

**Charakterisierung von enterischen neuronalen  
Vorläuferzellen *in vitro* und im *in vivo*-Mausmodell  
sowie Etablierung eines immundefizienten  
Morbus Hirschsprung-Mausmodells**

**Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Heike Monika Dettmann  
aus Stuttgart-Bad Cannstatt

Tübingen  
2014

Tag der mündlichen Qualifikation:

14.07.2014

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dominik Hartl

2. Berichterstatter:

PD Dr. Lothar Just

## **I - Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:**

[Abstract] Dettmann H, Fuchs J, Just L, Obermayr F. *Implantation of enteric nervous progenitors in the mouse model*. Tissue Engineering Part A, Feb 2011, 17(3-4):549-550

[Abstract] Dettmann H, Rottenberger J, Zhang Y, Just L, Obermayr F. *Murine and human postnatal ENS progenitor cells integrate into murine bowel in vivo*. Regen Med 2011; 6(6suppl.2), p.347

[Full Paper] Dettmann HM, Zhang Y, Wronna N, Kraushaar U, Guenther E, Mohr R, Neckel PH, Mack A, Fuchs J, Just L, Obermayr F. 2013. *Isolation, expansion and transplantation of postnatal murine progenitor cells of the enteric nervous system*. PlosOne, publiziert am 28.05.2014, DOI: 10.1371/journal.pone.0097792

## **II - Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits auf Tagungen vorgestellt:**

[Posterpräsentation] Dettmann H, Rottenberger J, Zhang Y, Just L, Obermayr F (2011). *Murine and human postnatal ENS progenitor cells integrate into murine bowel in vivo*, World conference on regenerative Medicine, Leipzig (Abstract siehe oben).

[Posterpräsentation] Dettmann H, Fuchs J, Just L, Obermayr F. (2010) *Implantation of enteric nervous system progenitors in the mouse model*, 4th Congress on Regenerative Biology and Medicine, BioStar, Stuttgart (Abstract siehe oben).



Gutta cavat lapidem non vi sed saepe cadendo.

-

Der stete Tropfen höhlt den Stein.

*(Ovid, epistulae ex Ponto 4, 10 5)*



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Das enterische Nervensystem (ENS) .....	1
1.2. Aufbau und Lage .....	1
1.2.1. Motorische Steuerung des ENS .....	3
1.2.2. Neuronentypen im ENS .....	4
1.2.3. Herkunft und Entwicklung des ENS .....	6
1.2.4. Gene, Transkriptionsfaktoren und Signalwege der ENS-Entwicklung .....	9
1.3. Stamm- und Progenitorzellen zur Behandlung enterischer Erkrankungen .....	12
1.3.1. Pluripotente Stammzellen .....	12
1.3.2. Multipotente Stammzellen und Progenitorzellen .....	13
1.4. Erkrankungen und Entwicklungsstörungen des enterischen Nervensystems .....	15
1.4.1. Gastrointestinale Erkrankungen im Kindesalter .....	15
1.4.2. Gastrointestinale Erkrankungen im Erwachsenenalter .....	19
1.5. Ziel der Arbeit .....	21
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
2.1. Geräte und Hilfsmittel .....	23
2.2. Computerprogramme .....	24
2.3. Verbrauchsmaterial .....	25
2.4. Patientenmaterial und Versuchstiere .....	26
2.4.1. Patientenmaterial .....	26
2.4.2. Versuchstiere .....	26
2.5. Lösungen, Medien und Puffer .....	28
2.5.1. Zellkultur .....	28
2.5.3. Immunhistologie .....	30
2.5.3. Polymerase-Kettenreaktion .....	31
2.6. Zellkultur und zellbiologische Methoden .....	32
2.6.1. Isolation und Kultivierung muriner enterischer Progenitorzellen .....	32
2.6.2. Isolation und Kultivierung humaner enterischer Progenitorzellen .....	33
2.6.3. Bestimmung der Zellzahl .....	34

2.7. Tierexperimentelle Methoden .....	35
2.7.1. Implantationsprozedere .....	35
2.7.2. Kreuzung C57Bl/6SOX10LacZ x NOD.Cg-Prkdc <sup>scid</sup> Il2rg <sup>tm1Wjl</sup> /SzJ.....	35
2.8. Molekularexperimentelle Methoden .....	37
2.8.1. DNA-Extraktion .....	37
2.8.2. Polymerase-Kettenreaktion .....	37
2.9. Histologische Methoden .....	40
2.9.1. Fixierung, Cryoprotektion und Einbettung .....	40
2.9.2. Herstellung von Gewebeschnitten .....	41
2.9.3. Immunhistochemie .....	42
2.10. Auswertung und Statistik .....	45
2.10.1. Quantifizierung neuronaler und glialer Zellen in Enterosphären .....	45
2.10.2. Quantifizierung neuronaler und glialer Zellen ( <i>in vitro</i> ) .....	45
2.10.3. Quantifizierung neuronaler und glialer Zellen nach Transplantation.....	46
2.10.4. Auswertung des BrdU-Inkorporationsversuchs ( <i>in vitro</i> ).....	46
2.10.5. Auswertung des BrdU-Inkorporationsversuchs nach Implantation .....	47
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
3.1. Isolation, Proliferation und Differenzierung enterischer Progenitorzellen .....	49
3.1.1. Präparation und Proliferation muriner enterischer ENS-Zellen.....	49
3.1.2. Differenzierung <i>in vitro</i> proliferierter enterischer Progenitorzellen .....	50
3.1.3. Zusammensetzung der Zellkultur nach der Differenzierung .....	51
3.1.4. Prozentuale Verteilung der Zelltypen nach der Differenzierung .....	54
3.1.5. Vergleich reifer Neurone in Sphäroiden und nach Differenzierung.....	54
3.1.6. Proliferationsnachweis durch BrdU-Inkorporation ( <i>in vitro</i> ).....	57
3.2. Implantation der ENS-Progenitorzellen in ein immundefizientes Mausmodell	60
3.2.1. Charakterisierung <i>in vitro</i> proliferierter ENS-Progenitorzellen nach Implantation <i>in vivo</i> .....	60
3.2.2. Proportionale Verteilung der Zelltypen nach Implantation .....	63
3.2.3. BrdU-Nachweis nach Implantation in den Maudarm .....	64
3.2.4. Implantation humaner adulter ENS-Progenitoren in ein immundefizientes Mausmodell .....	70
3.3. Generierung eines immundefizienten Morbus Hirschsprung-Mausmodells .....	74
3.3.1. Genotypische Verteilung der ersten drei Generationen.....	74



3.3.2. Makroskopische Unterschiede zwischen SOX 10 homozygoten und heterozygoten Nachkommen .....	76
3.3.3. Zelluläre Unterschiede zwischen SOX 10 homozygoten und heterozygoten Mäusen .....	79
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>83</b>
4.1. Isolation, Proliferation und Differenzierung enterischer Progenitorzellen .....	83
4.2. Implantation der ENS-Progenitoren in ein immunsupprimiertes Mausmodell .....	91
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>99</b>
<b>6. Referenzen .....</b>	<b>101</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>119</b>
7.1. Danksagungen .....	119
7.2. Lebenslauf .....	121



## Abkürzungsverzeichnis

<b>%</b>	Prozent
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>μ</b>	Mikro
<b>A2P</b>	Ascorbat-2-Phosphat
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AC</b>	aufsteigender Colon
<b>ACh</b>	Acetylcholin
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>b</b>	wildfarben, braun
<b>B27</b>	serumfreies Ergänzungspräparat für Medien neuronaler Zellen
<b>bFGF</b>	engl. basic fibroblast growth factor, basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
<b>bidest</b>	zweifach destilliert
<b>BMP</b>	engl. bone morphogenetic protein, knochenmorphogenetisches Protein
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BrdU</b>	Bromdesoxyuridin
<b>BSA</b>	engl. bovine serum albumine, Albumin aus Rinderserum
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>ca.</b>	circa
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcium
<b>Ce</b>	Caecum
<b>CIPO</b>	chronische intestinale Pseudoobstruktion
<b>cm</b>	Zentimeter
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>D</b>	Dünndarm
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<b>DCC</b>	engl. deleted in colorectal cancer, gelöscht in kolorektalem Krebs
<b>dest.</b>	destilliert
<b>d. h.</b>	das heißt
<b>DMEM/F-12</b>	Kulturmedium; dulbecco's modified eagle nutrient mixture F-12
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	engl. deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
<b>DNase</b>	Desoxyribonuklease
<b>dNTP</b>	Deoxynucleosid Triphosphat
<b>dPBS</b>	Phosphatpuffer, Dulbecco's PBS
<b>E 9</b>	embryonaler Tag 9
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EGF</b>	engl. epidermal growth factor, epidermaler Wachstumsfaktor
<b>eGFP</b>	enhanced green fluorescent protein
<b>ENCC</b>	engl. enteric neural crest cells, enterische Neuralleistenzellen

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Endkonz.</b>	Endkonzentration
<b>engl.</b>	aus dem Englischen
<b>ENS</b>	Enterisches Nervensystem, Darmnervensystem
<b>ESZ</b>	embryonale Stammzellen
<b>et al.</b>	et alii, aus dem Lateinischen „und andere“
<b>ETN-3</b>	Endothelin 3
<b>EDNRB</b>	Endothelinrezeptor B
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>F1</b>	1. Generation der Nachkommen
<b>FCS</b>	fetales Kälberserum
<b>g</b>	Gramm
<b>G</b>	Magen
<b>GDNF</b>	engl. glial cell line-derived neurotrophic factor, aus Gliazellen stammender neurotrophischer Faktor
<b>GFAP</b>	gliales fibrilläres azidisches Protein
<b>GFP</b>	grün fluoreszierendes Protein
<b>GFR<math>\alpha</math></b>	GDNF Familienrezeptor $\alpha$
<b>h</b>	Stunde
<b>H</b>	Leber
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>HBSS</b>	engl. hanks buffered salt solution, Hank's gepufferte Salzlösung
<b>HCl</b>	Salzsäure
<b>hetero</b>	heterozygot
<b>HSCR</b>	Morbus Hirschsprung
<b>Hu C/D</b>	Humanes neuronales Protein C und D
<b>Hum Nuc</b>	Human Nuclei, humaner Zellkern
<b>IHPS</b>	infantile hypertrophe Pylorusstenose
<b>IL</b>	Ileum
<b>IL2</b>	Interleukin 2
<b>IND</b>	intestinale neuronale Dysplasie
<b>in vitro</b>	aus dem Lateinischen „im Glas“; organische Vorgänge außerhalb des Organismus
<b>in vivo</b>	aus dem Lateinischen „im Lebendigen“; organische Vorgänge innerhalb des Organismus
<b>IPAN</b>	intrinsischer primärer afferenter Neuron
<b>iPS</b>	induzierte pluripotente Stammzellen
<b>KCl</b>	Kaliumchlorid
<b>Klf-4</b>	engl. Kruppel-like factor 4, Kruppel ähnlicher Faktor 4
<b>L</b>	Liter
<b>LacZ</b>	Gen, das für das Enzym $\beta$ -Galactosidase codiert
<b>M</b>	Molar
<b>MEN2B</b>	multiple endokrine Neoplasie 2b

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Mg<sup>2+</sup></b>	Magnesium
<b>MMC</b>	engl. migrating motor complex, wandernder myoelektrischer Komplex
<b>min</b>	Minute
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mut</b>	mutant
<b>n</b>	Anzahl der Versuche
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NADPH</b>	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
<b>NF1</b>	Neurofibromatose
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>NLZ</b>	Neuralleistenzellen
<b>nNOS</b>	humane neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>NSG</b>	Immundefizienter Mausstamm, NOD.Cg-Prkdc <sup>scid</sup> Il2rg <sup>tm1Wjl</sup> /SzJ
<b>O<sub>2</sub></b>	Sauerstoff
<b>Oct-4</b>	engl. octamer binding transcription factor 4, Oktamer bindender Transkriptionsfaktor 4
<b>P</b>	Elterngeneration
<b>P0</b>	Postnataler Tag 0, erster Lebenstag
<b>p75</b>	engl. neurotrophin receptor p75, Neurotrophin Rezeptor p75
<b>p.a.</b>	lat. <i>Pro Analysis</i> , zur Analyse geeignet
<b>PBS</b>	engl. phosphate buffered saline, Phosphatpuffer, Phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>PD</b>	Morbus Parkinson
<b>Pen/Strep</b>	Penicillin-Streptomycin-Mixtur
<b>PGP9.5</b>	humanes Protein Gen Produkt 9.5
<b>Ph2</b>	Phasenkontrast II
<b>R</b>	Rektum
<b>Raf</b>	engl. rapidly growing fibrosarcoma proteinkinase, Seronin-/Threoninkinase
<b>Ras</b>	GTPase, monomeres GTP-bindendes Protein
<b>RET</b>	Rezeptor Tyrosinkinase
<b>rpm</b>	engl. rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>scid</b>	engl. severe combined immunodeficiency, schwerer kombinierter Immundefekt
<b>Shh</b>	Sonic hedgehog, Protein
<b>Si</b>	Sigmoid
<b>Sox 2</b>	engl. sex determining region Y high mobility group-box 2, geschlechtsbestimmender Region Y-Box 2, Transkriptionsfaktor
<b>SOX10</b>	engl. Sex determining region Y high mobility group-box 10, geschlechtsbestimmender Region Y-Box 10, Transkriptionsfaktor
<b>T3</b>	3,3',5'-Triiodo-L-Thyronin

## Abkürzungsverzeichnis

---

<b>TAE</b>	Tris-Acetate-EDTA-Puffer
<b>TBS</b>	Tris-Puffer
<b>TC</b>	Colon transversum
<b>TrkC</b>	Tyrosinkinase C
<b>TUJ1</b>	Neuronen-spezifisches Klasse III $\beta$ -Tubulin
<b>TUNEL</b>	engl. terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling, terminale desoxynukleotidyl Transverase vermittelte dUTP-Biotin Bruchendenmarkierung
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>U.S.A.</b>	Vereinigte Staaten von Amerika
<b>VIP</b>	vasoaktives intestinales Peptid
<b>w</b>	weiß
<b>Well</b>	Vertiefung
<b>wt</b>	wildtyp
<b>x</b>	mal
<b>x g</b>	Beschleunigungskraft
<b>ZNS</b>	zentrales Nervensystem

---

# 1. Einleitung

## 1.1. Das enterische Nervensystem (ENS)

Das ENS ist Teil des peripheren Nervensystems (PNS). Es agiert dabei weitgehend unabhängig vom zentralen Nervensystem [1]. Die Kontrolle der gastrointestinalen Funktion ist in die Interaktionen zwischen enterischen Reflexen und Reflexböden zwischen Darm, PNS und ZNS integriert [2] und beinhaltet in etwa die gleiche Anzahl an Neuronen wie das Rückenmark ( $\sim 10^8$  im Menschen). In Bezug auf die Vielfalt der Neurotransmitter-Expression ähnelt es dem zentralen Nervensystem [3].

Das ENS koordiniert selbstständig den Status des Darmlumens, den Dehnungszustand des Darms und veranlasst entsprechende Maßnahmen durch Aktivierung intrinsischer Reflexe [4]. Diese wiederum generieren vorwärtstreibende, segmentierende und mischende peristaltische Bewegungen. Ebenso reguliert das ENS je nach Bedarf den Blutfluss [5], die Sekretion von Wasser und Elektrolyten [6]. Voraussetzung für eine intakte ENS-Funktion ist die koordinierte Aktivität der Neurone der Ganglien, wozu diese mit zahlreichen anderen Zelltypen des Darms interagieren müssen [7].

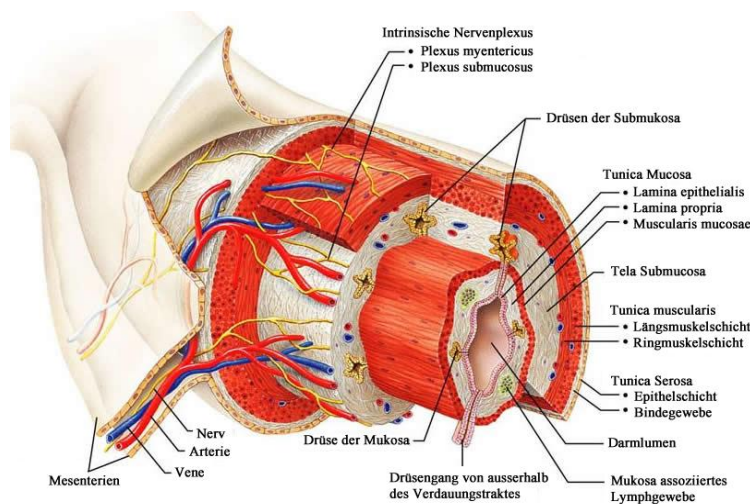
## 1.2. Aufbau und Lage

Innerhalb des Gastrointestinaltraktes ist der allgemeine Wandaufbau ähnlich und weist vier Hauptschichten auf (Tab. 1, Abb.1), in die das enterische Nervensystem (ENS) eingebettet ist. Das ENS ist vom Ösophagus bis hin zum Rektum zu finden [8]. Die enterischen Ganglien sind so verknüpft, dass sie zwei Plexus formen und zahlreiche neuronale Subtypen enthalten [8]. Dies ist zum einen der äußere Plexus myentericus (Auerbach Plexus), zum anderen der innere Plexus submucosus (Meissner Plexus) (Abb. 1) [8]. Dies gilt hauptsächlich für die gastrointestinalen Abschnitte unterhalb des Magens, denn im Ösophagus fehlt der Plexus submucosus bis auf einzelne Nervenzellen und im Magen sind nur selten vereinzelte submuköse Fasern zu beobachten [8].

Der **myenterische Plexus** ist zwischen der Ring- und Längsmuskelschicht der Tunica muscularis gelegen und ist in verschiedenen Spezies sowie in allen Regionen des Gastrointestinaltraktes vom Ösophagus bis hin zum Anus beschrieben [9].

**Tabelle 1: Allgemeiner Wandaufbau des Säugerdarmes (lumenseitig beginnend).**  
 Adaptiert aus Anatomie, Duale Reihe, Aumüller et al., Thieme, 2007.

Hauptschicht	Unterschicht (von innen nach außen)
<b>Tunica Mucosa</b> (Schleimhaut, Mukosa)	<b>Lamina epithelialis</b> (Oberflächenepithel)
	<b>Lamina propria</b> (Schleimhautbindegewebe)
	<b>Lamina muscularis mucosae</b> (Muskelschicht der Schleimhaut)
<b>Tela submucosa</b> (submuköse Bindegewebsschicht, Submukosa)	
<b>Tunica muscularis</b> (Muskelhaut, Muskularis); Im Magen teilweise dreischichtig.	<b>Fibrae obliquae</b> (nur im Magen)
	<b>Stratum circulare</b> (Ringmuskelschicht)
	<b>Stratum longitudinale</b> (Längsmuskelschicht);
<b>Tunica adventitia</b> (Adventitia, Bindegewebsschicht, extraperitoneal) bzw. <b>Tunica Serosa</b> (Serosa; intraperitoneal) mit Epithelschicht und Serosabindegewebe	



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus der Wandschichten im Säugerdarm** (verändert nach <http://classes.midlandstech.com/carterp/Courses/bio211/chap23/Slide7.JPG>)

Der myenterische Plexus besitzt größere Ganglien mit dickeren Verbindungssträngen als der submuköse Plexus [10]. Weiter kann der myenterische Plexus strukturell in drei Teile unterteilt werden. Er beinhaltet große primäre Nervenstränge (primärer Plexus) in oro-analer Richtung [9]. Der primäre Plexus ist der Markanteste und besteht aus großen Ganglien und interganglionären Strängen [10]. Aus feineren Nervensträngen hingegen wird der sekundäre Plexus gebildet. Diese Stränge zweigen aus den verbindenden Strängen des primären Plexus ab oder entspringen aus den Ganglien selbst [10]. Dabei orientieren sich diese feinen Stränge parallel zu den Muskelzellen der Ringmuskelschicht [10]. Der tertiäre Plexus besteht aus feinen Nervenbündeln des primären und sekundären Plexus, welche in die Zwischenräume der zwei Netzwerke hineinragen [10]. Die Fasern des tertiären Plexus innervieren



den Längsmuskel, die des primären und sekundären hingegen den Ringmuskel [10]. Jedoch ragen myenterische Fasern auch in die Mukosa und Submukosa. Dies ist insbesondere im Magen der Fall [10, 11], da dort submuköse Fasern selten sind oder fehlen [10].

Innerhalb der Submukosa ist der **submuköse Plexus** gelegen. Dieser lässt sich je nach Spezies in einen oder mehrere Unterplexus unterteilen. Kleine Nager wie Ratte, Maus oder Meerschweinchen zeigen einen einzelnen, einschichtigen submukösen Plexus, wobei große Spezies wie Pferd, Schwein oder Mensch zwei oder sogar drei submuköse Unterplexus unterscheiden lassen [9]. Dies ist zum einen der Plexus submucosus externus und zum anderen der Plexus submucosus internus, der näher am Lumen gelegen ist [10]. Der Plexus submucosus externus innerviert sowohl die Ring- als auch die Längsmuskelschicht der Muskelschicht [10]. Allerdings stellt er auch einen Teil der Mukosainnervation bereit [10]. Der Plexus submucosus internus hingegen innerviert hauptsächlich die Mukosa [10]. Der Plexus submucosus steuert damit die Sekretion der Drüsen, den Blutfluss und das Immunsystem [10].

### 1.2.1. Motorische Steuerung des ENS

Bewegungen des **Ösophagus** und damit der kontraktile Elemente aus quer gestreifter Muskulatur sind größtenteils unter Kontrolle des Hirnstamms (Medulla oblongata) [2]. Der in der Medulla oblongata liegende Nucleus ambiguus enthält die Zellkörper von Motorneuronen, deren motorische Endplatten direkt die quer gestreiften Muskelzellen des oberen Ösophagusdrittels innervieren [12]. Die glatte Muskulatur des unteren Ösophagus wird von den Nervenfasern der Neuronen, deren Zellkörper sich innerhalb von enterischen Ganglien befinden, innerviert. Jedoch sind diese enterischen Ganglien wiederum direkt durch Neurone des dorsalen Motornucleus des Vagusnervs innerviert [2, 13]. Die Kontrolle des unteren ösophagalen Sphinkters hat eine prädominante vagovagale Komponente [2]. Dies bedeutet, dass durch Nahrung im unteren Ösophagus der Vagusnerv aktiviert wird und es zur kurzzeitigen Erweiterung des Sphinkters kommt. Dieser Sphinkter sorgt vor allem für die Minimierung des Refluxes aus dem Magen in die Speiseröhre, aber auch dafür, dass die Nahrung in den Magen entlassen wird [2]. Die durch Schlucken ausgelöste reflexartige Relaxation des Sphinkters kann durch Blockade des Vagusnervs aufgehoben werden [14].

Die rhythmischen Wellen der **Magenperistaltik**, die zur Vermischung und Propulsion des Mageninhalts führen, sind zwar primär myogener Herkunft, doch liegt die

Überwachung des Magenstatus vornehmlich unter Kontrolle des Vagusnerven [2]. Diese beinhaltet die Beurteilung des Magenvolumens, die Stärke der Kontraktionen sowie die Säuresekretion in das Magenlumen [2].

Im Gegensatz hierzu ist die propulsive Aktivität im Dünndarm und Kolon durch enterische Reflexe gesteuert. Hierbei kann der **Dünndarm** verschiedene Bewegungsmuster zeigen. Zum einen die schnelle orthograde Propulsion der Darminhalte (Peristaltik) sowie Misch- und Zerkleinerungsbewegungen (Segmentation) und langsame orthograde Propulsion (wandernder myoelektrischer Komplex). Aber genauso kann eine Retropulsion, also eine Austreibung schädlicher Substanzen, gesteuert werden [2]. Dem Darmstatus entsprechend müssen diese Bewegungsmuster angeglichen werden. Dazu muss eine Beurteilung des Darmstatus stattfinden und angemessene motorische Signale generiert werden. Hierbei sind unter anderem intrinsische primäre afferente Neurone beteiligt (IPANs) sowie Interneurone und exzitatorische und inhibitorische Motorneurone [2].

Im **Dickdarm** wird die Propulsion des Darminhalts ebenso durch das ENS gesteuert [2]. Allerdings steht der propulsive Reflex im distalen Kolon und Rektum unter zentralnervöser Kontrolle, welche die fäkale Kontinenz erhält [2]. Wenn nötig, werden zentralnervöse Signale zur Defäkation über das Defäkationszentrum im lumbosakralen Rückenmark zum ENS des Kolons und Rektums weitergeleitet [15, 16]. Kommt es aber zu Verletzungen der kortikospinalen Verbindungen im Rückenmark führt dies zum Verlust der willentlichen Kontrolle der Defäkation [16].

### 1.2.2. Neuronentypen im ENS

Erstmals charakterisierte Dogiel (1899) die enterischen Neurone verschiedener Säugetier-Spezies anhand ihrer Morphologie. Dabei beschrieb er drei Neuronentypen in beiden Plexus [17]. Die von fortan als Dogiel Typ I benannten Neuronen besitzen einen runden bis ovalen mittigen Zellkörper und ein einzelnes Axon. Ebenso findet man bei ihnen 4-20 kurze, lamellenartige Zellfortsätze [17]. Typ II Neurone haben 3-10 glatte, Axon ähnliche Fortsätze und einen großen runden Zellkörper [18]. Typ III Neurone haben 2-10 verzweigte Dendriten [19].

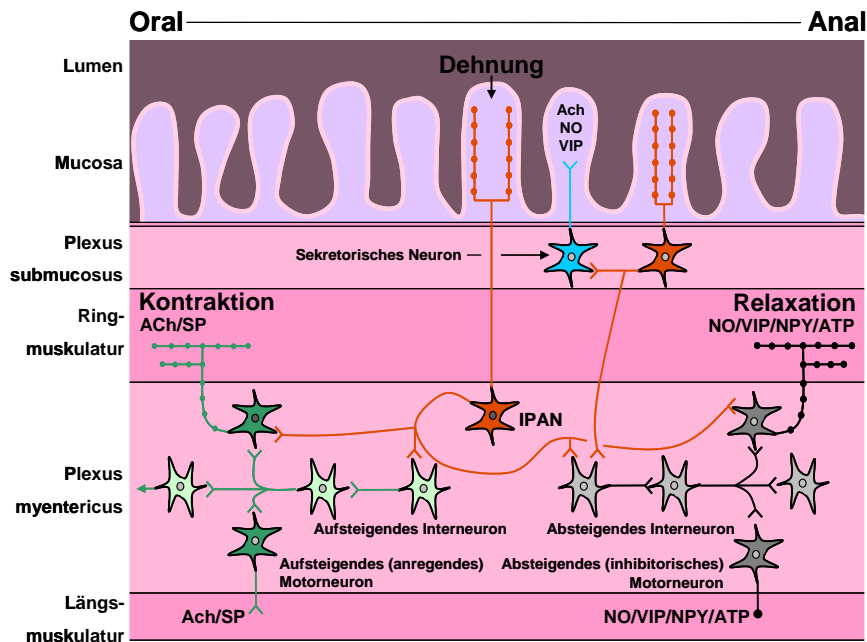
Durch elektrophysiologische Untersuchungen wurden zwei Haupttypen identifiziert. Zum einen S- (synaptische) und zum anderen AH- (engl. after hyperpolarization) Neurone [20]. S-Neurone zeigen schnelle postsynaptische Potenziale nach Stimulation [20] und entsprechen meist Dogiel Typ I und III. AH-Neurone hingegen entsprechen dem Dogiel Typ II [20]. Diese Neuronentypen können durch kombinierte

Betrachtung von Projektionszielen, Neurotransmittern, Morphologie und Elektrophysiologie weiter funktionell unterteilt werden. Eine dieser identifizierten Zellgruppen sind die intrinsischen primären afferenten Neurone (IPANs) (Abb.2). Diese weisen weiter Dogiel Typ II Morphologie auf und entsprechen elektrophysiologisch den AH-Neuronen [21]. Submuköse IPANs reagieren auf muköse Stimulation [22], myenterische IPANs dagegen lassen sich durch auf die Mukosa applizierte Chemikalien wie z. B. Aminosäuren aktivieren [23]. Jedoch lässt sich ein Teil von ihnen auch durch Dehnung des Darmes, z. B. durch Nahrung, stimulieren [24].

Im ENS findet man sowohl inhibitorische als auch stimulierende Motorneurone im Längs- und Ringmuskel (Abb. 2) [25, 26]. Alle Muskelmotorneurone entsprechen dem S-Typ [27] und vermitteln den peristaltischen Reflex. Dieser beinhaltet einen aufsteigenden erregenden und einen absteigenden inhibitorischen Reflex [26]. Ersterer wird durch anregende Motorneurone vermittelt, deren primäre Transmitter z.B. Acetylcholin (ACh) und Substanz P (SP) [25, 26] sind. Dadurch kommt es zur Kontraktion der glatten Ring- und Längsmuskulatur, welche sich im Darmabschnitt vor der stimulierten Stelle befindet [26]. Genau gegenteilig führt die Ausschüttung von Transmittern inhibitorischer Motorneurone (z. B. Stickoxid (NO), vasoaktives intestinales Peptid (VIP), Neuropeptid Y (NPY) und Adenosintriphosphat (ATP)) [25, 26] zur Relaxation der Ring- und Längsmuskulatur im nachfolgenden Darmabschnitt (absteigender inhibitorischer Reflex) [26].

Eine genauere Zuordnung der Neurotransmitter zu den entsprechenden Neuronensubtypen sind in [25] zusammengefasst.

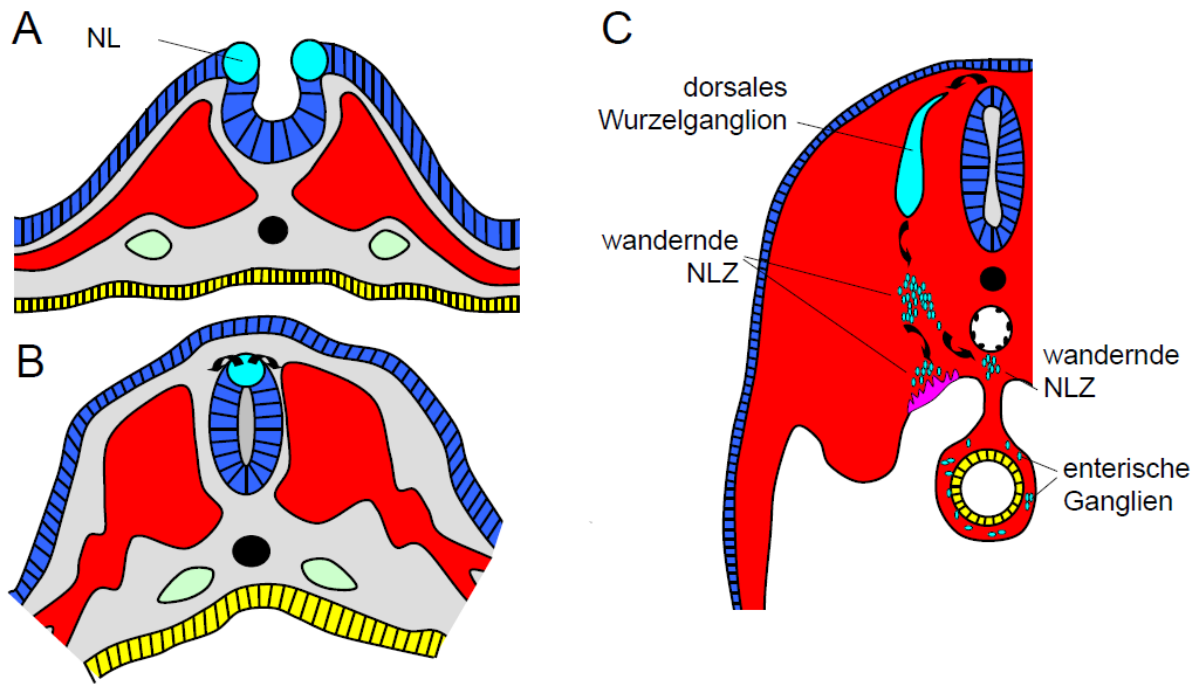
Der peristaltische Reflex wird durch die Aktivität von cholinergen Interneuronen, die sich sowohl im myenterischen als auch im submukösen Plexus befinden, koordiniert [26]. Sie empfangen Signale von IPANs und schicken diese entweder zu erregenden oder inhibitorischen Motorneuronen (Abb. 6) [26]. Sekretomotorische und gefäßerweiternde Reflexe werden durch Neurone des submukösen Plexus vermittelt, die ACh, VIP oder NO freisetzen (Abb. 6) [26].



**Abbildung 2: Repräsentative schematische Darstellung der am enterischen Reflex beteiligten neuronalen Verbindungen im ENS.** Der enterische Reflex wird z. B. durch lokale Dehnung der Darmwand, Verformung der Mukosa und chemische Inhalte im Lumen ausgelöst. Dies führt zur Aktivierung intrinsischer Neurone (IPANs) im submukösen und im myenterischen Plexus. Sie haben synaptische Verbindungen mit Interneuronen, Motorneuronen und anderen sensorischen Neuronen innerhalb des ENS. Die Aktivierung von aufsteigenden anregenden Motorneuronen durch IPANs oder Interneurone führt zur Kontraktion im vorangehenden Darmabschnitt, Aktivierung von absteigenden inhibitorischen Motorneuronen, führt zur Relaxation des nachfolgenden Darmabschnitts. Sekretomotorische und gefäßerweiternde Reflexe werden durch Neurone des Plexus submucosus vermittelt. Abbildung und Text repliziert und modifiziert nach [26].

### 1.2.3. Herkunft und Entwicklung des ENS

Gliazellen und Neurone des enterischen Nervensystems entstammen der Neuralleiste [28]. Die Neuralleistenzellen (NLZ) sind erstmals während der Neurulation zu beobachten (Abb. 3 A). Dabei befinden sie sich vorübergehend direkt zwischen dem Rand der Neuralplatte und dem nicht neuronalen Ektoderm (Abb. 3B). Sie sind zur Wanderung befähigt. Erst während der Besiedelung des Darms kann man zwischen neuronalem oder glialem Phänotyp unterscheiden (Abb. 3C) [29]. Der größte Anteil des ENS stammt von vagalen Neuralleistenzellen (Somiten 1-7) [30]. Vagale NLZ verlassen das dorsale Neuralrohr in der Maus am embryonalen Tag (E) 8,5 und erreichen den primitiven Vorderdarm (später Ösophagus, Magen und Duodenum) um den Tag E 9,5 [31, 32]. Ab diesem Zeitpunkt werden sie enterische Neuralleistenzellen (engl. enteric neural crest cells, ENCCs) genannt und sind direkte Vorläufer des enterischen Nervensystems [32].

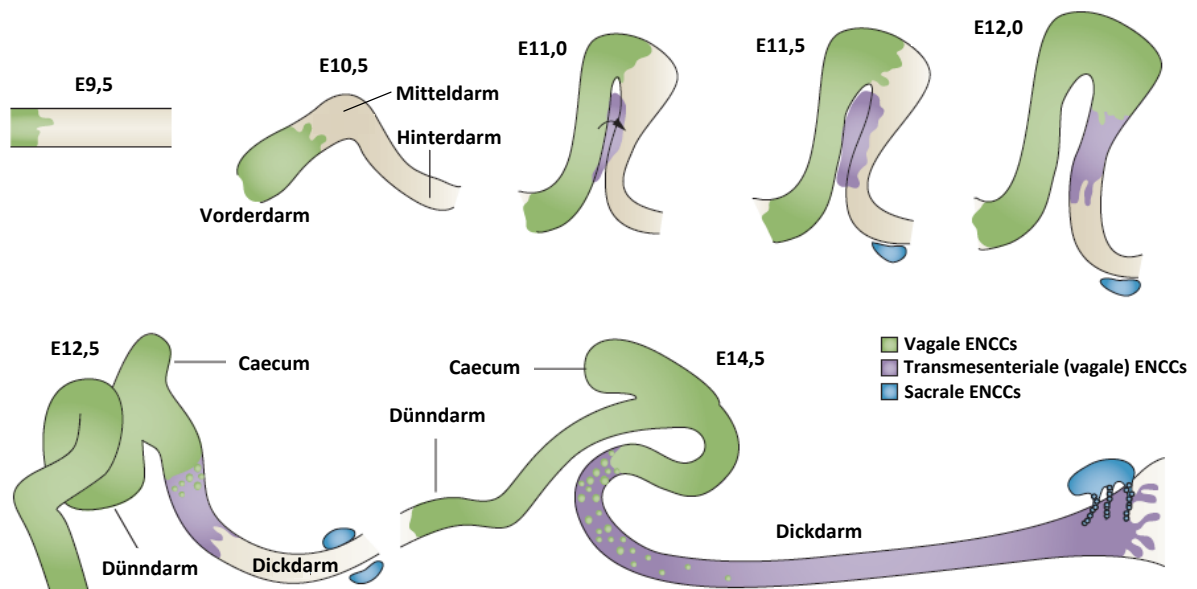


**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Neurulation und der Wanderung der Neuralleistenzellen.** (A) An den oberen Rändern der Neuralfalte bildet sich die Neuralleiste (NL). (B) Nach Schließung des Neuralrohrs beginnen die Neuralleistenzellen (NLZ) abzuwandern. (C) Die NLZ durchwandern den Körper und bilden u.a. Vorläufer des ENS, die später Neurone und Glia bilden. (A-C) Repliziert und modifiziert nach Sadler (2006).

Diese wandern im Darmmesenchym von rostral nach caudal, um Stück für Stück erst den Vorderdarm, den Mitteldarm (später Dünndarm, Caecum, aufsteigender Kolon, rostral transverser Kolon und Appendix) und schließlich den Hinterdarm (später caudaler transverser Kolon, absteigender Kolon, Sigmoid und Rektum) zu besiedeln (Abb. 4) [33, 34]. Sobald der Dickdarm durch die vagalen NLZ besiedelt ist, wandern sacrale NLZ in den Dickdarm ein und beginnen ihre Wanderung nach rostral [30, 35, 36]. Die räumliche und zeitliche Regulation der Einwanderung der sakralen Neuralleistenzellen wird hierbei unter anderem von repulsiven Molekülen wie beispielsweise Semaphorin 3A gesteuert. Semaphorin 3A wird vom distalen Kolon exprimiert und verhindert die Einwanderung von sakralen NLZ in das Kolon vor E 14,5 [37]. Der genaue Anteil der sakralen NLZ an der ENS-Formierung wurde bisher noch nicht bestimmt, aber bisherige Aussagen lassen annehmen, dass dieser sehr gering ist [36]. In Mäusen ist dieser Prozess ungefähr am Tag E 15 abgeschlossen [38, 39]. Beim Menschen erfolgt die Wanderung der Neuralleistenzellen etwa zwischen der 4. und 7. Schwangerschaftswoche [40]. Während der Wanderung der Neuralleistenzellen kommt es an der Spitze der Wanderungsfront zu einer ketten- bzw. fadenartigen Anordnung der Zellen („chain

migration“). Eine Ausbreitung der Zellen geht durch eine Bewegung innerhalb dieser Ketten oder entlang dieser vorstatten [39, 41]. Zudem können auch einzelne Zellen vor der Wanderungsfront beobachtet werden („advanced cells“) [42].

Wenn die Zellen das Caecum erreichen, kommt es zu einer deutlichen Pause der Wanderung, welche mehrere Stunden dauern kann. Währenddessen lösen sich die bisher gezeigten kettenartigen Zellformationen auf und ein vermehrtes Auftreten von „advanced cells“ kann beobachtet werden [42]. Je weiter sich diese Zellen von der stehenden Wanderungsfront entfernen, desto langsamer werden sie in ihrer Wandergeschwindigkeit [42]. Vor kurzem wurde in Organkulturen gezeigt, dass der Hinterdarm hauptsächlich von Zellen, die die Mesenterien durchqueren, besiedelt wird (Abb. 4) [43]. Dabei bilden sich während der Besiedelung des Dünndarms fadenartige Zellansammlungen nahe am Mesenterium. Diese wandern nach und nach durch es hindurch. Im Dickdarm angekommen breiten sie sich dann über die gesamte Breite des Darms aus (Abb. 4; E 11-12) [43]. Zellen, die das Caecum durchwandern, erreichen den Dickdarm etwas später. In ihrer Wanderung folgen sie den bereits bestehenden Ketten der mesenterialen ENCCs [43].



**Abbildung 4: Wanderung der ENCCs entlang des Mausdarms:** (E 9,5) Die ENCCs sind in den Vorderdarm eingedrungen und wandern caudal innerhalb des Darmmesenchyms. (E 11,0-11,5) Mitteldarm und postzökaler Darm liegen parallel beieinander und ein Teil der vagalen ENCCs nimmt eine Abkürzung durch das Mesenterium um den größten Teil des Dickdarms zu besiedeln. (~E 14,5) Vagale ENCCs erreichen das anale Ende des Darms. Parallel wandern sakrale Neuralleistenzellen bei E 11,5 in die Nachbarschaft des Dickdarms, dringen aber erst bei E13,5 entlang der Nervenfasern der extrinsischen Nerven in den distalen Kolon ein. Abbildung entnommen und modifiziert aus [34].

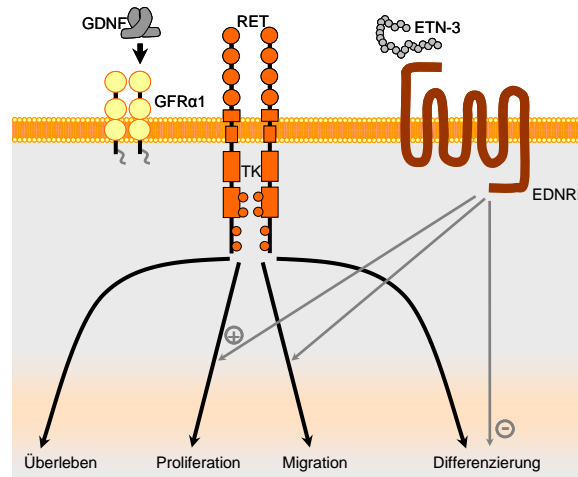
Ist den ENCCs der Weg über die Mesenterien verwehrt, so verzögert sich die gesamte Besiedelung des Dickdarms und ist infolgedessen ineffektiv [43]. Die Differenzierung der Neurone beginnt schon während der Wanderung der ENCCs. Die ersten Zellen differenzieren bereits kurz nachdem sie in den Darm eingedrungen sind und beginnen verschiedene panneurale Marker wie die neuronenspezifische Enolase, PGP9.5, Neurofilament M, TUJ1 und Hu C/D [44-49] zu exprimieren. Doch auch nNOS [50] und für Calbindin immunoreaktive Neurone bilden sich früh und können ab E 11,5 beobachtet werden [51].

Zudem entstehen Gliazellen, welche den größten Anteil an Zellen im adulten ENS einnehmen [52]. Diese können durch die Gliamarker S100 $\beta$  [53] und GFAP [54] detektiert werden. Wie die Neurone stammen die Gliazellen von ENCCs ab. Die gemeinsamen Vorläuferzellen von enterischen Gliazellen und Neuronen exprimieren sowohl SOX10 und Phox2b [55, 56]. Während der weiteren Entwicklung des ENS allerdings wird SOX10 in der neuronal determinierten Subpopulation von NLZ herunter reguliert. Dabei wird Phox2b weiterhin exprimiert. Umgekehrt verhält es sich in Gliazellen. Hier bleibt die SOX10-Expression erhalten und die Expression von Phox2b wird vermindert [55].

### **1.2.4. Gene, Transkriptionsfaktoren und Signalwege der ENS-Entwicklung**

Durch genetische Studien an Hirschsprung-Patienten und Untersuchungen verschiedener Tiermodelle konnte bisher eine Vielzahl an Genen und Signalwegen, welche die Besiedelung des Darmes und Formierung des ENS steuern, identifiziert werden.

Die Signalwege über glialem neurotrophen Faktor/GDNF Familienrezeptor  $\alpha$ /Rezeptortyrosinkinase RET (GDNF/GFR $\alpha$ 1/RET) und Endothelin-3/Endothelinrezeptor B (ETN-3/EDNRB) sind hierbei von besonderer Bedeutung (Abb. 5), aber auch verschiedene Transkriptionsfaktoren könnten dabei durch die Beeinflussung von RET eine entscheidende Rolle spielen.



