstaben^{xy} zwischen den Zeilen weisen auf signifikante Unterschiede hin.

5.4.3.2.1 Vergleich der Expression der mRNA für EGF zwischen den Darmabschnitten innerhalb einer Gruppe

Neonaten ohne Kolostrum:

Wie in Tabelle 5.12 zu sehen, unterschieden sich alle vier Darmabschnitte signifikant hinsichtlich ihrer EGF-mRNA-Expression. Den höchsten Wert wies das Duodenum auf, dieser war um den Faktor 38 höher als im Jejunum ($p \leq 0,001$), um den Faktor 7,2 höher als im Colon ascendens ($p \leq 0,001$) und um Faktor 17 höher als im Colon descendens ($p \leq 0,001$). Die geringste Expression der mRNA für EGF wies das Jejunum auf, hier unterschied sich der Wert zum Colon ascendens bzw. descendens um den Faktor 5,3 bzw. 2,3. Die Expression der mRNA für EGF war im Colon ascendens etwa doppelt so hoch wie im Colon descendens.

Neonaten mit Kolostrum:

Alle Darmabschnitte mit Ausnahme des Duodenums zum Colon ascendens unterschieden sich signifikant. Die niedrigste EGF-mRNA-Expression konnte man im Jejunum finden, diese war um den Faktor 20 geringer als die des Duodenums ($p \leq 0,001$). Colon ascendens und Colon descendens besaßen um den Faktor 10 ($p \leq 0,001$) bzw. 3,6 ($p \leq 0,05$) höhere Werte als das Jejunum. Die höchste mRNA-Expression für EGF wies das Duodenum auf, welches sich neben dem Jejunum auch zum Colon descendens signifikant unterschied. Wobei im Colon descendens eine um den Faktor 5,7 geringere Expression zu finden war. Das Colon ascendens wies um die Hälfte weniger EGF auf als das Duodenum, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Zusammenfassend zeigten beide Tiergruppen die höchste Expression an mRNA für EGF im Duodenum. Die niedrigste EGF-mRNA-Expression konnte man im Jejunum finden.

5.4.3.2.2 Vergleich der Expression der mRNA für EGF zwischen den Neonaten mit und ohne Kolostrum

Im Folgenden werden die Ergebnisse aus Tabelle 5.12 für die jeweiligen Darmabschnitte einzeln besprochen.

Duodenum:

Die Tiere mit Kolostrum wiesen eine um den Faktor 3,6 niedrigere Expression der mRNA für EGF auf, dieser Unterschied zeigte aber keine Signifikanz.

Jejunum:

Auch hier besaßen die Tiere mit Kolostrum eine um den Faktor 1,9 signifikant niedrigere Expression der EGF-mRNA als die Tiere ohne Kolostrum ($p \leq 0,05$).

Colon:

Im Colon ascendens wiesen beide Gruppen die gleiche Expression der mRNA für EGF auf. Und auch im Colon descendens zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Generell war zu sehen, dass die Neonaten mit Kolostrum mit Ausnahme des Colon ascendens eine niedrigere Expression der mRNA für EGF aufwiesen, leider waren die Unterschiede nur im Jejunum signifikant.

5.4.3.3 Gegenüberstellung der Ergebnisse des EGF-Nachweises auf Proteinebene mit den Ergebnissen auf mRNA-Ebene

Sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene fand man die geringste EGF-Expression im Bereich des Jejunums. Das Duodenum zeigte bei den immunocytochemischen Bestimmungen im Vergleich zum Colon einen niedrigeren prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen, während der mRNA-Nachweis im Duodenum eine höhere Expression an EGF zeigte als im Colon.

5.4.3.4 Bildung von EGF im Krypten- und Zottensystem: Immunocytochemische Nachweise

5.4.3.4.1 Duodenum

Um die unterschiedliche Verteilung des prozentualen Anteils an EGF-positiven Zellen an der Epithelzellzahl der Hemikrypten bzw. -zotten in den Hemikrypten und -zotten darzustellen und zum Vergleich der beiden Neonatengruppen, wurden diese Daten in der Abbildung 5.17 mit den signifikanten Unterschieden sowohl zwischen als auch innerhalb der Tiergruppen dargestellt.

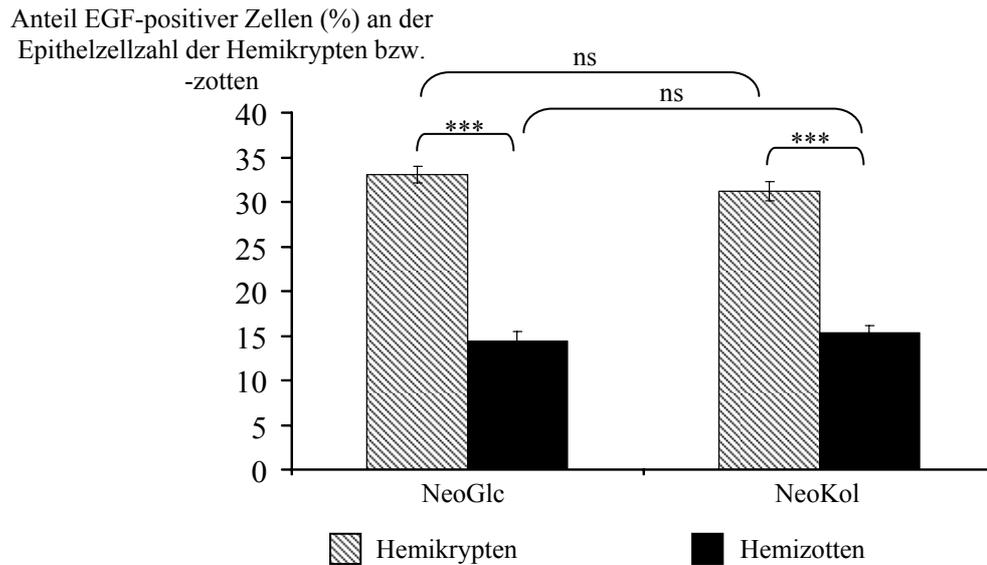


Abb. 5.17: Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Epithelzellzahl der Hemikrypten bzw. -zotten des Duodenums der Neonaten mit und ohne Kolostrum
(Mittelwerte \pm SEM)

Die Hemizotten und -krypten des Duodenums unterschieden sich zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant. Innerhalb einer Gruppe zeigte sich ein hoch signifikant höherer ($p \leq 0,001$) Anteil an EGF-positiven Zellen in den Hemikrypten im Vergleich zu den Hemizotten. In den Hemikrypten war ein etwa doppelt so hoher Anteil an EGF-positiven Zellen im Vergleich zu den Hemizotten nachzuweisen.

5.4.3.4.2 Jejunum

Die Abbildung 5.18 zeigt den prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen an der Epithelzellzahl der Hemikrypten bzw. -zotten in den Hemizotten und -krypten des Jejunums bei den Neonaten mit und ohne Kolostrum. Anhand der Klammern sind die signifikanten Unterschiede zwischen bzw. innerhalb einer Tiergruppe dargestellt.

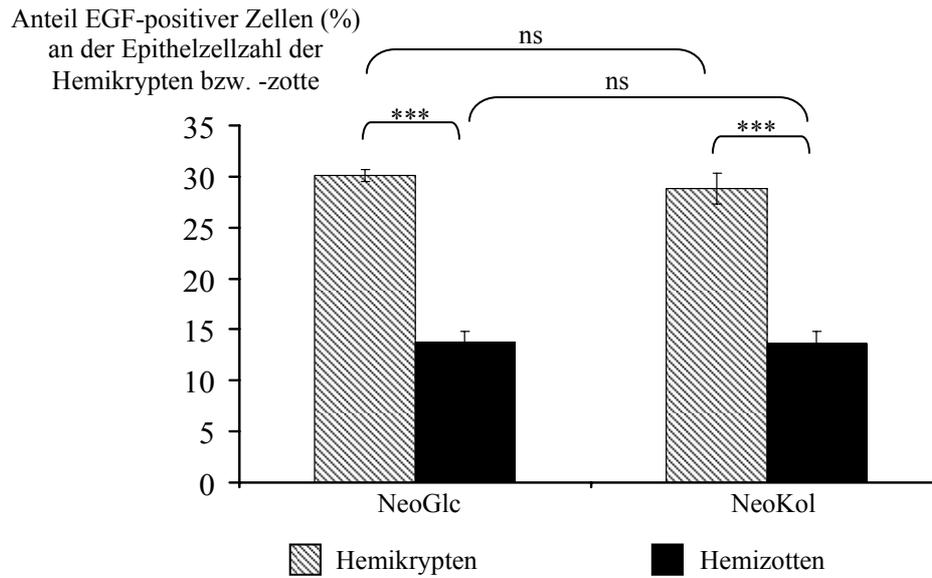


Abb. 5.18: Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Epithelzellzahl der Hemikrypten bzw. -zotten des Jejunums der Neonaten mit und ohne Kolostrum (Mittelwerte \pm SEM)

Der prozentuale Anteil an EGF-positiven Zellen in den Hemikrypten bzw. -zotten unterschied sich beim Vergleich zwischen den Neonaten mit und ohne Kolostrum nicht signifikant. Jedoch wiesen die Hemikrypten innerhalb einer Gruppe einen signifikant höheren prozentualen Anteil an EG-positiven Zellen auf als die Hemizotten ($p \leq 0,001$). In den Hemikrypten konnte ein etwa doppelt so hoher Wert im Vergleich zu den Hemizotten festgestellt werden.

5.4.3.4.3 Zusammenfassung der Befunde im Duodenum und Jejunum

Zusammenfassend zeigte der Vergleich von Duodenum bzw. Jejunum zwischen den Neonaten mit und ohne Kolostrum, dass sich bei beiden Darmabschnitten die Neonaten ohne Kolostrum und die Neonaten mit Kolostrum hinsichtlich des prozentualen Anteils an EGF-positiven Zellen in den Hemikrypten bzw. -zotten nicht unterscheiden. Der Vergleich des prozentualen Anteils an EGF-positiven Zellen zwischen Hemikrypten und -zotten zeigte bei beiden Tiergruppen sowohl im Duodenum als auch im Jejunum, dass der prozentuale Anteil an EGF-positiven Zellen im Hemikryptenbereich etwa doppelt so hoch war wie im Bereich der Hemizotten.

5.4.3.5 Bildung von EGF in den Krypten- und Zottenkompartimenten: Immuncytochemische Nachweise

Um Unterschiede in der prozentualen Verteilung des Anteils an EGF-positiven Zellen in den Hemikrypten- und Hemizottenkompartimenten darzustellen, wurde die Anzahl positiver Zellen in den Kompartimenten separat ermittelt und jeweils der prozentuale Anteil an EGF-positiven Zellen an der Epithelzellzahl der Kompartimente errechnet. Neben dem Vergleich des prozentualen Anteils an EGF-positiven Zellen zwischen den Kompartimenten, sollten zwischen den beiden Neonatengruppen auch die jeweils entsprechenden Kompartimente verglichen werden, um eventuelle Einflüsse des Kolostrums auf die Verteilung des EGFs in den Kompartimenten zu erhalten.

Die Tabellen 5.13 – 5.15 zeigen den prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen an der Epithelzellzahl der Kompartimente in den Kompartimenten des Duodenums und Jejunums sowie in den Kompartimenten des Colons der Neonaten.

Tab. 5.13: Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Epithelzellzahl der Kompartimente der Hemizotten des Duodenums und Jejunums der Neonaten mit und ohne Kolostrum (Mittelwerte \pm SEM)

Kompartiment	Duodenum Hemizotte			Jejunum Hemizotte		
	% Basis	% Mitte	% Spitze	% Basis	% Mitte	% Spitze
NeoGlc	16,14 \pm 1,46 ^{a/x}	12,23 \pm 0,89 ^{a/x}	14,75 \pm 0,66 ^{a/x}	14,09 \pm 0,55 ^{d/x}	12,02 \pm 0,94 ^{d/x}	15,32 \pm 1,40 ^{d/x}
NeoKol	18,08 \pm 0,58 ^{a/x}	13,14 \pm 1,00 ^{ab/x}	15,57 \pm 0,85 ^{b/x}	19,99 \pm 1,96 ^{d/x}	10,20 \pm 1,00 ^{e/x}	12,54 \pm 1,86 ^{e/x}

Unterschiedliche Buchstaben^{abc} bzw. ^{de} zwischen den Spalten weisen auf signifikante Unterschiede hin.
Unterschiedliche Buchstaben^{xy} zwischen den Zeilen weisen auf signifikante Unterschiede hin.

Die Verteilung des prozentualen Anteils an EGF-positiven Zellen entsprach in den Zotten des Duodenums und Jejunums keinem einheitlichen Muster. Im Duodenum konnte man bei beiden Tiergruppen den höchsten prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen im Bereich der Zottenbasis und den niedrigsten Anteil im Bereich der Zottenmitte finden. Mit Ausnahme eines Wertes waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Im Jejunum zeigten beide Tiergruppen ein unterschiedliches Verteilungsmuster, so fand man bei den Neonaten ohne Kolostrum den höchsten prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen in der Zottenspitze und den niedrigsten Anteil in der Zottenmitte, wobei keine signifikanten Unterschiede bestanden. Im Gegensatz hierzu konnte man bei den Neonaten mit Kolostrum den höchsten prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen im Bereich der Zottenbasis finden, welcher sich auch signifikant zur Zottenspitze und -mitte unterschied.

Der Vergleich der sich jeweils entsprechenden Kompartimente zwischen den Tiergruppen zeigte bei keinem Kompartiment einen signifikanten Unterschied.

Tab. 5.14: Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Epithelzellzahl der Kompartimente der Hemikrypten des Duodenums und Jejunums der Neonaten mit und ohne Kolostrum (Mittelwerte \pm SEM)

Kompartiment	Duodenum Hemikrypte			Jejunum Hemikrypte		
	% basal	% mittig	% luminal	% basal	% mittig	% luminal
NeoGlc	39,02 \pm 1,36 ^{a/x}	31,71 \pm 0,52 ^{b/x}	28,60 \pm 1,29 ^{b/x}	36,92 \pm 0,94 ^{d/x}	27,58 \pm 1,79 ^{e/x}	25,82 \pm 1,62 ^{e/x}
NeoKol	36,16 \pm 1,47 ^{a/x}	31,53 \pm 0,82 ^{b/x}	25,94 \pm 0,84 ^{c/x}	32,65 \pm 1,66 ^{d/x}	28,88 \pm 1,08 ^{d/e/x}	24,91 \pm 2,66 ^{e/x}

Unterschiedliche Buchstaben^{abc} bzw. ^{de} zwischen den Spalten weisen auf signifikante Unterschiede hin. Unterschiedliche Buchstaben^{xy} zwischen den Zeilen weisen auf signifikante Unterschiede hin.

Tab. 5.15: Anteil EGF-positiver Zellen (%) an der Epithelzellzahl der Kompartimente der Hemikrypten des Colon ascendens und Colon descendens der Neonaten mit und ohne Kolostrum (Mittelwerte \pm SEM)

Kompartiment	Colon ascendens			Colon descendens		
	% basal	% mittig	% luminal	% basal	% mittig	% luminal
NeoGlc	41,39 \pm 1,71 ^{a/x}	32,95 \pm 0,34 ^{b/x}	35,32 \pm 0,80 ^{b/x}	47,41 \pm 1,07 ^{d/x}	35,05 \pm 0,19 ^{e/x}	31,88 \pm 1,24 ^{e/x}
NeoKol	38,40 \pm 0,90 ^{a/x}	29,77 \pm 0,66 ^{b/x}	25,24 \pm 1,83 ^{b/y}	34,58 \pm 2,45 ^{d/x}	27,03 \pm 1,94 ^{d/x}	23,46 \pm 1,66 ^{d/y}

Unterschiedliche Buchstaben^{abc} bzw. ^{de} zwischen den Spalten weisen auf signifikante Unterschiede hin. Unterschiedliche Buchstaben^{xy} zwischen den Zeilen weisen auf signifikante Unterschiede hin.

Im Bereich der Krypten der Neonaten konnte man ein einheitliches Verteilungsmuster des prozentualen EGF-Anteils finden. Mit einer Ausnahme nahm der prozentuale Anteil an EGF-positiven Zellen in Richtung Darmlumen kontinuierlich ab. Nicht alle Werte zeigten signifikante Unterschiede, dennoch war ein eindeutiger Trend zu verzeichnen. Der Vergleich der sich entsprechenden Kompartimente zwischen den Tiergruppen zeigte im Bereich der Dünndarmkrypten keine signifikanten Unterschiede. Lediglich beim Vergleich der luminalen Colonkompartimente zeigte sich, dass die Neonaten ohne Kolostrum einen signifikant höheren prozentualen Anteil an EGF-positiven Zellen aufwiesen als die Neonaten mit Kolostrum.

