

**Einfluss des Schilddrüsenhormons  
3,5,3'-Trijodthyronin auf Vorläuferzellen  
des enterischen Nervensystems**

**Dissertation**

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

vorgelegt von  
Roland Mohr  
aus Leonberg

Tübingen  
2016



Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:	01.06.2017
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Lothar Just
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Rolf Reuter



**Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits publiziert  
oder bei Tagungen vorgestellt:**

**Publikationen:**

Neckel PH, Mohr R, Zhang Y, Hirt B, Just L. Comparative microarray analysis of proliferated and differentiated murine ENS progenitor cells. *Stem Cells Int.* Epub 2015, Nov 30. Die beiden erstgenannten Autoren haben zu gleichen Teilen zur Publikation beigetragen

Mohr R, Neckel P, Zhang Y, Stachon S, Nothelfer K, Schaeferhoff K, Obermayr F, Bonin M, Just L. Molecular and cell biological effects of 3,5,3'-triiodothyronine on progenitor cells of the enteric nervous system in vitro. *Stem Cell Res.* 2013; 11(3):1191-205

**Posterpräsentationen:**

Mohr R, Bareiss P, Skutella T, Just L. The influence of 3,5,3'-triiodothyronine on progenitor cells of the enteric nervous system. Posterpräsentation "World conference on regenerative medicine" (Leipzig), 29. – 31.10.2009

Mohr R, Bareiss P, Skutella T, Just L. The influence of 3,5,3'-triiodothyronine on progenitor cells of the enteric nervous system. Posterpräsentation „103. Tagung der Anatomischen Gesellschaft“ (Innsbruck), 14. – 17.03.2008



---

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Das enterische Nervensystem	2
1.1.1	Aufbau und Funktion	2
1.1.2	Klassifizierung der Neurone	5
1.1.3	Verlauf der Embryonalentwicklung des ENS	7
1.1.4	Genregulationen während der Entwicklung des ENS	9
1.1.5	Entwicklungsstörungen des ENS	15
1.2	Stammzelltypen - Möglichkeiten zur Behandlung von ENS - Erkrankungen	19
1.2.1	Adulte Stammzellen	19
1.2.2	Induzierte pluripotente Stammzellen (iPS)	21
1.3	Schilddrüsenhormone	23
1.3.1	Synthese, Transport, Wirkung	23
1.3.2	Regulation der Schilddrüsenhormonexpression	28
1.3.3	Erforschung der Funktion von Schilddrüsenhormonen im Tiermodell	29
1.4	Aufgabenstellung	33
<b>2</b>	<b>MATERIAL &amp; METHODEN</b>	<b>34</b>
2.1	Zell- und Gewebematerial	34
2.2	Präparation von Geweben und Anlegen von Zellkulturen	35
2.2.1	Isolation von murinen Vorläuferzellen des ENS	35
2.2.2	Präparation von humanem Darmgewebe	36
2.2.3	Kultivierung humaner und muriner Enterosphären	36
2.3	Pharmakologische Behandlung muriner Enterosphären	37
2.3.1	T3-Proliferationsassay	37
2.3.2	T3-Differenzierungsassay	38
2.4	Nachweis der Thyroidhormonrezeptoren durch RNA - Analyse	39
2.4.1	Reverse Transkription (RT - PCR)	40
2.4.2	Polymerase - Kettenreaktion (PCR)	41
2.4.3	Agarose - Gelelektrophorese	42
2.5	Immunhistochemie / Immunzytochemie	42
2.5.1	Immunhistochemie von Zellkulturen sowie Paraffinschnitten	42
2.5.2	Whole mount - Immunhistochemie	43
2.5.3	BrdU - labeling	44

---

2.6	Aufreinigung von murinen ENS -Vorläuferzellen durch Adhärenz-unterschiede	45
2.7	Genexpressionsanalyse	47
2.8	Real time PCR (qRT -PCR)	50
2.9	Statistik	51
2.10	Lösungen, Medien & Puffer	52
2.11	Antikörper	56
2.12	Geräte & Software	58
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>61</b>
3.1	Präparation und Kultivierung muriner ENS -Progenitorzellen	61
3.2	Vergleichende Genexpressionsanalyse proliferierender und differenzierender Enterosphären	66
3.3	Nachweis der Schilddrüsenhormonrezeptoren	88
3.4	Untersuchung des Einflusses von T3 auf die Proliferationskapazität von Enterosphären	89
3.5	Einfluss von T3 auf die Differenzierung von ENS -Vorläuferzellen	90
3.6	Untersuchung von Schilddrüsenhormonrezeptor -Knockout -Tiermodellen <i>in vivo</i>	93
3.7	Einfluss von T3 auf die Genregulation während der Differenzierung von Enterosphären	95
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>105</b>
4.1	Einfluss des Schilddrüsenhormons T3 auf Vorläuferzellen des ENS	106
4.2	Vergleichende Genexpressionsanalyse von Enterosphären in Proliferation und Differenzierung	113
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>120</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>122</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>150</b>
7.1	Abbildungsverzeichnis	150
7.2	Tabellenverzeichnis	152
7.3	Abkürzungen	154
7.4	Danksagungen	157
7.5	Lebenslauf	158
7.6	Tagungen und Publikationen:	159

## 1 EINLEITUNG

Die Hormone der Schilddrüse spielen bei Säugetieren eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung und bei der Regulation des Metabolismus. Störungen des Schilddrüsenhormonhaushalts mütterlicherseits in der Schwangerschaft können zu schwerwiegenden Schädigungen des zentralen Nervensystems (ZNS) [1], der Knochenentwicklung [2] und des Körperwachstums [3] des Embryos führen. Ähnliche Auswirkungen hat eine schwere Unterfunktion oder ein komplettes Fehlen der Schilddrüse des Kindes nach der Geburt [4]. Besonders groß ist der Einfluss auf die Reifung des ZNS und damit auf die geistige Entwicklung. Das Krankheitsbild, bei dem Patienten einen meist weit unterdurchschnittlichen IQ aufgrund eines zu geringen Schilddrüsenhormonlevels zeigen, wird als Kretinismus bezeichnet [5].

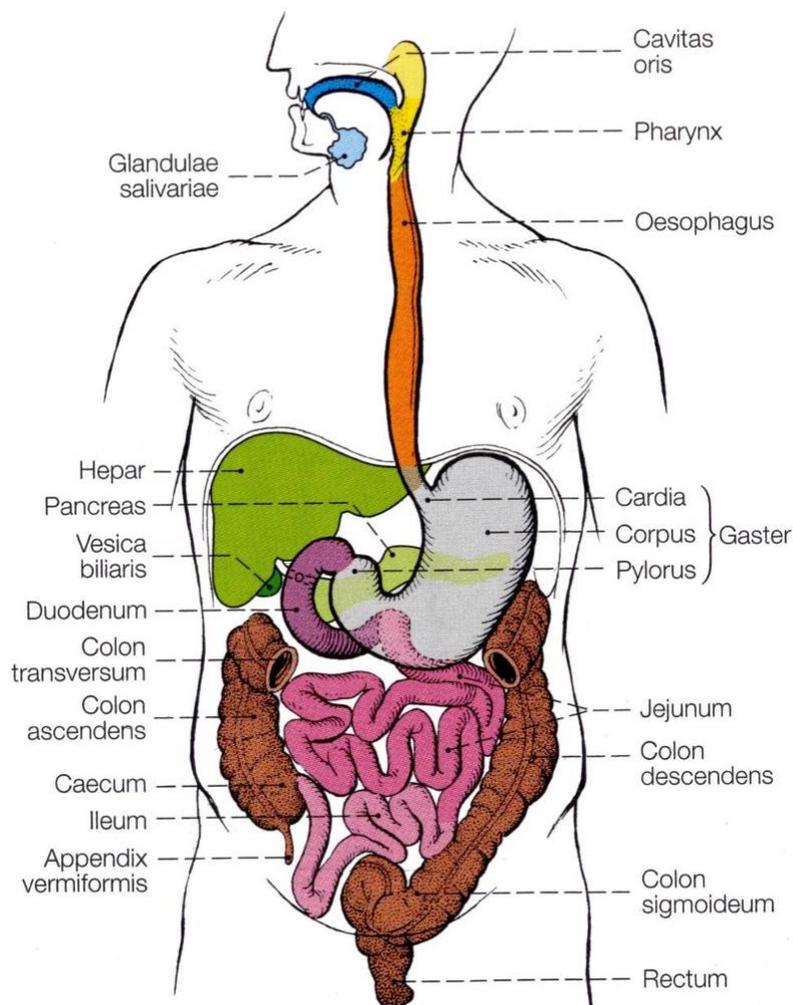
Durch zahlreiche Studien konnte bereits ein Einfluss von Schilddrüsenhormonen auf die Entwicklung des zentralen Nervensystems nachgewiesen werden, jedoch sind keine Untersuchungen bekannt, die die Rolle von Schilddrüsenhormonen bei der Entwicklung des enterischen Nervensystems (ENS) des Darms untersuchen. Im peripheren Nervensystem konnte zumindest ein Einfluss auf die Nervenregeneration nach Läsion des Nervus ischiadicus in Mäusen gezeigt werden [6]. Ein Hinweis auf eine mögliche Funktion bei der Reifung des ENS könnte sein, dass Kinder mit Kretinismus häufig an Störungen der Darmmotorik leiden [7].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen möglichen Einfluss der Schilddrüsenhormone bei der Entwicklung des ENS zu untersuchen. Ein besseres Verständnis der Entwicklungsabläufe des ENS ist Voraussetzung für die Entwicklung von Stammzelltherapien, mit denen invasive Operationsmethoden enterischer Krankheiten mit den teilweise schwerwiegenden Konsequenzen für die Patienten ersetzt werden können. Es sollten daher zellbiologische Einflüsse des Schilddrüsenhormons T3 auf ENS-Vorläuferzellen *in vitro* und auf die Entwicklung des ENS in Knockout-Tiermodellen *in vivo* untersucht werden. Ein weiterer Punkt war außerdem die Durchführung einer Genexpressionsanalyse, um die durch T3 hervorgerufenen Genregulationen bei ENS-Vorläuferzellen zu entschlüsseln.

## 1.1 Das enterische Nervensystem

### 1.1.1 Aufbau und Funktion

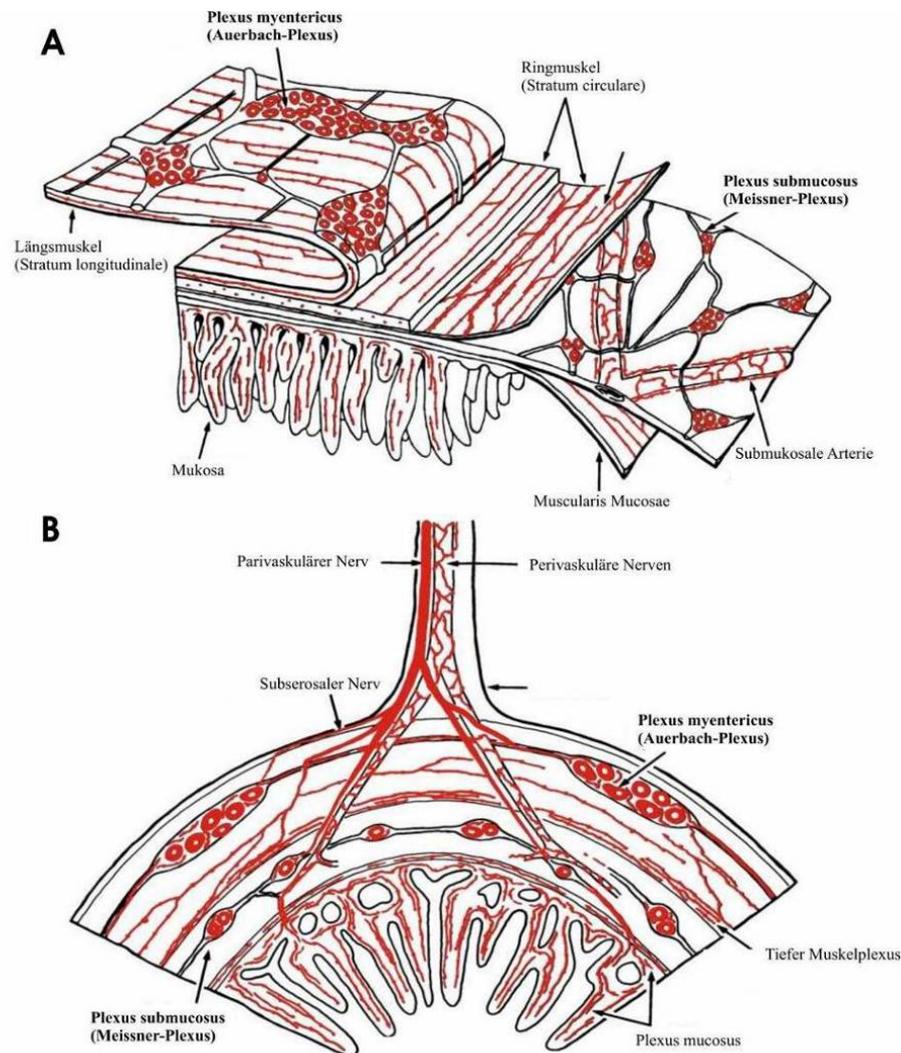
Muskelkontraktionen, Sekretionsprozesse und Resorptionsprozesse des Magen-Darm-Traktes werden von einem intestinalen Nervensystem reguliert, das als enterisches Nervensystem (ENS) bezeichnet wird. Es besteht beim Menschen aus mehreren hundert Millionen Nervenzellen, einer größeren Anzahl als das Rückenmark besitzt [8, 9]. Die Neurone erstrecken sich in einem weit verzweigten Nervengeflecht über den gesamten Intestinaltrakt vom Ösophagus bis hin zum Rektum (**Abb. 1**).



**Abb. 1:** Gliederung des Verdauungsapparates [10].

Die Zellkörper von Nerven- und Gliazellen gruppieren sich in Ganglien, die sich hauptsächlich auf zwei Nervengeflechte, den Plexus myentericus (1862 durch Leopold Auerbach entdeckt, daher auch „Auerbach Plexus“) und den Plexus submucosus

(„Meissner Plexus“; 1857 durch Georg Meissner entdeckt) verteilen [11, 12] (**Abb. 2A, B**).



**Abb. 2:** Aufbau der Dünndarmwand im Säugetier. Lokalisation des Enterischen Nervensystems (adaptiert nach Zeichnung von John Barton Furness [13]). Das enterische Nervensystem besteht aus Ganglien, die in mehreren großen (P. myentericus, P. submucosus) und kleinen Plexus angeordnet sind.

Der Plexus myentericus liegt eingebettet zwischen der äußeren Ring- (Stratum circulare) und der Längsmuskelschicht (Stratum longitudinale). Er ist für die Innervation der beiden äußeren Muskelschichten und damit hauptsächlich für die Steuerung der typischen Darmperistaltik verantwortlich [14]. Der Plexus submucosus befindet sich in der Tela submucosa. Er reguliert vor allem die Sekretion der Magen- und Darmdrüsen und ist maßgeblich an immunologischen Vorgängen im Darm, wie z. B. der Auslösung von Diarrhoe, beteiligt [15]. Darüber hinaus steuert er gemeinsam mit dem Plexus myentericus die Innervation der Lamina muscularis mucosae, einer klei-

nen Muskelschicht in der Mukosa. Diese ist beteiligt an der Darmperistaltik; so wird z.B. die Ausrichtung der Zotten durch sie gesteuert [16].

Im Gegensatz zum Plexus myentericus findet man im Ösophagus und im Magen keinen durchgehenden Plexus submucosus, sondern nur vereinzelt submukosale Ganglien [17]. In höheren Säugetieren ist der Plexus submucosus in bis zu 3 kleinere Plexus unterteilt [18]. Neben den beiden großen myenterischen und submukosalen Plexus gibt es auch noch wenige kleinere Plexus im enterischen Nervensystem direkt unterhalb der Tunica serosa, innerhalb der Ringmuskulatur und innerhalb der Mukosa (**Abb. 2B**)

Aufgrund seiner Funktionsweise nimmt das enterische Nervensystem als Teil des peripheren Nervensystems eine Sonderstellung ein. Es handelt sich um ein autonomes Nervensystem, d. h. es ist dazu in der Lage, auf äußere mechanische oder chemische Reize ohne Einwirkungen des zentralen Nervensystems zu reagieren [19]. Es sondiert die Nahrungszusammensetzung auf Nährstoffe, Wasseranteil und Salzgehalt und entscheidet und reguliert eigenständig, was vom Körper aufgenommen bzw. an Fäzes verdickt oder verdünnt und ausgeschieden wird. Dabei kann es Einfluss nehmen auf die Darmbewegung, auf die Blutzirkulation und auf die Sekretion und Resorption von Flüssigkeiten, Nährstoffen, Hormonen und Peptiden wie z. B. den Verdauungsenzymen [20]. Eine autonome Steuerung erfolgt z. B. bei den peristaltischen Bewegungen, die den Nahrungsbrei und die Fäzes von oral nach anal transportieren [21]. Als Schrittmacherzellen für die peristaltischen Bewegungen fungieren dabei die sogenannten Cajal-Zellen. Es handelt sich um aus dem Mesenchym abgeleitete Zellen, die eine Schnittstellenfunktion zwischen autonomen Nerven und den glatten Muskelzellen einnehmen [22]. Sie liegen zwischen Ring- und Längsmuskulatur und sorgen für den koordinierten Bewegungsablauf durch Kontraktionen und Dilatationen der Darmwand [23].

Die Auslösung der Bewegungsabläufe erfolgt durch Reizung von sensorischen Nervenzellen, den sogenannten IPANs (engl. „intrinsic primary afferent neurons“), bei Druck auf die luminale Darmschleimhaut. Die stereotypen Reflexbewegungen als Antwort auf eine Reizung der luminalen Darmschleimhaut wurden 1899 erstmals entdeckt und als Gesetz des Darms (engl. „Law of the intestine“) bezeichnet [24]. Aufgrund der eigenen Steuerungs- und Entscheidungsgewalt des ENS wird es in der Literatur auch oft als zweites Gehirn (engl. „second brain“), Bauchhirn (engl. „abdominal brain“) oder auch treffend als Darmhirn (engl. „brain in the gut“) bezeichnet.

Die autonom ablaufenden Vorgänge im Magen-Darm-Trakt können vom ZNS von außen über das vegetative Nervensystem beeinflusst werden. Das ENS ist dafür durch extrinsische und intrinsische Nervenleitungen mit Sympathikus und Parasympathikus verbunden. Die Steuerungszentren für die extrinsischen und intrinsischen Reize befinden sich im Rückenmark. Eine Verschaltung mit dem ZNS erfolgt parasympathisch über den Nervus vagus und sympathisch über die Nervi splanchnici [20, 25]. Über diese Nerven kann das ZNS unter anderem die Motilität oder die Sekretion des Darms beeinflussen, wie es zum Beispiel beim Auftreten von Durchfall in Stresssituationen passiert.

### 1.1.2 Klassifizierung der Neurone

Das enterische Nervensystem besteht aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Neurontypen. Diese wurden vor allem im Magen-Darm-Trakt von Meerschweinchen und Schwein nach verschiedenen Kriterien wie Morphologie, elektrophysiologischen und biochemischen Eigenschaften sowie nach ihrer Funktion in unterschiedliche Typen eingeordnet.

Eine erste Klassifizierung fand 1899 durch Alexander Stanislavich Dogiel in verschiedenen Säugetieren und im Menschen statt: Er unterteilte die Neurone aufgrund unterschiedlicher Morphologien in Dogiel Typ I, Dogiel Typ II und Dogiel Typ III und bezog sich dabei auf verschiedenartige Zellkörperformen und Unterschiede in der Anzahl der Zellfortsätze [26]. Dogiel Typ I-Neurone besitzen einen flachen, leicht länglichen Zellkörper und ein langes Axon und mehrere kurze Dendriten. Neurone des Dogiel Typ II sind die am häufigsten vorkommenden Neurone im Dünndarm und im Kolon. Sie besitzen einen eher rundlichen Zellkörper und viele Axone. Neurone vom Typ Dogiel III besitzen 2 bis 10 Dendriten, die immer dünner werden und sich verzweigen, je weiter sie vom Zellkörper entfernt liegen. In den letzten 20 Jahren wurden noch weitere Zellformen entdeckt, die in die Typen IV bis VII eingeordnet wurden [26, 27].

Eine Einstufung der Neurone aufgrund unterschiedlicher elektrophysiologischer Eigenschaften wurde ab 1973 vorgenommen [28]. Dabei wurden Neurone des S-Typs (engl. „mechanosensory“; auch als „Typ 1“ bezeichnet) und des AH-Typs (engl. „after-hyperpolarization“; auch „Typ 2“ genannt) unterschieden: Elektrophysiologische Messungen des AH-Typs zeigen eine große Amplitude mit normalerweise 2 Hyperpolarisationsphasen, während Neurone des S-Typs ein kurzes Aktionspotential mit einer kurzen Hyperpolarisation aufweisen. Beide Neurontypen unterscheiden sich

außerdem in der Morphologie: S-Neurone besitzen eine Vielzahl von Morphologien, sind meist aber kein Dogiel II-Typ, während Dogiel II-Neurone meist dem elektrophysiologischen AH-Typ entsprechen. Nishi et al. identifizierten damals zusätzlich Neurone, die kein Aktionspotential aufwiesen. Diese ordneten sie einem weiteren Typ zu, den sie als Typ 3 bezeichneten. Heutzutage geht man jedoch davon aus, dass Nishi et al. defekte Neurone identifizierten und sie daher keinen dritten elektrophysiologischen Typ klassifizierten [28, 29]. Ein „echter“ dritter Typ wurde jedoch später von Lomax et al. entdeckt [30]; er wurde als Typ 3 bzw. LT-Typ (engl. „Low threshold“; niederschwelliger Typ) bezeichnet. Neurone des LT-Typs weisen am Soma Tetrodotoxin-unempfindliche, spannungsgesteuerte Ströme auf und besitzen keine lange Hyperpolarisation. Außerdem besitzen Neurone des 3. Typs eine sehr leichte Erregbarkeit. Morphologisch handelt es sich um uniaxonale Neurone, was auf eine Funktion als Sekreto- oder Vasomotorneurone hinweist.

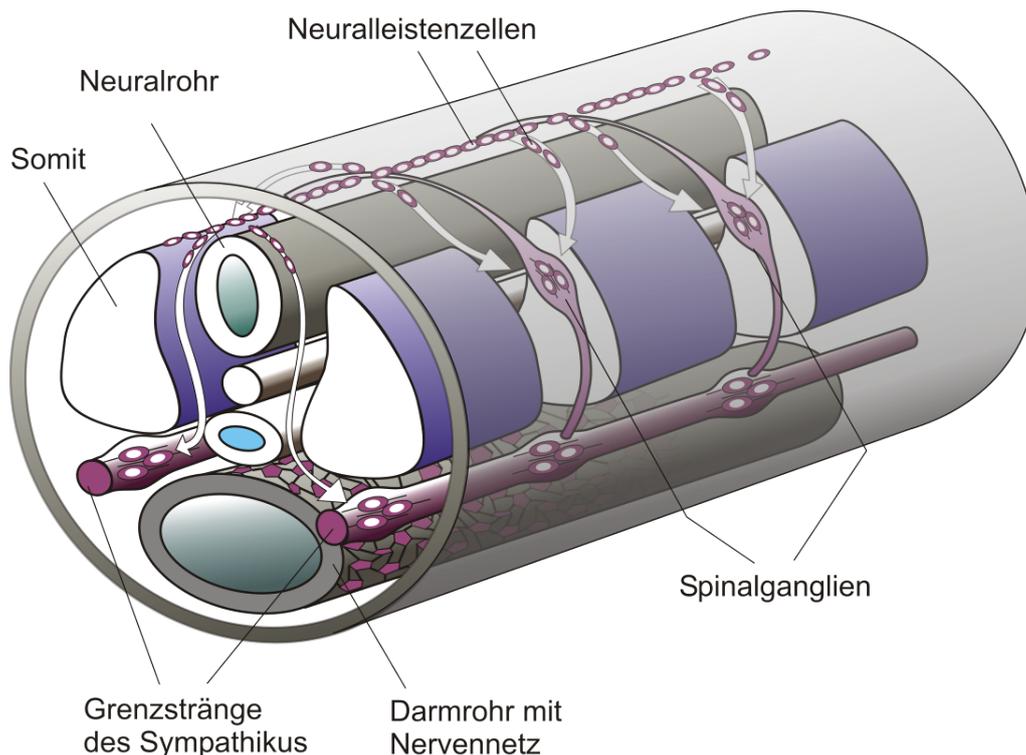
Eine weitere Einteilung der Neurontypen nach biochemischen Eigenschaften folgte auf die Einstufungen aufgrund der Morphologie und der elektrophysiologischen Eigenschaften [31]. Dabei wurden die Neurone anhand unterschiedlich auftretender Neurotransmitter unterschieden. Bei dieser Arbeit konnten durch histochemische Färbungen 17 unterschiedliche Neurontypen im Meerschweinchen identifiziert werden. Es wurden jedoch bei dieser Einstufung, die ja zum größten Teil auf biochemischen Eigenschaften basiert, bereits Aspekte der vorhergegangenen Einstufungen berücksichtigt.

Bei der aktuell gebräuchlichen Einteilung der unterschiedlichen Neurontypen wurden die bereits vorhandenen Kenntnisse aus den Funktionen der Neurone, ihrer Morphologie und ebenso die elektrophysiologischen und biochemischen Eigenschaften zur Unterscheidung herangezogen. Damit konnten im Meerschweinchen insgesamt 18 funktionell unterschiedliche Neurontypen klassifiziert werden [32]. Diese Neurontypen können dabei jeweils einer der 3 folgenden Klassen zugeordnet werden: Den Motoneuronen (inhibitorische und exzitatorische), den Interneuronen und den sensorischen Neuronen. Die Motoneurone innervieren Zellen der Muskelgewebe, des Mukosagewebes oder der Blutversorgung. Sie werden aufgrund der Art des innervierten Zielgewebes weiter in Muskel-, Sekreto- und Vasomotoneurone unterteilt [33]. Aufsteigende und absteigende Interneurone sind verantwortlich für die Reizweiterleitung zwischen den verschiedenen enterischen Nervenzellen. Außerdem besitzen viele Interneurone auch mechanosensitive oder chemosensitive Eigenschaften. Bei den Neuronen der dritten Gruppe handelt es sich um sensorische Neurone,

die IPANs. Sie besitzen die Eigenschaft, auf chemische Reize ebenso wie auf mechanische Reize wie z. B. Dehnungen der Darmmuskulatur oder der Mukosa zu reagieren und leiten die ausgelösten Reize an die Interneurone weiter [33].

### 1.1.3 Verlauf der Embryonalentwicklung des ENS

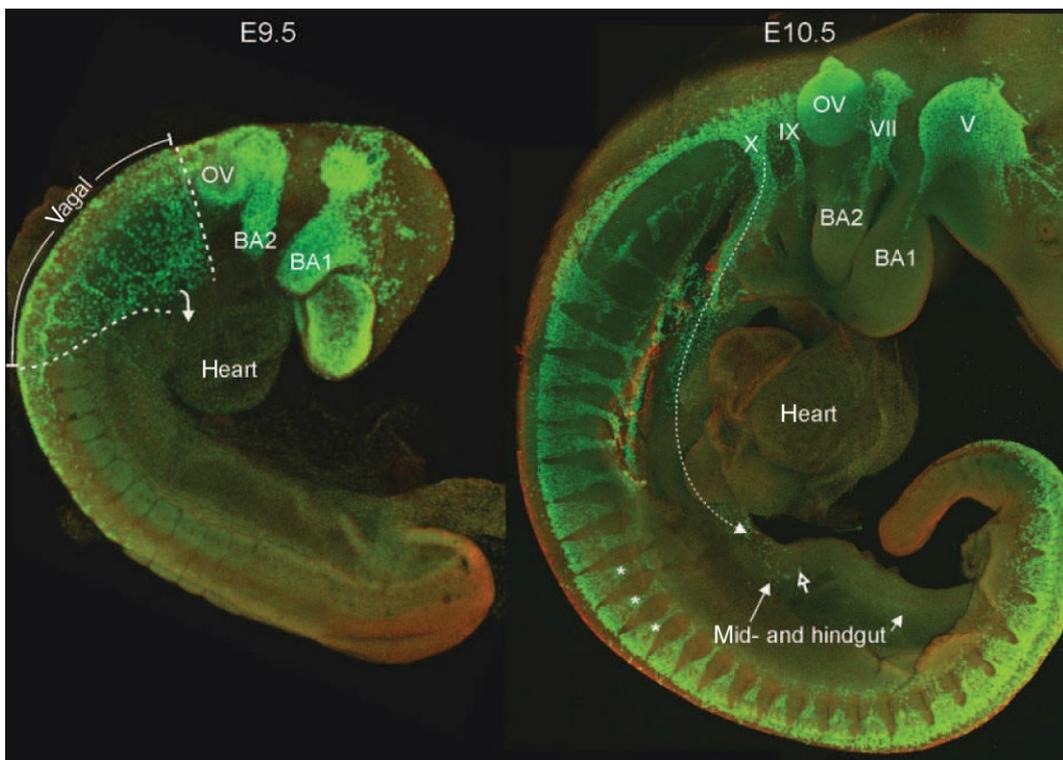
Das ENS wird bei höheren Wirbeltieren aus Neuralleistenzellen (NLZ) gebildet. Diese wandern entlang des Neuralrohres vorbei an den rostralen Hälften der Somiten in das Darmrohr ein (**Abb. 3**).



**Abb. 3:** Ursprung und Migration der Neuralleistenzellen während der Bildung des ENS. Oberhalb des Neuralrohres bilden sich Neuralleistenzellen, die an den Somiten medial entlang zum Magen-Darm-Trakt wandern und sich dort zu unterschiedlichen Zelltypen des ENS (Gliazellen, Nervenzellen) differenzieren.

Wichtige Grundlagen für das Verständnis der neuronalen Besiedelung des Darmes lieferten Yntema und Hammond 1954 mit ihren Ablationsstudien in Hühnerembryonen [34]. Sie entfernten Teile der Neuralleiste vor dem Auswandern der NLZs. Dabei stellten sie fest, dass ein Entfernen der kompletten rhomboencephalen (vagalen) Neuralleiste eine Besiedelung des Darmes mit Neuralleistenzellen und damit die Bildung von Ganglien unterdrückte und folgerten daraus, dass der Ursprung der ENS-Vorläuferzellen im vagalen Teil der Neuralleiste liegen müsse.

Zwanzig Jahre später spezifizierten Le Douarin und Teillet diese Beobachtung durch Transplantationen im Wachtel-Huhn-Chimärensystm: Sie fanden heraus, dass das ENS nicht nur, wie von Yntema und Hammond bereits festgestellt, aus einem vagalen Zellpool aus dem Bereich der Somiten 1-7 gebildet wird, sondern dass darüber hinaus auch im aboralen Teil des ENS einige Zellen aus dem sakralen Teil der Neuralleiste zur Bildung beitragen [35, 36].



**Abb. 4:** Wanderung von ENS-Vorläuferzellen vom Neuralrohr zum Darm. Immunhistochemische Färbung mit dem Neuralleistenzellmarker Sox10. Schnitte stammen von murinen Embryonen des Stadiums E9,5 und E10,5. Neuralleistenzellen wandern im Stadium E8,5 ventral aus dem vagalen Teil der Neuralleiste aus in Richtung Vorderdarm und erreichen diesen im Stadium E9,5. Im Stadium 10,5 sind die Zellen entlang der gepunkteten Linie gewandert und haben den Mitteldarm erreicht (OV: Otic vesicle; BA1, BA2: branchial arch; V, VII, IX, X: kraniale Nerven; Sternchen: Spinalganglien) [37].

Die vagalen Zellen wandern im murinen Organismus während der Embryogenese ab dem Stadium E8,5 aus der Neuralleiste in Richtung Vorderdarm und erreichen diesen im Embryonalstadium E9,5 (**Abb. 4**) [38]. Ab diesem Zeitpunkt werden die Zellen als enterische Neuralleistenzellen (engl. „enteric neural crest cells“, ENCC) bezeichnet, da ein Teil der Zellen schon eine erste Differenzierung in ENS-Vorläuferzellen durchlaufen hat [39]. Vom Eintrittspunkt in die Darmröhre bewegen sich die ENCC in mehreren Wellen rostro-kaudal über den gesamten Gastrointestinaltrakt bis zum Dickdarm, proliferieren und differenzieren zu Gliazellen und vielen unterschiedlichen

neuronalen Zelltypen [38]. Zwischen dem Stadium E11,5 und E12,5 findet außerdem eine Migrationsbewegung von ENCCs durch das Mesenchym statt.

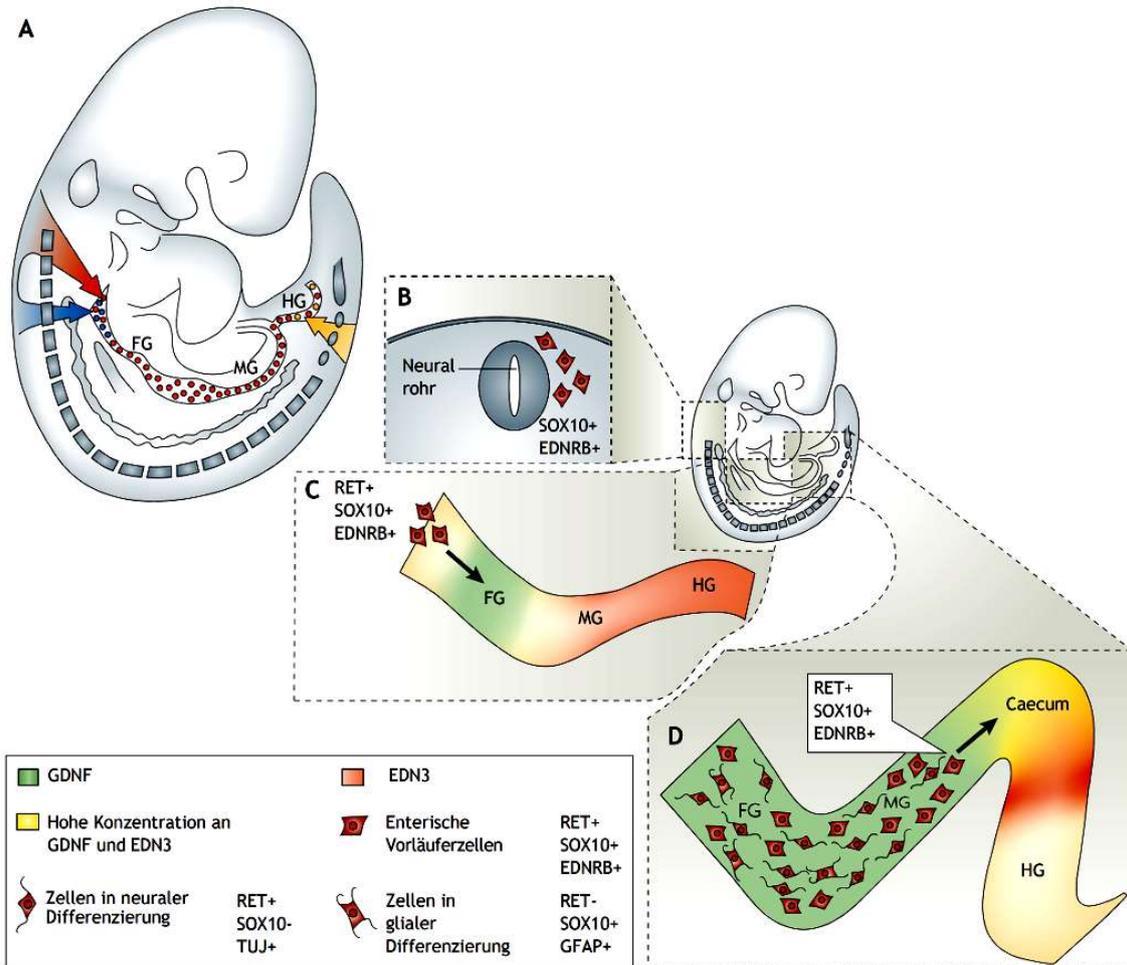
Nachdem die ersten Zellen den Dickdarm erreicht haben, beginnen ungefähr ab Embryonalstadium E13,5 Vorläuferzellen aus dem sakralen Teil der Neuralleiste distal über den Enddarm ins Darmrohr einzuwandern. Die sakralen ENCC tragen zur Bildung des Nervensystems im Dickdarm bei und sind außerdem verantwortlich für die Bildung des Remak - Nervs in höheren Säugetieren [40].

Neueste Studien zeigen außerdem, dass nicht nur ENCCs, die entlang des Darmrohres wandern, zur Bildung des ENS im Hinterdarm beitragen. Es finden ebenso Migrationsbewegungen von ENCCs vom Mittel- zum Hinderdarm durch das Mesenchym an den Stellen statt, an denen die beiden Darmabschnitte durch die Schleifenform des sich entwickelten Darms nah beieinander liegen [41].

Im kolorektalen Darm stammen nur bis zu 17 % der Neurone von sakralen Neuralleistenzellen ab, wie durch immunhistochemische Doppelfärbungen von Wachtel-Hühner-Chimären nachgewiesen werden konnte. Der Hauptteil differenziert sich aus vagalen NCCs [42]. Die Besiedelung des Darms ist in der Maus im Embryonalstadium E15,5 abgeschlossen [43].

#### 1.1.4 Genregulationen während der Entwicklung des ENS

Die komplexen genregulatorischen Vorgänge während der Bildung des enterischen Nervensystems wurden bereits in zahlreichen Studien an Menschen mit Darmentwicklungsstörungen ebenso wie im Mausmodell analysiert. Von Interesse sind dabei mehrere Signalwege, die für das Überleben, die Proliferation, Migration und Differenzierung der Vorläuferzellen verantwortlich sind, wie z.B. der GDNF/GFR $\alpha$ 1/RET- und der EDN3/EDNRB-Signalweg [43, 44] (**Abb. 5B-D**).



**Abb. 5:** Genexpression während der Entwicklung des enterischen Nervensystems. Während der Wanderung und der Reifung der enterischen Vorläuferzellen werden je nach Ort und Zeitpunkt unterschiedliche Gene wie z. B. RET, SOX10 und TUJ exprimiert. FG: Vorderdarm; MG: Mitteldarm; HG: Dickdarm. Angepasst nach Heanue et al. [43].

### **GDNF/GFR $\alpha$ 1/RET - Signalweg**

Das glykosilierte Homodimer GDNF (engl. „glial cell line - derived neurotrophic factor“) wurde 1993 entdeckt. Bei GDNF handelt es sich um einen Wachstumsfaktor der TGF- $\beta$ -Superfamilie, der eine Rolle bei Überleben und der morphologischen Differenzierung von dopaminergen Neuronen im Mittelhirn spielt [45].

Die Wirkung von GDNF entfaltet sich durch Bindung an Rezeptoren, die aus 2 Komponenten aufgebaut sind: einem transmembralen Tyrosinkinase-Rezeptor (RET) und seinem zugehörigen Korezeptor (GFR $\alpha$ ) [46]. Heutzutage sind 4 verschiedene Korezeptoren für RET bekannt (GFR $\alpha$ 1 - GFR $\alpha$ 4), wobei GDNF bevorzugt an Rezeptoren bindet, die mit GFR $\alpha$ 1 gekoppelt sind [47].