**Abbildung 5: GDNF/GFR $\alpha$ 1/RET und ETN3/EDNRB Signalwege:** ENCCs exprimieren RET, das durch GDNF und dessen Rezeptor GFR $\alpha$ 1 aktiviert wird. Dadurch wird das Überleben, die Proliferation sowie Migration und Differenzierung gefördert. Der durch ETN3 (Endothelin 3) aktivierte Rezeptor EDNRB (Endothelinrezeptor B) ist G-Protein gekoppelt und sorgt für den Erhalt von einer Reihe an undifferenzierten ENCCs. Es wird die Proliferation gefördert und die Differenzierung gehemmt. Repliziert und modifiziert nach [33].

#### 1.2.4.1. GDNF/GFR $\alpha$ 1/RET-Signalweg

GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) ist ein Wachstumsfaktor und gehört zur TGF $\beta$  Superfamilie (transforming growth factor- $\beta$ ) [57]. Durch die Bindung an den GDNF-Familienrezeptor (GFR $\alpha$ 1) kommt es zur Komplexbildung und Aktivierung der transmembranen Tyrosinkinase (RET), welche u.a. die Proliferation, die Differenzierung und die Migration von ENCCs steuert [58]. In Knock-out-Mäusen für *Ret*, *Gdnf* und *Gfra1* kommt es zu einem totalen Fehlen des ENS distal des Magens [59-61]. In der Maus sind RET und GFR $\alpha$ 1 zuerst in vagalen Neuralleistenzellen, die in den Vorderdarm eindringen, exprimiert [59, 62]. GDNF ist dahingegen schon vor Eintreffen der Zellen im Mesenchym des Darms exprimiert [62] und wirkt u.a. chemoattraktiv.

#### 1.2.4.2. ETN-3/EDNRB- Signalweg

Bisher sind die drei Endotheline ETN-1, ETN-2 und ETN-3 bekannt. Diese sind sezernierte Proteine, die über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (EDNRA, EDNRB) agieren und vasoaktiv wirken [63]. ETN-3 spielt vor allem eine Rolle bei der Entwicklung von Melanozyten und des enterischen Nervensystems [64]. Es wird vom embryonalen Darmmesenchym sezerniert [65]. Der entsprechende Rezeptor (EDNRB) wird von ENCCs exprimiert [65]. ETN-3 hat einen pro-proliferativen Effekt und hemmt die Differenzierung von Neuronen (Abb. 5) [65]. Darüber hinaus scheint ETN-3/EDNRB teilweise den RET-Signaltransduktionsweg über Proteinkinase A zu modulieren [66]. Die Mutation dieses Rezeptors oder des Gens für ETN-3 kann in



einer kleinen Population an Morbus Hirschsprung leidenden Patienten nachgewiesen werden (z. B. Waardenburg Syndrom Typ 4) [33]. Zudem führt der Verlust von ETN-3 in Knock-out-Mäusen zu einer Aganglionose distal des Magens sowie zu einer Pigmentierungsstörung des Felles.

### **1.2.4.3. Transkriptionsfaktoren**

Bisher konnte eine Beteiligung einer Vielzahl an Transkriptionsfaktoren an der Entwicklung des ENS gezeigt werden, wobei viele die Expression von RET beeinflussen. Unter anderem sind dies Sox10, Phox2b [67], Ascl1 (Mash) [68], Fox3d [69], Hand2 [70], Pax3 [71, 72], Zfhx1b [73] und Hlx [74].

Im Näheren soll nachfolgend besonders auf den Transkriptionsfaktor Sox10 eingegangen werden. Transkriptionsfaktoren der Sox Familie (sry high mobility group-box) sind in vielerlei Hinsicht in die Entwicklung der Neuralleistenzellen involviert [75].

Sox10 wird in Neuralleistenzellen schon vor Beginn ihrer Migration exprimiert [76]. Sox10-Mutationen betreffen nur trunkale und vagale NLZ, craniale hingegen werden verschont [77, 78]. Diese Mutation führt schon vor Eindringen der vagalen NLZ in den Vorderdarm zum Absterben der Zellen [77]. Es ist somit für das Überleben der NLZ während ihrer Wanderschaft nötig und erhält ihren proliferativen Status [76]. Dabei wird es in erster Linie zusammen mit Phox2b für die Expression von RET [72, 79], aber auch zu einem späteren Zeitpunkt für die gliale Differenzierung der ENCCs [80], benötigt.

### **1.3. Stamm- und Progenitorzellen zur Behandlung enterischer Erkrankungen**

Für potenzielle Zelltherapien stellen Stammzellen allgemein eine interessante Zellquelle dar. Per Definition sind sie dazu in der Lage, sich selbst zu erneuern und sich asymmetrisch zu teilen, also Tochterzellen mit verschiedenen Eigenschaften hervorzubringen [81-83]. Weiter sind sie potenziell dazu fähig, sich *in vitro* unendlich zu teilen.

Bisher konnten verschiedenste Quellen adulter Stammzellen bzw. multipotenter Stammzellen und Progenitorzellen identifiziert werden [84, 85].

In den letzten Jahrzehnten sind besonders Stammzellen zur Regeneration des Nervensystems nach Unfällen (z. B. Querschnittslähmung) oder nach Beeinträchtigung durch degenerative Erkrankungen (z. B. Morbus Parkinson) [86-90], aber auch Erkrankungen des ENS [91-93] in den Fokus der Forschung gerückt. Allerdings birgt die potenzielle Verwendung dieser Zellen zum Teil noch nicht absehbare Risiken für den Patienten oder gestaltet sich in Verfügbarkeit, Prozessierung und ethischer Vertretbarkeit aufgrund noch fehlender Kenntnisse schwierig.

Im Folgenden möchte ich im Näheren auf die Vor- und Nachteile der verschiedenen Zellquellen für eine potenzielle Behandlung enterischer Erkrankungen eingehen.

#### **1.3.1. Pluripotente Stammzellen**

Pluripotente Stammzellen sind dazu in der Lage, alle Zelltypen des Körpers zu bilden, einschließlich der Keimzellen und sich in Kultur fast unendlich in undifferenziertem Zustand zu teilen [83]. Zu diesen Stammzellen zählen embryonale Stammzellen (ES-Zellen und induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen).

**Embryonale Stammzellen** können aus der inneren Zellmasse von präimplantiven Blastozysten isoliert werden [94-97]. Unter angemessenen Kulturbedingungen ist es dann möglich, aus diesen embryonalen Stammzellen verschiedenste Zellarten zu generieren sowohl mit neuronaler [98-103] als auch mit nicht-neuronaler [104] Beschaffenheit.

Weiter ist es Forschern gelungen, aus somatischen Zellen **induzierte pluripotente Stammzellen** zu reprogrammieren. Diese konnten durch Transfektion mit verschiedenen Kombinationen an Wachstumsfaktoren, wie Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc

[105] oder aber Oct4, Sox2, NANOG und LIN28 [106], gewonnen werden. Die erhaltenen Zellen zeigen molekulare und funktionale Eigenschaften muriner und humaner ES-Zellen [107, 108]. Ebenso konnte ein weites Feld an Zellen, u. a. Neurone, generiert werden [109-112]. Jedoch ist es mitunter schwierig, die iPS-Zellen in die gewünschten Zelltypen zu differenzieren und die Erarbeitung entsprechender Protokolle ist aufwendig.

Trotz dieser vielversprechenden Ansätze [113, 114] birgt die Verwendung pluripotenter Stammzellen potenziell Gefahren für den Patienten, da sie unter Verdacht stehen, Terratome und Tumore hervorzurufen [83, 115-117]. Zum einen mag dies daran liegen, dass die hundertprozentige Aufreinigung von ES- und iPS-Zellen bisher kaum realisierbar ist. Grundsätzlich ist die Aufreinigung mittels fluoreszenzaktiviertem (FACS) oder magnetaktiviertem Zellsortierens (MACS) mit hohen Reinheitsgraden möglich. Jedoch benötigt dies spezifische Zellmarker, die oftmals nicht verfügbar sind [83]. Zum anderen wird zur Generierung der iPS-Zellen c-Myc, ein Protooncogen, verwendet, das in rund 20% der chimären Mäuse nach 10 Monaten Tumore verursacht [117]. Zwar ist auch eine Reprogrammierung der Zelle ohne c-Myc möglich, doch bisher liefert diese Technik eine sehr viel geringere Ausbeute [118, 119], als es bei den Reprogrammierungsprotokollen mit c-Myc der Fall ist [120, 121]. Diese Zellen bevorzugen eine Differenzierung in Richtung des Phänotyps ihrer Donorzellen, was die Differenzierung in andere Zelltypen beschränkt (epigenetisches Zellgedächtnis) [122-124].

### **1.3.2. Multipotente Stammzellen und Progenitorzellen**

Im adulten Lebewesen sind innerhalb verschiedener Gewebe nur wenige multipotente Stammzellen und Progenitorzellen zu finden. Adulte Stammzellen können sich allerdings nicht wie embryonale Stammzellen in jede Zellart des Körpers differenzieren. In der Regel sind sie im Stande bestimmte Zellarten zu generieren (multipotente Stammzellen).

In den letzten Jahren konnten solche beispielsweise im Knochenmark, Skelettmuskel und bestimmten Bereichen des Hirns und Rückenmarks [125-134] identifiziert werden. Aber sie wurden auch in der Haut [84] und in Knochen- und Knorpelgewebe gefunden [85]. In den frühen 90ern des 20. Jahrhunderts gelang es erstmalig, auch Zellen aus dem Neuralrohr (Neuralleiste) embryonaler Ratten zu isolieren [135]. Man fand heraus, dass diese Zellen sowohl dazu in der Lage sind sich selbst zu erneuern, als auch in Neurone, Schwann'sche Zellen (Glia) und glatten Muskelzellen

gleichende Myofibroblasten unter Zugabe der entsprechenden Wachstumsfaktoren zu differenzieren [136, 137].

Inzwischen konnten auch multipotente Zellen im ENS während der Embryonalentwicklung und sogar aus adultem Gewebe isoliert werden [138-147]. Sogar aus normal besiedelten Darmregionen von HSCR Patienten [148] (Vollwandpräparate) und aus Routinebiopsien der Submukosa von Kindern, inklusive HSCR Patienten, konnten sie gewonnen werden [149]. Allerdings gibt es für enterische Stamm- und Progenitorzellen bisher noch keinen spezifischen Zellmarker, der eine zuverlässige Isolation der Stammzellen mit hohem Reinheitsgrad ermöglicht. Aus dem ENS isolierte Zellen können unter Zugabe entsprechender Wachstumsfaktoren *in vitro* expandiert werden. Dabei bilden sie neurosphärenartige Gebilde, welche sowohl Progenitoren für Neurone als auch für Glia-Zellen enthalten [145]. Zudem zeigen sie die Kapazität aganglionäres Darmgewebe *in vitro* zu besiedeln und dem ENS entsprechende Neuronenphänotypen auszubilden [150].

Die Vorteile dieser Zellen sind zum einen, dass sie nicht dazu neigen, Tumore auszubilden, zum anderen, dass Sie aus dem Patienten selbst gewonnen werden können. Durch eine autologe Transplantation entfällt die Immunsuppression des Zellempfängers. Allerdings muss für eine erfolgreiche Therapie eine ausreichende Menge ENS-Progenitorzellen isoliert werden. Wie viele Zellen dies sind, muss in Zukunft untersucht werden. Weiter muss evaluiert werden, welcher Darmabschnitt für die Gewinnung der Zellen am besten geeignet ist.

## **1.4. Erkrankungen und Entwicklungsstörungen des enterischen Nervensystems**

### **1.4.1. Gastrointestinale Erkrankungen im Kindesalter**

#### **1.4.1.1. Morbus Hirschsprung**

Morbus Hirschsprung (HSCR) ist die am besten charakterisierte pädiatrische Neuropathie des enterischen Nervensystems und tritt etwa bei einem von 5000 Lebendgeborenen auf [151]. HSCR ist eine kongenitale (angeborene) Fehlbildung des Dickdarmes, hervorgerufen durch ein Fehlen der Neurone des myenterischen und des submukösen Plexus [152] in einem variabel langen Stück des distalen Darms. Allerdings ist die extrinsische parasymphatische Innervation vorhanden und oftmals hypertrophiert [34, 153]. Da die extrinsische Innervation hauptsächlich exzitiatorisch ist [34, 154], führt dies zu einer chronischen Obstruktion des betroffenen Abschnitts [155], nachfolgend zur Aufstauung des Kots und Ausbildung eines Megacolons [34]. Verursacht wird dies durch eine unvollständige Besiedelung des Darms durch die vagalen Neuralleistenzellen, welche das ENS ausbilden [156]. In den meisten Fällen wird HSCR kurz nach der Geburt diagnostiziert. Meist zeigt es sich durch intestinale Obstruktion mit verzögertem Absetzen des Kindspechs (> 48h nach Geburt) [157]. Aber auch Bauchblähungen, Erbrechen und Enterokolitis gehören zum symptomatischen Spektrum von HSCR [158]. HSCR ist eine multifaktorielle Krankheit, welche sich nicht nach der mendelschen Lehre vererbt und eine geringe geschlechtsabhängige Penetranz aufweist, wobei Jungen bevorzugt betroffen sind [159].

Die Erkrankung wird in Abhängigkeit der Länge des betroffenen Darmsegments eingeteilt in (1) Kurzsegment-HSCR (ca. 80% der Patienten), wobei das aganglionäre Segment nicht über das obere Sigmoid hinausreicht [158], während beim (2) Langsegment-HSCR (ca. 20%) die Aganglionose proximal über das Sigmoid hinausgeht [160]. Seltener auftretende Varianten sind zum einen die totale Aganglionose des Dickdarms (3-8% der Fälle) [160], zum anderen die totale intestinale Aganglionose, wobei der gesamte Darm betroffen ist [161]. Ebenso selten ist der Ultrakurzsegment-HSCR [162]. Hierbei ist der aganglionäre Bereich sehr kurz und befindet sich im distalen Rektum.

Der Hauptteil der HSCR-Patienten zeigt einen sporadisch auftretenden Kurzsegment-HSCR, wobei der aganglionäre Abschnitt variabel ist. Der Morbus Hirschsprung als einziges Merkmal tritt in 70% der Patienten auf, in 12 % der Fälle sind chromosomale Anomalien assoziiert. In 18% der Fälle ist es kombiniert mit anderen kongenitalen Anomalien [163, 164].

### **1.4.1.2. Infantile hypertrophe Pylorusstenose**

Die infantile hypertrophe Pylorusstenose (IHPS) tritt bei ungefähr 3 Kindern pro 1000 Geburten auf [165]. Männliche Säuglinge sind häufiger betroffen als weibliche (5:2) [166]. Die Erkrankung führt zu einer Ringmuskelhypertrophie (krankhaftes Muskelwachstum) des Magenausgangs [167]. Dies führt zwischen der 2. und 6. Lebenswoche [168] zum teilweisen oder kompletten Verschluss des Magenpförtner-Lumens. Diese hypertrophe Muskulatur weist eine deutlich herabgesetzte NADPH-Diaphorase-Aktivität (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Diaphorase) des Magenpförtners auf [168], was eine Beteiligung des ENS vermuten lässt. NADPH-Diaphorase wird zur Identifizierung inhibitorischer Neurone verwendet und zeigt die nNOS-Aktivität (neuronal Stickstoffmonoxid-Synthase) an, so dass vermutet wurde, dass für den Spasmus des Pylorus und der krankhaften Vergrößerung der Ringmuskulatur ein Fehlen der inhibitorischen Innervation ursächlich ist [168]. Diese Vermutung wurde durch Untersuchungen in der Maus, wobei das *NOS1*-Gen deletiert wurde, untermauert. Diese Mäuse zeigten einen vergrößerten Magen sowie eine Pylorus-Hypertrophie [169]. Genetische Kopplungsanalysen dieser Verbindung blieben allerdings ergebnislos [170, 171].

Neuere genetische Studien identifizierten anfällige Genloci auf dem Chromosomen 16q24 [172] sowie Regionen auf den Chromosomen 16p12-p13, 11q12-q22, Xq23 [173, 174]. Diese zeigten allerdings auch, dass IHPS mit verschiedenen genetischen Veränderungen assoziiert ist [173]. So wird angenommen, dass auch schon geringe Mutationen mehrerer verknüpfter Gene ausreichen um IHPS auszulösen. Aber auch extrinsische Faktoren wie Erythromycin, einem Motilin-Agonisten, der starke Magen- und Pyloruskontraktionen auslöst, können das Risiko einer IHPS erhöhen [175-177]. Ob die IHPS tatsächlich einen neurogenen Hintergrund hat, ist derzeit jedoch nicht endgültig geklärt.

### **1.4.1.3. Chronische intestinale Pseudoobstruktion (CIPO)**

Die CIPO ist durch einen chronischen oder wiederholt geblähnten, atonen Darm, sowie durch eine chronische Obstipation charakterisiert. Eine mechanische Ursache der Obstipation liegt nicht vor [178]. Das Aufrechterhalten oraler Ernährung führt zu unlösbaren Verstopfungen sowie schweren Mangelernährungen. 20-60% der Patienten müssen lange Zeit parental ernährt werden [179]. Bei Kindern sind die häufigsten Symptome Übelkeit und Erbrechen sowie eine Aufblähung des Abdomens und Verstopfungen. Doch keines dieser Symptome ist krankheitsbezeichnend [180]. CIPO entspricht einer weiten und heterogenen Gruppe von neuromuskulären Erkrankungen des Darms, welche als enterische viszerale Myopathien, Neuropathien und/ oder Mesenchymopathien bezeichnet werden [178, 181]. In Versuchen an Mäusen wurden c-Kit blockierende Antikörper appliziert [182]. c-Kit ist ein Protoonkogen, das u.a. die Proliferation myogener Vorläuferzellen fördert. Durch die Applikation des Antikörpers wurden die Cajal-Zellen eliminiert [183], eine mögliche Rolle der Cajal-Zellen bei der Pathogenese von CIPO vermuten ließ. Dies wurde durch zahlreiche Fallberichte über CIPO Patienten bestätigt, in denen in Darm-Biopsien nicht normale c-Kit-positive Cajal-Zellen gefunden wurden [184]. CIPO assoziierte Erkrankungen, welche die Dichte und Anzahl von Neuronen im Darm beeinflussen (Aganglionose, Hypoganglionose, Hyperganglionose), werden nachfolgend beschrieben.

### **1.4.1.4. Hyperganglionose**

Zwei Erkrankungen werden sowohl mit CIPO als auch mit Hyperganglionose assoziiert: intestinale neuronale Dysplasie (IND) und Ganglioneuromatose. IND ihrerseits kann in IND A und B unterteilt werden. IND A wird nur sehr selten diagnostiziert. Sie ist charakterisiert durch eine kongenitale Aplasie bzw. Hypoplasie der adrenergen Innervation [185], vor allem die der Blutgefäße, welche sich schon im Neugeborenenalter mit Obstruktionen des Darms, Diarrhö und Teerstuhl zeigt [186]. Die weit häufiger vorkommende zweite Form IND B wird als minimale Fehlentwicklung des ENS gesehen und beschränkt sich auf den submukösen Plexus [187]. Dies geht mit chronischer Obstipation einher [186]. Bisher wird diese Diagnose basierend auf der Morphologie gestellt, bleibt aber weiterhin eine diagnostische Herausforderung [187, 188]. IND wird oft bei sehr jungen Kindern diagnostiziert (unter einem Jahr alt), bei älteren eher selten [188]. Koletzko et al. gehen davon aus,

dass histologische „Abnormitäten“ bei sehr jungen Kindern eher eine normale Variante der postnatalen Entwicklung darstellen, als einen pathologischen Prozess [188]. HSCR Patienten zeigen ebenso ein hyperganglionäres Segment direkt proximal zum aganglionären Segment [189]. So bleibt die Existenz von IND B als eigenständige Erkrankung strittig [190].

*Sprouty2* und *Kif26a* als negativ auf den GDNF/Ret-Signalweg wirkende Regulatoren standen im Verdacht, an der Entstehung von IND beteiligt zu sein. Dafür sprach die erhöhte Neuronendichte im myenterischen Plexus von homozygoten Knock-out-Mäusen für *Sprouty2* oder *Kif26a* [191, 192]. Allerdings zeigte eine andere Studie, dass *Sprouty2* Knock-out-Mäuse zumindest im distalen Kolon eine Hypoganglionose aufweisen [193]. Des Weiteren wurden in einer Studie zur Überprüfung dieser Vermutung 26 Patienten mit diagnostizierter IND B auf Mutationen von *SPRY2* untersucht [194]. In diesen Patienten wurden jedoch keine Mutationen für *SPRY2* gefunden. Weiterhin konnte allerdings in heterozygoten Endothelinrezeptor B defizienten Ratten gezeigt werden, dass diese ähnliche Abnormitäten des submukösen Plexus aufweisen wie IND Patienten [195].

Eine intestinale Ganglionneuromatose kann zu HSCR-ähnlichen Symptomen mit Obstipation führen. Allerdings charakterisiert sich die Ganglionneuromatose durch eine höhere Anzahl der Ganglionzellen und Nervenfasern in der Darmwand [196]. Die Ganglionneuromatose tritt bei der multiplen endokrinen Neoplasie Typ 2b (MEN2B) und der Neurofibromatose (NF1) auf. Dies sind beides autosomal dominante Erkrankungen aufgrund ihrer Mutationen in *RET* bzw. *NF1* [197]. MEN2 tritt etwa bei ca. 0,002% der Gesamtbevölkerung auf, wobei die aggressive Unterform MEN2B nur einen sehr kleinen Anteil stellt (5-10% aller Fälle) [198], NF1 findet man in ca. 1 auf 2500-3000 Menschen [199].

### **1.4.1.5. Hypoganglionose**

In seltenen Fällen kann man in CIPO Patienten eine reduzierte Anzahl an Ganglienzellen in der Darmwand finden [200]. Die Hypoganglionose wird selten diagnostiziert [201], da sich die histopathologische Diagnose sehr schwierig gestaltet. Sogar im normalen Darm kommt es öfters zur nicht einheitlichen Verteilung der Ganglien auf verschiedenen histologischen Schnitten eines Probanden [201], sodass die Erhebung von Referenzwerten schwierig ist. Weiter werden Neuronenzählungen oft durch die Falschbehandlung der Gewebeproben beeinflusst [201]. Zudem sind die Ursachen der Hypoganglionose vielfältig. Im Mausmodell zeigen Tiere mit



Mutationen in Neurotrophin-3 oder seinem Rezeptor, Tyrosinkinase C (TrkC) als auch *Gdnf*<sup>+/-</sup> Mäuse eine starke Reduzierung der enterischen Neurone in beiden Plexus [202, 203].

## **1.4.2. Gastrointestinale Erkrankungen im Erwachsenenalter**

### **1.4.2.1. Ösophagale Achalasie**

Bei der ösophagalen Achalasie wird durch den Verlust an vasoaktivem intestinalem Peptid (VIP) und Stickoxid (NO) [204] eine motorische Störung der Ösophaguskulatur hervorgerufen. Dadurch wird diese während des Schluckaktes nicht ausreichend erweitert [205]. Dies führt sekundär zur Aussackung des proximalen Ösophagus. Patienten zeigen Symptome wie z. B. Dysphagie (Schluckstörungen), Brustschmerzen, Erbrechen, Aspiration von unverdauter, erbrochener Nahrung sowie Gewichtsverlust [206].

Die genaue Ursache der ösophagalen Achalasie ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Vermutlich handelt es sich aber um eine autoimmune Erkrankung, da in verschiedenen Studien sowohl das HLA-Antigen HLA-DQw1 [207] als auch eine gesteigerte Anzahl an Antikörpern gegen den myenterischen Plexus [208] nachgewiesen wurden.

### **1.4.2.2. Morbus Parkinson**

Morbus Parkinson (PD) ist bekannt als chronische neurodegenerative Erkrankung der dopaminergen Neurone des ZNS, welche in ihrem Verlauf progressiv voranschreitet [209]. Es wird vermutet, dass die krankheitsbedingten Prozesse eine direkte Auswirkung auf die enterischen Nerven haben. Neben den charakteristischen Bewegungsstörungen ist auch eine Störung der Verdauung bekannt. Diese Störung äußert sich beispielsweise durch Aufblähen des Bauchraumes, verzögerte Magenentleerung und Verstopfung [210]. Diese Symptome zeigen sich oft schon vor dem Einsetzen der Bewegungsstörungen [211]. Als Grund dafür wurde schon früh der Verlust an Neuronen im Gastrointestinaltrakt angeführt [212]. Dabei wurde nachgewiesen, dass sowohl die Dopamin-Konzentration als auch die Anzahl der für Dopamin immunreaktiven Nerven im aufsteigenden Kolon von PD-Patienten reduziert ist [212]. In Mäusen hemmt Dopamin die Darmmotilität [213, 214]. Doch weisen PD-Patienten Verstopfungen und Magenlähmungen auf und nicht die erwartete geförderte Darmmotilität durch den Mangel an Dopamin. Es wird

angenommen, dass Dopamin im Darm von Mäusen einer anderen Rolle gerecht wird, als in dem des Menschen. Deshalb musste die Beteiligung nicht-dopaminerger Neurone im Darm bei PD in Betracht gezogen werden. Es wurde gezeigt, dass diese pathologische Veränderungen aufweisen [215, 216]. Dabei handelt es sich um Ansammlungen von  $\alpha$ -Synuclein zwischen den Neuronen, auch Lewy-Körper genannt [215, 216]. Diese Lewy-Körper sind eine der pathologischen Hauptveränderungen in verschiedenen Hirnregionen von PD Patienten [217]. Allerdings konnten sogar in wenigen neurologisch gesunden Patienten mit Verstopfung ebenfalls  $\alpha$ -Synuclein Ansammlungen gefunden werden [218, 219].

### **1.4.2.3. *Diabetes assoziierte Gastroparese***

Als diabetische Gastroparese wird eine chronische Lähmung der Magenperistaltik durch eine länger bestehende Diabetes mellitus Erkrankung bezeichnet [220]. Diese Erkrankung führt zu einer verzögerten Magenentleerung [221]. Zusätzlich ist die diabetische Gastroparese nur eines der sekundären, aber das am häufigsten auftretende Symptom [222]. Die Ursachen diabetischer Gastroparese sind sehr komplex und von vielen Faktoren beeinflusst [223].

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche neuronale Subtypen des Gastrointestinaltraktes durch Diabetes beeinträchtigt sind [224]. Dabei sind inhibitorische Neurone (z. B. nNOS positive) [224-227] stärker betroffen als exzitatorische Neuronentypen [224, 228]. Die cholinerge, exzitatorische Innervation, welche die Kontraktion des Gastrointestinaltraktes auslöst, ist in diabetischen Tieren dagegen erhöht [229-231]. Es wird angenommen, dass diese veränderten Neuronenverteilungen durch Diabetes mellitus zu einer geminderten Darmmotilität führen.

### **1.5. Ziel der Arbeit**

Verschiedenen Forschergruppen ist es bisher gelungen, enterische Vorläuferzellen aus embryonalen und adulten Darmgeweben zu isolieren [142, 145, 146, 148, 150, 232]. Diese zeigten *in vitro* die Fähigkeit, embryonalen, aganglionären Darm der Maus zu besiedeln [145, 148, 149]. Seither wird diesen Zellen ein großes Potenzial zur zellbasierten Therapie verschiedener enterischer, neuronaler Erkrankungen zugesprochen. Allerdings wurde seitdem weder das Verhalten postnataler ENS-Progenitorzellen im gesunden, noch im Morbus Hirschsprung Tiermodell im Detail auf ihr Potenzial hin untersucht. Des Weiteren ist bisher auch kein immundefizientes Morbus Hirschsprung Mausmodell verfügbar, mit welchem eine zellbasierte, autologe Transplantation simuliert werden könnte.

Um das Potenzial postnataler ENS-Progenitorzellen in postnatalen *in vivo*-Systemen für zukünftige Zelltherapien untersuchen zu können, sollten in vorliegender Arbeit folgende Ziele verfolgt werden:

1. Die Isolierung und Proliferation muriner und humaner enterischer Progenitorzellen aus postnatalen Darmgeweben sowie die Charakterisierung dieser Zellen *in vitro*.
2. Die Implantation der erhaltenen ENS-Progenitoren in ein gesundes, immundefizientes Mausmodell und nachfolgend die Charakterisierung der implantierten Zellen.
3. Die Generierung eines immundefizienten Morbus Hirschsprung Mausmodells, das für Zelltransplantationsexperimente mit humanen Zellen geeignet ist.



## 2. Material und Methoden

Alle verwendeten Chemikalien waren in *p.a.*-Qualität. Sofern nicht gesondert ausgewiesen, befindet sich der Firmensitz des Herstellers in Deutschland.

### 2.1. Geräte und Hilfsmittel

Bezeichnung	Hersteller
Anatomische Pinzetten	Fine science tools, Heidelberg
Brutschrank BBD 6220	Heraeus, Hanau
Dampfsterilisator Varioklav	H + P Labortechnik, Oberschleißheim
Deckglas-Pinzette	Roth, Karlsruhe
Dumont medizinische Pinzette #3	Fine science tools, Heidelberg
Dumont medizinische Pinzette #5	Fine science tools, Heidelberg
Einbettautomat Shandon Pathcentre	Thermo Scientific, Langenselbold
Eismaschine	Scotsman, Ipswich, Großbritannien
Färbeglasten und Färbegestell	Roth, Karlsruhe
Färbekammer mit Deckel ABS	Roth, Karlsruhe
Fluoreszenzlampe HXP120C	Zeiss, Jena
Folienschweißgerät Folio	Severin, Sundern
Gefrierschrank -80°C HF4586 Basic	Heraeus, Hanau
Gelkammer PerfectBlue Gelsystem Mini M	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Heizplatte HI 1220	Leica, Nussloch
Kamera AxioCam HRm	Zeiss, Jena
Kryotom Leica CM3050S	Leica, Nussloch
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr, Ochsenhausen
Laborflaschen, versch. Größen	Duran Group, Mainz
Laborgasbrenner Fuego basic	WLD-Tec, Göttingen
Magnetrührer Ikamog RH	Janke & Kunkel, Staufen
Messzylinder, versch. Größen	Duran Group, Mainz
Mikroskop Axiovert25	Zeiss, Jena
Mikroskop Observer.Z1	Zeiss, Jena
Mikrotom Leica RM 2155	Leica, Nussloch
Mikrowelle Micro-Time FM1515E	Moulinex-Krups GmbH, Offenbach/Main
Netzteil Power Pac Basic	Bio-Rad, München
Neubauer Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Ohrbiopsierzange Finger Loop Ear Punch	Fine science tools, Heidelberg
PCR Cycler GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, Carlsbad, U.S.A.
pH-Meter Lab 850	Schott Instruments, Mainz
Pipettierhilfe Powerette Plus	Roth, Karlsruhe
Pipetten (verstellbar)	Eppendorf, Hamburg
Präparatemappen	Roth, Karlsruhe

Reaktionsgefäßständer, versch.	Roth, Karlsruhe
Rotilabo-Alu.Rack	Roth, Karlsruhe
Rüttler Logic Shaker	Neolab, Heidelberg
Schwannenhalslampe KL1500electronic	Zeiss, Jena
Skalpellgriff	Roth, Karlsruhe
Stereolupe SD30	Olympus, Hamburg
Stereolupe Stemi 2000	Zeiss, Jena
Stereolupe MZFLIII	Leica, Nussloch
Schere spitz-stumpf	Roth, Karlsruhe
Spatel, verschiedene Größen	Roth, Karlsruhe
Spülmaschine Mielabor G 7783 CD	Miele, Gütersloh
Sterilbank MSC Advantage	Thermo Scientific, Langenselbold
Thermoshaker PHMT	GrantBio, Shepreth, UK
Tischzentrifuge Rotina 380R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Vakuumpumpe Rotixa/AP	Hettich, Tuttlingen
Vannas Scissor straight	Fine science tools, Heidelberg
Vortexer VF2	Janke & Kunkel, Staufen
Waage Analytic	Sartorius, Göttingen
Waage Excellence	Sartorius, Göttingen
Wägeschalen, versch. Größen	Roth, Karlsruhe
Wärmeschrank	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
Wasserbad HI 1210	Leica, Nussloch
Wasserbad Typ 1003	GFL, Burgwedel
Zentrifuge Biofuge15R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge DW-41BR-230	Qualitron, Karachi, Pakistan
Zentrifuge MiniSpin	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank Heraguard	Thermo Scientific, Langenselbold
Sterilbank Safe2020	Thermo Scientific, Langenselbold
Vakuumpumpe Vacusafe	Integra Biosciences, Fernwald

## 2.2. Computerprogramme

Bezeichnung	Herstellung
Adobe Reader	Adobe Systems, München
Axio Vision 4.8	Zeiss, Jena
Axio Vision Rel 4.8	Zeiss, Jena
Corel Draw	Corel, Unterschleißheim
Image J, Cell Counter Plug In	National Institutes of Health, Bethesda, U.S.A.
LSM 5 Image Browser	Zeiss, Jena
Microsoft Excel, Word	Microsoft, Unterschleißheim
Reference Manager 11	Thomson Research Soft, Carlsbad, USA

### 2.3. Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Alufolie	Papstar, Kall
Augen- und Nasensalbe Bepanthen	Bayer, Leverkusen
Augensalbe Isopto-Max	Alcon Pharma, Freiburg
Combi-Tips Biopur	Eppendorf, Hamburg
Einmalspritzen, steril, 1/2/5/20 ml	Braun, Melsungen
Deckgläser 24x50mm	Langenbrinck, Emmendingen
Desinfektionsspray Softasept N	Braun, Melsungen
Desinfektionsspray Descosept AF	Braun, Melsungen
Einbettkassette universal	Langenbrinck, Teningen
Entsorgungsbeutel Plastibrand	Braun, Melsungen
Entsorgungsbeutel	Roth, Karlsruhe
Fettstift Dako Cytomotion Pen	Dako, Glostrup, Dänemark
Kanüle Sterican G24 x 1" (Gr.17)	Braun, Melsungen
Kanüle Sterican G30 x 1/2"	Braun, Melsungen
Kryo-Einbettmedium Tissue Tek <sup>®</sup> O.C.T.	Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Mikrotom-Klingen Feather R35	pfm medical, Köln
Latexhandschuhe, Micro-Touch High Grip	Ansell LTD, Brüssel, Belgien
Mikrotiterplatten 6-, 12-, 96-Well	Becton Dickinson, Heidelberg
Mikrotiterplatten 48-Well	Greiner BioOne, Frickenhausen
Millicell <sup>®</sup> Culture Plate Inserts CM	Millipore, Tullagreen, Irland
Nahtmaterial Prolene 5-0	Ethicon Inc., Norderstedt
Nahtmaterial 7-0	Ethicon Inc., Norderstedt
Objektträger SuperFrost <sup>®</sup> Plus	Langenbrinck, Emmendingen
Parafilm "M" Laboratory Film	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, W.I., U.S.A.
Pasteurpipetten 230mm Glas	WU, Mainz
PCR Reaktionsstreifen + Deckel, 8 Well, 0,2 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Peel-A-Way <sup>®</sup> Disposable Embedding Molds T-8	Polysciences, Warrington, Vereinigte Staaten von Amerika
Pipettenspitzen	Biozym Scientific, Oldendorf
Reaktionsgefäße 0,5 ml / 1,5 ml/ 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Rotilabo <sup>®</sup> -Einmal-Wägeschalen PS	Roth, Karlsruhe
Rotilabo <sup>®</sup> -Skalpellschneidklingen Typ 10 und 11	Roth, Karlsruhe
Schnittklingen für Kryostaten	Leica, Nussloch
Schraubdeckelröhrchen 15 ml / 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Serologische Pipetten 2 ml / 5 ml / 10 ml / 25 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Skalpellschneidklingen #11, #15	Paragon, Sheffield, Großbritannien
Sterilfilter Millex GP	Millipore, Tullagreen, Irland
Spritze, 1 ml	Braun, Melsungen

## 2.4. Patientenmaterial und Versuchstiere

### 2.4.1. Patientenmaterial

Humanes adultes Darmmaterial wurde freundlicherweise durch die Abteilung der Allgemeinen Chirurgie des Universitätsklinikums Tübingen, nach Freigabe durch Frau Dr. Silvia Wagner (Ethikantrag 168/2005), bereitgestellt.

### 2.4.2. Versuchstiere

Alle Tierversuche sind entsprechend den Richtlinien der Tierschutzkommission der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen (Projekt-Nr. K2/09) in Anwesenheit oder durch Dr. F. Obermayr durchgeführt worden.

Die Tiere wurden unter konstanten, pathogenfreien Standardbedingungen bei  $23 \pm 2$  °C und einer Luftfeuchtigkeit von ca. 57% in Makrolonkäfigen (Typ IV) gehalten, wobei ein Käfig mit maximal 4 Mäusen besetzt wurde. Der Tag-/ Nachtrhythmus betrug 12h/12h. Keimfreies Futter und Wasser standen den Tieren jederzeit zur Verfügung.

Verwendete Mausstämmе	Quelle
C57Bl/6	Charles River, Sulzfeld
C57Bl/6 <sup>Sox10/LacZ</sup>	Prof. Dr. M. Wegener, Erlangen
C57Bl/6 <sup>eGFP</sup>	Dr. M. Okabe, Universität Osaka, Japan
NOD.Cg-Prkdc <sup>scid</sup> Il2rg <sup>tm1Wjl</sup> /SzJ	Charles River, Sulzfeld

Die Mausstämmе C57Bl/6 und C57Bl/6<sup>eGFP</sup> wurden als Zellquelle für primäre enterische Progenitoren verwendet, NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ-Mäuse als Empfängertiere der grün leuchtenden enterischen Progenitoren und zur Kreuzung mit C57Bl/6<sup>Sox10/LacZ</sup>.

**C57Bl/6** ist einer der am weitesten genutzten Inzuchtstämmе. Die Mäuse besitzen ein schwarzes Fell und sind wegen ihrem permissiven Hintergrund, der eine maximale Expression an Mutationen zulässt, beliebt [Quelle: Jax Mice Database, <http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html>].

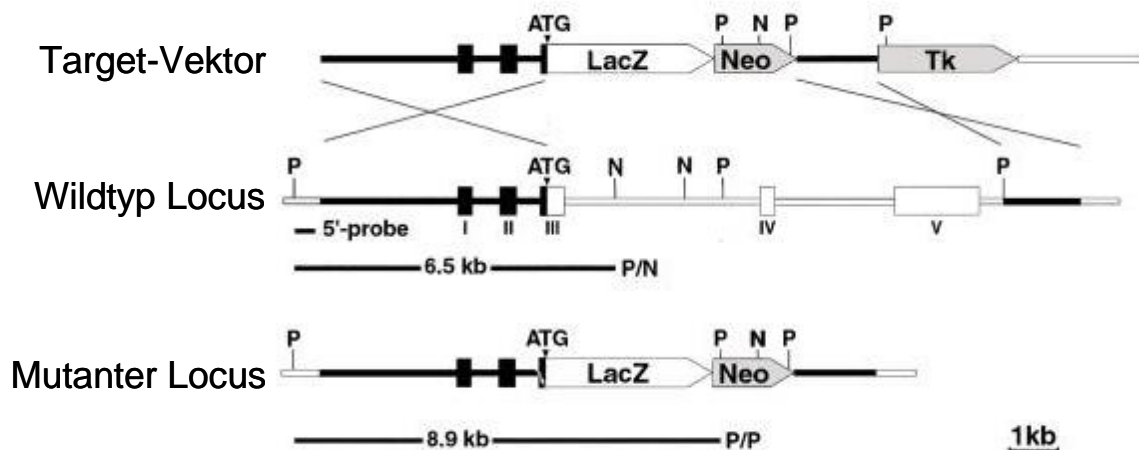
**C57Bl/6<sup>eGFP</sup>** wurden als zuverlässige Zellquelle für markierte Zellen entwickelt [233] und freundlicherweise von Dr. Okabe zur Verfügung gestellt. Grün fluoreszierendes Protein stammt ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria*. Die hier genutzten Mäuse exprimieren allerdings unter Kontrolle eines Hühnchen- $\beta$ -Aktinpromotors ein



designiertes enhanced GFP (eGFP), das im Zytosol exprimiert wird und so eine höhere Leuchtintensität zeigt, als das Wildtyp GFP [233]. Das Exzitationsoptimum liegt bei ~488 nm und kann somit mit einem Standard-Fluoreszenzmikroskop detektiert werden [233].

**NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>II2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ**-Mäuse gehören zu den am stärksten immunsupprimierten Mäusen, die derzeit erhältlich sind. Sie vereinen die schwere kombinierte Immundefizienz-Mutation (*scid*) und ein IL2 Rezeptor  $\gamma$ -Kette Defizit. Ihnen fehlen dadurch reife T-Zellen, B-Zellen und funktionale natürliche Killerzellen [234], außerdem haben sie Defizite in Zytokin-Signalwegen. Hierdurch eignen sie sich ausgezeichnet zur Xenotransplantation humaner Zellen [Quelle: Jax Mice Database, <http://jaxmice.jax.org/strain/005557.html>].

**C57Bl/6<sup>Sox10/LacZ</sup>**-Mäuse wurden durch eine induzierte Mutation des *Sox10* hergestellt. Hierzu wurde ein Target-Vektor konstruiert, welcher die Kodierungssequenzen des *Sox10* löscht und stattdessen *lacZ* in den Rahmen des *Sox10*-Startkodons hineinfusioniert (Abb. 7) [235].



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Targeting Strategie zur Deletion von Sox10 und zur Einschleusung von LacZ via Target-Vektor.** Nicht kodierende und kodierende Exone sind durch schwarze oder offene Boxen dargestellt. Entnommen und modifiziert nach [235].

Nach Einschleusung des Vektors in embryonale Stammzellen wurden daraus Chimären erzeugt. Man erhielt heterozygote *Sox10<sup>LacZ</sup>*-Mäuse [235]. Nach drei Generationen zeigten heterozygote Tiere einen weißen Brustfleck. Ein Großteil dieser Tiere stirbt in den ersten Lebenswochen durch Ausbildung eines massiven Megacolons [235]. Diese Mäuse wurden zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Wegener.

## 2.5. Lösungen, Medien und Puffer

### 2.5.1. Zellkultur

<b>Kits &amp; Fertiglösungen</b>	
Artikel	Hersteller
5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit I	Roche, Penzberg
Phosphatpuffer Dulbecco's PBS (dPBS)	PAA, Pasching, Österreich

<b>10 x Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)</b>	
NaCl, Sigma-Aldrich, München	80g
KCl, Sigma-Aldrich, München	2g
Kaliumdihydrogenphosphat	2,4g
Natriumdihydrogenphosphat	14,4g
Ad 1 l Aqua bidest und pH 7,4 einstellen	

<b>Enzymlösung für den Verdau von Darmmuskel</b>	
Collagenase IX, Sigma Aldrich, München	750 U/ml
Dispase II, Roche, Mannheim	250 µg/ml
lösen in HBSS mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> , PAA, Pasching, Österreich	
sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C	

<b>DNase I Stammlösung 5 %ig</b>	
DNase I aus Rinderpankreas, Sigma-Aldrich, München	1 g
H <sub>2</sub> Odest	20 ml
sterilfiltrieren, aliquotieren, Lagerung bei -20 °C;	
Einsatz 1: Endkonzentration im Verdau 0,05 %	

<b>Epidermal Growth Factor (EGF) Stammlösung 40 µg/ml</b>	
EGF, Roche, Mannheim	0,2 mg
BSA für Zellkultur (1 mg/ml), Sigma-Aldrich, München	5 mg
Essigsäure 100% (Endkonz. 10mM), Merck, Darmstadt	3 µl
H <sub>2</sub> Odest.	4,997 ml
sterilfiltrieren, aliquotieren, Lagerung -20 °C; vor Einsatz 1:1 mit bFGF mischen, 1:1000 in Kultur, Endkonz. 20ng/ml	

<b>PBS / Heparin / BSA-Lösung</b>	
BSA für Zellkultur, Sigma-Aldrich, München	1 mg
Heparin Natrium, Fagron, Barsbüttel	10 mg
PBS	1 ml

<b>basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) Stammlösung 20 ng/ml</b>	
PBS / Heparin / BSA-Lösung	625 µL
bFGF, Sigma-Aldrich, München	25 µg
sterilfiltrieren, aliquotieren, Lagerung -20 °C; vor Einsatz 1:1 mit EGF mischen, 1:1000 in Kultur.	