5.4.4 Expression des EGFR

Die Nachweise der Expression des EGFR sollten zeigen, ob die Expression des Rezeptors durch Kolostrum-EGF beeinflusst wird.

5.4.4.1 **Bildung von EGFR in unterschiedlichen Abschnitten des Intestinaltraktes: Immuncytochemische Nachweise**

Bei beiden Neonatengruppen waren in allen vier Darmabschnitten 100 % der Zellen des Epithelium mucosae positiv. Alle Epithelzellen zeigten eine positive Anfärbung des Zytoplasmas.

5.4.4.2 **Bildung von EGFR in unterschiedlichen Abschnitten des Intestinaltraktes: Nachweise auf mRNA-Ebene**

Die bei der quantitativen PCR gewonnenen Ergebnisse der beiden Neonatengruppen wurden gegen das Haushaltsgen Ubiquitin normalisiert und sind in Tabelle 5.16 dargestellt.

Tab. 5.16: Δ ct-Werte der mRNA für EGFR der untersuchten Darmabschnitte der Neonaten mit und ohne Kolostrum (Mittelwerte \pm SEM)

	Duodenum	Jejunum	Colon ascendens	Colon descendens
NeoGlc	3,77 \pm 0,22 ^{a/x}	4,33 \pm 0,07 ^{ab/x}	3,44 \pm 0,11 ^{ac/x}	3,39 \pm 0,67 ^{a/x}
NeoKol	4,37 \pm 0,27 ^{a/x}	5,36 \pm 0,32 ^{b/x}	3,33 \pm 0,17 ^{c/x}	4,08 \pm 0,16 ^{ac/x}

Unterschiedliche Buchstaben^{abc} zwischen den Spalten und^{xy} zwischen den Zeilen weisen auf signifikante Unterschiede hin.

5.4.4.2.1 **Vergleich der Expression der mRNA für EGFR zwischen den untersuchten Darmabschnitten**

Neonaten ohne Kolostrum:

Entsprechend Tabelle 5.16 wies das Jejunum die geringste Expression der mRNA für EGFR auf und unterschied sich signifikant vom Colon ascendens. Zwischen den anderen Darmabschnitten traten keine signifikanten Unterschiede auf.

Neonaten mit Kolostrum:

Auch hier zeigte das Jejunum die geringste Expression an EGFR-mRNA, welche zu den anderen Darmabschnitten signifikant unterschiedlich war. Die höchste Expression der EGFR-mRNA konnte man im Colon ascendens finden, welche signifikant höher war als die der Dünndarmabschnitte.

Die geringste EGFR-Expression konnte man bei beiden Tiergruppen im Jejunum finden. Die Expression der mRNA für EGF war im Bereich des Colon ascendens und Colon descendens am höchsten. Die Unterschiede zwischen Dickdarm und Duodenum waren zu vernachlässigen, aber in beiden Fällen war die EGFR-Expression im Duodenum geringer.

5.4.4.2 Unterschiede der mRNA-Expression für EGFR zwischen den Neonaten mit und ohne Kolostrum

Wie in Tabelle 5.16 zu sehen, wiesen bei beiden Dünndarmabschnitten die Neonaten ohne Kolostrum eine höhere Expression an EGFR-mRNA auf (im Duodenum um den Faktor 1,5 und im Jejunum um den Faktor 2), diese unterschieden sich aber nicht signifikant. Im Colon ascendens unterschied sich die Expression des EGFR zwischen den Gruppen nicht. Im Colon descendens dagegen zeigten wieder die Neonaten ohne Kolostrum eine um den Faktor 1,6 höhere, aber nicht signifikant unterschiedliche Expression.

5.4.4.3 Bildung von EGFR in unterschiedlichen Abschnitten des Intestinaltraktes: Nachweise auf Proteinebene mittels Western blot

Der Nachweis des EGFR erfolgte zur Absicherung auch bei den beiden Neonatengruppen mittels Western blot. Die Abbildung 5.19 zeigt diesen Western blot.

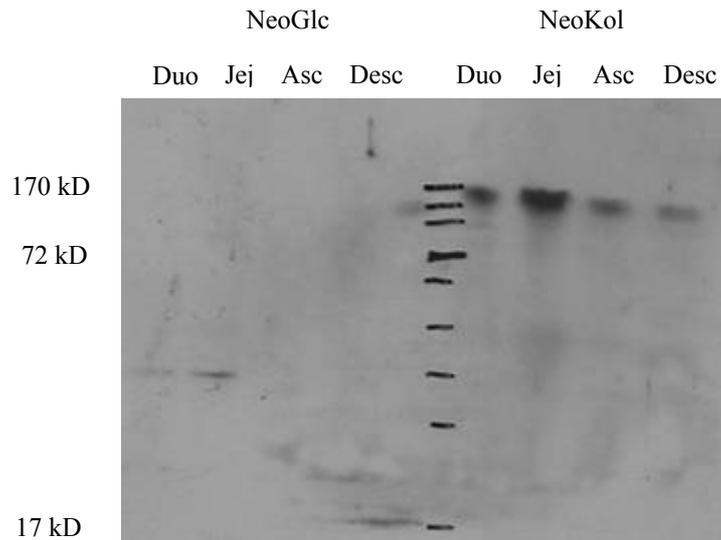


Abb. 5.19: Darstellung des EGFR-Western blot der Neonaten

Der Proteinnachweis im Gesamthomogenat des Darmes mittels Western blot zeigte bei den Neonaten ohne Kolostrum keine spezifischen Banden in den verschiedenen Darmabschnitten. Bei den Neonaten mit Kolostrum traten in allen Darmabschnitten spezifische Banden im Molekulargewichtsbereich des EGFR (170 kD) auf.

5.5 Fotografische Darstellung der nachgewiesenen Parameter

5.5.1 EGF

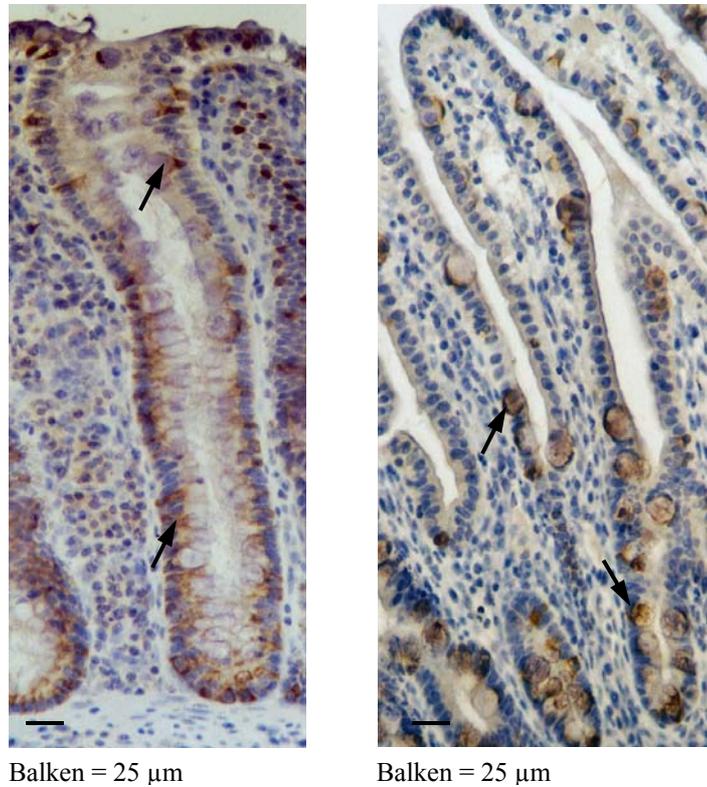


Abb. 5.20: Repräsentative Bilder der immunocytochemischen Färbung des EGF

Links: Bild einer Krypte des Colon ascendens der 9. Lebenswoche

Rechts: Bild einer Krypte mit dazugehöriger Zotte des Duodenum eines Neonaten mit Kolostrum

Pfeile markieren EGF-positive Zellen

5.5.2 EGFR

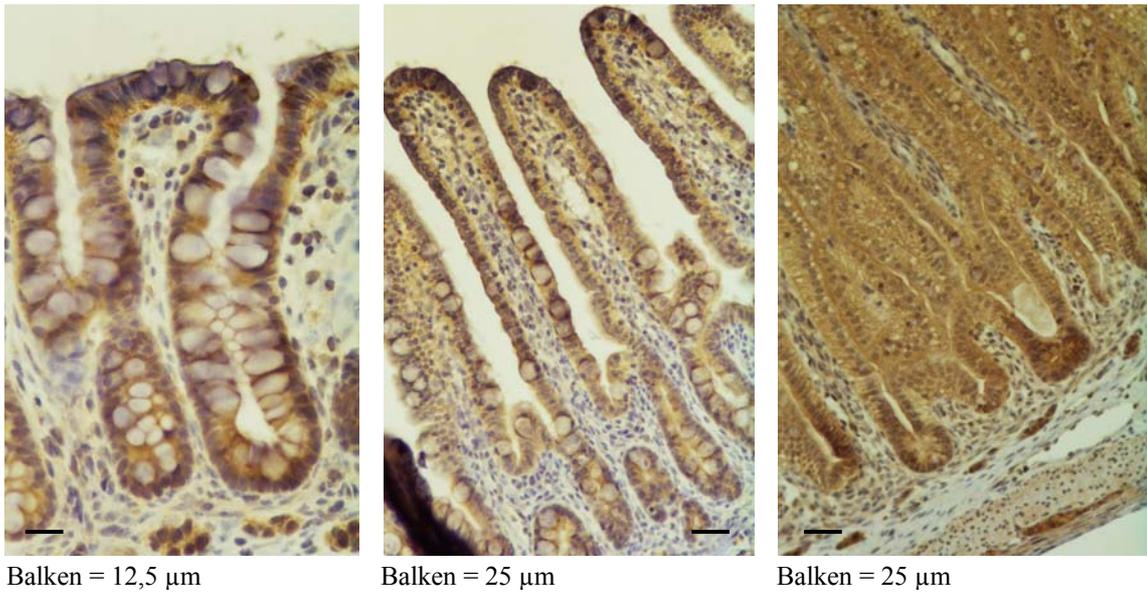


Abb. 5.21: Repräsentative Bilder der immuncytochemischen Färbung des EGFR

Links: Bild einer Krypte des Colon ascendens eines Neonaten mit Kolostrum

Mitte: Bild von Krypten und Zotten des Duodenum eines Neonaten mit Kolostrum

Rechts: Ausschnitt aus dem Jejunum eines Föten der 13. Woche

6. Diskussion

Umfassende Studien zur Expression des EGF im Darm des Schweines unter Anwendung eines schweinespezifischen Anti-EGF fehlen gänzlich in der Literatur. So sollte diese Arbeit einen Überblick über die Expression des EGF in verschiedenen Darmabschnitten sowohl prä- als auch postnataler Tiere geben. Auch die Expression des Rezeptors des EGF wurde untersucht. Zur Untersuchung kamen drei Fötalstadien und vier postnatale Entwicklungsstadien. Im Versuchsteil „Ontogenese“ wurde die Entwicklung des EGF- und EGFR-Systems bei fötalen und postnatalen Tiergruppen untersucht. Da EGF dem Neonaten auch über das Kolostrum zur Verfügung gestellt wird, könnte eine Beeinflussung des endogenen EGF- und EGFR-Systems dadurch ermöglicht werden. Um solch eine mögliche Beeinflussung zu erfassen, wurde der „Kolostrumversuch“ durchgeführt.

6.1 Morphologische Befunde im Colon ascendens der Föten

Das Auftreten von Zotten im Colon ascendens wurde bei allen drei Fötalstadien nachgewiesen. Auch in der Literatur wird vom Auftreten von Zotten im Colon bei verschiedenen Spezies berichtet (Schnorr, 1996). Untersuchungen von Lev & Orlic (1974) zeigten bei menschlichen Föten, dass sich die Zotten im Laufe der Entwicklung bis zur Geburt allmählich zurückbilden. Bei den neonatalen Ferkeln konnte allenfalls gelegentlich noch eine ehemalige Zottenspitze vermutet werden. Bei den Föten war zu sehen, dass die Anzahl der Epithelzellen im Zotten- und Kryptenbereich mit steigendem Trächtigkeitsstadium abnimmt. Die Kryptenentwicklung scheint im Colon des Menschen (Patzelt, 1931; Neubart, 1983) erst nach der Zottenbildung stattzufinden. Auch bei den untersuchten Schweineföten war eine Differenzierung in Krypte und Zotte bei der 10. Graviditätswoche noch nicht möglich. Erst ab der 13. Graviditätswoche war eine deutliche Kryptenbildung zu verzeichnen, wobei auch in diesem Stadium nicht immer eine eindeutige Grenze zwischen Krypte und Zotte zu ziehen war.

6.2 Altersabhängige Expression des EGF und EGFR

6.2.1 EGF

In der Literatur finden sich keine Untersuchungen über die altersabhängige Expression des EGF im Darm von Schweinen. Es liegen lediglich Befunde vor, dass EGF-mRNA während der Embryonalentwicklung des Darmes exprimiert wird (Vaughan et al., 1992B). In den

vorliegenden Untersuchungen konnte die Expression des EGF bei allen drei Fötalstadien nachgewiesen werden. Somit scheint der EGF sowohl während der Embryonalentwicklung als auch während der Fötalentwicklung exprimiert zu werden und auch generell für die pränatale Entwicklung von Bedeutung zu sein. Untersuchungen bei Ferkeln (Tag 1-28 post partum) zeigen die Expression des EGF-Proteins im Dünndarmbereich (Jaeger & Lamar, 1992). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen mit diesen Literaturbefunden insofern überein, als bei allen prä- und postnatalen Altersgruppen eine EGF-Expression sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene festzustellen war. Die Nachweise auf Proteinebene mittels immunocytochemischer Untersuchungen bestätigen die Untersuchungen von Claus et al. (2001), dass der EGF im Bereich der Dünndarmzotten bei allen Altersgruppen ausschließlich in den Gobletzellen exprimiert wird. Die vorliegenden Untersuchungen zeigten eine weitere Expression in den Krypten des Dün- und Dickdarmes, wobei in diesem Bereich neben den Gobletzellen auch undifferenzierte Kryptenzellen EGF exprimieren. Bei den positiv gefärbten Kryptenzellen könnte es sich um die noch nicht differenzierten Oligomukuszellen und Kryptenbasisenterozyten handeln. Aus diesen beiden Zelltypen gehen die Gobletzellen hervor. Die Kryptenbasisenterozyten sind zudem noch Vorläuferzellen der anderen Epithelzelltypen (Cheng & Leblond, 1974B und C).

Sowohl im Jejunum als auch im Colon ascendens war die Expression des EGF auf Proteinebene bei den Föten geringer als bei den adulten Tieren. Der Nachweis auf mRNA-Ebene zeigte diese Verhältnisse lediglich im Bereich des Colon ascendens, während im Jejunum kein Unterschied in der Expression des EGF zu sehen war. Somit scheint im Allgemeinen die Expression bei adulten Tieren höher zu sein als bei Föten. Die Unterschiede zwischen Protein- und mRNA-Expression lassen sich dadurch erklären, dass der mRNA Gehalt von Zellen nichts über die Transkriptionsaktivität oder die Stabilität von mRNA aussagt (Bustin, 2002). Somit spiegelt der RNA-Gehalt von Zellen möglicherweise nicht den Proteingehalt der Zellen wieder (Gygi et al., 1999).

Der Vergleich der anderen Tiergruppen mit den adulten Tieren zeigte nur vereinzelt signifikante Unterschiede zwischen den Altersgruppen. Ob diese Signifikanz auch aufrechterhalten werden kann, wenn größere Tierzahlen analysiert werden, muss noch überprüft werden. Insgesamt sprechen die vorliegenden Befunde dafür, dass die Expression des EGF in der 9., 18. Lebenswoche und bei den adulten Tieren keine altersabhängigen Unterschiede der Regulation zeigt. Dies lässt eine „konstitutive“ Expression vermuten. Nur die Föten scheinen eine geringere Expression an EGF aufzuweisen. Dies könnte daran

liegen, dass bei den Föten die Kryptenbildung noch nicht vollständig vollzogen war und somit die reichliche Expression des EGF im Bereich der Krypten noch fehlte.

6.2.2 EGFR

Auch die Expression der mRNA des EGFR ist schon in der frühen Embryonalentwicklung des Schweines (Tag 7-22 der Gravidität) nachgewiesen (Vaughan et al., 1992B). Im Rahmen dieser Arbeit konnte bei drei Fötalstadien ebenfalls ein Nachweis des EGFR auf Protein- und mRNA-Ebene im Darm geführt werden. Postnatal konnte der EGFR im Darm von neugeborenen und abgesetzten Ferkeln bereits nachgewiesen werden (Jaeger & Lamar, 1992; Kelly et al., 1992). In der vorliegenden Arbeit gelang die Detektion des EGFR sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene bei allen untersuchten postnatalen Altersgruppen.