Während der Embryonalentwicklung ist der GDNF/GFR $\alpha$ 1/RET-Signalweg maßgeblich an der Entstehung des enterischen Nervensystems beteiligt. Eine zeitlich exakt gesteuerte Expression der einzelnen Komponenten des Signalwegs ist essentiell. In Mäusen wird RET während der Entwicklung des ENS von in das Darmrohr einwandernden NCCs erstmals bei Eintritt in den Vorderdarm exprimiert [43]. Eine Expression des zugehörigen Liganden GDNF kann im Embryonalstadium E9 bis E9,5 in hohen Konzentrationen in den Mesenchymzellen des Magens nachgewiesen werden. Während der kaudalen Wanderung der NCCs wird GDNF im Caecum ab E11 ebenso wie ab dem Stadium E11,5 im Enddarm in großer Menge exprimiert [43].

Störungen im GDNF/GFR $\alpha$ 1/RET-Signalweg führen zu schwerwiegenden Erkrankungen des ENS. Heterozygote Mutationen in *RET* sind für 15-35% der sporadisch auftretenden und für 50% der familiär vererbten Hirschsprung-Fälle verantwortlich. Ebenso konnten heterozygote Mutationen in *GDNF* als Auslöser von HSCR nachgewiesen werden [48, 49]. Versuche mit Knockout-Mausmodellen zeigten außerdem, dass ein Ausschalten von *GDNF*, *GFR $\alpha$ 1* oder *RET* zu einer kompletten Aganglionose des Darms distal des Magens führt [50-52].

Neben GDNF gibt es noch 3 weitere Liganden, Neurturin (NTN), Artemin (ARTN), und Persephin (PSPN), die durch Bindung an GFR $\alpha$  den Tyrosinkinase-Rezeptor RET aktivieren können. Dabei bindet Neurturin bevorzugt an GFR $\alpha$ 2, Artemin bevorzugt an GFR $\alpha$ 3 und Persephin bevorzugt an GFR $\alpha$ 4. Während Persephin wohl keine Rolle bei der Entwicklung des ENS spielt, deuten immunhistochemische Färbungen mit Artemin-Antikörpern in Affen und Enten auf eine Rolle bei der ENS-Embryonalentwicklung hin [53]. Ebenso könnte Neurturin einen Einfluss auf ENS-Vorläuferzellen haben, da NTN-Knockoutmäuse (*NTN*<sup>-/-</sup>) eine Verminderung der Neuronendichte und der Neuronengröße im ENS, die mit Darmmotilitätsstörungen einhergeht, aufweisen [54].

### ***EDN3/EDNRB - Signalweg***

Endotheline (ET) gehören zur Gruppe der Peptidhormone. Mit ihren vasokonstriktischen Eigenschaften sind sie zu einem großen Teil an der Regulierung des Blutdrucks beteiligt [55-57]. Heutzutage sind 3 verschiedene Endothelintypen (ET-1 bis ET-3 kodiert von *EDN1* bis *EDN3*) bekannt, die aus jeweils 21 Aminosäuren bestehen und sich nur geringfügig in der Struktur unterscheiden [58]. Die Bezeichnung Endotheline leitet sich von der Herkunft der Proteine ab, da sie zum größten Teil im Endothel der Blutgefäße produziert werden. Als Bindestellen für

Endotheline wurden zwei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit dem Namen Endothelinrezeptor A (EDNRA) bzw. Endothelinrezeptor B (EDNRB) identifiziert. Neben den vasokonstriktorisches Eigenschaften konnte ebenso ein Einfluss von Endothelinen auf die Entwicklung von Melanozyten und auf die Entwicklung des enterischen Nervensystems festgestellt werden. Dabei spielt bei der Entstehung des ENS vor allem Endothelin 3 zusammen mit Endothelinrezeptor B eine Rolle, da es die Wanderung von Neuralleistenzellen in das Darmrohr beeinflusst [59]. Die Expression von Endothelin 3 im Darm findet hauptsächlich in den Mesenchymzellen des Caecum statt [60]. Endothelinrezeptor B wird hingegen zum größten Teil von ENS-Vorläuferzellen gebildet, wobei die Expression bereits direkt nach der Auswanderung aus dem Neuralrohr beginnt [61]. Essentiell für einen funktionierenden EDN3/EDNRB-Signalweg ist auch das Endothelin-konvertierende Enzym (ECE1), eine Metalloprotease, die durch enzymatische Hydrolyse eine passive Form des Endothelins (big-Endothelin) in die aktive Form katalysiert [62].

Heterozygote Mutationen in den Genen *EDN3*, *EDNRB* und *ECE1* sind für etwa 5 % der menschlichen Hirschsprung-Erkrankungen verantwortlich [48]. In Knockoutmäusen führte ein Ausschalten von *EDN3* oder *EDNRB* zu distalen Aganglionosen des Darms [63]. Man geht daher davon aus, dass der EDN3/EDNRB-Signalweg die Migration der NCCs beeinflusst. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass durch EDN3/EDNRB die Vorläuferzellen in einem proliferativen Zustand gehalten werden [64] und dass damit die Differenzierung verhindert wird.

### **Transkriptionsfaktoren**

Transkriptionsfaktoren regulieren im ENS die Expression verschiedenster für die Entwicklung und Funktion essentieller Gene, darunter auch solche, die Teil der oben beschriebenen Signalwege sind.

Ein paar der für die Entwicklung des ENS wichtigsten Transkriptionsfaktoren, SOX10, MASH1, PHOX2A, PHOX2B und SIP1, werden im Folgenden kurz vorgestellt:

#### SOX10

Der Transkriptionsfaktor SOX10 („SRY (sex determining region Y) - box 10“) ist während der Embryonalphase an der Entstehung der Neuralleiste beteiligt. Mäusen, die eine homozygote Mutation in *SOX10* tragen, fehlen verschiedene Zelllinien wie z. B. Melanozyten, Neurone des vegetativen und des enterischen Nervensystems und Gliazellen des peripheren Nervensystems. Im Menschen zeigt sich, dass eine

Haploinsuffizienz des *SOX10*-Gens für eine Reihe von Hirschsprungerkrankungen verantwortlich ist, in erster Linie in Verbindung mit dem Waardenburg-Shah-Syndrom [64]. In *SOX10*-hemizygoten Mäuse tritt eine Aganglionose des Enddarms auf und darüber hinaus bilden sich weiße Flecken auf der Haut (sogenanntes „White Spotting“).

Andere Versuche im Mausmodell, bei denen in Maus-Embryonen mit einer gezielten heterozygoten Deletion *SOX10* (*SOX10<sup>LacZ</sup>*) deaktiviert wurde, deuteten außerdem darauf hin, dass die Defekte im ENS auf eine Verringerung der ENS-Vorläuferzellpopulation zurückzuführen sind [65]. *SOX10<sup>-/-</sup>*-Mäuse leiden an einer Aganglionose des gesamten Gastrointestinaltraktes, was auf einen frühen Zelltod der Neuralleistenzellen, aus denen sich in gesunden Tieren das ENS bildet, zurückzuführen ist [66]. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass *SOX10*, zumindest in den Vorläuferzellen von Neuronen des sympathischen Nervensystems, für die Expression von *PHOX2B* benötigt wird [67].

### MASH1 (ASCL1)

Bei einem weiteren für die ENS-Entwicklung essentiellen Transkriptionsfaktor, MASH1 („mammalian achaete scute homolog -1“), handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor der Helix-loop-Helix-Familie in der Maus. Er ist ein Homolog des AS-C („achaete scute complex“) in der *Drosophila*-Fliege, der aus 4 Genen besteht.

Im Säugetier wird MASH1 für die Bildung von sensorischen Neuronen des Geruchsinns und für die Bildung von Neuronen des autonomen Nervensystems benötigt [68]. Bei der Entstehung des ENS in der Maus wird MASH1 erstmals in den wandernden ENCC des Magen-Darm-Traktes im Embryonalstadium E10,5 bis E13,5 exprimiert [68]. Während man nach der ersten Studie in Maus-Embryonen davon ausging, dass eine *MASH1*-Nullmutation nur zu einer Verzögerung der Reifung serotonerger Neurone im ENS führt, zeigten spätere Analysen, dass die Bildung von serotonergen Neuronen in *MASH1<sup>-/-</sup>*-Knockout-Mäusen komplett verhindert wird [69]. MASH1 ist damit bis jetzt der einzige bekannte Transkriptionsfaktor im ENS, von dem man sicher weiß, dass er für die Entwicklung eines einzelnen Neuronentyps im ENS essentiell ist.

### PHOX2A/2B

Die Transkriptionsfaktoren *PHOX2A* und *PHOX2B* („Paired-like homeobox“) sind an der Regulation der Stammzelldifferenzierung zu verschiedenen Neurontypen im zentralen und peripheren Nervensystem beteiligt. Sie üben dabei insbesondere Einfluss

auf das noradrenerge System aus, indem sie die Expression verschiedener Komponenten wie Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase (DBH), Noradrenalintransporter (NET) und Tyrosin-Hydroxylase (TH) steuern [70]. Diese Komponenten werden vor allem für die Reifung von Stammzellen zu noradrenergen Neuronen benötigt.

Die Expression von PHOX2 findet ausschließlich in neuronalen Zellen statt, im PNS vor allem in den sympathischen, den parasympathischen und auch den enterischen Ganglien [71]. Vorläuferzellen des ENS exprimieren erstmals direkt nach dem Eintritt in das Darmrohr PHOX2B, nicht jedoch PHOX2A [71]. Im weiteren Verlauf der ENS-Entwicklung ist dann die Expression von PHOX2A stets schwächer ausgeprägt als die Expression von PHOX2B; sie findet, im Gegensatz zur PHOX2B-Expression, die im gesamten ENS auftritt, nur hinter der Zellfront der ENCC statt, die den Darm besiedeln [71]. MASH1, das kurz vor dem ersten Auftreten von PHOX2A erstmals im Darmrohr gebildet wird, ist dabei zumindest teilweise für die Expressionsregulierung von PHOX2A verantwortlich [72].

Bei der Etablierung von Tiermodellen zeigte sich, dass das Ausschalten von *PHOX2A/B* lethal ist. *PHOX2A*<sup>-/-</sup>-Mäuse überleben nur bis kurz nach der Geburt. *PHOX2B*<sup>-/-</sup>-Mäuse sterben sogar bereits während der Embryonalphase, können jedoch durch Supplementierung des Muttertieres mit noradrenergen Antagonisten bis zum Stadium E18,5 überleben [70]. In *PHOX2B*<sup>-/-</sup>-Mäuse fehlen Neurone im gesamten Darm, da die ENCC zwar in den Darm eintreten, jedoch nicht kaudal entlang des Darmes weiter wandern; sie sterben schließlich zwischen den Embryonalstadien E10 und E13,5 an Apoptose [73]. Dies könnte damit zusammenhängen, dass PHOX2B essentiell für die Expression von RET benötigt wird [73].

## SIP1

SIP1 ("Smad interacting protein 1"; ZEB2, Zfhx1B) kodiert einen Transkriptionsfaktor der  $\delta$ EF1/Zfh-1-Zinkfinger-Familie. Mutationen in *SIP1* führen zu Morbus Hirschsprung [74] und zu Morbus Wilson [75]. In *SIP1*-Knockoutmäusen konnte gezeigt werden, dass Aganglionosen deshalb auftreten, da wichtige ENS-Vorläuferzellen der vagalen Neuralleiste fehlen [76]. Eine genetische Regulation, die für die Entwicklung eines funktionsfähigen ENS essentiell ist, findet zwischen SIP1 und SOX10 statt [77].

### 1.1.5 Entwicklungsstörungen des ENS

Die Besiedelung des Magen-Darm-Traktes mit neuralen Vorläuferzellen und die Reifung dieser Zellen zu Glia und Neuronen ist von einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Faktoren abhängig (siehe Kapitel 1.1.3 und 1.1.4). Mutationen in Genen der in Migration, Proliferation und Differenzierung der NCC involvierten Signalwege können zu schweren Entwicklungsstörungen des ENS führen. Es entstehen dabei je nach Mutation unterschiedlich stark ausgeprägte Neuropathien. Die wohl bedeutendste Entwicklungsstörung des ENS im Menschen wird als Morbus Hirschsprung (HSCR) bezeichnet, benannt nach ihrem Entdecker Harald Hirschsprung, der 1888 zum ersten Mal von zwei Neugeborenen berichtete, die an dieser Aganglionose starben. Morbus Hirschsprung tritt bei etwa 1 von 5000 Neugeborenen auf. Jungen sind dabei statistisch gesehen viermal so häufig betroffen wie Mädchen [78]. Darüber hinaus erkranken Kinder dunkelhäutiger Eltern etwa 1,67 mal so oft wie Kinder mit zwei weißen Elternteilen [79]. Morbus Hirschsprung wird als multigene Krankheit bezeichnet, da Mutationen mehrerer Gene zum Ausbruch der Krankheit führen können. Bekannt sind vor allem Mutationen in Genen, die Einfluss auf Migration, Proliferation und Differenzierung enterischer Vorläuferzellen ausüben, wie z. B. *EDN3*, *EDNRB*, *ECE1*, *RET*, *SOX10* [43] sowie *SIP1* [80].

Oftmals ist Morbus Hirschsprung auch eine Begleiterscheinung weiterer Entwicklungsstörungen, wie z. B. bei der Trisomie 21 (Morbus Down-Syndrom) oder dem bereits früher erwähnten Waardenburg-Shah-Syndrom, einer Entwicklungsstörung der Neuralleiste (Neurokristopathie), die auch als Waardenburg-Syndrom Typ IV bezeichnet wird [81]. Etwa 12 % der an Trisomie 21 erkrankten Patienten leiden an einer Aganglionose des Darms [82]. Morbus Hirschsprung kann außerdem auch in Verbindung mit dem Mowat-Wilson-Syndrom auftreten, einem Gendefekt, der zu mentaler Retardierung und zu Krampfanfällen führt [83], und in Verbindung mit dem Undine Syndrom, einer gestörten Atmungsaktivität, die hervorgerufen wird durch eine Mutation von *PHOX2B* [84].

Physiologisch manifestiert sich Morbus Hirschsprung in aganglionären Darmabschnitten. In 80 % der Fälle ist dabei nur das Rektum und Colon sigmoideum betroffen („short segment HSCR“), während in 20 % der Fälle der aganglionäre Bereich über das proximale Ende des Kolons hinaus geht („long segment HSCR“) [48]. In besonders schwerer Ausprägung, wenn der gesamte Dickdarm betroffen ist, wird die Krankheit auch als Jirásek-Zuelzer-Wilson-Syndrom bezeichnet [85]. Da die

ganglionäre Struktur des ENS vor allem für die Darmperistaltik verantwortlich ist, führen Aganglionosen des Darms in dem Bereich, in dem die Nervenzellen fehlen, zu einer schweren Störung der koordinierten Kontraktionen: Durch die fehlenden Ganglienzellen kommt es in Folge zu einem starken Anstieg der Zellteilung (Hyperplasie) der vorgeschalteten parasymphatischen Nervenfasern. Es tritt ein erhöhter Acetylcholinausstoß auf, was wiederum zu einer Dauerkontraktion der Ringmuskulatur des betroffenen Abschnitts führt. Der Transport der Fäzes findet nur noch vermindert statt. Ein Stau der Fäzes vor dem aganglionären Bereich kann zu einer Dilatation des Darms, einem sogenannten Megakolon, führen. Durch möglichen kompletten Darmverschluss oder Darmdurchbruch mit einhergehender Sepsis (meist Peritonitis) können unbehandelte Aganglionosen in schweren Fällen auch zum Tode führen.

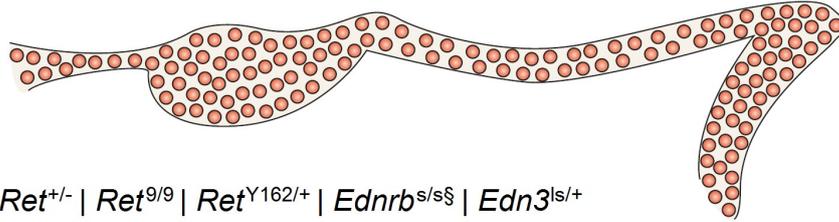
Erste Anzeichen auf eine Morbus Hirschsprung-Erkrankung sind Probleme beim Ausscheiden der Fäzes, Obstipationen in den ersten Tagen nach der Geburt und ein stark geschwollener Bauch. Bei manchen Fällen kann HSCR zu einer lebensbedrohlichen Enterokolitis führen einhergehend mit Fieber und wässrigem/blutigem Stuhl. Die Diagnose von HSCR erfolgt in den meisten Fällen durch Ultraschall (AbdomenSonogramm), Röntgenaufnahmen, bei denen ein Kontrastmittel (z. B. Barium) in den Darm eingeführt wird (Kolonkontrasteinlauf), und über eine Biopsie, bei der rektal ein Teil der Darmschleimhaut entfernt wird. Seltener wird auch eine Rektummanometrie durchgeführt, bei der die Passage der Fäzes durch den Enddarm über einen Ballon simuliert und der dabei auftretende Druck durch die Darmwand und den inneren Afterschließmuskel (*Musculus sphincter ani internus*) gemessen wird.

Eine Behandlung erfolgt operativ, wobei je nach Art und Stärke der Erkrankung verschiedene Methoden zum Einsatz kommen. Alle aktuellen Methoden haben dabei die Resektion des ganglienfreien Abschnitts mit einem anschließenden Zusammenschluss (Anastomose) der gesunden Darmabschnitte zum Ziel. Es werden dabei meist minimal invasive (laparoskopische) und transanale Methoden angewendet, da diese am wenigsten gesundes Gewebe schädigen. Zu den am meisten gebräuchlichen zählen dabei die retrorektale transanale Durchzugsoperation nach Duhamel [86], die endorektale transanale Rektosigmoidektomie nach Soave [86], eine Rektosigmoidektomie nach Swenson [86] und eine transabdominale Rektosigmoidektomie nach Rehbein [86]. Während früher auch häufiger zwei Operationen durchgeführt wurden, eine erste, bei der der gesunde Darmabschnitt in einem künstlichen Darmausgang (*Anus praeter*; Kolostoma) nach außen gelegt wurde und

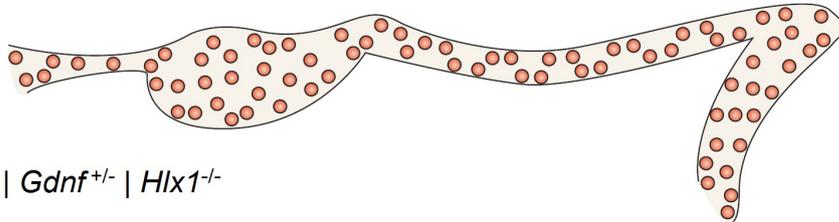
eine zweite, bei der die gesunden Darmabschnitte wieder zusammengefügt wurden, geht man heute immer mehr dazu über, beide Schritte in einer einzigen OP durchzuführen [87].

Die Nachteile der operativen Entfernung des aganglionären pathogenen Gewebes liegen jedoch in häufig auftretenden Nebenwirkungen wie z. B. anorektaler Inkontinenz. In einer Studie mit Patienten, die an einer schweren Aganglionose erkrankt waren, litten 82 % noch nach 5 Jahren nach der OP unter fäkaler Inkontinenz. Nach 10 Jahren reduzierte sich ihr Anteil auf 57 % und nach 15 Jahren noch weiter auf 33 % [88]. An einer anderen Möglichkeit der Therapie, dem Einsatz von Stammzellen, wird bereits seit mehreren Jahren geforscht. Bei erfolgreicher Etablierung einer Stammzellbehandlung könnten die belastenden Nebenwirkungen der invasiven OP-Methoden verringert oder ganz beseitigt werden. Eine Kultivierung körpereigener adulter ENS-Stammzellen ist bereits möglich [89].

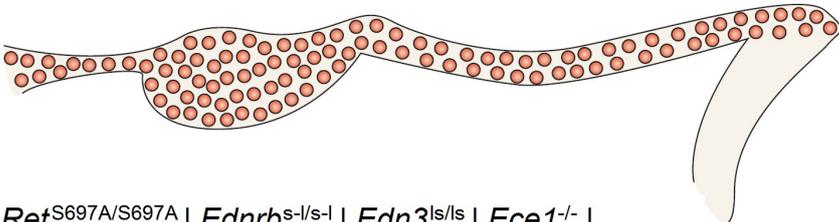
In Tieren treten Aganglionosen des Darms ebenfalls oft zusammen mit anderen Krankheitsbildern auf. So ist unter der Bezeichnung OLWS (engl. „Overo Lethal White Foal Syndrom“) ein vererbbares Krankheitsbild bekannt, das zu Leuzismus und Darmentwicklungsstörung bei Pferden führt. Auslöser ist eine Mutation im *EDNRB*-Gen [90]. Ein Auftreten von Aganglionosen in Mäusen kann ebenso recht häufig beobachtet werden. So ist z. B. die sogenannte SL-Krankheit (engl. „spotting-lethal“) bekannt, bei der die Tiere neben Darmmotilitätsstörungen auch unter Leuzismus und Schwerhörigkeit leiden [91]. Die genetischen Auslöser von Aganglionosen wurden zum größten Teil in Mausmodellen erforscht (**Abb. 6**).

**Normal**

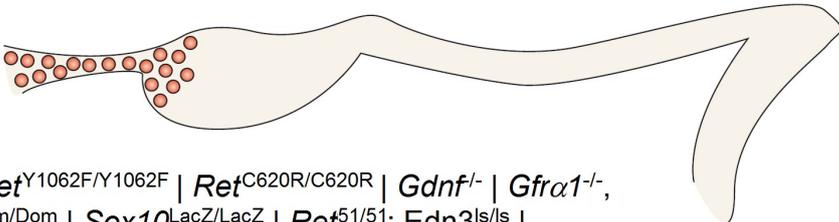
Wildtyp | *Ret*<sup>+/-</sup> | *Ret*<sup>9/9</sup> | *Ret*<sup>Y162/+</sup> | *Ednrb*<sup>s/s§</sup> | *Edn3*<sup>ls/+</sup>

**Hypo – ganglionose**

*Ret*<sup>C620R/+</sup> | *Gdnf*<sup>+/-</sup> | *Hlx1*<sup>-/-</sup>

**Aganglionose des Dickdarms**

*Ret*<sup>51/51</sup> | *Ret*<sup>S697A/S697A</sup> | *Ednrb*<sup>s-l/s-l</sup> | *Edn3*<sup>ls/ls</sup> | *Ece1*<sup>-/-</sup> |  
*Sox10*<sup>Dom/+</sup> | *Sox10*<sup>LacZ/+</sup> | *Ret*<sup>+/-</sup>; *Ednrb*<sup>s/s</sup> | *Ret*<sup>51/+</sup>; *Edn3*<sup>ls/ls\*</sup> |  
*Sall4*<sup>-/-</sup> |  $\beta$ 1-integrin<sup>-/-†</sup>

**Komplette intestinale Aganglionose**

*Ret*<sup>-/-</sup> | *Ret*<sup>Y1062F/Y1062F</sup> | *Ret*<sup>C620R/C620R</sup> | *Gdnf*<sup>-/-</sup> | *Gfra1*<sup>-/-</sup>,  
*Sox10*<sup>Dom/Dom</sup> | *Sox10*<sup>LacZ/LacZ</sup> | *Ret*<sup>51/51</sup>; *Edn3*<sup>ls/ls</sup> |  
*Sox10*<sup>Dom/+</sup>; *Edn3*<sup>ls/ls‡</sup> | *Sox10*<sup>Dom/+</sup>; *Ednrb*<sup>s-l/s-l‡</sup> | *Phox2b*<sup>-/-</sup> | *Pax3*<sup>-/-</sup>

- Andere**
- Nrtn*<sup>-/-</sup> — Reduzierte Größe der Neurone und Dichte der AChE-Neuriten
  - Gfra2*<sup>-/-</sup> — Reduzierte Dichte der AChE-Neuriten
  - DCC*<sup>-/-</sup> — Submukosale Ganglien fehlen
  - Ihh*<sup>-/-</sup> — Teilweise intestinale Aganglionose
  - Shh*<sup>-/-</sup> — Ektopische Ganglien
  - NT3*<sup>-/-</sup> — Reduzierte Anzahl von myenterischen und submukosalen Ganglien
  - TrkC*<sup>-/-</sup> — Reduzierte Anzahl von myenterischen und submukosalen Ganglien
  - Spry2*<sup>-/-</sup> — Gesteigerte Anzahl von Neuronen im gesamten Darm

**Abb. 6:** ENS-Entwicklungsstörungen in Mausmodellen. Zusammenfassung der ENS-Phänotypen in verschiedenen mutierten Maus-Stämmen, die als Hirschsprung-Modelle verwendet werden. Die unterschiedlichen Diagramme zeigen den Grad der Aganglionose. Totale Aganglionose des Kolons bezeichnet entweder eine komplette oder eine distale Aganglionose des Kolons. Angepasst nach Heanue et al. [43].

## **1.2 Stammzelltypen - Möglichkeiten zur Behandlung von ENS - Erkrankungen**

Stammzellen stellen bei vielen vorkommenden degenerativen Erkrankungen oder Entwicklungsstörungen eine mögliche Alternative zu herkömmlichen Therapien dar. Als Stammzellen werden Zellen bezeichnet, die die Fähigkeiten besitzen, sich selbst zu erneuern, also durch Zellteilung eine neue Stammzelle zu bilden, und sich in verschiedene Zelltypen zu differenzieren. Eine Einstufung von Stammzellen findet aufgrund der unterschiedlichen Differenzierungsfähigkeit in totipotente, pluripotente und multipotente Stammzellen statt.

Die Nachfolger von multipotenten Stammzellen werden als Progenitorzellen oder Vorläuferzellen bezeichnet. Sie werden auch determinierte Stammzellen genannt, da sie, obwohl sie dieselben Reproduktionseigenschaften von Stammzellen besitzen, doch bereits auf einen bestimmten Funktionsbereich determiniert sind. Diese Determinierung ist jedoch reversibel.

Im Folgenden soll auf verschiedene Stammzelltypen eingegangen und ihr mögliches Potential für die Therapie von ENS-Erkrankungen dargelegt werden.

### **1.2.1 Adulte Stammzellen**

Adulte Stammzellen sind Stammzellen, die sich noch nach der Geburt im menschlichen Körper befinden. Sie sind multipotent, können sich also zu verschiedenen Zelltypen innerhalb eines Gewebetyps differenzieren. Im Vergleich zu pluripotenten Stammzellen haben adulte Stammzellen jedoch ein eingeschränktes Entwicklungspotential. Außerdem haben sie im Vergleich zu embryonalen Stammzellen eine verringerte Proliferationsrate.

Postnatale Stamm- und Vorläuferzellen sind in fast allen Organen zu finden. Dabei können Sie sich meist nur zu Zellen eines bestimmten Organs differenzieren. So findet man z. B. hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark und in der Leber. Sie können sich zu allen Zellen des Blutes wie Erythrozyten, Neutrophile, Basophile, Eosinophile, Blutplättchen, Mastzellen, Monozyten, Gewebsmakrophagen, Osteoklasten und T- und B-Lymphozyten differenzieren [92]. Im ZNS wurden adulte neuronale Stammzellen in mehreren Regionen wie der Subventrikularzone (SVZ), dem Hippocampus und dem Rückenmark identifiziert [93].

Auch im Magen-Darm-Trakt konnten bereits verschiedene adulte Stammzelltypen identifiziert und isoliert werden. Ein Gewebe, bei dem Stammzellen eine wichtige Rolle spielen, ist das Darmepithel. Es befindet sich in einer ständigen Erneuerung; innerhalb eines Zeitraumes von etwa fünf Tagen werden alle Zellen des Epithelgewebes durch neu gebildete ersetzt [94]. An dieser fortlaufenden Erneuerung und an der Antwort auf Verletzungen des Epithelgewebes sind Stammzellen beteiligt, die in der basalen Basis der Lieberhahn-Krypten sitzen, sogenannte CBC-Zellen („crypt base columnar“) [95]. CBC-Stammzellen können sich zu TA-Vorläuferzellen („transient amplifying“) determinieren, die dann etwas weiter oberhalb des Kryptenbodens in die +4-Position migrieren. Determinierte TA-Zellen besitzen das Potential, sich in die vier wichtigen Zelltypen der Darmschleimhaut, Paneth-Zellen, enteroendokrine Zellen, Becherzellen und Enterozyten, zu differenzieren [96]. Eine Identifizierung der Stammzellen kann durch den Marker LGR5 (Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor) erfolgen, der Teil des Wnt- $\beta$ -Catenin-Signalweges ist [97].

Das zweite Gewebe im Magen-Darm-Trakt, in dem man Stammzellen identifizieren konnte, ist das enterische Nervensystem. Stamm- und Progenitorzellen des ENS wurden 2003 erstmals resektiert und kultiviert [98]. Dazu wurde embryonalen Mäusen der gesamte Darm entnommen, das komplette Gewebe enzymatisch verdaut, und die vereinzelt Zellen in Zellkultur gebracht. Es bildeten sich sogenannte neurosphärenartige Gebilde (engl. „neurosphere-like bodies“), die als „Enterosphären“ bezeichnet werden [98]. Eine ähnliche Vorgehensweise wurde mit postnatalen Mäusen (P2 bis P14) durchgeführt. Hierbei wurde jedoch nicht der gesamte Darm dissoziiert, um die Stammzellen zu gewinnen, sondern es wurden die äußeren Muskelschichten mit innliegendem Plexus Myentericus chirurgisch resektiert und anschließend die Stammzellen durch enzymatische Dissoziation aus dem Gewebeverbund heraus gelöst [98]. Kurze Zeit nach der Isolation der Stammzellen aus murinem Darm wurden auch aus humanem Darm ENS-Stammzellen gewonnen. Aus Resektionsgewebe von Föten und bis zu fünf Jahre alten Kindern konnten ENS-Stammzellen extrahiert und für bis zu 72 Stunden *in vitro* unter Proliferationsbedingungen kultiviert werden. Schwieriger war jedoch die Kultivierung von ENS-Stammzellen aus Darmmaterial adulter Patienten. Sie gelang im Jahre 2009, indem man der Zellkultur Kulturmedium muriner ENS-Vorläuferzellen hinzufügte [99].

Immunhistochemische Untersuchungen der murinen und humanen Enterosphären zeigen, dass sie nur zum Teil aus ENS-Progenitorzellen bestehen und daneben

auch andere Zelltypen wie Fibroblasten und glatte Muskelzellen enthalten. Die ENS-Progenitorzellen exprimieren dabei Marker wie P75, Ret, Sox2 und SOX10 und können über diese identifiziert bzw. aufgereinigt werden [43, 100].

Einen ersten Schritt in die Richtung einer möglichen Therapie der neurodegenerativen Erkrankungen stellten Implantationsexperimente in Darmexplantate dar. Dabei wanderten *in vitro* implantierte ENS-Vorläuferzellen in die Explantate ein und differenzierten sich dort zu Neuronen und Gliazellen [101]. Nach der Implantation in aganglionäre murine Darmexplantate bildeten sich funktionale Synapsen, durch die sich die typische hohe Kontraktionsrate der aganglionären Darmexplantate der niedrigeren Kontraktionsrate von normalem ganglionären Darm annäherte [102]. Diese Ergebnisse lassen hoffen, dass mit Hilfe der adulten Stammzellen des ENS in Zukunft eine stammzellbasierte Therapie für neuronale degenerative Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes gefunden werden kann [103].

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit für Stammzellen aus dem ENS stellt die Therapie von Erkrankungen des zentralen Nervensystems dar. ENS-Stammzellen könnten hierbei als körpereigener Zellpool dienen, aus dem sich Zellen mit wenigen Komplikationen extrahieren und vermehren lassen. Bereits durchgeführte Versuche befassten sich mit der Implantation von ENS-Vorläuferzellen in das murine Gehirn [104]. Die implantierten Zellen fügten sich dabei in das Zielgewebe ein und proliferierten und differenzierten im Gehirn zu neuronalen und glialen Zelltypen.

### 1.2.2 Induzierte pluripotente Stammzellen (iPS)

Bei induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) handelt es sich um ehemals nicht pluripotente Zellen, die durch künstliche Reprogrammierung ihre pluripotenten Eigenschaften wiedererlangt haben [105]. Im Jahr 2006 gelang es dem japanischen Team um Yamanaka erstmals, aus somatischen multipotenten Stammzellen pluripotente Stammzellen durch retrovirale Transfektion der Gene Oct3/4, Sox2, c-Myc und Klf4 in Fibroblasten der Maus herzustellen [105]. Die Zellen zeigten nach der Behandlung typische Merkmale wie z. B. das Wachstumsverhalten und die Morphologie von ES-Zellen. Außerdem exprimierten sie die für ES-Zellen typischen Zellmarker. Sie wurden, da die pluripotenten ES-Eigenschaften durch Wachstumsfaktoren induziert wurden, als induzierte pluripotente Zellen (iPS) bezeichnet. Leider zeigten Versuche, dass, obwohl die ersten iPS-Zellen typische ES-Eigenschaften aufwiesen, es nicht möglich war, mit ihnen durch Injektion in eine murine Blastocyste eine Maus-Chimäre zu bilden. Der entscheidende Durchbruch gelang durch eine Op-

timierung der Zellselektion, indem der für die Zellselektion verwendete Marker Fbx15 durch den Marker Nanog ersetzt wurde [106].

Eine Übertragung der Untersuchungsergebnisse vom Tiermodell auf den Menschen erfolgte 2007 in verschiedenen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander [107-109]. Thomson et al. erreichten dabei eine Reprogrammierung menschlicher somatischer Zellen mit Hilfe der bereits zuvor verwendeten Faktoren OCT4, SOX2 und NANOG, allerdings wurde bei diesem Experiment noch der Faktor LIN28 transfiziert [109].

Für zukünftige Stammzelltherapien stellen iPS-Zellen eine sehr vielversprechende Ressource dar. Ihr klarer Vorteil gegenüber embryonalen Stammzellen liegt darin, dass sie aus dem eigenen Körper des Patienten entnommen und *in vitro* expandiert werden können. Dies verringert die Möglichkeit einer Abstoßungsreaktion nach der Implantation der Zellen. In den bis jetzt durchgeführten Versuchen traten jedoch Probleme auf, die vor dem Einsatz als Zellressource für humane Anwendungen erst einmal gelöst werden müssen. So zeigen Zellen, die durch Transfektion mit den verschiedenen Faktoren ausgestattet worden sind, durch Veränderung des Erbgutes oftmals teratogene Eigenschaften. Besonders KLF4 und c-Myc sind dabei als Onkogene bekannt. 20% der Maus-Chimären aus iPS-Zellen, die mit c-Myc generiert worden sind, entwickelten innerhalb von 10 Monaten Teratome [106]. Eine Gewinnung von iPS-Zellen ohne c-Myc ist möglich, allerdings wird dabei die Effektivität der iPS-Generierung ca. um den Faktor 100 verringert [110]. Die schlechte Ausbeute bei der Generierung von iPS-Zellen stellt auch allgemein bei der möglichen Anwendung in Therapien ein Problem dar, da sie sich normalerweise im niedrigen Prozent- oder sogar Promillebereich bewegt und es dadurch sehr schwierig ist, eine Zellkultur mit ausreichend Zellmaterial anzulegen. Durch die geringe Zellanzahl ist es auch schwieriger, eine 100% reine iPS-Zellkultur zu kultivieren, die für therapeutische Anwendung benötigt wird. Weitere Untersuchungen sind außerdem nötig, um die Differenzierungsfähigkeit unterschiedlicher iPS-Zellen zu analysieren: Versuche mit humanen embryonalen Stammzelllinien hatten in der Vergangenheit bereits gezeigt, dass verschiedene Stammzelllinien unterschiedliche Potentiale aufweisen, sich zu finalen Zellen zu differenzieren [111]. Für iPS-Zellen wurden solche Versuche bis jetzt nicht durchgeführt. Für die Anwendung am Menschen ist jedoch eine vollständige Differenzierung der implantierten Zellen essentiell.

Überhaupt wurden Studien, die das Ziel einer Anwendung von iPS-Zellen im ENS haben, bis jetzt nur sehr spärlich durchgeführt. 2010 gelang es z. B., aus iPS-Zellen ein darmähnliches Organ zu züchten („iGut“), das aus 3 Zellschichten (Epithel, Bindege-

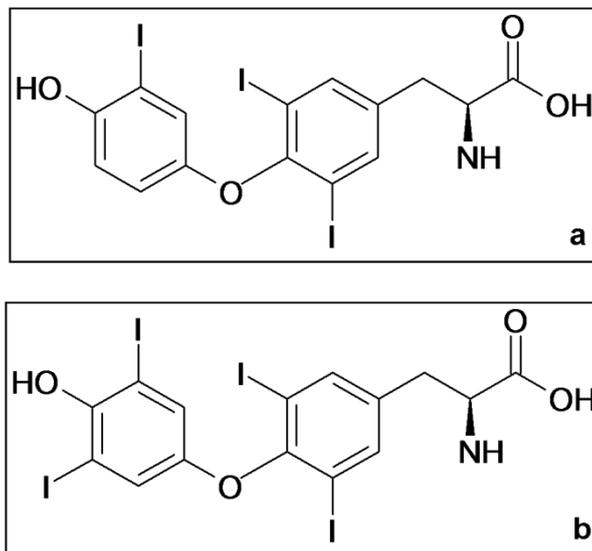
webe, Muskulatur) mit eingeschlossenen neuronalen Netzwerken und ganglionären Strukturen besteht, die um ein Lumen angeordnet sind [112]. Durch immunhistochemische Färbungen konnten Epithelzellen, glatte Muskelzellen, Schrittmacherzellen (Cajal-Zellen) und enterische Neurone identifiziert werden. Nach 14 Tagen zeigte das künstliche Organ gesteuerte Kontraktionen ähnlich denen eines normalen Darms.

## 1.3 Schilddrüsenhormone

### 1.3.1 Synthese, Transport, Wirkung

In der Schilddrüse werden das Hormon Calcitonin und die „klassischen Schilddrüsenhormone“ T3 (Trijodthyronin) und T4 (Thyroxin) gebildet.