<b>Proliferationsmedium Maus ENS</b>	
Dulbecco's Modified Eagle Nutrient Mixture F-12 Medium (PAA, Pasching, Österreich)	
N2-Supplement 100x stock, Gibco, Karlsruhe	1:100
Penicillin/Streptomycin 100x stock, PAA, Pasching, Österreich	1:100
L-Glutamin 100x stock, Gibco, Karlsruhe	1:100
bFGF, täglich frisch zugeben, Sigma-Aldrich, München	20 µg/ml
EGF, täglich frisch zugeben, Sigma-Aldrich, München	20 µg/ml
B27, Gibco, nur am 1. Tag	1:50
sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C	

<b>Differenzierungsmedium Maus ENS</b>	
Dulbecco's Modified Eagle Nutrient Mixture F-12 Medium, PAA, Pasching Österreich	
N2-Supplement 100x stock, Gibco, Karlsruhe	1:100
Penicillin/Streptomycin 100x stock, PAA, Pasching, Österreich	1:100
L-Glutamin 100x stock, Gibco, Karlsruhe	1:100
Ascorbat-2-Phosphat (Endkonz. 200 µM), Sigma-Aldrich, München	1:1000
Fetales Kälberserum, Biochrom, Berlin	1:50
sterilfiltrieren, Lagerung bei 4 °C	

<b>Proliferationsmedium ENS (human)</b>	
Dulbecco's Modified Eagle Nutrient Mixture F-12 Medium, PAA, Pasching, Österreich	
Ciprofloaxin Fresenius Kabi AG, Bad Homburg	1:400
L-Glutamin 100x stock, Gibco, Karlsruhe	1:100
Metronidazol, Fresenius Kabi AGm Bad Homburg	1:100
N2-Supplement 100x stock, Gibco, Karlsruhe	1:100
Penicillin/Streptomycin, 100x stock, PAA	1:100
20 µg/ml bFGF, täglich frisch zugeben, Sigma-Aldrich, München	20 µg/ml
20 µg/ml EGF, täglich frisch zugeben, Sigma-Aldrich, München	20 µg/ml
B27, Gibco, nur am 1. Tag	1:50
Proliferationsüberstand Maus	50%

<b>Differenzierungsmedium Human ENS</b>	
Dulbecco's Modified Eagle Nutrient Mixture F-12 Medium, PAA, Pasching, Österreich	
N2-Supplement 100x stock, Gibco, Karlsruhe	1:100
Penicillin/Streptomycin 100x stock, PAA, Pasching, Österreich	1:100
L-Glutamin 100x stock, Gibco, Karlsruhe	1:100
Ascorbat-2-Phosphat (Endkonz. 200 µM), Sigma-Aldrich, München	1:1000
Fetales Kälberserum, Biochrom, Berlin	1:50
Differenzierungsüberstand murin (steril)	50%
sterilfiltrieren, Lagerung bei 4 °C	

<b>Zellkulturplattenbeschichtung</b>	
Multiwellplatten, Greiner, Frickenhausen oder Becton Dickinson, Heidelberg	
Fibronectin, Sigma-Aldrich, München	1 µg/cm <sup>2</sup>
Poly-L-Ornithin, Sigma-Aldrich, München	10 µg/ml
Laminin, Sigma-Aldrich, München	2 µg/cm <sup>2</sup>
über Nacht inkubieren bei 37°C (Inkubator), danach 1x mit HBSS ohne Mg <sup>2+</sup> und Ca <sup>2+</sup> (PAA, Pasching, Österreich) waschen	

### 2.5.3. Immunhistologie

<b>Kits &amp; Fertiglösungen</b>	
Artikel	Hersteller
Fluorescence Mounting Medium	Dako, Glostrup, Dänemark
Ziegenerum	Dako, Glostrup, Dänemark
Tissue Tek <sup>®</sup> O.C.T. <sup>™</sup> Compound	Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Roti <sup>®</sup> Histofix	Roth, Karlsruhe
Roti <sup>®</sup> Histol (Xylol-Ersatzstoff)	Roth, Karlsruhe

<b>Saccharose-Lösung zur Kryoprotektion</b>	
Saccharose, Sigma-Aldrich, München	10 g
Aqua bidest	50 ml
Lösung immer frisch ansetzen	

<b>Tris-Puffer (TBS; 10x)</b>	
Tris Base (121,12 g/mol), Sigma-Aldrich, München	30,3 g
NaCl (58,44 g/mol), Sigma-Aldrich, München	81,5 g
Ad 1 l Aqua bidest, pH 7,5	
Lagerung bei RT, Arbeitslösung 1x	

<b>0,1 % Tris-BSA :</b>	
Tris-Puffer (1x)	50 ml
Albumin Rinderserum (=BSA), Sigma-Aldrich, München	50 mg
Lagerung bei 4 °C	

<b>Borax-Puffer</b>	
Di-Sodium-Tetraborat, Merck, Darmstadt	19,07 g
Ad 500 ml Aqua bidest, pH 8,5	
Lagerung bei RT	

<b>Zitratpuffer (10x):</b>	
Zitronensäure-Monohydrat, Sigma-Aldrich, München	21 g
Ad 1 l Aqua bidest, pH 6,0	
Lagerung bei RT	

### 2.5.3. Polymerase-Kettenreaktion

<b>Kits &amp; Fertiglösungen</b>	
Artikel	Hersteller
Alu I Set	Promega, Madison, U.S.A.
Deoxynucleosid Triphosphate Set	Roche, Mannheim
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Gel Red Nucleid Acid Stain	Biotium, Hayward, U.S.A.
Ladepuffer Blue/Orange 6x	Promega, Madison, U.S.A.
Marker 10 bp	Promega, Madison, U.S.A.
Marker Gel Pilot 1000 bp Plus	Qiagen, Hilden
Top Taq Polymerase Set	Qiagen, Hilden

<b>Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Lösung (0,5 M)</b>	
EDTA, Sigma-Aldrich, München	18,6 g
Ad 100 ml Aqua bidest, pH 8,0 einstellen	

<b>50 x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)</b>	
Tris-Base, Sigma-Aldrich, München	242 g
Essigsäure (100%), Merck, Darmstadt	57,1 ml
0,5M EDTA-Lösung	100 ml
Ad 1 l Aqua bidest, pH 8,5 einstellen, Arbeitslösung 1x	

<b>Agarose Gel (2%ig / 3%ig)</b>	
1x TAE	50 ml
LE Agarose, Biozym, Oldendorf	1 g/1.5 g
Gel Red Nucleid Acid Stain, Biotium Hayward, U.S.A.	5 µl
Erst Agarose in TAE aufkochen (Mikrowelle), dann Gel Red in heiße Agarose-Lösung geben und in eine Gel-Kammer mit Kämmen gießen, auskühlen lassen	

## **2.6. Zellkultur und zellbiologische Methoden**

### **2.6.1. Isolation und Kultivierung muriner enterischer Progenitorzellen**

Das Protokoll zur Isolation und Kultivierung muriner enterischer Progenitorzellen ist aus [236] adaptiert und modifiziert worden.

Um murine enterische Vorläuferzellen zu erhalten, wurden neugeborene (P 0-1) C57Bl/6 oder eGFP positive Mäuse verwendet. Diese wurden durch Dekapitation sakrifiziert, ihr Bauchraum unter einer Sterilbank eröffnet und der gesamte Darm entnommen. Dieser wurde zur Präparation in eisgekühltes HBSS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  überführt. Unter einer Stereolupe wurden mit einer feinen Schere Mesenterien und Blutgefäße vorsichtig von der Darmaußenseite entfernt und die Längs- und Ringmuskelschicht des Darmes mit medizinischen Pinzetten abgezogen. Bis zum Verdau wurden die Muskelschichten in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß gefüllt, mit eisgekühltem HBSS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  überführt und vorsichtig zerkleinert. Der Verdau der abgezogenen Muskelschichten erfolgte im 1,5 ml Eppendorf Gefäß in 1 ml steriler Enzymlösung für 30 min bei 37 °C im Wasserbad. Nach 10 min Inkubationszeit wurde 0,05 % DNase I hinzugefügt und die gesamte Lösung mit einer abgeflamten 1 ml Pipettenspitze vorsichtig trituiert. Nachfolgend wurde fetales Kälberserum (10 % Endkonzentration) hinzugegeben und wiederum mit einer abgeflamten Pipettenspitze trituiert. Danach wurde die Suspension 2 x bei 200 x g in einer Tischzentrifuge bei Raumtemperatur gewaschen, beim ersten Mal mit HBSS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ , das zweite Mal mit DMEM/F-12. Schlussendlich wurde das Pellet in Proliferationsmedium aufgenommen, die Zellzahl bestimmt (siehe Punkt 2.6.3) und auf Sechs-Well-Platten ausgesät (250 000 Zellen pro Well). Am ersten Tag der Proliferation wurde B27 zugesetzt und bei 37 °C in einer feuchten Atmosphäre und 5 %  $\text{CO}_2$  im Inkubator kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle drei Tage gewechselt, Wachstumsfaktoren EGF (20 ng/ml) und bFGF (20 ng/ml) jedoch täglich ins Medium appliziert.

Wenn eine Proliferation der Zellen im undifferenzierten Zustand nachgewiesen werden sollte, wurde ab dem zweiten Kultivierungstag 1  $\mu\text{M}$  BrdU labeling reagent in das Zellkulturmedium hinzugefügt.

Um eine Differenzierung der Zellaggregate hervorzurufen, wurden dem Kulturmedium die Wachstumsfaktoren entzogen und stattdessen 2 % FCS und A2P

(200  $\mu\text{M}$ ) hinzugefügt (Differenzierungsmedium Maus ENS). Hierbei wurden die Zellen auf 48-Well-Platten, welche einen Tag zuvor beschichtet wurden, ausgesät. Zellaggregate, welche zur Implantation in den Maudarm vorgesehen waren, wurden sieben Tage ohne Herbeiführung einer Differenzierung kultiviert und am siebten Tag der Kultivierung direkt vor der Implantation zweimal mit steriler Dulbecco's phosphatgepufferter Salzlösung (dPBS) gewaschen.

### **2.6.2. Isolation und Kultivierung humaner enterischer Progenitorzellen**

Nach Erhalt des Darmmaterials aus dem Operationssaal wurde ein Teil eines gesunden Darmabschnittes vom Pathologen abgeschnitten und sofort in eiskaltes HBSS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  mit 1 % Pen/Strep, 1 % Metronidazol und 0,25 % Ciprofloaxin überführt. Unter der Sterilbank wurde das erhaltene Gewebe von Mesenterien und Fett befreit und mehrfach in frischem HBSS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ , welches mit voran beschriebenen Antibiotika versetzt war, gewaschen, um eventuell vorhandene Blut- und Kotreste zu entfernen. Mit Hilfe von anatomischen Pinzetten wurden die Muskelschichten von der Submukosa abgezogen, mit zwei Skalpellens so zerkleinert, dass sich die Stückchen durch die Öffnung der 25 ml Pipette passten und zwei weitere Male in frischem HBSS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  gewaschen. Danach wurde das Muskelgewebe in HBSS mit je 25 ml Verdauungslösung 2 x 30 min verdaut. Nach je 10 min der Verdauzeit wurde 0,05 % DNase I zugegeben und das Gewebe erst mit einer 10 ml, dann mit einer 5 ml Stangenpipette trituiert.

Am Ende des Verdaus wurden 10 % FCS zur Lösung hinzugefügt. Nach großzügiger Durchmischung ließ man die noch vorhandenen Gewebestückchen absinken und entnahm den Überstand. Dieser wurde bei 200 x g zentrifugiert und anschließend zweimal bei 200 x g gewaschen, beim ersten Mal mit HBSS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ , beim zweiten Mal mit DMEM/F-12. Danach wurde das Zellpellet mit 50 % Proliferationsmedium human und 50 % murinem steril filtriertem Proliferationsüberstand aufgenommen und in ein Well einer 12-Well-Platte ausgesät. Am ersten Tag wurde B27 zugegeben. Nachfolgend wurden täglich die Wachstumsfaktoren EGF (20 ng/ml) und bFGF (20 ng/ml) hinzugegeben. Das Zellkulturmedium wurde alle 3 Tage gewechselt.

Sämtliche weitere Schritte, wie z. B. die Induktion der Differenzierung oder die Vorbereitung zur Implantation, wurde wie für murine Zellen durchgeführt.

### 2.6.3. Bestimmung der Zellzahl

Um sicherzustellen, dass nach der Isolierung der Zellen immer die gleiche Zellzahl in die entsprechende Well-Größe ausgesät wurde, wurde die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Dafür wurde das Zellpellet mit Proliferationsmedium aufgenommen und 10 µl dieser Suspension mit der gleichen Menge Trypanblau gründlich gemischt. Tote Zellen werden durch Trypanblau, aufgrund ihrer nicht mehr intakten Zellmembran, angefärbt, wobei lebende Zellen nicht angefärbt werden.

Zur Zählung wurde zusätzlich eine Neubauer-Zählkammer benötigt, welche frisch gereinigt und mit einem entsprechenden Deckglas versehen werden musste. Der richtige Sitz des Deckglases wurde durch newtonsche Ringe auf den Trägerstegen der Zählkammer angezeigt. Die gut durchmischte Lösung aus Zellsuspension und Trypanblau wurde dann am Rand des Deckglases aufgetropft und durch Kapillarkräfte in die normierte Zählkammer gesaugt.

Die Zellzählung erfolgte unter einem Lichtmikroskop bei 20-facher Vergrößerung. Dabei wurden 4 Großquadrate mit je 16 Kleinquadraten von links oben nach rechts unten ausgezählt. Aus der ermittelten Zellzahl der vier Großquadrate wurde der Durchschnitt gebildet und mit dem Kammerfaktor  $10^4$  multipliziert, welcher aus der Kammertiefe von 0,1 mm und der Fläche eines Großquadrates von  $0,1 \text{ mm}^2$  ergab. Daraus ließ sich ein Volumen von 1 µl errechnen. Die Zellzahl konnte durch Einbeziehung des Kammerfaktors und des Verdünnungsfaktors auf einen Milliliter bezogen werden. Somit ergab sich folgende Formel zur Ermittlung der Zellzahl:

$$\text{Zellzahl / ml} = \text{Durchschnitt der Großquadratzellzahl} \times 10^4 \times 2$$



## 2.7. Tierexperimentelle Methoden

### 2.7.1. Implantationsprozedere

Zur Implantation der in Proliferation befindlichen und der auf dem CCC andifferenzierten Enterosphären, wurden acht bis sechzehn Wochen alte Mäuse (25 – 30 g) mit Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (5 mg/kg) durch intraperitoneale Injektion anästhesiert. Nach Einsetzen der Narkose wurden die Mäuse auf den Rücken gelegt und der Bauchraum durch einen Einschnitt entlang der Mittellinie eröffnet.

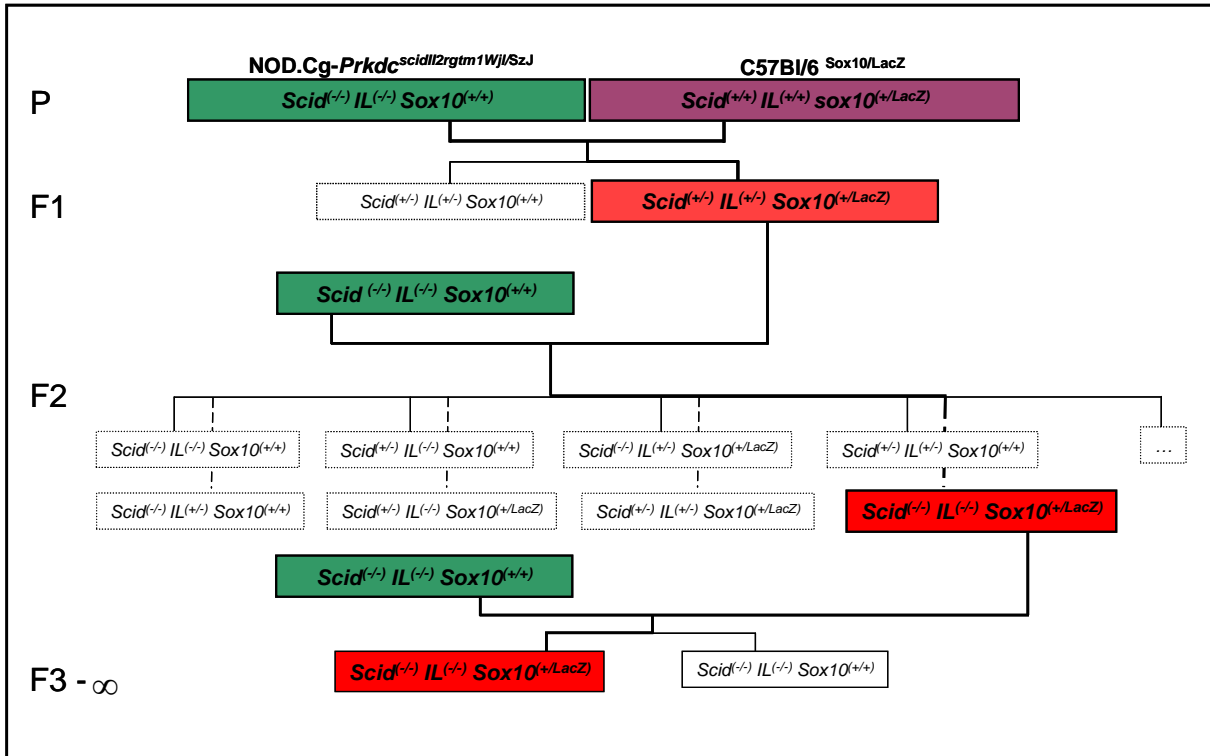
Zur Injektion der Zellen wurde das distale Kolon aus dem Bauchraum vorgelagert und mit Hilfe einer Haltenaht fixiert. Dies verhindert ein Verrutschen des Darmes während der Zellinjektion. Danach wurden an drei unterschiedlichen Stellen am distalen Ende des Kolons mit einer 30G Nadel je 100 µl Neurosphären-Suspension (200 Neurosphären/ml) injiziert.

Die Implantationen wurden unter Zuhilfenahme einer Stereolupe (Olympus SD 30, Olympus, Hamburg) vorgenommen. Nach der Operation hatten die Mäuse freien Zugang zu Nahrung und Wasser. 3 bzw. 12 Wochen nach der Implantation wurden die Mäuse nach CO<sub>2</sub>-Begasung per zervikale Dislokation sakrifiziert und der zuvor transplantierte Bereich für immunhistologische Untersuchungen entnommen.

### 2.7.2. Kreuzung C57Bl/6SOX10LacZ x NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ

Zum Erhalt eines immunsupprimierten HSCR Mausmodells wurden C57Bl/6<sup>Sox10/LacZ</sup>-Mäuse mit dem immunsupprimierten Mausstamm NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG; Charles River) gekreuzt (Abb. 7). Dabei ist der NSG-Stamm einer der am höchsten immunsupprimierten Maus-Inzuchtstämme, die derzeit erhältlich sind [237]. Ihnen fehlen sowohl reife T-, B- als auch natürliche Killerzellen [234]. Darüber hinaus sind einige Zytokin-Signalwege gestört und eine angeborene Immunität ist nicht vorhanden [234]. Die C57Bl/6<sup>Sox10/LacZ</sup>-Mäuse hingegen haben zwar ein intaktes Immunsystem, aber eine Deletion auf einem Genlocus für Sox10 und anstattdessen ein Insert für LacZ. Somit ist eine gesunde Entwicklung des ENS gestört und die Mäuse können ein Megacolon durch Fehlen der ENS-Zellen im Enddarm entwickeln. Gewollt waren in der F1-Generation Mäuse mit dem Genotyp Scid<sup>(+/-)</sup> IL<sup>(+/-)</sup> Sox10<sup>(+/LacZ)</sup>, die mit einer NSG-Maus rückgekreuzt wurden. In der F3- und allen

weiteren Generationen sollten die Tiere  $Scid^{(-/-)} IL^{(-/-)} Sox10^{(+LacZ)}$  oder  $Scid^{(-/-)} IL^{(-/-)} Sox10^{(+/+)}$  Genotyp zeigen.



**Abbildung 7: Kreuzungsschema C57Bl/6<sup>Sox10/LacZ</sup> x NOD.Cg-Prkdc<sup>scidII2rgtm1Wjl/SzJ</sup>.** In jeder F-Generation wurde mit einer NOD.Cg-Prkdc<sup>scidII2rgtm1Wjl/SzJ</sup>-Maus rückgekreuzt. P = Elterngeneration, F = Generation der Nachkommen, ∞ = unendlich. Rot = erwünschter Genotyp.

## **2.8. Molekularexperimentelle Methoden**

### **2.8.1. DNA-Extraktion**

Um zu kontrollieren, welche der Jungmäuse die gewollte Genotyp-Kombination haben, wurden diesen im Alter von 21 Tagen am Ohr mittels einer Lochzange Biopsien entnommen. Jeder Maus wurde aufgrund ihrer Ohrmarkierung eine Nummer zugeordnet und die Biopsien dementsprechend beschriftet. Nachfolgend wurden die Biopsien in ein Eppendorf-Gefäß überführt und die DNA mittels eines DNA-Extraktionskits von Qiagen gemäß der Benutzeranleitung extrahiert. Nachfolgend das Extraktionsprotokoll in Kürze:

- ◆ Ohrbiopsien mit je 180 µl ATL Puffer und 20 µl Proteinase K nach gutem Mixen 2 h bei 56 °C verdauen lassen.
- ◆ Gut vermischen und 200 µl AL Puffer hinzufügen. Nochmals gut mischen.
- ◆ 200 µl 96-100 %igen EtOH zugeben. Erneut gut mischen.
- ◆ Mixtur in DNeasy Mini Spin Säule inklusive Auffangbehältnis überführen. Bei 6000 x g (8000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Durchfluss verwerfen.
- ◆ 500 µl AW1 Puffer zugeben und bei 6000 x g (8000 rpm) für 1 min zentrifugieren. Durchfluss verwerfen.
- ◆ 500 µl AW2 Puffer zugeben und bei 20000 x g (14000 rpm) für 3 min zentrifugieren. Durchfluss verwerfen.
- ◆ Säule in neues Auffangbehältnis überführen und DNA durch das Hinzufügen von 200 µl AE Puffer eluieren. Für 1 min bei Raumtemperatur inkubieren und nachfolgend bei 6000 x g (8000 rpm) für 1 min zentrifugieren.
- ◆ Im Durchfluss befindet sich nun die DNA und kann bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt werden.

### **2.8.2. Polymerase-Kettenreaktion**

Zur Überprüfung des genetischen Status der erhaltenen Mäuse wurde für die jeweiligen genetischen Merkmale eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vorgenommen. Hierfür wurden folgende Primer und PCR-Protokolle verwendet:

**Tabelle 2: Zur Genotypisierung der Mäuse verwendete Primer:** alle Primer wurden von Eurofins mwg Operon, Ebersberg hergestellt. F = forward, vorwärts, R = reverse, rückwärts, B = backward, rückwärts.

Primer/Oligoname	Sequenz (5' - 3')
Scid F	GGAAAAGAATTGGTATCCAC
Scid R	AGTTATAACAGCTGGGTTGGC
IL2MUT F	CTTGGGTGGAGAGGCTATTC
IL2MUT R	AGGTGAGATGACAGGAGATC
IL2WT F	CTTTATTGATAACGATCTATCCCTCACCC
IL2WT R	CTCCACTCTGCAGAGTCTATGGAATCC
Sox10 F	CAGGTGGGCGTTGGGCTCTT
Sox10 B	CAGAGCTTGCCTAGTGTCTT
LacZ B	TAAAATGCGCTCAGGTCAA

**Tabelle 3: PCR-Protokoll Sox10/LacZ Genotyp Screening.**

Wt =wildtyp, mut = mutiert, hetero = heterozygot.

Reagenz	1x Ansatz	PCR-Konditionen Sox10/LacZ Screening			
DNA/H <sub>2</sub> O	13,5 µl	Hold	94°C	3 min	für 34 Zyklen
DMSO (Merck)	1,25 µl	Zyklus	D 94°C	30 sec	
10x PCR Puffer	2,5 µl		A 55°C	30 sec	
25mM MgCl <sub>2</sub>	2 µl		E 72°C	30 sec	
2,5 mM dNTP	2,5 µl	Hold	72°C	10 min	
Primer Sox F 10 pMol	1 µl	Hold	4°C	∞	
Primer Sox B 10 pMol	1 µl	Erwartete PCR Produkte			
Primer LacZ B 10 pMol	1 µl	wt	506 bp		
Taq-Polymerase	0,25 µl	mut	600 bp		
Gesamt	25 µl	hetero	506 bp + 600 bp		

**Tabelle 4: PCR Protokoll IL2 Genotyp Screening.**

Wt =wildtyp, mut = mutiert, hetero = heterozygot

Reagenz	1x Ansatz	PCR-Konditionen IL2 Screening			
DNA/H <sub>2</sub> O	2 µl	Hold	94°C	3 min	für 12 Zyklen
10x PCR Puffer	2,5 µl	Zyklus	D 94°C	20 sec	
25mM MgCl <sub>2</sub>	2 µl		A 64°C	30 sec	
2,5 mM dNTP	2 µl		E 72°C	35 sec	
Primer IL2WT F 10 pMol	1 µl	Zyklus	D 94°C	20 sec	für 15 Zyklen
Primer IL2WT R 10 pMol	1 µl		A 58°C	30 sec	
Primer IL2MUT F 10 pMol	1 µl		E 72°C	35 sec	
Primer IL2MUT R 10 pMol	1 µl	Hold	72°C	2 min	
Taq-Polymerase	0,25 µl	Hold	10°C	∞	
H <sub>2</sub> O	12,25 µl	Erwartete PCR Produkte:			
Gesamt	25 µl	wt	500 bp		
		mut	280 bp		
		hetero	280 + 500 bp		

**Tabelle 5: PCR Protokoll Scid Genotyp Screening.**

Wt =wildtyp, mut = mutiert, hetero = heterozygot.

Reagenz	1x Ansatz	PCR-Konditionen Scid Screening				
DNA/H <sub>2</sub> O	14,6 µl	Hold	94°C	1,5 min		
10x PCR Puffer	2,5 µl	Zyklus	D	94°C	30 sec	für <b>35</b> Zyklen
25mM MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl		A	<b>53°C</b>	<b>30 sec</b>	
2,5 mM dNTP	2 µl		E	72°C	30 sec	
Primer Scid F 10 pMol	1,2 µl	Hold	72°C	2 min		
Primer Scid R 10 pMol	1,2 µl	Hold	10°C	∞		
Taq-Polymerase	0,5 µl	<b>Erwartete PCR Produkte (nach Verdau):</b>				
H <sub>2</sub> O	0,5 µl	wt	11 bp + 68 bp			
Gesamt	25 µl	mut	11 bp + 28 bp + 38 bp			
		hetero	11 bp + 28 bp + 38 bp + 68 bp			

Verdau Scid	1x Ansatz
PCR-Produkt Scid	8 µl
10x Puffer	2 µl
BSA	0,2 µl
Alu I	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	9,3 µl
Gesamt	20 µl

Die Ansätze der PCR wurden auf einem auf -20°C vorgekühlten Alu-Rack pipettiert, um unerwünschte, frühzeitige Reaktionen zu vermeiden und mit dem entsprechenden Programm im PCR-Cycler prozessiert. Nach Beendigung der Polymerase-Kettenreaktion wurde das Agarosegel vorbereitet (siehe Punkt 1.1.2). Nach der Scid-PCR jedoch musste noch ein zweistündiger Verdau bei 37 °C auf einem Thermorüttler mit Hilfe des Enzyms Alu I vorgenommen werden. Ansonsten sind die PCR Produkte der Wildtyp-Mäuse nicht von denen der mutanten Mäuse unterscheidbar.

Durch Agarose-Gelelektrophorese sollten die einzelnen in der PCR vermehrten DNA-Fragmente in einzelne Banden auf Agarosegel aufgetrennt werden. Bei Gelen zur Auftrennung von IL2 und Sox10 DNA-Fragmenten wurde ein 1000 bp Marker verwendet, bei Gelen zur Scid-PCR ein 1000 bp Marker und ein 10 bp Marker. Zur besseren Verdichtung der DNA vor Beladung der Geltaschen wurde ein Ladepuffer der DNA-Probe hinzugefügt. Außerdem färbt der Ladepuffer das PCR-Produkt an und die Beladung der Geltaschen wird vereinfacht.

## **2.9. Histologische Methoden**

### **2.9.1. Fixierung, Cryoprotektion und Einbettung**

#### **2.9.1.1. Gewebefixierung und Fixierung von Zellkulturen**

Nach Entnahme des Darmabschnittes, in dem sich die transplantierten Zellen befanden, wurde in jedem Fall das Gewebe über Nacht in 4,5 %iger Formaldehydlösung (Roti-Histofix) ca. 24 h lang fixiert, um eine Beeinträchtigung bzw. Veränderung des biologischen Gewebes zu unterbinden, und danach dreimal für ca. 10 min mit TBS oder PBS gewaschen. Die Zellkulturen wurden für 30 min mit einer 4,5 %igen Formaldehydlösung fixiert.

#### **2.9.1.2. Einbettung zur Herstellung von Paraffinschnitten**

Nach Fixierung und Waschung der Gewebeproben wurde dem Gewebe in einem Einbettautomaten in einer aufsteigenden Alkoholreihe das Wasser entzogen und durch Xylol ersetzt. Abschließend wurde das Material in warmem Paraffin zu einem Block gegossen. Nach Auskühlen des Blocks konnte dieser zur Herstellung von Gewebeschnitten verwendet werden.

#### **2.9.1.3. Einbettung zur Herstellung von Kryostatschnitten**

Bei Geweben, die für die Herstellung von Kryostatschnitten verwendet werden sollten, wurde nach Fixierung eine Kryoprotektion vorgenommen. Das bedeutet, es sollte eine Bildung von Eiskristallen verhindert werden, welche die Gewebestruktur zerstören würden. Hierfür wurde das Gewebe für 24 h bei 4 °C in einer 20 %igen Saccharose-Lösung inkubiert.

Danach wurde das Gewebestück kurz mit Zellstoff abgetupft und in ein Einbettgeschälchen aus Plastik (Peel-A-Way® Disposable Embedding Molds) überführt, mit Tissue Tek® O.C.T.™ Compound überschichtet, wobei Luftblasen zu vermeiden waren, und auf Trockeneis eingefroren. Tissue Tek® O.C.T.™ Compound ist ein Gemisch aus Harzen und wasserlöslichen Glykolen, welche zusätzlich zur Saccharose vor Gefrierschäden des Gewebes schützen sollen. Die gefrorenen Gewebestücke wurden bei -80 °C aufbewahrt.

## **2.9.2. Herstellung von Gewebeschnitten**

### **2.9.2.1. Paraffinschnitte**

Das auf Blöcke befestigte in Paraffin gegossene Gewebe wurde für mindestens 2 h bei -20 °C eingefroren, um eine optimale Härte zur Anfertigung von Schnitten zu erhalten. Nach Einspannen des Blockes in die Schneidevorrichtung wurde überschüssiges Paraffin in 15 µm Schritten abgetragen, bis das zu schneidende Gewebe erreicht wurde. Hiervon wurden 4 µm dicke Serienschnitte angefertigt. Diese wurden mit Hilfe eines feinen Pinsels in eine Wasserschale mit Raumtemperatur warmem destilliertem Wasser platziert. Hier fand eine Vorstreckung der Schnitte statt und das Band an Schnitten wurde mit einer feinen Nadel in Stücke mit je 5 Schnitten zerteilt. Diese wurden mit einem unbeschichteten Objektträger in ein 45 °C warmes Wasserbad überführt, um diese durch die Oberflächenspannung des Wassers zu glätten und dann mit einem beschichteten Objektträger (SuperFrost® Plus Objektträger) aufgenommen. Der Objektträger wurde bei 40 °C auf einer Heizplatte getrocknet. Nach Trocknung wurden die Schnitte zur Aufbewahrung in dafür vorgesehenen Boxen bei Raumtemperatur gelagert.

### **2.9.2.2. Kryostatschnitte**

Zur Anfertigung von Kryostatschnitten wurde der bei -80 °C gelagerte Block ca. 2 h bei -20 °C eingefroren, um bei Beginn des Schneideprozesses direkt die optimale Schneidetemperatur von -20 °C zu erhalten und so eine mögliche Ausdehnung der Schnitte während des Schneidens zu unterbinden. Nach Entnahme des gefrorenen Blockes aus dem Eisfach wurde dieser direkt auf den Schneideblock mit Hilfe von Tissue Tek® O.C.T.™ Compound eingefroren und in die dafür vorgesehene Halterung im Kryostaten eingespannt. Überschüssiges Tissue Tek wurde in 30 µm Schritten abgetragen. Bei Erreichen des Gewebes wurden je nach Konstitution des Gewebes 10 µm oder 12 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf -20 °C vorgekühlte und beschichtete SuperFrost Objektträger kalt aufgenommen. Nachfolgend wurden die Schnitte per Hand zügig aufgetaut. Die Schnitte wurden solange getrocknet bis das um die Gewebeschnitte befindliche Tissue Tek nicht mehr glänzte bzw. trocken war. Danach wurden die Kryostatschnitte bei -20 °C gelagert.

### 2.9.3. Immunhistochemie

#### 2.9.3.1. *Immunfluoreszenzfärbung auf Paraffinschnitten*

Vor Durchführung des Färbeprotokolls wurden die Paraffinschnitte nach folgendem Schema entparaffiniert und rehydriert:

- ◆ 2 x 10 min in Roti<sup>®</sup>-Histol (Xylol-Ersatzstoff)
- ◆ 1 x 10 min in einem 1:1 Gemisch aus Roti<sup>®</sup>-Histol und EtOH
- ◆ 2 x 5 min in 100 % EtOH
- ◆ 1 x 5 min in 96 % EtOH
- ◆ 1 x 5 min in 70 % EtOH
- ◆ kurz in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> waschen

Danach wurden die Schnitte zur Antigendemaskierung ca. 10 min in Citratpuffer sprudelnd in der Mikrowelle auf höchster Stufe gekocht und anschließend 10 min auf Eis gekühlt. Nach dreimaligem Waschen der Objektträger in 1 x TBS wurden die Objektträger mit 4 % Ziegenserum (DAKO) und 0,1 % Triton-X 100 (Sigma-Aldrich, München) in 0,1 % TrisBSA inkubiert. Dies erfolgte, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermindern. Vor der Blockierung wurden die Schnitte mit einem Fettstift umkreist, um ein Verlaufen der Blockierlösung zu verhindern. Direkt danach wurde der primäre Antikörper in entsprechender Verdünnung ebenfalls mit 0,1 % Triton-X 100 in 0,1 % TrisBSA eingesetzt und auf die Schnitte aufgetragen. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht in einer feuchten Kammer.

Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte dreimalig je 10 min in TBS gewaschen. Nachfolgend wurde der sekundäre Antikörper, welcher mit einem Fluorochrom markiert ist, in entsprechender Verdünnung in 0,1 % Triton-X 100 in TBS aufgetragen und für 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Um ein Austrocknen der Schnitte zu vermeiden und Antikörper zu sparen, wurden sie während der Inkubationen zusätzlich zur Benutzung der feuchten Kammer mit einem passenden Stück Parafilm abgedeckt. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurden die Schnitte erneut dreimal in TBS gewaschen, dann gut abgeklopft, mit einem staubfreien Zellstofftuch vorsichtig trocken gewischt und mit Fluorescent Mounting Medium und Deckgläsern eingedeckt.



### 2.9.3.2. **Immunfluoreszenzfärbung auf Kryostatschnitten, Zellkulturen sowie Whole mount-Präparaten**

Die Fluoreszenzfärbung von Kryostatschnitten, Zellkulturen und Wholemout-Präparaten erfolgte, wie im Punkt 2.8.3.1 beschrieben, jedoch ohne den Entparaffinierungs- und den Demaskierungsschritt.

Bei Whole mount-Färbungen erhöhte sich die Inkubationszeit der Blockierung mit Serum auf 2 x 20 min bei RT und die von Primär- und Sekundärantikörpern auf je 72 h bei 4 °C, wobei die Präparate in Eppendorfgläsern in der Antikörperlösung schwammen.

Zur immunhistologischen Detektion von BrdU wurden Zellkulturen und Kryostatschnitte 30 min in vorgewärmter HCl (2N) inkubiert und nachfolgend zweimal mit Borax-Puffer gewaschen. Im Anschluss daran folgte das Standard Immunhistologie-Protokoll.

### 2.9.3.3. **Verwendete Antikörper zur Immunhistochemie**

Tabelle 6: Verwendete primäre Antikörper

Name	Wirt/Typ	Einsatz	Anbieter
anti-Green Fluorescent Protein (GFP)	Huhn, polyklonal	1:500	AbCam, Cambridge, Großbritannien
anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	Kaninchen, polyklonal	1:500	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
anti-Human Neuronal Protein HuC/D (HuC/D)	Maus, monoklonal	1:20	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
anti-Human nuclei (HumNuc)	Maus, monoklonal	1:50	Millipore, Temecula, Vereinigte Staaten von Amerika U.S.A.
anti-Human neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS)	Kaninchen, polyklonal	1:500	Biotrend Chemikalien, Köln
anti-Human protein gene product 9.5 (PGP9.5)	Kaninchen, polyklonal	1:500	AbD Serotec, Oxford, Großbritannien
anti-S100β	Kaninchen, monoklonal	1:500	AbCam, Cambridge, Großbritannien
anti-β-III Tubulin (TUJ1)	Maus, monoklonal	1:500	Covance, Emeryville, Vereinigte Staaten von Amerika U.S.A.
anti-β-III Tubulin (TUJ1)	Kaninchen, polyklonal	1:2000	Covance, Emeryville, Vereinigte Staaten von Amerika U.S.A.
anti-BrdU	Ratte	1:50	AbD Serotec, Oxford, Großbritannien
anti-BrdU	Maus	1:100	Dako, Glostrup, Dänemark

**Tabelle 7: Verwendete sekundäre Antikörper**

<b>Sekundäre Antikörper</b>	<b>Wirt</b>	<b>Einsatz</b>	<b>Anbieter</b>
Dylight 488 anti-chicken IgY	Ziege	1:500	AbCam, Cambridge, Großbritannien
Cy3 anti-mouse	Ziege	1:400	Invitrogen, Darmstadt
Cy3 anti-rabbit	Ziege	1:400	Invitrogen, Darmstadt
Cy3 anti-rat	Ziege	1:400	Invitrogen, Darmstadt
Cy5 anti-mouse IgG (H+L)	Ziege	1:400	Invitrogen, Darmstadt
Alexa488 anti-mouse	Ziege	1:400	Invitrogen, Darmstadt
Alexa488 anti-rabbit	Ziege	1:400	Invitrogen, Darmstadt
Alexa660 anti-mouse	Ziege	1:400	Invitrogen, Darmstadt

## **2.10. Auswertung und Statistik**

### **2.10.1. Quantifizierung neuronaler und glialer Zellen in Enterosphären**

Um später ausschließen zu können, dass die nach Differenzierung *in vitro* erhaltenen Zellen aus reifen Nervenzellen entstanden sind, sollte dies in undifferenzierten Enterosphären überprüft werden. Hierzu wurden die Därme von drei unabhängigen C57BL/6 Wüfeln mit je sechs Tieren (P 0) unabhängig voneinander präpariert, verdaut und die Zellen für sieben Tage bei 37 °C in einer feuchten Atmosphäre und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator kultiviert. Nachfolgend wurden die erhaltenen Enterosphären mit 4 % Paraformaldehyd für 20 min fixiert, in 2 %iger Agarose für Zellkultur (Sigma-Aldrich, München) gegossen, in Paraffin eingebettet und 5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Je Objektträger wurde ein Schnitt aufgenommen. Für Immunfluoreszenzfärbungen der Marker Hu C/D und nNOS wurden je Versuch fünf Schnitte ausgewählt, welche mindestens fünf Schnitte voneinander entfernt waren, um eine doppelte Zählung der Zellen zu vermeiden.

Die ausgewählten Schnitte wurden, wie im Punkt 2.9.3.1 beschrieben, gefärbt. Je Schnitt wurde ein Bild in 20-facher Vergrößerung aufgenommen, d. h. fünf Bilder pro Versuch, und nachfolgend die markerpositiven- und die DAPI-positiven Zellen mit dem Cell Counter Plug-in für Image J ausgezählt. Anschließend wurden die markerpositiven Zellen auf die DAPI-positiven normalisiert und je Versuch die Ergebnisse der einzelnen Bilder gemittelt. Die Ergebnisse aller drei Versuche wurden wiederum gemittelt und der Standardfehler errechnet.

### **2.10.2. Quantifizierung neuronaler und glialer Zellen (*in vitro*)**

Um die Verteilung von neuronalen und glialen Zellen nach Proliferation *in vitro* zu bestimmen, wurden die kompletten Därme von vier neugeborenen C57BL/6 Mauswelpen (P0) eines Wurfes getrennt voneinander präpariert und die ENS-Vorläuferzellen weiter separat isoliert.

Wie im Punkt 2.6.1. beschrieben, wurden diese für 7 Tage unter Proliferationsbedingungen kultiviert. Daraufhin wurden sie auf mit Laminin, Fibronectin und Poly-L-Ornithin beschichteten 48-Well-Platten unter Differenzierungsbedingungen für 7 Tage kultiviert (50 Neurosphären pro Well). Die anschließende Färbung ist, wie in Punkt 2.9.3.2 beschrieben, durchgeführt worden.

Nach dem Färbeprozedere wurden pro Well zehn Fotografien in 10-facher Vergrößerung aufgenommen und sowohl die DAPI-positiven Zellkerne als auch die Zellen, die für die jeweiligen Marker positiv waren, gezählt. Dies entspricht je Versuch ( $n = 4$ ; je 2 Wells) einer Fläche von  $2,828 \text{ mm}^2$ , d.h. insgesamt für alle Versuche  $11,311 \text{ mm}^2$ . Die Ergebnisse der vier Experimente wurden zusammengefasst und auf die gezählte DAPI-Zellzahl normalisiert. Ebenso wurde aus diesem Mittel der Standardfehler errechnet.

Für den Vergleich von Hu C/D- und nNOS-positiver Zellen in Sphären und *in vitro* differenzierten Zellen wurde zur Überprüfung der Signifikanz ein Mann-Whitney Rank Sum Test zum Vergleich zweier Gruppen durchgeführt. Signifikant werden Werte angesehen, deren P-Werte geringer als 0,001 sind.

### **2.10.3. Quantifizierung neuronaler und glialer Zellen nach Transplantation**

Um markerpositive Zellen 12 Wochen nach der Implantation der Neurosphären in die Maus quantifizieren zu können, wurden aus den entnommenen Därmen  $10 \mu\text{M}$  dicke Kryostatschnitte nach dem im Punkt 2.9.2.2 beschriebenen Protokoll von drei Tieren angefertigt und eine immunhistologische Färbung mit DAPI, eGFP und dem entsprechenden glialen oder neuronalen Marker vorgenommen. Nachfolgend wurden auf jedem zweiten Schnitt die markerpositiven, eGFP- und DAPI-positiven Zellen gezählt. Pro Tier wurden mindestens 100 Zellen gezählt. Daraufhin wurden die markerpositiven Zellen in Relation zu den DAPI- und eGFP-positiven Zellen gesetzt. Die Werte geben den Durchschnitt  $\pm$  den Standardfehler des Durchschnitts an.