Bezüglich der mRNA für EGFR zeigte sich bei den Föten im Jejunum generell eine höhere Expression im Vergleich zu den adulten Tieren; im Colon ascendens traf dies nur für die 13. Graviditätswoche zu. Diese höhere Expression der EGFR-mRNA im Jejunum könnte für eine stärkere Bedeutung der EGFR-Liganden bei der Entwicklung des Jejunums zu diesen Zeitpunkten sprechen.

Zur 9. Lebenswoche ergaben sich keine Unterschiede bezüglich der EGFR-Expression im Vergleich zu den adulten Tieren. Somit scheint eine nachgeburtliche Altersabhängigkeit der Expression beim Schwein nicht gegeben zu sein. Da beim Proteinnachweis alle Epithelzellen eine positive Färbung des EGFR zeigten, kann für die Expression des Proteins keine quantitative Angabe bezüglich der EGFR-Expression gemacht werden. Mittels Western blot konnte bei den Tieren der 9. Lebenswoche und bei den adulten Tieren das Vorkommen des EGFR-Proteins im Darm bestätigt werden.

6.3 Zum Vorkommen des EGF und EGFR in den verschiedenen Darmabschnitten

6.3.1 EGF

Zur Expression des EGF in verschiedenen Darmabschnitten des Schweines existieren keine Literaturangaben. Lediglich der Nachweis einer EGF-Immunoreaktivität im Bereich des Dünndarmes wurde geführt (Jaeger & Lamar, 1992). Dies besagt jedoch nichts über die quantitative Verteilung von EGF in unterschiedlichen Darmabschnitten. Auch bei anderen

Spezies finden sich diesbezüglich keine Untersuchungen. Dies liegt nicht zuletzt auch daran, dass die Hauptproduktion von EGF im GIT der Nager und des Menschen in den Speicheldrüsen erfolgt (Gresik & Barka, 1978, Murphy, 1998). Außerdem wird der EGF bei diesen Spezies im Bereich des GIT noch in den Brunner-Drüsen (Mensch, Heitz et al., 1978) und Panethzellen (Ratte, Mensch, Poulsen et al., 1986) produziert, so dass eine EGF-Bildung bei diesen Spezies im Bereich des Dickdarmes nicht nötig zu sein scheint. Das Fehlen der Panethzellen beim Schwein (Madara & Trier, 1994) schließt diesen Produktionsort bei dieser Tierart jedoch aus. Auch die Expression des EGF in den Brunner Drüsen konnte in der vorliegenden Arbeit immunocytochemisch nicht nachgewiesen werden. Auffallend ist, dass bei allen Altersgruppen die Expression des EGF im Jejunum signifikant geringer als in den anderen Darmabschnitten war, eine Ausnahme bildeten lediglich die drei Fötalstadien, bei denen sich der mRNA-Nachweis des EGF im Jejunum nicht vom Colon ascendens unterschied. Grund für die auffallend niedrigere Expression von EGF im Bereich des Jejunums könnte im Falle des Proteins bei den postnatalen Altersgruppen sein, dass im Jejunum sehr lange Zotten auftreten und somit die Anzahl der exprimierenden Zellen im Vergleich zur Anzahl an Epithelzellen in der Zotte geringer ist und dadurch eine geringere Expression des EGF resultiert (siehe auch Kapitel 6.4). Beim Vergleich der Proteinexpression zwischen Duodenum und Colon war die Proteinexpression im Duodenum bis auf eine Ausnahme geringer. Dies könnte, wie im Jejunum, daran liegen, dass im Duodenum Zotten ausgebildet sind und hier somit relativ wenig EGF exprimiert wird. Auf mRNA-Ebene konnte man in der 9. Lebenswoche und bei den adulten Tieren keine Unterschiede beim Vergleich der EGF-Expression zwischen Colon und Duodenum finden. Während bei den Neonaten im Duodenum eine höhere mRNA-Expression als im Colon zu verzeichnen war. Die Gründe hierfür sind noch nicht bekannt. Erläuterungen bezüglich der Unterschiede zwischen Protein- und mRNA-Expression siehe Kapitel 6.2.1.

6.3.2 EGFR

Die Expression des EGFR konnte in dieser Arbeit auf Protein- und mRNA-Ebene bei allen Altersgruppen in allen untersuchten Darmabschnitten nachgewiesen werden. Auch in der Literatur wird vom Nachweis des EGFR im GIT beim adulten und fötalen Menschen (Playford et al., 1996; Hormi & Lehi, 1994; Menard & Pothier, 1991; Miettinen, 1993) und beim Schwein (Kelly et al., 1992; Jaeger & Lamar., 1992) berichtet. Auch die Expression

des EGFR in unterschiedlichen Darmabschnitten kann durch andere Untersucher, die den EGFR bei Menschen und Mäusen im Bereich des Dün- und Dickdarmes lokalisieren bestätigt werden (Pothier & Menard, 1988; Menard et al., 1987). In der vorliegenden Arbeit können lediglich die Nachweise auf mRNA-Ebene als quantitativ eingestuft werden. Die Untersuchungen auf Proteinebene lassen hingegen keine quantitative Aussage zu. Die Nachweise auf mRNA-Ebene zeigten bei den Föten keine signifikant unterschiedliche Expression des EGFR zwischen Jejunum und Colon ascendens. Bei den untersuchten postnatalen Altersgruppen war ein Trend zur höheren Expression des EGFR im Bereich des Dickdarmes zu sehen und innerhalb des Dünndarmes wies das Duodenum höhere Werte auf, wobei nicht immer alle Werte signifikant waren. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von anderen Untersuchungen überein, bei welchen der EGFR auch im Bereich des Colons höher vertreten war (Pothier & Menard, 1988; Menard et al., 1987).

6.4 Zum Vorkommen des EGF und EGFR innerhalb der Krypten und Zotten

In diesem Kapitel werden nur die Ergebnisse der immunocytochemischen Untersuchungen diskutiert, da bei den Untersuchungen auf mRNA-Ebene keine Trennung nach Krypten und Zotten erfolgte.

6.4.1 EGF

6.4.1.1 Unterschiede zwischen Krypten und Zotten im Duodenum und Jejunum

Bei den postnatalen Tiergruppen konnte man im Jejunum eine signifikant höhere EGF-Expression in den Krypten im Vergleich zu den Zotten sehen. Im Bereich des Duodenums fand man dieses Expressionsmuster nur bei den Neonaten, während Tiere der 9., 18. Lebenswoche sowie die adulten Tiere keine signifikant unterschiedliche EGF-Expression zwischen Krypten und Zotten zeigten. Der im Bereich der Krypten zu sehende höhere Anteil an EGF produzierenden Zellen zeigte, dass EGF gerade in jenen Kompartimenten, in denen die Mitose abläuft, vermehrt gebildet wird. Dies unterstützt die Vermutung, dass EGF an der Förderung der Zellproliferation wesentlich beteiligt ist. Die in der 9., 18. Lebenswoche und bei den adulten Tieren etwa gleich hohe EGF-Expression im Zottenbereich wie im Kryptenbereich des Duodenums könnte dadurch bedingt sein, dass in

diesem Bereich, in dem der Nahrungsbrei aus dem Magen in den Darm kommt sowie Gallensaft und Bauchspeichel in den Darm münden, eine höhere Anzahl an Gobletzellen im Zottenbereich zum Mukosaschutz benötigt werden und somit auch ein höherer prozentualer Anteil an EGF produzierenden Zellen auftritt.

6.4.1.2 Expressionsmuster in den Zotten- und Kryptenkompartimenten

Zur Verteilung des EGF in den Kompartimenten der Krypten und Zotten existieren in der Literatur keine vergleichbaren Untersuchungen.

Kryptenkompartimente:

Die Expression des EGF in den Krypten scheint einem einheitlichen Prinzip zu folgen. So konnte man eine abnehmende Expression des EGF in Richtung Darmlumen feststellen. Diese Verteilung fand man bis auf wenige Ausnahmen bei allen Altersgruppen der postnatalen Tiere. Nicht alle Werte zeigten immer signifikante Unterschiede, jedoch ist ein deutlicher Trend zu verzeichnen. Die Expression des EGF ist also im basalen Bereich der Krypte am höchsten und nimmt kontinuierlich in Richtung Darmlumen ab. Somit exprimiert ein großer Prozentsatz der Zellen im Kryptengrund den EGF und kann auf die Nachbarzellen auf parakrinem Wege wirken. Bei diesen Zellen handelt es sich um Stammzellen und um noch nicht ausdifferenzierte Zellen (Transitzellen) (Potten & Löffler, 1990). Diese Zellen unterliegen alle der Zellteilung und die Transitzellen beginnen sich zu differenzieren (Potten & Löffler, 1990). Diese Lokalisation der EGF-Expression stimmt mit in der Literatur erwähnten Funktionen des EGF überein. So stimuliert EGF die Proliferation von epidermalem Gewebe (z.B. GIT) (Yates et al., 1991; Goodlad et al., 1985, Goodlad et al., 1987A) und wirkt direkt auf den Zellzyklus (Simmons et al., 1995; Reddy, 1994). Auch die Beeinflussung der Zelldifferenzierung ist in der Literatur beschrieben (Carpenter & Wahl, 1990; Menard et al., 1988). In Richtung Darmlumen nahm der prozentuale Anteil an EGF-exprimierenden Zellen ab und die Expression erfolgte unter den differenzierten Zellen nur noch durch Gobletzellen.

Zottenkompartiment:

Die Verteilung der positiv gefärbten Gobletzellen in den Zotten des Duodenums und Jejunums zeigte kein einheitliches Muster zwischen den Altersgruppen bzw. zwischen den Darmabschnitten. Außerdem zeigten die Werte nur vereinzelt signifikante Unterschiede. Somit scheint die Expression des EGF im Bereich der Zotten keinem bestimmten räumlichen Prinzip zu folgen. Im Bereich der Zotten wurde EGF nur noch durch reife

Gobletzellen exprimiert. In diesem Bereich steht aber nicht mehr die Wirkung auf die Zellproliferation und –differenzierung im Vordergrund, sondern andere Funktionen. Es ist in der Literatur beschrieben, dass der EGF als Survival-Faktor Zellen vor Apoptose schützen kann bzw. die Apoptose hinauszögern kann (O'Brien et al., 2001; Hague et al., 1997; Stern et al., 2000). Dies ist vor allem in Richtung Zottenspitze wichtig, in der die Zellen der Apoptose unterliegen. Weiterhin könnte der EGF auf autokrinem Wirkungsweg auch die Mukusproduktion der Gobletzellen erhöhen und somit zum Schutz der Mukosa beitragen. Die Beeinflussung der Mukussekretion und -synthese ist ebenfalls beschrieben (Yoshida et al., 1987; Kelly & Hunter, 1990). Auch zeigen verschiedene in vitro und in vivo Untersuchungen, dass EGF die Bürstensaumenzymexpression im Darm beeinflusst (Schwein: James et al., 1987; Zijlstra et al., 1994; Maus: Beaulieu et al., 1985; Calvert et al., 1982; Ratte: Nakai et al., 2004; Kaninchen: O'Loughlin et al., 1994). Ob dies ein eigenständiger Effekt von EGF ist oder die automatische Folge der Bereitstellung neuer Zellen durch Förderung der Mitoseaktivität, ist noch nicht eindeutig geklärt.

6.4.1.3 Föten

Bei den Föten zeigte das basale Kompartiment durchweg eine signifikant höhere EGF-Expression als die anderen Kompartimente. Beim basalen Kompartiment handelt es sich um den späteren Kryptenbereich. Es wird auch bei den Föten deutlich, dass im Bereich der Zellteilung und Differenzierung der höchste Prozentsatz an EGF-positiven Zellen vorliegt. Auch speziell bei Föten ist in der Literatur eine Beeinflussung der Proliferation und Differenzierung durch den EGF beschrieben (Menard et al., 1988). Die Funktionen des EGF im Zottenbereich der Föten dürften denen der postnatalen Tiere entsprechen.

6.4.2 EGFR

6.4.2.1 Expression in den Krypten und Zotten

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten keine Unterschiede bezüglich der Expression des EGFR in den Krypten und Zotten bzw. in den Krypten- und Zottenkompartimenten. Somit wird der EGFR in allen Epithelzellen der Darmmukosa exprimiert. Der Vergleich der Literatur zeigt bei verschiedenen Spezies inklusive dem Schwein zum Teil identische Ergebnisse (Miettinen, 1993; Hormi & Lehy, 1994; Chabot et al., 1987; Jaeger & Lamar, 1992) aber zum Teil auch eine vermehrte Expression des EGFR im Bereich der Krypten (Menard & Pothier, 1991; Playford et al., 1996; Kelly et al., 1992).

Bezüglich der zellulären Lokalisation konnte der EGFR in dieser Arbeit immunocytochemisch im Zytoplasma lokalisiert werden. Der zytoplasmatische Nachweis eines ansonsten membranständigen Rezeptors erklärt sich dadurch, dass der Antikörper gegen die intrazelluläre Domäne des EGFR gerichtet ist. Zudem ist auch eine Reaktion mit dem „verbrauchten“ Rezeptor, der zum Abbau wieder ins Zytoplasma aufgenommen wird, denkbar (Sorkin, 2001). Auch könnte es sich um noch nicht in die Membran integrierten EGFR handeln. Ein Nachweis im Zytoplasma wurde auch von anderen Autoren beschrieben (Hormi & Lehy, 1994). Auch Gu et al. (2008) lokalisierten den EGFR im Zytoplasma von Gobletzellen der Konjunktiva bei Ratten. Für die Lokalisation des EGFR innerhalb der Epithelzellen findet man verschiedene Angaben in der Literatur. Die Unterschiede scheinen zum einen durch Speziesunterschiede und zum anderen durch die verschiedenen Untersuchungsmethoden bedingt zu sein. Die Rezeptoren konnten bei anderen Studien entweder nur apikal (Ratte: Thompson, 1988 und Montaner & Perez-Tomas, 1999) oder nur basolateral (Ratte: Scheving et al., 1989; Chabot et al., 1987; Mensch: Playford et al., 1996; Menard & Pothier, 1991) oder sowohl apikal als auch basolateral (Maus: Miettinen, 1993 und Gallo-Payet & Hugon, 1985; Schwein: Kelly et al., 1992) gefunden werden. Aufgrund der Sezernierung des EGF in das Darmlumen macht das Vorkommen des EGFR im apikalen Zellbereich durchaus Sinn, da erst dann EGF seine Funktionen ausüben kann. Die basolateralen Rezeptoren könnten durch EGF aus der Zirkulation oder durch resorbiertes EGF stimuliert werden. Allerdings konnte EGF im Blut radioimmunologisch nicht nachgewiesen werden (Claus, unpublizierte Ergebnisse). Die Möglichkeit der Transcytose des EGF wird in der Literatur bei fötalen und säugenden Ratten beschrieben (Gonnella et al., 1987; Weaver et al., 1990).

6.5 Zur Expression des EGF und EGFR bei Neonaten in Abhängigkeit zur Aufnahme von Kolostrum

6.5.1 EGF

Die Expression des EGF auf Protein-Ebene zeigte lediglich in den beiden Dickdarmabschnitten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. So zeigten die NeoGlc eine signifikant höhere EGF-Expression im Vergleich zu den NeoKol. Betrachtet man die Ergebnisse im Krypten- und Zottensystem so wird deutlich, dass dieser Unterschied alleine im luminalen Kompartiment auftritt. Im basalen und mittleren Kryptenkompartiment traten keine signifikanten Unterschiede zwischen NeoGlc und

NeoKol auf. Die Expression des EGF auf mRNA-Ebene zeigte diesen Unterschied jedoch nicht. Auf mRNA-Ebene konnte man bei den NeoGlc im Bereich des Jejunums eine höhere EGF-Expression im Vergleich zu den NeoKol finden. Die Frage, ob das mit dem Kolostrum bereitgestellte EGF einen Einfluss auf die endogene Produktion hat, ist schwer zu beantworten. Es ist fraglich, ob die 6 Stunden der Kolostrumaufnahme ausreichen, um die Expression auf Protein- und mRNA-Ebene überhaupt zu beeinflussen. Des Weiteren ist es unwahrscheinlich, dass aufgrund der Passagedauer das im Kolostrum enthaltene EGF im Bereich des Dickdarmes zur Wirkung kommt (siehe Kapitel 6.6). Unter Berücksichtigung dieser Aspekte scheinen die Unterschiede zwischen den Gruppen Zufallsbefunde zu sein, die eventuell bei einer größeren Tierzahl nicht mehr auftreten würden.