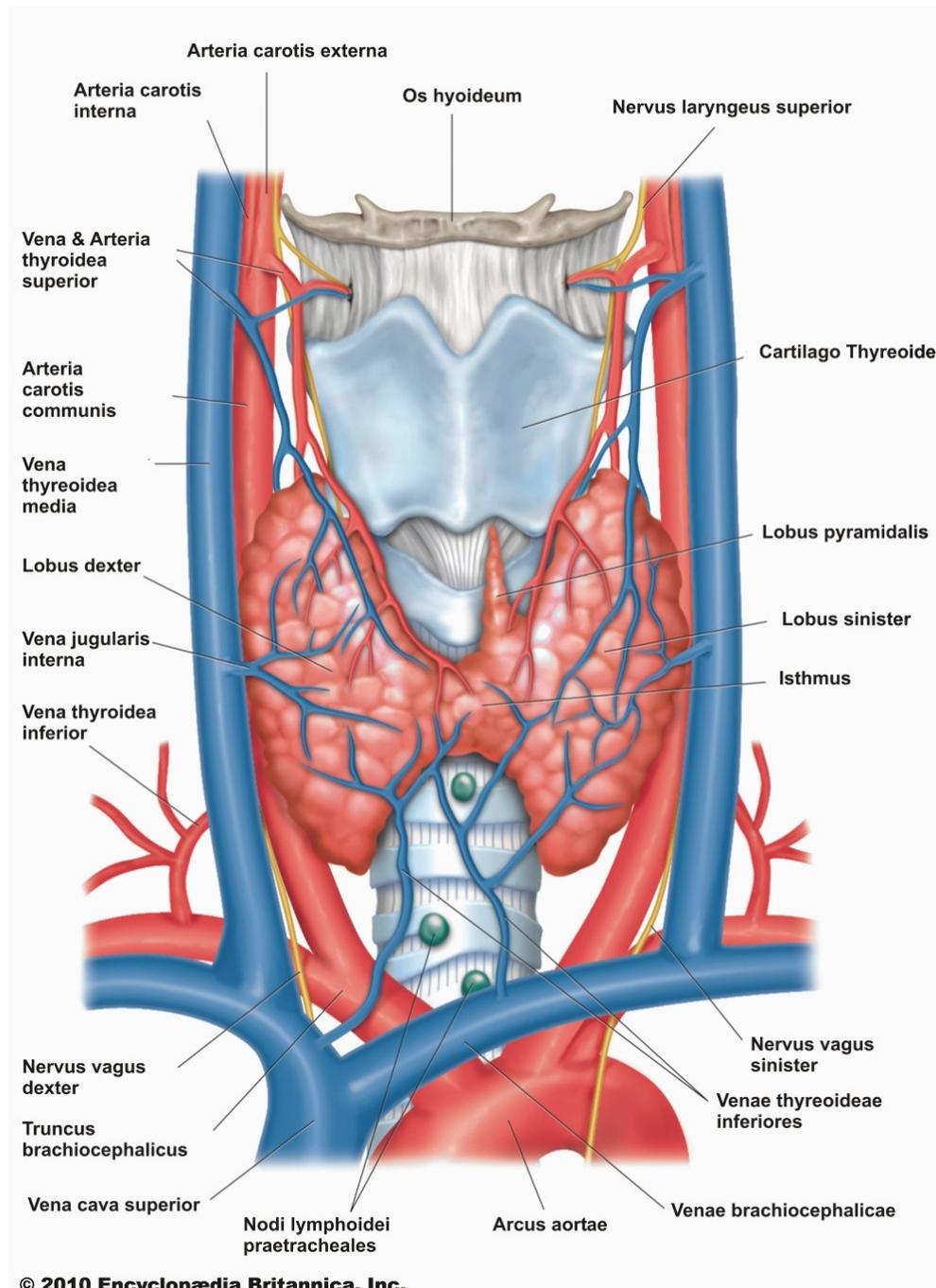
Während Calcitonin zusammen mit seinem Gegenspieler, dem in den Nebenschilddrüsen gebildeten Parathormon, den Calcium- und Phosphathaushalt reguliert, spielen Trijodthyronin und Thyroxin eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Metabolismus und bei der embryonalen und postnatalen Entwicklung. T3 und T4 bestehen aus der Aminosäure Thyronin, die an ihren 4 Ringen im Falle von Thyroxin an 4 Positionen und im Falle von Trijodthyronin an 3 Positionen jodiert ist (**Abb. 7**).



**Abb. 7:** Strukturformeln von Trijodthyronin (a) und Thyroxin (b)

Die Synthese der Schilddrüsenhormone findet in den Follikelepithelzellen der Schilddrüse statt [113, 114]. Die Schilddrüse (Glandula thyroidea) ist ein schmetterlingsförmiges Organ. Sie besteht aus einem Hauptkörper (Isthmus), der vor der Luftröhre

knapp unterhalb des Kehlkopfes liegt, und zwei Lappen, die sich links (Lobus sinister) und rechts (Lobus dexter) der Luftröhre befinden (**Abb. 8**).



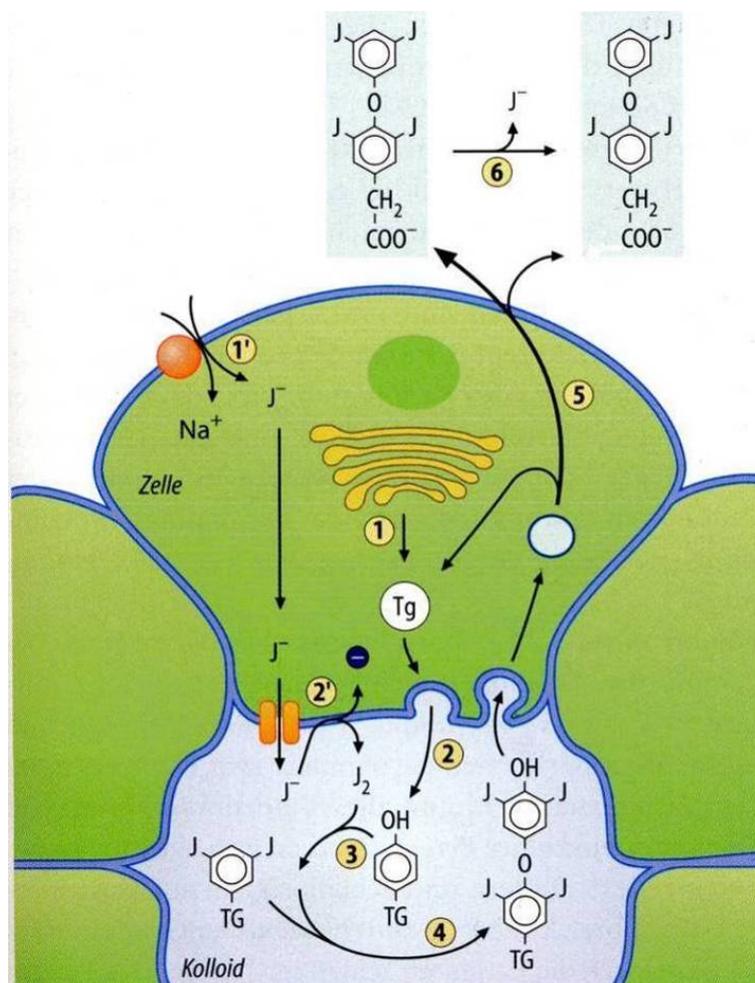
**Abb. 8:** Topografie der Schilddrüse (Angepasst nach Encyclopædia Britannica (www.britannica.com))

Unter dem Mikroskop kann man die kleinen Drüsenläppchen (Lobuli) erkennen. Das Innere dieser Lobuli besteht aus vielen bis zu 0,5 mm großen Bläschen (Follikel), die mit Follikelepithelzellen (Thyreozyten) ausgekleidet sind. In diesen Follikelepithelzel-

len wird Trijodthyronin und Thyroxin gebildet. Zwischen den Follikelepithelzellen liegen die sogenannten C-Zellen, in denen das Hormon Calcitonin synthetisiert wird.

Im Inneren der Follikel befindet sich das Kolloid, das das Vorstufenprotein für die Schilddrüsenhormone, das Thyreoglobulin, enthält [114].

Das für die Synthese von Trijodthyronin und Thyroxin benötigte Jod wird in Form von Jodid-Ionen im Dünndarm resorbiert, mit dem Blut zu den Follikelepithelzellen transportiert und dort auf das bis zu 20-50 fache angereichert. Der tägliche Bedarf an Jod liegt laut WHO zwischen 150 und 200  $\mu\text{g}$ . Der Ablauf der Schilddrüsenhormonsynthese ist im Folgenden nach Schmidt et al. [114] anhand **Abb. 9** erklärt.



**Abb. 9:** Schilddrüsenhormonsynthese[114]

Die Aufnahme des Jods in die Follikelepithelzellen erfolgt basolateral mit Hilfe eines Natrium-Jodid Symporters (NIS; 1'). Durch einen Chlorid-Jodid-Transporter (Pendrin; 2') gelangt das Jodid durch die apikale Membran in das Follikellumen. In den Zellen wird das Jodid mit Hilfe des Enzyms Thyreoperoxidase und  $\text{H}_2\text{O}_2$  (synthe-

tisiert durch die Thyrooxidase) oxidiert und an Tyrosinreste des zuvor synthetisierten Proteins Thyreoglobulin (TG; 2, 3) angelagert. Hierbei entstehen Monojod- und Dijodtyrosinreste, die sich unter Alanin-Abspaltung zu T3 (ein Mono- und ein Dijodtyrosinrest) oder T4 (zwei Dijodtyrosinreste) verbinden (4).

Die Schilddrüse produziert zum größten Teil T4 und nur wenig T3. Die Hormone werden nach ihrer Bildung an Thyreoglobulin gebunden in den Schilddrüsenfollikeln (Kolloid) gespeichert.

Um Schilddrüsenhormone in den Blutkreislauf ausschütten zu können, müssen sie aus dem Kolloid erst pinocytotisch von den umliegenden Schilddrüsenzellen aufgenommen werden. Dort wird das jodierte Thyreoglobulin dann proteolytisch gespalten, und anschließend werden die fertigen Hormone ins Blut abgegeben (5).

Im Blut sind Schilddrüsenhormone aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften zum allergrößten Teil (über 99%) an Transportproteine gekoppelt. Ungebunden kommt Trijodthyronin als freies T3 (ftT3) nur zu 0,3% vor, und L-Thyroxin findet man in freier ungebundener Form (fT4) sogar nur zu einem noch zehnfach geringeren Anteil von 0,03% [115]. Das wichtigste Transportprotein mit der höchsten Affinität für T3 und T4 ist das Thyroxin-bindende Globulin (TBG). Ca. 75% des T4 im Blut sind an TBG gebunden. Daneben gibt es als weitere Transportproteine noch Transthyretin (TTR), auch Thyroxin-bindendes Präalbumin (TBPA) genannt, an das 20% Thyroxin gebunden sind und Albumin (TBA) mit 5% gebundenen Thyroxin [116]. Die Bindung von Schilddrüsenhormonen an Transportproteine hat eine Erhöhung der Halbwertszeit zur Folge [116].

Eine Aufnahme der Schilddrüsenhormone in Zielzellen muss durch aktiven Transport, z. B. durch Organische-Anionen-Transport-Polypeptide (OATPs) oder Monocarboxylat-Transporter (MCTs) erfolgen, da die Schilddrüsenhormone als Aminosäureabkömmlinge aufgrund ihrer Ladung nicht durch die Zellmembran diffundieren können [117]. Ein essentieller aktiver Transport der Hormone in die Zielzelle bietet gleichzeitig auch noch eine weitere Möglichkeit der Steuerung des Hormonlevels in den Zellen und auch im Blut. Im Cytosol wird Thyroxin, das eine 3-8 fach geringere Wirkung bei Rezeptorbindung als T3 erzielt, durch Dejodasen in Trijodthyronin umgewandelt [118]. Die Wirkung in der Zelle wird hauptsächlich durch die Koppelung an membrangebundene Schilddrüsenhormonrezeptoren, die durch Splicing der Transkripte von zwei Genen, *c-erbA- $\alpha$*  und *c-erbA- $\beta$* , gebildet werden, entfaltet [119]. Es sind drei Rezeptortypen bekannt, die Schilddrüsenhormone binden

können (Tr $\alpha$ 1, Tr $\beta$ 1 und Tr $\beta$ 2); alle wurden bereits ausgiebig erforscht [6, 120-122]. Williams et. al haben außerdem 2000 in der Ratte eine dritte Splice-Variante des Tr $\beta$ -Gens entdeckt, die allerdings noch weit weniger gut erforscht ist [119, 123].

Lokalisiert sind die Schilddrüsenhormonrezeptoren an den Membranen der Zellkerne und der Mitochondrien. Die Wirkung der Schilddrüsenhormone ist umso stärker, je mehr Schilddrüsenhormonrezeptoren exprimiert sind. Durch Studien, die zum großen Teil in Schilddrüsenhormon-Knockoutmäusen durchgeführt wurden, konnten verschiedene Funktionen der einzelnen Rezeptoren entschlüsselt werden. Dabei ist das Auftreten der einzelnen Typen abhängig von Wirkort, Zelltyp und auch dem Zeitpunkt in der Entwicklung. So werden Tr $\alpha$ 1-Rezeptoren vor allem in der Embryonalentwicklung des ZNS exprimiert, während Tr $\beta$ -Rezeptoren eher in späteren Phasen gebildet werden [124]. Neben der Expression im ZNS findet man Tr $\alpha$ 1 auch noch in geringerer Anzahl in der Niere, dem Skelettmuskel, der Lunge, dem Herz und der Leber [119]. Tr $\beta$ 1 wird vor allem in den Nieren, in Leber, Gehirn, Herz und Schilddrüse und in geringerem Maße auch im Skelettmuskel, der Lunge und in der Milz, jedoch nicht in den Hoden exprimiert [119, 125, 126]. Tr $\beta$ 2 findet man nur in Gehirn, in der Retina, im Innenohr, in der Lunge und im Herz [119, 126, 127].

Schilddrüsenhormonrezeptoren besitzen sowohl eine Bindungsstelle für das Hormon als auch eine DNA-Bindungsstelle, an die kurze DNA-Sequenzen, die Hormonrezeptorregulationselemente, binden können [123, 128]. Diese Regulationselemente, im Falle der Schilddrüsenhormone als TREs (engl. „thyroid hormone response element“) bezeichnet, befinden sich im Promoterbereich verschiedener Gene. Eine Aktivierung der TRE, und damit die Transkription der im nachfolgenden DNA-Abschnitt liegenden Gene, erfolgt durch Bindung von Heterodimeren, die aus T3 und einem Hilfsprotein, z. B. dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) bestehen, wobei die Bindung von T3 an den Rezeptor für die Aktivierung der TRE erforderlich ist [129]. Alternativ kann ein Rezeptor-Homodimer durch T3-Bindung von einem inaktiven TRE freigesetzt werden, wobei das TRE aktiviert und die Transkription in Gang gesetzt wird [129].

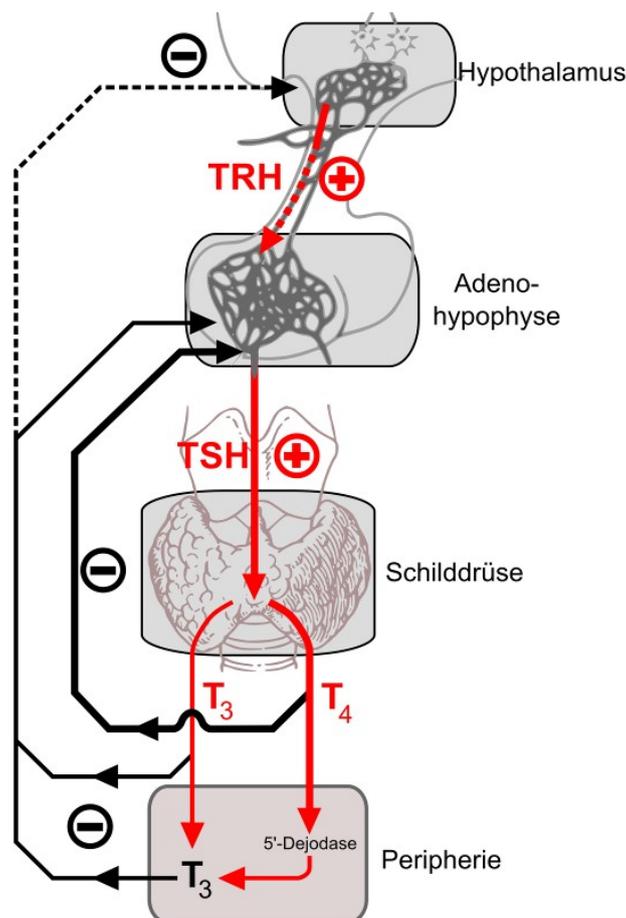
Der Einfluss von Schilddrüsenhormonen durch die Transkriptionssteuerung im Menschen ist enorm. Bereits im Mutterleib ist während der Schwangerschaft eine ausreichende Versorgung mit Schilddrüsenhormonen durch die Plazenta essentiell für eine gesunde Entwicklung des Fötus. Eine Hypothyreose kann die neuronale Entwicklung negativ beeinflussen. Viele Vorgänge wie Migration, Proliferation, Differenzierung der

neuronalen Zellen, sowie Synaptogenese, Axon- und Dendritenwachstum und Myelinisierungen sind betroffen [130]. Es kann zu mentaler oder motorischer Retardierung kommen [131]. Liegt postpartum weiterhin eine Hypothyreose vor, so werden die Effekte noch verstärkt. Neben neuronalen Effekten tritt noch Zwergwuchs auf [132].

Im erwachsenen Menschen beeinflussen Schilddrüsenhormone den Stoffwechsel. Sauerstoffaufnahme, Fettstoffwechsel, Körperwärme, Aktivität von Nerven, Muskel und Kreislauf [132, 133]. Außerdem können abnormale Schilddrüsenhormonlevel eine Infertilität bewirken [134]. Zusammengefasst kann man sagen, dass wahrscheinlich nahezu jede einzelne Zelle im Organismus auf Schilddrüsenhormone reagiert.

### 1.3.2 Regulation der Schilddrüsenhormonexpression

Die Konzentration der Schilddrüsenhormone im Blutplasma wird vom „Thyreotropen Regelkreis“ reguliert, einem Regelkreis zwischen Schilddrüse und Hypothalamus [135]. Der schematische Ablauf ist in **Abb. 10** dargestellt:



**Abb. 10:** Regelkreis der Schilddrüsenhormone [136]

Vom Hypothalamus wird das Thyreotropin-releasing hormone (TRH) ausgeschüttet, das die Hypophyse dazu anregt, Thyreotropin (thyroid stimulating hormone, TSH) auszuschütten. TSH wiederum regt die Produktion von Thyroxin und Trijodthyronin in der Schilddrüse an und sorgt für deren Freigabe in den Blutkreislauf. Umgekehrt regulieren Schilddrüsenhormone in einer negativen Feedback-Regulierung die Ausschüttung von TSH. Eine Hemmung der TSH-Sekretion kann außerdem durch das Peptidhormon Somatostatin erfolgen. Der Thyreotrope Regelkreis stellt durch seine Feedback-Regulation normalerweise einen konstanten Schilddrüsenhormonspiegel im Blut sicher.

Eine Herabsetzung der Hormonproduktion (Hypothyreose) kann mehrere Ursachen haben. So kann z. B. zu wenig Jod mit der Nahrung aufgenommen werden bzw. die Aufnahme des Jods in die Schilddrüse ist durch Defekt oder Hemmung der Carrier vermindert [1, 137, 138]. Außerdem können verschiedene Mutationen oder Hemmungen an Hormonen der Synthesewege, wie z. B. Hemmung der Peroxidase durch Thiouracil oder Jodüberschuss [139, 140], Defekte im Jodeinbau oder in der Kopplung zweier Thyrosinreste oder eine Unfähigkeit, T3 oder T4 aus Thyreoglobulin freizusetzen, ursächlich sein [141].

Der wahrscheinlichste Grund für eine gesteigerte Produktion von Schilddrüsenhormonen (Hyperthyreose) ist die Autoimmunerkrankung Morbus Basedow (engl. „Graves‘ Disease“). Zur verstärkten Ausschüttung von T3/T4 kommt es dadurch, dass Proteine wie das TSI (*Thyroidea-stimulierendes Immunglobulin*) gebildet werden, das in die TSH-Rezeptoren passt und diese aktiviert [142]. Weitere mögliche Auslöser für eine Hyperthyreose sind Entzündungen (Thyreoiditis), eine gesteigerte Ausschüttung von TSH und eine zu hohe Zufuhr von Schilddrüsenhormonen [143].

### **1.3.3 Erforschung der Funktion von Schilddrüsenhormonen im Tiermodell**

Um die Auswirkungen von Schilddrüsenhormonen auf die Entwicklung des Organismus und den Einfluss auf den Metabolismus *in vivo* untersuchen zu können, wurden mehrere Tiermodelle etabliert, bei denen 3 unterschiedliche Ansätze verfolgt wurden: Die Produktion der Schilddrüsenhormone sollte verhindert werden (operativ bei adulten Tieren z. B. auch durch das Entfernen der Schilddrüse – einer sogenannten Thyreoidektomie – erreichbar) [144], der Transport der Schilddrüsenhormone zu den Rezeptoren sollte unterbrochen werden [145], oder die Expression der verschiedenen Schilddrüsenhormonrezeptoren sollte durch Genmanipulation ausgeschaltet werden [146].

Zu Schwierigkeiten kann es bei der Interpretation der Auswirkungen der verschiedenen Methoden auf den lebenden Organismus kommen, da Schilddrüsenhormone ubiquitär im ganzen Körper in unterschiedlichsten Geweben wirken und man daher oft nicht genau feststellen kann, ob ein im Tiermodell festgestellter Effekt durch direkten Einfluss auf die zu untersuchenden Zellen oder das Gewebe oder durch sekundäre Einflüsse, die in einem anderen Gewebe aufgetreten sind, hervorgerufen wird. Erhaltene Daten sollten daher idealerweise durch zusätzliche Experimente gestützt werden.

Im Folgenden soll ein Überblick über die möglichen Ansätze zur Erforschung der Schilddrüsenhormonfunktionen im Tiermodell gegeben werden:

### **Deaktivierung der Hormonsynthese**

Eine Unterdrückung der Schilddrüsenhormonproduktion erfolgt in *PAX8*-Knockoutmäusen. *PAX8* („Paired-Box-Protein 8“) ist ein Protein, das für die Bildung der Follikelzellen der Schilddrüse, in denen T3 produziert wird, essentiell ist. Heterozygote *PAX8*<sup>+/-</sup>-Mäuse sind nahezu unauffällig im Vergleich zum Wildtyp, während in homozygoten *PAX8*<sup>-/-</sup>-Mäusen die Follikelzellen der Schilddrüse komplett fehlen, so dass sich die Schilddrüse nur aus Calcitonin-bildenden parafollikulären C-Zellen zusammensetzt [147]. Bereits kurze Zeit nach der Geburt zeigen *PAX8*<sup>-/-</sup>-Mäuse ein vermindertes Wachstum, und nach Ende des Säugens sterben sie [147]. Andere Gewebe, in denen *PAX8* exprimiert wird, wie z.B. das Rückenmark, das Rhombencephalon und das Mesencephalon zeigen in *PAX8*<sup>-/-</sup>-Mäusen keine Auffälligkeiten gegenüber dem Wildtyp. Das fehlende *PAX8* wird vermutlich zumindest teilweise von anderen *PAX*-Typen (z. B. *PAX6*) ersetzt [147].

Ein ähnliches Ergebnis–die Unterdrückung der Bildung von T3 und T4–ist auch chemisch durch die Supplementierung der Nahrung mit Substanzen möglich, die auf Thioharnstoff aufbauen. Zur Anwendung kommen Propylthiouracil (PTU; 6-*n*-Propyl-2-thiouracil), Methimazol (MMI, 1-Methyl-2-mercaptoimidazol), Carbimazol (CBZ) und 6-Methyl-Thiouracil (MTU) [148]. Die Wirkung beruht auf der Hemmung der Jodisation an der Thyreoperoxidase, die Jodid zu Jod reduziert. Aufgrund des dadurch fehlenden Jods kann kein T3 und T4 mehr synthetisiert werden.

### **Deaktivierung des Hormontransports in die Zielzelle**

Einen anderen Ansatz für eine Untersuchung der Schilddrüsenhormonfunktionen bieten Knockoutmäuse, bei denen der MCT8-Transporter ausgeschaltet wird. Dieser

Transporter sorgt für einen aktiven Transport des Schilddrüsenhormons in das Zelllumen. Da das *MCT8*-Gen (*SLC16A2*) auf dem X-Chromosom liegt (Lokus Xq13), können männliche *MCT8*-KO-Mäuse durch hemizygoten Knockout des Gens (*MCT8*<sup>-y</sup>) gezüchtet werden [149]. Mutationen in *SLC16A2* konnten 2003 als Auslöser des Allan–Herndon–Dudley-Syndroms identifiziert werden [150]. Männer sind aufgrund der Lokation des Gens von dieser Erkrankung weit häufiger betroffen als Frauen, da bei diesen nur Mutationen im *MCT8*-Gen auf beiden X-Chromosomen zum Ausbruch führen. Die Patienten zeigen, ebenso wie solche, die an Kretinismus leiden, Anzeichen einer starken geistigen Retardierung [151]. Die Krankheit geht allerdings darüber hinaus noch mit einer Muskelunterentwicklung und Hypertonie einher [151]. Man geht davon aus, dass die zusätzlichen Symptome der Muskeldystrophien von toxischen Reaktionen durch einen zu hohen T3-Spiegel ausgelöst werden, da T3 nicht in die Zielzellen transportiert werden kann und sich daher in hoher Konzentration im Blut anreichert. Zusätzlich ist auch der TSH-Spiegel erhöht. Der T4-Spiegel ist jedoch niedriger als beim WT [151].

Nicht ganz klar sind bis heute die Regulierungsmechanismen, die zu diesen anormalen Hormonleveln führen. Studien deuten mittlerweile darauf hin, dass *MCT8* nicht nur am Transport der Schilddrüsenhormone in die Zielzelle sondern zumindest auch teilweise der an Sezernierung der Schilddrüsenhormone aus der Schilddrüse ins Blut beteiligt ist [151].

### Deaktivierung der Rezeptorsynthese

Viele Erkenntnisse über Schilddrüsenhormone wie z.B. ihre Auswirkungen auf die Entwicklung von Organen und den Metabolismus konnten durch Versuche mit murinen Rezeptorknockoutmodellen gewonnen werden. Dabei wurde in den vergangenen Jahren eine Vielzahl unterschiedlicher Modelle etabliert [146, 152]. Es zeigten sich große Unterschiede im Phänotyp (Nervensystementwicklung, Organentwicklung, Knochenwachstum), dem Metabolismus, der Fertilität und der Lebenserwartung der Tiere zwischen den einzelnen Modellen, je nachdem, welcher Rezeptortyp ausgeschaltet wurde bzw. wenn mehrere Rezeptoren ausgeschaltet wurden, in welcher Kombination dies geschah.

**Tabelle 1** zeigt einen Überblick über aktuelle Rezeptor-Knockoutmausmodelle und die jeweils festgestellten Einflüsse der genetischen Veränderung.

Genotyp	Phänotyp / Metabolismus	Lebenserwartung	Fertilität	Literatur
$\text{Tra}^{-/-} \text{Tr}\beta^{-/-}$	Hyperthyreose Verringertes Wachstum Verringerte Knochenentwicklung Darmentwicklung verzögert Vergrößerte Schilddrüse	Tod nach der Säugethiergephase	-	[146]
$\text{Tra}^{-/-} \text{Tr}\beta^{+/+}$	Hypothyreose Verringertes Wachstum Verringerte Knochenentwicklung Verringerte Dünndarmentwicklung Verkleinerte Schilddrüse	Tod 5 Wochen nach Geburt	-	[146, 153]
$\text{Tra1}^{-/-} \text{Tr}\beta^{+/+}$	Verringerter Herzschlag Verringerte Körpertemperatur	normal	fertil	[154]
$\text{Tra1}^{-/-} \text{Tr}\beta^{-/-}$	Leichte Hypothyreose Verringertes Wachstum Verringerte Knochenentwicklung Verringerter Herzschlag Verringerte Körpertemperatur Vergrößerte Schilddrüse RTH	lebensfähig, aber leicht verringert	verringert	[155]
$\text{Tra2}^{-/-} \text{Tr}\beta^{+/+}$	Leichte Hypothyreose Verringertes Wachstum Verringerte Knochenentwicklung  Erhöhter Herzschlag Erhöhte Körpertemperatur Überexpression von $\text{Tra1}^{-/-}$	normal	♂: fertil ♀: verringert	[156]
$\text{Tra}^{+/+} \text{Tr}\beta^{-/-}$	Überexpression T3, T4, TSH Normale Wachstumsrate Verringerte Gehörentwicklung Verringertes Knochenwachstum Resistance to thyroid hormone (RTH) Vergrößerte Schilddrüse	lebensfähig	fertil	[120, 157]
$\text{Tra}^{+/+} \text{Tr}\beta2^{-/-}$	Hyperthyreose RTH	normal	-	[158]

**Tabelle 1:** T3-Rezeptor-Knockout-Mausmodelle: Auswirkungen auf Phänotyp, Fertilität und Lebensfähigkeit; RTH: „Resistance to thyroid hormone“

## 1.4 Aufgabenstellung

Die Auswirkungen von Schilddrüsenhormonen auf die Entwicklung des ZNS waren bereits Gegenstand vieler Studien. Besonders während der Embryonalentwicklung kann ein zu niedriger Schilddrüsenhormonspiegel, ausgelöst durch Jod-Mangel oder eine Schilddrüsenunterfunktion, schwere Schädigungen des Embryos zur Folge haben [159-161].

Auswirkungen auf das periphere Nervensystem sind weit weniger gut erforscht. Es wurden meist die Expression von Schilddrüsenhormonrezeptoren oder die Regeneration von peripherem Nervengewebe, wie z. B. dem Ischias-Nerv erforscht [6, 162].

Das enterische Nervensystem nimmt wie bekannt im peripheren Nervensystem eine spezielle Position ein. Ob – und falls ja auf welche Weise – Schilddrüsenhormone auf das enterische Nervensystem einwirken, wurde bis jetzt noch nicht untersucht. Durch Hypothyreose hervorgerufene Obstipationen oder eine Veränderung der myoelektrischen Aktivität im Darm induzieren jedoch zumindest einen Einfluss [163].

Ziel des Promotionsprojektes war es, erstmals eine Untersuchung der Auswirkungen von Trijodthyronin auf Stamm- und Progenitorzellen des enterischen Nervensystems durchzuführen. Dazu wurden folgende Schritte geplant:

- 1.) Charakterisierung von ENS - Progenitorzellen mittels immunhistochemischer Methoden und einer Genexpressionsanalyse
- 2.) Nachweis der Schilddrüsenhormonrezeptoren in Vorläuferzellen und Geweben des enterischen Nervensystems
- 3.) Untersuchung der Wirkungen des Schilddrüsenhormons T3 auf Proliferation und Differenzierung von murinen Vorläuferzellen *in vitro*
- 4.) Untersuchung des Einflusses von Schilddrüsenhormonrezeptoren auf den Darm im murinen KO-Mausmodell
- 5.) Genexpressionsanalyse des T3-Einflusses auf mRNA-Expression von Vorläuferzellen des enterischen Nervensystems während des Eintritts in die Differenzierung.

## 2 MATERIAL & METHODEN

### 2.1 Zell- und Gewebematerial

#### **Murines Gewebematerial:**

Das Zell- und Gewebematerial, das für Zellkultur, Immunhistochemie, Nachweis der Rezeptoren, RNA-Chips und die qRT-PCR verwendet wurde, wurde aus neonatalen C57BL/6-Mäusen (Charles River, Sulzfeld) gewonnen.

Präparationen des gesamten Darms für die Whole mount-Immunhistochemie wurden mit neonatalen (P0)  $Tr\alpha 1^{-/-}$ - und  $Tr\beta^{-/-}$ -Knockout- und C57BL/6-Mäusen durchgeführt [154, 157].  $Tr\alpha 1^{-/-}$ - und  $Tr\beta^{-/-}$ -Mäuse wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Marlies Knipper aus der HNO-Klinik Tübingen bereitgestellt.

Die artgerechte Haltung der Tiere erfolgte unter konstanten, pathogenfreien Bedingungen bei  $23 \pm 2$  °C, Luftfeuchtigkeit von 57 % und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12 Stunden/12 Stunden.

Die Sakrifizierung der Tiere und die Entnahme der Organe erfolgten nach den Richtlinien der Tierschutzkommission der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Die entsprechenden Tierversuchsanträge wurden vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt.

#### **Humanes Gewebematerial:**

Die humanen Gewebeproben stammten von adulten Patienten der Urologie Tübingen und von Kindern, die in der Chirurgie der Kinderklinik Tübingen operiert wurden (Ethikantrag 168/2005).

Die adulten Patienten wurden zum größten Teil wegen eines Karzinoms oder einer Zystektomie behandelt. Das Gewebe juveniler Patienten der Kinderchirurgie wurde bei Operationen der Hirschsprung-Erkrankung, einer Atresie oder einer Anus praeter-Rückverlagerung entnommen.

Die Entnahme erfolgte nach den Richtlinien der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

## 2.2 Präparation von Geweben und Anlegen von Zellkulturen

### 2.2.1 Isolation von murinen Vorläuferzellen des ENS

Zur Herstellung von Zellkulturen muriner ENS-Vorläuferzellen wurden C57BL/6-Mäuse (E18 oder P0) verwendet. Die Präparation erfolgte mit Hilfe einer Stereolupe unter der Sterilbank. Wurden embryonale Mäuse präpariert, so wurde das Muttertier zuvor durch CO<sub>2</sub>-Begasung betäubt und danach durch Überstrecken des Genicks getötet. Nach Desinfektion des Abdomen mit 70 % (v/v) Ethanol, Entfernen der Epidermis mit Körperfell im Abdomenbereich und anschließender Laparotomie mit neuem sterilem Präparationsbesteck wurden die Embryonen entnommen.

Embryonen oder neonatale Mäuse wurden durch Dekapitation sakrifiziert, der Bauchraum wurde geöffnet und der gesamte Darm vom Duodenum bis zum Rektum wurde entnommen. Nach Überführung des Darms in eisgekühlte Hank's Balanced Salt Solution ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> mit Penicillin/Streptomycin wurden anschließend mit medizinischen Pinzetten und einer feinen Federstahl-Mikroschere anhängende Mesenterien und Blut- und Fettgewebe entfernt. Die beiden Darmmuskelschichten (Ring- und Längsmuskulatur mit innenliegendem Plexus myentericus) konnten anschließend mit zwei Pinzetten abgezogen werden. Nach nochmaliger Überprüfung auf mögliche zelluläre Verunreinigungen (Mesenterien, Blut, Fett, Mukosa) wurde der abgezogene Muskelschlauch mit zwei Skalpellern zerkleinert, um durch die kleineren Gewebestücke einen besseren enzymatischen Verdau zu ermöglichen. Der Verdau erfolgte für 30 min in 1 ml enzymatischer Dissoziationslösung (Collagenase-Dispase). Während dieser Zeit wurde das Zellmaterial in Abständen von 10 Minuten vorsichtig mit einer abgeflamten sterilen 1 ml - Pipettenspitze homogenisiert. Vor dem mechanischen Auflösen des Gewebes durch Trituieren wurde dem Verdaumedium zusätzlich noch 0,05 % (v/w) DNase I zugegeben, um ein Verklumpen der Zellen durch freigesetzte DNA zu verhindern.

Mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) wurde der Verdauvorgang schließlich abgestoppt. Die Verdauenzyme wurden durch zweimaliges Waschen (200 × g) der Zellen in je 10 ml Hank's Balanced Salt Solution ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> entfernt.

Zur Vereinzelung wurden die Zellen über ein 40 µm-Zellsieb (Becton Dickinson, Heidelberg) filtriert und danach die Zellkonzentration mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die erhaltene Zellsuspension wurde für die weiteren Experimente verwendet.

### 2.2.2 Präparation von humanem Darmgewebe

Humangewebe aus adulten Patienten wurde ausschließlich zum Nachweis der Thyroidhormonrezeptoren verwendet. Der Transport aus dem OP-Saal der Kinderchirurgie in die Anatomie erfolgte in eisgekühlter Hank's Balanced Salt Solution ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  inkl. 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin und 1 % (v/v) Metronidazol. Die Präparation wurde unter der Sterilbank durchgeführt. Die Ring- und die Längsmuskulatur mit innenliegendem Plexus myentericus wurden freigelegt, indem die Mucosa und die Serosa vom Gewebe abgezogen und die Muskelschichten von den restlichen Fett-, Mucosa- und Serosaresten gereinigt wurden. Anschließend wurden die Muskelschichten mit 2 Skalpelln in kleine Stücke geschnitten, um den Verdau des Gewebes zu beschleunigen.

Der Verdau erfolgte für 60 Minuten in 10-20 ml enzymatischer Dissoziationslösung (Collagenase-Dispase). Während dieser Zeit wurde das Zellmaterial alle 15 Minuten vorsichtig mit einer abgeflamnten sterilen 10 ml Stangenpipette homogenisiert. Vor der Gewebsdesintegration durch Verdau und Trituieren wurde der Dissoziationslösung zusätzlich noch 0,05 % (v/w) DNase I zugegeben, um ein Verklumpen der Zellen durch freigesetzte DNA zu verhindern.

Mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) wurde der Verdauvorgang schließlich abgestoppt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit je 10 ml Hank's Balanced Salt Solution ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  gewaschen, um die Verdauenzyme zu entfernen.

Zur Vereinzelung wurden die Zellen zum Schluss noch über ein 40  $\mu\text{m}$  Zellsieb (Becton Dickinson) filtriert und danach die Zellkonzentration mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die erhaltene Zellsuspension wurde für die weiteren Experimente verwendet.

### 2.2.3 Kultivierung humaner und muriner Enterosphären

Die Zellkulturexperimente wurden in S1-Laboren unter sterilen Bedingungen in Zellkulturplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen oder Nunc, Wiesbaden) durchgeführt. Die Inkubation der Zellen oder Gewebe erfolgte in Inkubatoren bei 95 % Luftfeuchtigkeit, 5 %  $\text{CO}_2$  und 37 °C. N2-Proliferations- und N2-Differenzierungsmedien wurden nach Ansetzung sterilfiltriert und anschließend bei 4 °C gelagert. Ein Mediumwechsel wurde alle 3 Tage durchgeführt.

Murine und humane Enterosphären wurden maximal 14 Tage in Zellkultur gehalten. Direkt nach der Präparation wurde einmalig 2 % B27-Supplement zugegeben. Die

Konzentration der Zellen betrug bei Start der Kultivierung  $2,5 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$ . Die Kultivierung erfolgte während der Proliferationsphase in 6-Well-Platten (Greiner Bio-One, Frickenhausen) in N2-Proliferationsmedium auf einer Wachstumsfläche von  $9,6 \text{ cm}^2$  pro Well. Dem Medium wurden jeden Tag die Wachstumsfaktoren EGF (20 ng/ml) und bFGF (20 ng/ml) zugegeben.

Zur Ausdifferenzierung der murinen Vorläuferzellen in verschiedene Zelltypen erfolgte nach der Proliferationsphase eine Differenzierungsphase von bis zu 7 Tagen. Zuerst wurden die noch im Medium enthaltenen Wachstumsfaktoren EGF und bFGF durch mehrmaliges Waschen ( $200 \times g$ ) in HBSS entfernt und die Zellen dann in N2-Differenzierungsmedium überführt. Die Differenzierung erfolgte je nach Anwendung mit Zugabe von 2% (v/w) FCS, wenn die Zellen an den Boden adhären sollten, oder ohne FCS, falls die Zellen im Überstand ausdifferenzieren sollten (z. B. vor der Genexpressionsanalyse).

Ein Wechsel der Medien erfolgte sowohl bei Proliferation als auch bei Differenzierung alle 3 Tage.

## 2.3 Pharmakologische Behandlung muriner Enterosphären

Für die Untersuchung des Einflusses von Trijodthyronin auf ENS-Vorläuferzellen *in vitro* wurden verschiedene Zellkulturassays etabliert. Für die Versuche wurden ausschließlich Zellen von C57BL/6-Mäusen kurz vor (E18) oder bis zu 6 Std nach der Geburt (P0) verwendet.