### **2.10.4. Auswertung des BrdU-Inkorporationsversuchs (*in vitro*)**

Um das proliferative Potenzial der ENS-Progentioren quantifizieren zu können, wurden die Zellen von vier verschiedenen Mauswelpen (P1) eines Wurfes getrennt präpariert. Nachfolgend wurden diese für eine Woche mit  $1 \mu\text{M}$  BrdU unter Proliferationsbedingungen kultiviert. Je Maus wurden fünf Wells auf einer 48-Wellplatte beschichtet. Nach einer Woche in Differenzierung wurde eine immunhistologische Färbung für die Marker Hu C/D, nNOS, PGP9.5, TUJ1 und GFAP vorgenommen. Diese wurden in Kombination mit einem Antikörper gegen BrdU gefärbt. Anschließend wurden je Well 10 Aufnahmen in 10-facher Vergrößerung aufgenommen. Auf diesen randomisiert aufgenommenen Bildern wurden dann sowohl die DAPI- und markerpositiven Zellen gezählt, als auch die

DAPI- und markerpositiven Zellen, in deren Zellkern BrdU nachgewiesen wurde. Die Gesamtzellzahl der BrdU- und markerpositiven Zellen der 10 Bilder wurde auf die Anzahl der markerpositiven Zellen normiert. Insgesamt wurden je Versuch 6,005 mm<sup>2</sup> ausgezählt, d. h. für alle vier Versuche gesamt 24,02 mm<sup>2</sup>. Aus den Ergebnissen der vier Mäuse wurde dann der Mittelwert gebildet, wobei der Standardfehler aus diesem Mittel errechnet wurde.

### **2.10.5. Auswertung des BrdU-Inkorporationsversuchs nach Implantation**

Um BrdU- und markerpositive Zellen drei Wochen nach der Implantation der Neurosphären in die Maus beispielhaft quantifizieren zu können, wurden aus dem entnommenen Darm 10 µm dicke Kryostatschnitte nach dem im Punkt 2.9.2.2 beschriebenen Protokoll eines Tieres angefertigt und eine immunhistologische Färbung für DAPI, eGFP, sowie BrdU und dem entsprechenden glialen oder neuronalen Marker vorgenommen. Im Anschluss daran wurden auf jedem zweiten Schnitt die markerpositiven, eGFP- und DAPI-positiven Zellen gezählt, sowie die Zellen, die sowohl eine Färbung für den Marker, BrdU, DAPI und eGFP zeigten. Pro Marker wurden mindestens 100 Zellen eGFP-, DAPI- und markerpositive Zellen gezählt. Danach wurden positive Zellen für Marker, DAPI, eGFP und BrdU in Relation zu den DAPI-, eGFP- und markerpositiven Zellen gesetzt. Die Werte geben den Durchschnitt ± den Standardfehler des Durchschnitts an.



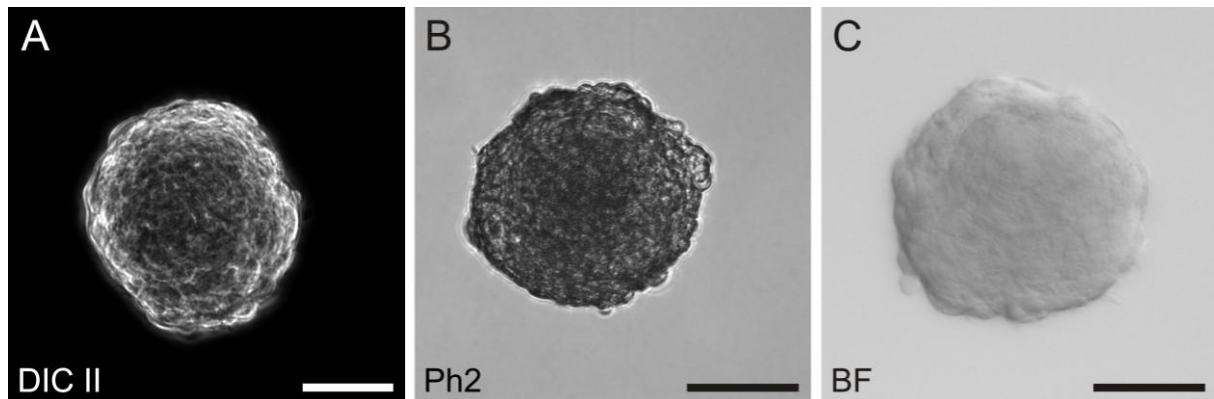
### 3. Ergebnisse

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es, das Potenzial von postnatalen neuronalen enterischen Vorläuferzellen muriner und humaner Herkunft zur Regeneration des ENS im immundefizienten Mausmodell zu evaluieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Möglichkeit der Isolation dieser Zellen, deren Proliferationsverhalten *in vitro*, sowie die Migrations- und Differenzierungseigenschaften *in vivo* untersucht werden. Des Weiteren sollte ein immundefizientes Morbus Hirschsprung-Mausmodell etabliert werden, welches es erlaubt, die Eigenschaften von humanen postnatalen Vorläuferzellen des ENS im Xenotransplantationsmodell zu analysieren.

#### 3.1. Isolation, Proliferation und Differenzierung enterischer Progenitorzellen

##### 3.1.1. Präparation und Proliferation muriner enterischer ENS-Zellen

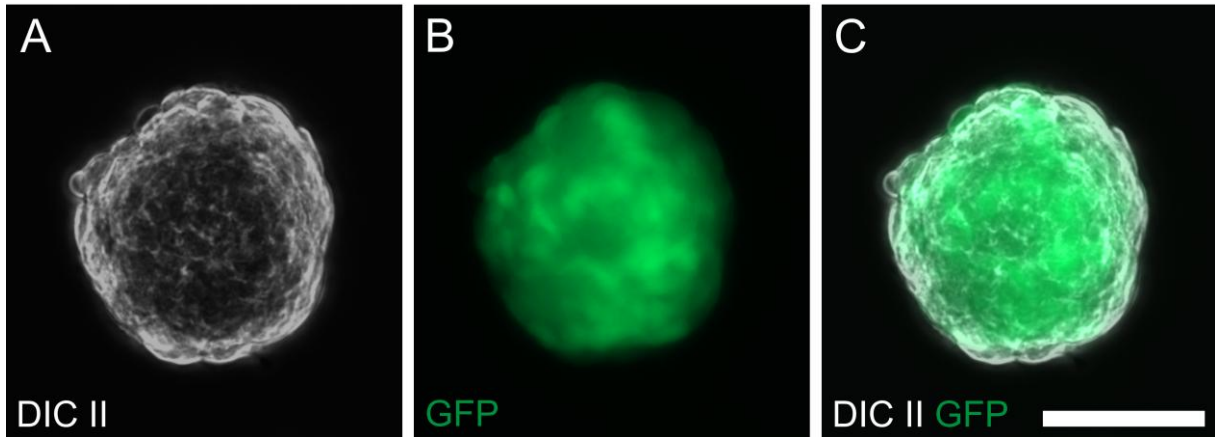
Aus den Darmmuskelschichten neugeborener C57Bl/6-Mäuse wurden die Zellen zunächst präpariert und für sieben Tage mit Wachstumsfaktoren kultiviert, um die Charakterisierung der murinen ENS-Vorläuferzellen vornehmen zu können. Unter diesen Kultivierungsbedingungen bildeten die ENS-Zellen nach ca. zwei Tagen neurosphärenartige Strukturen aus (Abb. 8).



**Abbildung 8: Enterische Neurosphären *in vitro*.** Die Zellen wurden sieben Tage unter Zugabe von Wachstumsfaktoren kultiviert. **(A)** Aufnahme mit DIC II (differenzieller Interferenzkontrast), **(B)** Aufnahme mit Phasenkontrast (PH2), **(C)** Aufnahme im Durchlicht (BF=Brightfield). Maßstab: 50  $\mu$ m.

Um in späteren Implantationsversuchen die transferierten Zellen identifizieren zu können, wurden aus Därfen frischgeborener C57Bl/6<sup>eGFP</sup>-Mäuse Zellen isoliert und kultiviert. Die Zellen dieser Mäuse exprimieren ein grün fluoreszierendes Protein, das in den Mäusen unter einem Aktinpromotor exprimiert wird und die Identifizierung im

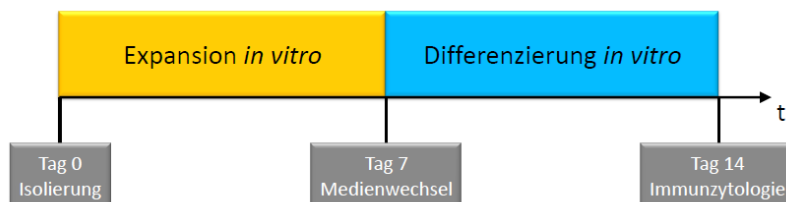
Empfängertier ermöglicht. Wie zuvor für die C57Bl/6-Mäuse beschrieben, entwickelten sich auch hier während der siebentägigen Proliferationsphase sphäroide Zellcluster. Erwartungsgemäß leuchteten lebende eGFP-positive Zellen im Fluoreszenzmikroskop grün (Abb. 9).



**Abbildung 9: eGFP-positive enterische Neurosphären *in vitro*.** Die Zellen wurden sieben Tage unter Zugabe von Wachstumsfaktoren kultiviert. **(A)** Aufnahme mit DIC II (differenzieller Interferenzkontrast). **(B)** Fluoreszenzaufnahme. Die Zellen der Sphäre exprimieren eGFP und leuchten grün. **(C)** Kombination von A und B. Maßstab: 50 µm.

### 3.1.2. Differenzierung *in vitro* proliferierter enterischer Progenitorzellen

Nachfolgend sollte die Differenzierung der Zellen eingeleitet werden, um untersuchen zu können, welche Zelltypen aus den isolierten und expandierten Zellen entstehen (Abb. 10). Dafür wurden Sphäroide auf mit Matrixproteinen beschichtete Platten überführt.

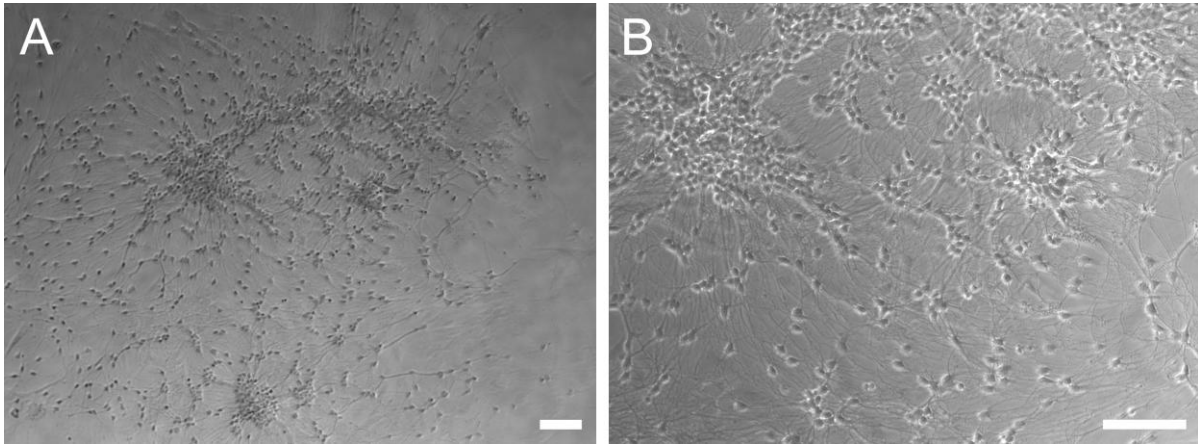


**Abbildung 10: Ablaufschema der Expansion und Differenzierung *in vitro*.**

Durch den Entzug der Wachstumsfaktoren und das Hinzufügen von fetalem Kälberserum konnte eine Adhärenz der Neurosphären am Boden der Zellkulturplatten nach wenigen Stunden beobachtet werden. Nach und nach flachten sich die Sphären ab und immer mehr Zellen wanderten aus der Sphäre aus. Nach



sieben Tagen unter Differenzierungsbedingungen konnte eine deutliche Abflachung der Sphären sowie ein Ausbilden von langen Zellfortsätzen beobachtet werden (Abb. 11).

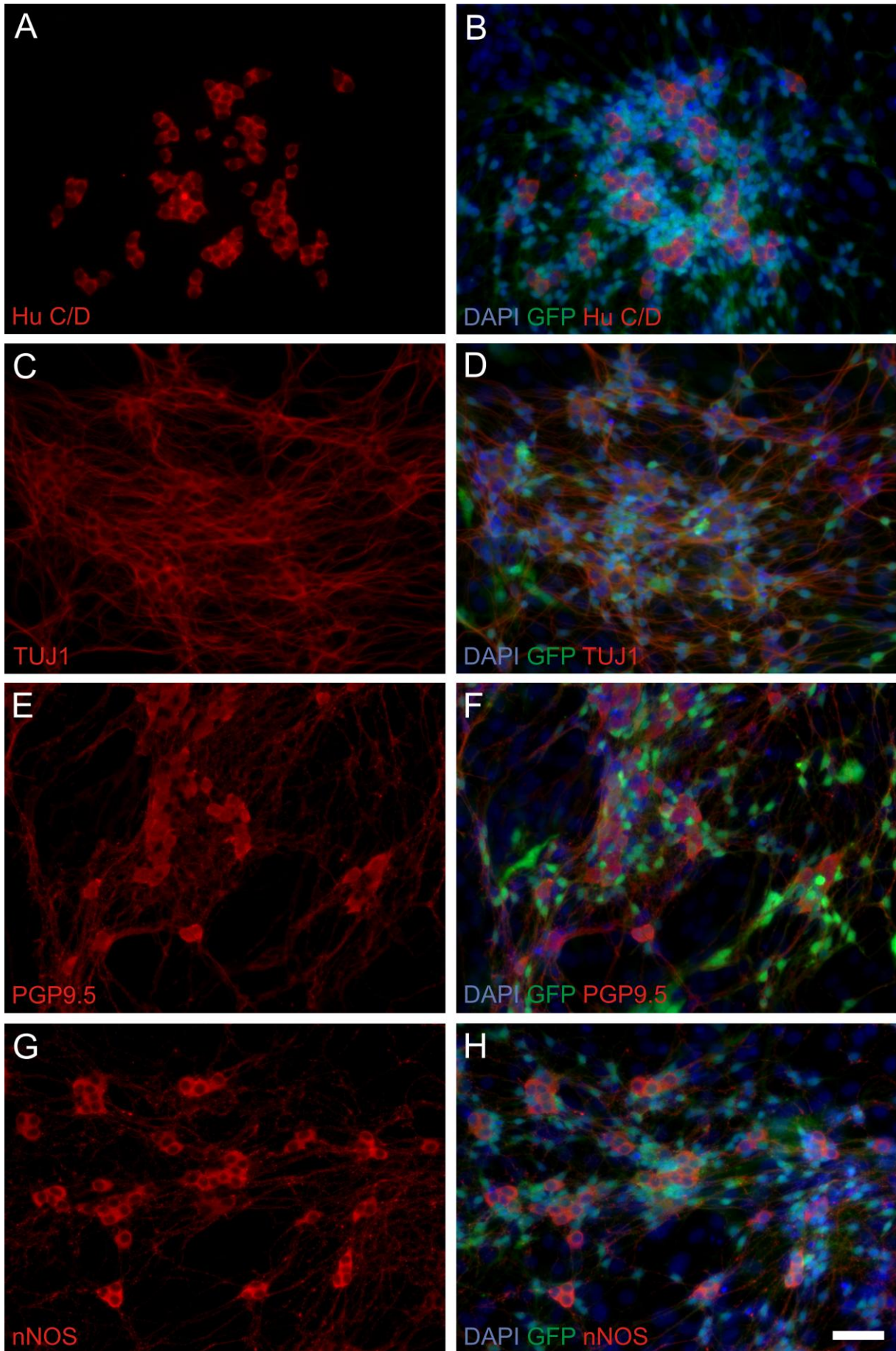


**Abbildung 11: Differenzierte Sphäroide *in vitro*.** Hierfür wurden die isolierten Zellen für sieben Tage *in vitro* expandiert und anschließend differenziert. Nach Anheftung der Sphäroide an den Boden der Zellkulturplatte wanderten die Zellen strahlenförmig aus den Sphäroiden heraus. Viele der ausgewanderten Zellen bildeten eine Vielzahl an neuritenartigen Fortsätzen aus. **(A)** Übersichtsaufnahme. **(B)** zeigt einen anderen Ausschnitt der Platte unter stärkerer Vergrößerung. Maßstab: 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.3. Zusammensetzung der Zellkultur nach der Differenzierung

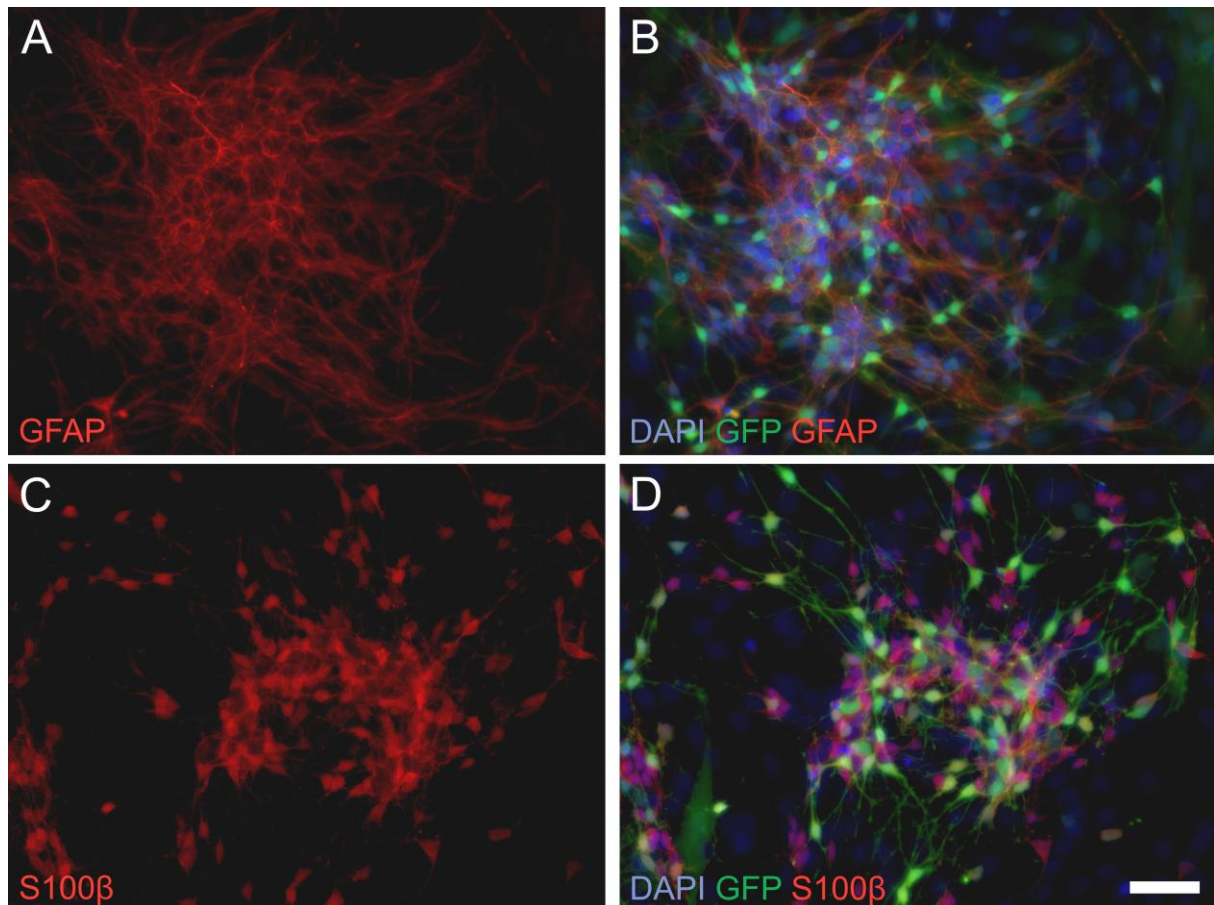
Nach der in Abbildung 10 beschriebenen Prozessierung der Zellen wurde eine immunzytologische Charakterisierung der Zellen vorgenommen. Dies sollte nachweisen, dass sowohl neuronale als auch gliale Zelltypen des ENS in den erhaltenen Zellkulturen vorhanden waren.

Es konnten positive Zellen für verschiedene panneuronale (PGP9.5, TUJ1, Hu C/D; Abb. 12), sowie einen spezifischen Neuronenmarker (nNOS; Abb. 12) nachgewiesen werden. Ebenfalls konnten gliale Zellen detektiert werden (GFAP, S100 $\beta$ ; Abb. 13). In der Kultur waren auch einige glatte Muskelzellen vorhanden (Daten nicht gezeigt). Wie in Abbildung 12 zu sehen, wurde der panneuronale Marker Hu C/D direkt im Zytoplasma exprimiert, jedoch nicht im Zellkern oder den neuritenartigen Zellfortsätzen (Abb. 12 A, B). Die Marker PGP9.5 (Abb. 12 E, F) und nNOS (Abb. 12 G, H) wurden, sowohl im Zytoplasma als auch in den neuritenartigen Zellfortsätzen exprimiert, wobei PGP9.5 auch schwach im Nukleus (Abb. 12 E, F) beobachtet werden konnte.



**Abbildung 12: Immunzytologische Färbung differenzierter Sphäroide *in vitro*.** eGFP-positive Sphäroide wurden für sieben Tage unter Differenzierungsbedingungen kultiviert und anschließend immunzytologisch gefärbt. Es konnten die neuronalen Marker Hu C/D (A, B), TUJ1 (C, D), PGP9.5 (E, F) und nNOS (G, H) identifiziert werden. Zellkerne wurden durch DAPI Färbung (blau) dargestellt. Maßstabsbalken 50  $\mu$ m.

TUJ1, ließ sich hauptsächlich im tubulinhaltigen Exoskelett inklusive der neuritenartigen Zellfortsätze der Zellen detektieren (Abb. 12 C, D). Der spezifische Antikörper gegen S100 $\beta$  band sowohl im Zellkern, im Zytoplasma des Zellkörpers und den Zellfortsätzen (Abb. 13 C, D). GFAP-Antigene hingegen konnten im Zytoplasma der Zelle (Abb. 13 A, B) detektiert werden. eGFP wurde in allen Zellen in unterschiedlichen Intensitäten exprimiert.



**Abbildung 13: Immunzytologische Färbung differenzierter Sphäroide *in vitro*.** eGFP-positive Sphäroide wurden für sieben Tage unter Differenzierungsbedingungen kultiviert und immunzytologisch gefärbt. Es konnten sowohl GFAP (A, B), als auch S100 $\beta$  (C, D) exprimierende Gliazellen detektiert werden. Darstellung der Zellkerne durch DAPI Färbung (blau). Maßstabsbalken 50  $\mu$ m.

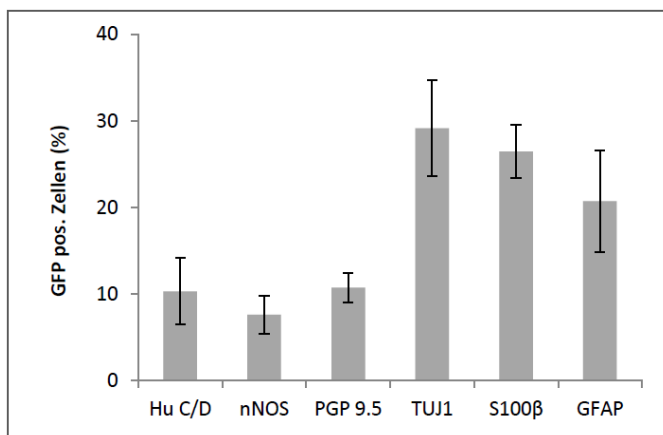
Der Nachweis dieser Marker spricht dafür, dass sowohl neuronale als auch gliale Zelltypen, die im enterischen Nervensystem *in vivo* vorkommen, ebenfalls in der Zellkultur vorhanden sind.

### 3.1.4. Prozentuale Verteilung der Zelltypen nach der Differenzierung

Um die Zusammensetzung der Zellkultur der differenzierten Zellen weiter zu charakterisieren, wurde bestimmt, in welchem Verhältnis die verschiedenen Zelltypen in den Kulturen vorhanden waren.

Hierzu wurden von vier neugeborenen Mäusen getrennt primäre ENS-Zellkulturen angelegt und nach dem in Punkt 2.6.1 angegebenen Protokoll proliferiert und differenziert. Pro Marker und Tier wurden 20 Aufnahmen aufgenommen und DAPI-positive Zellkerne sowie Zellen mit Doppelfärbungen von eGFP und den jeweiligen Markern ausgezählt. Die Ergebnisse wurden nach Marker getrennt zusammengefasst und auf die gemittelte Anzahl der DAPI-positiven Zellen relativiert (Abb. 14).

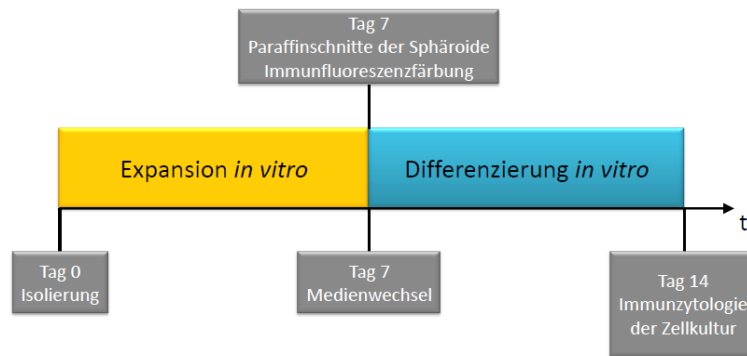
Für die panneuronalen Marker Hu C/D und PGP9.5 ergaben sich  $10,3 \pm 3,9$  % bzw.  $10,7 \pm 1,7$  % (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Im Vergleich dazu exprimierten  $7,6 \pm 2,2$  % der Zellen den Neuronentyp spezifischen Marker nNOS. Allerdings belief sich der Anteil der TUJ1-positiven Zellen auf  $29,2 \pm 5,5$  % aller Zellen. TUJ1 färbte somit, im Vergleich zu den anderen panneuronalen Markern Hu C/D und PGP9.5, weit mehr Zellen an. Für die glialen Marker S100 $\beta$  und GFAP konnten  $26,5 \pm 3,1$  % respektive  $20,7 \pm 5,9$  % der Zellen identifiziert werden.



**Abbildung 14: Proportionale Verteilung der eGFP-positiven Zelltypen *in vitro*.** Nach jeweils siebentägiger Proliferations- und Differenzierungsphase wurden nach Immunzytologie die Anteile der verschiedenen zelltypspezifischen Marker quantifiziert und auf die Gesamtzellzahl relativiert. Neuronale Marker: Hu C/D  $10,3 \pm 3,9$  %, nNOS  $7,6 \pm 2,2$  %, PGP9.5  $10,7 \pm 1,7$  %; TUJ1  $29,2 \pm 5,5$  %, Gliale Marker: S100 $\beta$   $26,5 \pm 3,1$  %, GFAP  $20,7 \pm 5,9$  %,  $n = 4$ . Dargestellt sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen.

### 3.1.5. Vergleich reifer Neurone in Sphäroiden und nach Differenzierung

Um den Anteil der Neurone zu definieren, der *in vitro* aus Vorläuferzellen hervorging, wurde der Anteil der Neurone in Sphäroiden bestimmt und mit den Ergebnissen der differenzierten Zellen aus Punkt 3.1.4 verglichen (Abb. 15). Hierfür wurden Paraffinschnitte von Sphäroiden, die sieben Tage unter Proliferationsbedingungen kultiviert wurden, angefertigt und immunzytologisch gefärbt.

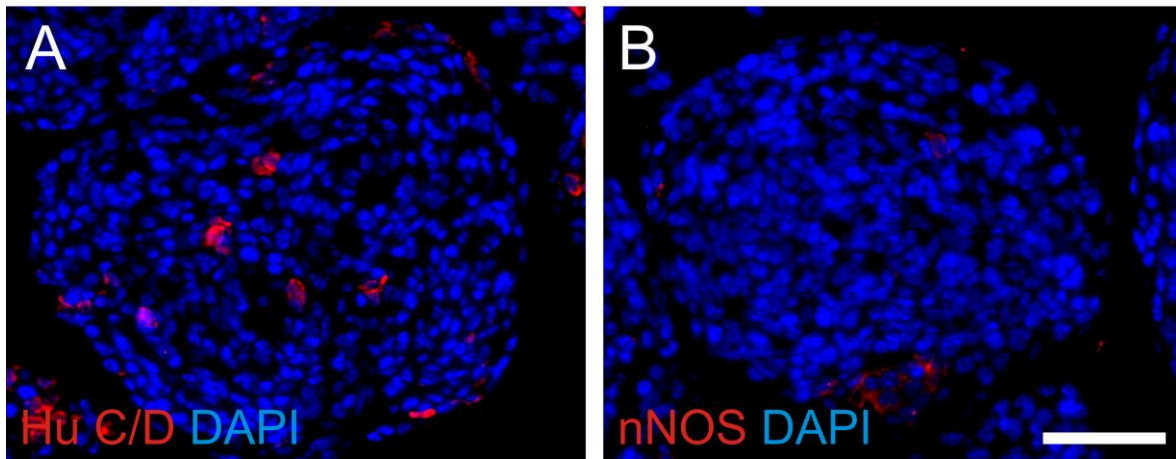


**Abbildung 15: Ablaufschema zum Versuch zum Vergleich reifer Neurone in Sphäroiden und nach Differenzierung.**

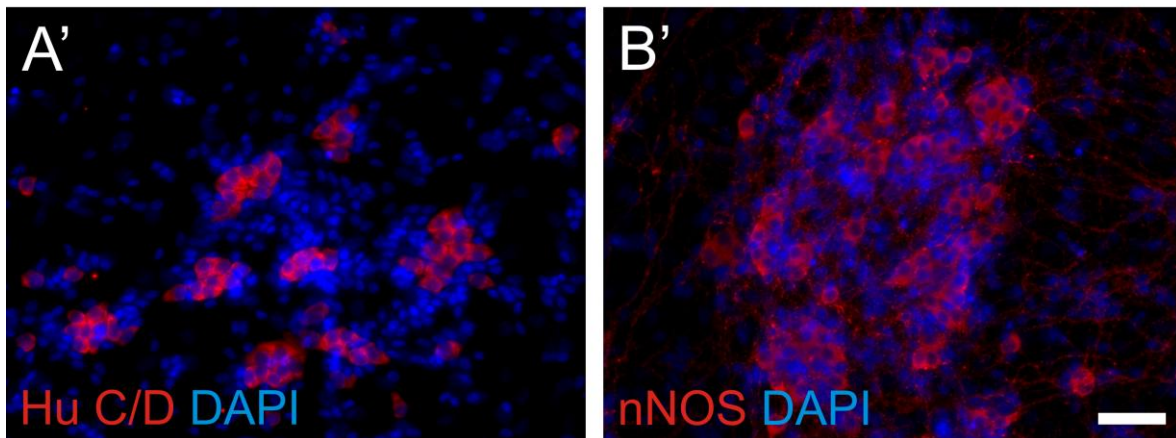
Nachfolgend wurden die Zellen, die die Marker Hu C/D und nNOS exprimierten, quantifiziert. In den Sphäroiden waren  $3,8 \pm 0,9$  % der Zellen Hu C/D-positiv,  $3,0 \pm 0,8$  % der Zellen nNOS-positiv (Abb. 16, 17).

Vergleicht man dies mit den Ergebnissen der *in vitro* differenzierten Zellen (Hu C/D  $10,3 \pm 3,9$  %, nNOS  $7,6 \pm 2,2$  %; Abb. 14), waren in den undifferenzierten Sphären signifikant weniger Hu C/D- ( $P < 0,001$ ) und nNOS- ( $P < 0,001$ ) positive Zellen zu finden als nach einer weiteren Woche unter Differenzierungsbedingungen. Das weist darauf hin, dass ein Großteil der Neurone *in vitro* entstanden war und die Neurone nicht bereits zum Zeitpunkt der Isolation existierten (Abb.17).

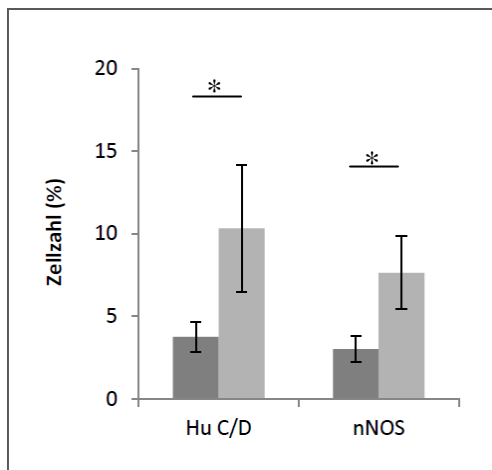
## Proliferation



## Differenzierung



**Abbildung 16: Vergleich reifer Neurone in Sphäroiden und nach deren Differenzierung *in vitro*.** (A-B) 5  $\mu$ m dicker Paraffinschnitt von Enterosphären nach siebentägiger Proliferationsphase. (A) Hu C/D, (B) nNOS. (A') Hu C/D-positive Zellen nach einer Woche Proliferation und anschließender einwöchiger Differenzierung *in vitro*. (B') nNOS-positive Zellen nach einer Woche Proliferation und anschließend einwöchiger Differenzierung *in vitro*. In Sphäroiden sind sehr viel weniger Hu C/D- und nNOS-positive Zellen vorhanden als in Zellkulturen nach einwöchiger Differenzierungsphase. Maßstab 50 $\mu$ m.



**Abbildung 17: Vergleich reifer Neurone in Sphäroiden und nach Differenzierung *in vitro*.** Quantifizierung der reifen Neurone in Sphäroiden (dunkelgrau) und in Zellkulturen nach siebentägiger Differenzierungsphase (hellgrau). Hu C/D wird in Sphäroiden (n=3; 3,8  $\pm$  0,9 %) signifikant weniger exprimiert als in Zellkulturen nach einwöchiger Differenzierungsphase (n=4; 10,3  $\pm$  3,8 %; P = 0,036). nNOS wird in Sphäroiden (n=3; 3,0  $\pm$  0,8 %) ebenso signifikant weniger exprimiert als in Kulturen nach einwöchiger Differenzierungsphase (n = 4; 7,6  $\pm$  2,2 %; P = 0,019). Dargestellt sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen. Um die Gruppen zu vergleichen, wurde ein Mann-Whitney Rank Sum Test durchgeführt (\* = P<0,001).

### 3.1.6. Proliferationsnachweis durch BrdU-Inkorporation (*in vitro*)

Obwohl der Unterschied der Neuronenzahl in proliferierenden zu differenzierten enterischen Neurosphären (Punkt 3.1.5, Abb. 16, 17) darauf hinwies, dass die Neurone *in vitro* entstanden waren, blieb unklar, wie viele Neurone tatsächlich aus Vorläuferzellen generiert wurden, welche sich während der Proliferationsphase geteilt hatten und somit tatsächlich zur Proliferation fähig waren.

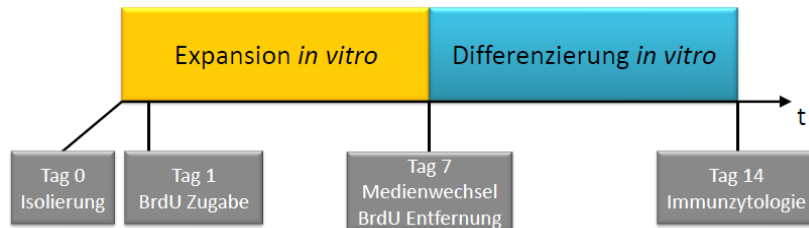
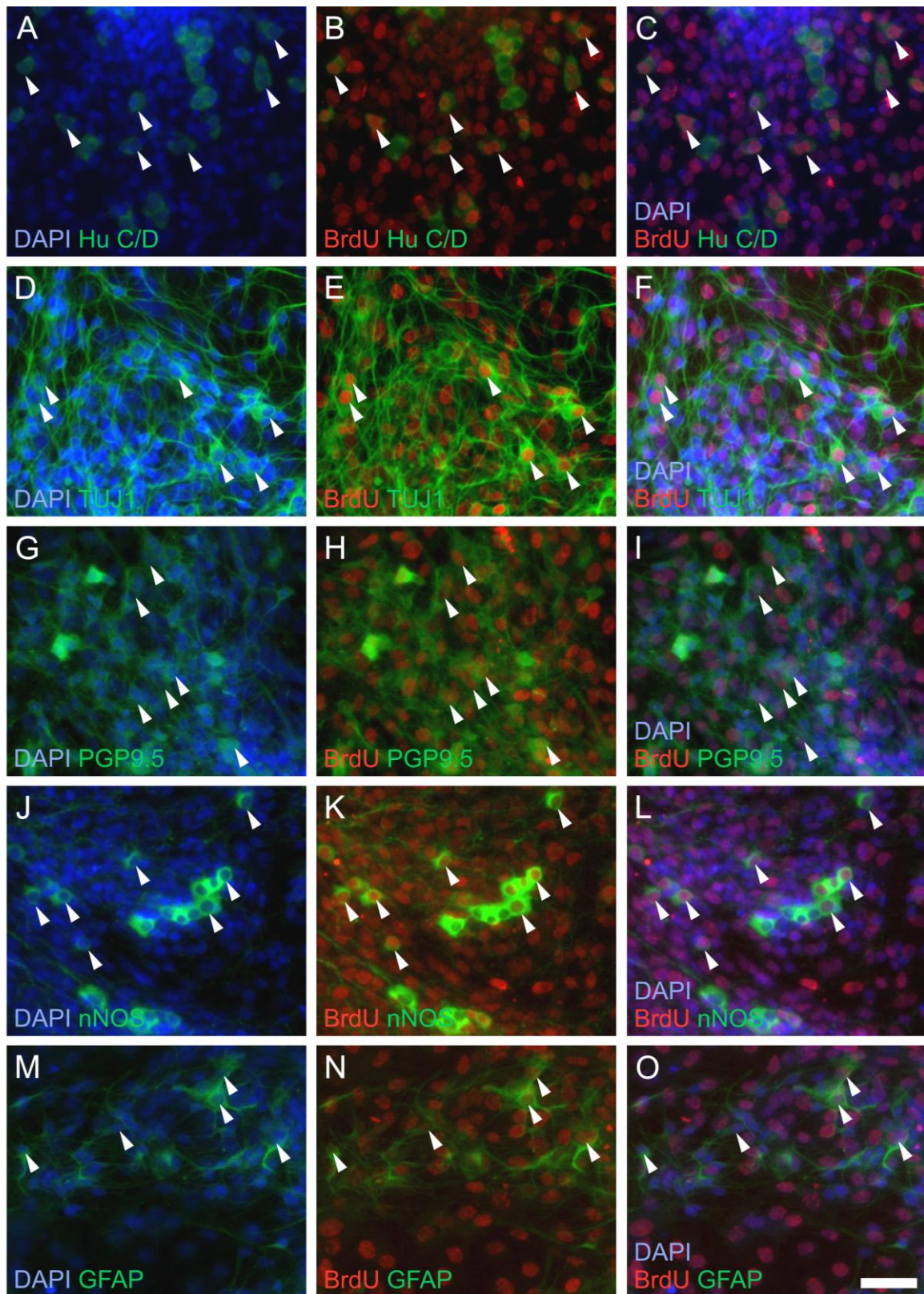


Abbildung 18: Ablaufschema des BrdU-Inkorporationsversuchs *in vitro*.

Um dies zu untersuchen, wurden postnatale ENS-Zellkulturen für die gesamte Zeit der siebentägigen Proliferation mit BrdU inkubiert (Abb. 18). Am Ende der siebentägigen Proliferationsphase wurde das BrdU entfernt. Nach weiteren sieben Tagen in Differenzierung konnte das BrdU immunhistochemisch im Kern von Zellen nachgewiesen werden, die sich während der BrdU Exposition während der Proliferationsphase geteilt hatten. Nach einer Immunfluoreszenzfärbung der Zellen gegen BrdU, konnte eine große Anzahl an BrdU-positiven Zellkerne beobachtet werden (Abb. 19), d.h dass diese Zellen sich während der Proliferationsphase geteilt hatten. Nach Kofärbung mit den neuronalen und glialen Markern, war festzustellen, dass einige der markerpositiven Zellen auch einen BrdU-positiven Zellkern aufwiesen. Dies bedeutet, dass diese Zellen sich während der Proliferationsphase geteilt hatten (Abb. 19). BrdU wurde ausschließlich in den Zellkernen nachgewiesen und deckt sich mit der Fluoreszenz der DAPI-Kernfärbung.

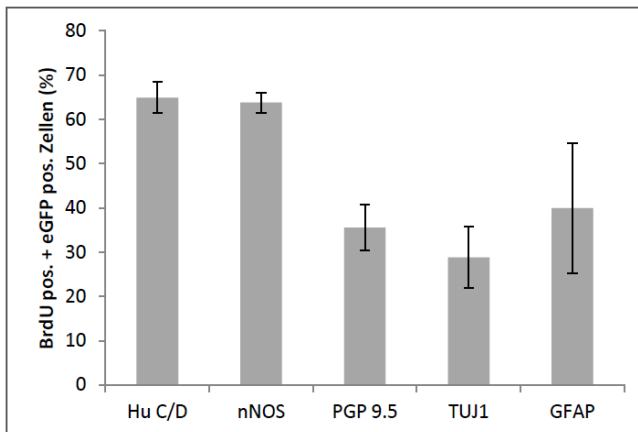
Nachfolgend sollte evaluiert werden, wie viele der ausdifferenzierten Zellen des jeweiligen Markers aus *in vitro* proliferierten Zellen stammten. Hierfür wurden alle Zellen, welche eine Immunreaktivität für den jeweiligen Marker und BrdU zeigten, gezählt und nachfolgend auf die Gesamtzahl aller für diesen markerpositiven Zellen normiert.



**Abbildung 19: Immunzytochemische Auswertung des BrdU-Inkorporationsexperiments *in vitro*.** Während der Proliferation wurde das Zellkulturmedium mit 1µM BrdU supplementiert. In neuronalen Zellen, welche eine Immunreaktivität für die neuronalen Marker Hu C/D (**A**), TUJ1 (**D**), nNOS (**K**) und PGP9.5 (**G**) zeigten, wurde auch eine Einlagerung von BrdU nachgewiesen (**B**, **E**, **H**, **K**, **N**). In glialen Zellen konnte dies ebenfalls beobachtet werden (**N**). Das wies darauf hin, dass reife Neurone und Glia aus *in vitro* proliferierten Zellen entstanden waren. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Maßstab: 50 µm.



Für die panneuronalen Marker ergaben sich hierbei folgende Ergebnisse: Hu C/D  $64,9 \pm 3,5$  %, TUJ1  $28,8 \pm 6,9$  % und PGP9.5  $35,5 \pm 5,1$  %. nNOS erzielte einen Wert von  $63,8 \pm 2,3$  %. Die Auswertung des glialen Markers GFAP ergab einen Wert von  $39,9 \pm 14,6$  % (Abb.20).



**Abbildung 20: BrdU-Inkorporation während der Proliferationsphase *in vitro*.** Nach einer einwöchigen Proliferationsphase, während der  $1\mu\text{M}$  BrdU zugegeben wurde, und einer einwöchigen Differenzierungsphase wurde eine Immunfluoreszenz-färbung gegen verschiedene neuronale und gliale Marker, sowie BrdU vorgenommen. Anschließend wurden jeweils 10 randomisierte Aufnahmen pro Maus ( $n=4$ ) aufgenommen und ausgewertet. Hu C/D  $64,9 \pm 3,5$  %, nNOS  $63,8 \pm 2,3$  %, TUJ1  $28,8 \pm 6,9$  %, PGP9.5  $35,5 \pm 5,1$  %, GFAP  $39,9 \pm 14,6$  %. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen.

### 3.2. Implantation der ENS-Progenitorzellen in ein immundefizientes Mausmodell

Da bis zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt war, ob diese *in vitro* proliferierten ENS-Progenitoren in einem gesunden adulten Empfänger Darm überleben und in die gewünschten Zelltypen differenzieren, wurden eGFP-positive Neurosphären in ein immunsupprimiertes Mausmodell (NSG-Maus), dessen enterisches Nervensystem intakt war, implantiert. Hierzu wurden Sphären nach Eröffnung des Bauchraumes der NSG-Maus in die Darmwand des distalen Endes des Kolons an definierte Stellen injiziert.