6.5.2 EGFR

Die Expression des EGFR zeigte weder auf Protein- noch auf mRNA-Ebene einen signifikanten Unterschied zwischen den NeoGlc und den NeoKol. Also scheint das im Kolostrum enthaltene EGF auch keine Auswirkungen auf die Expression des EGFR zu haben. Mögliche Gründe und Denkansätze dafür sind in Kapitel 6.5.1 bei der Expression des EGF schon diskutiert. Der Nachweis des EGFR auf Protein-Ebene wurde auch bei den Neonaten noch mittels Western blot durchgeführt. Die Ergebnisse des Western blot zeigten bei den NeoKol spezifische Banden im Molekulargewichtsbereich des EGFR. Während bei den NeoGlc in keinem der untersuchten Darmabschnitte Banden nachgewiesen werden konnten. Gründe für das Fehlen des EGFR bei den NeoGlc sind nicht bekannt und lassen auch keine Vermutungen zu. Andere Untersuchungen zeigen den genau umgekehrten Sachverhalt und zwar dass kein EGFR bei säugenden Tieren nachzuweisen ist (Ratte: Thompson, 1988; Schwein: Kelly et al., 1992). Gründe hierfür könnten sein, dass das EGF des Kolostrums einen Großteil der EGFR besetzt und es nachfolgend zu einer erhöhten Endocytose, zu vermindertem Rezeptor-Recycling und/oder zum Abbau des EGFR-Proteins kommt (Kelly et al., 1992).

6.6 Einflüsse des Kolostrums auf die Morphologie des Darmes

Die sechsstündige Aufnahme von Kolostrum zeigte in den Darmabschnitten Duodenum, Jejunum und Colon ascendens keinen Unterschied in der Epithelzellzahl der Krypten bzw. Zotten zwischen den NeoGlc und den NeoKol. Im Colon descendens zeigten jedoch die

NeoKol eine signifikant tiefere Krypte als die NeoGlc. Andere Studien zeigten bei Kälbern, die am Tag 8 postpartum euthanasiert wurden, dass diejenigen mit längerer Kolostrumaufnahme besser entwickelte Zotten im Duodenum besaßen, während weiter distal gelegene Segmente nicht beeinflusst wurden (Blättler et al., 2001). Dass das Duodenum durch die Kolostrumaufnahme mehr beeinflusst wird als weiter distal gelegene Darmsegmente des Dünndarms, konnten auch andere Untersucher feststellen (Bühler et al., 1998). Grund für diesen Sachverhalt ist, dass die Komponenten des Kolostrums in proximalen Darmabschnitten in größeren Mengen vorhanden sind als weiter distal und somit die Wirkungen des Kolostrums proximal also im Bereich des Duodenums höher sind als im Bereich des Jejunums und Ileums (Blättler et al., 2001). Die Ergebnisse der tieferen Krypten im Colon descendens der NeoKol im Rahmen der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit scheinen somit nicht durch die Kolostrumaufnahme bedingt zu sein. Um eine Wirkung des Kolostrums zu erfassen, hätte vermutlich die Aufnahme des Kolostrums für eine längere Zeitspanne erfolgen müssen, da aufgrund der Dauer des Zellzyklus nach sechs Stunden noch keine morphologischen Veränderungen zu erwarten sind. Trotzdem könnte durch EGF das Mitosegeschehen gefördert werden, solche Veränderungen waren offenbar durch die notwendigerweise aus Tierschutzgründen begrenzte Versuchsdauer nicht erkennbar (siehe Kapitel 4.1.1).

7. Zusammenfassung

Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) ist ein Peptid, das seine Wirkungen über den membranständigen Rezeptor (EGFR) entfaltet. Der EGF beeinflusst durch mitosefördernde Wirkungen den Zellzyklus. Er beschleunigt sowohl in vitro als auch in vivo die Proliferation und Differenzierung verschiedener Zelltypen epithelialer Gewebe. Im Bereich des Darmes wird der EGF beim Schwein in den Gobletzellen synthetisiert und mit dem Mukus abgegeben. Seine Funktionen sind insbesondere im Darm essentiell, da dieser einem besonders hohen Ausmaß an Zellerneuerung unterliegt. Zudem wirkt EGF durch seine apoptosehemmende Funktion als Survivalfaktor für Enterozyten. Untersuchungen über die Verteilung des EGF in den verschiedenen Darmabschnitten sowie die Expression des EGF in unterschiedlichen Altersgruppen beim Schwein fehlen weitgehend. Deshalb war das Ziel dieser Arbeit eine „Bestandsaufnahme“ der Expression des EGF und EGFR im Darm von Schweinen durchzuführen. Da der EGF auch mit dem Kolostrum der Sau in hoher Konzentration abgegeben wird, sollte zusätzlich bei neonatalen Ferkeln untersucht werden, ob die Gabe von Kolostrum zu einer erkennbaren Beeinflussung des EGF- und EGFR-Systems im Darm führt. Somit umfassen die Untersuchungen zwei Versuchsteile. Im Versuchsteil „Ontogenese“ wurde die Entwicklung des EGF- und EGFR-Systems in der fötalen und postnatalen Entwicklung untersucht. Dafür stand Untersuchungsmaterial von Föten der 10., 13. und 15. Graviditätswoche zur Verfügung. Postnatal wurden Tiere der 9., 18. Lebenswoche und adulte Tiere (26. – 30. Lebenswoche) untersucht. Im Versuchsteil „Kolostrum“ wurden zwei Tiergruppen (je n = 4) von Neonaten untersucht von denen die eine Gruppe über 6 Stunden ad libitum Kolostrum bei der Muttersau aufnehmen konnte (NeoKol), wohingegen die Kontrollgruppe über 6 Stunden eine 5 % Glucose verabreicht bekam (NeoGlc). Bei allen Tiergruppen wurde EGF und EGFR immunocytochemisch und molekularbiologisch mittels quantitativer PCR und Western blot in den Darmabschnitten Duodenum, Jejunum, Colon ascendens und Colon descendens nachgewiesen. Der immunocytochemische Nachweis des EGF erfolgte mit einem schweinespezifischen Antikörper, der am Fachgebiet bereits früher hergestellt worden war. Bei den Föten wurde aufgrund morphologischer Besonderheiten im Colon zusätzlich die Epithelzellzahl der Enterozyten der Zotten und Krypten erfasst. Auch bei NeoKol und NeoGlc wurden die Epithelzellzahlen erfasst, um eine mögliche Auswirkung des Kolostrums auf die Morphologie des Darmepithels zu erfassen. Nachfolgend sind wesentliche Befunde zusammengefasst. Der EGF wird sowohl in den Gobletzellen als auch in den undifferenzierten Kryptenzellen exprimiert. Die Expression in

den verschiedenen Darmabschnitten zeigte eine signifikant geringere Expression im Jejunum. Eine Ausnahme bildete der mRNA-Nachweis bei Föten. Generell war der Trend zu verzeichnen, dass die Expression des EGF bei adulten Tieren höher ist als bei den Föten. Innerhalb der postnatalen Altersgruppen zeigten sich keine systematischen Unterschiede der quantitativen Expression. Im gesamten Dünndarm war bei den Neonaten der Anteil EGF-positiver Zellen in den Krypten stets höher als in den Zotten. Mit höherem Alter war dieses Verteilungsmuster nur im Jejunum zu erkennen, während im Duodenum annähernd gleiche Anteile der Zellen das Protein enthielten. Die Verteilung der EGF-bildenden Zellen in den Zotten- und Kryptenkompartimenten zeigte im Bereich der Zotten kein einheitliches Verteilungsmuster. Innerhalb der Krypten wurde bei allen Tiergruppen eine abnehmende Zahl EGF-bildender Zellen in Richtung Darmlumen nachgewiesen. Auch bei den Föten zeigte sich im basalen Kompartiment der höchste Prozentsatz an EGF-positiven Zellen.

Der immunocytochemische Nachweis des EGFR zeigte die positive Färbung aller Epithelzellen. Dabei wurde der EGFR im Zytoplasma sowohl im apikalen als auch basolateralen Bereich der Zellen lokalisiert. Auf mRNA-Ebene zeigte sich ein Trend zu höherer Expression des EGFR im Dickdarm, wobei die Werte nicht immer signifikant unterschiedlich zu anderen Darmabschnitten waren. Altersunterschiede zeigte die Expression des EGFR auf mRNA-Ebene bei den postnatalen Tieren nicht, lediglich die Föten zeigten im Jejunum eine höhere Expression als die adulten Tiere.

Als zusätzlicher morphologischer Befund wurden im Colon der Föten Zotten nachgewiesen. Mit steigendem Alter der Föten nahm die Anzahl der Epithelzellen im Zotten- und Kryptenbereich ab. Die Neonaten zeigten bereits eine weitgehende Rückbildung der Zotten, so dass nur noch gelegentlich eine in Rückbildung begriffene Zottenspitze vermutet werden konnte.

Der Kolostrumversuch zeigte weder auf Protein- noch auf mRNA-Ebene eine Beeinflussung des EGF- und EGFR-Systems. Auch die morphologischen Untersuchungen zeigten innerhalb des tierschutzbedingt knapp bemessenen Applikationszeitraums von 6 Stunden keine Unterschiede zwischen den NeoGlc und den NeoKol.

Die Befunde auf der Basis des EGF-Proteins und der EGF-mRNA sowie des Rezeptors zeigen, dass dieses zellzyklussteuernde System in allen Kompartimenten des Darmes von Schweinen eine sehr hohe Bedeutung hat. Dies ist auch darauf zurückzuführen, dass eine „Zufuhr“ des Proteins durch den Speichel, der bei anderen Spezies die Haupt-EGF-Quelle darstellt beim Schwein nur eine untergeordnete Rolle spielt.

8. Summary

Expression and localisation of the epidermal growth factor (EGF) and its receptor (EGFR) in the intestinal tract of pigs.

The epidermal growth factor (EGF) is a peptide which exerts its effect via the membrane receptor (EGFR). Its function is directed primarily towards epithelial tissues where it stimulates mitotic activity and thus proliferation and differentiation of different cell types as shown both *in vitro* and *in vivo*. In the porcine gut it is mainly expressed in goblet cells which deliver EGF to luminal surface of the epithelium together with the mucus. Its function in the gut system is specifically important due to its high degree of cell renewal. In addition to the mitogenic function EGF is also a survival factor which extends the life span of enterocytes by delaying apoptosis.

So far detailed studies on the occurrence of EGF in different compartments of the pig gut with increasing age so far are largely missing. So it was the aim of the present study to clarify the expression both of EGF and EGFR in different compartments of the gut during fetal and postnatal development. Because EGF is also supplied in high amounts by colostrum to neonates, a possible role for gut maturation was additionally investigated. These two parts of the study were organized as follows:

With the project “ontogenesis” expression of EGF and EGFR were demonstrated by immunocytochemistry (pig specific antiserum for EGF), quantitative PCR and western blot in fetuses from weeks 10, 13 and 15 and postnatally in weeks 9, 18 and adults (26 – 30 weeks of age). The experiment “colostrum” included two groups of neonates each with four piglets. They were either suckled for 6 hours by their mother (NeoKol). A control group instead received only 5 % glucose solution (NeoGlc). Piglets were sacrificed thereafter, again EGF and EGFR were investigated. In addition the number of epithelial cells, possible effect of the colostrum on gut epithelium morphology were determined. Major results are summarized below.

In addition to the known expression in goblet cells, EGF-expression was also demonstrated in undifferentiated crypt cells. Expression was significantly lower in the jejunum compared to duodenum, colon ascendens and colon descendens. As shown by mRNA in fetuses expression did not reveal differences between these compartments. Generally expression of EGF was higher in adult compared with fetuses. A separate analysis along the crypt-villus-axis revealed a higher proportion of EGF-positive cells in the crypts compared with villi for neonates. With increasing age these differences could also be substantiated for the

jejunum but not for the duodenum. In all age groups an decrease number of EGF-positive cells in crypts was found from the crypt bottom to the crypt-villus-border. Distribution in villi seemed to occur at random. In fetuses maximal percentage of EGF-positive cells was found in the basal compartement.

The demonstration of the presence of EGFR by immunocytochemistry demonstrated its (constitutive) expression in cytoplasm of all cells. Both in the apical and basolateral area of the cytoplasm. Basing on mRNA determination EGFR-expression in the colon tended to be higher but differences were only partly. Except fetuses with an increased expression of EGFR in the jejunum, no other age effects on EGFR-expression could be substantiated. It was additionally detected that in the fetal colon villi still were present. But with increasing age of fetuses however the number of epithelial cells decreased both in the villi and the crypts. In neonates e.g. only few villi could still be found.

The experiment with colostrum application did not reveal significant differences of EGF and EGFR between the two groups and no morphological differences could be detected. Probably an application period of 6 hours was to short to reveal an effect but could not be extended due to welfare considerations.

All together the data clearly point to the fact that the EGF protein together with its receptor EGFR plays a predominant role to regulate the gut epithelium and the expression of the protein is directly located in the gut whereas in other species saliva was shown to be the major source of EGF.

9. Anhang

Anhang I: Immuncytochemische Färbung

Entparaffinieren:

- Chloroform (Trichlormethan, Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland)

Ab- bzw. aufsteigende Alkoholreihe:

- 100% Ethanol (100% Ethanol, Roth GmbH & Co KG, Darmstadt, Deutschland)
- 96% Ethanol (100% Ethanol, Roth GmbH & Co KG, Darmstadt, Deutschland)
Aqua bidest
- 70% Ethanol (100% Ethanol, Roth GmbH & Co KG, Darmstadt, Deutschland)
Aqua bidest

Gegenfärbung mit Hämalaun:

- Mayers Hämalaunlösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

Xylol:

Xylol (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland)

Eindecken:

DEPEX (Serva electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)

Negativkontrolle:

- Kaninchen Serum (non-immune), Institut für Tierhaltung und Tierzucht
Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie
- TBS Puffer
Verdünnung: 1:1000

Puffer und Lösungen

TBS-Puffer Stammlösung:

- 60,6 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- 163,6 g NaCl (Natriumchlorid, Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland)

- 2000 ml Aqua bidest

Gebrauchslösung: pH: 7,5; Verdünnung: 1:10

Citratpuffer:

- 21,0 g Citronensäuremonohydrat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- 1000 ml Aqua bidest

Gebrauchslösung: pH: 6,0; Verdünnung: 1:10

Lösung zum Blockieren der endogenen Peroxidase:

- 14,8 ml Wasserstoffperoxid 30% (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 200 ml Aqua bidest

Frisch ansetzen!

Lösung zum Blockieren unspezifischer Bindungen:

- Schaf Serum (Institut für Tierhaltung und Tierzucht, Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie)
- TBS Puffer

Verdünnung: 1:10

Farbentwicklungslösung:

- 100 mg DAB (3,3`Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid Dihydrat, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz)
- 100 µl Wasserstoffperoxid 30% (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 200 ml TBS Puffer

Unmittelbar vor Gebrauch ansetzen!