### 2.3.1 T3-Proliferationsassay

Murine Enterosphären wurden nach einer vorangegangenen 7-tägigen Proliferationsphase in je 2 ml Proliferationsmedium/Well (mit Wachstumsfaktoren EGF (20 ng/ml) und FGF (20 ng/ml)) auf 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Direkt nach dem Ausplattieren wurde in 50% der Wells 100 nM T3 zugegeben. Die unbehandelten Enterosphären in den anderen Wells dienten als Negativkontrolle.

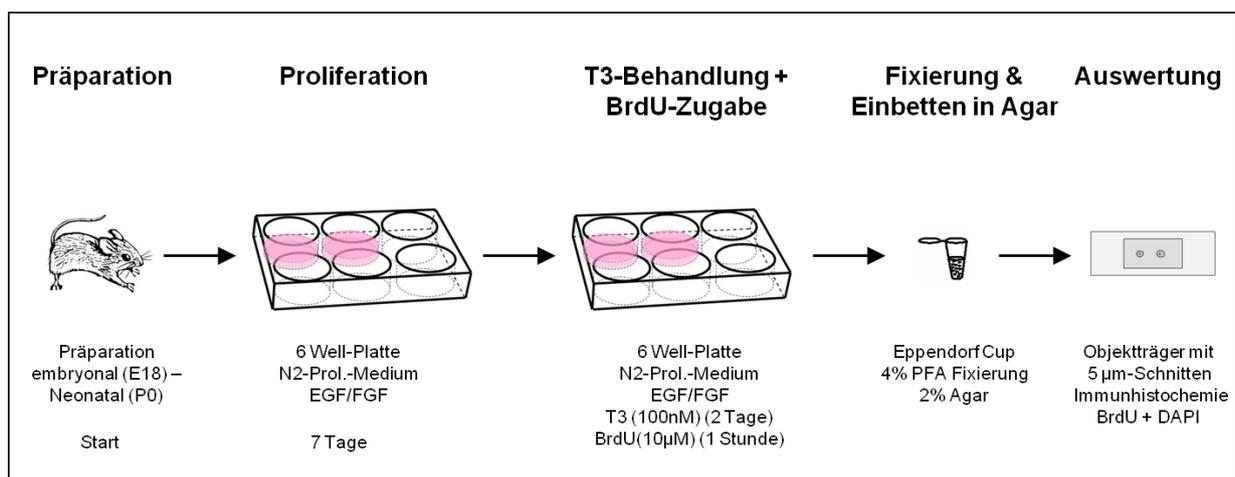
Die Inkubation der Enterosphären erfolgte über 48 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ . Eine Stunde vor Ablauf dieser Zeit wurde dem Proliferationsmedium der T3-behandelten Zellen als auch den Negativkontrollen das Thymidin-Analogon Bromdesoxyuridin (Endkonz.  $10 \mu\text{M}$ ; BrdU labeling and Detection Kit I) zugefügt.

Anschließend wurden die Enterosphären in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf-Cup) überführt, mit 4% PFA fixiert und  $3\times$  mit TBS gewaschen ( $200 \times g$ ). 2% Agar

wurden in TBS durch Erhitzen in einer Mikrowelle gelöst und je ca. 500 µl in jedes Reaktionsgefäß gefüllt. Während der Abkühlzeit des Agars wurden die Enterosphären zentrifugiert (6000 × g, 10 s), damit sie sich am Boden des Reaktionsgefäßes sammelten. Der ausgekühlte Agarkegel wurde schließlich in Paraffin eingebettet und es wurden 5 µm dicke Schnitte des Paraffinblocks angefertigt. Um sicherzustellen, dass jede Enterosphäre nur einmal ausgewertet wird, wurde nur alle 200 µm ein Schnitt mit BrdU gefärbt und ausgewertet. BrdU wurde mit dem fluorochromgekoppelten Antikörper Cy3-anti Maus sichtbar gemacht, während die Zellkerne durch 4',6-Diamidino-Phenylindol (DAPI) visualisiert wurden. Die Aufnahmen der Enterosphärenschnitte wurden an einem Zeiss Axioplan-Mikroskop durchgeführt. Die Bestimmung der Zellanzahl erfolgte mittels ImageJ-Software mit installiertem Cell Counter-Plugin.

Zur Auswertung wurden die BrdU- und DAPI-positiven Zellen sowie die Fläche jedes Enterosphärenschnitts bestimmt und das Verhältnis von BrdU- zu DAPI-positiven Zellen der T3-behandelten und der negativen Kontrollgruppe verglichen. Es wurden nur Enterosphärenschnitte mit einer Flächengröße von 2000-8000 µm<sup>2</sup> ausgewertet.

Die Analyse der Daten erfolgte mit der Statistiksoftware Sigmastat 3.5 (Systat Software GmbH).



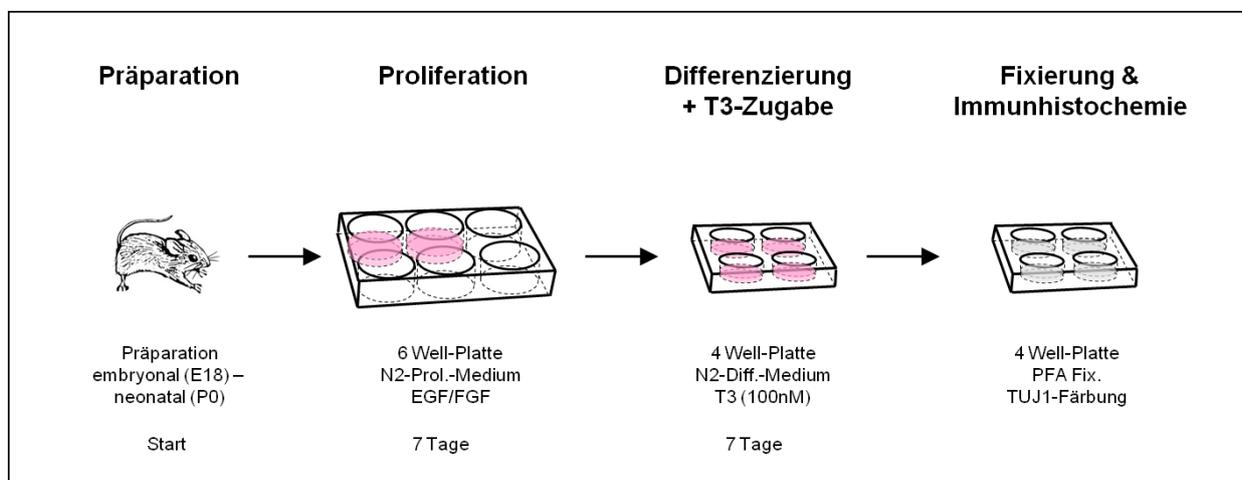
**Abb. 11:** Zeitlicher Ablauf des Proliferationsassays (Schema)

### 2.3.2 T3-Differenzierungsassay

Die Wirkung von T3 auf differenzierende ENS-Vorläuferzellen wurde mit Hilfe eines Zellkulturassays, in dem das Auswachsen der Zellfortsätze gemessen wurde, untersucht. Zunächst wurde eine Zellkultur aus 8 neonatalen C57BL/6-Mäusen (alle entstammten dem gleichen Muttertier) angelegt (2.2.1). Die Enterosphären wurden für 7

Tage unter Proliferationsbedingungen in Kultur gehalten. Zum Abschluss der Proliferationsphase wurde ein Waschschrift in HBSS durchgeführt ( $200 \times g$ ), um die Wachstumsfaktoren EGF und bFGF zu entfernen. Danach wurden die Sphären zu gleichen Teilen auf zuvor über Nacht bei Raumtemperatur mit Laminin ( $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), Fibronectin ( $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) und Poly-L-Ornithin ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) beschichteten 4-Well-Platten (Nunc) in  $800 \mu\text{l}$  N2-Differenzierungsmedium pro Well ausplattiert. Nach einem Tag Inkubation wurde der Hälfte der Wells T3 in Konzentrationen von  $50 \text{ nM}$  oder  $100 \text{ nM}$  zugegeben. Die restlichen Wells ohne Zugabe von T3 dienten als Negativkontrolle. Es folgte eine 1-wöchige Differenzierungsphase, in der alle 2 Tage das Medium erneuert und T3 frisch zugegeben wurde. Nach 7 Tagen wurden die differenzierten Zellen mit 4% PFA fixiert und anschließend eine immunhistochemische Färbung mit  $\beta$ -Tubulin III (TUJ1)-Antikörper und DAPI durchgeführt. Die Aufnahmen der  $\beta$ -Tubulin III-positiven Zellen wurden an einem Zeiss Axioplan-Mikroskop durchgeführt.

Ausgewertet wurden die Anzahl der primären Verzweigungen der Zellfortsätze, die direkt vom Soma ausgingen, sowie die Länge des längsten Zellfortsatzes. Die Analyse der Daten erfolgte mit der Statistiksoftware Sigmapstat 3.5 (Systat Software GmbH).



**Abb. 12:** Zeitlicher Ablauf des Differenzierungsassays (Schema)

## 2.4 Nachweis der Thyroidhormonrezeptoren durch RNA-Analyse

Zum Nachweis der Thyroidrezeptortypen  $\text{Tr}\alpha$  und  $\text{Tr}\beta$  wurde RNA aus humanem und murinem Gewebe und murinen Enterosphären extrahiert. Das Material für diesen Versuch wurde wie in Kapitel 2.2.1 und 2.2.2 beschrieben präpariert, in RLT-Puffer (RNEasy Mini Kit, Qiagen, Hilden) mit 1% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol (Sigma - Aldrich)

aufgenommen und anschließend mit einem Ultra-Turrax (T25 basic, IKA-Werke, Staufen, Deutschland) aufgeschlossen und homogenisiert. Das weitere Vorgehen erfolgte nach Anleitung des RNEasy Mini Kits. Die extrahierte RNA wurde in 60 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Der RNA-Gehalt wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers gemessen und auf eine Konzentration von 0,1 µg/µl eingestellt. Anschließend erfolgten die weiteren Schritte: Eine Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) zum Umschreiben der RNA in DNA, PCR mit Primern für die Thyroidhormonrezeptoren und die Visualisierung der synthetisierten DNA durch eine Agarose-Gelelektrophorese.

Die Primer für den Nachweis der humanen Schilddrüsenrezeptoren und die Primer zum Nachweis von Trβ1 in der Maus wurden bereits in anderen Publikationen eingesetzt und evaluiert. Die Primer, die zum Nachweis des Trα-Rezeptors in der Maus verwendet wurden, wurden mit Hilfe des Programms Oligo-Explorer (GeneLink, New York, USA) erstellt und anschließend von Sigma-Aldrich synthetisiert.

#### **2.4.1 Reverse Transkription (RT-PCR)**

Durch die RT-PCR wurde mittels einer RNA-abhängigen DNA Polymerase die RNA, die aus den murinen und humanen Enterosphären und dem murinen ENS-Gewebe extrahiert wurde, in cDNA umgeschrieben.

- Ansatz:
- 10 µl (1 µg) RNA
  - 2 µl Oligo-(dT)<sub>23</sub>, Anchored Primer (Sigma-Aldrich)
  - 2 µl dNTPs
  - 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>
  - 8 µl 5× Puffer
  - 4 µl DTT
  - 2 µl RNase Out (Sigma-Aldrich)
- Ablauf:
- 2 min auf 42 °C erwärmen
  - 2 µl Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) zugeben
  - 50 min Inkubation bei 42 °C
  - 15 min Inaktivierung der reversen Transkriptase bei 70 °C
  - Auffüllen mit 60 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auf Endkonzentration von 20 µg/µl

### 2.4.2 Polymerase - Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion wurden die durch die RT - PCR erhaltenen DNA - Stücke mit Hilfe einer DNA-Polymerase vervielfältigt.

- Ansatz:
- 4 µl (40 µg) cDNA
  - 2,5 µl 10× Puffer
  - 0,5 µl dNTPs
  - 1 µl Primer Forward
  - 1 µl Primer Reverse
  - 0,25 µl AmpliTaq (Applied Biosystems, Darmstadt)
  - 14,75 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

- Ablauf:
- Denaturierung: 94 °C
  - Denaturierung: 94 °C
  - Annealing: 56 - 59 °C
  - Elongation: 72 °C
  - Elongation: 72 °C
- } 40 Zyklen

#### Eingesetzte Primer

Gen	Sequenzen	Ann-Temp. (T <sub>A</sub> )	Produktgröße	Publikation
Trα1 hu	F: 5'-TTGCGAAGACCAGATCATCCT-3' R: 5'-GTGGGGCACTCGACTTTCAT-3'	59 °C	453 bp	[164]
Trβ1 hu	F: 5'-GTCGTCGCCACATCTCATC-3' R: 5'-CCATTTCCCCATTCAAGGTTA-3'	56 °C	845 bp	[164]
Trα ms	F: 5'-ATGCCGGACGGAGACAAGGTAGAC-3' R: 5'-TTGGGCCAGAAGTGCGGAATGTT-3'	59 °C	488 bp	-
Trβ1 ms	F: 5'-CAGTGCCAGGAATGTCGCTTTAAG-3' R: 5'-ACTCTGGTAATTGCTGGTGTGATGAT-3'	56 °C	371 bp	[165]
GapDH	F: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' R: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	56 °C	452 bp	-

### **2.4.3 Agarose - Gelelektrophorese**

Die Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, mit deren Hilfe Moleküle wie Proteine oder Nukleinsäurestränge (RNA, DNA) in einem Gel anhand eines elektrischen Feldes nach ihrer Größe und Ladung aufgetrennt werden. Da bei Nukleinsäuren das Verhältnis von Ladung zu Masse nahezu gleich ist, erfolgt bei ihnen eine Auftrennung hauptsächlich nach Molekülform und Masse. Negativ geladene Moleküle wandern im elektrischen Feld zum positiven Pol (Anode), positiv geladene Moleküle wandern zum negativen Pol (Kathode).

Die PCR-Produkte wurden auf ein Gel, hergestellt aus 1 % (w/v) Agarose in TBE-Puffer, aufgetragen und nach dem Lauf mit Ethidiumbromid (10 ng/ml in TBE-Puffer, Sigma - Aldrich) gefärbt.

## **2.5 Immunhistochemie / Immunzytochemie**

### **2.5.1 Immunhistochemie von Zellkulturen sowie Paraffinschnitten**

Bei Paraffinschnitten erfolgte vor Durchführung des eigenen Färbeprotokolls eine Entparaffinierung durch Xylol und eine absteigende Alkoholreihe (20 min in Xylol (Roth); je 5 min in 100 % EtOH, 96 % (v/v) EtOH, 70 % (v/v) EtOH, 50 % (v/v) EtOH). Die Epitope wurde anschließend durch 5 min Kochen in Zitratpuffer in der Mikrowelle freigelegt. Nach 10 min Abkühlen auf Eis erfolgte die Immunfärbung auf die gleiche Weise wie bei Zellkulturen nach folgendem Protokoll:

- 3 × 5 min waschen in PBS - Puffer
- Gewebe bzw. Zellen mit Fettstift umranden (bei Paraffinschnitten)
- 30 min blockieren in PBS - Puffer (+10 % (v/v) Schweineserum +0,3 % (v/v) Triton - X - 100)
- Serum abklopfen
- Über Nacht: Inkubation mit primärem Antikörper in Tris - BSA - Puffer (+ 10 % (v/v) Schweineserum, + 0,1 % (v/v) Triton - X - 100) in Feuchtekammer bei 4 °C
- 3 × 5 min waschen in PBS - Puffer
- 30 min: Inkubation mit sekundärem Antikörper in Tris - BSA - Puffer (+ DAPI 1:5000, + 0,1 % (v/v) Triton - X - 100) in Feuchtekammer
- 3 × 5 min waschen in PBS - Puffer
- Paraffinschnitte: Eindeckeln der Proben mit Kaiser - Gelatine

### 2.5.2 Whole mount - Immunhistochemie

Im Gegensatz zur einfachen Immunhistochemie, bei der einzelne Zellen oder Schnitte mit wenigen Zellschichten angefärbt werden müssen, werden bei der whole mount - Immunfärbung größere Gewebe oder komplette Organe angefärbt. Bei dieser Methode ist besonders wichtig, dass der Antikörper das Gewebe durchdringen kann, damit er an die entsprechenden Proteine andocken kann.

Für die Whole mount - Immunhistochemie wurden komplette Därme aus embryonalen Mäusen des Stadiums E14 und P0 präpariert. Für die DAB-Färbung wurde das Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) verwendet.

#### **Protokoll der whole mount - Färbung von neonatalem Maudarm mit fluorochromgekoppelten Antikörpern:**

- Murinen Darm (E14 oder P0) über Nacht in 4 % (v/w) PFA bei 4 °C fixieren
- 2 × 30 min Waschen in PBS - Puffer
- 2 × 30 min blockieren in PBS - Puffer (+ 10 % (v/v) Schweineserum + 1 % (v/v) Triton - X - 100)
- 3 × 5 min waschen in PBS - Puffer
- 2 - 4 Tage Inkubation mit primärem Antikörper in Tris - BSA - Puffer (+ 10 % (v/v) Schweineserum + 1 % (v/v) Triton - X - 100) auf Schüttler bei 4 °C
- 3 × 5 min waschen in PBS - Puffer (+ 0,1 % (v/v) Triton - X - 100)
- 2 - 4 Tage Inkubation mit sekundärem Antikörper (Fluoreszenz, DAB) in Tris - BSA (+ DAPI 1:5000, + 10 % Schweineserum, + 0,1 % Triton - X - 100) auf Schüttler bei 4 °C
- 3 × 45 min waschen in PBS - Puffer
- Eindeckeln der whole mount - Proben unter leichtem Quetschen unter Objektträger mit Kaiser - Gelatine

**Protokoll der whole mount-Färbung von neonatalem Maudarm mit DAB-gekoppelten Antikörpern:**

- Murinen Darm (E14 oder P0) über Nacht in 4 % (v/v) PFA bei 4 °C fixieren
- 2 × 30 min waschen in PBS-Puffer
- 2 × 30 min blockieren in PBS-Puffer (+ 10 % (v/v) Schweineserum + 1 % (v/v) Triton-X-100)
- 3 × 5 min waschen in PBS-Puffer
- 2-4 Tage Inkubation mit primärem Antikörper in Tris-BSA-Puffer (+ 10 % (v/v) Schweineserum, + 0,1 % (v/v) Triton-X-100) auf Schüttler bei 4 °C
- 3 × 5 min waschen in PBS-Puffer (+ 0,1 % (v/v) Triton-X-100)
- 2-4 Tage Inkubation mit Zweitantikörper (DAB) in Tris-BSA (+ 10 % (v/v) Schweineserum, + 0,1 % (v/v) Triton-X-100) bei 4 °C
- 3 × 45 min waschen in PBS-Puffer
- Vectastain-Lsg: 2,5 ml Tris-BSA + 25 µl Vectastain A + 25 µl Vectastain B; 30 min Vorinkubation bei RT
- 1 Std Inkubation des Darms in Vectastain-Lsg bei RT
- 3 × 40 min waschen in PBS-Puffer
- 2-5 min Inkubation des Darms in DAB-Lsg (5 ml H<sub>2</sub>O, 100 µl Substrat-Puffer, 250 µl DAB-Puffer, 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- Abstoppen der Reaktion durch Waschen in PBS, dann Waschen in Leitungswasser
- Eindeckeln der Whole mount-Proben unter leichtem Quetschen unter Objektträger mit Kaiser-Gelatine

**2.5.3 BrdU-labeling**

Zur Messung der Proliferationskapazität von Zellen stehen verschiedene Möglichkeiten zur Auswahl. So können proliferierende Zellen z. B. mit einem Antikörper gegen das Ki67-Protein nachgewiesen werden, das während des Zellzyklus in der G1-, S-, G2- und M-Phase gebildet wird. Zellen in der G0-Phase, also ruhende Zellen, exprimieren dieses Protein nicht. Einem ähnlichen Prinzip liegt die Verwendung eines Antikörpers gegen das Protein Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) zugrunde. PCNA wird im Zellzyklus nur in der G1- und S-Phase exprimiert, tritt also auch nur bei proliferierenden Zellen auf.

Für die Proliferationsversuche in dieser Doktorarbeit wurde eine Methode verwendet, die sich stark von den beiden zuvor genannten Methoden unterscheidet: Das Thymidin-Analogon Bromdesoxyuridin (BrdU) wird bei der DNA-Replikation während der Zellteilungsphase anstatt Thymidin in die DNA eingebaut. BrdU wird dazu während der Proliferation dem Kulturmedium zugegeben. Nach der Fixierung kann BrdU immunhistochemisch nachgewiesen werden. Alle immunhistochemisch gefärbten BrdU-positiven Zellen sind also in dem Zeitraum, in dem BrdU dem Medium zugefügt war, durch Zellteilung neu entstanden.

## **2.6 Aufreinigung von murinen ENS-Vorläuferzellen durch Adhärenzunterschiede**

Eine Aufreinigung von neuronalen Zellen und Vorläuferzellen des enterischen Nervensystems kann bei der Kultivierung in N2-Proliferationsmedium mit Hilfe der im Vergleich zu Fibroblasten und glatten Muskelzellen unterschiedlichen Adhärenzeigenschaften durchgeführt werden. Dabei macht man sich zu Nutzen, dass Fibroblasten und glatte Muskelzellen die Eigenschaft haben, in Kultur eher an Kunststoffoberflächen zu adhären, während neuronale Zellen dazu tendieren, im Medienüberstand zu proliferieren [166]. Die Zellaufreinigung bei diesem Versuch erfolgte daher durch mehrfache Passagierung des Kulturüberstandes mit allen nicht adhären-ten Zellen. Nach 4 Tagen erfolgte die erste Passagierung von einer 6-Well-Zellkulturplatte in Petrischalen, nach 5 Tagen Proliferation eine weitere Passagierung in frische Petrischalen.

Das folgende Protokoll beschreibt detailliert den Ablauf der einzelnen Schritte.

### **Protokoll der Zellkultivierung mit Adhärenzaufreinigung**

- Je  $2,5 \times 10^5$  Zellen in 2 ml N2-Proliferationsmedium (+ B27 (50 ×), EGF (20 ng/ml) und bFGF (20 ng/ml)) pro Well auf 6-Well-Platten ausplattieren
- 4 Tage Inkubation bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Täglich Zugabe von EGF (20 ng/ml) und bFGF (20 ng/ml)
- Nach 4 Tagen Absaugen der schwimmenden Enterosphären und überführen in unbeschichtete Petrischalen (Ø 60 mm) in je 5 ml N2-Proliferationsmedium mit EGF (20 ng/ml) und bFGF (20 ng/ml)

- 5 Tage Inkubation bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Täglich Zugabe von EGF (20 ng/ml) und bFGF (20 ng/ml)
- Absaugen der Enterosphären aus Überstand und überführen in 6 neue Petrischalen mit je 5 ml N2-Differenzierungsmedium (ohne FCS; Differenzierung der Zellen ohne Anheften an den Kunststoffboden) und 3 Petrischalen mit je 5 ml Proliferationsmedium (Zugabe von EGF (20 ng/ml) und bFGF (20 ng/ml)). Inkubation für 1 Tag bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>
- Zugabe von T3 (100 nm) in 3 von 6 Petrischalen mit Differenzierungsmedium (3 × T3-Differenzierung und 3 × Differenzierung). Zugabe von EGF (20 ng/ml) und bFGF (20 ng/ml) in 3 Schalen mit Proliferationsmedium
- 1 Tag Inkubation bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>
- Absaugen der Enterosphären im Überstand und leicht adhärenter runder Enterosphären und Überführung in 1,5 ml Eppendorf-Gefäß. Zentrifugation für 10 min bei 200 × g. Überstand verwerfen
- Pellets aufnehmen in je 300 µl RNA-Puffer (RLT - Puffer ohne β-Mercaptoethanol, Qiagen)
- Einfrieren und aufbewahren bis zur RNA-Extraktion bei -80 °C

## 2.7 Genexpressionsanalyse

Die für die Genexpressionsanalyse verwendeten Enterosphären wurden wie in Kapitel 2.6 beschrieben behandelt. Die Prozessierung von der Extraktion der RNA bis zur Gewinnung der Expressions-Rohdaten wurde von der Microarray Genechip Facility Tübingen (MFT) durchgeführt:

Von den nach der Aufreinigung eingefrorenen Enterosphären wurde die RNA mit einem RNeasy Micro Kit (Qiagen) extrahiert. Eine RNA-Qualitätskontrolle wurde auf einem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn) durchgeführt. Anschließend wurde jeweils von 100 ng RNA mit dem GeneChip® WT cDNA Synthesis and Amplification Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) nach Anleitung doppelsträngige cDNA synthetisiert, amplifiziert und biotinyliert. 15 µg der cDNA wurden auf GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST arrays (Affymetrix) hybridisiert.

Nachfolgend wurden die Arrays in einer Fluidics Station 450 (Affymetrix) gewaschen und gefärbt. Biotinylierte cDNA, die an Zielmoleküle gebunden hat, wurde nach Protokoll mit an Streptavidin gekoppeltem Phycoerithrin, biotinylierten IgG Antikörper gegen Streptavidin und wieder mit an Streptavidin gekoppeltem Phycoerithrin visualisiert. Die Detektion der Fluoreszenz wurde mit einem GCS3000 Genchip-Scanner (Affymetrix) und AGCC 3.0-Software durchgeführt. Nach dem Scannen der Microarray-Chips wurden die Bilder zuerst sorgfältig auf Hybridisierungsartefakte und korrekte Anordnung der Gitterstruktur mit Hilfe der Expression Console 1.0 (Affymetrix) analysiert. Die Weiterverarbeitung der Rohdaten erfolgte mit der Partek Software 6.6.

Der für die Analyse verwendete GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST analysiert die Expression von 28.853 Genen, wobei jedes einzelne Gen jeweils über durchschnittlich 27 Sonden detektiert wird (insgesamt besteht der Chip aus 770.317 Sonden). Jedem Gen sind 50 % „Perfect Match“-Sonden (PM) und 50 % „Mismatch“-Sonden (MM) zugeteilt. PM-Sonden bestehen aus 25 Basenpaaren, die an komplementäre Stellen der DNA des Zielgens binden können. Dabei kommen für jedes Gen PM-Sonden mit unterschiedlichen Nukleotidsequenzen zum Einsatz, die an verschiedene Stellen der DNA des zu untersuchenden Gens binden. MM-Sonden entsprechen den PM-Sonden, allerdings wurde das mittlere Basenpaar ausgetauscht, so dass keine 100 % Komplementarität zur DNA des Zielgens besteht.

Indem die erhaltenen Werte der PM-Sonden von den MM-Sonden abgezogen werden, kann auf diese Weise der Effekt von Kreuzhybridisierungen detektiert und eliminiert werden.

Das Verfahren, Kreuzhybridisierungen durch PM-Sonden zu detektieren, bringt jedoch den Nachteil mit sich, dass durch die Berechnungen bei Genen, die nur gering exprimiert werden, vorhandenes Hintergrundrauschen verstärkt wird [167].

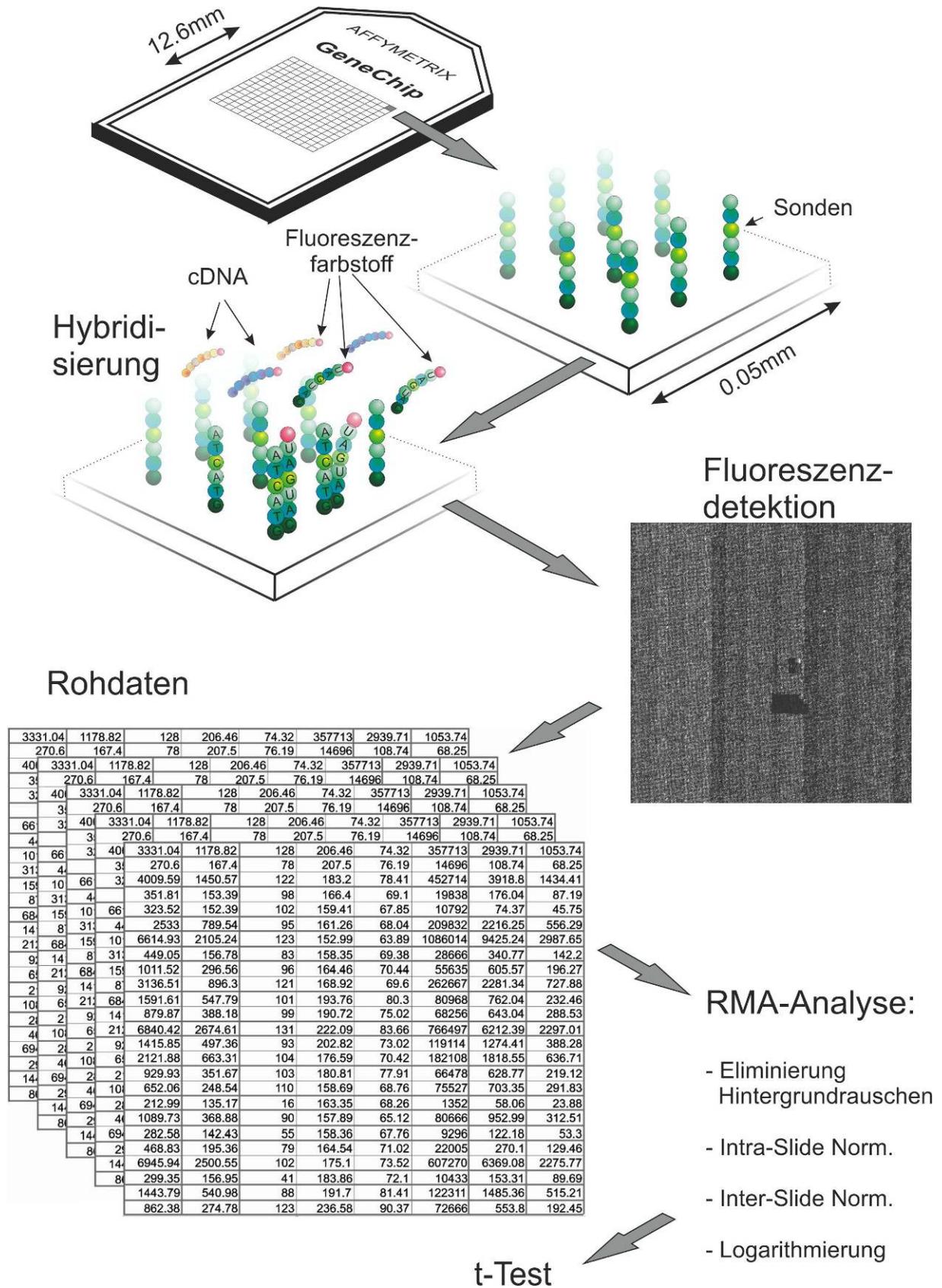
Mittlerweile wird daher meist, wie auch in diesem durchgeführten Experiment, ein RMA-Algorithmus (Robust Multi-Array Average) verwendet, der die MM-Sonden nicht in die Berechnung mit einbezieht. Mit Hilfe des RMA-Algorithmus wird das Hintergrundrauschen jedes einzelnen Chips eliminiert, die Rohdaten jedes einzelnen Chips („Intra-slide normalization“) und anschließend die Daten der Chips untereinander normalisiert („Inter-slide-normalization“). Um die erhaltenen Expressionswerte um den Wert 0 zu zentrieren, wird anschließend eine Logarithmierung ( $\log_2$ ) durchgeführt.

Mit Hilfe eines PCA-Plots („Principal Component Analysis), der die umfangreichen Datensätze für jeden Chip strukturiert und vereinfacht darstellt, wurde untersucht, ob sich unter den zu analysierenden Chips grobe Ausreißer befinden. Bei einer PCA-Analyse werden eine Vielzahl statistischer Variablen durch Linearkombinationen („principal components“) ersetzt und in einem dreidimensionalen Koordinatensystem dargestellt. Je höher die Kongruenz der Chips ist, desto näher liegen die Punkte im Koordinatensystem beieinander.

Für die durchgeführten Versuche wurden jeweils 3 unabhängige Experimente durchgeführt. Die Probe auf Signifikanz der Werte wurde durch einen t-Test ohne mehrfache Fehlerkorrektur durchgeführt (t-Test jeweils für jedes einzelne Gen; 3 × Werte der behandelten Zellen, 3 × Werte der Kontrollgruppe).

Die beschriebene Vorgehensweise ist schematisch in **Abb. 13** auf der nächsten Seite dargestellt.

Die weitere Auswertung der erhaltenen Gendaten erfolgte durch die Analysesoftware IPA und durch Literaturrecherche in der Wissenschaftsdatenbank Pubmed ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)).



**Abb. 13:** Ablauf der Affymetrix-Genchip-Analyse, Präprozessierung der Rohdaten und statistische Analyse

## 2.8 Real time PCR (qRT - PCR)

Die Überprüfung der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse einzelner Gene durch real time PCR wurden in Kooperation mit der Microarray Genechip Facility Tübingen durchgeführt.

Die für diesen Versuch verwendeten Enterosphären wurden, wie in Kapitel 2.6 beschrieben, behandelt. Die RNA-Extraktion wurde mit Hilfe des RNeasy Micro Kits (Qiagen) nach Anleitung für tierische Zellen durchgeführt. Die Homogenisierung erfolgte über QIAshredder-Säulen (mini-spin). Die Qualität der RNA wurde auf einem Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Böblingen) analysiert. Aus einer Menge von jeweils 200 ng RNA wurde mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) cDNA synthetisiert.

Die qRT-PCR wurde auf einem LightCycler480 (Roche) mit dem QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) nach Herstelleranleitung durchgeführt:

Von jeder Probe wurden 2 µl einer cDNA-Verdünnung (1:20) in einem 10 µl-Reaktionsmix mit jeweils 2 pmol jedes Primers amplifiziert.

Protokoll der qRT-PCR:

- Denaturierung: 95 °C 15 min
  - Denaturierung (15 s): 94 °C
  - Annealing (30 s): 55 °C
  - Elongation (30 s): 72 °C
- } 50 Zyklen

Die Datenerfassung erfolgte nach jedem 72 °C-Schritt. Die Schmelzkurven wurden am Ende des Laufs erstellt. Um die PCR-Effizienz zu errechnen, wurden für jedes amplifizierte Produkt Standardkurven erstellt. Die CP-Werte wurden durch die LightCycler-Software 480 (Roche) errechnet.

Für jedes untersuchte Gen wurden 3 unabhängige Messungen der Expression durchgeführt. Als Referenzgene wurden  $\beta$ -Actin (ActB), Pyruvatdehydrogenase- $\beta$ -Untereinheit und Succinatdehydrogenase Untereinheit A (Sdha) eingesetzt. Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der qbasePLUS-Software Version 2.4 (Biogazelle, Gent, Belgien).

**Eingesetzte Primer**

Gen	Sequenzen	Größe
ActB	F: 5'- CCACACCCGCCACCAGTTCG -3' R: 5'- TACAGCCCGGGGAGCATCGT -3'	112 bp
Edn3	F: 5'- AAAGCTCCCAGCCTTCTCC -3' R: 5'- CAGTCTCCCGCATCTCTTCT -3'	153 bp
Ntn1	F: 5'- ATAAAGGTGCGAGGAAGGTG -3' R: 5'- GGGGATGGGGAGGTATGAG -3'	171 bp
Pdh	F: 5'- GTAGAGGACACGGGCAAGAT -3' R: 5'- TGAAAACGCCTCTTCAGCA -3'	89 bp
Prph	F: 5'- ATCTCAGTGCCGGTTCATTC -3' R: 5'- TCCAGGTCACTGTGCTGTTC -3'	173 bp
Sdha	F: 5'- GCAGCACAGGGAGGTATCA -3' R: 5'- CTCAACCACAGAGGCAGGA -3'	153 bp
Syt12	F: 5'- GATGGGAGGAAAATGAGCAA -3' R: 5'- CCCTGGCCCAATGATGAC -3'	189 bp

**2.9 Statistik**

Für die Zellkulturassays, die Genexpressionsanalyse und die quantitative-Realtime-PCR wurden jeweils 3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Alle quantifizierten Daten sind als Mittelwert mit der dazugehörigen Standardabweichung des Mittelwertes ( $\pm$ SD) angegeben. Die Ergebnisse des Proliferationsassays wurden mit t-Test und die des Differenzierungsassays mit Kruskal-Wallis-Test und nachfolgendem Dunn's Post Hoc-Test auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Ein p-Wert  $<0,05$  wurde als statistisch signifikant festgelegt.

Die statistischen Berechnungen der Zellkultur-Assays wurden mit dem Programm SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc., Chicago, USA) durchgeführt.

Die statistische Auswertung der Genexpressionsanalyse erfolgte mit dem Programm Partek Software 6.6 mittels t-Tests (siehe 2.7). Dabei wurde ein p-Wert  $<0,05$  als statistisch signifikant festgelegt. Der Threshold-Wert, ab dem ein Gen als reguliert festgelegt wurde, betrug 1,5.