#### 3.2.1. Charakterisierung *in vitro* proliferierter ENS-Progenitorzellen nach Implantation *in vivo*

Drei oder 12 Wochen nach der Implantation wurden die Mäuse getötet und die Injektionsstelle unter einem Fluoreszenzbinokular begutachtet, um die implantierten eGFP-positiven Zellen im Darm der Empfängermaus detektieren zu können (Abb. 21). In 13 von 16 Fällen konnte die grün fluoreszierende Färbung der injizierten Zellen identifiziert werden, was per se zeigt, dass die Zellen vital waren.

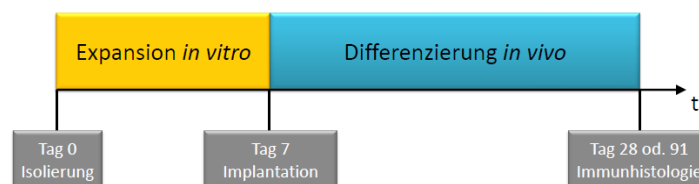
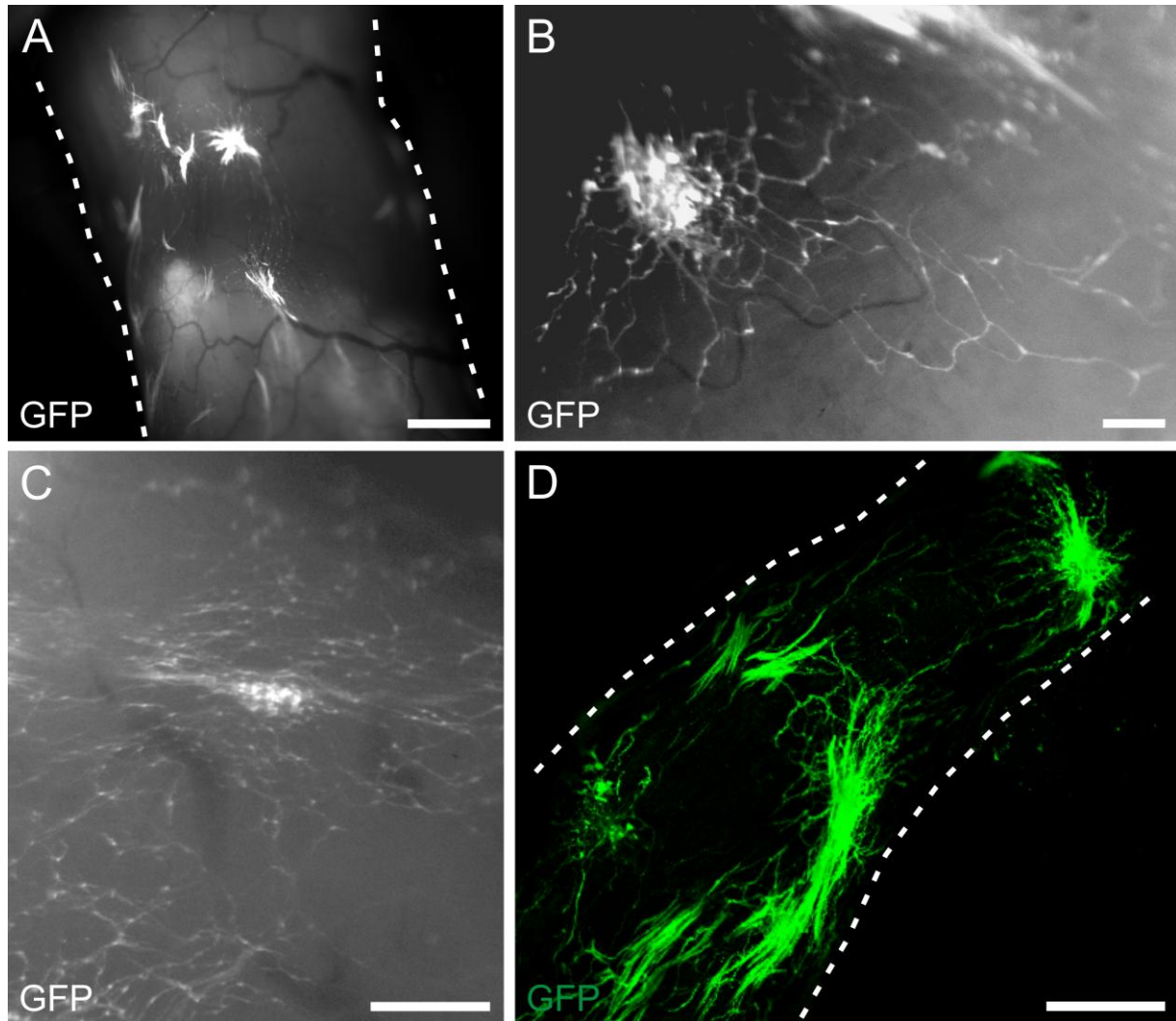


Abbildung 21: Ablaufschema Implantationsversuche *in vivo*.

Neben großen, hell leuchtenden Haufen großer Zellen, konnte auch beobachtet werden (Abb. 22 D), dass einige Zellen in das Gewebe hineingewandert waren bzw. sich von einer Sphäre entfernt und lange neuritenartige Zellfortsätze ausgebildet hatten (Abb. 22 B-D). Diese schienen mit anderen Zellen verbunden zu sein und man konnte erkennen, dass einige Zellfortsätze sich von einem implantierten Zellhaufen zum nächsten über mehrere Millimeter ausgebildet hatten (Abb. 22 C, D). Zusätzlich konnte eine Ausbildung netzartiger Verbindungen zwischen den Zellen beobachtet werden.

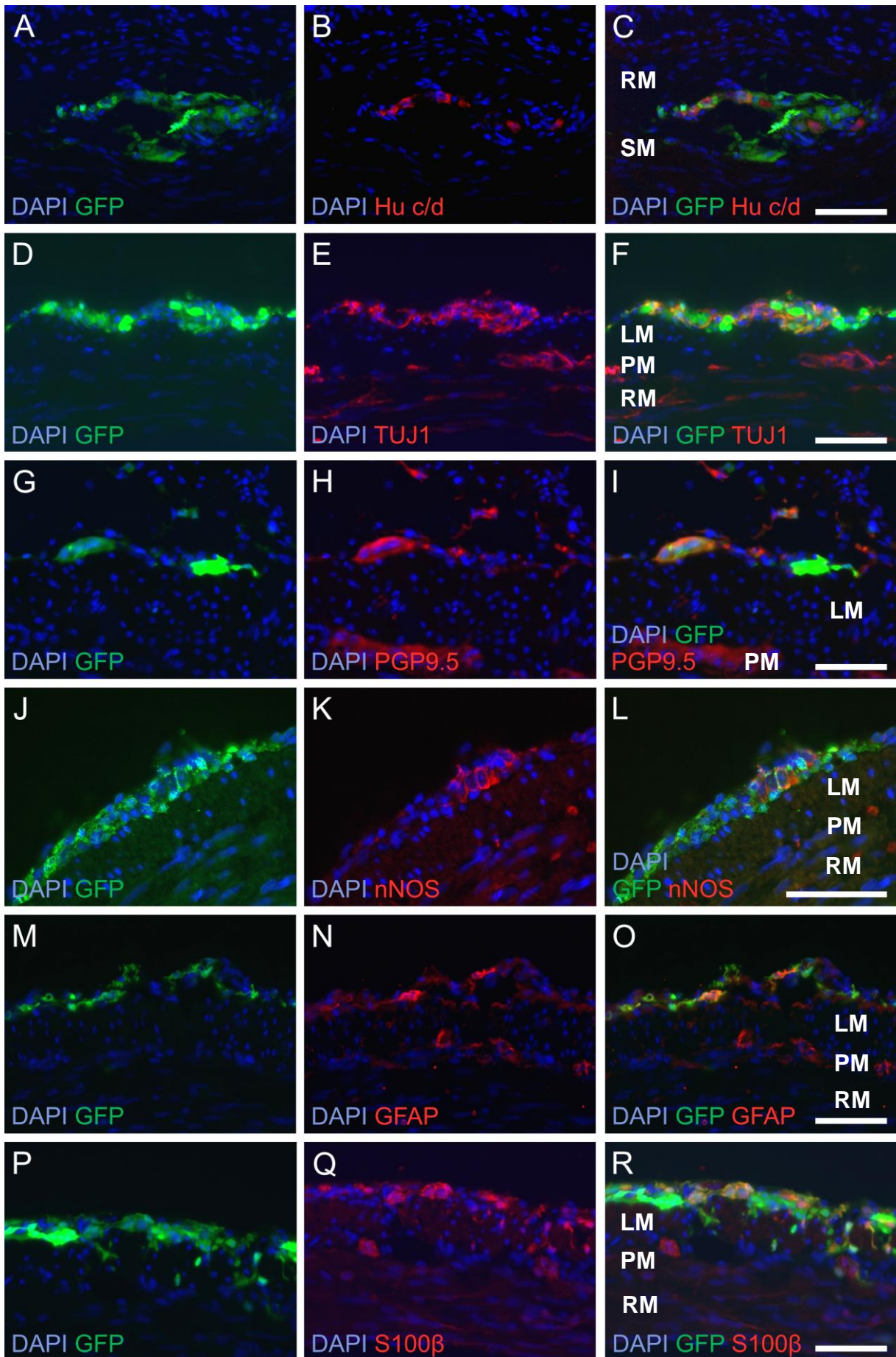
Da es im Mausmodell schwierig war, die Zellen exakt in die direkte Nähe des Plexus myentericus zu injizieren, sollte evaluiert werden, in welchen Schichten der Darmwand eGFP-positive Zellen zu finden waren. Es sollte auch untersucht werden, ob aus den implantierten Zellen reife neuronale und gliale Zellen entstanden waren.



**Abbildung 22: eGFP-positive Zellen 12 Wochen nach Injektion in die distale Darmwand immundefizienter Mäuse.** Die Abbildungen zeigen implantierte, eGFP-positive Zellen im Empfänger Darm. **(A)** Die implantierten Zellen hatten sich in die Darmwand des Empfängertieres integriert. Sie wanderten in das umgebende Gewebe aus und bildeten lange Fortsätzen aus. Die gestrichelten Linien zeigen die Grenzen des Darms an. **(B, C)** Vergrößerte Darstellung der gewanderten eGFP-exprimierenden Zellen inklusive der ausgebildeten Zellfortsätze. Die Ausbildung eines neuronalen Netzwerkes konnte beobachtet werden. **(D)** Whole mount Stapelaufnahme eines gesamten Darmabschnittes 12 Wochen nach Injektion von eGFP-positiven Zellen. Es ist zu beobachten, dass die injizierten Zellen weit in das Empfängergewebe des Darmes ausgewandert sind und durch ihre Zellfortsätze miteinander verbunden sind. Maßstabsbalken **(A)** 1 mm, **(B)** 100  $\mu$ m, **(C)** 200  $\mu$ m, **(D)** 500  $\mu$ m.

Dafür wurden aus den Geweben Paraffin oder Kryostatblöcke angefertigt und dementsprechend geschnitten. Nachfolgend wurden die Schnitte via Fluoreszenz-

Ergebnisse

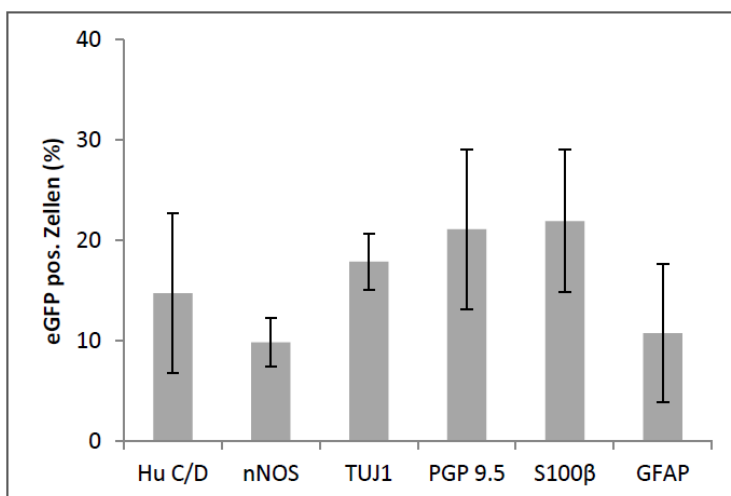


**Abbildung 23: eGFP-positive Zellen 12 Wochen nach Injektion in die distale Darmwand immundefizienter Mäuse.** Aus den entnommenen Därfen wurden 10 µm dicke Kryostatschnitte angefertigt und nachfolgend immunhistologisch gefärbt. Dabei wurden Hu C/D- (A-C), TUJ1- (D-F), PGP9.5- (G-I) und nNOS-positive (J-L) Neurone, sowie GFAP- (M-O) und S100β-positive (P-R) Gliazellen detektiert. Die eGFP-positiven Zellen konnten sowohl im Bereich des submukösen Plexus beobachtet werden (A-C) als auch im Bereich der Ring- oder Längsmuskulatur (G-I) und der Serosa (D-F, J-R). DAPI (blau) stellt die Zellkerne dar. Maßstab: 50 µm. PM = Plexus myentericus, RM = Ringmuskelschicht, LM = Längsmuskelschicht, SM = Submukosa.

immunhistologie auf die gleichen Marker wie in der Zellkultur hin untersucht: Hu C/D, TUJ1, PGP9.5 und nNOS als neuronale Marker und S100β sowie GFAP als gliale Marker. Dabei konnten die Zellen im Bereich der Submukosa (Abb. 23 A-C), im Bereich der Längs- und Ringmuskulatur (Abb. 23 G-I) und der Serosa (Abb. 23 D-F, J-R) identifiziert werden. 12 Wochen nach Implantation der eGFP-positiven Zellen ließen sich alle diese Marker in den implantierten Zellen nachweisen. Dies spricht dafür, dass es im Mikromilieu der adulten Darmwand zu einer Differenzierung der unreifen Vorläuferzellen in gliale und neuronale Zellen kam (Abb. 23).

### 3.2.2. Proportionale Verteilung der Zelltypen nach Implantation

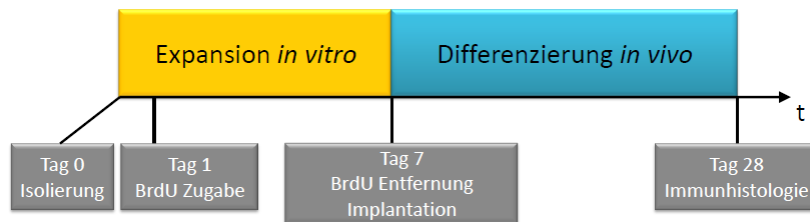
Um zu untersuchen, ob das Mikromilieu des Darmes einen Einfluss auf die proportionale Verteilung der Zelltypen hat, wurden für jeden Marker Schnitte von drei Tieren ausgewertet. Um eine Mehrfachzählung einzelner Zellen zu vermeiden, wurde nur jeder zweite Schnitt für die Auswertung herangezogen (Kryostatschnitte). Danach wurden diese auf die Gesamtzahl der eGFP-positiven Zellen auf den Schnitten relativiert. Dies ergab folgende Ergebnisse für die neuronalen Marker: Hu C/D  $14,7 \pm 8,0$  %, nNOS  $9,8 \pm 2,5$  %, TUJ1  $17,9 \pm 2,8$  %, PGP9.5  $21,1 \pm 8,0$  %. Für die glialen Marker S100β  $21,9 \pm 7,1$  %, GFAP  $10,7 \pm 6,9$  % (Abb. 24).



**Abbildung 24: Proportionale Verteilung der Zelltypen nach Implantation in die distale Darmwand.** Es wurden alternierende Kryostatschnitte dreier Mäuse ausgewertet. Die eGFP-positiven Zellen zeigten zu  $14,7 \pm 8,0$  % eine Kofärbung mit Hu C/D, zu  $9,8 \pm 2,5$  % mit nNOS, mit  $17,9 \pm 2,8$  % TUJ1 und zu  $21,1 \pm 8,0$  % mit PGP9.5. Eine Kofärbung mit den glialen Markern S100β und GFAP konnte in  $21,9 \pm 7,1$  % bzw.  $10,7 \pm 6,9$  % der eGFP-positiven Zellen detektiert werden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen.

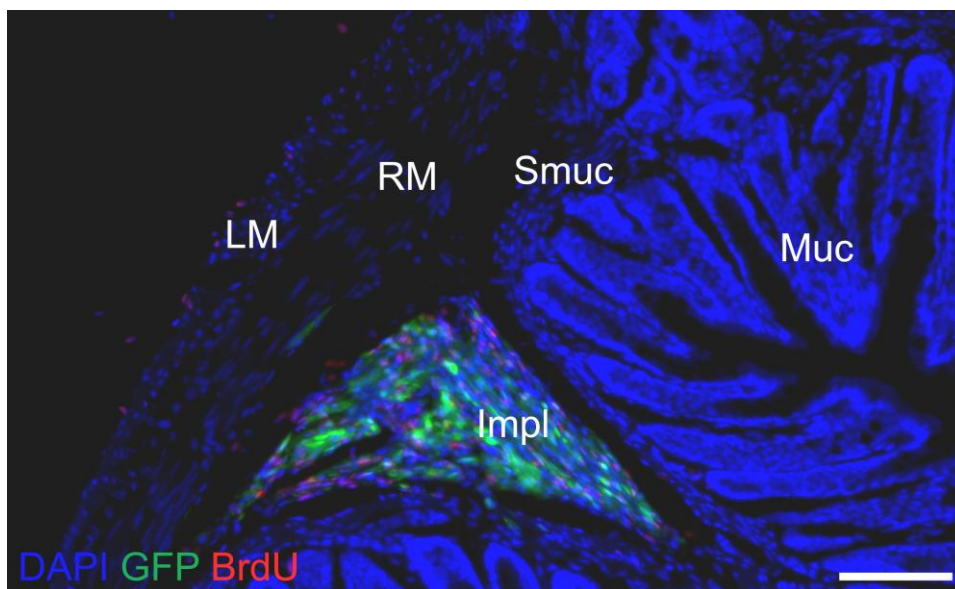
### 3.2.3. BrdU-Nachweis nach Implantation in den Maudarm

*In vitro* wurde gezeigt, dass die primär gewonnenen enterischen Progenitoren proliferierten und während ihrer Teilung BrdU aufnahmen. Im Tiermodell sollte ebenfalls evaluiert werden, ob die entstehenden Neurone und Gliazellen sich von zuvor *in vitro* proliferierenden Zellen ableiten.



**Abbildung 25: Ablaufschema des BrdU-Inkorporationsversuchs mit nachfolgender Implantation in das Mausmodell.**

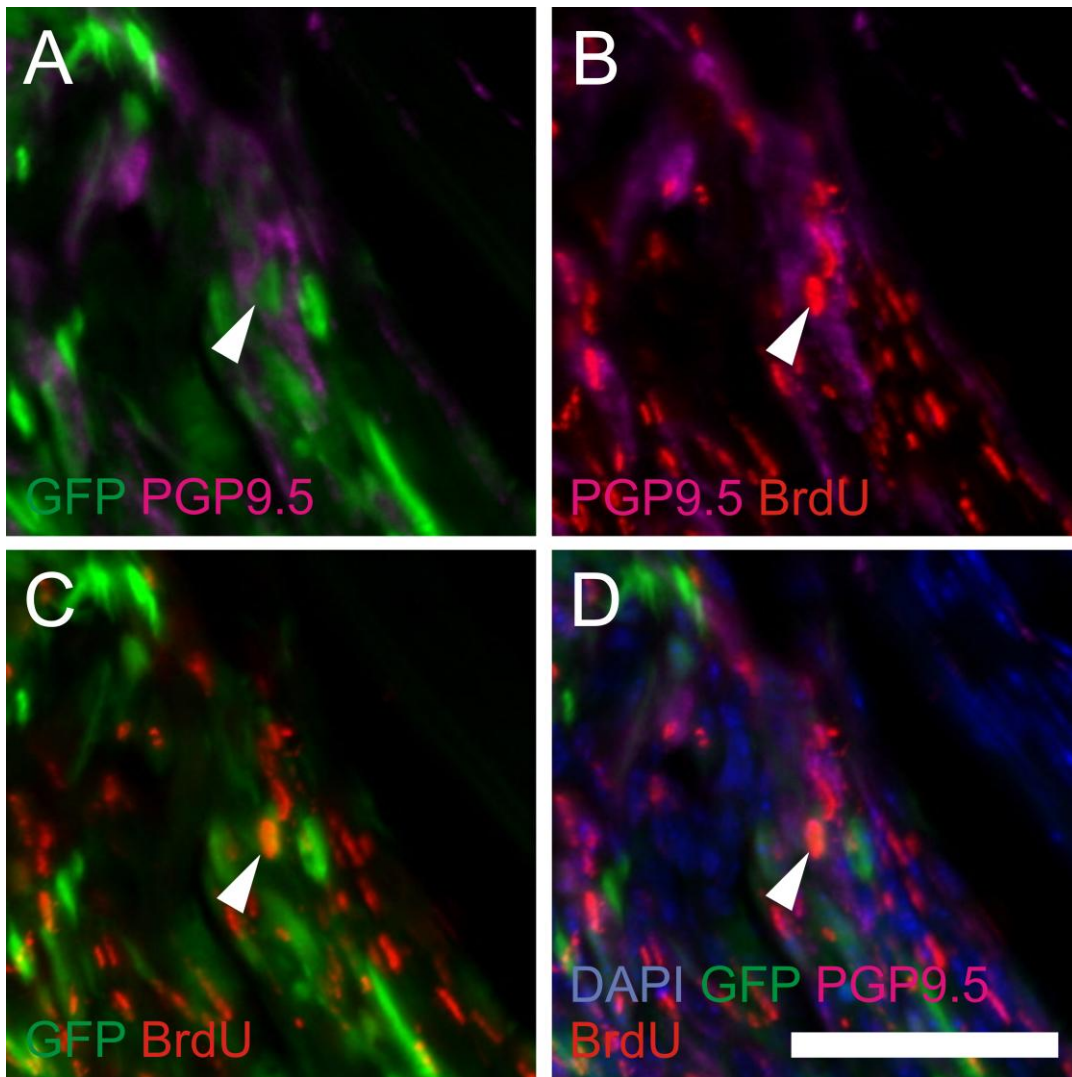
Hierzu wurden murine eGFP exprimierende Progenitoren aus postnatalen Mäusen (P0-1) gewonnen, *in vitro* unter Zugabe von BrdU kultiviert. Am Ende der *in vitro*-Kultivierung wurde BrdU ausgewaschen und die kultivierten Zellen in den distalen Darm einer Maus an verschiedenen Stellen implantiert (Abb. 25).



**Abbildung 26: Übersichtsaufnahme der implantierten eGFP-positiver Sphären.** Zu sehen ist ein Kryostatschnitt drei Wochen nach der Implantation der eGFP-positiven Sphäroide in die Maus. Während der Proliferationsphase wurden die Zellen in Gegenwart von BrdU (1 µM) kultiviert. Die implantierten Zellen haben sich in diesem Fall zwischen der Tela submucosa (Smuc) und der Ringmuskelschicht (RM) angesiedelt. LM: Längsmuskelschicht; Muc: Tunica mucosa; Impl: implantierte Zellen. Die Zellkerne werden durch DAPI markiert. Maßstab: 100 µm.

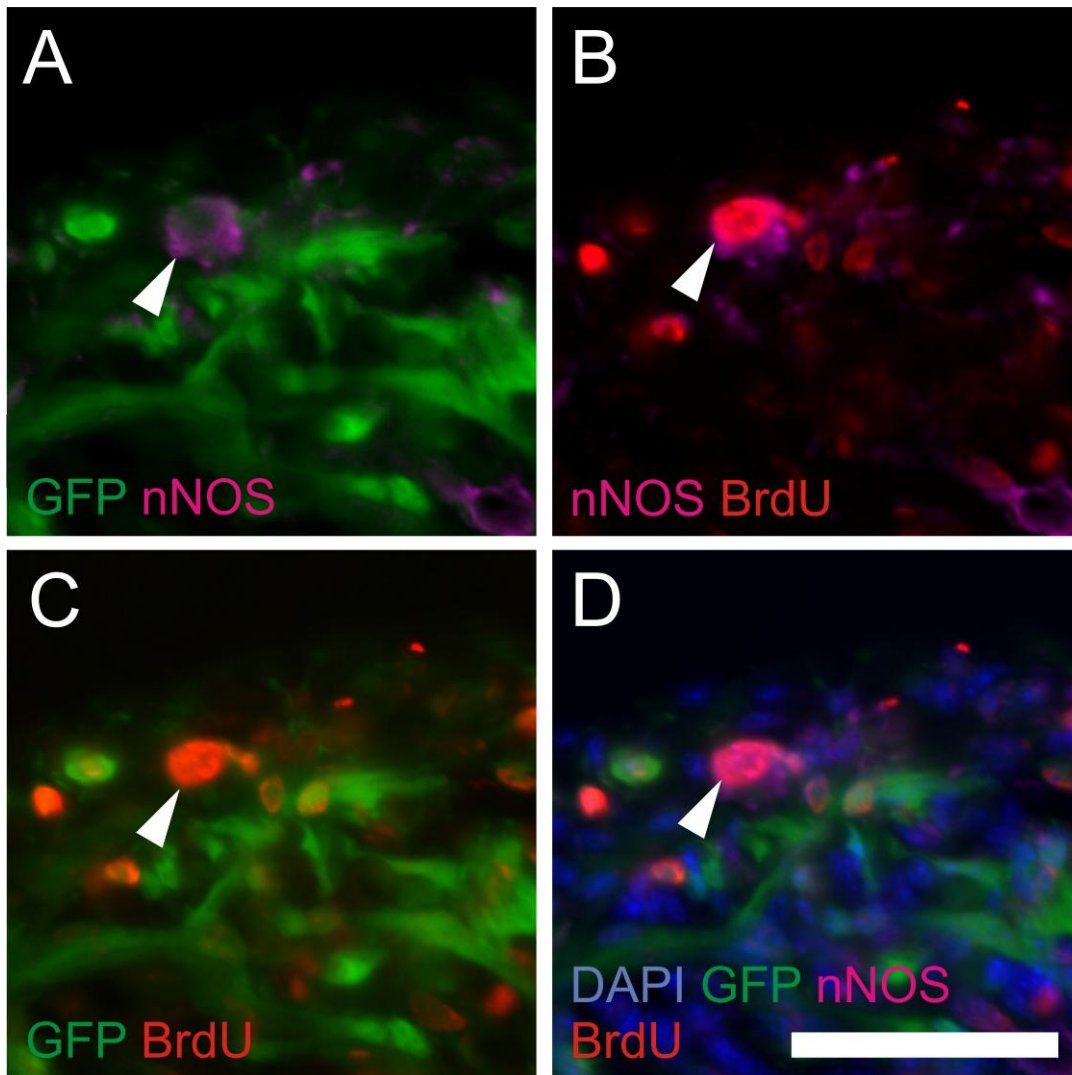
Um evaluieren zu können, ob sich auch wie *in vitro* die verschiedenen Zelltypen aus *in vitro* proliferierten Zellen differenzierten, wurde eine immunhistologische Dreifachfärbung der aus dem Gewebe gewonnenen Kryostatschnitte vorgenommen. Dabei wurden die implantierten Zellen durch die Expressierung von eGFP identifiziert (Abb. 26). Innerhalb dieser Zellen waren neuronale (nNOS+, Abb. 28; PGP 9.5+, Abb. 27) als auch gliale Zellen (S100 $\beta$ +, Abb. 30; GFAP+, Abb. 29) mit BrdU-positiven Zellkernen zu beobachten. Damit konnte nachgewiesen werden, dass sich die detektierten reifen Neurone aus unreifen Zellen ableiteten, die sich während ihrer Expansionsphase *in vitro* geteilt hatten.

Nachfolgend wurden alternierende Kryostatschnitte ausgewertet, um den Anteil der BrdU-positiven Zellen an den detektierten neuronalen und glialen Zellen zu bestimmen. Die erhaltenen Zellzahlen der eGFP- und BrdU-positiven Zellen wurden anschließend auf die Gesamtzahl der BrdU-positiven Zellen relativiert.

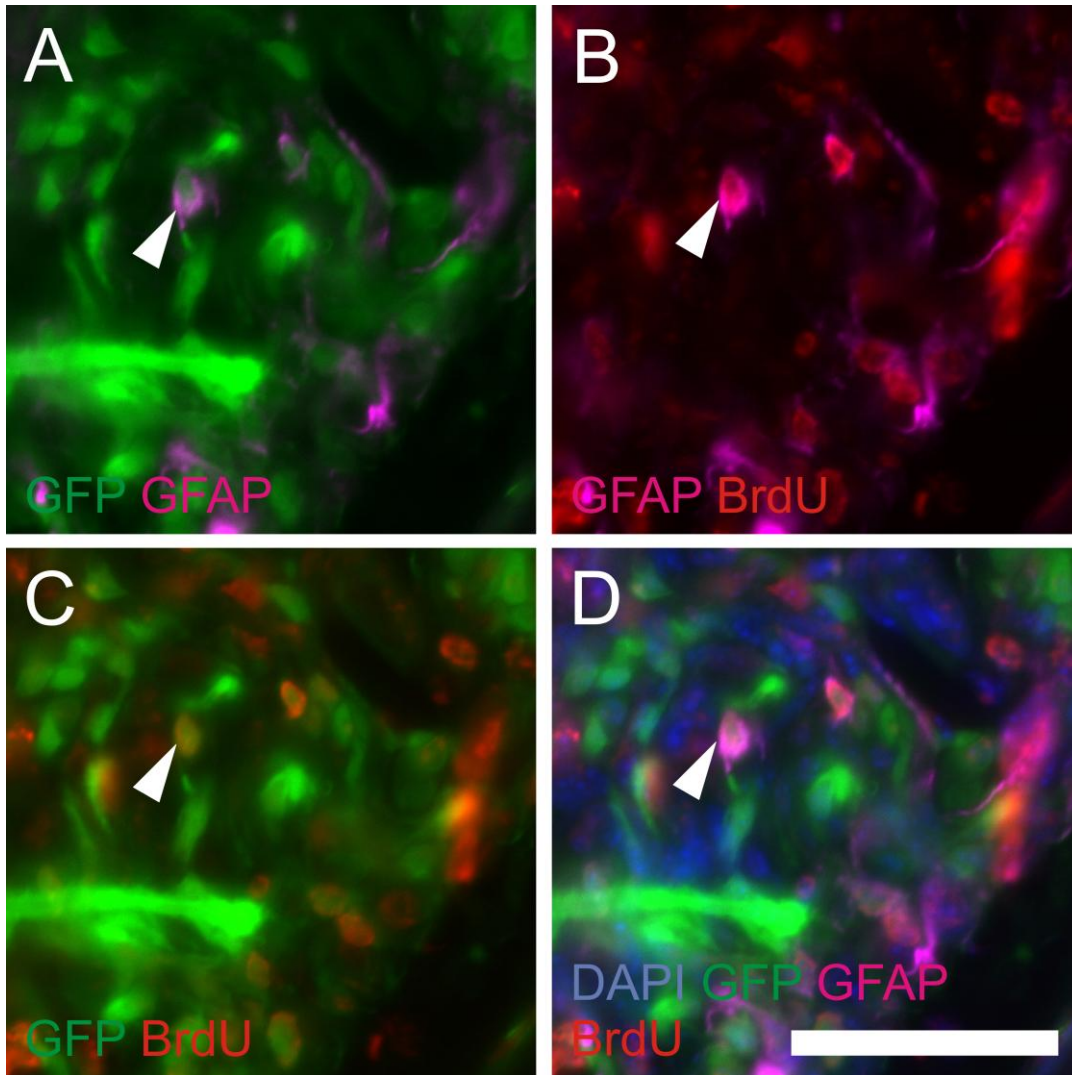


**Abbildung 27: Nachweis von BrdU- und PGP9.5-positiven Zellen innerhalb der implantierten eGFP-positiven Zellen.** Die Sphäroide waren zuvor sieben Tage *in vitro* mit 1 µM BrdU (rot) im Medium kultiviert worden. Nach drei Wochen wurde der Darm entnommen, 10 µm dicke Kryostatschnitte angefertigt und mittels Immunfluoreszenz dreifach gefärbt. **(A-D)** Innerhalb der implantierten Zellen (grün) konnten BrdU-positive Zellen detektiert werden (Pfeilspitze), die gleichzeitig PGP9.5 exprimierten. **(A)** PGP9.5- und eGFP-positive Zelle, **(B)** PGP9.5- und BrdU-positive Zelle, **(C)** BrdU- und eGFP-positive Zelle, **(D)** Überlagerungsbild von A-C. Zellkerne wurden mit DAPI identifiziert. Maßstab: 50µm.

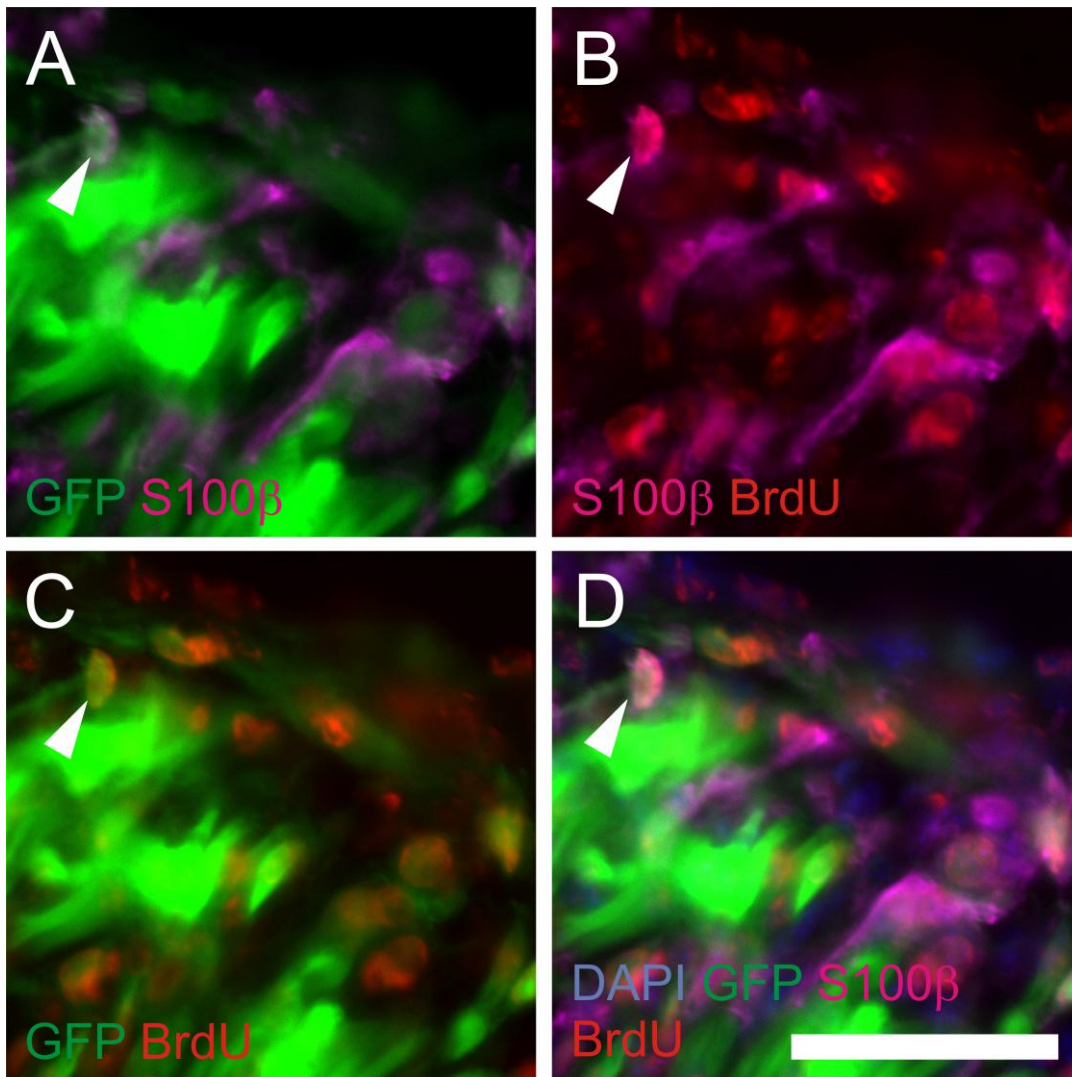




**Abbildung 28: Nachweis von BrdU- und nNOS-positiven Zellen innerhalb der implantierten eGFP-positiven Zellen.** Die Sphäroide waren zuvor sieben Tage *in vitro* mit 1  $\mu$ M BrdU (rot) im Medium kultiviert worden. Nach drei Wochen wurde der Darm entnommen, 10  $\mu$ m dicke Kryostatschnitte angefertigt und mittels Immunfluoreszenz dreifach gefärbt. **(A-D)** Innerhalb der implantierten Zellen (grün) konnten BrdU-positive Zellen detektiert werden (Pfeilspitze), die gleichzeitig nNOS exprimieren. **(A)** nNOS- und eGFP-positive Zellen, **(B)** nNOS- und BrdU-positive Zellen, **(C)** BrdU- und eGFP-positive Zellen, **(D)** Überlagerungsbild von A-C. Zellkerne wurden mit DAPI identifiziert. Maßstab: 50 $\mu$ m.



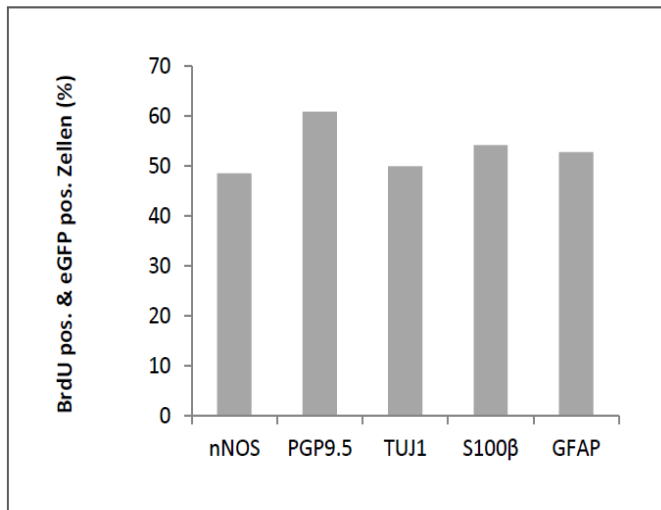
**Abbildung 29: Nachweis von BrdU- und GFAP-positiven Zellen innerhalb der implantierten eGFP-positiven Zellen.** Die Sphäroide waren zuvor sieben Tage *in vitro* mit 1  $\mu$ M BrdU (rot) im Medium kultiviert worden. Nach drei Wochen wurde der Darm entnommen, 10  $\mu$ m dicke Kryostatschnitte angefertigt und mittels Immunfluoreszenz dreifach gefärbt. **(A-D)** Innerhalb der implantierten Zellen (grün) konnten BrdU-positive Zellen detektiert werden (Pfeilspitze), die gleichzeitig GFAP exprimieren. **(A)** GFAP- und eGFP-positive Zelle, **(B)** GFAP- und BrdU-positive Zellen, **(C)** BrdU- und eGFP-positive Zellen, **(D)** Überlagerungsbild von A-C. Zellkerne wurden mit DAPI identifiziert. Maßstab: 50 $\mu$ m.



**Abbildung 30: Nachweis von BrdU- und S100 $\beta$ -positiven Zellen innerhalb der implantierten eGFP-positiven Zellen.** Die Sphäroide waren zuvor sieben Tage *in vitro* mit 1  $\mu$ M BrdU (rot) im Medium kultiviert worden. Nach drei Wochen wurde der Darm entnommen, 10  $\mu$ m dicke Kryostatschnitte angefertigt und mittels Immunfluoreszenz dreifach gefärbt. **(A-D)** Innerhalb der implantierten Zellen (grün) konnten BrdU-positive Zellen detektiert werden (Pfeilspitze), die gleichzeitig S100 $\beta$  exprimieren. **(A)** S100 $\beta$ - und eGFP-positive Zelle, **(B)** S100 $\beta$ - und BrdU-positive Zellen, **(C)** BrdU- und eGFP-positive Zellen, **(D)** Überlagerungsbild von A-C. Zellkerne wurden mit DAPI identifiziert. Maßstab: 50 $\mu$ m.

Da die Zellen nur in ein Tier explantiert worden waren, konnte in der Auswertung kein Mittelwert und somit auch keine Standardabweichung ermittelt werden.

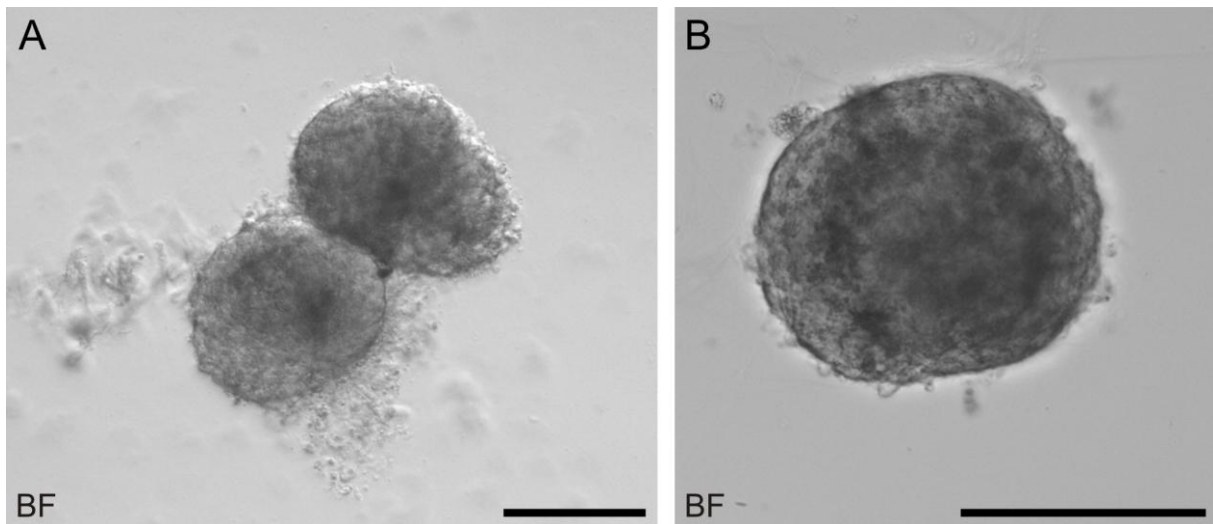
Die Auswertung ergab, dass je Zelltyp rund 50 % der ausgewerteten implantierten Zellen aus *in vitro* proliferierten Progenitoren entstanden sind (TUJ1 50 %, PGP9.5 61,0 %, S100 $\beta$  54,2 % und GFAP 52,8 %. nNOS erreichte einen Wert von 48,6 % (Abb. 31).



**Abbildung 31: Anteil der BrdU-positiven Neurone und Gliazellen nach Implantation.** Hierfür wurden primäre ENS-Zellen *in vitro* mit 1 $\mu$ m BrdU kultiviert und nachfolgend in die distale Darmwand der NSG-Maus implantiert. Nach drei Wochen wurde der Darm entnommen, 10 $\mu$ m dicke Kryostatschnitte angefertigt, welche immunhistologisch angefärbt wurden. Für die Auswertung wurden alternierende Schnitte verwendet. Die erhaltenen Zahlen der marker-, eGFP- und BrdU-positiven Zellen wurden auf die Zahl der eGFP- und BrdU-positiven Zellen relativiert. Dies ergab folgende Ergebnisse: nNOS und BrdU 48,6 %, TUJ1 50,0 %, PGP9.5 61,0 %, S100 $\beta$  54,2 % und GFAP 52,8 %. Dargestellt sind die Mittelwerte.