Weitere Reagenzien:

Primärantikörper:

- Anti-porcines EGF polyclonal rabbit (Institut für Tierhaltung und Tierzucht, Fachgebiet Tierhaltung und Leistungsphysiologie)

Verdünnung: 1:500

- Anti-human EGFR polyclonal rabbit (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland)

Verdünnung: 1:10

Sekundärantikörper:

- sheep anti rabbit IgG: Biotin (Biozol, Eching, Deutschland)
- TBS Puffer

Verdünnung: 1:400

AB-Komplex:

- 4,5µl A/B Strept ABC Complex / HRP: (Dako GmbH, Hamburg, Deutschland)
- 500 µl TBS

30 Minuten vorher ansetzen, dunkel aufbewahren

Anhang II: PCR

RNA Stabilization Solution:

Zusammensetzung für 2000 ml, pH 5,2:

- 40 ml 0,5 M EDTA Lösung pH 8,0 (Ethylendiaminotetraacetat, Sigma, St.Louis, USA)
- 25 ml 1 M Natrium-Citrat –Lösung (Natrium-Citrat, Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 700 g Ammoniumsulfat (ApplicChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- 935 ml DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat 1:1000, ApplicChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)

Gelelektrophorese der PCR-Produkte:

TAE-Puffer (50x):

- 24,2 g Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, ApplicChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- 5,71 ml Eisessig (Essigsäureanhydrid Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- 10 ml EDTA 0,5M: pH 8,0 (Ethylendiaminotetraacetat, Sigma, St.Louis, USA)
- 100 ml Aqua bidest

Ladepuffer:

- 5 ml Glycerin 99% (ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- 0,25 ml Bromphenolblau 5% (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland)
- 2,25 ml Aqua bidest

Anhang III: Western blot

Proteinisolierung:

Zusammensetzung des Lysis-Puffer (5 ml):

- 500 µl 1M Tris/HCl ph 7,5 (ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
Endkonzentration: 10 mM
- 0,0242 g Natriummolybdatdihydrat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Endkonzentration: 20 mM
- 0,0077 g DTT (1,4 Dithio-DL-threitol, Serva GmbH & Co, Heidelberg, Deutschland)
Endkonzentration: 10 mM
- 500 µl 100% Glycerol (ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
Endkonzentration: 10%
- 2,5 µl Triton X-100 (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Endkonzentration: 0,05%
- ad 5 ml Aqua bidest

Zu 5 ml Lysis Puffer werden noch folgende Substanzen zugegeben:

- 50 µl Pepstatin A (ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
Endkonzentration: 10 µg/ml
- 50 µl Leupeptin (ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
Endkonzentration: 10 µg/ml
- 5 µl Aprotinin (ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
Endkonzentration: 10 µg/ml
- 200 µl PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid, ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
Endkonzentration: 2 mM
- 10 µl 0,5 M EDTA (Molecular Sigma Biology, St.Louis, USA)
Endkonzentration 1 mM

Proteinquantifizierung nach Bradford:Verwendete Lösungen:

- Bradford Reagenz:
 - 200 ml 2%ige Perchlorsäure (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
 - 120 mg Coomassie® Brilliant blue 250 (Serva GmbH & Co, Heidelberg, Deutschland)

Western blot des EGFR:SDS-Gelelektrophorese nach Lämmli:

Verwendete Lösungen und Substanzen:

10 % APS:

- 100 mg Ammoniumperoxidsulfat (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland)
- ad 1 ml Aqua bidest

Trenngelbuffer: (pH 8,8)

- 18,17 g 1,5 M Trishydroxymethyl-aminomethan (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- ad 100 ml Aqua bidest

Sammelgelbuffer: (pH 6,8)

- 12,11 g 1 M Trishydroxymethyl-aminomethan (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- 0,5 g Orange G (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

30% Acrylamid:

- 30 g 30% Acrylamid 2x (Serva GmbH & Co, Heidelberg, Deutschland)
- 0,8 g 0,8 % Bisacrylamid 2K (ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- ad 100 ml Aqua bidest

10% SDS:

- 10 g SDS (Natriumdodecylsulfat, ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)

- ad 100 ml Aqua bidest

5x Elektrodenpuffer:

- 72 g Glycin (ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- 5 g SDS (Natriumdodecylsulfat, ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- 7,5 g Trishydroxymethyl-aminomethan (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- ad 1 l Aqua bidest (pH 8,3)

5x Ladepuffer:

- 3 ml 300 mM Tris/HCl (pH 6,8) (ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- 1,5 g 15 % SDS (Natriumdodecylsulfat, ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- 3,5 ml 35 % Glycerin (ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- 2,5 ml 25 % β -Mercaptoethanol (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 0,01 g 0,1 % Bromphenolblau (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland)
- ad 10 ml Aqua bidest

Marker:

Page Ruler™ (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland)

Proteintransfer:

Verwendete Lösungen:

Towbin-Puffer:

- 7,207 g 0,192 M Glycin (ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- 12,5 ml 0,025 M Tris/HCl: pH 8,3 (ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- 0,187 g 0,0013 M SDS (Natriumdodecylsulfat, ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- ad 500 ml Aqua bidest

- für Nitrocellulose Membran 10 % Methanol (Roth GmbH & Co KG, Darmstadt, Deutschland) zugeben

Detektion EGFR:

Verwendete Lösungen:

PBS-Puffer (pH 7,2):

- 11,5 g Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- 2,96 g Natrium-Dihydrogenphosphat-Monohydrat (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 5,84 g Natriumchlorid (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland)
- ad 1 Liter Aqua bidest

PBS-T-Puffer:

- in benötigte Menge PBS-Puffer 0,1 % Tween® 20 (ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) zufügen

Blockingreagenz:

- in benötigte Menge PBS-T-Puffer 5 % Magermilchpulver (Naturalflor®, Töpfer GmbH, Dietmannsried, Deutschland) geben

ECL-Detektionsreagenz:

- 1 ml 0,0442 g 250 mM Luminol (3-Aminophthalhydrazide, Fluka, Steinheim, Deutschland) in 1 ml DMSO (Dimethylsulfoxide, Fluka, Steinheim, Deutschland)
- 445 µl 0,0075 g 90mM p-Coumarsäure (Fluka, Steinheim, Deutschland) in 0,5 ml DMSO (Dimethylsulfoxide, Fluka, Steinheim, Deutschland)
- 10 ml 1M Tris/HCl pH 8,5 (ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland))
- ad 100 ml Aqua bidest

Entwickler: (D19 Entwickler für Autoradiographiefilme)

- 2,2 g PhotoRex® (4 Methylaminophenolsulfat, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- 72 g Natriumsulfit (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 8,8 g Hydrochinon krist. (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- 48 g Natriumcarbonat, wasserfrei (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- 4 g Kaliumbromid (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

- ad 1 l Aqua bidest

Western blot des EGF:

Tricingel-Elektrophorese nach Schägger und Jagow:

Verwendete Lösungen:

Acrylamid:

- 48 g Acrylamid 2x (Serva GmbH & Co, Heidelberg, Deutschland)
- 1,5 g Bisacrylamid 2K (ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- ad 100 ml Aqua bidest

Gel Puffer:

- 36,32 g 3M Tris (ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- 0,3 g 0,3 % SDS (Natriumdodecylsulfat, ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- ad 100 ml Aqua bidest pH 8,45

Ladepuffer:

- 20 µl 10% SDS (Natriumdodecylsulfat, ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- 600 µl Glycerol (ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- 250 µl 1M Tris pH 6,8 (ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- 100 µl β-Mercaptoethanol (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 50 µl 1% Bromphenolblau (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland)
- 3,98 ml Aqua bidest

10x Elektrophoresepuffer:

- 12,11 g 1 M Tris (ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- 17,92 g 1 M Tricin (ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- 1 g 1 % SDS (Natriumdodecylsulfat, ApplieChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- ad 100 ml Aqua bidest
- für Elektrophorese wird auf 1x verdünnt

10. Literaturverzeichnis

- Abud H.E., Watson N., Heath J.K. (2005)
Growth of intestinal epithelium in organ culture is dependent on EGF signalling.
Experimental Cell Research 303: 252-262
- Adamson E.D., Meek J. (1984)
The ontogeny of epidermal growth factor receptors during mouse development.
Developmental Biology 103: 62-71
- Alison M.R., Sarraf C.E. (1994)
The role of growth factors in gastrointestinal cell proliferation.
Cell Biology International 18: 1-10
- Anklesaria P., Teixeira J., Laiho M., Pierce J.H., Greenberger J.S., Massague J. (1990)
Cell-cell adhesion mediated by binding of membrane-anchored transforming growth factor to epidermal growth factor receptors promotes cell proliferation.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 87: 3289-3293
- Arteaga C. (2003)
Potent HER1/Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition.
Seminars in Oncology 39: Suppl. 7
- Bainter K. (1986)
Intestinal absorption of macromolecules and immune transmission from mother to young.
Florida CRC Press Inc.
- Bainter K. (1994)
Demonstration of acidity in intestinal vacuoles of the suckling rats and pigs.
The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society 42: 231-328
- Baumrucker C.R., Blum J.R. (1993)
Secretion of insulin-like growth factors in milk and their effect on the neonate.
Livestock production science 35:49
- Beaulieu J.F., Ménard D., Calvert R. (1985)
Influence of epidermal growth factor on the maturation of the fetal mouse duodenum in organ culture.
Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 4: 476-481
- Behnke O. (1963)
Demonstration of acid phosphatase-containing granules and cytoplasmic bodies in the epithelium of fetal rat duodenum during certain stages of differentiation.
Journal of Cell Biology 18: 251-265
- Berseth C.L. (1987)
Enhancement of intestinal growth in neonatal rats by EGF in milk.
The American Journal of Physiology 253: 662-665
- Bertsch S., Marks F. (1974)
Effect of fetal calf serum and epidermal growth factor on DNA synthesis in explants of chick embryo epidermis.
Nature 251: 517-519
- Biernat M., Wolinski J., Godlewski M.M., Motyl T., Morisset J. (2003)
Apoptosis in the gut of neonatal piglets.
Proceedings of the 9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs.
University of Alberta, Edmonton, Canada: 46-48

- Blättler U., Hammon H.M., Morel C., Philipona C., Rauprich A., Rome V., Le Huerou-Luron I., Guilloteau P., Blum J.W. (2001)
Feeding colostrum, its composition and feeding duration variably modify proliferation and morphology of the intestine and digestive enzyme activities of neonatal calves.
Journal of Nutrition 131: 1256-1263
- Blum J. W., Baumrucker C. R. (2002)
Colostrum and milk insulin-like growth factors and related substances: mammary gland and neonatal (intestinal and systemic) targets.
Domestic Animal Endocrinology 23: 101-110
- Bradford M.M. (1976)
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Analytical Biochemistry 72: 248-254
- Bradshaw R.A., Sporn M.B. (1983)
Polypeptide growth factors and the regulation of cell growth and differentiation.
Federation Proceedings 42: 2590-2591
- Bragg L.E., Hollingsed T.C., Thompson J.S. (1990)
Urogastrone reduces gut atrophy during parenteral alimentation.
Journal of Parenteral and Enteral Nutrition 14: 283-286
- Breier B.H., Gluckman P.D., Blair H.T., McCutcheon S.N. (1989)
Somatotrophic receptors in hepatic tissue of the developing male pig.
The Journal of Endocrinology 188: 242-250
- Britton J.R., George-Nascimento C., Koldovsky O. (1988)
Luminal hydrolysis of recombinant human epidermal growth factor in the rat gastrointestinal tract: segmental and developmental differences.
Life Sciences 43: 1339-1347
- Britton J. R., George-Nascimento C., Udall J. N., Koldovsky O. (1989)
Minimal hydrolysis of epidermal growth factor by gastric fluid of preterm infants.
Gut 30: 327-332
- Brown K.D., Blay J. (1986)
Epidermal growth factor: origins, cellular actions and some possible physiological roles
In: *Control and Manipulation of Animal growth*, Butterworths, Butterfield P.J., Haynes N.B., Lindsay D.B.
- Brown C.F., Teng C.T., Pentecost B.T., DiAugustine R.P. (1989)
Epidermal growth factor precursor in mouse lactating mammary gland alveolar cells.
Molecular Endocrinology 3:1077
- Bucher O., Wartenberg H. (1989)
Verdauungsapparat
In: *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*: 369-439. Verlag Hans Huber, Bern, Stuttgart, Toronto.
- Bühler C., Hammon H., Rossi G.L., Blum J.W. (1998)
Small intestinal morphology in eight-day-old calves fed colostrum for different duration or only milk replacer and treated with long-R³-insulin-like growth factor-I and growth hormone.
Journal of Animal Science 76: 758-765

- Buret A., Olson M.E., Gall D.G., Hardin J.A. (1998)
Effects of orally administered EGF on enteropathogenic *Escherichia coli* infection in rabbits.
Infection and Immunity 66: 4917-4923
- Bustin S.A. (2002)
Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems.
Journal of Molecular Endocrinology 29: 23-39
- Bye W.A., Allan C.H., Trier J.S. (1984)
Structure, distribution and origin of M-cells in Peyer's patches of mouse ileum.
Gastroenterology 86: 789-801
- Byyny R., Orth D.N., Cohen S. (1972)
Radioimmunoassay of EGF.
Endocrinology 90: 1261-1266
- Byyny R., Orth D.N., Cohen S., Doyne E.S. (1974)
EGF: effects of androgenic and adrenergic agents
Endocrinology 95: 776-782
- Calvert R., Beaulieu J.F., Ménard D. (1982)
Epidermal growth factor (EGF) accelerates the maturation of the fetal mouse intestinal mucosa in utero.
Experientia 38: 1096-1097
- Carpenter G. (1980)
EGF is a major growth-promoting agent in human milk.
Science 210: 198-199
- Carpenter G., Cohen S. (1979)
Epidermal growth factor.
Annual Review of Biochemistry 48: 193-216
- Carpenter G., Wahl M.I. (1990)
The epidermal growth factor family
In: *Peptide Growth Factors and their Receptors I*. Sporn M.B., Roberts A.B. Springer Verlag 69-171
- Cera K., Mahan D.C., Simmen F.A. (1987)
In vitro growth-promoting activity of porcine mammary secretions: initial characterization and relationship to known peptide growth factors.
Journal of Animal Science 65:1149-1159
- Chabot J.G., Walker P., Pelletier G. (1987)
Demonstration of EGF binding sites in the adult rat small intestine by autoradiograph.
Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 65:109-112
- Chang W.W.L., Leblond C.P. (1971)
Renewal of the epithelium in the descending colon of the mouse I. Presence of three cell populations: vacuolated-columnar, mucous and argentaffin
American Journal of Anatomy 131: 73-100
- Chapple R.P., Cuaron J.A., Easter R.A. (1989)
Temporal changes in carbohydrate digestive capacity and growth rate of piglets in response to glucocorticoid administration and weaning age.
Journal of Animal Science 67: 2985-2995

- Chen Z. J., Kataoka K. (1991)
Histogenesis of the mukosa of the descending colon in mouse fetuses.
Archives of Histology and Cytology 54: 221-232
- Cheng H., Leblond C.P. (1974A)
Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine I. Columnar cell.
American Journal of Anatomy 141: 461-480
- Cheng H., Leblond C.P. (1974B)
Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine II. Mucous cells.
American Journal of Anatomy 141: 481-502
- Cheng H., Leblond C.P. (1974C)
Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types
American Journal of Anatomy 141: 537-562
- Cheng H. (1974)
Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine IV. Paneth cells.
American Journal of Anatomy 141: 503-519
- Clarke R. M., Hardy R.N. (1971)
Histological changes in the small intestine of the young pig and their relation to macromolecular uptake.
Journal of anatomy 108: 63-77
- Clarke L.A., Amaral M.D. (2003)
Protocol for RNase retarding solutions for all samples.
Provided: The European working group on CFTR Expression.
- Claus R., Weiler U. (1994)
Endocrine regulation of growth and metabolism in the pig: a review.
Livestock Production Science 37: 245-260
- Claus R., Mentschel J., Blazey B., Munz O. (2001)
Preliminary studies on EGF immunoreactivity in goblet cells of the small intestine by a species specific antiserum in healthy piglets and piglets with diarrhoea.
Journal of Animal and Feed Sciences 10: 309-315
- Cohen S. (1962)
Isolation of a mouse Submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal.
The Journal of Biological Chemistry 237:1555-1562
- Cohen S. (1964)
Isolation and biological effects of an epidermal growth-stimulating protein.
In: W.J. Rutter (ed) Metabolic control mechanisms in animal cells. National Cancer Institute Monograph 13:13-27
- Cohen S. (1965)
The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF).
Developmental Biology 12: 394-407
- Cohen S., Elliott G.A. (1963)
The stimulation of epidermal keratinization by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse.
Journal of Investigative Dermatology 40: 1-6

- Collins M.K.L., Perkins G.R., Rodriguez-Tarduchy G., Nieto M.A., Lopez-Rivas A. (1993)
Growth factors as survival factors: regulation of apoptosis
BioAssays 16(2): 133-138
- Colony P.C., Kois J.M., Peiffer L. P. (1989)
Structural and enzymatic changes during colonic maturation in the fetal and suckling rat.
Gastroenterology 97: 338-347
- Conteas C.N., De Morrow J.M., Majumdar A.P.N. (1986)
Effect of epidermal growth factor on growth and maturation of fetal and neonatal rat intestine in organ culture.
Experientia 42: 950-952
- Cooke P.S., Yonemura C.U., Russell S.M. Nicoll C.S. (1986)
Growth and differentiation of fetal rat intestine transplants: dependence on insulin and growth hormone.
Biology of the Neonate 49: 211-218
- Cross M., Dexter M.T. (1991)
Growth factor in development, transformation, and tumorigenesis
Cell 64: 271-280
- Daniele B., Quaroni A. (1991)
Effects of epidermal growth factor on diamine oxidase expression and cell growth in Caco-2 cells.
The American Journal of Physiology 261: 669-676
- Dembinski A., Gregory H., Konturek S.J., Polanski M. (1982)
Trophic action of epidermal growth factor on the pancreas and gastroduodenal mucosa in rats.
Falk Symposium 30: 281-284
- Dolling N., Thorburn G.E., Young I.R. (1983)
Effect of epidermal growth factor in skin of the fetal lamb.
Journal of Anatomy 136: 656
- Donovan S.M., McNeil L.K., Jimenez-Flores R., Odle J. (1994)
IGF's and IGF binding proteins in porcine serum and milk throughout lactation.
Pediatric Research 36: 159-168
- Donovan S.M., Odle J. (1994)
Growth factors in milk as mediators of infant development.
Annual Review of Nutrition 14: 147-167
- Duh G., Mouri N., Warburton D., Thomas D.W. (2000)
EGF regulates early embryonic mouse gut development in chemically defined Organ Culture.
Pediatric Research 48: 794-802
- Ekberg S., Carlsson L., Carlsson B., Billig H., Jansson J.O. (1989)
Plasma growth hormone pattern regulates epidermal growth factor receptor messenger ribonucleic acid levels and EGF binding in the rat liver.
Endocrinology 125: 2158-2166
- Elsaesser F., Parvizi N. (1994)
Endokrinologie des Fetus
In: *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. Gustav Fischer Verlag, Döcke F.: 547-570
- Eppstein D.A., Marsh Y.V., Schreiber A.B., Newman S.R., Todaro G.J., Nestor Jr J.J. (1985)
EGFR occupancy inhibits vaccinia virus infection.
Nature 318: 663-665