## 2.10 Lösungen, Medien & Puffer

### *Gebrauchsfertige Chemikalien, Kits, Lösungen*

4',6-Diamidino-Phenylindol (DAPI)	Roth, Karlsruhe
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	Sigma - Aldrich, München
B27 - Supplement	Gibco, Karlsruhe
BrdU Labeling and Detection Kit I	Roche, Penzberg
Collagenase IX	Sigma - Aldrich, München
Dispase	Roche, Penzberg
DNase	Sigma - Aldrich, München
FCS	PAA, Pasching, Österreich
Fibronectin	Sigma - Aldrich, München
Hank's Balanced Salt Solution ohne $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$	PAA, Pasching, Österreich
Hank's Balanced Salt Solution mit $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$	PAA, Pasching, Österreich
Laminin	Sigma - Aldrich, München
B-Mercaptoethanol	Sigma - Aldrich, München
Metronidazol 100x stock	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Penicillin / Streptomycin, 100 x stock	PAA, Pasching, Österreich
Poly-L-Ornithin	Sigma - Aldrich, München
Triton - X - 100	Roche, Penzberg

## Lösungen

### Dissoziationslösung für den Verdau des Darmmuskulgewebes

- Hank's Balanced Salt Solution mit  $\text{Ca}^{2+}$  /  $\text{Mg}^{2+}$
- Collagenase IX, 750 U/ml
- Dispase, 250  $\mu\text{g}$ /ml
- Sterilfiltrieren

### DNase I Stammlösung (5%ig)

- DNase I, 1 g
- $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ , 20 ml
- Sterilfiltrieren
- Sterilfiltrieren, aliquotieren und bei  $-20^\circ\text{C}$  lagern
- Endkonzentration bei Verdau: 0,05 %

### EGF / FGF - Stammlösung

- *EGF-stock*: 0,2 mg EGF (Epidermal Growth Factor, Roche, Mannheim), 5 mg BSA für Zellkultur (Sigma-Aldrich) in Essigsäure (100%; Endkonz. 10 mM) und 4,997 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ . Lösen. Sterilfiltrieren, aliquotieren und bei  $-20^\circ\text{C}$  lagern
- *bFGF-stock*: 25  $\mu\text{g}$  bFGF (Sigma - Aldrich) in 625  $\mu\text{l}$  sterilem PBS mit bovinem Serumalbumin, Fraktion V (1 mg/ml, BSA, Sigma - Aldrich) und Heparin (10 mg/ml, Fagron, Barsbüttel) lösen. Sterilfiltrieren, aliquotieren und bei  $-20^\circ\text{C}$  lagern
- Vor erstem Gebrauch EGF -stock und bFGF -stock 1:1 mischen

### Paraformaldehyd 4 % (PFA)

- 100 ml PBS -Puffer (10  $\times$ )
- 800 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ .
- Auf  $60^\circ\text{C}$  erhitzen
- 40g PFA (Sigma - Aldrich) und 1-2ml 10M NaOH (Roth) unter dem Abzug zugeben
- pH auf 7,4 einstellen
- mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  auf 1 l auffüllen
- sterilfiltrieren und bei  $4^\circ\text{C}$  oder  $-20^\circ\text{C}$  (längere Haltbarkeit) lagern

**Medien****N2 - Proliferationsmedium (für murine Zellen)**

- DMEM/Ham's F12 ohne L - Glutamin (PAA)
- 1 % N2 - Supplement, 100 × stock (Gibco)
- 1 % L-Glutamin, 100 × stock (Gibco)
- 1 % Penicillin - Streptomycin, 100 × stock (PAA)
- 2 % B27, 50 × stock (Gibco), einmalig nach Präparation zugeben
- 0,1 % EGF/FGF - Stammlösung, täglich frisch zugeben

**N2 - Differenzierungsmedium (für murine Zellen)**

- DMEM/Ham's F12 ohne L - Glutamin (PAA)
- 1 % N2 - Supplement, 100 × stock (Gibco)
- 1 % L - Glutamin, 100 × stock (Gibco)
- 1 % Penicillin - Streptomycin, 100 × stock (PAA)
- 2 % FCS (PAA)
- 0,1 % L - Ascorbinsäure - 2 - Phosphat, Endkonz.: 200 µM (Sigma - Aldrich)

**N2 - Proliferationsmedium (für humane Zellen)**

- DMEM/Ham's F12 ohne L - Glutamin (PAA)
- 1 % N2 supplement, 100 × stock (Gibco)
- 1 % L-Glutamin, 100 × stock (Gibco)
- 1 % Penicillin - Streptomycin, 100 × stock (PAA)
- 50 µg/ml Metronidazol (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg)
- 0,1 % EGF/FGF-Stammlösung, täglich frisch zugeben

**Puffer****PBS - Puffer (phosphate buffered saline), 10 ×**

- 80 g NaCl (Sigma - Aldrich)
- 2 g KCl (Sigma - Aldrich)
- 2,4 g Kaliumhydrogenphosphat (Roth)
- 14,4 g Natriumhydrogenphosphat (Roth)
- Auffüllen mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  Und Einstellen des pH-Wertes auf pH 7,4

**TBE – Puffer (Tris base boric acid and EDTA), 10 ×**

- 0,9 M Tris base (Sigma - Aldrich)
- 0,9 M Borsäure (Roth)
- 20 mM EDTA pH 8,0 (Sigma - Aldrich)
- Lösen in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

**TBS - Puffer (Tris buffered saline), 10 ×**

- 30,3 g Tris base (121,12 g/mol) (Sigma - Aldrich)
- 81,5 g NaCl (58,44 g/mol) (Roth)
- Lösen in 1 l  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
- pH 7,5 einstellen

**Substrat - Puffer (DAB - Immunhistochemie)**

- 200 mM Zitronensäuremonohydrat (Roth)
- 1 M Imidazol (Merck, Darmstadt)
- 1 M NaCl (Sigma - Aldrich)
- Lösen in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$
- pH auf 7,0 einstellen

**Tris - BSA - Puffer (0,1 %)**

- 50 ml TBS - Puffer
- 50 mg BSA (Sigma - Aldrich)

**Zitrat-Puffer, 10x**

- 21 g Zitronensäuremonohydrat (Roth)
- Lösen in 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>
- pH auf 6,0 einstellen

**2.11 Antikörper*****Primärantikörper***

<b>Antikörper</b>	<b>Wirtstier</b>	<b>Verd.</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Anwendung</b>
BrdU	Maus	1:100	DakoCytomation, Hamburg	Immunhistochemie
BrdU	Ratte	1:50	AbD Serotec	Immunhistochemie
GFAP	Kaninchen	1:400	DakoCytomation, Hamburg	Immunhistochemie
HuC/D	Maus	1:20	Invitrogen	Immunhistochemie
NOS	Kaninchen	1:200	Biotrend, Köln	Immunhistochemie
P75	Kaninchen	1:500	Abcam	Immunhistochemie
PGP9.5	Kaninchen	1:800	AbD Serotec	Whole mount
Smooth muscle actin (SMA)	Kaninchen	1:100	AMS Biotechnology	Immunhistochemie
β-Tub III (TUJ1)	Maus	1:500	Santa Cruz	Immunhistochemie, Whole mount
β-Tub III (TUJ1)	Kaninchen	1:10000	Covance	Immunhistochemie

**Sekundärantikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Wirtstier</b>	<b>Verd.</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Anwendung</b>
Alexa488 - Anti - Kaninchen	Ziege	1:400	Invitrogen	Immunhistochemie, Whole mount
Alexa488 - Anti - Ratte	Ziege	1:400	Invitrogen	Immunhistochemie
Cy3 - Anti - Maus	Ziege	1:400	Jackson ImmunoResearch, WestGrove, USA	Immunhistochemie
Cy3 - Anti - Ratte	Ziege	1:400	Jackson ImmunoResearch	Immunhistochemie
Cy5 - Anti - Maus IgG (H+L)	Ziege	1:400	Invitrogen	Immunhistochemie
Anti - Kaninchen (biotinyl.)	Schwein	1:400	DakoCytomation, Hamburg	Immunhistochemie, Whole mount

## 2.12 Geräte & Software

### Geräte

Typ	Modell	Hersteller
Brutschrank	Cytoperm 2	Thermo Scientific, Langenselbold
Dampfsterilisator	5075 ELV	Systec, Linden
Gel - Dokumentationssystem	Image Master VDS	Pharmacia Biotech, Cambridge, England
Genchip - Prozessierung	Fluidics Station 450	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Genchip - Scanner	GCS3000	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Kamera	Axiocam HRm	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop	Axioplan	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop	Axiovert25	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop	Observer.Z1	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop (Fluoreszenzvorschaltgerät)	EpQ100	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop (Lasermodule)	LSM 5 Lasermodule	Carl Zeiss, Jena
Mikrotom	DSC 2	Leica Biosystems, Nussloch
PCR - Cyclus	Primus 96 Plus	MWG Biotech
pH - Meter	Innolab	WTW, Weilheim

Typ	Modell	Hersteller
RNA - Analysegerät	2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn
RNA - Analysegerät	Genequant pro RNA / DNA Calculator	GE Healthcare, Freiburg
Schwanenhalslampe	CL1500ECO	Carl Zeiss, Jena
Schwanenhalslampe	KL1500	Carl Zeiss, Jena
Stereolupe	Stemi 2000	Carl Zeiss, Jena
Sterilbank	HeraGuard HPH 18/95	Thermo Scientific, Langenselbold
Sterilbank	Safe 2020	Thermo Scientific, Langenselbold
Waage	AZ214	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	WNB10	Memmert, Schwabach
Wasserbad	Typ 1052	GFL, Burgwedel
Ultraschallbad	Elma S10	Elmasonic, Mörfelden-Walldorf
Ultra - Turrax	T25 basic	IKA-Werke, Staufen
Vakuumpumpe	Vacunsafe	Integra Biosciences, Fernwald
Zentrifuge	5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Rotina 380R	Hettich Lab Technology, Tuttlingen

## Software

Bezeichnung	Hersteller
AGCC 3.0	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
AxioVision 4.8	Carl Zeiss GmbH, Jena
Corel Draw XI	Corel GmbH, München
Endnote X7	Thomson ResearchSoft, Carlsbad, USA
Expression Console 1.0	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Image J, Plugin	National Institutes of Health, Bethesda, USA
MS Excel 2007	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
MS Office 2007	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Oligo-Explorer 1.5	GeneLink, New York, USA
qbasePLUS 3.4	Biogazelle, Gent, Belgien
SigmaStat 3.5	Systat Software GmbH, Erkrath
ZEN	Carl Zeiss GmbH, Jena

### 3 ERGEBNISSE

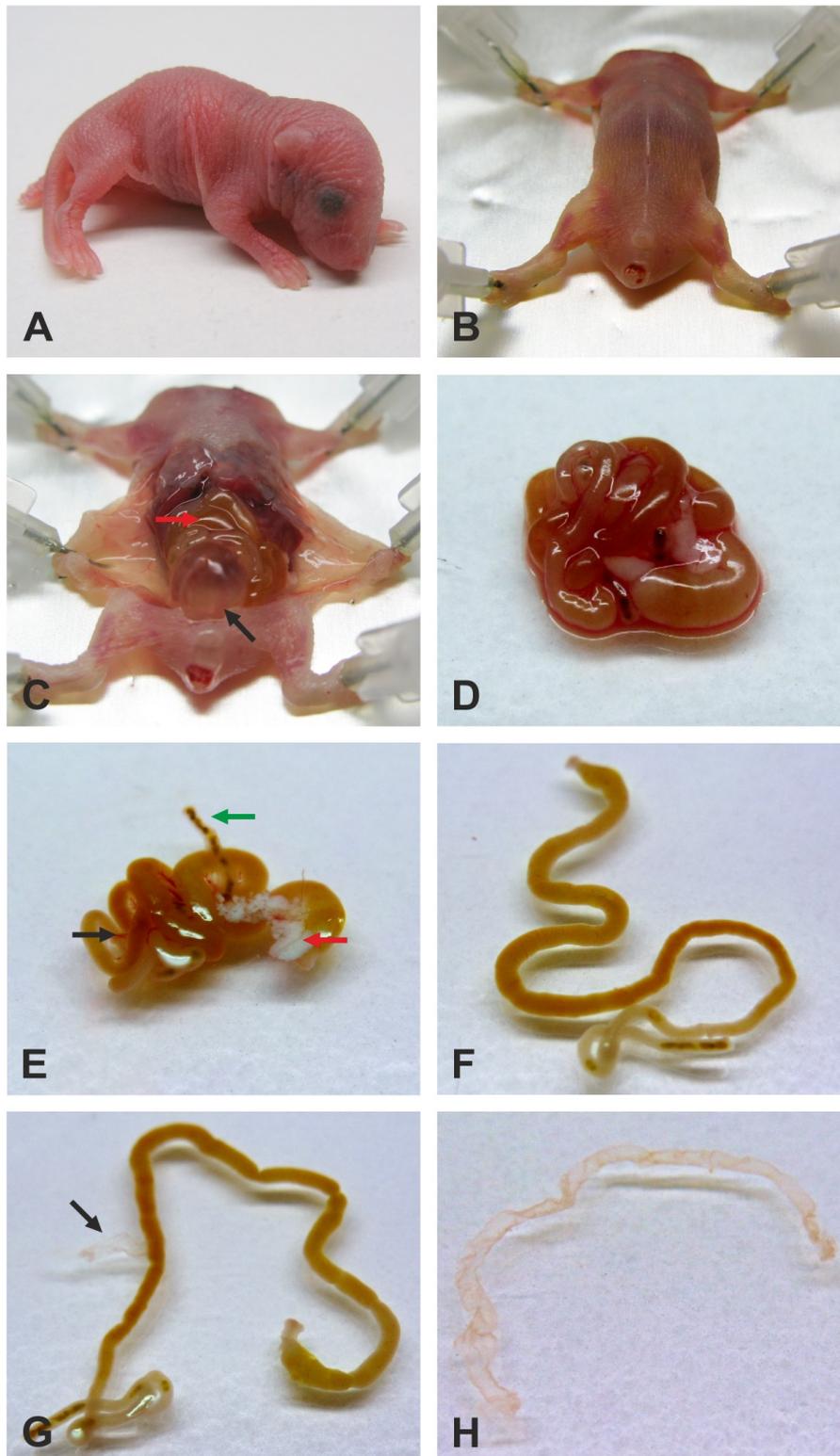
Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit bestand darin, mögliche Einflüsse des Schilddrüsenhormons Trijodthyronin (T3) auf die Entwicklung des enterischen Nervensystems des Darms zu analysieren. Da die Wirkung von Schilddrüsenhormonen auf Zellen und Gewebe zum allergrößten Teil durch Wechselwirkungen mit Rezeptoren erfolgt, wurden ENS-Gewebe und Enterosphären auf Schilddrüsenhormonrezeptoren untersucht. Die Rolle von T3 bei der Proliferation und Differenzierung von ENS-Vorläuferzellen *in vitro* wurde mit Hilfe verschiedener Zellkultur-Assays erforscht. Darüber hinaus sollte im murinen Tiermodell anhand von Whole mount-Färbungen des Darms untersucht werden, ob ein Ausschalten der T3-Rezeptorsynthese die Strukturbildung des ENS beeinflusst.

Neben den zellbiologischen Einflüssen von T3 auf ENS-Zellen sollte in einem weiteren Teil der Arbeit mittels eines Affymetrix-Genchips eine Genexpressionsanalyse der Regulationen, die durch T3 an differenzierenden Vorläuferzellen auftreten, durchgeführt werden, um mögliche Faktoren zu entschlüsseln, die für die beobachteten zellbiologische Effekte verantwortlich sind.

Vor dem Start der Versuche wurde darüber hinaus das Protokoll für die Gewinnung der Enterosphären, die die ENS-Vorläuferzellen enthalten, etabliert. Eine Charakterisierung der Enterosphären erfolgte durch immunhistochemische Methoden. Außerdem sollten in einer Genexpressionsanalyse genauere Kenntnisse über die genetischen Vorgänge während der Differenzierung der Vorläuferzellen erlangt und mögliche wichtige Entwicklungsfaktoren für nachfolgende Forschungsprojekte entschlüsselt werden.

#### 3.1 Präparation und Kultivierung muriner ENS - Progenitorzellen

Für die Durchführung der Versuche wurden Stammzellen des ENS aus embryonalen und postnatalen Mäusen gewonnen. Dabei wurden die äußeren Muskelschichten des Dünndarms abgezogen und die im zwischenliegenden Plexus myentericus vorkommenden Stammzellen durch enzymatischen Verdau freigesetzt und kultiviert. Während in früheren Veröffentlichungen meist von einem Abziehen der Muskelschicht in einzelnen kleineren Stücken geschrieben wird, wurde bei diesem Schritt Wert darauf gelegt, den Muskelschlauch an einem kompletten Stück abzuziehen (**Abb. 14**).

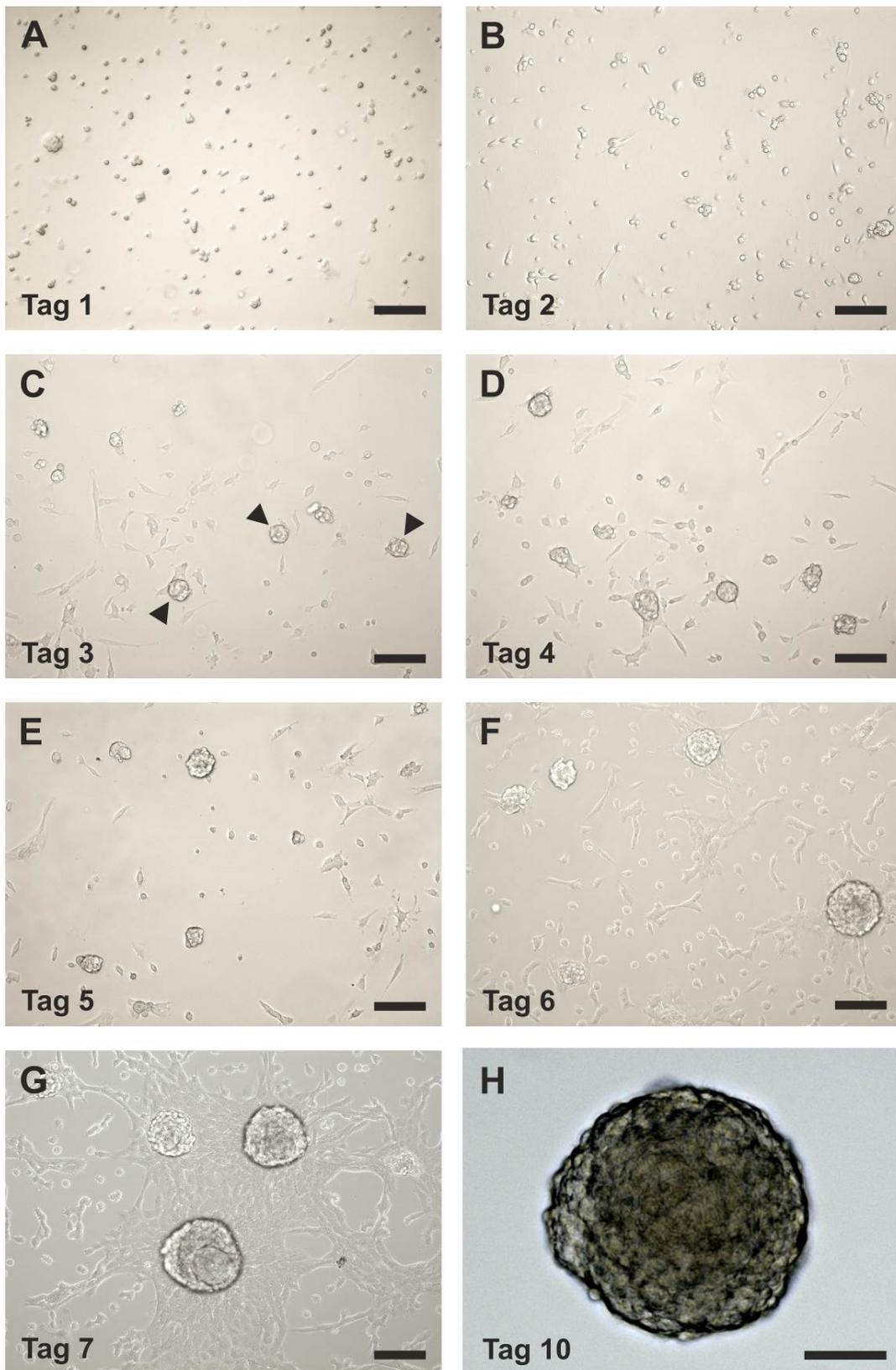


**Abb. 14:** Präparation muriner Darmmuskelschichten. **A-C** Neonatale Maus: **A** vital, **B** Maus nach Dekapitation, **C** Abdomen geöffnet, Darm (roter Pfeil) und Blase (schwarzer Pfeil) sichtbar. **D** Darm nach Extraktion. **E-G** Dünndarm: **E** mit anhängenden Mesenterien (schwarzer Pfeil) und Pankreasgewebe (roter Pfeil). Dickdarm (grüner Pfeil) **F** Mesenterien entfernt, **G** mit teilweise abgezogener Ring- und Längsmuskelschicht (Pfeil). **H** Vollständig abgezogener Muskelschlauch.

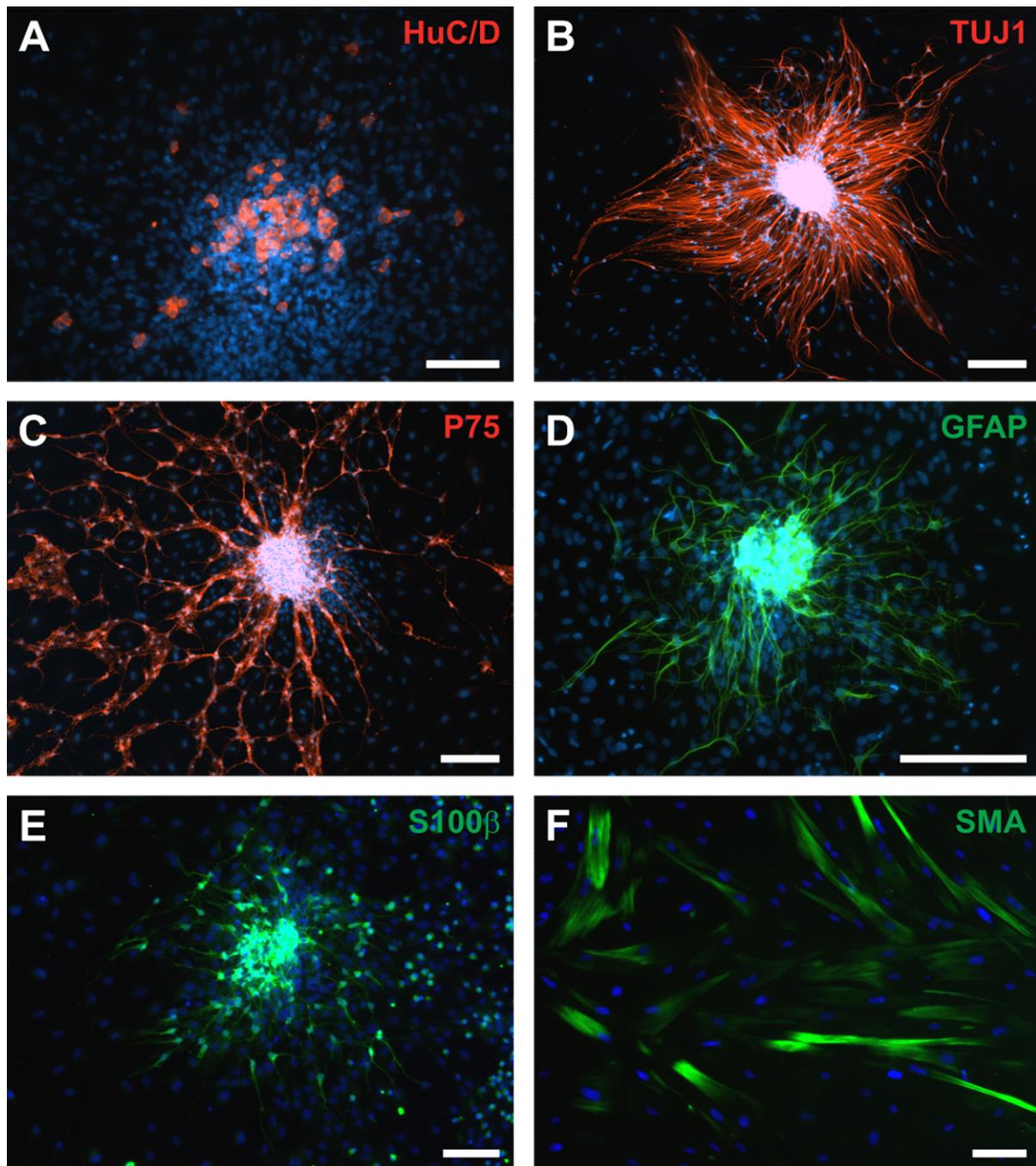
Nach Resektion des Darms wurde mit Hilfe einer Federstahlpinzette sichtbares dem Darm anhängendes Mesenterien- und Pankreasgewebe entfernt (**Abb. 14F**). Anschließend konnten die äußeren Muskelschichten als kompletter Schlauch vom Restdarm abgezogen werden (**Abb. 14G, H**). Nach einer erneuten Kontrolle auf anhängendes Mesenterien- und Pankreasgewebe folgte die mechanische Zerkleinerung des Muskelschlauchs mit dem Skalpell und der enzymatische Verdau des Gewebes. Mit den vereinzelt Zellen wurden Zellkulturen angelegt, mit denen die weiterführenden Versuche durchgeführt wurden.

Eine Kultivierung erfolgte für die nachfolgenden Experimente für bis zu 11 Tage, wobei auch ein Zeitraum von bis zu 14 Tage ohne weitere Probleme möglich ist. Es entwickelten sich während der Proliferationsphase aus den vereinzelt Zellen durch Aggregation kugelartige Strukturen, die sich erst am Boden der Kulturplatte anheften, sich jedoch später ab dem zweiten bis dritten Tag mit zunehmender Größe wieder ablösen (**Abb. 15**). Diese sogenannten Enterosphären enthalten neben neuronalen Zellen auch noch andere Zelltypen wie z.B. glatte Muskelzellen und Fibroblasten. Ein Nachweis konnte nach einer Differenzierungsphase von sieben Tagen durch immunhistochemische Färbungen der Zellen geführt werden. Die Zellen ließen sich mit Markern für neuronale Zellen (HuC/D bzw.  $\beta$ -Tubulin III (TUJ1)), neuronale Stammzellen (p75), Gliazellen (GFAP, S100 $\beta$ ) und glatte Muskelzellen (SMA) anfärben (**Abb. 16**).

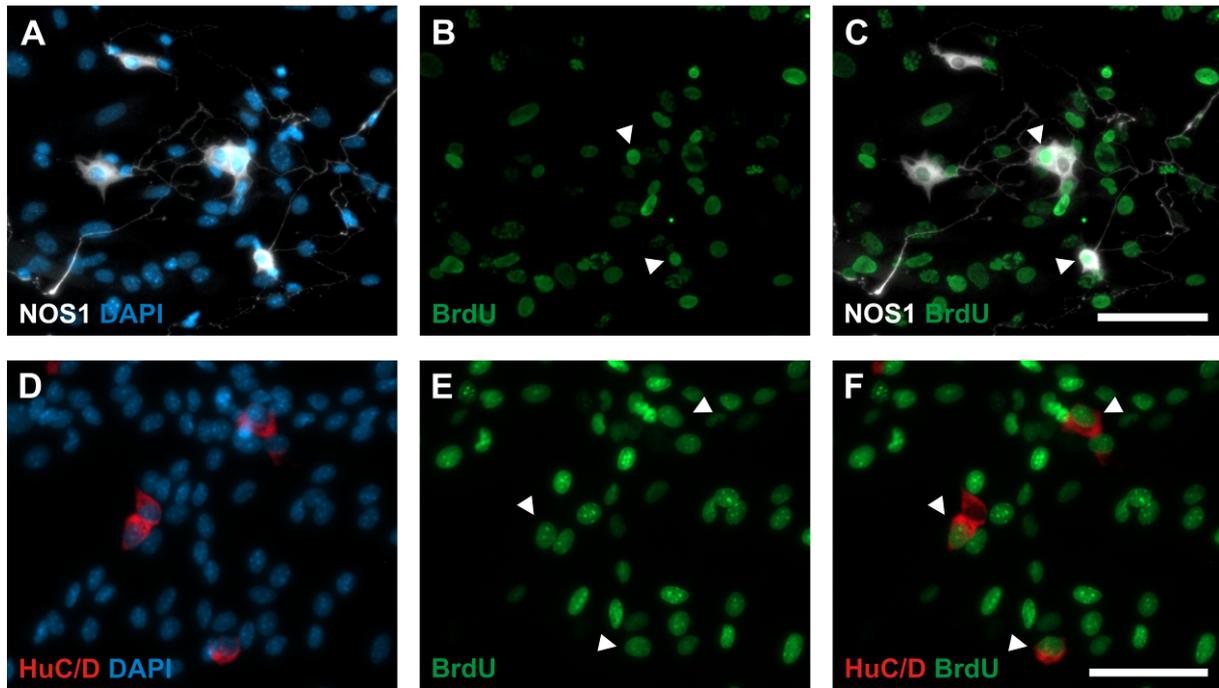
Durch immunhistochemische Färbungen konnte außerdem belegt werden, dass ein Großteil der aus Enterosphären differenzierten Neurone aus ENS-Vorläuferzellen entsteht. Für die Durchführung dieses Experiments wurden Enterosphären während der Proliferationsphase für 4 bzw. 5 Tage mit dem Thymidinanalogon Bromdesoxyuridin (BrdU) behandelt und anschließend für 1 Woche differenziert. Nach der Fixierung der Enterosphären wurde eine immunhistochemische Co-Färbung von Enterosphären gegen BrdU und gegen die neuronalen Marker HuC/D bzw. NOS durchgeführt (**Abb. 17**). Doppelt positiv für BrdU und HuC/D bzw. NOS gefärbte Zellen sind damit nachweislich aus Vorläuferzellen des ENS entstanden.



**Abb. 15:** ENS-Zellkultur in Proliferation. **A-G** Aufnahmen der Zellkultur, Tag 1 bis Tag 7. Durch Aggregation bilden sich aus anfänglich vereinzelt Zellen zwischen Tag 2 und 3 runde Konstrukte (Enterosphären; siehe Pfeile). **(H)** Einzelne Enterosphäre in Nahaufnahme, Tag 10. Maßstabsbalken: **(A-G)** = 100  $\mu\text{m}$ ; **(H)** = 50  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 16:** Differenzierte Enterosphären. Immunhistochemisch gefärbt mit Antikörpern gegen HuC/D (A),  $\beta$ -Tubulin III (TUJ1) (B), P75<sup>ntr</sup> (C), GFAP (D), S100 $\beta$  (E) und Smooth Muscle Actin (SMA) (F). Maßstabsbalken: (A, B) = 200  $\mu$ m; (C-F) = 100  $\mu$ m.

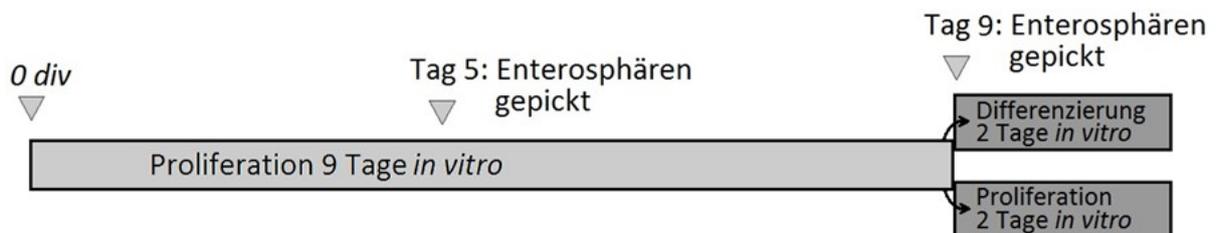


**Abb. 17:** Immunhistochemische Doppelfärbung differenzierter ENS-Neurone für BrdU und NOS1 bzw. BrdU und HuC/D. Die Färbung weist nach, dass die differenzierten Neurone von proliferierten BrdU-positiven ENS-Vorläuferzellen abstammen. **A-C:** Immunhistochemische Doppelfärbung für NOS1 (weiß) und BrdU (grün); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). **D-F:** Immunhistochemische Doppelfärbung für HuC/D (rot) und BrdU (grün); Zellkernfärbung mit DAPI (blau). Enterosphären wurden 5 Tage expandiert, danach für 7 Tage differenziert. Pfeile zeigen auf Zellen doppelt positiv für BrdU und NOS1 bzw. BrdU und HuC/D; Maßstabsbalken: (A-C): 100  $\mu\text{m}$ ; (D-F): 50  $\mu\text{m}$  (Aufnahmen in Zusammenarbeit mit Peter Neckel).

### 3.2 Vergleichende Genexpressionsanalyse proliferierender und differenzierender Enterosphären

Weitreichende Kenntnisse über die genregulatorischen Abläufe während der verschiedenen Entwicklungsstadien der ENS-Vorläuferzellen sind Grundvoraussetzung für mögliche Stammzelltherapien von ENS-Erkrankungen. Dabei steht vor allem die Differenzierung der Zellen im Focus, bei der ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren darüber entscheidet, was für ein Zelltyp aus einer Vorläuferzelle entsteht. Einige wichtige Differenzierungsfaktoren wie z. B. der Transkriptionsfaktor MASH1, der für die Bildung serotonerger Neurone benötigt wird [69], oder GDNF, das nicht nur Einfluss auf die Differenzierung, sondern auch auf die Migration der Vorläuferzellen nimmt [168], wurden bereits entschlüsselt und waren Forschungsobjekt zahlreicher Studien. Bis heute sind jedoch noch viele Fragen bezüglich der Regulation der Differenzierung offen, und es sind noch lange nicht alle beteiligten Faktoren bekannt.

Durch eine vergleichende Genexpressionsanalyse von proliferierenden Enterosphären und Enterosphären, die sich in einem frühen Stadium der Differenzierung befanden, sollte in dem durchgeführten Versuch ein Überblick darüber gewonnen werden, welche Gene in der frühen Differenzierung von ENS-Vorläuferzellen eine Rolle spielen. Als Ausgangsmaterial wurden Enterosphären verwendet, die während der Proliferationsphase mehrmals passagiert worden waren (**Abb. 18**).

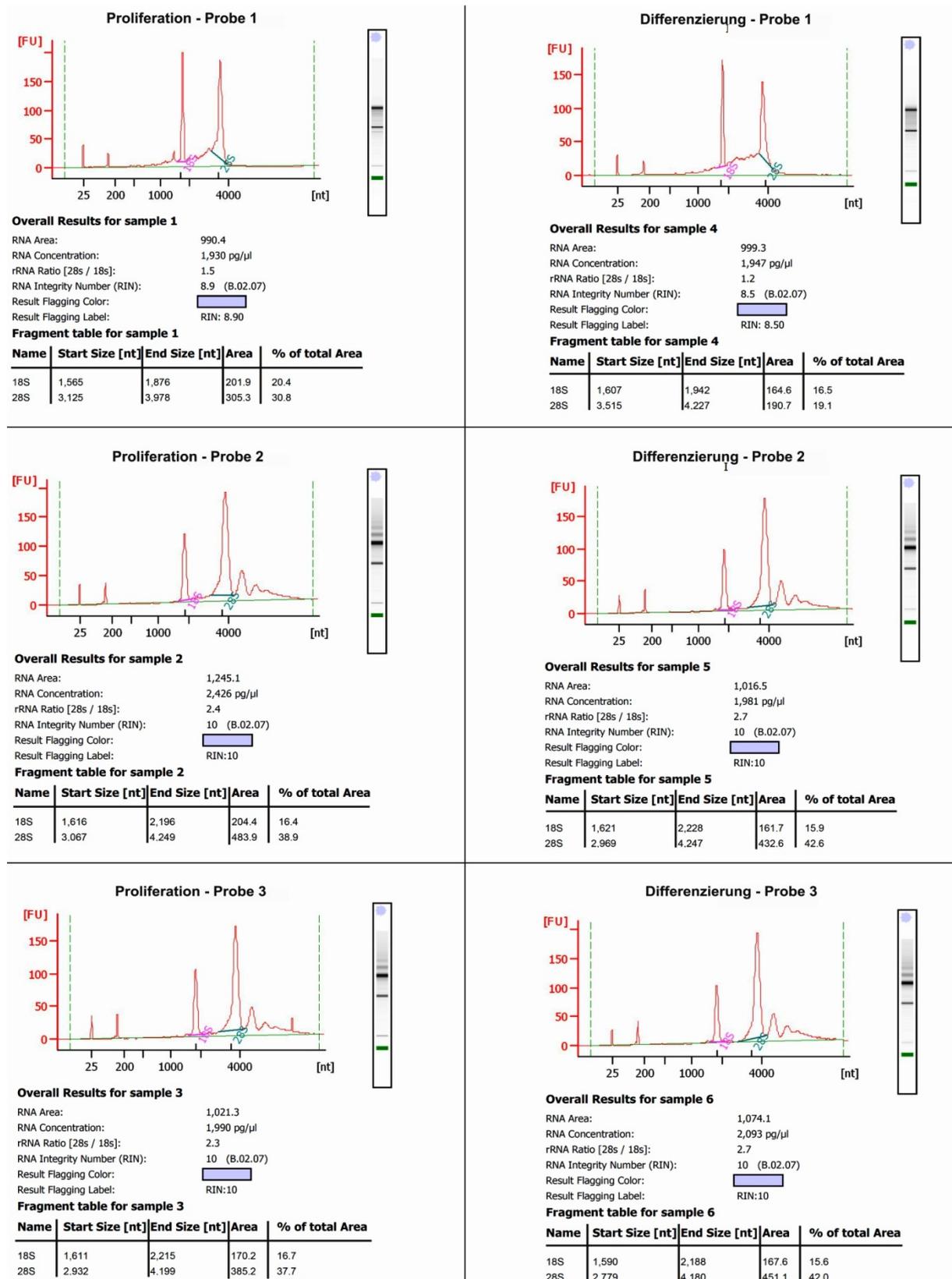


**Abb. 18:** Ablauf der Zellkulturphase vor vergleichender Genexpressionsanalyse (Proliferation gegenüber Differenzierung von Enterosphären). Enterosphären wurden an Tag 5 und Tag 9 in neue Zellkulturschalen überführt. div: Anzahl der Tage in Kultur *in vitro* (engl. „days *in vitro*“)

Da das Interesse auf früh induzierter Genregulation lag, wurden die verwendeten Enterosphären vor der Untersuchung der Genexpression nach 9 Tagen in Proliferationsmedium nur für 48 Stunden differenziert. Die Vergleichsgruppe der proliferierenden Enterosphären wurde für die gesamte Zeit, also für insgesamt 11 Tage, in Proliferationsmedium kultiviert.

Nach der Extraktion wurden die einzelnen RNA-Proben auf ihre Qualität untersucht. Dabei wird der RNA Integrity-Wert (RIN), der durch einen Algorithmus aus dem Verhältnis der 28S- und 18S-Ribosomenuntereinheiten berechnet wird, bestimmt. Dieser lag bei allen untersuchten Proben zwischen 8,5 und 10 (**Abb. 28**). Die erhaltenen Werte bedeuteten eine optimale Ausgangslage für die nachfolgende Expressionsanalyse; Fleige et al. definieren einen RIN-Wert ab 5 als gut geeignet und einen RIN-Wert ab 8 als perfekt geeignet für eine weitere Analyse wie Sequenzierung, real time PCR oder eine Genchipanalyse [169].

Die Auswertung und Diskussion der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Peter Neckel.



**Abb. 19:** Messung der RNA-Qualität vor Durchführung der Genchip-Analyse. Diese basiert auf dem RNA integrity-Wert, der auf einer Berechnung aus dem Verhältnis der 28S- und 18S-Ribosomenuntereinheiten basiert. Die RNA-Qualität lag mit RIN-Werten zwischen 8,5 und 10 vor der Genexpressionsanalyse in einem optimalen Bereich.

Insgesamt konnten 1454 Transkripte, die sich in ihrer Expression zwischen proliferierenden und differenzierenden Enterosphären mindestens um den Faktor 1,5 unterscheiden, identifiziert werden. Von diesen 1454 Transkripten waren zum Zeitpunkt der Untersuchung 1333 Gene bereits bekannten Proteinen zugeordnet (IPA- Datenbank Stand April 2015). Die Expression von 541 Genen war in differenzierenden Enterosphären hochreguliert gegenüber Enterosphären, die sich in der Proliferationsphase befanden, während 752 Gene in geringerem Maße exprimiert wurden.

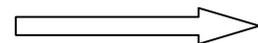
Eine Einteilung der Gene in verschiedene Gruppen bzw. Tabellen aufgrund von bereits bekannten Funktionen im ENS und in anderen neuronalen Geweben wurde durch die Analysesoftware IPA und durch die Literaturdatenbank Pubmed vorgenommen. Dabei ist anzumerken, dass bei einzelnen Genen auch mehrere Funktionen identifiziert werden konnten, womit diese Gene auch mehreren der festgelegten Gruppen hätten zugeteilt werden können. Trat dieser Fall auf, so wurde das Gen derjenigen Gruppe zugeteilt, bei der in der Literatur die meiste Übereinstimmung bezüglich der Funktion gefunden werden konnte.