### 3.2.4. Implantation humaner adulter ENS-Progenitoren in ein immundefizientes Mausmodell

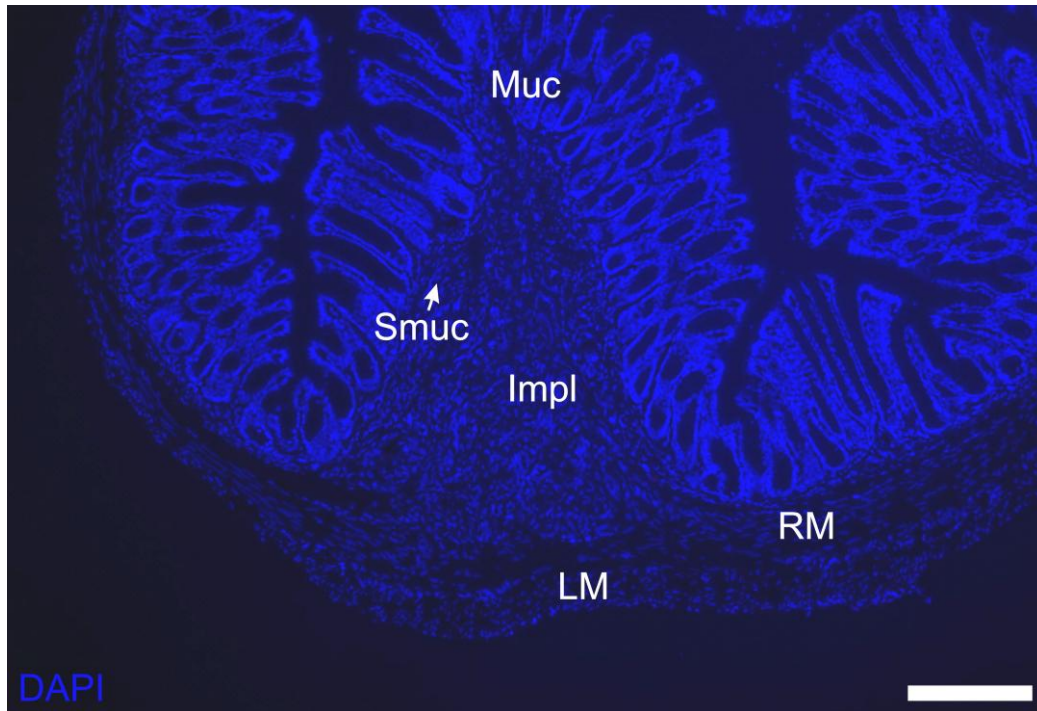
Nachdem die Implantation juveniler postnataler ENS-Progenitoren der eGFP-Maus in die NSG-Maus vielversprechende Ergebnisse lieferte, sollte beispielhaft auch die Implantation humaner ENS-Zellen erfolgen. Zur Gewinnung dieser stellte uns die Abteilung für Allgemeine Chirurgie Darmgewebe gesunde Darmabschnitte von Darmkrebspatienten (zwischen 42 und 84 Jahre alt) beiderlei Geschlechts zur Verfügung.



**Abbildung 32: Adulte humane Enterosphären nach siebentägiger Proliferation.** Diese Sphären wurden aus gesundem Darmgewebe eines 68 Jahre alten männlichen Rektumkarzinom-Patienten gewonnen. **(A)** Humane Enterosphären freischwimmend im Kulturmedium. **(B)** Vergrößerte Darstellung einer frei im Kulturmedium schwimmenden Enterosphäre. BF: engl. brightfield, Durchlicht. Maßstab: 100 µm.

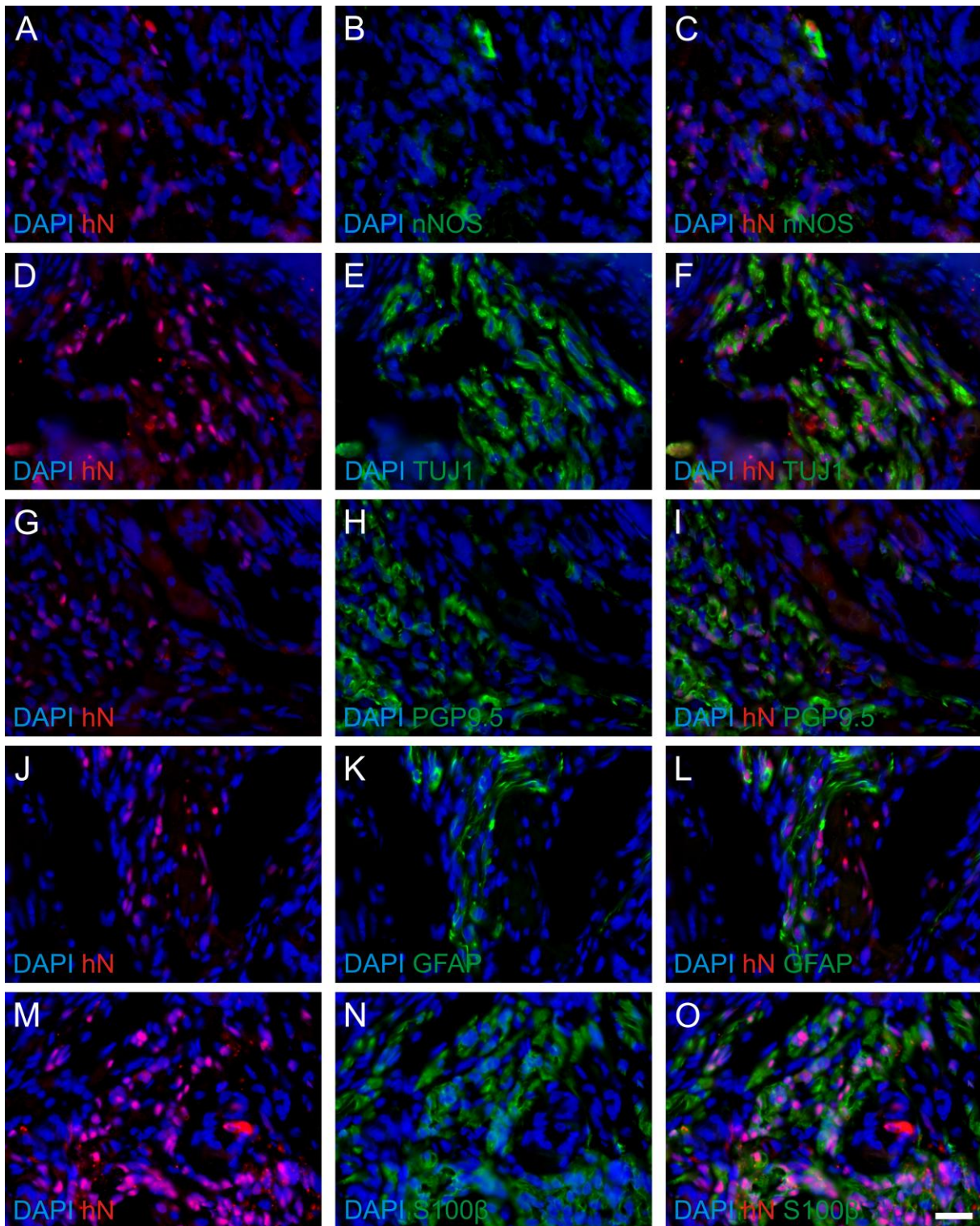
Hierbei handelte es sich um ca. 3 cm x 3 cm große Vollwandgewebestücke, die zuvor vom Pathologen als tumorfrei eingestuft wurden. Nach Präparation der Darmmuskelschicht wurden diese, wie im Punkt 2.6.2 beschrieben, prozessiert und in Kultur genommen.

Bei einigen Geweben konnten nach ca. fünf Tagen Enterosphären beobachtet werden. Jedoch bei Weitem nicht in den Mengen, wie man sie bei Präparationen von postnatalen Mäusen erhält (max. 50 Sphären/Gewebe) (Abb. 32). Die humanen enterischen Neurosphären wurden nach einer Woche Proliferation wie im Punkt 2.6.2 beschrieben in die Darmwand injiziert. Die Injektionsstelle wurde mit einem nicht resorbierbaren Faden markiert. Nach drei Wochen wurde der Darm entnommen, davon Kryostatschnitte angefertigt und die implantierten Zellen mit Hilfe eines Antikörpers gegen humane Zellkerne (human nuclei, hN) identifiziert (Abb. 34).



**Abbildung 33: Übersichtsaufnahme humane adulte ENS Zellen.** Humane Sphäroide wurden in den distalen Darm immundefizienter Mäuse implantiert. Hier ist ein Kryostatschnitt drei Wochen nach Implantation dargestellt. Die implantierten Zellen (Impl) haben sich zwischen Tela submucosa (Smuc) und der Ringmuskelschicht (RM) angesiedelt. Die Zellkerne wurden mit DAPI identifiziert. LM: Längsmuskelschicht; Muc: Tunica mucosa. Maßstab: 200  $\mu\text{m}$ .

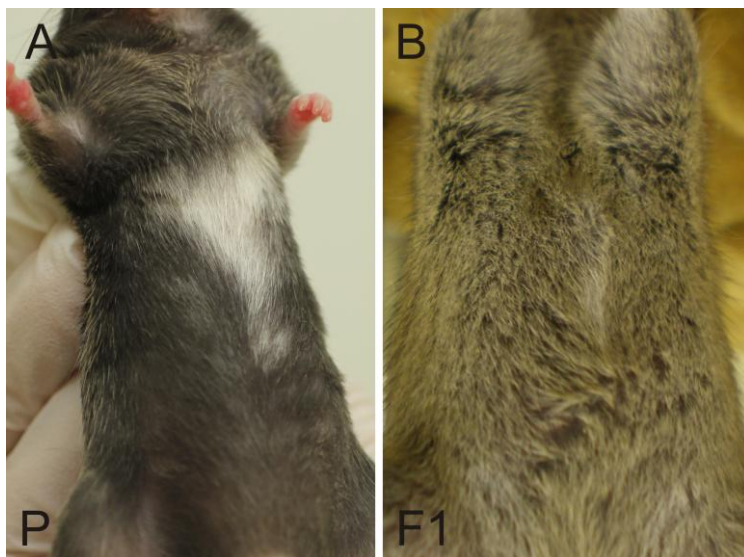
Hierbei zeigte sich die Immunoreaktivität nur im Zellkern der Zellen humanen Ursprungs (Abb. 34 A, D, G, J, M). Human Nuclei-positive Zellen wiesen eine Immunoreaktivität für die neuronalen Marker nNOS, TUJ1 und PGP9.5 sowie die glialen Marker GFAP und S100 $\beta$  auf. Auf den Schnitten waren die panneuronalen Marker TUJ1 (D-F) sowie PGP9.5 (G-I) erkennbar. Ebenso konnten wenige nNOS- und hN-positive Zellen detektiert werden (A-C). Gliale Zellen in den humanen transplantierten Zellen wurden durch S100 $\beta$  (M-O) und GFAP (J-L) nachgewiesen.



**Abbildung 34: Nachweis humaner ENS-Zellen drei Wochen nach Implantation selbiger in den distalen Darm der NSG-Maus.** Die Zellen von A-I, M-O entstammen von einem 75 Jahre alten männlichen Patienten. J-L von einem 66 Jahre alten männlichen Patienten. In der 1. Spalte sind durch den spezifischen Antikörper hN (=human nuclei) Zellen humaner Herkunft markiert. Ein Teil dieser Zellen wiesen eine Kofärbung mit den neuronalen Markern nNOS (**A-C**), TUJ1 (**D-F**) und PGP9.5 (**G-I**) sowie mit den glialen Markern GFAP (**J-L**) und S100 $\beta$  (**M-O**) auf. Darstellung aller Zellkerne durch DAPI (blau). Maßstab: 20  $\mu$ m.

### 3.3. Generierung eines immundefizienten Morbus Hirschsprung-Mausmodells

Die bisherigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass Vorläuferzellen des enterischen Nervensystems aus postnatalem Darm isoliert werden können, sich *in vitro* vermehren lassen und sich nach Implantation in gesundem Maudarm in Neurone und Gliazellen differenzieren. Um das Verhalten von ENS-Vorläuferzellen in erkrankten Darmabschnitten zu untersuchen und dieses Modell auch für humane Xenotransplantationen zu nutzen, wurde ein immundefizientes Mausmodell generiert. Hierzu wurde ein immunkompetentes Morbus Hirschsprung-Mausmodell (C57Bl/6<sup>Sox10/LacZ</sup>; schwarzes Fell mit weißem Brustfleck, Abb. 36 A) mit einem stark immundefizienten Mausstamm (NSG; albinotisch weiß) gekreuzt (Kreuzungsschema siehe Punkt 2.7.2, Abb. 7).

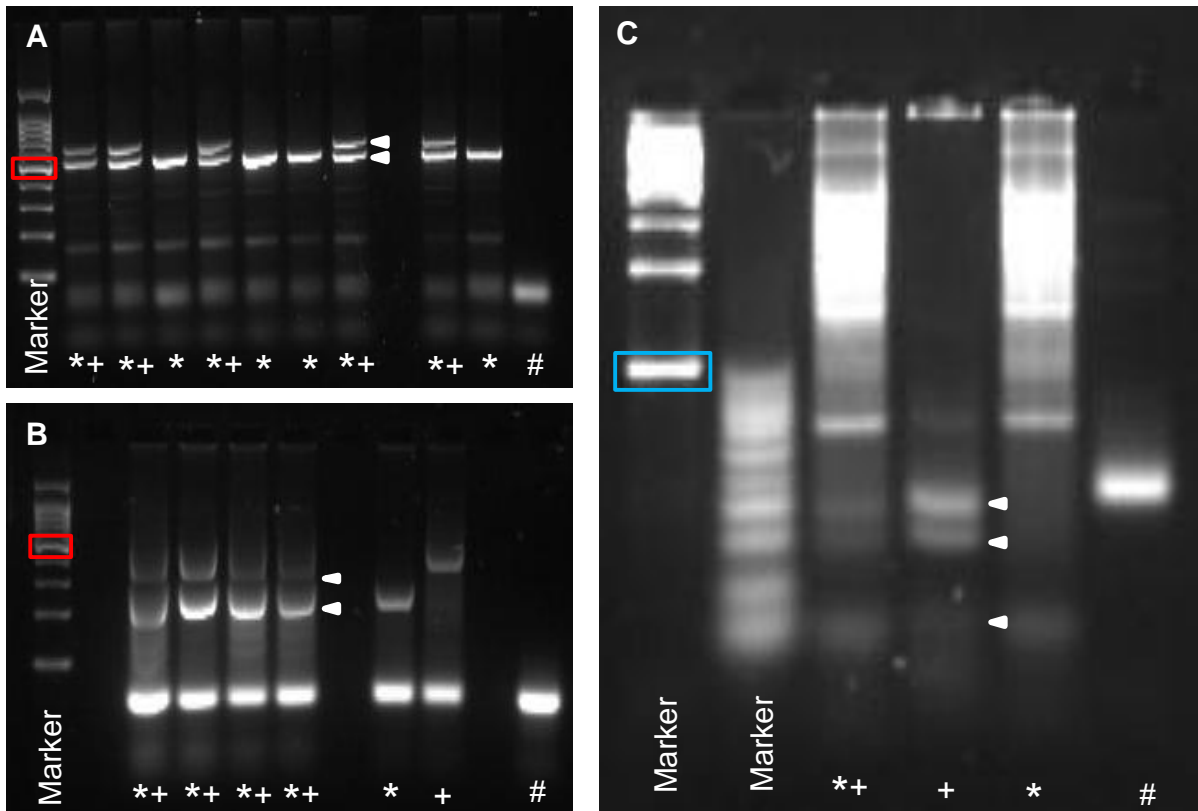


**Abbildung 35: Pigmentierung des Brustfells.** (A) C57Bl/6<sup>Sox10/LacZ</sup>-Mäuse zeigen einen weißen Brustfleck. (B) Bei Sox10/LacZ-positiven Mäusen der F1 Generation konnte kein Brustfleck beobachtet werden.

#### 3.3.1. Genotypische Verteilung der ersten drei Generationen

In der ersten Generation an Nachkommen (F1) waren die Tiere einheitlich wildfarben. Ein weißer Brustfleck, wie er bei den C57Bl/6<sup>Sox10/LacZ</sup>-Mäusen vorkommt (Abb. 35 A), wurde nicht beobachtet (Abb. 36 B). Aufgrunddessen wurde die Genotypisierung der Nachkommenschaft über drei PCR-Protokolle durchgeführt (Abb. 36).





**Abbildung 36: Agarosegele zur Bestimmung des Genotyps.** (A) Beispielergebnisbild einer Sox10/LacZ PCR nach Gelelektrophorese (Agarosegel 2%ig), (B) Beispielergebnisbild einer IL2 PCR nach Gelelektrophorese (Agarosegel 2 %ig), (C) Beispielergebnisbild einer Scid PCR nach Gelelektrophorese (Agarosegel 3 %ig). Pfeilspitze: Bande des erwünschten Genotyps, \*= wildtyp, +\*= heterozygot, += mutant, #=H<sub>2</sub>O-Kontrolle, roter Kasten 500 bp-Bande, blauer Kasten = 100 bp-Bande.

Genotypisch konnten zwei Varianten unterschieden werden. Zum einen Tiere, die heterozygot für scid (severe combined immunodeficiency) und IL2 (Interleukin 2 Rezeptor) waren, sich aber für das sox10 Gen wildtypisch zeigten. Zum anderen Tiere, die für scid, IL2 und für sox10 heterozygot waren. Dies bedeutet, dass sie auf einem Allel das Wildtyp-Gen für sox10 trugen und auf dem anderen Allel statt des sox10 ein LacZ Insert. Das Verhältnis dieser zwei Gruppen betrug 50 % (SOX10<sup>+/+</sup> IL2<sup>+/-</sup> SCID<sup>+/-</sup>) zu 50 % (SOX10<sup>+/LacZ</sup> IL2<sup>+/-</sup> SCID<sup>+/-</sup>) aller geborenen Welpen (n = 36; 18:18) aus acht Würfen (siehe Tab. 8).

**Tabelle 8: Genotypische Verteilung der F1 Generation.** Der Genotyp wurde nach Absetzen von der Mutter (P21) bestimmt. MV = mendelsche Verteilung; TV = tatsächliche genotypische Verteilung; (b) = wildfarbene Fellfarbe.

F1	SOX10 <sup>+</sup> IL2 <sup>-</sup> SCID <sup>-</sup>	SOX10 <sup>+</sup> IL <sup>-</sup> SCID <sup>-</sup>	MV	TV
SOX10 <sup>+</sup> IL2 <sup>+</sup> SCID <sup>+</sup>	SOX10 <sup>+/+</sup> IL2 <sup>+/-</sup> SCID <sup>+/-</sup>	SOX10 <sup>+/+</sup> IL2 <sup>+/-</sup> SCID <sup>+/-</sup>	1/2	n=18 (b)
LacZ <sup>+</sup> IL2 <sup>+</sup> SCID <sup>+</sup>	SOX10 <sup>+/LacZ</sup> IL2 <sup>+/-</sup> SCID <sup>+/-</sup>	SOX10 <sup>+/LacZ</sup> IL2 <sup>+/-</sup> SCID <sup>+/-</sup>	1/2	n=18 (b)

Durch Rückkreuzung der für SOX10 heterozygoten Tiere der F1 Generation mit einer NSG-Maus wurden in der F2 Generation sowohl weiße (n=63) als auch braune Tiere (n=70) geboren. Hierbei zeigte sich die Färbung der Tiere als nicht genotypisch abhängig, sodass in allen acht möglichen genotypischen Kombinationen weiße als auch braune Tiere festzustellen waren. Von insgesamt 133 abgesetzten Tieren trugen nur sechs Tiere die gewünschte genotypische Kombination  $SOX10^{+/LacZ} IL2^{-/-} SCID^{-/-}$ . Nach Mendel hätte ihr Anteil 1/8 der erhaltenen Tiere der F2 Generation ausmachen müssen. Tatsächlich stellten sie nur ca. 1/22.

**Tabelle 9: Genotypische Verteilung der F2.** Der Genotyp wurde nach Absetzten von der Mutter (P21) bestimmt. MV = mendelsche Verteilung; TV = tatsächliche genotypische Verteilung; (b) = wildfarbene Fellfarbe.

F2	SOX10 <sup>+</sup> IL2 <sup>-</sup> SCID <sup>-</sup>	SOX10 <sup>+</sup> IL2 <sup>-</sup> SCID <sup>-</sup>	MV	TV
SOX10 <sup>+</sup> IL2 <sup>+</sup> SCID <sup>-</sup>	SOX10 <sup>+/+</sup> IL2 <sup>+/-</sup> SCID <sup>-/-</sup>	SOX10 <sup>+/+</sup> IL2 <sup>+/-</sup> SCID <sup>-/-</sup>	1/8	n=89 (w)44/(b)45
SOX10 <sup>+</sup> IL2 <sup>-</sup> SCID <sup>-</sup>	SOX10 <sup>+/+</sup> IL2 <sup>-/-</sup> SCID <sup>-/-</sup>	SOX10 <sup>+/+</sup> IL2 <sup>-/-</sup> SCID <sup>-/-</sup>	1/8	
SOX10 <sup>+</sup> IL2 <sup>-</sup> SCID <sup>+</sup>	SOX10 <sup>+/+</sup> IL2 <sup>-/-</sup> SCID <sup>+/-</sup>	SOX10 <sup>+/+</sup> IL2 <sup>-/-</sup> SCID <sup>+/-</sup>	1/8	
SOX10 <sup>+</sup> IL2 <sup>+</sup> SCID <sup>+</sup>	SOX10 <sup>+/+</sup> IL2 <sup>+/-</sup> SCID <sup>+/-</sup>	SOX10 <sup>+/+</sup> IL2 <sup>+/-</sup> SCID <sup>+/-</sup>	1/8	
LacZ <sup>+</sup> IL2 <sup>-</sup> SCID <sup>-</sup>	SOX10 <sup>+/LacZ</sup> IL2 <sup>+/-</sup> SCID <sup>-/-</sup>	SOX10 <sup>+/LacZ</sup> IL2 <sup>+/-</sup> SCID <sup>-/-</sup>	1/8	n=18 (w)5/(b)13
LacZ <sup>+</sup> IL2 <sup>+</sup> SCID <sup>+</sup>	SOX10 <sup>+/LacZ</sup> IL2 <sup>+/-</sup> SCID <sup>+/-</sup>	SOX10 <sup>+/LacZ</sup> IL2 <sup>+/-</sup> SCID <sup>+/-</sup>	1/8	
LacZ <sup>+</sup> IL2 <sup>-</sup> SCID <sup>+</sup>	SOX10 <sup>+/LacZ</sup> IL2 <sup>-/-</sup> SCID <sup>+/-</sup>	SOX10 <sup>+/LacZ</sup> IL2 <sup>-/-</sup> SCID <sup>+/-</sup>	1/8	n=20 (w)11/(b)9
LacZ <sup>+</sup> IL2 <sup>-</sup> SCID <sup>-</sup>	SOX10 <sup>+/LacZ</sup> IL2 <sup>-/-</sup> SCID <sup>-/-</sup>	SOX10 <sup>+/LacZ</sup> IL2 <sup>-/-</sup> SCID <sup>-/-</sup>	1/8	n=6 (w)3/(b)3

Für den Erhalt der F3 Generation wurden ausschließlich  $SOX10^{+/LacZ} IL2^{-/-} SCID^{-/-}$  Tiere der F2 Generation mit NSG-Mäusen rückgekreuzt. Die theoretische mendelsche Verteilung der Mäuse der zwei Genotypen betrug hierbei 1:1. Praktisch entsprach die Verteilung nicht ganz der errechneten mit n = 22  $SOX10^{+/+} IL2^{-/-} SCID^{-/-}$  und n = 15  $SOX10^{+/LacZ} IL2^{-/-} SCID^{-/-}$  Tieren. Der Hauptanteil der Tiere beider Genotypen hatte weißes Fell (n = 26), nur circa 1/3 der Tiere zeigte eine braune Färbung.

**Tabelle 10: Genotypische Verteilung der F3 Generation nach Verpaarung von C57Bl/6<sup>SOX10/LacZ</sup> x NSG-Mäusen nach Absetzten von der Mutter (P21).** MV = mendelsche Verteilung; TV = tatsächliche genotypische Verteilung; (b) = wildfarbenedes Fell, (w) = weißes Fell.

F3	SOX10 <sup>+</sup> IL2 <sup>-</sup> SCID <sup>-</sup>	SOX10 <sup>+</sup> IL2 <sup>-</sup> SCID <sup>-</sup>	MV	TV
SOX10 <sup>+</sup> IL2 <sup>-</sup> SCID <sup>-</sup>	SOX10 <sup>+/+</sup> IL2 <sup>-/-</sup> SCID <sup>-/-</sup>	SOX10 <sup>+/+</sup> IL2 <sup>-/-</sup> SCID <sup>-/-</sup>	1/2	n=22 (w)14/(b)8
LacZ <sup>+</sup> IL2 <sup>-</sup> SCID <sup>-</sup>	SOX10 <sup>+/LacZ</sup> IL2 <sup>-/-</sup> SCID <sup>-/-</sup>	SOX10 <sup>+/LacZ</sup> IL2 <sup>-/-</sup> SCID <sup>-/-</sup>	1/2	n=15 (w)12/(b)3

### 3.3.2. Makroskopische Unterschiede zwischen SOX 10 homozygoten und heterozygoten Nachkommen

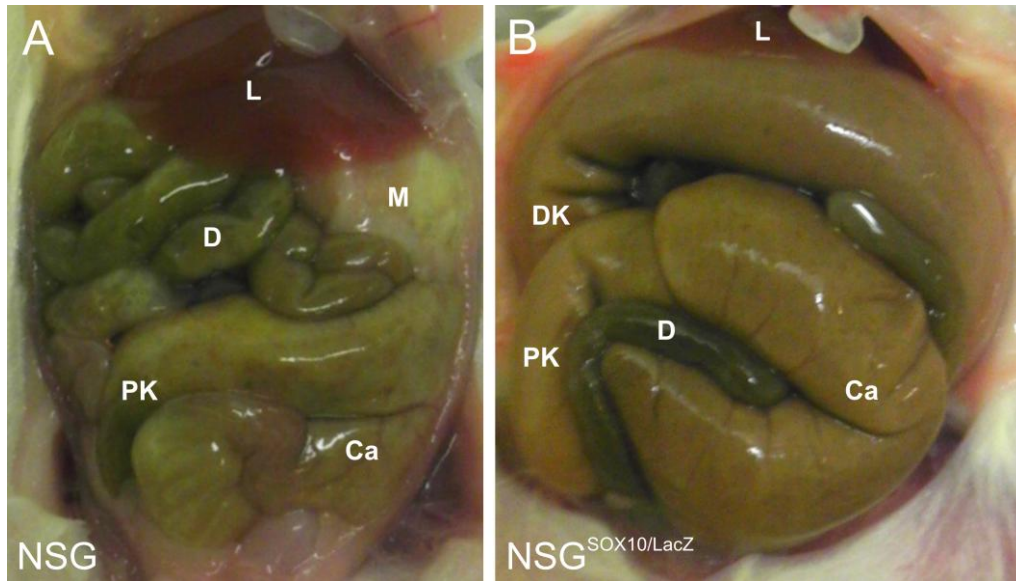
Vier der insgesamt 21 NSG<sup>SOX10/LacZ</sup>-Mäuse der Generation F1 und F2 entwickelten nach Absetzen vom Muttertier spätestens am 26. Lebenstag ein Megacolon. Dies

bedeutet, dass durch eine Verengung im Rektum die Passage des Kots unmöglich oder erschwert ist. Dadurch kommt es zu einem Rückstau des Nahrungsbreis und zur Aufweitung des Dickdarms proximal der Engstelle. Die davon betroffenen Tiere zeigten sich, im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern, als etwa 1/4 kleiner und waren häufig in einem schlechten Allgemeinzustand (Abb. 37). Bis auf das ausladende Abdomen waren sie stark abgemagert, litten oft an schleimigen Durchfällen und waren weniger aktiv als ihre Geschwister. Bei klaren Anzeichen eines Megacolons wurden diese Tiere euthanasiert und ihre Därme untersucht.



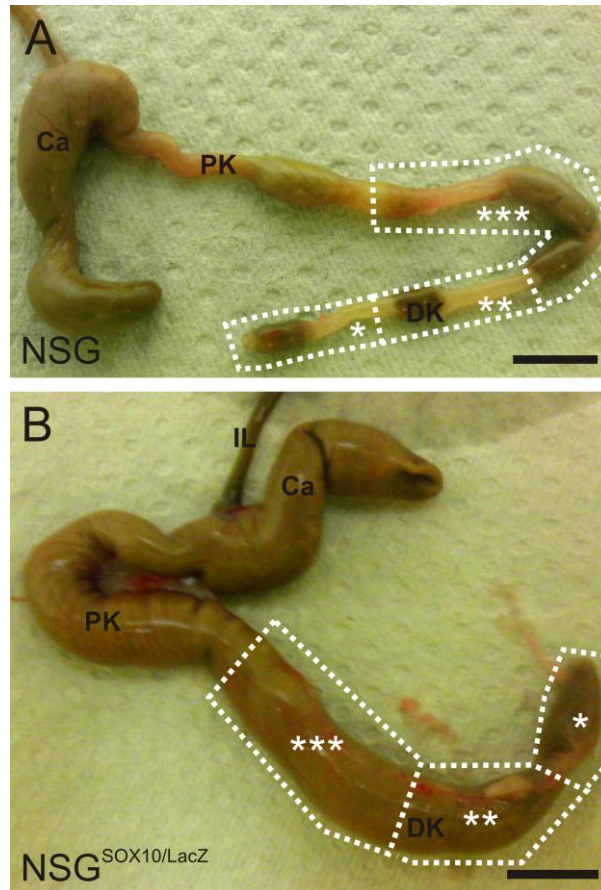
**Abbildung 37: Phänotypischer Vergleich von NSG und NSG<sup>Sox10/LacZ</sup>.** Abgebildet sind Wurfgeschwister am 25. Lebenstag. Das links abgebildete Tier ist heterozygot für LacZ. Im Vergleich zum Geschwistertier war es ca. ¼ kleiner und abgemagert. Das für Sox10 homozygote Tier (rechts) war normal entwickelt.

Bei Sectio der betroffenen Tiere zeigte sich eine starke Aufweitung des gesamten Dickdarms und des Caecums (Abb. 38 B). Zur weiteren Begutachtung des Darmes wurde dieser aus dem Bauchraum der Mäuse herausgelagert. Beim gesunden Tier (Abb. 39 A) ist das Caecum mit einer breiigen Nahrungsmasse gefüllt, im Kolon ließen sich wohlgeformte einzelne Kotballen erkennen.



**Abbildung 38: Vergleich des Darmsitus von NSG und NSG<sup>Sox10/LacZ</sup>.** Hier abgebildet sind die Därme zweier Wurfgeschwister (P 25). **(A)** Darm-Situs einer NSG-Maus (SOX<sup>+/+</sup> IL<sup>-/-</sup> SCID<sup>-/-</sup>) mit normaler Lage der Leber, des Magens und normal gefülltem Caecum. **(B)** Darm-Situs einer NSG<sup>SOX10/LacZ</sup>-Maus. Zu sehen ist ein prall gefülltes Caecum sowie ein stark aufgeweitetes Kolon. Die Leber ist durch das vergrößerte Kolon zurückgedrängt und der Dünndarm ist fast vollständig vom Kolon verdeckt. Ca = Caecum, D = Dünndarm, M = Magen, L = Leber, PK = proximales Kolon, DK = distales Kolon.

In den vom Megacolon betroffenen Mäusen ließen sich keine Kotballen im Dickdarm erkennen. Im in Abb. 39 B gezeigten Fall waren der Dickdarm inklusive des Caecums komplett mit verhärteten Kot angefüllt und keine einzelnen Kotballen abgrenzbar. Dadurch wurde der Dickdarm auf ein vielfaches seines normalen Durchmessers gedehnt. Zum Nachweis eines distalen aganglionären Segments wurde die distal gelegene Hälfte des Darmes vom Rest des Darmes abgeschnitten, zur Immunfluoreszenz-Färbung vorbereitet und grob in drei Teilbereiche eingeteilt.



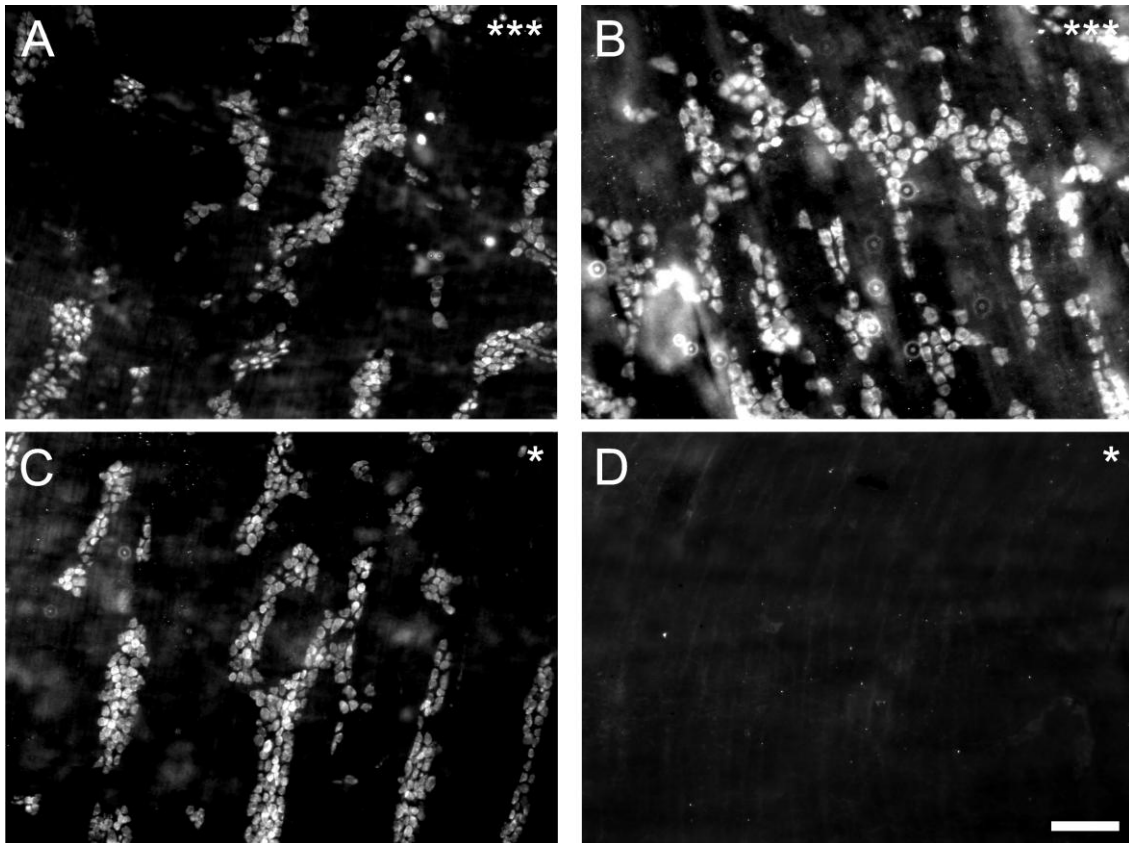
**Abbildung 39: Vergleich Dickdarm NSG-Maus vs. NSG<sup>SOX10/LacZ</sup>-Maus (P25; Wurfgeschwister).** (A) NSG-Maus. Normal ausgeprägtes Caecum und Dickdarm. Das Caecum ist mit weichem Futterbrei angefüllt, im gesamten Dickdarm normal gebildete Kotballen sichtbar. (B) NSG<sup>SOX10/LacZ</sup>-Maus. Zu sehen ist ein stark aufgeweiteter Dickdarm. Im gesamten Caecum und Dickdarm sind keine abgegrenzten Kotballen zu erkennen. Stattdessen ist dieser Bereich komplett mit hartem Kot angefüllt. IL = Ileum, Ca = Caecum, PK = proximales Kolon, DK = distales Kolon. \*\*\*: am weitesten proximal gelegener untersuchter Dickdarmabschnitt; \*\*: mittlerer untersuchter Dickdarmabschnitt; \*: am weitesten distal gelegener untersuchter Abschnitt. Maßstab: 1cm.

### 3.3.3. Zelluläre Unterschiede zwischen SOX 10 homozygoten und heterozygoten Mäusen

Zum Nachweis eines distalen aganglionären Segments des Kolons bei NSG<sup>SOX10/LacZ</sup>-Mäusen wurden Whole-mount-Färbungen des distalen Kolons angefertigt (anti-Hu C/D; anti-PGP9.5).

Die in Abb. 39 dargestellten Bereiche wurden separat voneinander untersucht. Hierbei bezeichneten die drei \*-Symbole den am weitesten proximal befindlichen Dickdarmabschnitt, ein \*-Symbol das am weitesten distal gelegene Darmsegment an. Im oral gelegenen Abschnitt beider Mäuse (Abb. 40 A, B) waren keine Unterschiede in Anzahl und Verteilung der Hu C/D- positiven Zellen zu erkennen. Im letzten, am weitesten anal gelegenen Dickdarmabschnitt (Abb. 40 C) des NSG-Tieres konnte

eine ähnliche Anordnung der Hu C/D-positiven Zellen wie im ersten Abschnitt (Abb. 40 A) beobachtet werden. In der NSG<sup>SOX10/LacZ</sup>-Maus hingegen ließen sich keine Hu C/D-positiven Zellen finden, was für ein Fehlen von neuronalen Zellen im betrachteten Bereich spricht.



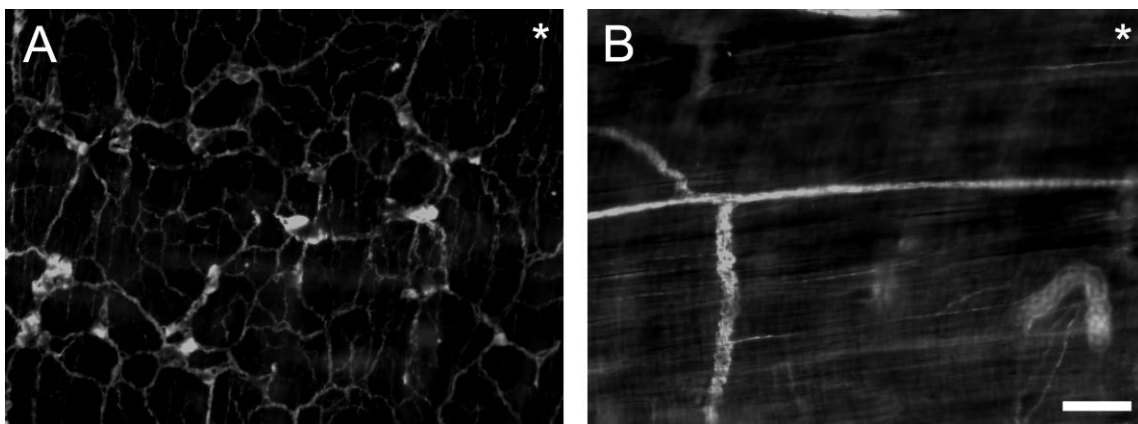
**Abbildung 40: Vergleich der Hu C/D-positiven Neurone in NSG- und NSG<sup>SOX10/LacZ</sup>-Mäusen (P25).** Für den Vergleich wurden die Darmabschnitte als *Wholemout* gefärbt. Die NSG-Maus ist in der linken Spalte dargestellt, die NSG<sup>SOX10/LacZ</sup>-Maus mit ausgeprägtem Megacolon in der rechten. In der für SOX10 Wildtyp-Maus ist die Immunoreaktivität für Hu C/D in den beiden observierten Abschnitten gleichmäßig (A, C). In der für SOX10 heterozygoten Maus ist allein im Abschnitt \*\*\* (B) eine normale Verteilung der Hu C/D-positiven Zellen zu beobachten. Im letzten Abschnitt (D) jedoch ist keinerlei Immunoreaktivität für Hu C/D durch Immunfluoreszenz nachweisbar. \*\*\*: am weitesten proximal gelegener untersuchter Dickdarmabschnitt; \*: am weitesten distal gelegener untersuchter Abschnitt. Maßstab: 100 µm.

Die Verteilung und Anordnung der neuritenartigen Zellfortsätze neuronaler Zellen wurde im am weitesten distal gelegenen Abschnitt durch eine Färbung mit einem PGP9.5 Antikörper untersucht. In Abb. 41 A war im weitesten distal gelegenen Dickdarmabschnitt der NSG-Maus ein dichtes gut verzweigtes Netz der neuronalen Zellen zu erkennen, sowie eine hohe Anzahl an in Clustern angeordneten Zellkörpern. In der vergleichenden Betrachtung dieses Abschnittes mit dem der NSG<sup>SOX10/LacZ</sup>-Maus (Abb. 41 B) zeigte sich ein starker Gegensatz. Der rektale Bereich dieser Maus wies keinerlei Zellkörper auf. Zusätzlich ist die Anzahl der

neuritenartigen Zellfortsätze deutlich geringer als in der NSG-Maus. Diese verliefen mit wenigen Querverbindungen längs des Darmes.

Die Fortsätze zeigten sich mit eher kräuselter Feinstruktur. Diese Fasern könnten einer der cholinergen, hypertrophierten Fehlinnervation beim humanen Morbus Hirschsprung entsprechen und sind extrinsischen Ursprungs.

Dieses Phänomen der NSG<sup>Sox10/LacZ</sup>-Mäuse ähnelt dem humanen Morbus Hirschsprung. Durch die Immundefizienz dieser Mäuse ist es möglich, humane Zellen zu implantieren und *in vivo* zu untersuchen.



**Abbildung 41: Vergleich der PGP9.5-positiven Neurone in NSG- und NSG<sup>SOX10/LacZ</sup>-Mäusen (P25).** Die NSG-Maus ist in der linken Spalte dargestellt, die NSG<sup>SOX10/LacZ</sup>-Maus in der rechten. Im am meisten distal gelegenen Abschnitt konnte man in der NSG-Maus eine Netzstruktur mit vielen Quervernetzungen zu beobachten. In der NSG<sup>SOX10/LacZ</sup>-Maus waren im letzten Abschnitt keine Zellkörper vorhanden. Die Neuritenfortsätze bilden einzelne dicke, konzentrierte Faserbündel und sind extrinsischen Ursprungs. \*: am weitesten distal gelegener untersuchter Abschnitt. Maßstab: 100 µm.





## **4. Diskussion**

Die Behandlung entwicklungsbedingter Erkrankungen des enterischen Nervensystems ist oft unbefriedigend und mit zahlreichen Komplikationen verknüpft [238-242].

Bei Patienten mit einer Aganglionose des Rektums bleibt derzeit lediglich die chirurgische Therapie. Das defekte Darmsegment wird entfernt. Eine koloanale Anastomose stellt die Darmpassage wieder her, ist aber mit zahlreichen Problemen wie chronischer Obstipation, Enterokolitis und Inkontinenz sowie letztlich mit deutlichen Einschränkungen der Lebensqualität verbunden [238, 239, 242]. Ist das aganglionäre Segment nicht auf das Rektum beschränkt, sondern betrifft auch weitere proximale Darmanteile, wie in seltenen Fällen auch Teile des Dünndarms, kommt es zu einem Verlust von Resorptionsfläche und zu einem funktionellen Kurzdarmsyndrom [243]. Für diese Patienten bleibt langfristig nur die Durchführung einer parentalen Ernährung oder die Option einer Darmtransplantation mit weiterhin schlechter Langzeitprognose [240, 241].

Zur Verbesserung der Therapie bzw. zur Entwicklung eines alternativen Therapieansatzes für diese Gruppe von Patienten wird in der vorliegenden Studie das Potenzial von postnatalen Vorläuferzellen des ENS für eine zellbasierte Therapie im Mausmodell evaluiert.

### ***4.1. Isolation, Proliferation und Differenzierung enterischer Progenitorzellen***

Derzeit besteht kein geeignetes zelltherapeutisches Protokoll um enterische Motilitätsstörungen zu behandeln. Grundsätzlich werden aber verschiedene Zellquellen als dafür geeignet vermutet [244].