- Etherton T.D. (1989)
Mechanisms by which porcine growth hormone (pGH) and insulin-like growth factors (IGFs) regulate pig growth performance: approaches from the pGH and IGF receptors to the whole animal.
In: Biotechnology for control of growth and product quality in swine. Implications and acceptability: 111-125. R.D. Politiek (eds.). Pudoc, Wageningen. Van der Wal P., Niuewhof G.J.
- Evans R.M. (1988)
The steroid and thyroid hormone receptor superfamily.
Science 230: 889-895
- Feldman E.J., Aures D., Grossman M.I. (1978)
EGF stimulates ornithine decarboxylase activity in the digestive tract of mouse.
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 159: 400-402
- Ferrell C.L. (1989)
Placental regulation of fetal growth
In: Animal Growth Regulation. Plenum Press Campion. Hausman D.R., Martin G.J.
- Fisher D.A., Lakshmanan J. (1990)
Metabolism and effects of EGF and related growth factors in mammals.
Endocrine Reviews 11: 418-442
- Fitzpatrick L.R., Wang P., Johnson L.R. (1987)
Effect of epidermal growth factor on polyamine-synthesizing enzymes in rat enterocytes.
American Journal of Physiology 252: 209-214
- Foster H., Whitehead R.H. (1990)
Intravenous but not intracolonic EGF maintains colonocyte proliferation in defunctioned rat colorectum.
Gastroenterology 99: 1710-1714
- Fowden A.L. (2003)
The insulin-like growth factors and feto-placental growth.
Placenta 24: 803-812
- Gab S.L., Hye S.K., Sang H.H., Hyun Y.J., Dong H.N., Yeon W.J., Sue K., Ji H.K., Sung K.K., Byeong C.L., Woo S.H. (2005)
Effect of EGF in preimplantation development of porcine cloned embryos.
Molecular Reproduction and Development 71: 45-51
- Galan J.E., Pace J., Hayman M.J. (1992)
Involvement of the EGFR in the invasion of cultured mammalian cells by *Salmonella typhimurium*.
Nature 357: 588-589
- Gallo-Payet N., Hugon J.S. (1985)
EGFRs in isolated adult mouse intestinal cells: studies in vivo and in organ culture.
Endocrinology 116:194-201
- Gallo-Payet N., Pothier P., Hugon J.S. (1987)
Ontogeny of EGF receptors during postnatal development of mouse small intestine.
Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 6: 144-120
- Gauthier S.F., Pouliot Y., Maubois J.-L. (2006)
Growth factors from bovine milk and colostrum: composition, extraction and biological activities.
Lait 86: 99-125

- Georgieva R., Gerov K. (1975)
The morphological and functional differentiation of the alimentary canal of the pig during Ontogeny: II: development and differentiation of the jejunum.
Anatomischer Anzeiger 137: 16-20
- Gluckman P.D. (1986)
The role of pituitary hormones, growth factors and insulin in the regulation of fetal growth.
Oxford Reviews of Reproductive Biology 8: 1-60
- Gluckman P.D., Breier B.H. (1989)
The regulation of the growth hormone receptor.
In: *Biotechnology in growth regulation*. Butterworths, London Boston Singapore Sidney Toronto Wellington. Heap R.B., Prosser C.G., Lamming G.E.(eds.): 27-33
- Godlewski M.M., Słupecka M., Wolinski J., Skrzypek T., Skrzypek H., Motyl T., Zabielski R. (2005)
Into the unknown - the death pathways in the neonatal gut epithelium.
Journal of Physiology and Pharmacology 56: 7-24
- Gonnella P.A., Siminoski K., Murphy R.A., Neutra M.R. (1987)
Transepithelial transport of epidermal growth factor by absorptive cells of suckling rat ileum.
The Journal of Clinical Investigation 80:22-32
- Goodlad R.A., Wilson T.G., Lenton W., Wright N.A, Gregory H., McCullagh K.G. (1985)
Urogastrone-epidermal growth factor is trophic to the intestinal epithelium of parenterally fed rats.
Experientia 41: 1161-1163
- Goodlad R.A., Wilson T.G., Lenton W., Gregory H., McCullagh K.G., Wright N.A. (1987A)
Proliferative effects of urogastrone-EGF on the intestinal epithelium.
Gut 28: 37-43
- Goodlad R.A., Wilson T.G., Lenton W., Wright N.A, Gregory H., McCullagh K.G. (1987B)
Intravenous but not intragastric urogastrone-EGF is trophic to the intestinal epithelium of parenterally fed rats.
Gut 28: 573-582
- Goodlad R.A., Lee C.Y., Wright N.A. (1992)
Cell proliferation in the small intestine and colon of intravenously fed rats: effects of urogastrone-epidermal growth factor.
Cell Proliferation 25: 393-404
- Gray A., Dull T.J., Ullrich A. (1983)
Nucleotide sequence of EGF cDNA predicts a 128,000-molecular weight protein precursor.
Nature 303: 722-725
- Gregory H. (1975)
Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor.
Nature 257: 325-327
- Gresik E. W., Barka T. (1978)
Immunocytochemical localization of epidermal growth factor during the postnatal development of the submandibular gland of the mouse.
The American Journal of Anatomy 151: 1-9
- Griffith D.A., Jarvis S.M. (1996)
Nucleoside and nucleobase transport systems of mammalian cells.
Biochimica et Biophysica Acta 1286: 153-181

- Gu J., Chen L., Shatos M.A., Rios J. D., Gulati A., Hodges R.R., Dartt D.A. (2008)
Presence of EGF growth factor ligands and their effects on cultured rat conjunctival goblet cell proliferation.
Experimental Eye Research 86: 322-334
- Gürtler H., Schweigert F.J. (2005)
Physiologie der Laktation.
In: Physiologie der Haustiere. Enke Verlag. Engelhardt v.W., Breves G.: 552-573
- Gutscher M. (2002)
Der Glucocorticoidrezeptor des Schweins: Herstellung und Charakterisierung eines polyklonalen Antiserums, sowie Studien zur Verteilung des GCR im Intestinaltrakt von Ebern und Kastraten.
Dissertation Universität Hohenheim
- Gygi S.P., Rochon Y., Franza B.R., Aebersold R. (1999)
Correlation between protein and mRNA abundance in yeast.
Molecular and Cell Biology 19: 1720-1730
- Haeussler S. (2007)
Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Fötalentwicklung beim Schwein.
Dissertation Universität Hohenheim
- Hague A., Hicks D.J., Bracey T.S., Paraskeva C. (1997)
Cell-cell contact and specific cytokines inhibit apoptosis of colonic epithelia cells: growth factors protect against c-myc-independent apoptosis.
British Journal of Cancer 75: 960-968
- Hahn U., Stallmach A., Hahn E.G., Riecken E.O. (1990)
Basement membrane components are potent promoters of rat intestinal epithelial cell differentiation in vitro.
Gastroenterology 98: 322-335
- Haigler H.T., McKanna J.A., Cohen S. (1979)
Direct visualization of the binding and internalization of a ferritin conjugate of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431.
The Journal of Cell Biology 81: 382-395
- Haining R.E.B., Cameron I.T., van Papadorp C., Davenport A.P., Prentice A., Thomas E.J., Smith S.K. (1991)
Epidermal growth factor in human endometrium: proliferative effects in culture and immunocytochemical localization in normal and endometriotic tissues.
Human Reproduction 6: 1200-1205
- Hampson D.J. (1986A)
Alterations in piglet small intestinal structure at weaning.
Research in Veterinary Science 40: 32-40
- Hampson D.J. (1986B)
Attempts to modify changes in the piglet small intestine after weaning.
Research in Veterinary Science 40: 313-317
- Hardy R.N., Hockaday A.R., Tapp R.L. (1971)
Observation on the structure of the small intestine in foetal, neo-natal and suckling pigs.
Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences 259: 517-531
- Harris R.C., Chung E., Coffey R.J. (2003)
EGF receptor ligands.
Experimental Cell Research: 284: 2-13

- Hartman P.A., Hays V. W., Baker R.O., Neagle L.H., Catron D.V. (1961)
Digestive enzyme development in the young pig.
Journal of Animal Science 20: 144-123
- Heby O., Holm I., Frostesjoe L., Collin H., Grahn B., Rehnholm A., Stjernborg L., Ask A., Persson L. (1992)
Polyamines: regulators of mammalian cell growth and differentiation.
Falk Symposium 62: 19-28
- Hees H. (2000)
Verdauungsapparat.
In: *Histologie: Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*. Deutscher Ärzte-Verlag. Hees H., Sinowatz F.: 262-284
- Heitz P.U., Kasper M., van Noorden S. (1978)
Immunohistochemical localisation of urogastrone to human duodenal and submandibular glands.
Gut 19: 408-413
- Henning S.J., Rubin D.C., Shulman R.J. (1994)
Ontogeny of the intestinal mucosa.
In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract, Third Edition*. Raven Press, New York. Johnson L.R.: 571-610
- Herbein J.H. Martin R.J. Griel L.C. Kavanaugh J.F. (1977)
Serum hormones in the perinatal pig and the effect of exogenous insulin on blood sugars.
Growth 41: 277-283
- Herbst R.S., Langer C.J. (2002)
Epidermal growth factor receptors as a target for cancer treatment: the emerging role of IMC-C225 in the treatment of lung and head and neck cancers.
Seminars in Oncology 29: 27-36
- Herington A.C., Ymer S.I., Tiong T.S. (1991)
Does the serum binding protein for growth hormone have a functional role?
Acta Endocrinologica 124: 14-20
- Higashiyama S., Lau K.E., Besner G.A., Abraham J., Klagsbrun M. (1992)
Structure of heparin-binding EGF-like growth factor. Multiple forms, primary structure, and glycosylation of the mature protein.
The Journal of Biological Chemistry 267: 6205-6212
- Hill D.J. (1989)
Growth factors and their cellular actions.
Journal of Reproduction and Fertility 85: 723-734
- Hormi K., Lehy T. (1994)
Developmental expression of TGF- α and EGF receptor proteins in the human pancreas and digestive tract.
Cell and Tissue Research 278: 439-450
- Hossner K.L. (2005)
Growth hormone and Insulin-like growth factors.
In: *Hormonal Regulation of Farm Animal Growth*. CABI Publishing. Hossner K.L.: 94-122
- Huet-Hudson Y.M., Chakraborty C., De S.K., Suzuki Y., Andrews G.K. (1990)
Estrogen regulates synthesis of epidermal growth factor in mouse uterine epithelial cells.
Molecular Endocrinology 4: 510-523
- Ishikawa S., Cepinskas G., Süecian R.D., Itoh M., Kvietys P.R. (1994)
EGF attenuates jejunal mucosal injury induced by oleic acid: role of mucus
American Journal of Physiology 30:1067-1077

- Jacobs L.R., Lupton J.R. (1982)
Dietary wheat bran lowers colonic pH in rats.
The Journal of Nutrition 112: 592-594
- Jaeger L.A., Lamar C.H., Bottoms G.D., Cline T.R. (1987)
Growth-stimulating substances in porcine milk.
American Journal of Veterinary Research 48: 1531-1533
- Jaeger L.A., Lamar C.H. (1992)
Immunolocalization of EGF and EGF receptors in the porcine upper GIT.
American Journal of Veterinary Research 53: 1685-1692
- James P.S., Smith M.W., Tivey D.R., Wilson T.J.G. (1987)
EGF selectively increases maltase and sucrose activities in neonatal piglet intestine.
Journal of Physiology 393: 583-594
- Johansson S., Husman B., Norstedt G., Andersson G. (1989)
Growth hormone regulates the rodent hepatic epidermal growth factor receptor at a pretranslational level.
Journal of Molecular Endocrinology 3: 113-120
- Johnson R.L. (1986)
Regulation of gastrointestinal growth.
In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (Second Edition). Raven Press, New York.
Johnson L.R.: 301-333
- Johnson L.R., Wang P., Haddox M.K. (1992)
Ornithine decarboxylase in large bowel mucosa: regulation by gastrin secretin and EGF.
Journal of Physiology and Pharmacology 43: 33-41
- Johnson R.L., McCormack S.A. (1994)
Regulation of gastrointestinal mucosal growth
In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (Third Edition) Raven Press, New York.
Johnson L.R.: 611-641
- Jørgensen P.E. (1997)
Urinary epidermal growth factor.
Danish Medical Bulletin 44:111-124
- Jørgensen P.E., Jensen L.G., Sorensen B.S., Poulsen S.S., Nexø E. (1998)
Pig EGF precursor contains segments that are highly conserved among species.
Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation 58: 287-298
- Karg H. (1994)
Hormonale Regulation des Wachstums
In: *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. Gustav Fischer Verlag. Döcke F.: 176-203
- Karlsson B.W. (1972)
Ultrastructure of the small intestinal epithelium of the developing pig foetus.
Zur anatomischen Entwicklungsgeschichte 135: 253-264
- Kasayama S., Ohba Y., Oka T. (1989)
Epidermal growth factor deficiency associated with diabetes mellitus.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86: 7644-7648
- Kelly S.M., Hunter J.O. (1990)
Epidermal growth factor stimulates synthesis and secretion of mucus glycoproteins in human gastric mucosa.
Clinical Science 79: 425-427

- Kelly D., Smyth J.A., McCracken K.J. (1991)
Digestive development of the early-weaned pig. 1. Effect of continuous nutrient supply on the development of the digestive tract and on changes in digestive enzyme activity during the first week post-weaning.
The British Journal of Nutrition 65:169-180
- Kelly D., McFayden M., King T.P., Morgan P.J. (1992)
Characterization and autoradiographic localization of the EGF-R in the jejunum of neonatal and weaned pigs.
Reproduction, Fertility, and Development 4:183-191
- Kelly D. (1994)
Colostrum, growth factors and intestinal development in pigs.
In: *Proceedings of the Fourth International Symposium on Digestive Physiology in Pigs*. Bad Doberan, Germany. Souffrant W.B., Hagenmeister H.
- Kennedy T.G., Brown K.D., Vaughan T.J. (1994)
Expression of the genes for the EGFR and its ligands in porcine oviduct and endometrium.
Biology of Reproduction 50: 751-756
- Kim J.G., Vallet J.L., Christenson R.K. (2001)
Characterization of uterine epidermal growth factor during early pregnancy in pigs.
Domestic Animal Endocrinology 20: 253-265
- Kirkegaard P., Olsen P.S., Poulsen S.S., Nexø E. (1983)
Epidermal growth factor inhibits cysteamine-induced duodenal ulcers.
Gastroenterology 85:1277-1283
- König H.E., Sautet J., Liebich H.-G. (1999)
Verdauungsapparat.
In: *Anatomie der Haussäugetiere*. Schattauer, Stuttgart, New York. König H.E., Liebich H.-G.:15-80
- Koldovsky O., Thornburg W. (1987)
Hormones in milk.
Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 6: 172-196
- Kollmann J. (1898)
Lehrbuch der Entwicklungsgeschichte des Menschen.
Gustav Fischer Verlag, Jena
- Kondapaka S.B., Fridman R., Reddy K.B. (1997)
Epidermal growth factor and amphiregulin up-regulate matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human breast cancer cells.
International Journal of Cancer 70: 722-726
- Konturek S.J., Brzozowski T., Piastucki I., Dembinski A., Radecki T., Dembinska-Kiec A., Zmuda A., Gregory H. (1981)
Role of mucosal prostaglandins and DNA synthesis in gastric cytoprotection by luminal EGF.
Gut 22: 927-932
- Konturek S.J., Dembinski A., Warzecha Z., Brzozowski T., Gregory H. (1988)
Role of epidermal growth factor in healing of chronic gastroduodenal ulcers in rats.
Gastroenterology 94:1300-1307
- Konturek J.W., Bielanski W., Konturek S.J., Bogdal J., Oleksy J. (1989)
Distribution and release of EGF in man.
Gut 30: 1194-1200