In den erstellten Gruppen bzw. Tabellen ist die Angabe „Fold-change“ immer als die Veränderung der Genexpression von differenzierenden Enterosphären zu proliferierenden Enterosphären definiert.

Bei 152 regulierten Genen konnte ein direkter Einfluss auf den Zellzyklus recherchiert werden (**Tabelle 2** bis **Tabelle 5**). Diese Gene exprimierten zum großen Teil Zentromerproteine, Proteine die am Aufbau des Spindelapparates beteiligt sind, oder Proteine, die direkt die Abläufe der unterschiedlichen Zellstadien steuern, wie z. B. die Zyklone.

Gen	Protein	Fold change	Rolle im Zellzyklus
AURKA	aurora kinase A	-2,712	<b>STOP</b>
AURKB	aurora kinase B	-4,146	<b>STOP</b>
BORA	bora. aurora kinase A activator	-2,319	<b>STOP</b>
BRINP1	bone morphogenetic protein/retinoic acid inducible neural-specific 1	-2,090	<b>GO</b>
BTC	betacellulin	5,946	<b>GO</b>
BUB1	BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase	-5,736	<b>STOP</b>
BUB1B	BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase B	-3,464	<b>STOP</b>
CASC5	cancer susceptibility candidate 5	-4,295	<b>STOP</b>
CCNA2	cyclin A2	-4,652	<b>STOP</b>
CCNB1	cyclin B1	-5,752	<b>STOP</b>
		-5,820	
		-5,857	
CCNB2	cyclin B2	-3,392	<b>STOP</b>
CCND1	cyclin D1	-2,476	<b>STOP</b>
CCND3	cyclin D3	-1,539	<b>STOP</b>
CCNE1	cyclin E1	-1,777	<b>STOP</b>
CCNE2	cyclin E2	-2,847	<b>STOP</b>
CCNF	cyclin F	-3,211	<b>STOP</b>
CDC6	cell division cycle 6	-1,936	<b>STOP</b>
CDC20	cell division cycle 20	-3,113	<b>STOP</b>
CDC25B	cell division cycle 25B	-1,636	<b>STOP</b>

Fortsetzung Tabelle 2 nächste Seite

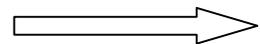


CDC25C	cell division cycle 25C	-2,414	<b>STOP</b>
CDC45	cell division cycle 45	-1,769	<b>STOP</b>
CDCA2	cell division cycle associated 2	-3,461	<b>STOP</b>
CDCA3	cell division cycle associated 3	-3,003	<b>STOP</b>
CDCA5	cell division cycle associated 5	-3,053	<b>STOP</b>
CDCA7L	cell division cycle associated 7-like	-4,123	<b>STOP</b>
CDCA8	cell division cycle associated 8	-3,467	<b>STOP</b>
CDK1	cyclin-dependent kinase 1	-3,227	<b>STOP</b>
CDK5R1	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)	1,597	<b>ND</b>
CENPA	centromere protein A	-1,895	<b>STOP</b>
CENPE	centromere protein E, 312kDa	-4,140	<b>STOP</b>
CENPF	centromere protein F, 350/400kDa	-3,927	<b>STOP</b>
CENPI	centromere protein I	-2,899	<b>STOP</b>
CENPK	centromere protein K	-2,813	<b>STOP</b>
CENPL	centromere protein L	-1,864	<b>STOP</b>
CENPM	centromere protein M	-3,407	<b>STOP</b>
CENPN	centromere protein N	-2,465	<b>STOP</b>
CENPU	centromere protein U	-1,624	<b>STOP</b>
CEP55	centrosomal protein 55kDa	-3,625	<b>STOP</b>
CHAF1B	chromatin assembly factor 1, subunit B (p60)	-2,440	<b>STOP</b>
CHEK1	checkpoint kinase 1	-3,096	<b>GO</b>

**Tabelle 2:** Regulation von Genen während der Differenzierung von Enterosphären, die direkt an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt sind; Teil 1 von 4. Auswirkung der detektierten Regulation auf Zellzyklus: **STOP**: Stopp des Zellzyklus; **GO**: Fortsetzung/ Start des Zellzyklus; **ND**: Funktion nicht eindeutig definiert.

Gen	Protein	Fold change	Rolle im Zellzyklus
CHEK2	checkpoint kinase 2	-1,997	GO
CKAP2	cytoskeleton associated protein 2	-3,765	STOP
CKAP2L	cytoskeleton associated protein 2-like	-3,219	STOP
CKS2	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	-2,948	STOP
		-2,878	
		-2,887	
DBF4	DBF4 zinc finger	-2,249	STOP
DNA2	DNA replication helicase/nuclease 2	-2,242	STOP
DTL	denticleless E3 ubiquitin protein ligase homolog (Drosophila)	-2,940	STOP
E2F1	E2F transcription factor 1	-1,977	STOP
E2F2	E2F transcription factor 2	-1,693	STOP
E2F3	E2F transcription factor 3	-1,555	STOP
EAPP	E2F-associated phosphoprotein	1,532	GO
ECT2	epithelial cell transforming 2	-4,764	STOP
EME1	essential meiotic structure-specific endonuclease 1	-2,032	STOP
FBXW7	F-box and WD repeat domain containing 7, E3 ubiquitin protein ligase	-1,517	ND
FOXM1	forkhead box M1	-3,412	STOP
GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	2,711	STOP
GADD45B	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	2,584	STOP
GADD45G	growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma	2,145	STOP
GAS1	growth arrest-specific 1	1,930	STOP

Fortsetzung Tabelle 3 nächste Seite

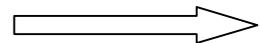


GTSE1	G-2 and S-phase expressed 1	-2,995	STOP
Hmga2	high mobility group AT-hook 2	-1,905	STOP
INCENP	inner centromere protein antigens 135/155kDa	-2,416	STOP
IQGAP3	IQ motif containing GTPase activating protein 3	-4,269	STOP
JDP2	Jun dimerization protein 2	1,688	GO
JUN	jun proto-oncogene	1,646	GO
KIF2C	kinesin family member 2C	-3,648	STOP
KIF4A	kinesin family member 4A	-4,520	STOP
KIF11	kinesin family member 11	-4,722	STOP
KIF14	kinesin family member 14	-2,833	STOP
KIF15	kinesin family member 15	-3,948	STOP
KIF18A	kinesin family member 18A	-1,895	STOP
KIF18B	kinesin family member 18B	-5,056	STOP
KIF20A	kinesin family member 20A	-4,189	STOP
KIF20B	kinesin family member 20B	-2,338	STOP
KIF22	kinesin family member 22	-3,063	STOP
KIF23	kinesin family member 23	-3,710	STOP
KIF24	kinesin family member 24	-2,141	STOP
KNTC1	kinetochore associated 1	-2,976	STOP
MASTL	microtubule associated serine/threonine kinase-like	-2,849	GO
MCM2	minichromosome maintenance complex component 2	-2,127	STOP

**Tabelle 3:** Regulation von Genen während der Differenzierung von Enterosphären, die direkt an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt sind; Teil 2 von 4. Auswirkung der detektierten Regulation auf Zellzyklus: **STOP:** Stopp des Zellzyklus; **GO:** Fortsetzung/ Start des Zellzyklus; **ND:** Funktion nicht eindeutig definiert.

Gen	Protein	Fold change	Rolle im Zellzyklus
MCM3	minichromosome maintenance complex component 3	-2,604	<b>STOP</b>
MCM4	minichromosome maintenance complex component 4	-1,721	<b>STOP</b>
MCM5	minichromosome maintenance complex component 5	-2,409	<b>STOP</b>
MCM7	minichromosome maintenance complex component 7	-1,807	<b>STOP</b>
MCM8	minichromosome maintenance complex component 8	-1,729	<b>STOP</b>
MCM10	minichromosome maintenance complex component 10	-2,304	<b>STOP</b>
MELK	maternal embryonic leucine zipper kinase	-3,429	<b>STOP</b>
MKI67	marker of proliferation Ki-67	-5,081	<b>STOP</b>
NCAPD2	non-SMC condensin I complex, subunit D2	-2,507	<b>STOP</b>
NCAPD3	non-SMC condensin II complex, subunit D3	-1,662	<b>STOP</b>
NCAPG	non-SMC condensin I complex, subunit G	-4,432	<b>STOP</b>
NCAPG2	non-SMC condensin II complex, subunit G2	-2,695	<b>STOP</b>
NCAPH	non-SMC condensin I complex, subunit H	-3,621	<b>STOP</b>
NDC80	NDC80 kinetochore complex component	-2,428	<b>STOP</b>
NEK2	NIMA-related kinase 2	-3,020	<b>STOP</b>
NES	nestin	2,413	<b>GO</b>
NSL1	NSL1, MIS12 kinetochore complex component	-1,689	<b>STOP</b>
NUF2	NUF2, NDC80 kinetochore complex component	-4,739	<b>STOP</b>
PARP3	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 3	2,803	<b>STOP</b>
PBK	PDZ binding kinase	-3,672	<b>STOP</b>
PDE3A	phosphodiesterase 3A, cGMP-inhibited	-1,781	<b>STOP</b>
PDE3B	phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited	-1,860	<b>STOP</b>

Fortsetzung Tabelle 4 nächste Seite



PLK1	polo-like kinase 1	-4,320	<b>STOP</b>
PLK2	polo-like kinase 2	-2,042	<b>STOP</b>
PLK4	polo-like kinase 4	-1,854	<b>STOP</b>
POLA1	polymerase (DNA directed), alpha 1, catalytic subunit	-1,966	<b>STOP</b>
POLA2	polymerase (DNA directed), alpha 2, accessory subunit	-1,593	<b>STOP</b>
POLD1	polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit	-1,506	<b>STOP</b>
POLE	polymerase (DNA directed), epsilon, catalytic subunit	-3,304	<b>STOP</b>
POLE2	polymerase (DNA directed), epsilon 2, accessory subunit	-1,991	<b>STOP</b>
POLH	polymerase (DNA directed), eta	-1,542	<b>STOP</b>
PRC1	protein regulator of cytokinesis 1	-3,160	<b>STOP</b>
PRIM1	primase, DNA, polypeptide 1 (49kDa)	-1,983	<b>STOP</b>
PSRC1	proline/serine-rich coiled-coil 1	-2,235	<b>STOP</b>
RAD51	RAD51 recombinase	-2,508	<b>STOP</b>
RAD51AP1	RAD51 associated protein 1	-2,093	<b>STOP</b>
RAD51B	RAD51 paralog B	-1,531	<b>STOP</b>
RAD51C	RAD51 paralog C	-1,572	<b>STOP</b>
RAD54B	RAD54 homolog B (S, cerevisiae)	-2,299	<b>STOP</b>
RAD54L	RAD54-like (S, cerevisiae)	-2,114	<b>STOP</b>
RFC4	replication factor C (activator 1) 4, 37kDa	-2,030	<b>STOP</b>
RFWD3	ring finger and WD repeat domain 3	-1,520	<b>ND</b>
		-1,534	

**Tabelle 4:** Regulation von Genen während der Differenzierung von Enterosphären, die direkt an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt sind; Teil 3 von 4. Auswirkung der detektierten Regulation auf Zellzyklus: **STOP:** Stopp des Zellzyklus; **GO:** Fortsetzung/ Start des Zellzyklus; **ND:** Funktion nicht eindeutig definiert.

Gen	Protein	Fold change	Rolle im Zellzyklus
RGCC	regulator of cell cycle	1,604	ND
RND3	Rho family GTPase 3	-1,514	STOP
SATB1	SATB homeobox 1	1,980	GO
SHCBP1	SHC SH2-domain binding protein 1	-3,297	STOP
SIK3	SIK family kinase 3	1,780	ND
SKA1	spindle and kinetochore associated complex subunit 1	-1,532	STOP
SKA2	spindle and kinetochore associated complex subunit 2	-1,582	STOP
SKA3	spindle and kinetochore associated complex subunit 3	-3,490	STOP
SKP2	S-phase kinase-associated protein 2, E3 ubiquitin protein ligase	-1,845	STOP
SLBP	stem-loop binding protein	-1,567	STOP
		-1,677	
SMC2	structural maintenance of chromosomes 2	-2,408	STOP
SMC4	structural maintenance of chromosomes 4	-1,723	STOP
SPAG5	sperm associated antigen 5	-3,782	STOP
SPC25	SPC25, NDC80 kinetochore complex component	-4,148	STOP
STIL	SCL/TAL1 interrupting locus	-4,020	STOP
TACC3	transforming, acidic coiled-coil containing protein 3	-2,153	STOP
TICRR	TOPBP1-interacting checkpoint and replication regulator	-3,857	STOP
TONSL	tonsoku-like, DNA repair protein	-1,617	STOP
TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	-4,814	STOP
TOPBP1	topoisomerase (DNA) II binding protein 1	-1,626	STOP
TPX2	TPX2, microtubule-associated	-4,151	STOP
TROAP	trophinin associated protein	-3,122	STOP
TTK	TTK protein kinase	-3,305	STOP
TYMS	thymidylate synthetase	-1,971	STOP
UBE2C	ubiquitin-conjugating enzyme E2C	-3,311	STOP
UBE2L6	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6	-1,675	STOP
UBE2T	ubiquitin-conjugating enzyme E2T (putative)	-1,689	STOP
UHRF1	ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1	-3,159	STOP
USP1	ubiquitin specific peptidase 1	-2,027	STOP
WEE1	WEE1 G2 checkpoint kinase	-1,908	GO

**Tabelle 5:** Regulation von Genen während der Differenzierung von Enterosphären, die direkt an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt sind; Teil 4 von 4. Auswirkung der detektierten Regulation auf Zellzyklus: **STOP:** Stopp des Zellzyklus; **GO:** Fortsetzung/ Start des Zellzyklus; **ND:** Funktion nicht eindeutig definiert.

Eine weitere Gruppe, die zur Analyse der detektierten Genregulationen erstellt wurde, enthält Gene, die essentiell für programmierten Zelltod (Apoptose) sind. Apoptose kann durch Zellstress ausgelöst werden und eine Einleitung der Apoptose hätte neben der Regulation einer Reihe typischer Apoptosegene auch die Regulation weiterer Gene zur Folge, was die Ergebnisse des durchgeführten Experiments, das ja durch Einleitung der Differenzierung hervorgerufenen Genregulationen feststellen sollte, stark verfälscht oder unbrauchbar gemacht hätte. Eine Regulierung typischer Apoptosegene konnte jedoch nur in einem geringen Maße detektiert werden (**Tabelle 6**), wobei gerade einmal 3 der 12 identifizierten Gene in eine Richtung reguliert wurden, bei der in der Literatur Hinweise auf Apoptose erwähnt wurden. Dies deutete darauf hin, dass die angewandte Methodik nicht zu einer gestiegenen Apoptoserate der Zellen führt. Bestätigt wurde diese Annahme durch später durchgeführte zellbiochemische Untersuchungen (nicht veröffentlicht).

Gen	Protein	Fold change	
<b>Apoptose</b>			
BCL3	B-cell CLL/lymphoma 3	2,320	<b>SURVIVAL</b>
BMF	Bcl2 modifying factor	1,616	<b>DEATH</b>
CARD6	caspase recruitment domain family, member 6	-1,593	<b>DEATH</b>
CHEK1	checkpoint kinase 1	-3,096	<b>SURVIVAL</b>
CHEK2	checkpoint kinase 2	-1,997	<b>SURVIVAL</b>
E2F7	E2F transcription factor 7	-2,504	<b>SURVIVAL</b>
E2F8	E2F transcription factor 8	-3,524	<b>SURVIVAL</b>
EGLN3	egl-9 family hypoxia-inducible factor 3	-1,624	<b>SURVIVAL</b>
G2E3	G2/M-phase specific E3 ubiquitin protein ligase	-1,648	<b>DEATH</b>
NOL3	nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)	1,711	<b>SURVIVAL</b>
PDCD4	programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)	-1,524	<b>SURVIVAL</b>
PIDD1	p53-induced death domain protein 1	-1,935	<b>SURVIVAL</b>

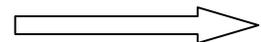
**Tabelle 6:** Regulation von Apoptose-Genen während der Differenzierung von Enterosphären. Die vierte Spalte gibt an, wie sich die analysierte Regulation in den Enterosphären nach Literaturangaben auf das Überleben der Zellen in anderen Geweben auswirken (**DEATH:** Zelltod **SURVIVAL:** Überleben der Zelle).

Das primäre Ziel dieses Versuches lag in der Identifikation von Genen, die wichtige Funktionen bei der neuronalen Entwicklung des ENS übernehmen. Mit Hilfe der Genchipanalyse konnten Regulationen bei einer großen Anzahl von Genen gezeigt werden, bei denen bereits über einen Einfluss auf die Entwicklung anderer Nervensysteme berichtet wurde: Insgesamt fand eine Regulation bei 99 Genen statt, die in diese Kategorie fallen (**Tabelle 7, Tabelle 8, Tabelle 9**). Eine Funktion bei der Homöostase von neuronalen Stammzellen konnte bei 8 dieser Gene nachgewiesen

werden. Bei 33 weiteren Genen fanden sich in der Literatur Hinweise auf Aufgaben bei der Differenzierung von Neuronen oder sie wurden bereits als Differenzierungsmarker bei neuronalen Zellen erwähnt (**Tabelle 7**).

Gen	Protein	Fold change
<b>Neuronale Stammzellen</b>		
ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2 (Junior blood group)	-1,526
ASPM	asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated (Drosophila)	-4,911
CDT1	chromatin licensing and DNA replication factor 1	-1,528
EGFL7	EGF-like-domain, multiple 7	3,132
EPHA2	EPH receptor A2	-1,529
ETV4	ets variant 4	-1,934
ETV5	ets variant 5	-2,844
		-2,651
FABP7	fatty acid binding protein 7, brain	-2,095
<b>Neuronale Differenzierung</b>		
ATOH8	atonal homolog 8 (Drosophila)	1,932
AXL	AXL receptor tyrosine kinase	2,015
CRIM1	cysteine rich transmembrane BMP regulator 1 (chordin-like)	1,999
CRLF1	cytokine receptor-like factor 1	2,382
DAB1	Dab, reelin signal transducer, homolog 1 (Drosophila)	-2,297
ELK3	ELK3, ETS-domain protein (SRF accessory protein 2)	-1,613
ESCO2	establishment of sister chromatid cohesion N-acetyltransferase 2	-4,767
GAP43	growth associated protein 43	1,613

Fortsetzung Tabelle 7 nächste Seite



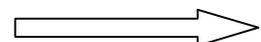
GLDN	gliomedin	5,809
HMOX1	heme oxygenase (decycling) 1	1,884
KLF9	Kruppel-like factor 9	1,592
Lmo3	LIM domain only 3	1,542
MAP6	microtubule-associated protein 6	1,874
MYRF	myelin regulatory factor	2,527
NEUROD4	neuronal differentiation 4	2,036
OLIG1	oligodendrocyte transcription factor 1	2,660
Pvr	poliovirus receptor	1,768
RGS4	regulator of G-protein signaling 4	1,955
S1PR1	sphingosine-1-phosphate receptor 1	5,073
SOCS2	suppressor of cytokine signaling 2	2,052
		2,335
WIPF1	WAS/WASL interacting protein family, member 1	1,587
<b>Neuronale Differenzierungsmarker</b>		
CALB2	calbindin 2	1,616
CNP	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase	1,732
GFAP	glial fibrillary acidic protein	2,239
MBP	myelin basic protein	1,768
Mturn	maturin, neural progenitor differentiation regulator homolog (Xenopus)	1,853
OMG	oligodendrocyte myelin glycoprotein	-1,822
OPALIN	oligodendrocytic myelin paranodal and inner loop protein	39,246
PLP1	proteolipid protein 1	1,630
S100B	S100 calcium binding protein B	-1,675
TUBB2A	tubulin, beta 2A class IIa	1,608
TUBB2B	tubulin, beta 2B class IIb	1,535
TUBB3	tubulin, beta 3 class III	1,976

**Tabelle 7:** Regulation von Genen während der Differenzierung von Enterosphären, von denen ein Einfluss auf neuronale Differenzierung bekannt ist.

Weitere Untergruppierungen wurden außerdem für Gene erstellt, die bei der Differenzierung von neuronalen Zellen bei der Ausbildung der Zellausläufer und der Synapsen benötigt werden oder die für die an den Synapsen benötigten Neurotransmitter kodieren (**Tabelle 8**).

Gen	Protein	Fold change
<b>Synapsenproteine &amp; Neurotransmitter</b>		
ABAT	4-aminobutyrate aminotransferase	-1,512
ADRA1D	adrenoceptor alpha 1D	1,803
ADRA2A	adrenoceptor alpha 2A	2,900
ADRA2B	adrenoceptor alpha 2B	-2,093
CHRM2	cholinergic receptor, muscarinic 2	1,635
CHRM3	cholinergic receptor, muscarinic 3	-1,715
CHRNA7	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 7 (neuronal)	1,772
COMT	catechol-O-methyltransferase	1,515
DDC	dopa decarboxylase (aromatic L-amino acid decarboxylase)	1,711
DNM3	dynamamin 3	2,643
EPHA5	EPH receptor A5	2,076
GRIA3	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 3	-1,528
GRIA4	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 4	-1,997
GRIK2	glutamate receptor, ionotropic, kainate 2	-1,565
GRM5	glutamate receptor, metabotropic 5	-1,600
HTR1B	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B, G protein-coupled	-2,377
HTR2B	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B, G protein-coupled	2,205
LRRTM2	leucine rich repeat transmembrane neuronal 2	3,665
LRRTM3	leucine rich repeat transmembrane neuronal 3	2,210
NTM	neurotrimin	1,820
PENK	proenkephalin	3,478
PRR7	proline rich 7 (synaptic)	1,788
SLC10A4	solute carrier family 10, member 4	1,824
		1,867
SLITRK2	SLIT and NTRK-like family, member 2	-2,414
SLITRK6	SLIT and NTRK-like family, member 6	1,672
STON2	stonin 2	4,054
STXBP3	syntaxin binding protein 3	1,730
Stxbp3b	syntaxin-binding protein 3B	1,637
SV2C	synaptic vesicle glycoprotein 2C	1,929
SYT6	synaptotagmin VI	2,571

Fortsetzung Tabelle 8 nächste Seite



Neuritenwachstum		
ATF3	activating transcription factor 3	2,579
DOK4	docking protein 4	4,937
FEZ2	fasciculation and elongation protein zeta 2 (zygin II)	1,547
NAV2	neuron navigator 2	1,647
NRCAM	neuronal cell adhesion molecule	2,496
PLXNB3	plexin B3	1,739
RGMA	repulsive guidance molecule family member a	1,552
RNF165	ring finger protein 165	-1,548
ROBO2	roundabout, axon guidance receptor, homolog 2 (Drosophila)	-2,211
SEMA3B	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3B	3,692
SEMA3E	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3E	2,877
SEMA4F	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4F	4,891
SEMA6A	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6A	-1,707
SRGAP1	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 1	1,524
UNC5B	unc-5 homolog B (C, elegans)	-1,927

**Tabelle 8:** Regulation von Genen während der Differenzierung von Enterosphären, die an der Ausbildung von Synapsen und Zellausläufern der Neurone und den für die Reizübertragung benötigten Transmittern beteiligt sind.

Es konnten außerdem 13 Wachstumsfaktoren identifiziert werden, die an der Entwicklung von Nervensystemen beteiligt sind. In der Differenzierung verstärkt exprimiert wurden 10 dieser Wachstumsfaktoren. Nur 3 wiesen eine negative Regulierung in den differenzierenden Enterosphären auf gegenüber denjenigen Enterosphären, die sich in Proliferation befanden (**Tabelle 9**).

Gen	Protein	Fold change
<b>Wachstumsfaktoren</b>		
ARTN	artemin	2,423
FGF2	fibroblast growth factor 2 (basic)	2,264
FGF5	fibroblast growth factor 5	7,704
GDF10	growth differentiation factor 10	-2,361
GDF11	growth differentiation factor 11	1,604
GDNF	glial cell derived neurotrophic factor	4,325
GFRA3	GDNF family receptor alpha 3	1,707
MET	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase	6,680
NGFR	nerve growth factor receptor	1,728
NTRK3	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3	-1,575
SNX16	sorting nexin 16	1,641
SPHK1	sphingosine kinase 1	1,704
SPRY1	sprouty homolog 1, antagonist of FGF signaling (Drosophila)	-1,647

**Tabelle 9:** Expressionsregulation von Wachstumsfaktoren während der Differenzierung von Enterosphären, die an der Nervensystementwicklung beteiligt sind.

Dass Enterosphären bei einfacher Kultivierung neben neuronalen Vorläuferzellen auch andere Zelltypen wie Endothelzellen, Fibroblasten oder auch glatte Muskelzellen besitzen, wurde bereits in den vorhergehenden Kapiteln erwähnt. Da der Fokus des Experiments auf Genexpressionsänderungen der neuronalen Vorläuferzellen lag, wurden während der Zellkultivierung Aufreinigungsschritte durchgeführt, um den Anteil dieser Zellen in den Enterosphären zu erhöhen. Die Entwicklung des ENS ist jedoch sehr komplex, und es spielen neben von neuronalen Zellen gebildeten Faktoren ebenso Faktoren eine Rolle, die von umgebendem Gewebe, z. B. von Endothelzellen, synthetisiert werden. Die untersuchten Enterosphären hatten daher gegenüber einer vollständig aufgereinigten Zellkultur den Vorteil, dass sie als Organoide mit den verschiedenen Zelltypen eine ähnliche Zellzusammensetzung darstellten, wie sie auch bei der ENS-Entwicklung *in vivo* vorzufinden ist.

Bei der der Auswertung des Experiments wurde folglich auch erwartet, dass nicht nur Expressionsänderungen bei Genen vorgefunden werden, die einen Zusammenhang zu neuraler Entwicklung besitzen, sondern ebenso auch bei Genen, die bei der Differenzierung nicht-neuronaler Zelltypen im Gastrointestinaltrakt eine Rolle spielen. Bei insgesamt 30 der identifizierten regulierten Gene wurde bereits in anderen Studien beschrieben, dass sie an der Differenzierung von glatten Muskelzellen und den Schrittmacherzellen der glatten Muskulatur (Interstitielle Zellen von Cajal) im Intestinaltrakt oder in anderen Geweben beteiligt sind (**Tabelle 10**).

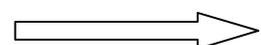
Gen	Protein	Fold change
<b>Glatte Muskelzellen</b>		
ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	1,693
ACTG2	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	2,336
ACTN1	actinin, alpha 1	-1,724
AEBP1	AE binding protein 1	2,702
AFAP1	actin filament associated protein 1	1,638
ARID5B	AT rich interactive domain 5B (MRF1-like)	1,521
Cald1	caldesmon 1	-1,535
CNN1	calponin 1, basic, smooth muscle	1,652
ENG	endoglin	-1,552
ENPP1	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1	-1,522
ENPP2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	2,959
ENTPD1	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	1,636
FOSL2	FOS-like antigen 2	2,566
GAMT	guanidinoacetate N-methyltransferase	1,725
MYO1E	myosin IE	1,569
MYO5A	myosin VA (heavy chain 12, myosin)	1,680
MYO7B	myosin VIIB	1,710
MYO18A	myosin XVIII A	1,994
MYPN	myopalladin	1,570
NEB	nebulin	1,569
Nebi	nebulette	2,378
NUP210	nucleoporin 210kDa	-1,838
RBM24	RNA binding motif protein 24	1,548
SMTN	smoothelin	-1,778
SSPN	sarcospan	1,603
TAGLN	transgelin	2,706
<b>ICCs (Interstitial cells of Cajal)</b>		
GUCY1A3	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	-1,876
GUCY1B3	guanylate cyclase 1, soluble, beta 3	-2,008
KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	-1,798
KITLG	KIT ligand	-1,541

**Tabelle 10:** Regulation von Genen während der Differenzierung von Enterosphären, die Einfluss auf glatte Muskelzellen oder Schrittmacherzellen ausüben.

Ebenso konnte die Regulierung einer Reihe von Genen beobachtet werden, die für Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) kodieren (**Tabelle 11**). ECM-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Migration der Neuralleistenzellen in das Zielgewebe [170] und beim Auswachsen von Axonen [171]. Bei der Differenzierung der Vorläuferzellen üben ECM-Proteine auch Einfluss darauf aus, was für ein Zelltyp gebildet wird [172]. Ihre ubiquitäre Aufgabe besteht jedoch im Zusammenhalt der einzelnen Zellen und der Strukturierung der verschiedenen Gewebetypen. Bei 37 Genen, die für ECM-Proteine wie Kollagene, Integrine und Metallopeptidasen kodieren, konnten Expressionsunterschiede zwischen Proliferation und Differenzierung festgestellt werden.

Gen	Protein	Fold change
CHSY3	chondroitin sulfate synthase 3	-1,645
COL6A5	collagen, type VI, alpha 5	1,527
COL12A1	collagen, type XII, alpha 1	-1,973
COL14A1	collagen, type XIV, alpha 1	6,135
COL16A1	collagen, type XVI, alpha 1	1,666
COL18A1	collagen, type XVIII, alpha 1	1,595
COL27A1	collagen, type XXVII, alpha 1	1,522
COLGALT2	collagen beta(1-O)galactosyltransferase 2	-1,564
CSPG4	chondroitin sulfate proteoglycan 4	-2,952
CSPG5	chondroitin sulfate proteoglycan 5 (neuroglycan C)	-1,585
CYR61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	1,748
ECM1	extracellular matrix protein 1	2,580
HSPG2	heparan sulfate proteoglycan 2	1,923
ITGA1	integrin, alpha 1	-1,665
ITGA4	integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)	-2,324
ITGA7	integrin, alpha 7	4,203
ITGA8	integrin, alpha 8	-2,262
ITGA11	integrin, alpha 11	1,762
ITGB3	integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa. antigen CD61)	-5,342
ITGB4	integrin, beta 4	1,567
KRT80	keratin 80	2,833
LAMA4	laminin, alpha 4	-1,537
LAMA5	laminin, alpha 5	1,684

Fortsetzung Tabelle 11 nächste Seite



LOX	lysyl oxidase	3,250
LOXL4	lysyl oxidase-like 4	2,427
		2,417
MATN2	matrilin 2	2,570
MMP2	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	1,668
MMP9	matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	-5,557
MMP15	matrix metalloproteinase 15 (membrane-inserted)	-2,017
MMP16	matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)	-1,634
MMP17	matrix metalloproteinase 17 (membrane-inserted)	1,612
MMP19	matrix metalloproteinase 19	3,236
MMP28	matrix metalloproteinase 28	1,956
NDST3	N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 3	-5,557
P4HA1	prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide I	-1,958
PLOD3	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	2,250
UGDH	UDP-glucose 6-dehydrogenase	1,529

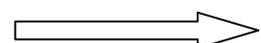
**Tabelle 11:** Regulation der Genexpression von extrazellulären Matrixproteinen während der Differenzierung von Enterosphären.

Eine Veränderung der Genexpression verschiedener Proteine des Wnt-Signalweges konnte ebenfalls festgestellt werden. Die 35 analysierten Genregulationen konnten den funktionellen Gruppen Wnt-Signalweg, Wnt-Zielgene, Agonisten/ Inhibitoren und Aktivatoren zugeteilt werden (**Tabelle 12, Abb. 20**).

Alle Rohdaten der vergleichenden Genexpressionsanalyse proliferierender und differenzierender Enterosphären sind in der NCBI's Gene Expression Omnibus – Datenbank abgelegt und sind abrufbar unter dem GEO-Zugangscode GSE68797 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE68797>).

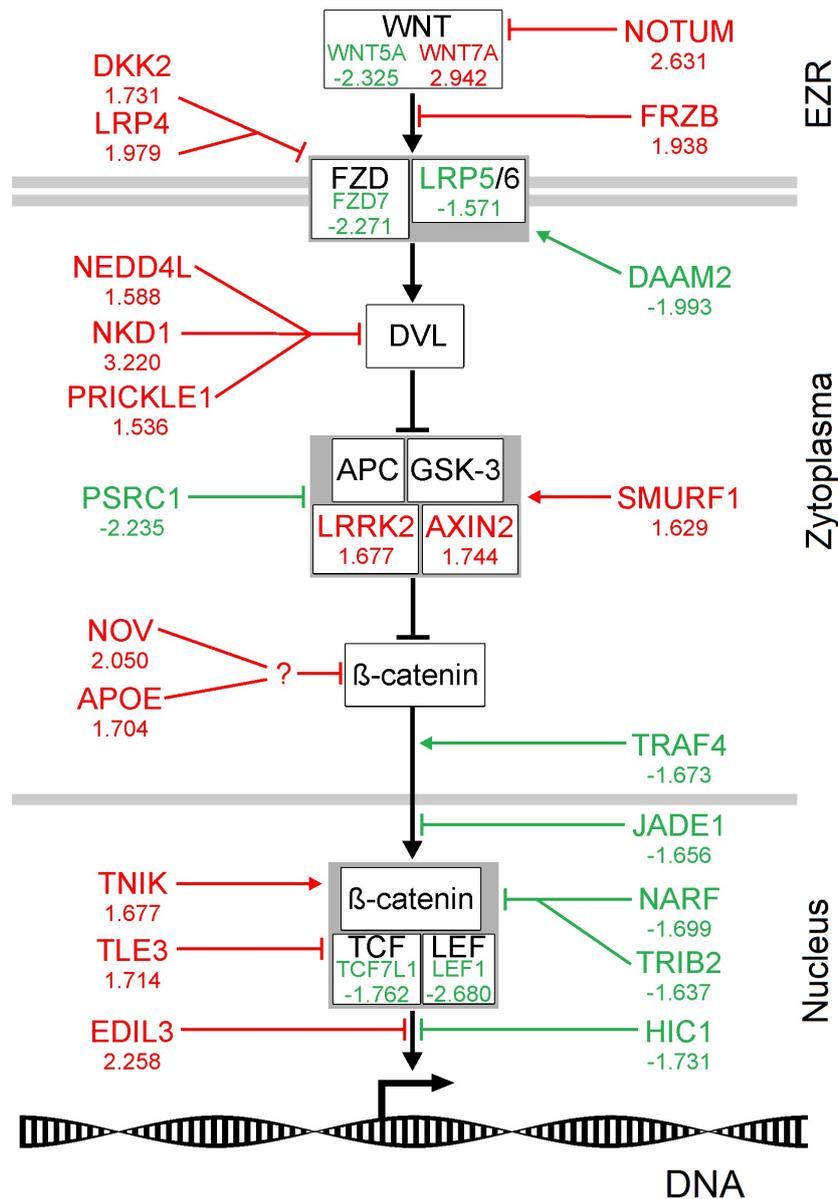
Gen	Protein	Fold change
<b>Wnt-Signalweg</b>		
FZD7	frizzled class receptor 7	-2,271
LEF1	lymphoid enhancer-binding factor 1	-2,680
LRP5	low density lipoprotein receptor-related protein 5	-1,571
LRRK2	leucine-rich repeat kinase 2	1,677
TCF19	transcription factor 19	-2,217
TCF7L1	transcription factor 7-like 1 (T-cell specific, HMG-box)	-1,762
WNT5A	wingless-type MMTV integration site family, member 5A	-2,325
WNT7B	wingless-type MMTV integration site family, member 7B	2,942
<b>Zielgene</b>		
ARL4C	ADP-ribosylation factor-like 4C	2,179
AXIN2	axin 2	1,744
CCND1	cyclin D1	-2,476
CSRNP1	cysteine-serine-rich nuclear protein 1	1,822
RACGAP1	Rac GTPase activating protein 1	-3,201
SPRY2	sprouty homolog 2 (Drosophila)	-1,771
SPRY4	sprouty homolog 4 (Drosophila)	-2,771
WISP1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	2,489
<b>Agonisten / Inhibitoren</b>		
APOE	apolipoprotein E	1,704
DKK2	dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 2	1,731
EDIL3	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3	2,258
FRZB	frizzled-related protein	1,938
HIC1	hypermethylated in cancer 1	-1,731
JADE1	jade family PHD finger 1	-1,656
LRP4	low density lipoprotein receptor-related protein 4	1,979
NARF	nuclear prelamin A recognition factor	-1,699
NEDD4L	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like, E3 ubiquitin protein ligase	1,588
NKD1	naked cuticle homolog 1 (Drosophila)	3,220
NOTUM	notum pectinacetyltransferase homolog (Drosophila)	2,631
NOV	nephroblastoma overexpressed	2,050
PRICKLE1	prickle homolog 1 (Drosophila)	1,536
TLE3	transducin-like enhancer of split 3	1,714
TRIB2	tribbles pseudokinase 2	-1,637

Fortsetzung Tabelle 12 nächste Seite



Aktivatoren		
DAAM2	dishevelled associated activator of morphogenesis 2	-1,993
PSRC1	proline/serine-rich coiled-coil 1	-2,235
TNIK	TRAF2 and NCK interacting kinase	1,677
TRAF4	TNF receptor-associated factor 4	-1,673

**Tabelle 12:** Genexpressionsänderungen von Genen des Wnt-Signalwegs, die bei der frühen Differenzierungsphase in Enterosphären auftreten.



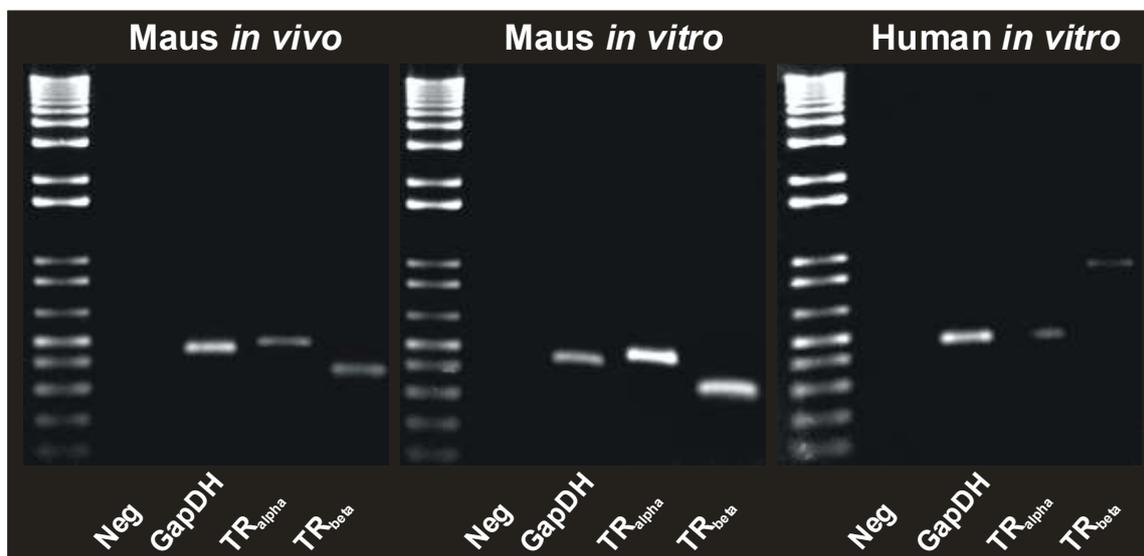
**Abb. 20:** Schematische Darstellung der Genregulationen im Wnt-Signalweg in Enterosphären nach Einleitung der Differenzierung. Spitze Pfeile bedeuten einen hemmenden, flache Pfeile einen aktivierenden Einfluss. Gene, die nach Start der Differenzierung hochreguliert wurden, sind in rot markiert, Gene mit negativer Regulation in grün. Der genaue Wert der Expressionsregulation ist jeweils unter dem Namen jedes einzelnen Gens notiert. (aus [173]. Erstellt von Peter Neckel). EZR: Extrazellulärraum

### 3.3 Nachweis der Schilddrüsenhormonrezeptoren in murinem und humanem ENS -Gewebe und murinen Enterosphären

Schilddrüsenhormone wie T3 wirken durch Bindung an ihre zugehörigen Hormonrezeptoren. Es wurde daher untersucht, ob im Zielgewebe und in den Zielzellen die Schilddrüsenhormonrezeptortypen Tr $\alpha$  und Tr $\beta$  in murinen und humanen Enterosphären und murinem Darmgewebe des enterischen Nervensystems exprimiert werden und somit die Grundvoraussetzung für den Einfluss von T3 auf die Zellen gegeben ist.