Eine dieser Gruppe wird durch embryonale Stammzellen (ESZ) dargestellt. Diese können aus der inneren Zellmasse von 5-7 Tage alten Blastozysten gewonnen werden [245]. ESZ bieten den Vorteil, dass sie in Kultur unter entsprechenden Bedingungen im undifferenzierten Zustand unendlich expandiert werden können [245]. Bisher ist es gelungen aus diesen Zellen u.a. Motorneurone [103], dopaminerge [100] sowie periphere sensorische und sympathische Neurone [98] zu erzeugen. Verschiedenen Gruppen ist es weiter sogar gelungen neuralleistenähnliche Zellen zu induzieren [98, 246], jedoch konnte bisher keine

Differenzierung in Richtung enterische Neuronentypen gezeigt werden. Daneben stehen ES-Zellen im Verdacht Tumore zu entwickeln, was in Mäusen auch bestätigt wurde [116]. Weiter wird die Nutzung von ES-Zellen aus ethischer Sicht kontrovers diskutiert [116, 247] und die Nutzung hierzulande ist durch das Embryonenschutzgesetz signifikant eingeschränkt (Embryonenschutzgesetz §1, §2; <http://www.gesetze-im-internet.de/eschg/>).

Generell muss bei Fremdspenden von Organen und Zellen eine maximale Histokompatibilität von Spender und Empfänger gewährleistet sein, sonst kann es trotz Immunsuppression des Empfängers zur Abstoßung des Gewebes oder zu sogenannten Graft-Versus-Host-Diseases kommen [248, 249]. Eine totale Übereinstimmung der Gewebemerkmale kann z. B. durch die Nutzung induzierter pluripotenter Stammzellen (iPS) erreicht werden, die gleichzeitig die ethisch fragwürdige Transplantation embryonaler Stamm- und Vorläuferzellen umgeht. iPS-Zellen können durch die Überexpression verschiedener Wachstumsfaktoren wie z. B. Oct 4, Sox2, Klf4 und c-Myc in z. B. Fibroblasten generiert werden [105] und u.a. zu aktiven Motoneuronen [109] differenziert werden. Es sind bisher einige vielversprechende Therapieansätze im Tiermodell bekannt [113, 114], doch bergen diese Zellen auch die Gefahr der Tumorbildung [117]. Bisher konnte keine Differenzierung in enterische Neurone demonstriert werden. Dies und die bisher nur geringe Anzahl der erhaltenen iPS-Zellen [118, 119] machen daher die Anwendung dieser Zellen für therapeutische Zwecke schwierig.

Um Fremdspenden, Tumorformierungen und Differenzierung in nicht erwünschte Zelltypen zu umgehen, bietet sich die Verwendung von multipotenten Stammzellen oder Progenitoren, welche in der Regel dazu in der Lage sind nur eine bestimmte Zellart generieren zu können, an. Diese Zellen sind auch im ENS zu finden. So ist es bisher verschiedenen Gruppen gelungen, ENS-Vorläuferzellen aus embryonalem und postnatalem Darmgewebe der Maus zu isolieren. Die gewonnenen Zellen *in vitro* können expandiert werden und sich in Neurone und Gliazellen differenzieren [138, 139, 142, 144, 146, 232, 250, 251].

Natarajan und Kollegen reinigten RET<sup>+</sup> Zellen aus dem gesamten fötalen Gastrointestinaltrakt von PTY-Mausembryonen (E 11,0 - 11,5) mit Hilfe der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie auf. Durch eine Immunhistologie konnte gezeigt werden, dass aus diesen isolierten Zellen sowohl gliale (S100-positiv) und neuronale Zellen (Neuronen spezifische Enolase positiv) entstehen können [138]. Eine andere Gruppe

nutzte als Zellquelle Därme embryonaler und postnataler Ratten (E 14,5 - P 15). Auch hier wurden Zellen mit Hilfe von Durchflusszytometrie angereichert. In diesem Fall wurde via Antikörper der Rezeptor NGFR p75 detektiert, der an Nervenwachstumsfaktoren bindet [142]. Nach Differenzierung *in vitro* konnten hier die Zellen mittels Immunhistologie als Neurone, gliale Zellen und Myofibroblasten charakterisiert werden [142].

Damit postnatale Zellen zur Regeneration eines ENS genutzt werden können, muss eine ausreichende Anzahl an Zellen erreicht werden. Um evaluieren zu können, ob postnatale ENS-Zellen ein proliferatives Potenzial bieten, kultivierten Bondurand *et al.* postnatale ENS-Zellen (P 2 - P 14). Nach wenigen Tagen führte dies zur Ausbildung neurosphärenartiger Körper, was für ein proliferatives Potenzial oder/ und Aggregation der Zellen sprach. Als Nachweis der Multipotenz dieser Zellcluster konnten sie darin GFAP- und TUJ1-positive Zellen nachweisen [146]. In frisch isolierten Zellen hingegen konnten direkt nach der Isolierung keine Zellen beobachtet werden, die eine Expression für GFAP und TUJ1 aufwiesen. Dies ließ annehmen, dass die sich entwickelnden Neurone aus *in vitro* proliferierten Zellen differenziert hatten. Allerdings wurde nicht gezeigt, dass die entstandenen Neurone und Glia-Zellen tatsächlich aus *in vitro*-proliferierten Zellen entstanden waren [146]. Die Möglichkeit, dass die Ausbildung der Sphären, durch Zellaggregation zustande kam, konnte nicht definitiv ausgeschlossen werden. Auch exprimierten die Neurone zwar neuronenspezifische Oberflächenmarker [146], aber eine elektrophysiologische Funktionalität *in vitro* proliferierter und differenzierter Neurone wurde nicht gezeigt.

Suarez-Rodriguez und Kollegen konnten wiederum zeigen, dass es ebenso möglich ist, enterische Progenitoren aus murinem postnatalem Darm mit Hilfe eines adhärennten Zellkultursystems Nestin-positive Zellen zu expandieren und daraus Neurone, Glia-Zellen und glatte Muskelzellen zu gewinnen [251].

Um eine weitere Charakterisierung postnataler Progenitorzellen des ENS *in vitro* vorzunehmen und auch ihr proliferatives Potential näher beurteilen zu können, isolierten wir aus dem Darm postnataler C57Bl/6- und C57Bl/6<sup>eGFP</sup>-Mäuse (P 0 – P 1) Vorläuferzellen des ENS und kultivierten diese für sieben Tage unter proliferativen Konditionen. Nach wenigen Tagen bildeten sich Sphäroide aus. Da diese aus Tieren gewonnen wurden, die unter einem  $\beta$ -Aktin Promotor des Huhns eGFP exprimieren, zeigten die Sphäroide eine durchgängige grüne Fluoreszenzfärbung.

Nach der Kultivierung dieser Sphäroide unter Differenzierungsbedingungen konnten wir mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen zeigen, dass die *in vitro* proliferierten Zellen ein multipotentes Verhalten aufwiesen. Neben den panneuralen Markern TUJ1, Hu C/D und PGP9.5 konnten wir auch die Subpopulation der Stickoxid-Synthase (nNOS) enthaltenden Nervenzellen nachweisen. Auch konnten wir gliale Zellen durch Antikörper gegen das gliale fibrilläre azidische Protein (GFAP) und gegen S100 $\beta$  zeigen.

Nach einer Woche unter Proliferations- und einer weiteren Woche unter Differenzierungsbedingungen konnten ca. 10 % der Zellen den panneuralen Markern Hu C/D und PGP9.5 zugeordnet werden. Positiv für die Stickoxid-Synthase zeigten sich rund 7,6 % der Zellen. Zu den ermittelten Werten von PGP9.5 und HuC/D nach Differenzierung passt der ermittelte Anteil der TUJ1-positiven Zellen allerdings nicht, denn alle drei Marker gelten als panneural. Dies bedeutet, dass alle drei Marker alle vorhandenen Neurone detektieren und somit nach Auswertung ähnliche prozentuale Anteile zeigen sollten.

TUJ1-positive Zellen machten einen Anteil von 29 % aus. Diese Diskrepanz zwischen den für Hu C/D oder PGP9.5 und für TUJ1 ermittelten Zahlen ließ sich am schlüssigsten durch die Vermutung erklären, dass eine Überlappung der Immunreaktivität für TUJ1 mit anderen Zellen der Kultur vorliegt, welche jedoch noch nicht Hu C/D oder PGP9.5 exprimierten.

Tatsächlich bemerkten auch Hendershot *et al.*, dass im sich entwickelnden Darm von Hand2 Knock-out-Mäusen ein quantitativer Unterschied zwischen den TUJ1-immunoreaktiven und der gesamten Hu C/D-positiven Population vorlag. In diesem Tiermodell verblieb ein Teil der enterischen Neuralleistenzellen scheinbar in einem Vorläuferstadium ohne ihre Entwicklung mit einer vollständigen Differenzierung abzuschließen. Es wurde vermutet, dass die nicht reifen Nervenzellen von Hand2 Knock-out-Mäusen schon TUJ1 exprimieren, wobei sie sich aufgrund ihres noch nicht vollständigen differenzierten Zustands negativ für Hu C/D zeigten [252]. Ebenfalls gaben sie als mögliche Ursache an, dass das neuronenspezifische  $\beta$ -Tubulin nicht ausschließlich von Neuronen exprimiert wird [252]. Unter Berücksichtigung dessen könnte ein Teil der TUJ1-positiven Zellen in der vorliegenden Studie eher neuronale Progenitorzellen repräsentieren als junge und voll differenzierte postmitotische Nervenzellen, da sie nur eine Woche lang unter Differenzierungskonditionen kultiviert wurden. Allerdings wäre es auch möglich, dass TUJ1, wie oben erwähnt, nicht nur

von Neuronen exprimiert wurde. Jedoch erwies sich die Auswertung der TUJ1-positiven Zellen als insgesamt schwierig, da  $\beta$ -III-Tubulin hauptsächlich in den neuritenartigen Fortsätzen der Zellen exprimiert wurde und nicht immer zuverlässig einem Zellkern zugeordnet werden konnte.

Um für einen stammzelltherapeutischen Ansatz zur Behandlung von gastrointestinalen Motilitätsstörungen eine ausreichende Anzahl an Zellen zu generieren, müssen die isolierten Zellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung bzw. Proliferation besitzen. Mehrere Forschergruppen untersuchten daraufhin embryonale und postnatale Zellen des Maudarms [142, 145, 146, 232, 250, 251].

Diese Gruppen generierten Sphäroide aus embryonalen und/ oder postnatalen Zellen [142, 146, 232, 251]. Um den selbsterneuernden Charakter darzustellen, vereinzeln sie die Zellen aus den primären Sphäroiden und kultivierten diese erneut unter Proliferationsbedingungen. Dadurch entstanden ebenfalls Sphäroide (sekundäre Sphäroide). Daraus folgerten sie, dass zur Teilung befähigte neurale Zellen in diesen Kulturen vorhanden seien [142, 146, 232, 251]. Allerdings können Sphäroide nicht nur durch Teilung der Zellen entstehen. Sie können sich auch durch Aggregation mehrerer nicht zur Teilung befähigter Zellen bilden.

Um zu demonstrieren, dass sich in primären Sphäroiden weniger reife Neurone befinden als in differenzierten Zellkulturen aus Sphäroiden, wurden in Paraffin gegossene Sphäroide geschnitten und der prozentuale Anteil der reifen Neurone ermittelt. Die Sphäroide enthielten nach einer Woche unter Proliferationsbedingungen *in vitro*  $3,8 \pm 0,9$  % Hu C/D-positive und  $3,0 \pm 3,8$  % nNOS-positive Neurone. Im Vergleich dazu zeigten aus Sphäroiden differenzierte Zellkulturen signifikant höhere Werte (Abb. 16; Hu C/D:  $10,3 \pm 3,8\%$ ,  $P < 0,001$ ; nNOS:  $7,6 \pm 2,2$  %,  $P < 0,001$ ). Dies lässt darauf schließen, dass 1.) undifferenzierte Zellen in Sphäroiden vorhanden sind und 2.) die neuronalen Zellen, die nach der Differenzierung vorhanden sind, zum Großteil aus sich *in vitro* teilenden Zellen entstanden sind.

Da dieser Versuch aber keinen direkten Proliferationsnachweis lieferte, wurden Bromdesoxyuridin(BrdU)-Inkorporationsversuche durchgeführt. BrdU ist ein Thymidin Analogon und wird an dessen Stelle in die sich replizierende DNA eingebaut [253, 254]. Es kann daher zum Nachweis der Proliferation von Zellen *in vitro* [255] und *in vivo* z. B. in der adulten Neurogenese im zentralen Nervensystem [256, 257] genutzt

werden. BrdU kann nur in der S-Phase (Replikation der DNA) der Zelle inkorporiert werden [256], sodass Zellen, die sich in anderen Phasen des Zellzyklus befinden, nicht durch BrdU markiert werden können. Almond et al. bewiesen, dass sekundäre Sphäroide BrdU aufnehmen können, jedoch untersuchten sie nicht, welche Zelltypen, insbesondere Glia- und Nervenzellen, aus diesen Zellen nach Differenzierung entstanden waren [145]. Dies sollte in vorliegender Studie untersucht werden. Als Grundvoraussetzung wurde hierbei angenommen, dass differenzierte Neurone, die bereits zum Zeitpunkt der Isolation vorhanden waren, sich nicht teilen können. Diese Zellen nehmen somit auch kein BrdU auf. Um möglichst alle sich teilenden Zellen in der Zellkultur der primär gewonnenen ENS Progenitorzellen mit BrdU zu markieren, wurden die Zellen für einen Zeitraum von sechs Tagen unter Proliferationsbedingungen kultiviert. Nachfolgend wurden sie für eine Woche unter Differenzierungsbedingungen ohne BrdU kultiviert und immunhistochemisch charakterisiert. Dabei konnten sowohl gliale als auch neuronale Zellen identifiziert werden, die BrdU aufgenommen hatten. Diese waren daher aus Zellen entstanden, die sich während der Proliferationsphase geteilt hatten. Nach quantitativer Auswertung wiesen  $39,9 \pm 14,6$  % aller GFAP-positiven Zellen, sowie  $64,9 \pm 3,5$  % der Hu C/D und  $63,8 \pm 2,3$  % der nNOS-positiven einen BrdU-positiven Kern auf. Im Vergleich dazu erreichten die panneuronalen Marker TUJ1 und PGP9.5 nur Werte von  $28,8 \pm 6,9$  % bzw.  $35,5 \pm 5,1$  %.

Da Hu C/D, sowie TUJ1 und PGP9.5 panneuronale Marker darstellen und somit auf allen neuronalen Zellen vorhanden sein sollten, ist es unklar, weshalb sie nicht ähnlich hohe prozentuale Anteile erreichen. Allerdings gibt es, wie schon erwähnt, Hinweise darauf, dass TUJ1 nicht nur in reifen Neuronen exprimiert wird. Weiter könnten technische Schwierigkeiten bei der Auswertung der Zellen für diese Diskrepanzen ursächlich sein. Hu C/D und nNOS färben hauptsächlich das Zytoplasma und sind somit leicht dem jeweiligen Zellkern zuzuordnen. TUJ 1 (beta-Tubulin III Protein) hingegen ist hauptsächlich in den neuritenartigen Fortsätzen exprimiert und erschwert so eine genaue Zuordnung zu dem entsprechenden Zellkern. PGP9.5 wird allerdings sowohl im Zytoplasma als auch in den Prozessen neuronaler Zellen exprimiert, ist also leicht dem entsprechenden Zellkern zuzuordnen, was jedoch den fast 30 % niedrigeren Anteil im Vergleich zu Hu C/D-positiven Zellen nicht erklärt.

Wie oben erwähnt, muss für eine therapeutische Anwendung im Menschen eine Passagierung der Zellen vorgenommen werden.

Bisher konnte dargestellt werden, dass es möglich ist, aus murinen und auch humanen Geweben enterische Progenitorzellen zu isolieren und durch enzymatische Dissoziation sekundäre und tertiäre Sphären zu generieren [145, 258]. Die Passagierung von primären Sphären mit Hilfe von enzymatischer Dissoziation zeigt sich bisweilen als schwierig. Darüber hinaus zeigten traditionelle Passagierversuche von ZNS Neurosphären, dass die Wachstumsrate der sekundären Neurosphären langsam ist [259]. Ebenso wurde die Seneszenz der passagierten Zellen vermutet [259]. Alternativ ist es aber auch möglich die Sphären mit Hilfe eines automatisierten Gewebhackers zu vierteln. Diese Methode erwies sich als schonender, denn die Zell-Zell-Kontakte blieben größtenteils erhalten und zelluläre Traumata wurden minimiert [259].

In vorläufigen Experimenten unserer Projektpartner des anatomischen Instituts Tübingen bestätigte sich ein ähnliches Verhalten enterischer Sphäroide, die ebenfalls mit einem Gewebehacker zerteilt worden waren. Diese nahmen auch nach vier Wochen als tertiäre Sphären noch BrdU auf. Nach Differenzierung der tertiären Sphäroide konnten BrdU und HuC/D oder nNOS ko-gelabelte Zellen identifiziert werden (persönliche Kommunikation mit Peter Neckel).

Darüber hinaus ist es für eine mögliche Zelltherapie wichtig, dass funktionale Neurone aus *in vitro* prozessierten Zellen entstehen können. Versuche von Projektpartnern vom NMI Reutlingen konnten zusätzlich demonstrieren, dass proliferierte postnatale enterische Vorläuferzellen nach Differenzierung *in vitro* spannungsaktivierte Natriumströme besitzen, die durch Tetrodotoxin blockiert werden können (persönliche Kommunikation). In 50 % der untersuchten Zellen konnten Aktionspotenziale ausgelöst werden. Dabei ließen sich phasische als auch tonische Aktionspotenzialmuster unterscheiden. Diese Aktionspotenzialmuster wurden in früheren Studien schon für adulte myenterische Neurone des Meerschweinchens beschrieben [260]. Um zu beweisen, dass die abgeleiteten Zellen auch wirklich aus *in vitro* proliferierten Zellen entstanden waren, waren sie während der Proliferationsphase unter Zugabe von BrdU kultiviert worden und während der elektrophysiologischen Charakterisierung mit Biozytin befüllt (persönliche Kommunikation NMI Reutlingen). Biozytin lässt sich immunzytologisch nachweisen

und erlaubt die Identifizierung der abgeleiteten Zellen. Eine Kofärbung von BrdU und Biozitin zeigte an, dass sich diese Zelle *in vitro* geteilt hatte und einen spannungsabhängigen Natriumkanal aufwies.

Durch diese Versuche konnten wir demonstrieren, dass es möglich ist primäre, enterische Progenitorzellen *in vitro* zu expandieren und diese in gliale und funktionale neuronale Zellen zu differenzieren.



## **4.2. Implantation der ENS-Progenitoren in ein immunsupprimiertes Mausmodell**

Nach der erfolgreichen Isolation und *in vitro* Expansion von embryonalen und postnatalen ENS-Vorläuferzellen wurde demonstriert, dass die Implantation von neuronalen Progenitorzellen aus verschiedenen Zellquellen in verschiedene gastrointestinale Gewebe grundsätzlich möglich ist [138, 261-268]. Nachfolgend werde ich auf einige dieser Studien näher eingehen.

*In vitro* gelang es Metzger et al. embryonale ENS-Progenitorzellen, die unter einem Aktinpromotor eGFP exprimierten, in embryonale Darmschnitte zu implantieren. Dort bildeten diese Zellen gliale und neuronale Zellen aus [236]. Natarajan et al. isolierten embryonale RET-positive ENS Zellen und implantierten diese in embryonalen aganglionären Darm *in vitro* [138]. Immunhistologisch wiesen sie nach bis zu 14 Tagen nach, dass die implantierten Zellen den Darm besiedelt hatten und dass unter diesen gliale und neuronale Zellen zu finden waren [138].

Weiter wurden embryonale und postnatale zentralnervöse oder enterische Progenitorzellen in verschiedene Tiermodelle implantiert [267-269].

Micci et al. implantierten beispielsweise embryonale Progenitorzellen des ZNS in den Pylorus von NOS defizienten Mäusen. Durch das Fehlen von nNOS<sup>+</sup> Zellen wird funktional eine Magenlähmung hervorgerufen. Man untersuchte nach nur einer Woche nach Implantation die Magenentleerung dieser Mäuse [267]. 20 Minuten nach Gabe von Phenolrot wurden die Mägen entfernt und *ex vivo* in einem NaOH-haltigen Bad homogenisiert und nach einer Stunde Inkubationszeit der Überstand auf Phenolrot hin untersucht. [267]. Zwar zeigten die Mäuse mit transplantierten Zellen eine schnellere Magenentleerung als nNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse ohne implantierte Zellen, doch demonstrierten Micci et al. nicht, ob die transplantierten Mäuse hinsichtlich der Magenentleerung Werte ähnlich gesunder Mäuse erreichten. Weiter wiesen sie in den Mägen der Mäuse PGP9.5-positive und GFAP-positive Zellen nach. Ob allerdings nNOS<sup>+</sup> Zellen vorhanden waren untersuchten sie nicht [267], obwohl eine Verbesserung der Magenentleerung vornehmlich durch nNOS<sup>+</sup> Neurone erwartet werden würde.

Aus praktischer, aber vor allem aus ethischer Sicht ist die Verwendung solcher ZNS abgeleiteter und embryonaler Progenitoren für eine zellbasierte Therapie schwierig

(siehe Abschnitt 4.1). Quellen enterischer Progenitorzellen hingegen sind relativ einfach zu erreichen. Zwei Arbeiten, die sich dem Potenzial postnataler ENS-Progenitorzellen annahmen, applizierten die Zellen in die Magen- oder in die Dünndarmwand erwachsener Ratten [262, 263]. Diese Zellen integrierten sich dort nach Implantation und exprimierten neuronale und gliale Markerproteine. Allerdings wurden die immunhistologischen Untersuchungen schon sieben Tage nach Injektion der Zellen vorgenommen, sodass ein Langzeitüberleben der Zellen nicht nachgewiesen werden konnte [262, 263]. Zwar implantierte man GFP-positive Zellen, bewies aber nicht, dass es sich bei den an der Transplantationsstelle gefundenen Neuronen und Gliazellen wirklich um implantierte Zellen handelte [262, 263].

In vorliegender Arbeit wurden enterische Progenitorzellen aus postnatalem Darm eGFP-positiver Mäuse isoliert und für sieben Tage unter Proliferationsbedingungen expandiert. Dies sollte gewährleisten, dass die Zellen nach Implantation in das distale Kolon immundefizienter Mäuse einfach, aber definitiv wieder gefunden werden konnten. Darüber hinaus sollte ein Nachweis von BrdU zeigen, ob reife Neurone aus *in vitro* proliferierten Zellen entstanden waren. Immundefiziente Mäuse wurden gewählt, um eine Abstoßung zu verhindern. Im Vergleich zu den anderen Arbeiten war es zum ersten Mal möglich, das Langzeitverhalten postnataler ENS-Progenitorzellen nach Transplantation im Mikromilieu eines normal mit ENS besiedelten Darms zu beobachten. In Hinblick auf eine zellbasierte Therapie war dies nötig, um das klinische Szenario einer autologen Progenitorzell-Transplantation imitieren zu können. Dafür wurden die Zellen jeweils 3 oder 12 Wochen (Ende der Studie) im Empfängertier belassen. Immunhistochemische Untersuchungen nach der Explantation des transplantierten Darmabschnittes sollten offenbaren, ob die eGFP-positiven Zellen in das anliegende Gewebe eingewandert und welche Zelltypen entstanden waren.

Die transplantierten Zellen wurden sowohl in der Subserosa, den Muskelschichten, sowie in der submukösen Schicht des Darmes identifiziert. Dies zeigt an, dass die Injektion der undifferenzierten Zellen in die, im Vergleich zum menschlichen Darm, sehr dünnen Darmwand der Maus in Hinsicht auf die Injektionstiefe schwer reproduzierbar ist. So konnte die Injektion in immer die gleiche definierte Gewebeschicht des Darms nicht gewährleistet werden.

Dies ließ auch darauf schließen, dass in vorliegender Studie keine Schichten übergreifende Migration in Richtung des myenterischen Plexus vorlag, jedoch eine Migration längs der injizierten Schicht.

In vorangegangenen Studien wurde eine Migration von Vorläuferzellen in Richtung Plexus myentericus, sogar nach intraperitonealer Injektion, beschrieben [265, 268]. In diesen Studien wurden allerdings zum einen meist Zellen embryonaler Herkunft verwendet [265, 268], zum anderen waren die Empfängertiere meist sehr jung [268]. Eine mögliche Ursache für die fehlende radiale Migration und konzentrische Organisation der implantierten Zellen im adulten Empfänger Darm kann das Fehlen von entsprechenden Signaltransduktionskaskaden sein, wie sie in der Embryonalentwicklung des Darmes bekannt sind.

Eine dieser Signaltransduktionskaskaden wird vermittelt durch Netrin, einem Laminin verwandten Protein, und dessen Rezeptor DCC (engl. deleted in colorectal cancer, gelöscht in kolorektalem Krebs).

Es ist bekannt, dass Netrin für die sekundäre, zentripetale Migration der ENCCs aus der Region des Plexus myentericus in Richtung der submukösen Region während der Embryonalentwicklung des Darmes benötigt wird [270]. Es wird im embryonalen Maudarm im äußeren Mesenchym und an der Basis des mukösen Epithels exprimiert [270], also den Regionen, an denen später der Plexus myentericus und der Plexus submucosus entstehen. Netrin wirkt dort als Leitmolekül für die von der Neuralleiste abgeleiteten Zellen, die den membranständigen Netrin Rezeptor DCC exprimieren [270]. Während der sekundären radialen Wanderung erreicht die DCC Expression ihren Höchstwert [270]. Zwar wird humanes Netrin-1 in verschiedenen adulten Geweben nachgewiesen, am höchsten u.a. in Herz, Dünndarm und Kolon, doch schreibt man diesem eher eine Funktion außerhalb der Vermittlung des Axonauswuchses zu [271]. Bisher ist nicht bekannt, ob die vorhandenen Netrin-Level im adulten Dünndarm und Kolon sich in den Regionen des Plexus myentericus und submucosus konzentrieren sowie ob und wie das vorhandene Netrin auf implantierte enterische neuronale Vorläuferzellen wirkt. Deshalb wäre es durchaus möglich, dass das im adulten Kolon vorhandene Netrin nicht zur radialen Wanderung der implantierten Zellen ausreicht um diese bis in den Plexus myentericus vordringen zu lassen, wie es von embryonalen transplantierten enterischen Progenitoren berichtet worden ist. Auch ist es möglich, dass postnatale enterische Progenitorzellen

aufgrund einer herabregulierten DCC-Expression nicht mehr empfänglich für die Lockwirkung des Netrin sind.

Für eine korrekte konzentrische Anlage der Darmschichten während der embryonalen Entwicklung sind des Weiteren mesenchymal exprimierte knochenmorphogenetische Proteine (engl. BMPs), die durch die epitheliale Expression von Sonic hedgehog (Shh) induziert werden, beteiligt und wichtig für die Entwicklung des ENS [272]. *In vivo* werden BMPs am stärksten im Darmmesenchym angrenzend zum Epithel exprimiert [232, 273]. Im Hühnchen oder in der Maus führt die Blockierung des Shh Signals zur Störung des BMP Signals und nachfolgend zur abnormen Entwicklung der Darmwand und zu ektopen enterischen Neuronen, die oft nahe am Epithel zu finden sind [147, 273, 274]. Die Aktivierung des BMP-Signalwegs fördert also die Bündelung von ENCCs in Ganglien und schränkt die radiale Migration von ENCCs in der Darmwand ein [272].

Es ist also durchaus möglich, dass im adulten Empfängerdarm eine sehr hohe Shh-Konzentration und somit auch eine hohe BMP Expression vorliegt und so verhindert wird, dass die transplantierten enterischen Progenitorzellen bis zum Plexus myentericus vordringen können. Allerdings kann auch die postnatale Natur der in vorliegender Studie verwendeten postnatalen ENS-Progenitoren ursächlich für das limitierte gerichtete Migrationsverhalten gen Plexus myentericus sein.

Die immunhistochemische Charakterisierung der injizierten Zellen mit Antikörpern gegen die Antigene Hu C/D, TUJ1, PGP9.5, nNOS, S100 $\beta$  und GFAP *in vivo* bestätigte, dass die undifferenziert injizierten Zellen im Mikromilieu des Darmes in der Lage sind, in neuronale und gliale Zellen zu differenzieren. Es lässt sich demnach annehmen, dass auch das Mikromilieu eines adulten, normal ganglionierten Darmes dazu in der Lage ist, die Differenzierung neuraler, aus postnatalem Darm isolierter ENS-Progenitorzellen zu vermitteln. Durch die Zugabe von BrdU während der Proliferation *in vitro* konnte gezeigt werden, dass die *in vivo* entstandenen Neurone und glialen Zellen aus *in vitro* proliferierten Zellen entstammten. Ein beispielhaftes Auswerten der BrdU- und markerpositiven Zellen eines transplantierten Tieres offenbarte, dass 48,6 % der nNOS, 50,0 % TUJ1, 61,0 % der PGP9.5, 54,2 % der S100 $\beta$ - und 52,8 % der GFAP-positiven Zellen BrdU inkorporiert hatten, d.h. aus *in vitro* proliferierten Zellen entstanden waren.

Die Proliferation *in vitro* stellt einen sehr wichtigen Punkt dar, da zwar *in vivo* ein Teil der Zellen zur Proliferation nach Transplantation befähigt ist [275], doch der Großteil der benötigten Zellen durch *in vitro*-Proliferation generiert werden müssen, um das ENS in beschädigten oder aganglionären Darmsegmenten rekonstruieren zu können.

Bisher berichteten mehrere Gruppen davon, dass die Isolation enterischer Progenitoren sowohl aus gesundem neonatalem als auch adultem humanem Darmgewebe (Vollwandpräparate und Biopsieproben) möglich ist [148, 150, 276]. Ebenso wurde darüber berichtet, dass auch eine Isolierung dieser Zellen aus Darmgewebe von Hirschsprung Patienten erfolgreich ist [145, 149]. In vorliegender Studie wurden enterische Progenitorzellen aus tumorfreien Vollwandpräparaten von Darmkrebspatienten isoliert. Beim Großteil der Proben gelang es nicht, die Zellen *in vitro* zu proliferieren. Dies bedeutet, dass sich nach sieben Tagen Kultivierung unter Proliferationsbedingungen noch keine neurosphärenartigen Strukturen ausgebildet hatten. Dies lag wahrscheinlich an der chemotherapeutischen Vorbehandlung der Patienten sowie an ihrem fortgeschrittenen Alter (42 – 84 Jahre). Bei einigen wenigen Geweben gelang die Isolation und Proliferation. Diese Zellen wurden in immundefiziente Mäuse implantiert. Nach drei Wochen konnten via Immunhistochemie auch hier der Nachweis erbracht werden, dass aus den humanen adulten ENS-Progenitoren ebenfalls neuronale und gliale Zellen entstanden sind. Hierbei wurden humane Zellen mit Hilfe eines Antikörpers gegen humane Zellkerne detektiert.

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, postnatale enterische Progenitorzellen muriner und humaner Herkunft in ein immundefizientes Mausmodell mit intaktem enterischen Nervensystem zu implantieren und ein Überleben von bis zu 12 Wochen (Ende der Studie) nachzuweisen.

Ein Langzeitverhalten dieser postnatalen Progenitoren muss allerdings auch in einem HSCR-Tiermodell untersucht werden, da hier die Untersuchung der funktionellen Komponenten, wie Verbesserung der Peristaltik im betroffenen Darmsegment nach Transplantation oder des Kotabsatzes möglich ist. Weiter ist anzunehmen, dass in HSCR-Tiermodellen das Mikromilieu der Darmwand verändert ist und dies auf das Überleben und die Integration der transplantierten enterischen Progenitorzellen im aganglionären Darmsegment einen Einfluss haben könnte.

Weiter ist es wichtig zu überprüfen, ob die applizierten ENCCs nach Differenzierung in synaptischen Kontakt mit den bisher vorhandenen Nervenzellen treten.

Um humane ENS-Progenitorzellen adäquat untersuchen zu können, ist ein immundefizientes HSCR-Mausmodell nötig. Dies soll verhindern, dass implantierte humane Zellen vom Immunsystem der Maus angegriffen werden. Bisher ist ein solches Modell allerdings nicht verfügbar.

In vorliegender Arbeit wurden Sox10<sup>+LacZ</sup>-Mäuse auf C57Bl/6 (schwarzes Fell) [235] Hintergrund, was einem Morbus Hirschsprung Phänotyp entspricht, mit immundefizienten NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>II2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ-Mäusen (weiß, NSG) gekreuzt. Diese sind bekannt dafür, dass sie einerseits durch die schwere Immundefizienzmutation (*scid*), andererseits durch ein IL2-Rezeptor-Defizit ein Höchstmaß an Immundefekten aufweisen [234]. Dadurch haben sie Defizite in den Zytokin-Signalwegen, zusätzlich fehlen ihnen reife T-Zellen, B-Zellen und natürliche Killerzellen, weswegen sie für Xenotransplantations-Untersuchungen gut geeignet sind [237].

Bereits in der F2-Generation konnten Mäuse mit entsprechendem Genotyp (Scid<sup>-/-</sup> IL2<sup>-/-</sup> Sox10<sup>+LacZ</sup>) generiert werden. Hierbei trugen nur 6 von 133 genotypisch bestimmten Mäusen diese Kombination. Nach Mendel hätte die Anzahl der gewünschten Tiere fast dreimal so hoch sein müssen (ca. 16 Tiere). Es ist aber möglich, dass die mutanten Embryonen schon intrauterin versterben, oder nach ihrer Geburt vom Muttertier gefressen wurden. Ebenso könnte das errechnete mendelsche Verhältnis mit höheren Wurfzahlen erreicht werden.

Nach erneuter Rückkreuzung mit NSG-Mäusen konnte in der F3 Generation fast einen 50 %igen Anteil an Scid<sup>-/-</sup> IL2<sup>-/-</sup> Sox10<sup>+LacZ</sup>-Mäusen in den Würfen beobachtet werden.

Insgesamt sprechen diese Ergebnisse dafür, dass die Mutationen dieser drei Gen-Loci ohne weitere Probleme kombiniert werden können. Auch eine weitere Zucht dieser Tiere ist ohne Probleme möglich, da durchgehend große Welpenanzahlen pro Wurf fallen. Allerdings entwickeln nur vier von 21 der Scid<sup>-/-</sup> IL2<sup>-/-</sup> Sox10<sup>+LacZ</sup>-Tiere nach Absetzen vom Muttertier ein Megacolon. Diese Tiere zeigten sich wenig aktiv und stark abgemagert, aber mit auffällig aufgetriebenem Bauchbereich. Nach Euthanasie der Tiere und makroskopischer Untersuchung des Darms ließ sich eine Stenose im distalen Kolon feststellen. Der Dünndarm stellte sich normal dar, Caecum und das gesamte Kolon waren stark aufgetrieben und mit weicher bzw. stark

verhärteter Kotmasse angefüllt. Immunhistochemisch wurde der Dickdarm im Ganzen untersucht. Hierbei lag im proximalen Teil des untersuchten Bereichs noch eine normale Besiedelung durch enterische Neurone vor. Im mittleren untersuchten Bereich hingegen war eine Veränderung der Nerven- bzw. Ganglienvernetzung der PGP9.5-positiven Neurone zu beobachten, wobei die Hu C/D-Verteilung relativ normal wirkte. Dieser Bereich entsprach damit der Übergangzone. Im rektalen Bereich wiederum waren kaum noch PGP9.5-positive Neuritenfortsätze zu finden, Hu C/D-positive Zellen waren nicht nachzuweisen. Dies entsprach einer Aganglionose bei Morbus Hirschsprung mit fehlenden Nervenzellen im distalen Kolon mit paralleler Hypertrophie der extrinsischen Nervenfasern.

Mit Hilfe dieses Mausmodells ist es in Zukunft möglich, Studien über das Verhalten und das Potential humaner postnataler ENS-Stamm- und Progenitorzellen zu untersuchen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stellen einen erheblichen Schritt in Richtung einer zellbasierten Therapie, die sich auf enterische Progenitorzellen stützt, dar. Allerdings muss in Zukunft noch vieles in diesem Bereich erforscht werden, bevor ein zufriedenstellendes Therapieergebnis erreicht werden kann.

Neben elektrophysiologischen und funktionalen Untersuchungen der Därme von an HSCR erkrankten Mäusen, die mit postnatalen enterischen Progenitorzellen behandelt wurden, muss auch untersucht werden, wie genau ein gesundes postnatales ENS zusammengesetzt ist. D.h. in welchem Verhältnis welche Nerventypen vorhanden sein müssen, um ein optimales Funktionsergebnis zu erhalten.

Ebenso muss geklärt werden, aus welcher Stelle des Darmes des Patienten die benötigten Zellen in ausreichender Menge gewonnen werden können. Ebenso muss untersucht werden, wie diese enterischen Stamm- und Progenitorzellen in großer Menge, z. B. durch Zugabe bestimmter Faktoren, *in vitro* für längere Zeit unter standardisierten Bedingungen kultivieren werden können.





## 5. Zusammenfassung

Zellbasierte Therapien stellen potentiell einen alternativen Behandlungsansatz angeborener und degenerativer Erkrankungen des enterischen Nervensystems dar. Bisher wurde die Besiedelungskapazität enterischer Stamm- und Progenitorzellen hauptsächlich mit embryonalen Progenitorzellen und in embryonalen Organkultursystemen getestet.

Um das Differenzierungspotenzial postnataler ENS-Stamm- und Progenitorzellen analysieren zu können, wurden diese Zellen aus eGFP-positiven Mäusen isoliert und in der Zellkultur proliferiert und differenziert. Nach Differenzierung ließen sich sowohl gliale als auch neuronale Zellen identifizieren. Diese entstanden zum Teil aus sich *in vitro* teilenden Zellen, was durch BrdU-Inkorporationsversuche belegt wurde. Nach Implantation der *in vitro*-proliferierten Zellen in die Darmwand immundefizienter Mäuse konnten die Zellen in 13 von 16 implantierten Tieren detektiert werden. Innerhalb von 12 Wochen waren die Zellen weit in das Empfängergewebe eingewandert und hatten Neuritenfortsätze ausgebildet. Mittels immunhistologischer Methoden konnten eGFP-positive neuronale und gliale Zellen nachgewiesen werden, die zuvor in der Zellkultur BrdU aufgenommen hatten. In weiteren Versuchsreihen wurden ebenfalls humane, adulte Stamm- und Progenitorzellen in Därme immundefizienter Mäuse implantiert. Diese differenzierten sich ebenfalls in gliale und neuronale Zellen.

Um untersuchen zu können, ob humane, enterische Stamm- und Progenitorzellen in der Lage sind, ein enterisches Nervensystem in aganglionären Darmabschnitten zu rekonstruieren, ist ein immundefizientes Morbus Hirschsprung-Mausmodell notwendig. Durch Kreuzung immundefizienter Mäuse mit immunkompetenten C57Bl/6<sup>SOX10+/LacZ</sup>-Mäusen entwickelten 4 von 21 Tieren des gewünschten Genotyps ein Megacolon. Histologische Analysen ergaben, dass diese Mäuse über ein aganglionäres Segment im distalen Darm verfügen, wie es auch im humanen Morbus Hirschsprung bekannt ist.

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit erhobenen Ergebnisse unterstreichen das Potenzial postnataler enterischer Progenitorzellen für eine Behandlung intestinaler Neuropathien. Inwieweit diese aber zur vollständigen Rekonstruktion des ENS im Rahmen einer zellbasierten Therapie beitragen können, muss in Zukunft in

weiterführenden Arbeiten in tierischen Erkrankungsmodellen detailliert untersucht werden.

## 6. Referenzen

1. Furness JB, Johnson PJ, Pompolo S, Bornstein JC. Evidence that enteric motility reflexes can be initiated through entirely intrinsic mechanisms in the guinea-pig small intestine. *Neurogastroenterol Motil* 1995;7:89-96.
2. Furness JB. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;9:286-94.
3. Gershon MD, Ratcliffe EM. Developmental biology of the enteric nervous system: pathogenesis of Hirschsprung's disease and other congenital dysmotilities. *Semin Pediatr Surg* 2004;13:224-35.
4. Kunze WA, Furness JB. The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annu Rev Physiol* 1999;61:117-42.
5. Vanner S, Surprenant A. Neural reflexes controlling intestinal microcirculation. *Am J Physiol* 1996;271:G223-G230.
6. Costa M, Brookes SJ, Hennig GW. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* 2000;47 Suppl 4:iv15-iv19.
7. Ward SM, Sanders KM. Involvement of intramuscular interstitial cells of Cajal in neuroeffector transmission in the gastrointestinal tract. *J Physiol* 2006;576:675-82.
8. Newgreen D, Young HM. Enteric nervous system: development and developmental disturbances--part 1. *Pediatr Dev Pathol* 2002;5:224-47.
9. Brehmer A. Structure of enteric neurons. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2006;186:1-91.
10. Furness JB, Furness. *The enteric nervous system*, 1 Edn Blackwell Publishing Inc., 2006.
11. Bruhin-Feichter S, Meier-Ruge W, Martucciello G, Bruder E. Connective tissue in gut development: a key player in motility and in intestinal desmosis. *Eur J Pediatr Surg* 2012;22:445-59.
12. Bieger D, Hopkins DA. Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the medulla oblongata in the rat: the nucleus ambiguus. *J Comp Neurol* 1987;262:546-62.
13. Jean A. Brain stem control of swallowing: neuronal network and cellular mechanisms. *Physiol Rev* 2001;81:929-69.
14. Reynolds RP, El-Sharkawy TY, Diamant NE. Lower esophageal sphincter function in the cat: role of central innervation assessed by transient vagal blockade. *Am J Physiol* 1984;246:G666-G674.
15. de Groat WC, Nadelhaft I, Milne RJ, Booth AM, Morgan C, Thor K. Organization of the sacral parasympathetic reflex pathways to the urinary bladder and large intestine. *J Auton Nerv Syst* 1981;3:135-60.
16. Lynch AC, Frizelle FA. Colorectal motility and defecation after spinal cord injury in humans. *Prog Brain Res* 2006;152:335-43.

17. Brehmer A, Schrodli F, Neuhuber W. Morphological classifications of enteric neurons--100 years after Dogiel. *Anat Embryol (Berl)* 1999;200:125-35.
18. Bornstein JC, Hendriks R, Furness JB, Trussell DC. Ramifications of the axons of AH-neurons injected with the intracellular marker biocytin in the myenteric plexus of the guinea pig small intestine. *J Comp Neurol* 1991;314:437-51.
19. Portbury AL, Pompolo S, Furness JB, et al. Cholinergic, somatostatin-immunoreactive interneurons in the guinea pig intestine: morphology, ultrastructure, connections and projections. *J Anat* 1995;187 ( Pt 2):303-21.
20. Hirst GD, Holman ME, Spence I. Two types of neurones in the myenteric plexus of duodenum in the guinea-pig. *J Physiol* 1974;236:303-26.
21. Furness JB, Jones C, Nurgali K, Clerc N. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog Neurobiol* 2004;72:143-64.
22. Kirchgessner AL, Tamir H, Gershon MD. Identification and stimulation by serotonin of intrinsic sensory neurons of the submucosal plexus of the guinea pig gut: activity-induced expression of Fos immunoreactivity. *J Neurosci* 1992;12:235-48.
23. Gwynne RM, Thomas EA, Goh SM, Sjovald H, Bornstein JC. Segmentation induced by intraluminal fatty acid in isolated guinea-pig duodenum and jejunum. *J Physiol* 2004;556:557-69.
24. Kunze WA, Clerc N, Furness JB, Gola M. The soma and neurites of primary afferent neurons in the guinea-pig intestine respond differentially to deformation. *J Physiol* 2000;526 Pt 2:375-85.
25. Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 2000;81:87-96.
26. Benarroch EE. Enteric nervous system: functional organization and neurologic implications. *Neurology* 2007;69:1953-7.
27. Nurgali K, Stebbing MJ, Furness JB. Correlation of electrophysiological and morphological characteristics of enteric neurons in the mouse colon. *J Comp Neurol* 2004;468:112-24.
28. YNTEMA CL, HAMMOND WS. The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo. *J Comp Neurol* 1954;101:515-41.
29. Young HM, Hearn CJ, Newgreen DF. Embryology and development of the enteric nervous system. *Gut* 2000;47 Suppl 4:iv12-iv14.
30. Burns AJ, Champeval D, Le Douarin NM. Sacral neural crest cells colonise aganglionic hindgut in vivo but fail to compensate for lack of enteric ganglia. *Dev Biol* 2000;219:30-43.
31. Farlie PG, McKeown SJ, Newgreen DF. The neural crest: basic biology and clinical relationships in the craniofacial and enteric nervous systems. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2004;72:173-89.
32. Newgreen D, Young HM. Enteric nervous system: development and developmental disturbances--part 2. *Pediatr Dev Pathol* 2002;5:329-49.