- Kreikemeier K.K., Harmon D.L., Nelssen J.L. (1990)
Influence of hydrocortisone acetate on pancreas and mucosal weight, amylase and disaccharidase activities in 14-day-old pigs.
Comparative Biochemistry and Physiology 97: 45-50
- Lämmler U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227: 680-685
- Lax I., Bellot F., Howk R., Ullrich A., Givol D., Schlessinger J. (1989)
Functional analysis of the ligand binding site of EGF-receptor utilizing chimeric chicken/human receptor molecules.
EMBO Journal 8: 421-427
- Leblond C.P., Messier B. (1958)
Renewal of chief cells and goblet cells in the small intestine as shown by radioautography after injection of thymidine- H^3 into mice.
The Anatomical Record 132: 247-259
- Leblond, C. P., Stevens C.E. (1948)
The constant renewal of the intestinal epithelium in the albino rat.
The Anatomical Record 100: 357-377
- Lecce J.G., Broughton C.W. (1973)
Cessation of uptake of macromolecules by neonatal guinea pig, hamster and rabbit intestinal epithelium (closure) and transport into blood.
Journal of Nutrition 103: 744-750
- Le Huërou-Luron I, Peiniau J., Guilloteau P., Aumaitre A. (2000)
Are the activities of intestinal peptidases age- and diet-dependent in piglets?
In: *The 8th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs*. Uppsala, Sweden. Lindberg J.E., Ogle B.: 20-22
- Lei Z.M., Rao C.V. (1992)
Expression of epidermal growth factor (EGF) receptor and its ligands, EGF and transforming growth factor- α , in human fallopian tubes.
Endocrinology 131: 947-957
- Lev R., Orlic D. (1974)
Histochemical and radioautographic studies of normal human fetal colon.
Histochemistry 39: 301-311
- Liebich H.G. (1999)
Verdauungsapparat
In: *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere*. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York: 176-230
- Liggins G.C. (1976)
Adrenocortical-related maturational events in the fetus.
American Journal of Obstetrics and Gynecology 126: 931-941
- Lindberg T., Ohlsson K., Westroem B. (1982)
Protease inhibitors and their relation to protease activity in human milk.
Pediatric Research 16: 479-483
- Madara J.L., Trier J.S. (1994)
The functional morphology of the mucosa of the small intestine.
In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract (Third Edition)*. Raven Press, New York. Johnson L.R.: 1577-1622

- Malo C., Menard D. (1982)
Influence of EGF on the development of suckling mouse intestinal mucosa.
Gastroenterology 83: 28-35
- Marsh M.N., Trier J.S. (1974)
Morphology and cell proliferation of subepithelial fibroblasts in adult mouse jejunum. I. Structural features.
Gastroenterology 67: 622-635
- Marti U., Burwen S.J., Jones A.L. (1989)
Biological effects of epidermal growth factor, with emphasis on the gastrointestinal tract and liver: an update.
Hepatology 9: 126-138
- Martin K.L., Barlow D.H., Sargent I.L. (1998)
Heparin-binding EGF significantly improves human blastocyst development and hatching in serum-free medium.
Human Reproduction 13: 1645-1652
- Massague J. (1990)
Transforming growth factors – α . A model for membrane-anchored growth factors.
The Journal of Biological Chemistry 265: 21393-21396
- Mayer M., Rosen F. (1975)
Interaction of anabolic steroids with glucocorticoid receptor sites in rat muscle cytosol.
American Journal of Physiology 229: 1381-1386
- Meinecke B. (2005)
Endokrinologie.
In: *Physiologie der Haustiere*. Enke Verlag, Stuttgart. V. Engelhardt W., Breves G.: 470-494
- Ménard D., Pothier P. (1991)
Radioautographic localization of EGF receptors in human fetal gut.
Gastroenterology 101: 640-649
- Ménard D., Pothier P., Gallo-Payet N. (1987)
EGFR during postnatal development of the mouse colon.
Endocrinology 121: 1548-1554
- Ménard D., Arsenault P., Pothier P. (1988)
Biologic effects of EGF in human fetal jejunum.
Gastroenterology 94: 656-663
- Miettinen P.J. (1993)
TGF- α and EGF-expression in human fetal gastrointestinal tract.
Pediatric Research 33: 481-486
- Miettinen P.J., Berger J.E., Meneses J., Phung Y., Pedersen R.A., Werb Z., Derynck R. (1995)
Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking EGFR.
Nature 376: 337-341
- Montaner B., Perez-Tomas R. (1999)
EGFR localization in the apical membrane of the enterocytes of rat duodenum.
Cell Biology International 23: 475-479
- Moon H.W. (1971)
Epithelial cell migration in the alimentary mucosa of the suckling pig.
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 137: 151-154

- Moon H.W. (1972)
Vacuolated villous epithelium of the small intestine of young pigs.
Veterinary Pathology 9: 3-21
- Moore R., Carlson S., Madara J.L. (1989)
Rapid barrier restitution in an in vitro model of intestinal epithelial injury.
Laboratory Investigation; a journal of technical methods and pathology 60: 237-244
- Moss S.F., Agarwal B., Arber N., Guan R.J., Krajewska M., Krajewski S., Reed J.C., Holt P.R. (1996)
Increased intestinal bak expression results in apoptosis.
Biochemical and Biophysical Research Communications 223: 199-203
- Murphy M.S. (1998)
Growth factors and the gastrointestinal tract.
Nutrition 14: 771-774
- Nakai K., Hamada Y., Kato Y., Kitagawa K., Hioki K., Ito S., Okumura T. (2004)
Further evidence that EGF enhances the intestinal adaption following small bowel transplantation
Life Sciences 75: 2091-2102
- Neubart C. (1983)
Ultrastructure of the human colon during ontogenesis.
Zeitschrift für mikroskopisch-anatomische Forschung 97: 279-308
- Nexo E., Jorgensen E., Hansen M.R. (1992)
Human EGF. Molecular forms present in urine and blood.
Regulatory Peptides 42: 75-84
- O'Brien D.P., Williams J.L., Erwin C.R., Warner B.W. (2001)
EGF receptor signaling induces the expression of bcl-2 family members bax and bcl-surgical.
Forum 52: 11-12
- Odle J., Zijlstra R.T., Donovan S.M. (1996)
Intestinal effects of milkborne growth factors in neonates of agricultural importance.
Journal of Animal Science 74: 2509-2522
- Oka Y., Orth D. (1983)
Human plasma epidermal growth factor/ -urogastrone is associated with blood platelets.
Journal of Clinical Investigation 72: 249-259
- Oka Y., Ghishan F.K., Greene H.L., Orth D.N. (1983)
Effect of mouse EGF/urogastrone on the functional maturation of rat intestine.
Endocrinology 112: 940-944
- Olayioye M.A., Graus-Porta D., Beerli R.R., Rohrer J., Gay B., Hynes N.E. (1998)
ErbB1 and ErbB2 acquire distinct signalling properties dependent upon their dimerization partner.
Molecular and Cellular Biology 18: 5042-5051
- Olayioye M.A., Neve R.M., Lane H.A., Hynes N.E. (2000)
The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer.
EMBO Journal 19: 3159-3167
- Oliver A.M. (1988)
Epidermal growth factor receptor expression in human foetal tissues is age-dependent.
British Journal of Cancer 58: 461-463

- O'Loughlin E.V., Chung M., Hollenberg M., Hayden J., Zahavi I., Gall D.G. (1985)
Effect of EGF on ontogeny of the gastrointestinal tract.
The American Journal of Physiology 249: 674-678
- O'Loughlin E., Winter M., Shun A., Hardin J.A., and Gall D.G. (1994)
Structural and functional adaptation following jejunal resection in rabbits: effect of EGF.
Gastroenterology 107: 87-93
- Olsen P.S., Poulsen S.S., Kirkegaard P., Nexø E. (1984)
Role of submandibular saliva and EGF in gastric cytoprotection.
Gastroenterology 87: 103-108
- Opleta-Madsen K., Meddings J.B., Gall D.G. (1991)
Epidermal growth factor and postnatal development of intestinal transport and membrane structure.
Pediatric Research 30: 432-350
- Pascall J.C., Jones D.S.C., Doel S.M., Clements J.M., Hunter M., Fallon T., Edwards M., Brown K.D. (1991)
Cloning and characterization of a gene encoding pig epidermal growth factor.
Journal of Molecular Endocrinology 6: 63-70
- Patzelt V. (1931)
Die feinere Ausbildung des menschlichen Darmes von der 5. Woche bis zur Geburt.
Zeitschrift für mikroskopisch-anatomische Forschung 27: 269-518
- Perheentupa J., Lakshmanan J., Macaso T., Fisher D.A. (1984)
Growth hormone increases neonatal mouse urine epidermal growth factor.
Acta Endocrinologica 106: 184-187
- Pfaffl M.W. (2004)
Real-Time PCR: neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung.
Biospektrum 1/04: 92-95
- Pimentel, E. (1994)
Handbook of growth factors Vol. I: General basic aspects
E.Pimentel (ed.) CRC Press Boca Raton –Ann Arbor –London – Tokyo, 1-72
- Playford R.J. (1995)
Peptides and gastrointestinal mucosal integrity.
Gut 37: 595-597
- Playford R.J., Marchbank T., Calnan D.P., Calam J., Royston P., Batten J.J., Hansen H.F. (1995)
Epidermal growth factor is digested to smaller, less active forms in acidic gastric juice.
Gastroenterology 108: 92-101
- Playford R.J., Hanby A.M., Gschmeissner S., Pfeiffer L.P., Wright N.A., McGarrity T. (1996)
The EGF-R is present on the basolateral, but not on the apical, surface of enterocytes in the human gastrointestinal tract.
Gut 39: 262-266
- Pluske J.R., Hampson D.J., Williams I.H. (1997)
Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review.
Livestock Production Science 51: 215-236
- Podolsky D.K. (1994)
Peptide growth factors in the gastrointestinal tract.
Physiology of the Gastrointestinal Tract (Third Edition). Raven Press, New York. Johnson L.R.: 129-167

- Ponder B.A., Schmidt G.H., Wilkinson M.M., Wood M.J., Monk M., Reid A. (1985)
Derivation of mouse intestinal crypts from single progenitor cells.
Nature 313: 689-691
- Pothier P., Menard D. (1988)
Presence and characteristics of EGF receptors in human fetal small intestine and colon.
FEBS Letters 228: 113-117
- Potten C.S., Chwalinski S., Khokhar M.T. (1982)
Spatial interrelationships in surface epithelia: their significance in proliferation control.
In: *The Functional Integration of Cells in Animal Tissues*. Cambridge University Press.
Finbow M.E., Pitts J.O.: 285-300
- Potten C.S., Loeffler M. (1990)
Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt.
Development 110: 1001-1020
- Potten C.S. (1995)
Structure, function and proliferative organisation of mammalian gut.
In: *Radiation and Gut*. Elsevier Science.
- Potten C.S., Wilson J.W., Booth C. (1997)
Regulation and significance of apoptosis in the stem cells of the gastrointestinal epithelium.
Stem Cells 15: 82-93
- Poulsen S.S., Skov-Olsen P., Hess J., Kirkegaard P. (1986)
Immunohistochemical localisation of epidermal growth factor in rat and man.
Histochemistry 85: 389-394
- Quastler H., Sherman F.G. (1959)
Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse.
Experimental Cell Research. 17: 420-438
- Que F.G., Gores G.J. (1996)
Cell death by apoptosis: basic concepts and disease relevance for the gastroenterologist.
Gastroenterology 110: 1238-1243
- Rall L. B., Scott J., Bell G. I., Crawford R. J., Penschow J. D., Niall H.D., Coghlan J.P. (1985)
Mouse preproepidermal growth factor synthesis by the kidney and other tissues.
Nature 313: 228-231
- Rao R.K., Koldovsky O., Korc M., Pollack P.F. Wright S., Davis T.P. (1990)
Processing and transfer of epidermal growth factor in developing rat jejunum and ileum.
Peptides 11:1093-1102
- Rao R.K., Koldovsky O., Grimes J., Williams C., Davis T.P. (1991)
Regional differences in gastrointestinal processing and absorption of epidermal growth factor in suckling rats.
The American Journal of Physiology 261: 790-798
- Rao R. K. (1995)
Luminal processing of epidermal growth factor in mouse gastrointestinal tract in vivo.
Peptides 16: 505-513
- Rasmussen R. (2001)
Quantification on the LightCycler.
In: *Rapid Cycle Real time PCR Methods and Applications*. Springer Press, Heidelberg.
Meurer S., Wittwer C., Nakagawara K.: 21-3

- Reddy S.S.K., Kahn C.R. (1989)
Epidermal growth factor receptor defects in leprechaunism. A multiple growth factor-resistant syndrome.
Journal of Clinical Investigation 84: 1569-1576
- Reddy G.P.V. (1994)
Cell cycle: regulatory events in G1→S transition of mammalian cells.
Journal of Cellular Biochemistry 54: 379-386
- Reeves J.R., Richards R.C., Cooke T. (1991)
The effects of intracolonic EGF on mucosal growth and experimental carcinogenesis.
British Journal of Cancer 63: 223-226
- Romer A.S., Parsons T.S. (1991)
Verdauungssystem.
In: Vergleichende Anatomie der Wirbeltiere. Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin.
Romer A.S., Parsons T.S.: 336-353
- Romeis P. (1989)
Einbetten der fixierten Präparate.
In: Mikroskopische Technik. Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore. Romeis P.: 113-152
- Rüsse I. (1994)
Frühgravidität, Implantation und Plazentation.
In: Lehrbuch der Embryologie der Haustiere Parey Buchverlag Berlin Rüsse I., Sinowatz F.: 153-220
- Salomon D.S., Brandt R., Ciardiello F., Normanno N. (1995)
Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies.
Critical Reviews in Oncology/Hematology 19: 183-232
- Sangild P.T., Foltmann B., Cranwell P.D. (1991)
Development of gastric proteases in fetal pigs and pigs from birth to thirty six days of age. The effect of adrenocorticotropin (ACTH).
Journal of Developmental Physiology 16: 229-238
- Sangild P.T., Sjöström H., Norén, Fowden A.L., Silver M. (1995)
The prenatal development and glucocorticoid control of brush-border hydrolases in the pig small intestine.
Pediatric Research 37: 207-212
- Sangild P.T., Trahair J.F., Loftager M.K., Fowden A.L. (1999)
Intestinal macromolecule absorption in the fetal pig after infusion of colostrums in utero.
Pediatric Research 45: 595-602
- Sangild P.T., Fowden A.L., Trahair J.F. (2000)
How does the foetal gastrointestinal tract develop in preparation for enteral nutrition after birth?
Livestock Production Science 66: 141-150
- Sangild P.T. (2001)
Transitions in the life of the gut at birth.
In: Digestive Physiology of Pigs – Proceedings of the 8th International Symposium. CAB International, Oxon. Edited by Lindberg J.E., Ogle B.: 3-17
- Sata M., Ahnen D.J. (1992)
Regional variability of colonocyte growth and differentiation in the rat.
The Anatomical Record 233: 409-414

- Savage C.R., Inagami T., Cohen S. (1972)
The primary structure of epidermal growth factor.
The Journal of Biological Chemistry 247: 7612-7621
- Savage C.R., Cohen S. (1973)
Proliferation of corneal epithelium induced by epidermal growth factor.
Experimental Eye Research 15: 361-366
- Schägger H., v. Jagow G. (1987)
Tricine-sodium-dodecyl-sulfate-polyacrylamide-gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.
Analytical Biochemistry 166: 368-379
- Schaudies R.P., Grimes J., Davis D., Rao R.K., Koldovsky O. (1989)
EGF content in the gastrointestinal tract of rats. Effect of age and fasting/feeding.
The American Journal of Physiology 256: 856-861
- Scheving L.A., Shiurba R.A., Nguyen T.D. Gray G.M. (1989)
Epidermal growth factor receptor of the intestinal enterocyte. Localization to laterobasal but not brush border membrane.
The Journal of Biological Chemistry 264: 1735-1741
- Schnorr B. (1996)
Entwicklung der Verdauungsorgane
In: Embryologie der Haustiere. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart. Schnorr B.: 132-153
- Schweiger M., Steffl M., Amselgruber W.M. (2003)
Differential Expression of EGF receptor in the pig duodenum during the transition phase from maternal milk to solid food.
Journal of Gastroenterology 38: 636-642
- Scott J., Urdea M. Quiroga M., Sanchez-Pescodar R., Fong N, Selby M. Rutter W.,J., Bell G.I. (1983)
Structure of a mouse submaxillary messenger RNA encoding epidermal growth factor and seven related proteins.
Science 221: 236-240
- Seiler N. (1990)
Polyamine metabolism.
Digestion 46: 319-330
- Shen W.H., Xu R.J. (1996)
Stability of EGF in the gastrointestinal lumen of suckling and weaned pigs
Life Sciences 59: 197-208
- Shen W.H., Xu R.J. (1998)
Stability and distribution of orally administered epidermal growth factor in neonatal pigs.
Life Science 63: 809-820
- Shen W.H., Xu R.J. (2000)
Gastrointestinal stability and absorption of insulin in suckling pigs.
Comparative Biochemistry and Physiology 125: 389-401
- Shen W.H., Liechty E.A. (2003)
Digestion and absorption
In: The neonatal pig. Nottingham University Press. Xu R.J., Cranwell P.D.:157-184
- Shimamoto C., Takao Y., Hirata I, Yoshimura K., Ohshiba S., Boland C.R. (1993)
The mechanism of the cytoprotective activity of EGF in the stomach using cultured gastric mucus cells.
Gastroenterology 104: 181