Durch eine RT-PCR konnte gezeigt werden, dass sowohl in den murinen Enterosphären als auch in den murinen und humanen Geweben T3- bindende Tr $\alpha$  als auch Tr $\beta$ -Rezeptoren vorhanden sind (**Abb. 21**).

Eine genauere Lokalisation der Schilddrüsenhormonrezeptoren sollte in diesem Projekt nach der RT-PCR-Analyse durch immunhistochemische Färbungen erfolgen. Dies scheiterte jedoch daran, dass der verwendete Antikörper keine genaueren Ergebnisse liefern konnte; er wurde kurze Zeit nach Durchführung der Versuche vom Markt genommen. Zum Zeitpunkt der Versuchsserie waren auf dem Markt auch keine geeigneten Antikörper gegen Schilddrüsenhormonrezeptoren verfügbar, die sich für eine immunhistochemische Analyse eignen.



**Abb. 21:** RT-PCR-Analyse von Schilddrüsenhormonrezeptoren in murinen und humanen Enterosphären (*in vitro*) und in murinem Gewebe des ENS (*in vivo*). Negativkontrolle: PCR von DNase-behandelten RNA-Proben ohne RT-PCR. Zur Bestimmung der Größe der detektierten Produkte wurde eine 1kb DNA-Leiter verwendet (1 Kb Plus DNA ladder<sup>TM</sup>, Invitrogen)

### 3.4 Untersuchung des Einflusses von T3 auf die Proliferationskapazität von Enterosphären

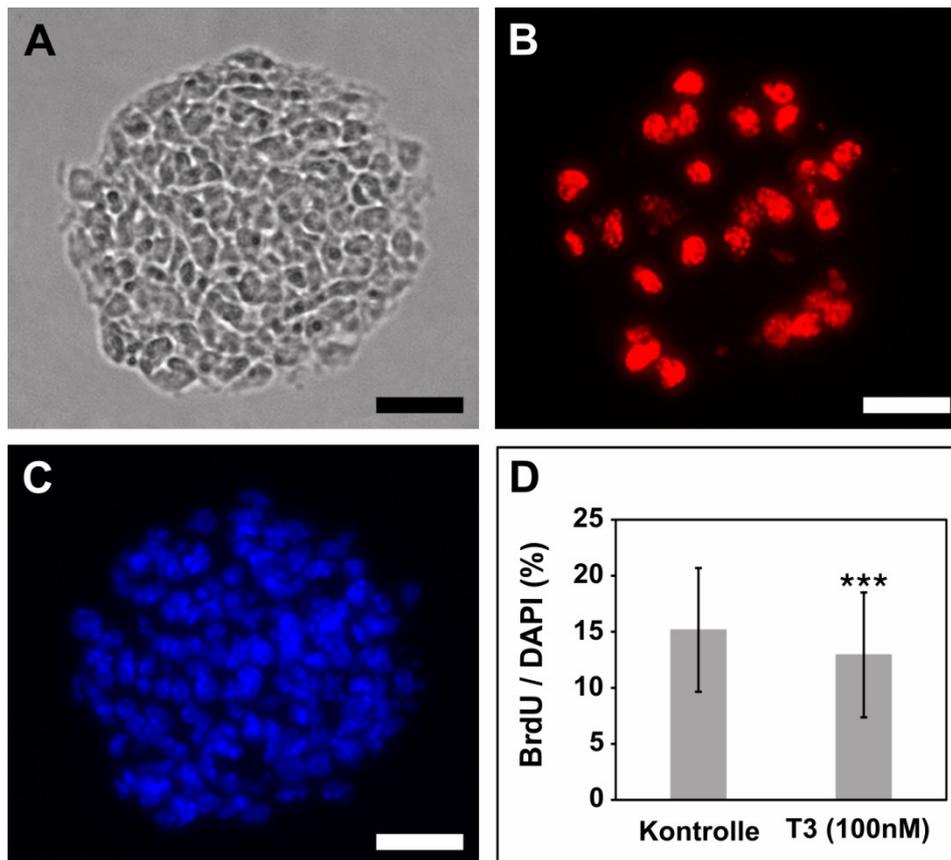
Nach dem Nachweis von Schilddrüsenhormonrezeptoren stellte sich die Frage, auf welche Weise eine Kopplung von T3 an die Rezeptoren der Zielzellen deren Entwicklung beeinflusst. Im ersten durchgeführten Zellkulturassay sollte daher ein möglicher Einfluss auf die Proliferationskapazität mit Hilfe des Thymidin-Analogons BrdU untersucht werden. Das eingesetzte Zellmaterial wurde jeweils aus fünf bis sechs neonatalen C57BL/6-Mäusen gewonnen, wobei die Jungtiere jedes Versuchs von unterschiedlichen Elterntieren abstammten. Eine BrdU-Aufladung erfolgte am Ende der Proliferation, eine Stunde bevor die Enterosphären mit PFA fixiert wurden.

Von den hergestellten Paraffinblöcken wurden im Abstand von 200  $\mu\text{m}$  jeweils 5  $\mu\text{m}$ -Schnitte entnommen: Diese Vorgehensweise sollte sicherstellen, dass keine Enterosphäre zweimal in die Bewertung aufgenommen wurde.

Insgesamt wurden in 3 unabhängigen Versuchen Paraffinschnitte von 138 unbehandelten Enterosphären und von 150 mit T3 behandelten Enterosphären ausgewertet. Da mit zunehmender Größe und Dichte die Proliferationsrate zur Mitte von Enterosphären stark abnimmt, wurde festgelegt, dass nur Schnitte von Enterosphären mit einer standardisierten minimalen und maximalen Querschnittsfläche ausgewertet werden. Diese lag zwischen 2125  $\mu\text{m}^2$  und 8072  $\mu\text{m}^2$ .

Um eine Aussage über die Proliferationskapazität der Zellen treffen zu können, wurde das Verhältnis der BrdU-positiven Zellen (**Abb. 22B**) zur Gesamtzahl der Zellen jeder Enterosphäre (DAPI positive Zellen; **Abb. 22C**) bestimmt.

Die Auswertung der erhaltenen Daten zeigte eine statistisch signifikante Reduktion der Proliferationskapazität der mit T3 behandelten Enterosphären um 15,1 % gegenüber den Enterosphären der Kontrollgruppe (Kontrolle: 15,2 %  $\pm$  5,5 % (MW  $\pm$  StAbw); T3: 12,9 %  $\pm$  5,6 % (MW  $\pm$  StAbw);  $p \leq 0,001$ ) (**Abb. 22D**).

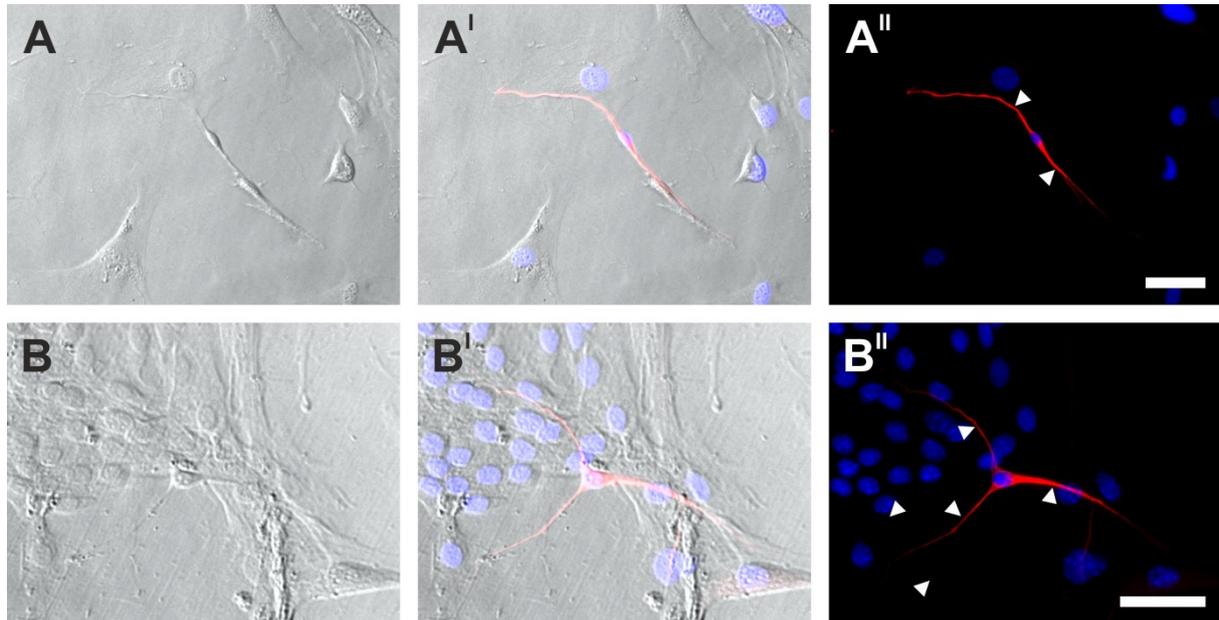


**Abb. 22:** Einfluss von T3 auf die Proliferationskapazität von Enterosphären. Murine Enterosphären wurden 9 Tage in Proliferation gehalten. In den letzten 48 Std wurde T3 (100 nM) und 1 Std vor Beenden der Kultivierung wurde dem Medium BrdU zugegeben. **(A-C)** Querschnitt einer einzelnen mit BrdU aufgeladenen Enterosphäre: **(A)** Durchlichtaufnahme; **(B)** BrdU-Färbung (rot); **(C)** DAPI-Kernfärbung (blau). Maßstabsbalken (A-C): 20  $\mu$ m. **(D)** Proliferationsrate in T3-behandelten und unbehandelten Enterosphären (Kontrolle): Prozentualer Anteil an BrdU-positiven Zellen zur Gesamtzahl (DAPI) als MW  $\pm$  StAbw. \*\*\*:  $p \leq 0,001$  zur Kontrolle.

### 3.5 Einfluss von T3 auf die Differenzierung von ENS - Vorläuferzellen

Neben dem Einfluss auf die Proliferationskapazität sollte in einem weiteren Zellkulturassay auch der Einfluss von T3 auf die Differenzierung enterischer Vorläuferzellen untersucht werden. Dazu wurden die Zellen nach der Präparation für 7 Tage unter Proliferationsbedingungen kultiviert und anschließend für 1 Woche unter T3-Zugabe differenziert. Nach Abstoppen der Versuche mit 4% PFA und der immunhistochemischen Färbung der Zellen mit dem neuronalen Marker  $\beta$ -Tubulin III (TUJ1) wurde anschließend von  $\beta$ -Tubulin III-positiven Zellen, die in der Zellkultur vereinzelt ohne Kontakt zu anderen Zellen lagen, sowohl der längste Zellausläufer

gemessen, als auch die Anzahl der primären Verzweigungen am Soma gezählt (**Abb. 23**).



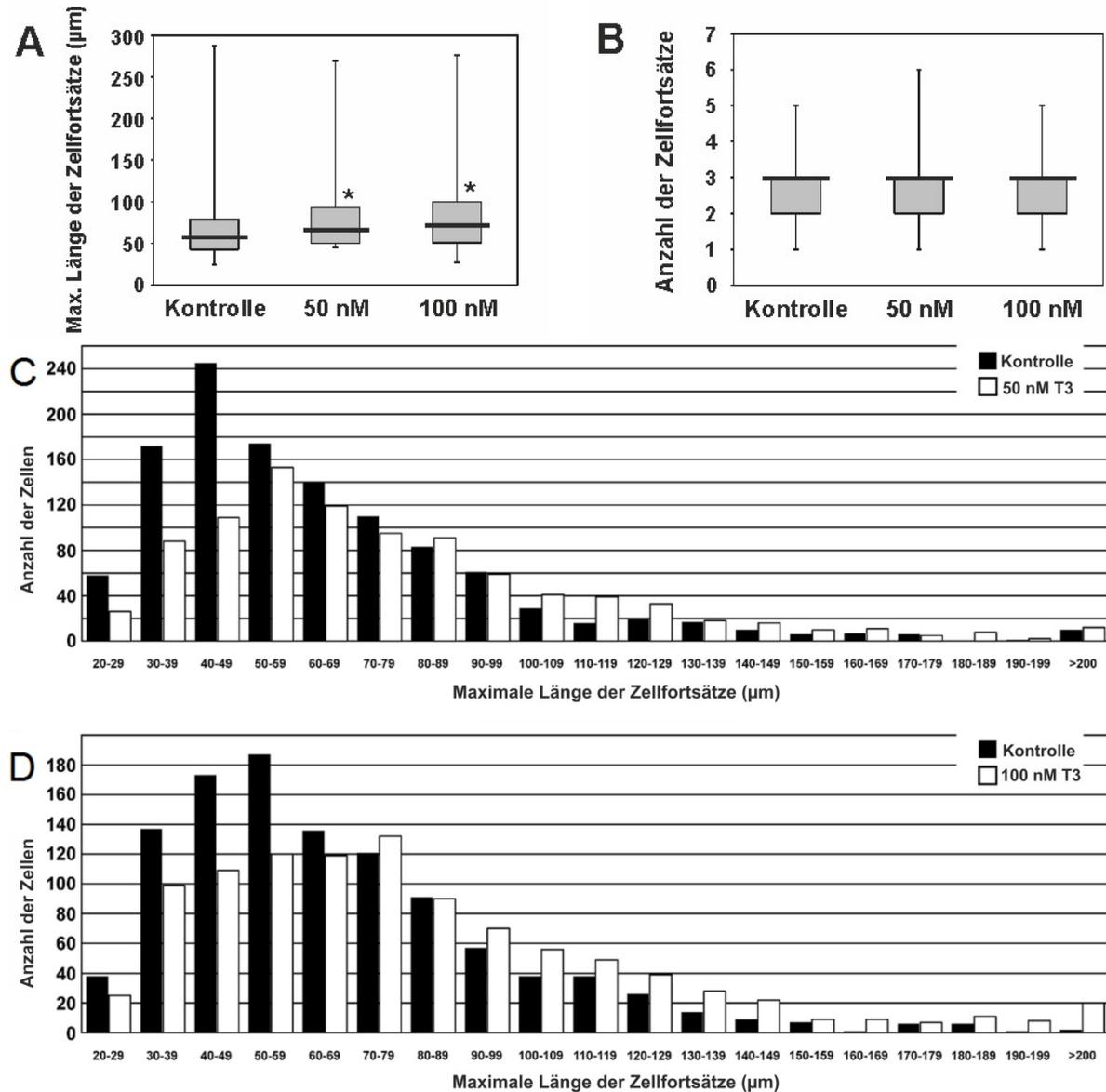
**Abb. 23:** Immunhistochemische Färbung einzelliger  $\beta$ -Tubulin III (TUJ1)-positiver ENS-Zellen nach 7 Tagen Differenzierung. Ausgewertet wurden TUJ1-positive Zellen; **A-A''**: Bipolare TUJ1-positive Zelle; **B-B''**: Tripolare TUJ1-positive Zelle; **A,B**: Hellfeld; **A',B'**: Hellfeld mit  $\beta$ -Tubulin (TUJ, rot) und Zellkernen (DAPI, blau); **A'', B''**:  $\beta$ -Tubulin (TUJ, rot) und Zellkerne (DAPI, blau); Pfeile zeigen einzelne Neuriten; Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.

Insgesamt wurden drei voneinander unabhängige Versuche mit Mäusen von jeweils dem gleichen Elterntier durchgeführt. Dabei wurden 935 Zellen, die mit 50 nM T3 behandelt wurden, 1022 mit 100 nM T3 behandelte Zellen und 2254 Zellen der Kontrollgruppe ausgewertet.

Die Auswertung zeigte bei T3 behandelten TUJ1-positiven Zellen bei 50 nM ein um 16 % gesteigertes und bei 100 nM ein um 24 % gesteigertes Wachstum der Zellausläufer (50 nM T3: 67  $\mu$ m (Median), 45-270  $\mu$ m (Min.-Max.),  $p \leq 0,001$  (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test); 100 nM T3: 72  $\mu$ m (Median), 27-276  $\mu$ m (Min.-Max.),  $p \leq 0,001$  (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test); Negativkontrolle: 58  $\mu$ m (Median), 25-288  $\mu$ m (Min.-Max.) (**Abb. 24A, C, D**).

Bei der Auszählung der primären Verzweigungen am Soma konnte weder bei der mit 50 nM T3 behandelten Gruppe, noch bei der mit 100 nM T3 behandelten Gruppe ein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (50 nM T3: 3 (Mittelwert) 1-6 (Min.-Max.),  $p = 0,858$  (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test);

100 nM T3: 3 (Mittelwert) 1-5 (Min.-Max.),  $p = 0,185$  (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test); Kontrolle: 3 (Mittelwert) 1-5 (Min.-Max.) (**Abb. 24B**).



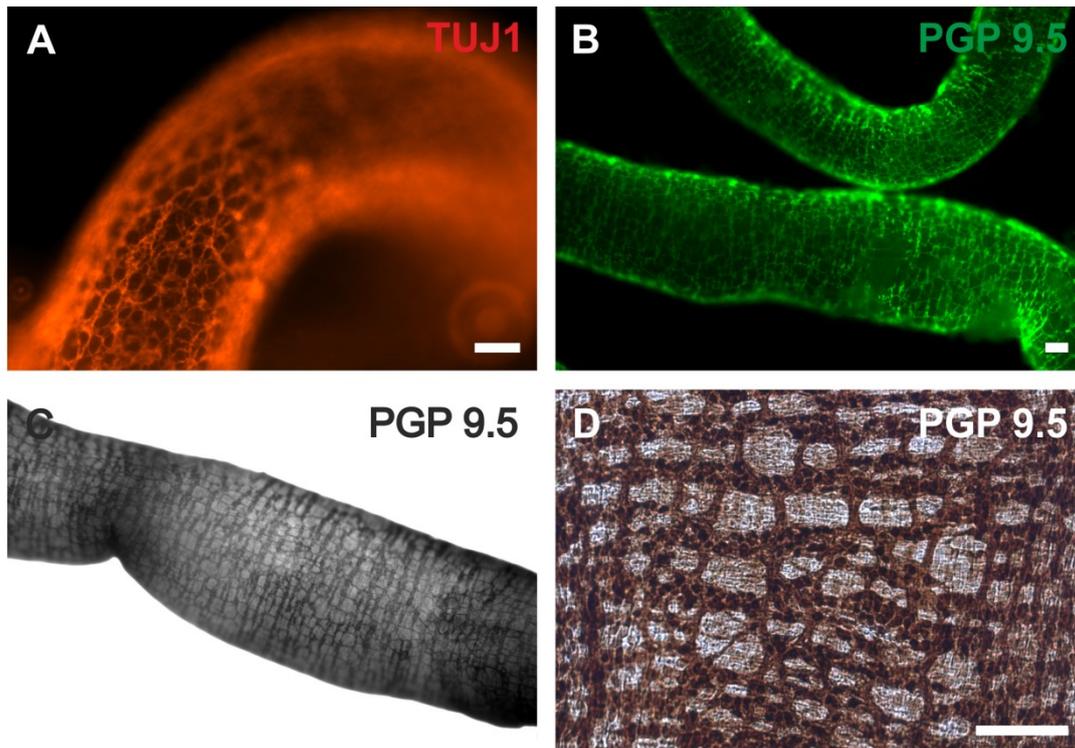
**Abb. 24:** Analyse des T3-Einflusses auf Länge der Zellfortsätze und Anzahl der primären Verzweigungen  $\beta$ -Tubulin III (TUJ1)-positiver neuraler Vorläuferzellen des ENS. Enterosphären wurden für 7 Tage expandiert; anschließend folgte eine 7-tägige Differenzierungsphase unter T3-Behandlung. **A:** Durchschnittliche maximale Länge der Zellfortsätze (**B**) Anzahl der primären Zellfortsätze, die ihren Ursprung im Soma hatten, (**C-D**) Graphische Darstellung der Ergebnisse von (A) in Gruppen mit 10  $\mu\text{m}$ -Abständen.

### 3.6 Untersuchung von Schilddrüsenhormonrezeptor - Knockout - Tiermodellen *in vivo*

In den durchgeführten Zellkulturassays konnte ein Einfluss von Trijodthyronin auf Proliferation und Differenzierung von ENS-Vorläuferzellen *in vitro* nachgewiesen werden. Mit Hilfe einer RT-PCR-Analyse konnte außerdem gezeigt werden, dass beide Schilddrüsenhormonrezeptortypen sowohl in Enterosphären *in vitro* als auch in murinem und humanem Darmgewebe *in vivo* exprimiert werden. Dies deutete darauf hin, dass die Wirkung der Schilddrüsenhormone im ENS zumindest teilweise auf der Bindung von T3 an Schilddrüsenhormon-Rezeptoren basiert.

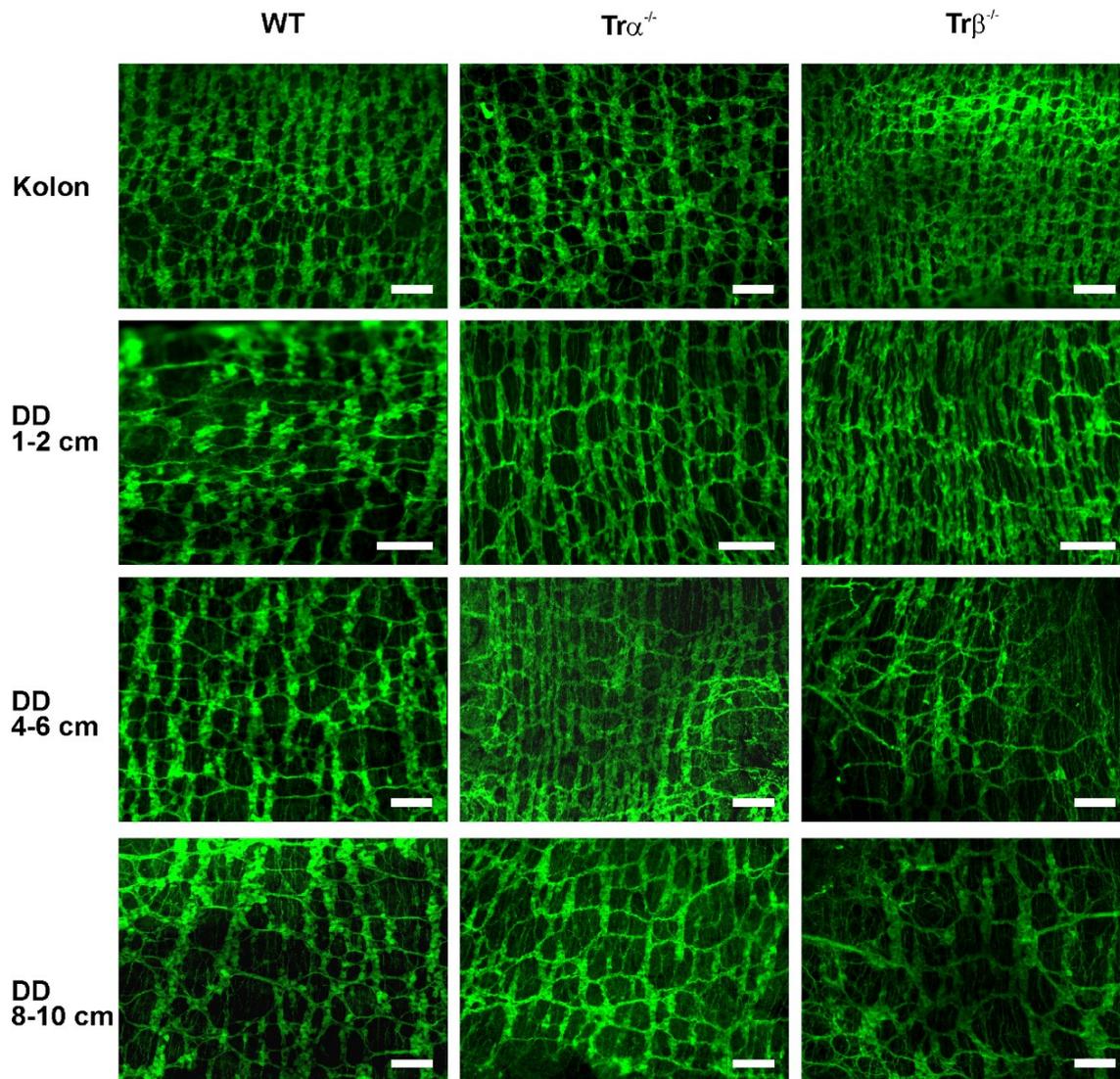
Es sollte daher im folgenden Schritt untersucht werden, ob das Ausschalten einzelner Schilddrüsenhormonrezeptortypen im Knockout-Mausmodell einen Einfluss auf die Struktur des enterischen Nervensystems *in vivo* hat. Für das Experiment standen neonatale  $Tr\alpha 1^{-/-}$ -Knockout- und  $Tr\beta^{-/-}$ -Knockout-Mäuse zur Verfügung.

Zunächst wurden verschiedene immunhistochemische Whole mount-Färbungen von murinen neonatalen Darmresektaten etabliert. Die Färbung der enterischen Ganglien wurde mit neuronalen Zellmarkern gegen  $\beta$ -Tubulin und PGP9.5 durchgeführt. Eine Auswertung sollte durch Messung der Abstände zwischen den einzelnen Ganglien bzw. Ermittlung der Netzgröße des ENS-Netzwerkes erfolgen. Dazu wurden mit einem Laserscanning-Mikroskop jeweils Aufnahmen des Kolons, sowie Aufnahmen des Dünndarms in einer Entfernung von 1-2 cm, 4-6 cm und 8-10 cm proximal zum Kolon angefertigt (**Abb. 25**).



**Abb. 25:** Immunhistochemische Whole mount-Färbungen des murinen ENS. **(A)** Fötaler Darm Stadium E14, **(B-D)** Neonataler Darm (P0). Immunhistochemische Färbungen gegen  $\beta$ -Tubulin III (TUJ1) **(A)** und PGP9.5 **(B-D)**. **(C, D)**: DAB-Färbungen von neonatalem Dünndarm komplett **(C)** und von Ring- und Längsmuskelschicht mit innenliegendem Plexus Myentericus nach Abziehen **(D)**. Maßstabsbalken: 100  $\mu$ m.

Bei den durchgeführten Analysen wurde eine sehr hohe Varianz der Messwerte zwischen den einzelnen Explantaten und auch innerhalb eines einzelnen Explantats festgestellt. Da die Messwerte durch die Flexibilität des Darmschlauches stark beeinflusst wurden, wäre für eine statistisch verwertbare Aussage eine sehr große Anzahl an Wildtyp und Knockout-Mäusen nötig gewesen. Da jedoch die Thr-Knockoutmäuse eine geringere Fertilität aufwiesen und dadurch nur eine sehr begrenzte Anzahl an Versuchstieren (Im Versuchszeitraum 8 neonatale  $Tr\alpha^{-/-}$  und 8 neonatale  $Tr\beta^{-/-}$ -Mäuse) für dieses Experiment zur Verfügung stand, wurde ein weiteres Vorgehen in diese Richtung als nicht praktikabel verworfen.



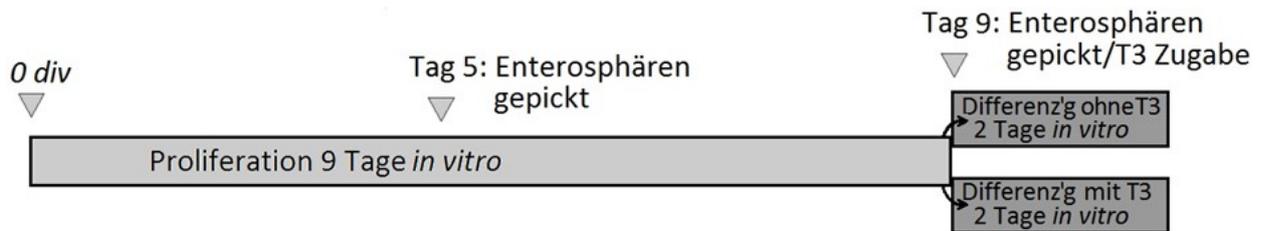
**Abb. 26:** Immunhistochemische Vergleichsaufnahmen des murinen ENS von WT-,  $Tr\alpha^{1-/-}$ -KO- und  $Tr\beta^{-/-}$ -KO-Mäusen. **(A)** Es wurden jeweils Aufnahmen von Kolon-Gewebe und von Dünndarm-Gewebe (DD) ascendierend vom Kolon in 1-2 cm, 4-6 cm und 8-10 cm aufgenommen. Maßstabsbalken: 100  $\mu$ m.

### 3.7 Einfluss von T3 auf die Genregulation während der Differenzierung von Enterosphären

In den durchgeführten Zellkulturassays konnte eine hemmende Wirkung von T3 auf die Zellproliferation und eine Stimulation auf das Wachstum von Zellausläufern gezeigt werden. Außerdem wurde durch eine RT-PCR-Analyse festgestellt, dass der genetische Code für beide Schilddrüsenhormonrezeptortypen  $Tr\alpha$  und auch  $Tr\beta$  in präpariertem Darmmuskulgewebe und Enterosphären *in vitro* vorhanden ist. Dies legte nahe, dass der Einfluss von Schilddrüsenhormonen auf Vorläuferzellen des ENS durch eine rezeptorbasierte Genregulation erfolgt. Mit Hilfe eines Affymetrix Microarray-Genchips sollte daher der bei Enterosphären beobachtete stimulierende

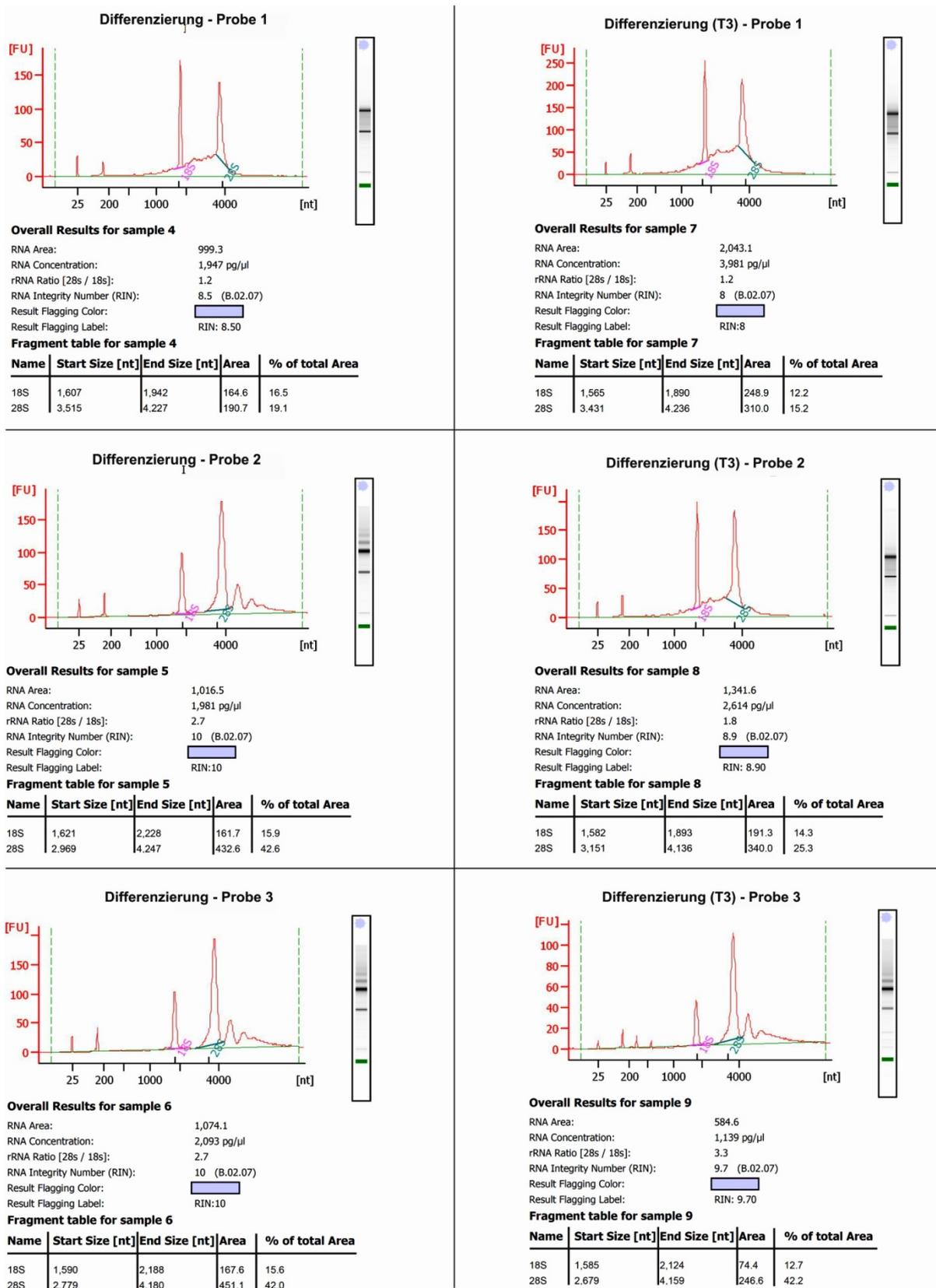
Effekt auf das Auswachsen der Zellfortsätze von ENS Vorläuferzellen während der Differenzierung auf Genexpressionsebene untersucht werden.

Da das Interesse auf der früh induzierten Genregulation lag, wurden die verwendeten Enterosphären vor der Untersuchung der Genexpression nach 9 Tagen in Proliferationsmedium nur für 48 Stunden differenziert (**Abb. 27**). In 50% der Zellkulturplatten wurde dabei in den letzten 24 Stunden der Differenzierung 100 nM T3 zugegeben.



**Abb. 27:** Ablauf der Zellkulturphase der vergleichenden Genexpressionsanalyse (Differenzierung ohne gegenüber Differenzierung mit T3-Zugabe). Enterosphären wurden an Tag 5 und Tag 9 in neue Zellkulturschalen überführt. T3 wurde 24 Stunden vor Ende des Experiments dem Differenzierungsmedium zugegeben. div: Anzahl der Tage in Kultur *in vitro* (engl. „days *in vitro*“)

Nach der Extraktion wurden die einzelnen RNA-Proben auf ihre Qualität untersucht: Es wurde der RNA Integrity-Wert (RIN), der durch einen Algorithmus aus dem Verhältnis der 28S- und 18S-Ribosomenuntereinheiten berechnet wird, bestimmt. Dieser lag bei allen untersuchten Proben zwischen 8 und 10 (**Abb. 28**).



**Abb. 28:** Messung der RNA-Qualität vor Durchführung der Genchip-Analyse. Diese basiert auf dem RNA integrity-Wert, der auf einer Berechnung aus dem Verhältnis der 28S- und 18S-Ribosomenuntereinheiten basiert. Die RNA-Qualität lag mit RIN-Werten zwischen 8 und 10 vor der Genexpressionsanalyse in einem optimalen Bereich.

Die erhaltenen Werte bedeuteten eine optimale Ausgangslage für die nachfolgende Expressionsanalyse; Fleige et al. definieren einen RIN-Wert ab 5 als gut geeignet und einen RIN-Wert ab 8 als perfekt geeignet für eine weitere Analyse wie Sequenzierung, real time PCR oder eine Genchipanalyse [169].

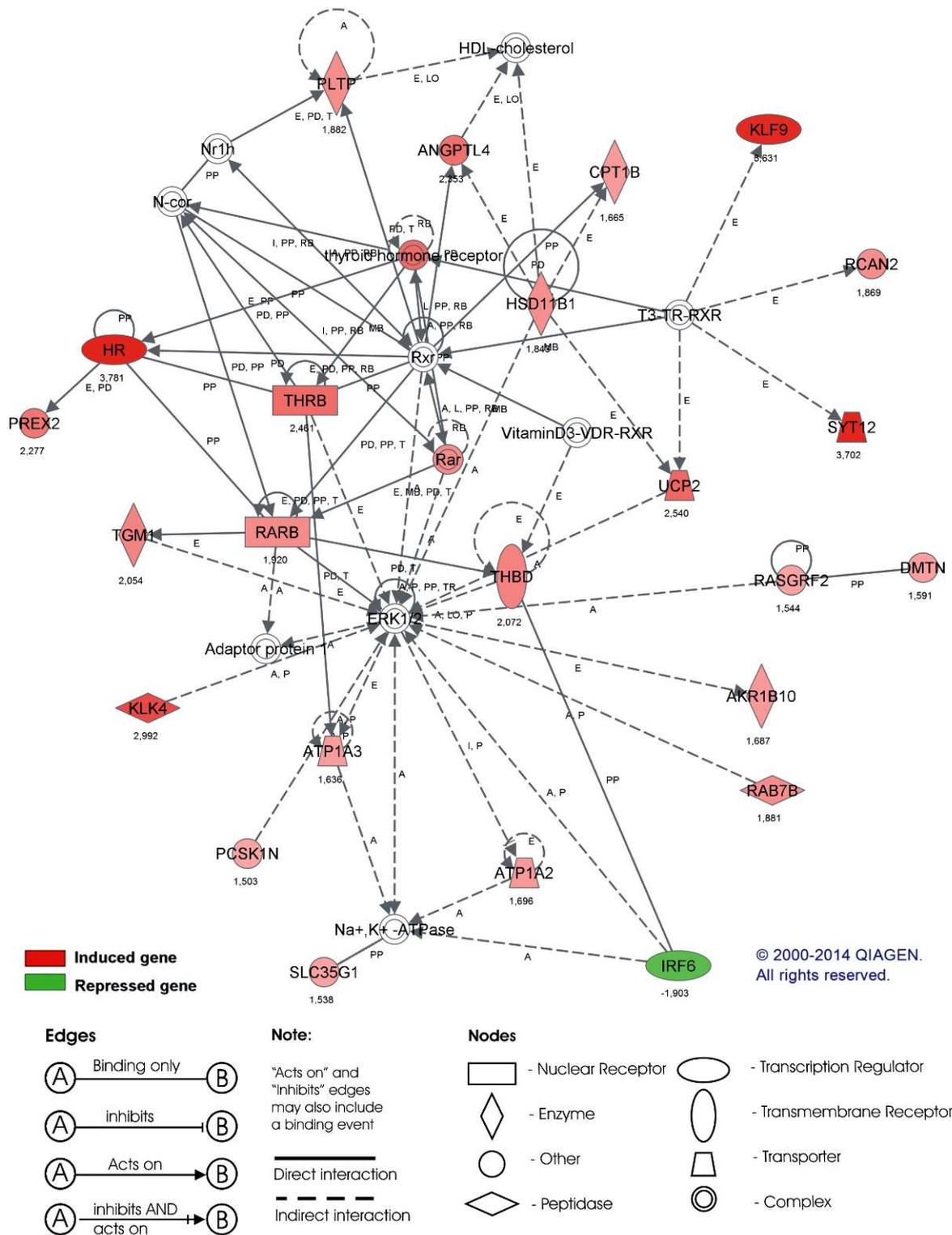
Nach der Prozessierung der Affymetrix-Chips wurden diese auf Hybridisierungsfehler und Artefakte untersucht und mit Hilfe eines RMA-Algorithmus das Hintergrundrauschen herausgerechnet, die Daten innerhalb und zwischen den Slides normalisiert und anschließend logarithmiert.