33. Heanue TA, Pachnis V. Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nat Rev Neurosci* 2007;8:466-79.
34. Obermayr F, Hotta R, Enomoto H, Young HM. Development and developmental disorders of the enteric nervous system. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10:43-57.
35. Burns AJ, Douarin NM. The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut: spatiotemporal analysis of the development of the enteric nervous system. *Development* 1998;125:4335-47.
36. Anderson RB, Stewart AL, Young HM. Phenotypes of neural-crest-derived cells in vagal and sacral pathways. *Cell Tissue Res* 2006;323:11-25.
37. Anderson RB, Bergner AJ, Taniguchi M, et al. Effects of different regions of the developing gut on the migration of enteric neural crest-derived cells: a role for *Sema3A*, but not *Sema3F*. *Dev Biol* 2007;305:287-99.
38. Kapur RP, Yost C, Palmiter RD. A transgenic model for studying development of the enteric nervous system in normal and aganglionic mice. *Development* 1992;116:167-75.
39. Druckenbrod NR, Epstein ML. The pattern of neural crest advance in the cecum and colon. *Dev Biol* 2005;287:125-33.
40. Fu M, Lui VC, Sham MH, Cheung AN, Tam PK. *HOXB5* expression is spatially and temporarily regulated in human embryonic gut during neural crest cell colonization and differentiation of enteric neuroblasts. *Dev Dyn* 2003;228:1-10.
41. Young HM, Bergner AJ, Anderson RB, et al. Dynamics of neural crest-derived cell migration in the embryonic mouse gut. *Dev Biol* 2004;270:455-73.
42. Druckenbrod NR, Epstein ML. Behavior of enteric neural crest-derived cells varies with respect to the migratory wavefront. *Dev Dyn* 2007;236:84-92.
43. Nishiyama C, Uesaka T, Manabe T, et al. Trans-mesenteric neural crest cells are the principal source of the colonic enteric nervous system. *Nat Neurosci* 2012;15:1211-8.
44. Marusich MF, Weston JA. Identification of early neurogenic cells in the neural crest lineage. *Dev Biol* 1992;149:295-306.
45. Cochard P, Goldstein M, Black IB. Ontogenetic appearance and disappearance of tyrosine hydroxylase and catecholamines in the rat embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978;75:2986-90.
46. Teitelman G, Baker H, Joh TH, Reis DJ. Appearance of catecholamine-synthesizing enzymes during development of rat sympathetic nervous system: possible role of tissue environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:509-13.
47. Baetge G, Gershon MD. Transient catecholaminergic (TC) cells in the vagus nerves and bowel of fetal mice: relationship to the development of enteric neurons. *Dev Biol* 1989;132:189-211.
48. Newgreen DF, Hartley L. Extracellular matrix and adhesive molecules in the early development of the gut and its innervation in normal and spotting lethal rat embryos. *Acta Anat (Basel)* 1995;154:243-60.

49. Young HM, Jones BR, McKeown SJ. The projections of early enteric neurons are influenced by the direction of neural crest cell migration. *J Neurosci* 2002;22:6005-18.
50. Branchek TA, Gershon MD. Time course of expression of neuropeptide Y, calcitonin gene-related peptide, and NADPH diaphorase activity in neurons of the developing murine bowel and the appearance of 5-hydroxytryptamine in mucosal enterochromaffin cells. *J Comp Neurol* 1989;285:262-73.
51. Hao MM, Moore RE, Roberts RR, et al. The role of neural activity in the migration and differentiation of enteric neuron precursors. *Neurogastroenterol Motil* 2010;22:e127-e137.
52. Hoff S, Zeller F, von Weyhern CW, et al. Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody. *J Comp Neurol* 2008;509:356-71.
53. Albuerne M, Mammola CL, Naves FJ, Levanti B, Germana G, Vega JA. Immunohistochemical localization of S100 proteins in dorsal root, sympathetic and enteric ganglia of several mammalian species, including man. *J Peripher Nerv Syst* 1998;3:243-53.
54. Fekete E, Timmermans JP, Resch BA, Scheuermann DW. Different distribution of S-100 protein and glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactive cells and their relations with nitrergic neurons in the human fetal small intestine. *Histol Histopathol* 1999;14:785-90.
55. Young HM, Ciampoli D, Hsuan J, Canty AJ. Expression of Ret-, p75(NTR)-, Phox2a-, Phox2b-, and tyrosine hydroxylase-immunoreactivity by undifferentiated neural crest-derived cells and different classes of enteric neurons in the embryonic mouse gut. *Dev Dyn* 1999;216:137-52.
56. Young HM, Bergner AJ, Muller T. Acquisition of neuronal and glial markers by neural crest-derived cells in the mouse intestine. *J Comp Neurol* 2003;456:1-11.
57. Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* 2002;3:383-94.
58. Manie S, Santoro M, Fusco A, Billaud M. The RET receptor: function in development and dysfunction in congenital malformation. *Trends Genet* 2001;17:580-9.
59. Durbec P, Marcos-Gutierrez CV, Kilkenny C, et al. GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature* 1996;381:789-93.
60. Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F, Pachnis V. Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* 1994;367:380-3.
61. Sanchez MP, Silos-Santiago I, Frisen J, He B, Lira SA, Barbacid M. Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature* 1996;382:70-3.
62. Natarajan D, Marcos-Gutierrez C, Pachnis V, de GE. Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis. *Development* 2002;129:5151-60.
63. Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med* 1995;333:356-63.

64. Baynash AG, Hosoda K, Giaid A, et al. Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. *Cell* 1994;79:1277-85.
65. Barlow A, de GE, Pachnis V. Enteric nervous system progenitors are coordinately controlled by the G protein-coupled receptor EDNRB and the receptor tyrosine kinase RET. *Neuron* 2003;40:905-16.
66. Asai N, Jijiwa M, Enomoto A, et al. RET receptor signaling: dysfunction in thyroid cancer and Hirschsprung's disease. *Pathol Int* 2006;56:164-72.
67. Pattyn A, Morin X, Cremer H, Golidis C, Brunet JF. The homeobox gene Phox2b is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. *Nature* 1999;399:366-70.
68. Guillemot F, Joyner AL. Dynamic expression of the murine Achaete-Scute homologue Mash-1 in the developing nervous system. *Mech Dev* 1993;42:171-85.
69. Teng L, Mundell NA, Frist AY, Wang Q, Labosky PA. Requirement for Foxd3 in the maintenance of neural crest progenitors. *Development* 2008;135:1615-24.
70. D'Autreaux F, Morikawa Y, Cserjesi P, Gershon MD. Hand2 is necessary for terminal differentiation of enteric neurons from crest-derived precursors but not for their migration into the gut or for formation of glia. *Development* 2007;134:2237-49.
71. Lang D, Chen F, Milewski R, Li J, Lu MM, Epstein JA. Pax3 is required for enteric ganglia formation and functions with Sox10 to modulate expression of c-ret. *J Clin Invest* 2000;106:963-71.
72. Lang D, Epstein JA. Sox10 and Pax3 physically interact to mediate activation of a conserved c-RET enhancer. *Hum Mol Genet* 2003;12:937-45.
73. Van de PT, Maruhashi M, Francis A, et al. Mice lacking ZFHX1B, the gene that codes for Smad-interacting protein-1, reveal a role for multiple neural crest cell defects in the etiology of Hirschsprung disease-mental retardation syndrome. *Am J Hum Genet* 2003;72:465-70.
74. Bates MD, Dunagan DT, Welch LC, Kaul A, Harvey RP. The Hlx homeobox transcription factor is required early in enteric nervous system development. *BMC Dev Biol* 2006;6:33.
75. Hong CS, Saint-Jeannet JP. Sox proteins and neural crest development. *Semin Cell Dev Biol* 2005;16:694-703.
76. McKeown SJ, Lee VM, Bronner-Fraser M, Newgreen DF, Farlie PG. Sox10 overexpression induces neural crest-like cells from all dorsoventral levels of the neural tube but inhibits differentiation. *Dev Dyn* 2005;233:430-44.
77. Herbarth B, Pingault V, Bondurand N, et al. Mutation of the Sry-related Sox10 gene in Dominant megacolon, a mouse model for human Hirschsprung disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:5161-5.
78. Kapur RP. Early death of neural crest cells is responsible for total enteric aganglionosis in Sox10(Dom)/Sox10(Dom) mouse embryos. *Pediatr Dev Pathol* 1999;2:559-69.

79. Kim J, Lo L, Dormand E, Anderson DJ. SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. *Neuron* 2003;38:17-31.
80. Paratore C, Goerich DE, Suter U, Wegner M, Sommer L. Survival and glial fate acquisition of neural crest cells are regulated by an interplay between the transcription factor Sox10 and extrinsic combinatorial signaling. *Development* 2001;128:3949-61.
81. Hall PA, Watt FM. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* 1989;106:619-33.
82. Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 1990;110:1001-20.
83. Rippon HJ, Bishop AE. Embryonic stem cells. *Cell Prolif* 2004;37:23-34.
84. Shi C, Zhu Y, Su Y, Cheng T. Stem cells and their applications in skin-cell therapy. *Trends Biotechnol* 2006;24:48-52.
85. Aubin JE. Bone stem cells. *J Cell Biochem Suppl* 1998;30-31:73-82.
86. Lindvall O. Stem cells for cell therapy in Parkinson's disease. *Pharmacol Res* 2003;47:279-87.
87. Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat Med* 2004;10 Suppl:S42-S50.
88. Lindvall O, Kokaia Z. Stem cell therapy for human brain disorders. *Kidney Int* 2005;68:1937-9.
89. Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature* 2006;441:1094-6.
90. Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells in human neurodegenerative disorders--time for clinical translation? *J Clin Invest* 2010;120:29-40.
91. Micci MA, Pasricha PJ. Neural stem cells for the treatment of disorders of the enteric nervous system: strategies and challenges. *Dev Dyn* 2007;236:33-43.
92. Young HM. Neural stem cell therapy and gastrointestinal biology. *Gastroenterology* 2005;129:2092-5.
93. Schafer KH, Micci MA, Pasricha PJ. Neural stem cell transplantation in the enteric nervous system: roadmaps and roadblocks. *Neurogastroenterol Motil* 2009;21:103-12.
94. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292:154-6.
95. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:7634-8.
96. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-7.



97. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 2000;18:399-404.
98. Pomp O, Brokhman I, Ben-Dor I, Reubinoff B, Goldstein RS. Generation of peripheral sensory and sympathetic neurons and neural crest cells from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005;23:923-30.
99. Mizuseki K, Sakamoto T, Watanabe K, et al. Generation of neural crest-derived peripheral neurons and floor plate cells from mouse and primate embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:5828-33.
100. Zeng X, Cai J, Chen J, et al. Dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2004;22:925-40.
101. Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, et al. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 2000;28:31-40.
102. Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* 2002;110:385-97.
103. Li XJ, Du ZW, Zarnowska ED, et al. Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2005;23:215-21.
104. Wobus AM, Boheler KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev* 2005;85:635-78.
105. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-76.
106. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007;318:1917-20.
107. Wernig M, Meissner A, Foreman R, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007;448:318-24.
108. Maherali N, Sridharan R, Xie W, et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 2007;1:55-70.
109. Karumbayaram S, Novitsch BG, Patterson M, et al. Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons. *Stem Cells* 2009;27:806-11.
110. Zhang D, Jiang W, Liu M, et al. Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Res* 2009;19:429-38.
111. Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, et al. Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res* 2009;104:e30-e41.
112. Senju S, Haruta M, Matsunaga Y, et al. Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2009;27:1021-31.

113. Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:5856-61.
114. Tsuji O, Miura K, Okada Y, et al. Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:12704-9.
115. Murry CE, Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* 2008;132:661-80.
116. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-7.
117. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 2008;322:949-53.
118. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008;26:101-6.
119. Wernig M, Meissner A, Cassady JP, Jaenisch R. c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2008;2:10-2.
120. Stadtfeld M, Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev* 2010;24:2239-63.
121. Hanna JH, Saha K, Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell* 2010;143:508-25.
122. Kim K, Doi A, Wen B, et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 2010;467:285-90.
123. Polo JM, Liu S, Figueroa ME, et al. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2010;28:848-55.
124. Lister R, Pelizzola M, Kida YS, et al. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011;471:68-73.
125. Howell JC, Lee WH, Morrison P, Zhong J, Yoder MC, Srour EF. Pluripotent stem cells identified in multiple murine tissues. *Ann N Y Acad Sci* 2003;996:158-73.
126. Jackson KA, Mi T, Goodell MA. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:14482-6.
127. Jiang Y, Liu MT, Gershon MD. Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas. *Dev Biol* 2003;258:364-84.
128. Goodell MA, Jackson KA, Majka SM, et al. Stem cell plasticity in muscle and bone marrow. *Ann N Y Acad Sci* 2001;938:208-18.
129. Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3168-71.
130. Palmer TD, Takahashi J, Gage FH. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci* 1997;8:389-404.

131. Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, varez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 2001;21:7153-60.
132. Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 2000;287:2032-6.
133. Weiss S, Dunne C, Hewson J, et al. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci* 1996;16:7599-609.
134. Shihabuddin LS, Ray J, Gage FH. FGF-2 is sufficient to isolate progenitors found in the adult mammalian spinal cord. *Exp Neurol* 1997;148:577-86.
135. Stemple DL, Anderson DJ. Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell* 1992;71:973-85.
136. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 2001;3:778-84.
137. Sieber-Blum M, Grim M, Hu YF, Szeder V. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle. *Dev Dyn* 2004;231:258-69.
138. Natarajan D, Grigoriou M, Marcos-Gutierrez CV, Atkins C, Pachnis V. Multipotential progenitors of the mammalian enteric nervous system capable of colonising aganglionic bowel in organ culture. *Development* 1999;126:157-68.
139. Lo L, Anderson DJ. Postmigratory neural crest cells expressing c-RET display restricted developmental and proliferative capacities. *Neuron* 1995;15:527-39.
140. Chalazonitis A, Rothman TP, Chen J, Gershon MD. Age-dependent differences in the effects of GDNF and NT-3 on the development of neurons and glia from neural crest-derived precursors immunoselected from the fetal rat gut: expression of GFRalpha-1 in vitro and in vivo. *Dev Biol* 1998;204:385-406.
141. Heanue TA, Pachnis V. Prospective identification and isolation of enteric nervous system progenitors using Sox2. *Stem Cells* 2011;29:128-40.
142. Kruger GM, Mosher JT, Bixby S, Joseph N, Iwashita T, Morrison SJ. Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron* 2002;35:657-69.
143. Kruger GM, Mosher JT, Tsai YH, et al. Temporally distinct requirements for endothelin receptor B in the generation and migration of gut neural crest stem cells. *Neuron* 2003;40:917-29.
144. Mosher JT, Yeager KJ, Kruger GM, et al. Intrinsic differences among spatially distinct neural crest stem cells in terms of migratory properties, fate determination, and ability to colonize the enteric nervous system. *Dev Biol* 2007;303:1-15.
145. Almond S, Lindley RM, Kenny SE, Connell MG, Edgar DH. Characterisation and transplantation of enteric nervous system progenitor cells. *Gut* 2007;56:489-96.
146. Bondurand N, Natarajan D, Thapar N, Atkins C, Pachnis V. Neuron and glia generating progenitors of the mammalian enteric nervous system isolated from foetal and postnatal gut cultures. *Development* 2003;130:6387-400.

147. Fu M, Lui VC, Sham MH, Pachnis V, Tam PK. Sonic hedgehog regulates the proliferation, differentiation, and migration of enteric neural crest cells in gut. *J Cell Biol* 2004;166:673-84.
148. Metzger M, Caldwell C, Barlow AJ, Burns AJ, Thapar N. Enteric nervous system stem cells derived from human gut mucosa for the treatment of aganglionic gut disorders. *Gastroenterology* 2009;136:2214-25.
149. Lindley RM, Hawcutt DB, Connell MG, et al. Human and mouse enteric nervous system neurosphere transplants regulate the function of aganglionic embryonic distal colon. *Gastroenterology* 2008;135:205-16.
150. Rauch U, Hansgen A, Hagl C, Holland-Cunz S, Schafer KH. Isolation and cultivation of neuronal precursor cells from the developing human enteric nervous system as a tool for cell therapy in dysganglionosis. *Int J Colorectal Dis* 2006;21:554-9.
151. Suita S, Taguchi T, Ieiri S, Nakatsuji T. Hirschsprung's disease in Japan: analysis of 3852 patients based on a nationwide survey in 30 years. *J Pediatr Surg* 2005;40:197-201.
152. WHITEHOUSE FR, KERNOHAN JW. Myenteric plexus in congenital megacolon; study of 11 cases. *Arch Intern Med (Chic )* 1948;82:75-111.
153. Kapur RP. Practical pathology and genetics of Hirschsprung's disease. *Semin Pediatr Surg* 2009;18:212-23.
154. Kubota M, Suita S, Kamimura T, Ito Y, Szurszewski JH. Electrophysiological properties of the aganglionic segment in Hirschsprung's disease. *Surgery* 2002;131:S288-S293.
155. Worman S, Ganiats TG. Hirschsprung's disease: a cause of chronic constipation in children. *Am Fam Physician* 1995;51:487-94.
156. Taraviras S, Pachnis V. Development of the mammalian enteric nervous system. *Curr Opin Genet Dev* 1999;9:321-7.
157. Klein MD, Coran AG, Wesley JR, Drongowski RA. Hirschsprung's disease in the newborn. *J Pediatr Surg* 1984;19:370-4.
158. Amiel J, Sproat-Emison E, Garcia-Barcelo M, et al. Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. *J Med Genet* 2008;45:1-14.
159. Badner JA, Sieber WK, Garver KL, Chakravarti A. A genetic study of Hirschsprung disease. *Am J Hum Genet* 1990;46:568-80.
160. Fekete C, Ricour C, Martelli H, Jacob SL, Pellerin D. Total colonic aganglionosis (with or without ileal involvement): a review of 27 cases. *J Pediatr Surg* 1986;21:251-4.
161. Neilson IR, Yazbeck S. Ultrashort Hirschsprung's disease: myth or reality. *J Pediatr Surg* 1990;25:1135-8.
162. Neilson IR, Yazbeck S. Ultrashort Hirschsprung's disease: myth or reality. *J Pediatr Surg* 1990;25:1135-8.
163. Garver KL, Law JC, Garver B. Hirschsprung disease: a genetic study. *Clin Genet* 1985;28:503-8.

164. Goldberg EL. An epidemiological study of Hirschsprung's disease. *Int J Epidemiol* 1984;13:479-85.
165. Ohshiro K, Puri P. Pathogenesis of infantile hypertrophic pyloric stenosis: recent progress. *Pediatr Surg Int* 1998;13:243-52.
166. Mitchell LE, Risch N. The genetics of infantile hypertrophic pyloric stenosis. A reanalysis. *Am J Dis Child* 1993;147:1203-11.
167. Tam PK. Observations and perspectives of the pathology and possible aetiology of infantile hypertrophic pyloric stenosis--a histological, biochemical, histochemical and immunocytochemical study. *Ann Acad Med Singapore* 1985;14:523-9.
168. Vanderwinden JM, Mailleux P, Schiffmann SN, Vanderhaeghen JJ, De Laet MH. Nitric oxide synthase activity in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *N Engl J Med* 1992;327:511-5.
169. Huang PL, Dawson TM, Bredt DS, Snyder SH, Fishman MC. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* 1993;75:1273-86.
170. Chung E, Curtis D, Chen G, et al. Genetic evidence for the neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1) as a susceptibility locus for infantile pyloric stenosis. *Am J Hum Genet* 1996;58:363-70.
171. Soderhall C, Nordenskjold A. Neuronal nitric oxide synthase, nNOS, is not linked to infantile hypertrophic pyloric stenosis in three families. *Clin Genet* 1998;53:421-2.
172. Everett KV, Chioza BA, Georgoula C, et al. Genome-wide high-density SNP-based linkage analysis of infantile hypertrophic pyloric stenosis identifies loci on chromosomes 11q14-q22 and Xq23. *Am J Hum Genet* 2008;82:756-62.
173. Capon F, Reece A, Ravindrarajah R, Chung E. Linkage of monogenic infantile hypertrophic pyloric stenosis to chromosome 16p12-p13 and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 2006;79:378-82.
174. Everett KV, Chioza BA, Georgoula C, et al. Genome-wide high-density SNP-based linkage analysis of infantile hypertrophic pyloric stenosis identifies loci on chromosomes 11q14-q22 and Xq23. *Am J Hum Genet* 2008;82:756-62.
175. Panteli C. New insights into the pathogenesis of infantile pyloric stenosis. *Pediatr Surg Int* 2009;25:1043-52.
176. Honein MA, Paulozzi LJ, Himelright IM, et al. Infantile hypertrophic pyloric stenosis after pertussis prophylaxis with erythromycin: a case review and cohort study. *Lancet* 1999;354:2101-5.
177. Cooper WO, Griffin MR, Arbogast P, Hickson GB, Gautam S, Ray WA. Very early exposure to erythromycin and infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2002;156:647-50.
178. Chitkara DK, Di LC. From the bench to the 'crib'-side: implications of scientific advances to paediatric neurogastroenterology and motility. *Neurogastroenterol Motil* 2006;18:251-62.
179. Connor FL, Di LC. Chronic intestinal pseudo-obstruction: assessment and management. *Gastroenterology* 2006;130:S29-S36.

180. Di LC. Pseudo-obstruction: current approaches. *Gastroenterology* 1999;116:980-7.
181. Di LC, Youssef NN. Diagnosis and management of intestinal motility disorders. *Semin Pediatr Surg* 2010;19:50-8.
182. Ward SM, Burns AJ, Torihashi S, Harney SC, Sanders KM. Impaired development of interstitial cells and intestinal electrical rhythmicity in steel mutants. *Am J Physiol* 1995;269:C1577-C1585.
183. Yamataka A, Ohshiro K, Kobayashi H, et al. Abnormal distribution of intestinal pacemaker (C-KIT-positive) cells in an infant with chronic idiopathic intestinal pseudoobstruction. *J Pediatr Surg* 1998;33:859-62.
184. Yamataka A, Ohshiro K, Kobayashi H, et al. Abnormal distribution of intestinal pacemaker (C-KIT-positive) cells in an infant with chronic idiopathic intestinal pseudoobstruction. *J Pediatr Surg* 1998;33:859-62.
185. Feichter S, Meier-Ruge WA, Bruder E. The histopathology of gastrointestinal motility disorders in children. *Semin Pediatr Surg* 2009;18:206-11.
186. Fadda B, Maier WA, Meier-Ruge W, Scharli A, Daum R. [Neuronal intestinal dysplasia. Critical 10-years' analysis of clinical and biopsy diagnosis]. *Z Kinderchir* 1983;38:305-11.
187. Bruder E, Meier-Ruge WA. [Intestinal neuronal dysplasia type B: how do we understand it today?]. *Pathologe* 2007;28:137-42.
188. Koletzko S, Jesch I, Faus-Kebetaler T, et al. Rectal biopsy for diagnosis of intestinal neuronal dysplasia in children: a prospective multicentre study on interobserver variation and clinical outcome. *Gut* 1999;44:853-61.
189. Meier-Ruge WA, Bronnimann PB, Gambazzi F, Schmid PC, Schmidt CP, Stoss F. Histopathological criteria for intestinal neuronal dysplasia of the submucosal plexus (type B). *Virchows Arch* 1995;426:549-56.
190. Kapur RP. Neuronal dysplasia: a controversial pathological correlate of intestinal pseudo-obstruction. *Am J Med Genet A* 2003;122A:287-93.
191. Taketomi T, Yoshiga D, Taniguchi K, et al. Loss of mammalian Sprouty2 leads to enteric neuronal hyperplasia and esophageal achalasia. *Nat Neurosci* 2005;8:855-7.
192. Zhou R, Niwa S, Homma N, Takei Y, Hirokawa N. KIF26A is an unconventional kinesin and regulates GDNF-Ret signaling in enteric neuronal development. *Cell* 2009;139:802-13.
193. Miyamoto R, Jijiwa M, Asai M, et al. Loss of Sprouty2 partially rescues renal hypoplasia and stomach hypoganglionosis but not intestinal aganglionosis in Ret Y1062F mutant mice. *Dev Biol* 2011;349:160-8.
194. Borghini S, Duca MD, Pini PA, et al. Search for pathogenetic variants of the SPRY2 gene in intestinal innervation defects. *Intern Med J* 2009;39:335-7.
195. von Boyen GB, Krammer HJ, Suss A, Dembowski C, Ehrenreich H, Wedel T. Abnormalities of the enteric nervous system in heterozygous endothelin B receptor deficient (spotting lethal) rats resembling intestinal neuronal dysplasia. *Gut* 2002;51:414-9.

196. d'Amore ES, Manivel JC, Pettinato G, Niehans GA, Snover DC. Intestinal ganglioneuromatosis: mucosal and transmural types. A clinicopathologic and immunohistochemical study of six cases. *Hum Pathol* 1991;22:276-86.
197. Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, et al. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 1993;363:458-60.
198. Raue F, Frank-Raue K. Update multiple endocrine neoplasia type 2. *Fam Cancer* 2010;9:449-57.
199. Ferner RE. Neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2: a twenty first century perspective. *Lancet Neurol* 2007;6:340-51.
200. Navarro J, Sonsino E, Boige N, et al. Visceral neuropathies responsible for chronic intestinal pseudo-obstruction syndrome in pediatric practice: analysis of 26 cases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1990;11:179-95.
201. Kapur RP. Neuropathology of paediatric chronic intestinal pseudo-obstruction and related animal models. *J Pathol* 2001;194:277-88.
202. Gianino S, Grider JR, Cresswell J, Enomoto H, Heuckeroth RO. GDNF availability determines enteric neuron number by controlling precursor proliferation. *Development* 2003;130:2187-98.
203. Chalazonitis A, Pham TD, Rothman TP, et al. Neurotrophin-3 is required for the survival-differentiation of subsets of developing enteric neurons. *J Neurosci* 2001;21:5620-36.
204. Hoshino M, Omura N, Yano F, Tsuboi K, Kashiwagi H, Yanaga K. Immunohistochemical study of the muscularis externa of the esophagus in achalasia patients. *Dis Esophagus* 2012.
205. Park W, Vaezi MF. Etiology and pathogenesis of achalasia: the current understanding. *Am J Gastroenterol* 2005;100:1404-14.
206. Pohl D, Tutuian R. Achalasia: an overview of diagnosis and treatment. *J Gastrointestin Liver Dis* 2007;16:297-303.
207. Wong RK, Maydonovitch CL, Metz SJ, Baker JR, Jr. Significant DQw1 association in achalasia. *Dig Dis Sci* 1989;34:349-52.
208. Verne GN, Sallustio JE, Eaker EY. Anti-myenteric neuronal antibodies in patients with achalasia. A prospective study. *Dig Dis Sci* 1997;42:307-13.
209. Thümler. *Morbus Parkinson: ein Leitfaden für Klinik und Praxis* 2002.
210. Quigley EM. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Semin Neurol* 1996;16:245-50.
211. Kaye J, Gage H, Kimber A, Storey L, Trend P. Excess burden of constipation in Parkinson's disease: a pilot study. *Mov Disord* 2006;21:1270-3.
212. Singaram C, Ashraf W, Gaumnitz EA, et al. Dopaminergic defect of enteric nervous system in Parkinson's disease patients with chronic constipation. *Lancet* 1995;346:861-4.

213. Li ZS, Schmauss C, Cuenca A, Ratcliffe E, Gershon MD. Physiological modulation of intestinal motility by enteric dopaminergic neurons and the D2 receptor: analysis of dopamine receptor expression, location, development, and function in wild-type and knock-out mice. *J Neurosci* 2006;26:2798-807.
214. Li ZS, Pham TD, Tamir H, Chen JJ, Gershon MD. Enteric dopaminergic neurons: definition, developmental lineage, and effects of extrinsic denervation. *J Neurosci* 2004;24:1330-9.
215. Wakabayashi K, Takahashi H, Ohama E, Ikuta F. Parkinson's disease: an immunohistochemical study of Lewy body-containing neurons in the enteric nervous system. *Acta Neuropathol* 1990;79:581-3.
216. Wakabayashi K, Takahashi H, Takeda S, Ohama E, Ikuta F. Parkinson's disease: the presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses. *Acta Neuropathol* 1988;76:217-21.
217. Grathwohl SA, Steiner JA, Britschgi M, Brundin P. Mind the gut: secretion of alpha-synuclein by enteric neurons. *J Neurochem* 2013;125:487-90.
218. Bloch A, Probst A, Bissig H, Adams H, Tolnay M. Alpha-synuclein pathology of the spinal and peripheral autonomic nervous system in neurologically unimpaired elderly subjects. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2006;32:284-95.
219. Shannon KM, Keshavarzian A, Dodiya HB, Jakate S, Kordower JH. Is alpha-synuclein in the colon a biomarker for premotor Parkinson's disease? Evidence from 3 cases. *Mov Disord* 2012;27:716-9.
220. Krishnan B, Babu S, Walker J, Walker AB, Pappachan JM. Gastrointestinal complications of diabetes mellitus. *World J Diabetes* 2013;4:51-63.
221. Janssen P, Harris MS, Jones M, et al. The relation between symptom improvement and gastric emptying in the treatment of diabetic and idiopathic gastroparesis. *Am J Gastroenterol* 2013;108:1382-91.
222. Chandrasekharan B, Srinivasan S. Diabetes and the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 2007;19:951-60.
223. Chang J, Rayner CK, Jones KL, Horowitz M. Diabetic gastroparesis-backwards and forwards. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26 Suppl 1:46-57.
224. Chandrasekharan B, Srinivasan S. Diabetes and the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 2007;19:951-60.
225. Wrzos HF, Cruz A, Polavarapu R, Shearer D, Ouyang A. Nitric oxide synthase (NOS) expression in the myenteric plexus of streptozotocin-diabetic rats. *Dig Dis Sci* 1997;42:2106-10.
226. Iwasaki H, Kajimura M, Osawa S, et al. A deficiency of gastric interstitial cells of Cajal accompanied by decreased expression of neuronal nitric oxide synthase and substance P in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol* 2006;41:1076-87.
227. Watkins CC, Sawa A, Jaffrey S, et al. Insulin restores neuronal nitric oxide synthase expression and function that is lost in diabetic gastropathy. *J Clin Invest* 2000;106:373-84.



228. Spangeus A, El-Salhy M. Myenteric plexus of obese diabetic mice (an animal model of human type 2 diabetes). *Histol Histopathol* 2001;16:159-65.
229. Fregonesi CE, Miranda-Neto MH, Molinari SL, Zanoni JN. Quantitative study of the myenteric plexus of the stomach of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Arq Neuropsiquiatr* 2001;59:50-3.
230. Monckton G, Pehowich E. Autonomic neuropathy in the streptozotocin diabetic rat. *Can J Neurol Sci* 1980;7:135-42.
231. Spangeus A, Suhr O, El-Salhy M. Diabetic state affects the innervation of gut in an animal model of human type 1 diabetes. *Histol Histopathol* 2000;15:739-44.
232. Bixby S, Kruger GM, Mosher JT, Joseph NM, Morrison SJ. Cell-intrinsic differences between stem cells from different regions of the peripheral nervous system regulate the generation of neural diversity. *Neuron* 2002;35:643-56.
233. Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 1997;407:313-9.
234. Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol* 2005;174:6477-89.
235. Britsch S, Goerich DE, Riethmacher D, et al. The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev* 2001;15:66-78.
236. Metzger M, Bareiss PM, Nikolov I, Skutella T, Just L. Three-dimensional slice cultures from murine fetal gut for investigations of the enteric nervous system. *Dev Dyn* 2007;236:128-33.
237. Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol* 2007;7:118-30.
238. Rintala RJ, Pakarinen MP. Outcome of anorectal malformations and Hirschsprung's disease beyond childhood. *Semin Pediatr Surg* 2010;19:160-7.
239. Rintala RJ, Pakarinen MP. Long-term outcomes of Hirschsprung's disease. *Semin Pediatr Surg* 2012;21:336-43.
240. Ruttenstock E, Puri P. A meta-analysis of clinical outcome in patients with total intestinal aganglionosis. *Pediatr Surg Int* 2009;25:833-9.
241. Sauvat F, Grimaldi C, Lacaille F, et al. Intestinal transplantation for total intestinal aganglionosis: a series of 12 consecutive children. *J Pediatr Surg* 2008;43:1833-8.
242. Tsuji H, Spitz L, Kiely EM, Drake DP, Pierro A. Management and long-term follow-up of infants with total colonic aganglionosis. *J Pediatr Surg* 1999;34:158-61.
243. Fouquet V, De Lagausie P, Faure C, et al. Do prognostic factors exist for total colonic aganglionosis with ileal involvement? *J Pediatr Surg* 2002;37:71-5.
244. Wilkinson DJ, Edgar DH, Kenny SE. Future therapies for Hirschsprung's disease. *Semin Pediatr Surg* 2012;21:364-70.
245. Williams RL, Hilton DJ, Pease S, et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 1988;336:684-7.

246. Jiang X, Gwye Y, McKeown SJ, Bronner-Fraser M, Lutzko C, Lawlor ER. Isolation and characterization of neural crest stem cells derived from in vitro-differentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2009;18:1059-70.
247. Robertson JA. Human embryonic stem cell research: ethical and legal issues. *Nat Rev Genet* 2001;2:74-8.
248. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009;373:1550-61.
249. Murakawa K, Sato T, Maeda Y, Kitamura Y, Tanimoto M, Sendo T. Preparation of Enteric-coated Capsules of Beclomethasone Dipropionate for Patients with Intestinal Graft-versus-Host Disease and a Case Study. *Acta Med Okayama* 2013;67:319-24.
250. Schafer KH, Hagl CI, Rauch U. Differentiation of neurospheres from the enteric nervous system. *Pediatr Surg Int* 2003;19:340-4.
251. Suarez-Rodriguez R, Belkind-Gerson J. Cultured nestin-positive cells from postnatal mouse small bowel differentiate ex vivo into neurons, glia, and smooth muscle. *Stem Cells* 2004;22:1373-85.
252. Hendershot TJ, Liu H, Sarkar AA, et al. Expression of Hand2 is sufficient for neurogenesis and cell type-specific gene expression in the enteric nervous system. *Dev Dyn* 2007;236:93-105.
253. Kaplan MS, Bell DH. Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. *J Neurosci* 1984;4:1429-41.
254. Kuhn HG, Kinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 1996;16:2027-33.
255. Gao R, Ustinov J, Pulkkinen MA, Lundin K, Korsgren O, Otonkoski T. Characterization of endocrine progenitor cells and critical factors for their differentiation in human adult pancreatic cell culture. *Diabetes* 2003;52:2007-15.
256. Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, Wojtowicz JM. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods* 2002;115:97-105.
257. Seki T, Arai Y. Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat. *J Neurosci* 1993;13:2351-8.
258. Lindley RM, Hawcutt DB, Connell MG, Edgar DH, Kenny SE. Properties of secondary and tertiary human enteric nervous system neurospheres. *J Pediatr Surg* 2009;44:1249-55.
259. Svendsen CN, ter Borg MG, Armstrong RJ, et al. A new method for the rapid and long term growth of human neural precursor cells. *J Neurosci Methods* 1998;85:141-52.
260. Vogalis F, Hillsley K, Smith TK. Diverse ionic currents and electrical activity of cultured myenteric neurons from the guinea pig proximal colon. *J Neurophysiol* 2000;83:1253-63.
261. Anitha M, Joseph I, Ding X, et al. Characterization of fetal and postnatal enteric neuronal cell lines with improvement in intestinal neural function. *Gastroenterology* 2008;134:1424-35.

262. Geisbauer CL, Chapin JC, Wu BM, Dunn JC. Transplantation of Enteric Cells Expressing p75 in the Rodent Stomach. *J Surg Res* 2011.
263. Geisbauer CL, Wu BM, Dunn JC. Transplantation of enteric cells into the aganglionic rodent small intestines. *J Surg Res* 2012;176:20-8.
264. Liu W, Wu RD, Dong YL, Gao YM. Neuroepithelial stem cells differentiate into neuronal phenotypes and improve intestinal motility recovery after transplantation in the aganglionic colon of the rat. *Neurogastroenterol Motil* 2007;19:1001-9.
265. Martucciello G, Brizzolara A, Favre A, et al. Neural crest neuroblasts can colonise aganglionic and ganglionic gut in vivo. *Eur J Pediatr Surg* 2007;17:34-40.
266. Micci MA, Learish RD, Li H, Abraham BP, Pasricha PJ. Neural stem cells express RET, produce nitric oxide, and survive transplantation in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 2001;121:757-66.
267. Micci MA, Kahrig KM, Simmons RS, Sarna SK, Espejo-Navarro MR, Pasricha PJ. Neural stem cell transplantation in the stomach rescues gastric function in neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *Gastroenterology* 2005;129:1817-24.
268. Tsai YH, Murakami N, Garipey CE. Postnatal intestinal engraftment of prospectively selected enteric neural crest stem cells in a rat model of Hirschsprung disease. *Neurogastroenterol Motil* 2011;23:362-9.
269. Dong YL, Liu W, Gao YM, et al. Neural stem cell transplantation rescues rectum function in the aganglionic rat. *Transplant Proc* 2008;40:3646-52.
270. Jiang Y, Liu MT, Gershon MD. Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas. *Dev Biol* 2003;258:364-84.
271. Meyerhardt JA, Caca K, Eckstrand BC, et al. Netrin-1: interaction with deleted in colorectal cancer (DCC) and alterations in brain tumors and neuroblastomas. *Cell Growth Differ* 1999;10:35-42.
272. Fu M, Vohra BP, Wind D, Heuckeroth RO. BMP signaling regulates murine enteric nervous system precursor migration, neurite fasciculation, and patterning via altered Ncam1 polysialic acid addition. *Dev Biol* 2006;299:137-50.
273. Goldstein AM, Brewer KC, Doyle AM, Nagy N, Roberts DJ. BMP signaling is necessary for neural crest cell migration and ganglion formation in the enteric nervous system. *Mech Dev* 2005;122:821-33.
274. Chalazonitis A, D'Autreaux F, Guha U, et al. Bone morphogenetic protein-2 and -4 limit the number of enteric neurons but promote development of a TrkC-expressing neurotrophin-3-dependent subset. *J Neurosci* 2004;24:4266-82.
275. Hotta R, Stamp LA, Foong JP, et al. Transplanted progenitors generate functional enteric neurons in the postnatal colon. *J Clin Invest* 2013;123:1182-91.
276. Metzger M, Bareiss PM, Danker T, et al. Expansion and Differentiation of Neural Progenitors Derived From the Human Adult Enteric Nervous System. *Gastroenterology* 2009.



## **7. Anhang**

### **7.1. Danksagungen**

An dieser Stelle möchte ich mich sehr bei all denjenigen bedanken, die mit ihrer fachlichen und auch persönlichen Unterstützung zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Jörg Fuchs für die Möglichkeit danken, meine Promotion in seiner Abteilung durchführen zu können.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Dominik Hartl für die Vertretung meiner Arbeit an der biologischen Fakultät der Eberhard Karls Universität in Tübingen.

Herrn PD Dr. Lothar Just danke ich für die Übernahme der Funktion des zweiten Gutachters, seine kompetente fachliche Unterstützung, das jederzeit offene Ohr und die herzliche Aufnahme als Gast in seiner Arbeitsgruppe am Anatomischen Institut Tübingen.

Besonders großen Dank möchte ich an Herrn Dr. Florian Obermayr aussprechen, nicht nur für die Vergabe dieses Themas. Danke für das Vertrauen, die Geduld, die stetige Diskussionsbereitschaft, die ausdauernde Korrektur meiner Manuskripte und die hervorragende Betreuung.

Ebenso ein herzliches Danke an die Laborangestellten der Kinderchirurgie sowie des Anatomischen Instituts, die durch ihr fachliches und technisches Wissen, aber auch ihre Persönlichkeit eine Bereicherung des Laboralltags waren: Jennifer Rottenberger, Susanne Stachon, Karin Seid, Julia Wenz, Bettina Kirchner, Roland Mohr, Jürgen von der Ruhr, Alexander Dewerth, Dr. Delia Herrmann, Fabian Vogt, Alexander Hoh, Sarah Jöhler, En-Hae Hong und Dr. Ying Zhang.

Danke auch an die Abteilung der allgemeinen Chirurgie des Universitätsklinikums in Tübingen für die Bereitstellung des adulten humanen Gewebes, der Abteilung der Kinderchirurgie und Kinderurologie für die Bereitstellung des kindlichen humanen Materials.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Volker und Monika Dettmann, sowie meiner Schwester Sandra, die mir während meines universitären Weges so viel Unterstützung zuteilwerden ließen.



## 7.2. Lebenslauf

### **Persönliche Angaben:**

Name: Heike Monika Dettmann  
Geburtsdatum und –ort: 12.05.1984 in Stuttgart-Bad Cannstatt  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig

### **Promotion:**

08/2009-12/2013 Doktorandin in der Abteilung für Kinderchirurgie und Kinderurologie, Universitätskinderklinik Tübingen, Dr. Florian Obermayr:  
*Charakterisierung von enterischen neuronalen Vorläuferzellen in vitro und im in vivo-Mausmodell sowie Etablierung eines immundefizienten Morbus Hirschsprung-Mausmodells.*

### **Studium:**

03/2009 Diplom in Biologie, Note: 2,6.  
05/2008 - 01/2009 Diplomandin am Institut für Zoologie, Universität Hohenheim, Prof. Dr. Reinhard Hilbig:  
*REM und LSM: Aspekte zur Mineralisation von Otolithen – unter besonderer Berücksichtigung des veränderten Vestibularverhaltens unter Schwerelosigkeit (Fallturm, ZARM).*

10/2003 – 05/2008 Biologie-Studium, Universität Hohenheim  
Hauptfach: Zoologie  
Nebenfächer: Parasitologie, Tierphysiologie  
Profilierende Lehreinheiten: Säuge- und Versuchstierkunde, Bioorganische Chemie, Bildanalytik und Elektronenmikroskopie

### **Schulbildung:**

07/2003 Allgemeine Hochschulreife, Note: 2,3  
09/1994 – 07/2003 Eduard Spranger Gymnasium, Filderstadt  
09/1990 – 07/1994 Weilerhau Grundschule, Filderstadt

**Tagungen:**

02. – 04.11.2011                      Posterpräsentation: *Murine and human postnatal ENS progenitor cells integrate into murine bowel in vivo*, World conference on regenerative Medicine, Leipzig.
13. - 15.10.2010                      Posterpräsentation: *Implantation of enteric nervous system progenitors in the mouse model*, 4th Congress on Regenerative Biology and Medicine, BioStar, Stuttgart.

**Publikationen:**

[Abstract] Dettmann H, Fuchs J, Just L, Obermayr F. Implantation of enteric nervous progenitors in the mouse model. *Tissue Engineering Part A*, Feb 2011, 17(3-4):549-550

[Abstract] Dettmann H, Rottenberger J, Zhang Y, Just L, Obermayr F. Murine and human postnatal ENS progenitor cells integrate into murine bowel in vivo. *Regen Med* 2011; 6(6suppl.2), p.347

[Full Paper] Dettmann HM, Zhang Y, Wronna N, Kraushaar U, Guenther E, Mohr R, Neckel PH, Mack A, Fuchs J, Just L, Obermayr F. 2013. Isolation, expansion and transplantation of postnatal murine progenitor cells of the enteric nervous system. *PlosOne*, publiziert am 28.05.2014, DOI: 10.1371/journal.pone.0097792