- Shoyab M., McDonald V.L., Bradley J.G., Todaro G.J. (1988)
Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 85: 6528-6532
- Silbernagl S., Despopoulos A. (2001)
Hormone, Reproduktion
In: dtv-Atlas Physiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York. Silbernagl S., Despopoulos A.: 266-309
- Simmen F.A., Simmen R.C.M., Reinhart G. (1988)
Maternal and neonatal somatomedin C / IGF-I and IGF binding proteins during early lactation in the pig.
Developmental Biology 130:16-27
- Simmons J.G., Hoyt E.C., Westwick J.K., Brenner D.A., Pucilowska J.B., Lund P.K. (1995)
Insulin-like growth factor-I and EGF interact to regulate growth and gene expression in IEC-6 intestinal epithelial cells.
Molecular Endocrinology 9: 1157-1165
- Simpson R.J., Smith J.A., Moritz R.L., O'Hare M.J., Rudland P.S., Morrision J.R., Lloyd C.T., Grego B., Burgess A.W., Nice E.C. (1985)
Rat epidermal growth factor: complete amino acid sequence.
European Journal of Biochemistry 153: 629-637
- Singh A.B., Harris R.C. (2005)
Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands.
Cellular Signalling 17:1183-1193
- Sinowatz F. (1991)
Verdauungskanal und Anhangsorgane.
In: Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. Parey Buchverlag Berlin. Rüsse I., Sinowatz F.: 338-367
- Sinowatz F. (1995)
Verdauungskanal und Anhangsorgane.
In: Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. Parey Buchverlag, Berlin. Rüsse I., Sinowatz F.: 338-398
- Sinowatz F. (2000)
Die Zelle.
In: Histologie: Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie. Deutscher Ärzte-Verlag. Hees H., Sinowatz F.: 35-93
- Sinowatz F. (2000)
Blut, Knochenmark und lymphatisches System.
In: Histologie: Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie. Deutscher Ärzte-Verlag. Hees H., Sinowatz F.: 35-93
- Skouteris G.G. (1994)
C-myc is essential for initiation of DNA Synthesis in EGF-stimulated hepatocyte cultures.
Cell Biology 88: 109-127
- Skov Olsen P., Kirkegaard P., Poulsen S.S., Nexø E. (1984)
The role of submandibular saliva and EGF in gastric cytoprotection.
Gastroenterology 87: 103-108

- Skrzypek T., Valverde Piedra J.L., Skrzypek H., Wolinski J., Kazimierzak W., Szymanczyk S., Pawlowska M., Zabielski R. (2005)
Light and scanning electron microscopy evaluation of the postnatal small intestinal mucosa development in pigs.
Journal of Physiology and Pharmacology 56: 71-87
- Ślebodziński A. (1994)
Endokrinologie des Neugeborenen
In: *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. Gustav Fischer Verlag, Döcke F.: 594-608
- Smith M.W., Jarvis L.G. (1978)
Growth and cell replacement in the new-born pig intestine.
Proceedings of the Royal Society of London 203: 69-89
- Smith M.W. (1988)
Postnatal development of transport function in the pig intestine.
Comparative Biochemistry and Physiology: 90: 577-582
- Sorkin A. (2001)
Internalization of the EGF receptor: role in signalling.
Biochemical Society Transactions 29: 480-484
- Stern L.E., Erwin C.R., O'Brien D.P., Huang F., Warner B.W. (2000)
EGF is critical for intestinal adaptation following small bowel resection.
Microscopy Research and Technique 51: 138-148
- Stewart F., Power C.A., Lennard S.N., Allen W.R., Amet L., Edwards R.M. (1994)
Identification of the horse EGF coding sequence and its use in monitoring EGF gene expression in the endometrium of the pregnant mare.
Journal of Molecular Endocrinology 12: 341-350
- Strachan L., Murison J.G., Prestidge R.L., Sleemann M.A., Watson J.D., Kumble K.D. (2001)
Cloning and biological activity of epigen, a novel member of the epidermal growth factor superfamily.
The Journal of Biological Chemistry 276: 18265-18271
- Strong J.E., Tang D., Lee P.W.K. (1993)
Evidence that the EGFR on host cells confers reovirus infection efficiency.
Virology 197: 405-411
- Sundell H.W., Gray M.E., Serenius F.S., Escobedo M.B., Stallmann M.T. (1980)
Effects of epidermal growth factor on lung maturation in fetal lambs.
The American Journal of Pathology 100: 707-726
- Tamada H., Higashiyama C., Takano H., Kawate M., Inaba T., Sawada T. (1999)
The effects of heparin-binding EGF-like growth factor on preimplantation-embryo development and implantation.
Life Sciences 64: 1967-1973
- Taylor J.M., Cohen S., Mitchell W.M. (1970)
EGF: high and low molecular weight forms.
Proceedings of the National Academy of Sciences 67: 164-171
- Taylor J. M., Mitchell, William M., Cohen S. (1972)
Epidermal growth factor: physical and chemical properties.
Journal of Biological Chemistry 247: 5928-5934
- Taylor J.M., Mitchell W.M., Cohen S. (1973)
Characterization of the binding protein for EGF.
The Journal of Biological Chemistry 249: 2188-2194

- Thompson D.M., Gill G.N. (1985)
The EGF receptor: structure, regulation and potential role in malignancy.
Cancer Surveys 4: 767-788
- Thompson J.F. (1988)
Specific receptors for EGF in rat intestinal microvillus membranes.
The American Journal of Physiology 254: 429-435
- Thompson J.F., van den Berg M., Stokkers P.C.F. (1994)
Developmental regulation of EGF-R kinase in rat intestine.
Gastroenterology 107: 1278-1287
- Toyoda H., Komurasaki T., Uchida D., Takayama Y., Isobe T., Okuyama T., Hanada K. (1995)
Epiregulin. A novel epidermal growth factor with mitogenic activity for rat primary hepatocytes.
The Journal of Biological Chemistry 270: 7495-7500
- Trahair J.F., Perry R.A., Silver M., Robinson P.M. (1987)
Studies on the maturation of small intestine of the fetal sheep. I. The effects of bilateral adrenalectomy.
Quarterly Journal of Experimental Physiology 72: 61-69
- Trier J.S., Allan CH, Abrahamson D.R., Hagen S.J. (1990)
Epithelial basement membrane of mouse jejunum: evidence for laminin turnover along the entire crypt-villus axis.
The Journal of Clinical Investigation 86: 87-95
- Turkington R. W. (1969)
Role of epithelial growth factor in mammary gland development in vitro.
Experimental Cell Research 57: 79-85
- Tytgat G.N, Rubin C.E, Saunders D.R. (1971)
Synthesis and transport of lipoprotein particles by intestinal absorptive cells in man.
Journal of Clinical Investigation 50: 2065-2078
- Ullrich A., Coussens L., Hayflick J.S., Dull T.J., Gray A., Tam A.W., Lee J., Yarden Y., Libermann T.A. (1984)
Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells.
Nature 309: 418-425
- Ulshen M.H., Lyn-Cook L.E., Raasch R.H. (1986)
Effects of intraluminal epidermal growth factor on mucosal proliferation in the small intestine of adult rats
Gastroenterology 91:1134-1140
- Uribe J.M., Barrett K.E. (1997)
Nonmitogenic actions of growth factors: an integrated view of their role in intestinal physiology and pathophysiology.
Gastroenterology 112: 255-268
- Vaughan T.J., Littlewood C.J., Pascall J.C., Brown K.D. (1992A)
EGF concentrations in pig tissues and body fluids measured using a homologous radioimmunoassay.
Journal of Endocrinology 135: 77-83
- Vaughan T.J., James P.S., Pascall J.C., Brown K.D. (1992B)
Expression of the genes for TGF alpha, EGF and the EGF receptor during early pig development.
Development 116: 663-669

- Veerabagu M.P., Meguid M.M., Oler A., Levine R.A. (1996)
Intravenous nucleosides and a nucleotide promote healing of small bowel ulcers in experimental enterocolitis.
Digestive Disease and Sciences 41:1452-1457
- Vizzotto L., Vartemati M., Marinello E., Leoncini R., Pagani R., Pizzichini M. (1996)
Effect of testosterone on purine metabolism and morphometric parameters in the rat liver.
Molecular and Cellular Endocrinology 119: 123-127
- Vollmerhaus B., Roos H. (1999)
Speiseröhre, Magen, Darm, Darmanhangsdrüsen.
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band II: Eingeweide. Parey Buchverlag, Berlin.
Nickel R., Schummer A., Seiferle E. Herausgeber: Frewein J., Gasse H., Leiser R., Roos H., Thomè H., Vollmerhaus B., Waibl H.: 103-214
- Walker-Smith J.A., Philips A.D., Walford N., Gregory H., Fitzgerald J.D., MacCullagh K., Wright N. A. (1985)
Intravenous epidermal growth factor/urogastrone increases small-intestinal cell proliferation in congenital microvillous atrophy.
Lancet 2: 1239-1240
- Wang T., Xu R.-J. (1996)
Effects of colostrum feeding on intestinal development in newborn pigs.
Biology of the Neonate 70: 339-348
- Watson H., Franks S., Bonney R.C. (1996)
Regulation of EGFR synthesis by ovarian steroids in human endometrial cells in culture.
Journal of Reproduction and Fertility 107: 199-205
- Weaver L.T., Walker W.A. (1988)
EGF and the developing human gut.
Gastroenterology 94: 845-847
- Weaver L.T., Gonnella P.A., Israel E.J., Walker W.A. (1990)
Uptake and transport of epidermal growth factor by the small intestinal epithelium of the fetal rat.
Gastroenterology 98: 828-837
- Werb Z. (1990)
Expression of EGF and TGF- α genes in early mammalian development.
Molecular Reproduction and Development 27: 10-15
- Weström B.R., Carlsson L.C.T. (1976)
Trypsin inhibitors in serum of adult and suckling rats and in rat milk.
International Journal of Biochemistry 7: 41-47
- Weström B.R., Ohlsson B.G., Svendsen J., Tagesson C., Karlsson B.W. (1985)
Intestinal transmission of macromolecules (BSA- and FITC-dextran) in the neonatal pig: enhancing effect of colostrum, proteins and proteinase inhibitors.
Biology of the Neonate 47: 359-366
- Weström B.R., Ekman R., Svendsen L., Svendsen J., Karlsson B.W. (1987)
Levels of immunoreactive insulin, neurotensin, and bombesin in porcine colostrum and milk.
Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 6: 460-465
- Whitman M., Melton D.A. (1989)
Growth factors in early embryogenesis.
Annual Reviews Cell Biology 5: 93-117

- Widdowson E.M., Colombo V.E., Artavanis C.A. (1976)
Changes in the organs of pigs in response to feeding for the first 24 hours after birth.
Biology of the Neonate 28: 272-281
- Wittmann J. (2005)
Wachstum.
In: *Physiologie der Haustiere*. Enke Verlag, Stuttgart. V. Engelhardt W., Breves G.: 574-579
- Wollenhaupt K., Tiemann U., Einspanier R., Schneider F., Kanitz W., Brüssow K.-P. (1997)
Characterization of the EGFR in pig oviduct and endometrium.
Journal of Reproduction and Fertility 111: 173-181
- Wood S.A., Kaye P.L. (1989)
Effects of EGF on preimplantation mouse embryos.
Journal of Reproduction and Fertility 85: 575-582
- Wooding F.B.P., Smith M.W., Craig H. (1978)
The ultrastructure of the neonatal pig colon.
The American Journal of Anatomy 152: 269-286
- Wright N.A., Pike C., Elia G. (1990)
Induction of a novel epidermal growth factor-secreting cell lineage by mucosal ulceration in human gastrointestinal stem cells.
Nature 343: 82-85
- Xu R.J., Mellor D.J., Tungthanathanich P., Birtles M.J., Reynolds G.W., Simpson H.V. (1992)
Growth and morphological changes in the small and the large intestine in piglets during the first three days after birth.
Journal of Developmental Physiology 18:161-172
- Xu R.J. (1996)
Development of the newborn GI tract and its relation to colostrum/milk intake: a review.
Reproduction, Fertility and Development 8: 35-48
- Xu R.J., Mao Y.L., Tso M.Y.W. (1996)
Stability of gastrin in the gastrointestinal lumen of suckling, weanling and adult pigs.
Biology of the Neonate 70: 60-68
- Xu R.J., Doan Q.C., Register G.O. (1999)
Detection and characterisation of TGF- β in porcine colostrum.
Biology of the Neonate 75: 59-65
- Xu R.J., Sangild P.T., Zhang Y.Q., Zhang S.H. (2002)
Bioactive compounds in porcine colostrums and milk and their effects on intestinal development in neonatal pigs.
In: *Biology of the Intestine In Growing Animals*. Elsevier, Amsterdam. Zabielski R., Gregory P.C., Weström B.: 169-192
- Xu R.J. (2003)
Composition of porcine milk.
In: *The neonatal pig*. Nottingham University Press. Xu R.J., Cranwell P.D.: 213-246
- Yarden Y., Sliwkowski M.X. (2001)
Untangling the ErbB signalling network.
Nature Reviews Molecular Cell Biology 2(2): 127-137

- Yates R.A., Nanney L.B., Gates R.E., King L.E. (1991)
Epidermal growth factor and related growth factors.
International Journal of Dermatology 30: 687-694
- Yoshida S., Kasuga S. Hirao Y., Fuwa T., Nakagawa S. (1987)
Effect of biosynthetic human epidermal growth factor on the synthesis and secretion of mucin glycoprotein from primary culture of rabbit fundal mucosal cells.
In vitro Cellular & Developmental Biology: Journal of the Tissue Culture Association 23: 460-464
- Yoshikawa I. (1993)
Effects of epidermal growth factor on alkaline secretion and mucus formation in rat duodenum exposed to luminal acid.
Gastroenterologia Japonica 28: 496-504
- Zapf J., Walter H., Froesch E.R. (1981)
Radioimmunological determination of IGF-I and II in normal subjects and in patients with growth disorders and extrapancreatic tumor hypohlycemia.
The Journal of Clinical Investigation 68: 1321-1330
- Zijlstra R.T., Odle J., Hall W.F., Petschow B.W., Gelberg H.B., Litov R.E. (1994)
Effect of orally administered EGF on intestinal recovery of neonatal pigs infected with rotavirus.
Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 19: 382-390
- Zumkeller W. (1992)
Relationship between insulin-like growth factor-I and – II and IGF-binding proteins in milk and the gastrointestinal tract: growth and development of the gut.
Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 15: 357-369

Danksagung

Ein großes Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. Dr. Rolf Claus für die Überlassung des Themas und seine Betreuung durch wissenschaftliche Anregungen und Ratschläge. Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Stangassinger für die Annahme der Arbeit an der Ludwig Maximilians Universität München bedanken.

Vielen Dank an Helga Hägele für die Einarbeitung in histologische Techniken und die immunocytochemische Färbung. Ein ebenso großer Dank geht an Carmen Ostertag, für die Einarbeitung im Molekularlabor, sowie an Herrn Dr. H. Welter für die Hilfestellungen bei der Auswertung der molekularbiologischen Labormethoden.

Weiterhin möchte ich mich bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Ein weiteres Dankeschön geht an meine Zimmergenossinnen Silke Rottner, Anna Wagner und Nina Bernklau für die wissenschaftlichen und weit darüber hinaus reichenden Gespräche.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann für seine Hilfe bei Computerfragen sowie für die weitere Unterstützung und Geduld. Vielen Dank auch an meine Eltern und Großeltern für ihre Unterstützung außerhalb des Instituts.