Die Auswertung und Analyse der Chipdaten erfolgte mit Hilfe der Analysesoftware IPA („Ingenuity Pathway Analysis“) von Ingenuity.

Um die genregulatorischen Einflüsse von T3 auf differenzierende Enterosphären analysieren zu können, wurden mit Hilfe des Affymetrix-Genchips die Genexpressionen von Enterosphären, die unter T3-Zugabe differenziert wurden, und die Genexpressionen in differenzierenden Enterosphären ohne T3-Zugabe verglichen.

Es konnten 434 Transkripte identifiziert werden, deren Expression durch T3-Zugabe während der Differenzierung mindestens 1,5-fach reguliert wurde (IPA-Datenbank Stand November 2014). Bei 338 der Transkripte handelte es sich um Gene, die bei Refseq charakterisiert sind. 75 % (255) der Gene wurden durch T3 positiv reguliert, bei 25 % (83) der Gene konnte eine durch T3 verursachte negative Regulation beobachtet werden.

Eine der Funktionen der IPA-Software besteht darin, aus den eingegebenen Daten aufgrund der Hinweise aus der Literatur Netzwerke zu erstellen, die graphisch darstellen, wie sich die Gene in ihrer in ihrer Regulation gegenseitig beeinflussen. Das größte dabei von der Software identifizierte zusammenhängende Netzwerk bestand dabei aus 25 durch T3 im Chipversuch regulierte Gene, die im Zusammenhang mit Nervensystementwicklung, Erbkrankheiten und neuronalen Erkrankungen stehen (**Abb. 29**). Zusätzlich wurden von der Software zu diesem Netzwerk auch Gene hinzugefügt, von denen man aufgrund von Hinweisen in der Literatur ausgehen muss, dass zwischen ihnen und den T3-regulierten Genen ein funktioneller Zusammenhang besteht. Dabei konnten vor allem viele Verbindungen zur MAP-Kinase *ERK1/2* und dem Retinoid-Rezeptor (*Rxr*) identifiziert werden. *ERK1/2* wird z. B. für die Entwicklung des Cortex benötigt; Deletionen in *ERK1* oder *ERK2* führen zu einer Fehlentwicklung des Cortex in der Maus [174]. Retinolsäure beeinflusst gleich mehrere Zellvorgänge der ENS-Entwicklung. So konnte gezeigt werden, dass sie sowohl die Proliferation von ENS-Vorläuferzellen positiv reguliert, aber auch bei der Differenzierung.



**Abb. 29:** Funktionelle Analyse von T3-regulierten Genen in differenzierenden Enterosphären, die im Zusammenhang mit der Nervensystementwicklung stehen. Das Netzwerk stellt regulatorische und funktionelle Verbindungen zwischen 25 regulierten Genen dar. Es wurde durch algorithmische Berechnungen von IPA erstellt und beinhaltet neben den 25 durch den Microarray-Chip entschlüsselten Genen (grün; rot) auch Gene, die von IPA aufgrund von Hinweisen aus der Literatur auf funktionelle Verbindungen zu den T3-regulierten Genen eingefügt wurden (weiß). Die Farbintensität ist proportional zur Stärke der Expressionsänderung in beiden Gruppen.

Zusätzlich zur Analyse der Daten durch IPA wurde auch eine ausgiebige Literaturrecherche zu jedem Gen durchgeführt.

Die Angabe „Fold-change“ bezeichnet in den Tabellen dieses Kapitels immer die Veränderung der Genexpression von mit T3 differenzierten Enterosphären zu ohne T3 differenzierten Enterosphären.

Bei 67 der durch T3 regulierten Gene konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass sie eine Rolle bei neuronalen Entwicklungsvorgängen oder bei der Funktion von neuronalen Zellen spielen (**Tabelle 13, Tabelle 14**).

Dabei wurden in diese Gruppe auch Gene eingefügt, von denen die genaue Funktion noch nicht bekannt ist, aber von denen man bereits herausgefunden hat, dass sie in neuronalen Geweben in hohem Maße exprimiert werden. Von 50 der 67 Gene wurde außerdem in der Literatur noch kein Bezug zu einer Regulation durch T3 hergestellt. Eine mehr als 2-fache Regulation wurde bei 29 Genen detektiert; bei 6 Genen konnte sogar eine mehr als 3-fache Regulierung festgestellt werden.

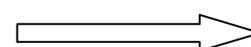
Aufgrund der unterschiedlichen Funktionen wurde eine Unterteilung in weitere Untergruppen vorgenommen. 53 Gene wurden als Ionenkanäle, Hormone und Neurotransmitter, Zelladhäsionsproteine, Zytoskelettproteine, Transkriptionsfaktoren und Co-Faktoren, Enzyme, Wachstumsfaktoren und -rezeptoren, Synapsenproteine eingeordnet oder konnten keiner bestimmten Gruppe zugeordnet werden (**Tabelle 13**).

Von besonderem Interesse waren Guidance-Moleküle und andere Proteine, die an Neuritenwachstum beteiligt sind, da für diese eine erhöhte Wahrscheinlichkeit besteht, dass sie für die verlängerten Zellfortsätze während der Differenzierung verantwortlich sind (**Tabelle 14**).

Bei der Auswertung der Chipdaten konnte zusätzlich zur Gruppe der beschriebenen 67 Gene noch eine weitere Gruppe von 11 Genen identifiziert werden, von denen bekannt ist, dass sie vom Wnt-Signalweg (Wnt3a) reguliert werden: Die Expression von 9 dieser 11 Gene wurde in differenzierenden Enterosphären von T3 in gegensätzlicher Richtung zur bekannten Wnt3a-Regulation beeinflusst (**Tabelle 15**).

Gen	Protein	Fold change	Literaturreferenz	Bekannt als T3 reguliert?
<b>Ionenkanäle</b>				
<b>Kcna1</b>	potassium voltage-gated channel, shaker-related sub-family, member 1	<b>3,86994</b>	[175]	-
<b>Kcnj5</b>	G protein-activated inward rectifier potassium channel 4	<b>1,67494</b>	[176]	-
<b>Slc4a10</b>	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 10	<b>1,60479</b>	[177]	-
<b>Slc12a2</b>	solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporters), member 2	<b>1,61269</b>	[178]	-
<b>Sncg</b>	gamma-synuclein	<b>1,50816</b>	[179]	-
<b>Hormone und Neurotransmitter</b>				
<b>Adam11</b>	disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 11	<b>1,75515</b>	[180]	-
<b>Adora2a</b>	adenosine A <sub>2A</sub> receptor	<b>2,00035</b>	[181]	-
<b>Adra2a</b>	alpha-2A adrenergic receptor	<b>1,55959</b>	[182]	√
<b>Agtr2</b>	angiotensin II receptor, type 2	<b>-1,57395</b>	[183]	-
<b>Chrm3</b>	muscarinic acetylcholine receptor M <sub>3</sub>	<b>1,76495</b>	[184]	-
<b>Chrna7</b>	neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-7	<b>-1,97994</b>	[185]	-
<b>Htr2b</b>	hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B	<b>2,39907</b>	[186]	-
<b>Npy</b>	neuropeptide Y	<b>1,98077</b>	[187]	√
<b>Oprd1</b>	opioid receptor, delta 1	<b>2,56026</b>	[188]	√
<b>Sorcs3</b>	sortilin-related VPS10 domain containing receptor 3	<b>2,63863</b>	[189]	-
<b>Thrb</b>	thyroid hormone receptor beta	<b>2,46133</b>	[122]	√
<b>Zelladhäsionsproteine</b>				
<b>Cdh12</b>	cadherin 12 (N-cadherin)	<b>5,63469</b>	[190]	-
<b>Cdh13</b>	cadherin 13 (T-cadherin)	<b>-2,17263</b>	[191]	-
<b>Ntm</b>	neurotrimin	<b>-1,64763</b>	[192]	-
<b>Transkription (Faktoren, Co-Faktoren)</b>				
<b>Dlx5</b>	distal-less homeobox 5	<b>-2,02068</b>	[193]	-
<b>Ebf2</b>	early B-cell factor 2	<b>-1,74581</b>	[194]	-
<b>Egr2</b>	early growth response protein	<b>-1,55788</b>	[195]	√
<b>Etv4</b>	ets variant gene 4 (E1A enhancer binding protein, E1AF)	<b>-1,55667</b>	[196]	-
<b>Hr</b>	hairless	<b>3,78143</b>	[197]	√
<b>Klf9</b>	krueppel-like factor 9	<b>3,63150</b>	[198]	√
<b>Neurod4</b>	neurogenic differentiation 4	<b>-1,63769</b>	[199]	-
<b>Ppargc1a</b>	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha	<b>1,90344</b>	[200]	√

Fortsetzung Tabelle 13 nächste Seite



<b>Enzyme</b>				
<b>Ace</b>	angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1	<b>2,72957</b>	[183]	√
<b>Camk2a</b>	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha	<b>1,50507</b>	[201]	-
<b>Dbh</b>	dopamine beta hydroxylase	<b>1,87457</b>	[202]	-
<b>Gda</b>	guanine deaminase	<b>1,57576</b>	[203]	√
<b>Nell2</b>	Protein kinase C-binding protein NELL2	<b>1,52924</b>	[204]	-
<b>Ppp2r2c</b>	protein phosphatase 2, regulatory subunit B, gamma	<b>1,73758</b>	[205]	-
<b>Tgm2</b>	transglutaminase 2 (C polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase)	<b>2,16683</b>	[206]	-
<b>Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren</b>				
<b>Dner</b>	delta/notch-like EGF repeat containing receptor	<b>1,56037</b>	[207]	-
<b>Egfr</b>	EGF receptor	<b>-1,55935</b>	[208]	√
<b>Igf1</b>	insulin-like growth factor 1	<b>1,60032</b>	[209]	√
<b>Met</b>	met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)	<b>-1,69860</b>	[210]	-
<b>Synapsenproteine</b>				
<b>Sntg1</b>	gamma-1-syntrophin	<b>1,50941</b>	[211]	√
<b>Syn2</b>	synapsin II	<b>1,79116</b>	[212]	√
<b>Syt12</b>	synaptotagmin XII	<b>3,70183</b>	[213]	√
<b>Syt5</b>	synaptotagmin V	<b>1,52479</b>	[214]	-
<b>Syt9</b>	synaptotagmin IX	<b>1,75215</b>	[215]	-
<b>Andere</b>				
<b>Efhd1</b>	EF-hand domain family, member D1	<b>-1,70797</b>	[216]	-
<b>Gldn</b>	gliomedin	<b>2,27283</b>	[217]	-
<b>Lrrtm1</b>	leucine-rich repeat transmembrane neuronal protein 1	<b>2,34792</b>	[218]	-
<b>Nptx2</b>	neuronal pentraxin-2	<b>-1,58724</b>	[219]	-
<b>Nsg1</b>	neuron specific gene family member 1	<b>1,55256</b>	[220]	-
<b>Opalin</b>	oligodendrocytic myelin paranodal and inner loop protein	<b>-2,48342</b>	[221]	-
<b>Pcp411</b>	purkinje cell protein 4 like 1	<b>1,99058</b>	[222]	-
<b>Sez6</b>	seizure related gene 6	<b>1.64391</b>	[223]	-
<b>Prph</b>	peripherin	<b>1,91597</b>	[224]	-
<b>Thy1</b>	thymus cell antigen 1, theta	<b>2,36079</b>	[225]	-

**Tabelle 13:** T3-regulierte Gene in differenzierenden Enterosphären, ausgewählt nach Funktion in neuronaler Entwicklung, Synapsenübertragung oder aufgrund einer hohen Expression in sich entwickelnden neuronalen Geweben. Literaturreferenzen enthalten Informationen über die Funktion der Gene in neuronalen Geweben. Die letzte Spalte gibt an, ob über eine Regulierung des entsprechenden Gens durch T3 in der Literatur bereits berichtet wurde.

Gen	Protein	Fold change	Literaturreferenz	Bekannt als T3 reguliert?
<b>Proteine, die an Neuritenwachstum beteiligt sind</b>				
<b>Apba1</b>	amyloid beta A4 precursor protein-binding family A member 1	<b>1,63559</b>	[226]	-
<b>Caln1</b>	calcium-binding protein 8	<b>1,90350</b>	[227]	-
<b>Ptppt</b>	receptor-type tyrosine-protein phosphatase T	<b>2,33632</b>	[228]	-
<b>Rasd2</b>	GTP-binding protein Rhes	<b>2,79085</b>	[229]	√
<b>Sox11</b>	SRY-box containing gene 11	<b>-2,30604</b>	[230]	-
<b>Sprr1a</b>	small proline-rich protein 1A	<b>1,50926</b>	[231]	-
<b>Tnn</b>	tenascin N	<b>-1,50234</b>	[232]	-
<b>Tnr</b>	tenascin R	<b>2,33804</b>	[233]	-
<b>Guidance-Moleküle</b>				
<b>Edn3</b>	endothelin 3	<b>3,21551</b>	[64]	-
<b>Gfra3</b>	GDNF family receptor Alpha-3	<b>1,50723</b>	[234]	-
<b>Ntng1</b>	netrin-G1	<b>2,24415</b>	[235]	-
<b>Sema3a</b>	semaphorin-3A	<b>1,59264</b>	[236]	-
<b>Sema3d</b>	semaphorin-3D	<b>-1,63008</b>	[237]	-
<b>Slit1</b>	slit homolog 1 protein	<b>-1,61701</b>	[238]	√

**Tabelle 14:** T3-regulierte Gene in differenzierenden Enterosphären, spezifisch ausgewählt nach ihrer Funktion als Guidance-Moleküle und einer wichtigen Funktion bei Neuritenwachstum. Literaturreferenzen enthalten Informationen über die Funktion der Gene in neuronalen Geweben. Letzte Spalte gibt an, ob über eine Regulierung des entsprechenden Gens durch T3 in der Literatur bereits berichtet wurde.

ID	Transkript	Fold change	Regulation durch T3	Regulation durch Wnt3a
NM_177839	TNN	-1,502	↓	↑
NM_009382	THY1	2,361	↑	↓
NM_028977	LRRC17	-1,636	↓	↑
NM_010518	IGFBP5	1,935	↑	↓
NM_008216	HAS2	-1,940	↓	↑
NM_010118	EGR2	-1,558	↓	↑
NM_010516	CYR61	-2,049	↓	↑
NM_010217	CTGF	-3,297	↓	↑
NM_009783	CACNA1G	-1,514	↓	↑
NM_020265	DKK2	1,629	↑	↑
NM_001032298	Bglap	1,674	↑	↑

**Tabelle 15:** 11 Gene, die durch T3 und Wnt3a reguliert werden. Diese Gene wurden von der Analysesoftware IPA aus allen 338 Genen ausgewählt. 9 der Gene werden von T3 und Wnt3 genau in gegensätzlicher Richtung reguliert (grau hinterlegt).

Alle Rohdaten des durchgeführten T3-Versuchs sind in der NCBI's Gene Expression Omnibus – Datenbank abgelegt und sind abrufbar unter dem GEO-Zugangscode GSE39634 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE39634>).

Nach der Durchführung der Genchipanalyse wurde die Regulation einzelner ausgesuchter T3-regulierter Gene mit Hilfe einer qRT-PCR überprüft. Hierbei konnten die bereits erfassten Messergebnisse der Microarray-Analyse für die untersuchten Gene bestätigt werden (**Tabelle 16**).

	Microarray	qRT-PCR
Endothelin 3	3,22	5,66±2,44
Netrin G1	2,24	2,20±1,06
Peripherin	1,92	2,74±1,11
Synaptotagmin 12	3,70	4,92±1,09

**Tabelle 16:** Vergleichende Analyse ausgesuchter T3-regulierter Gene durch Microarray und qRT-PCR. Werte sind angegeben als Fold-Change ± StAbw

## 4 Diskussion

Das enterische Nervensystem des Magen-Darm-Traktes steuert den Transport des Nahrungsbreis, die Sekretion von Verdauungsenzymen und die Absorption der Nährstoffe [20]. Darüber hinaus übernimmt es neben Funktionen bei der Verdauung auch Aufgaben der Immunabwehr [20]. Erkrankungen und Entwicklungsstörungen des ENS können zu Komplikationen wie z. B. einem Darmverschluss mit Ausbildung eines Megakolons bei Morbus Hirschsprung führen [82]; als Folge kann es zu einer Enterokolitis oder einer Darmperforation kommen, was in seltenen Fällen auch zum Tod des Patienten führt. Derzeit werden zur Behandlung verschiedene Methoden eingesetzt, bei denen der betroffene Darmabschnitt chirurgisch entfernt wird [87]. Oftmals bleibt dieses Vorgehen jedoch für den Patienten nicht ohne Folgen: Je nach Schwere der Erkrankung kann es zu Verdauungsstörungen wie einer chronischen Obstipation oder einer zeitlebens bleibenden Inkontinenz kommen [88]. Es wird daher nach alternativen Therapien gesucht, bei denen die Folgen der Erkrankung abgemildert bzw. beseitigt werden können.

Eine mögliche Behandlungsform stellen zellbasierte Therapien dar, bei denen Stammzellen transplantiert werden, um die Funktionsfähigkeit des ENS in den erkrankten Darmabschnitten wiederherzustellen. Grundvoraussetzung für die Entwicklung derartiger Therapien sind jedoch genaue Kenntnisse über die Vorgänge während der Entwicklung des ENS; im Blickpunkt stehen Faktoren, die die Migration, die Proliferation und die Differenzierung der Stammzellen zu den unterschiedlichen Zelltypen des Nervensystems beeinflussen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, weitere Kenntnisse über mögliche Faktoren, die auf die ENS-Entwicklung wirken, zu erlangen. Dabei stand vor allem die Wirkung des Schilddrüsenhormons T<sub>3</sub> auf die Entwicklung von ENS-Vorläuferzellen im Fokus. Es wurde außerdem eine Genexpressionsanalyse durchgeführt, um Genregulationen während der frühen Differenzierung von Enterosphären zu entschlüsseln und damit mögliche Faktoren für zukünftige Forschungen und Stammzelltherapien zu identifizieren.

#### **4.1 Einfluss des Schilddrüsenhormons T3 auf Vorläuferzellen des ENS**

Schilddrüsenhormone sind dafür bekannt, dass sie den Metabolismus in Säugetieren regulieren. Sie spielen darüber hinaus aber vor allem eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung [161, 239]. Besteht während der Schwangerschaft ein Mangel an Jod, das für die Synthese der Hormone benötigt wird, kann dies zu schwerwiegenden Entwicklungsstörungen des Kindes führen [138]. Dabei können vor allem im ZNS schwerste Schädigungen auftreten [161, 240]. Im peripheren Nervensystem sind die Einflüsse einer Hypothyreose weit weniger erforscht als im ZNS. Studien dazu befassen sich z. B. mit Untersuchungen der Nervenleitgeschwindigkeit in Ratten nach Thyroidektomie [241] oder mit der Nervenregeneration in hypothyroiden mit Propylthiouracil (PTU) behandelten Ratten [6]. Eine Behandlung kann nach Diagnose, die durch Messung eines erhöhten TSH-Levels oder verminderter Schilddrüsenhormonlevel im Blut gestellt wird, durch orale Zugabe von Levothyroxin oder Liothyronin entweder bei der Mutter während der Schwangerschaft oder beim Neugeborenen nach der Geburt erfolgen [242]. Unbehandelt treten neben verminderter Intelligenz durch die Beeinträchtigung der ZNS-Entwicklung auch Störungen des Knochenwachstums und damit verbundenem Zwergwuchs, Innenohrschwerhörigkeit und Gangstörungen auf. Auch Störungen der Darmaktivität in Form von Obstipationen bis hin zum Ileus sind bekannt [243]. Verantwortlich dafür kann ein direkt durch T3-Mangel induzierter verlangsamter Nahrungstransport und damit auftretende Stauungen der Fäzes sein [243], aber auch eine Beeinflussung über eine Störung bzw. Verzögerung der ENS-Entwicklung ist denkbar. Ein Indiz für einen Einfluss auf das enterische Nervensystem sind Veränderungen der myoelektrischen Aktivität im Darm bei hyper- und hypothyroiden Patienten, die bei Elektrogastrogramm (EGG)-Untersuchungen aufgefallen sind [163].

Obwohl bekannt ist, dass Schilddrüsenhormone die Entwicklung nahezu aller Gewebe beeinflussen und es Indizien gibt, dass sie ebenso auf die Entwicklung und Funktion des enterischen Nervensystems einwirken, ist ihre Rolle im ENS bis heute nicht genau untersucht worden. Die vorliegende Dissertation sollte daher zum ersten Mal mögliche Einflüsse des Schilddrüsenhormons 3,5,3'-Trijodthyronin auf Entwicklungsvorgänge im ENS untersuchen. Insbesondere ist dabei von Interesse, welche Einflüsse T3 auf die Proliferation und auf die Differenzierung von ENS-Stammzellen

ausübt, um eine mögliche Rolle des Hormons nicht nur in der Zellkultur sondern auch für mögliche zukünftige Stammzelltherapien von ENS-Erkrankungen zu erforschen.

Für die Durchführung der Versuche wurden Vorläuferzellen aus dem neonatalen murinen Plexus myentericus isoliert und in Kultur gebracht. Eine Isolation wurde in ähnlicher Weise durchgeführt wie bereits in anderen Publikationen beschrieben [98, 101, 244, 245]. Die isolierten und vereinzelt Zellen wuchsen in Form von dreidimensionalen kugelförmigen neurosphärenähnlichen Zellkonstrukten, die aufgrund ihrer Herkunft und Zusammensetzung auch als Enterosphären bezeichnet werden. Die Sphäroide, die während der Proliferation frei schwebend im Kulturmedium gehalten wurden, bilden bei Ausdifferenzierung neben den verschiedenen neuronalen und glialen Zelltypen auch Fibroblasten und glatte Muskelzellen [98, 99].

In den durchgeführten Zellkulturassays konnte ein Einfluss von T3 auf die Proliferation und auf die Differenzierung der Enterosphärenzellen nachgewiesen werden. Die eingesetzten Hormonkonzentrationen lagen über der physiologischen Hormonkonzentration im Organismus (~10 nM) und sollten damit, wie bereits in anderen Publikationen beschrieben [246], für eine optimale Analyse sicherstellen, dass alle Rezeptoren während des Versuchs aktiviert sind. Zugabe von 100 nM T3 in das Zellkulturmedium während der Proliferation verringerte die Proliferationsrate der Enterosphären um 15%. Eine Verringerung der Proliferationsrate von neuronalen Zellen durch Trijodthyronin konnte bereits im ZNS in neuronalen Stammzellen im murinen embryonalen Neocortex [247] und in anderen Bereichen des murinen postnatalen Gehirns gezeigt werden [248]. Es gibt jedoch auch Studien, die einen stimulierenden Effekt auf neuronale Zelltypen zeigen. So steigerten z. B. im Lachs implantierte T3-Pellets, die den T3-Hormonlevel konstant erhöhten, die Proliferationsrate der olfaktorischen neuronalen Vorläuferzellen [249].

Während in den eigenen durchgeführten Zellkulturexperimenten die Proliferationsrate von Enterosphärenzellen durch T3 verringert wurde, zeigten Untersuchungen der Zelldifferenzierung der ENS-Vorläuferzellen einen stimulierenden Effekt von T3 auf das Wachstum von Zellausläufern. Zellen, die positiv für den neuronalen Zellmarker  $\beta$ -Tubulin III (TUJ1) gefärbt werden konnten, wiesen bei Behandlung mit 50 nM oder 100 nM T3 ein verlängertes Wachstum der Zellfortsätze von 15% bzw. 22% auf. Eine weitere Analyse der Anzahl der primären Zellfortsätze, also die Zellausläufer, die direkt dem Soma entspringen, zeigte keine Unterschiede zwischen T3-behandelten Gruppen und den Kontrollgruppen. Eine Stimulation von Dendritenwachstum durch T3 wurde bereits in murinen Spinalganglien *in vitro* [250] und in Purkinjezellen, die

aus murinem Cerebellum isoliert worden waren, nachgewiesen [251]. Anders als bei den in dieser Dissertation durchgeführten Versuchen, zeigten Purkinjezellen jedoch auch einen Anstieg der primären Neuritenverzweigungen. Dabei wurde der  $Tr\alpha$ -Rezeptor, nicht jedoch der  $Tr\beta$ -Rezeptor für die beobachteten T3-Effekte benötigt. Die Spinalganglienversuchen erbrachten darüber hinaus den Nachweis, dass T3 auch einen Schutz vor Apoptose bietet [6]. Aufgrund der Tatsache, dass hauptsächlich der Rezeptor  $Tr\beta 1$  in den Zielzellen exprimiert wird, geht man davon aus, dass dabei vor allem dieser Rezeptortyp eine Rolle spielt [6].

In den murinen Enterosphären, die für die durchgeführten Proliferations- und Differenzierungsversuche verwendet wurden, und in murinen und humanen Muskelgeweben, die den Plexus myentericus enthalten, konnten durch RT-PCR - Analysen sowohl die Expression von  $Tr\alpha$ - als auch  $Tr\beta$ - Subtypen, nachgewiesen werden. Eine geplante genauere Lokalisierung der Rezeptoren durch immunhistochemische Färbungen scheiterte daran, dass der verwendete Antikörper keine spezifische Bindung an die Rezeptoren zeigte und zum Zeitpunkt der Versuche auch kein anderer Antikörper, der für Färbungen der Rezeptoren eingesetzt werden konnte, zur Verfügung stand. Die nachgewiesene Expression der Rezeptoren durch die RT-PCR in den untersuchten Zellen und Geweben stützt jedoch die Vermutung, dass die beobachtete Wirkung von T3 rezeptorgebunden erfolgte. Es sollte daher in einem *in vivo*-Versuch in Knockout-Mausmodellen ermittelt werden, ob das Ausschalten eines der beiden Schilddrüsenhormonrezeptortypen einen Einfluss auf die Struktur des ENS besitzt. Bei den für diesen Versuch verwendeten Mausmodellen wurden entweder der  $Tr\alpha$ -Rezeptor ( $Tr\alpha 1$ ) [154] oder die beiden Splice-Varianten des  $Tr\beta$ -Rezeptors ( $Tr\beta 1$ ,  $Tr\beta 2$ ) [120] ausgeschaltet. Der Vergleich der ENS-Struktur der neonatalen Versuchstiere sollte anhand von immunhistochemischen Whole mount- Färbungen des gesamten Darmtraktes mit einem PGP9.5-Antikörper erfolgen [252, 253]. Bei der Auswertung wurde jedoch deutlich, dass die Varianz in der Länge der Ganglienabstände und der ENS-Gitterstruktur sehr hoch ist. Einerseits spielt bei diesem Effekt sicherlich die natürliche Dehnungsfähigkeit des Darmmuskelschlauchs eine Rolle. Zusätzlich ist jedoch auch denkbar, dass die mehrtägige immunhistochemische Behandlung mit ihren zahlreichen Waschschritten einen Einfluss auf die Struktur hatte. Die festgestellten hohen Varianzen führten zu dem Problem, dass eine sehr große Menge an Versuchstieren hätte untersucht werden müssen, um eine verwertbare statistische Aussage treffen zu können. Da Probleme mit der Verpaarung der Tiere auftraten, so dass nur jeweils 8 neugeborene Mäuse der KO-Modelle zur Verfügung

standen, konnte das Experiment nicht statistisch ausgewertet werden. Probleme bei der Verpaarung durch eine reduzierte Fertilität wurde bis jetzt nur bei  $Tr\alpha 1^{-/-}$  /  $Tr\beta^{-/-}$ -Mäusen beobachtet, nicht jedoch bei  $Tr\alpha^{+/+}$  /  $Tr\beta^{-/-}$ -Mäusen [154, 155, 157]. Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, dass die Nachwuchsprobleme auf Schwierigkeiten bei der Verpaarung zurückzuführen sind und es nicht zwingend an der genetischen Veränderung der Versuchstiere liegt. Ein offensichtlicher visueller Unterschied in der ENS-Struktur zwischen den Knockout- und den Wildtyp- Mäusen konnte bei den gefärbten und untersuchten Tieren ohne statistische Auswertung jedenfalls nicht festgestellt werden.

Der Nachweis von Schilddrüsenhormonrezeptoren warf nicht nur die Frage auf, welcher Rezeptortyp in die beobachteten Veränderungen während der Differenzierung involviert ist, sondern ebenso auch, welche Gene durch eine Rezeptorbindung von T3 reguliert werden. Mit Hilfe eines Affymetrix-Microarray-Chips wurde daher die mRNA-Expression von sich differenzierenden Enterosphären unter T3-Einfluss untersucht. Da der Fokus auf die Genexpression neuraler Zellen gelegt wurde, wurden während der Durchführung des Experiments die frei schwimmenden Enterosphären mehrmals in neue Zellkulturplatten passagiert, um den Anteil nicht-neuronaler Zellen wie Fibroblasten und glatte Muskelzellen, die eine hohe Adhärenz für den Plastikboden der Kulturschalen besitzen, zu verringern. Diese Methode verspricht eine schlechtere Aufreinigung als andere Methoden wie z. B. die MACS-Methode, allerdings wird die Zellvitalität weit weniger beeinflusst, so dass die Gewinnung einer genügend großen Zellpopulation für das nachfolgende Genexperiment möglich ist. Nach der Aufreinigung wurden die Enterosphären differenziert, die mRNA extrahiert und die Genexpressionsanalyse durchgeführt. Das Ziel lag in der Untersuchung der Expression von früh nach Eintritt in die Aktivierungsphase aktivierter Gene, weshalb die Dauer der Differenzierungsphase nach der Aufreinigung nur 48 Stunden, die letzten 24 Stunden davon unter T3-Zugabe, betrug.

Die statistische Auswertung ergab eine Regulation von 338 Transkripten, die als Gene in der Refseq-Datenbank registriert sind. Durch einen Abgleich der Daten aus wissenschaftlicher Literatur und der Genexpressionsanalysesoftware IPA konnten 67 Gene identifiziert werden, von denen bekannt ist, dass sie bei der Entwicklung neuronaler Zellen eine Rolle spielen. Die erhaltenen Gene konnten in verschiedene Kategorien wie z. B. Ionenkanäle, Synapsenproteine oder Wachstumsfaktoren eingeteilt werden. Die Expressionsänderungen verschiedener Synapsenproteine wie Synapsin II, Synaptotagmin V, IX und XIII wie auch von Proteinen, die in

Neurotransmitterübertragung involviert sind wie Adenosin-, Serotonin-, Neuropeptid-, Opioid- oder adrenerge und muskarinische Rezeptoren (*Adora2a*, *Adra2a*, *Chrm3*, *Chrna7*, *Htr2b*, *Npy*, *Oprd1*) bestätigten einen Einfluss von Trijodthyronin auf die Differenzierung neuronaler Zellen.

Die Ergebnisse anderer wissenschaftlicher Publikationen deuten außerdem bei einigen der 67 kategorisierten Gene eine hohe Wahrscheinlichkeit an, für die Stimulation des Wachstums der Zellfortsätze mit verantwortlich zu sein. So konnte dem kalzium-abhängigen Ionenkanal Cadherin 12 (*Cdh12*, N-Cadherin, +5,6), dem Gen mit der größten Expressionsregulierung durch T3, bereits ein Einfluss auf das Längenwachstum der Neuriten von retinalen Ganglienzellen nachgewiesen werden [254]. Dabei entfaltet es seine Wirkung durch Bindung an die Tyrosin-Protein-Phosphatase T (*PTPRT1*; +2,8) [228]. Für die Darmentwicklung ist Cadherin 12 nicht essentiell, allerdings zeigen *Cdh12* KO-Mäuse eine Verzögerung der Darmentwicklung und in Kombination mit dem Ausschalten der Expression von  $\beta$ 1-Integrin trat sogar eine schwere Aganglionose des Enddarms auf [255].

Die vermehrte Expression des Transkriptionsfaktors KLF9 (*BTEB*; +3,6) und des Co-Repressors Hairless (*Hr*, +3,8) führt zu verstärktem Auswachsen von Neuriten und zu verstärkter Neuritenverzweigung während der Entwicklung des Maushirns [256]. Beide Gene sind außerdem in die Autoregulation des Schilddrüsenhormonrezeptors Tr $\beta$ 1 involviert [257, 258]. Eine Regulation der Tr $\beta$ -Rezeptoren (+2,5) konnte vom Affymetrix-Genchip ebenso in den differenzierenden neuronalen ENS-Zellen erfasst werden. Möglicherweise spielen die Gene *BTEB* und *Hr* eine bedeutende Rolle bei dem im Zellkulturversuch nachgewiesenen durch T3 ausgelösten Einfluss auf die Länge der Zellausläufer. Unterschiede zum Versuch im Maushirn bestanden jedoch im Einfluss auf die Neuritenverzweigung, da hier keine Veränderung im ENS nachweisbar war.

Ein weiteres Gen, *TGM2*, das die Tissue transglutaminase 2 (+2,2) kodiert, ist ebenfalls ein interessanter Kandidat dafür, eine Rolle bei T3-reguliertem Auswachsen der Zellfortsätze zu spielen. In Experimenten konnte gezeigt werden, dass das Transferieren von Neuroblastomazellen in Serum-freies Medium verstärktes Neuritenwachstum und einen 10 fachen Anstieg der *TGM2*-Expression zur Folge hat [206].

Das Membranprotein Solute carrier family 12 (*SLC12A1*, +1,6) spielt eine Rolle bei NGF-induziertem Neuritenwachstum in Pheochromocytoma P12D-Zellen [178]. Das

Zelladhäsionsmolekül Neurotrimin (*Ntm*; +1,6) reguliert je nach Zelltyp Neuritenwachstum entweder positiv oder negativ [259]. Überexpression des kleinen prolinreichen Proteins 1A (*Sprr1a*; +1,5) in embryonalen und adulten Spinalganglien führt zu verstärktem Wachstum der Axone [231, 259]. C-Met (*Met*; -1,7), ein Wachstumsfaktor für Hepatozyten ist essentiell für die Entwicklung von Sinneszellen und stimuliert zusammen mit dem Hepatozytenwachstumsfaktor HGF („hepatocyte growth factor“) das Auswachsen von Axonen [260].

Für die Mehrzahl der Gene wurde in der Literatur bei einer Veränderung der Expression in dieselbe Richtung, wie sie in den differenzierenden Enterosphären festgestellt wurde, eine Stimulation des Auswachsens von Zellfortsätzen beschrieben. Die Expression einzelner Gene von differenzierenden ENS-Progenitoren wurde jedoch auch konträr zur beschriebenen stimulierenden Expressionsveränderung reguliert. So wurde die Synthetisierung des Proteins Pentraxin-2 (*NPTX2*, *NARP*, -1,6), das das Neuritenwachstum in corticalen Explantaten verstärkt [219], in ENS-Vorläuferzellen durch T3 gehemmt, weshalb es wahrscheinlich nicht an der beobachteten Stimulierung der Differenzierung von ENS-Zellen beteiligt ist.

Von besonderem Interesse war der T3-Einfluss auf die Expression von Guidance-Molekülen. Während der ENS-Entwicklung spielen diese eine wichtige Rolle bei Migrationsvorgängen der Neuralleistenzellen zum Darm. Guidance-Moleküle in der ENS-Entwicklung sind hauptsächlich ein Teil der folgenden Signalwege: Dem GDNF/ GFR $\alpha$ 1/Ret-Signalweg [210], dem SemaA/neuropilin-1-Signalweg [261], dem Netrin/DCC/Neogenin-Signalweg [262], dem Neurturin/GFR $\alpha$ 2/Ret-Signalweg [263] und dem Slit/Robo-Signalweg [264]. Ein hemmender Einfluss auf das Neuritenwachstum von ENS-Vorläuferzellen und auf die Struktur von Ganglienzellen während der Differenzierung konnte außerdem bei dem Guidance-Molekül RGMA („Repulsive guidance molecule alpha“) nachgewiesen werden [245].

Während Guidance-Moleküle hauptsächlich für die Migration der Neuralleistenzellen und den Aufbau der typischen ENS-Struktur verantwortlich sind, spielen Gene anderer Signalwege hauptsächlich eine Rolle bei der Proliferation und bei der Reifung der NCCs während der Darmentwicklung. Es handelt sich dabei z. B. um Gene des Endothelin/ Endothelin-Rezeptor-Signalwegs oder um Transkriptionsfaktoren wie z. B. *Phox2a/b* und *Sox10* [12]. Mutationen in diesen Genen sind bekannt dafür, dass sie Aganglionosen wie die Hirschsprung-Krankheit, das Waardenburg-Syndrom oder das Haddad-Syndrom auslösen [265].

Die Analyse der Microarray-Chipdaten zeigte, dass die Expression einiger dieser Gene, wie Endothelin 3, Netrin-G1, den Semaphorinen oder *Slit-1* durch T3 gesteuert wird. Endothelin 3, das in ENS-Vorläuferzellen 3,2-fach hochreguliert wurde, steuert die Migration von Neuralleistenzellen in embryonalen Mäusen: Ein Ausschalten der Endothelin 3-Expression führt in Mäusen zu einer Aganglionose des distalen Darmbereichs [63, 266].

Im Menschen sind Mutationen im Endothelin 3-Gen für 5% der Hirschsprung-Erkrankungen (siehe Kapitel 1.2.4) verantwortlich [264]. Ungefähr 5-10% der Hirschsprung-Erkrankungen sind auf Mutationen des Endothelin 3-Rezeptors (EDNRB) zurückzuführen. Dessen Expression wurde allerdings nicht von T3 beeinflusst.

Netrin-G1 (*Ntng1*; +2,2), bei dem es sich um ein Guidance-Molekül handelt, das anziehend auf Zielzellen wirkt, ist Teil des Netrin/DCC/Neogenin-Signalwegs. Es beeinflusst nicht nur das Wachstum von ENS-Neuronen [262, 264], sondern ist auch in das Auswachsen thalamocorticaler Neurone involviert [235]. Außerdem können Mutationen in *Ntng1* das Rett-Syndrom auslösen, bei dem Kinder die Koordinationsfähigkeiten der Hände und die Fertigkeit zu Sprechen verlieren. Auswirkungen zeigen sich auch auf den Darmtrakt in Form von Störungen der Motilität, die zu Erbrechen oder gastrointestinalem Reflux führen [267, 268].

Weitere für Guidance-Moleküle kodierende Gene, deren Expression durch T3 reguliert wurde und die das Auswachsen von Neuriten und Axonen beeinflussen, sind die Semaphorine (*Sema3a*, *Sema3d*; +1,6 und -1,6) und *Slit-1* (-1,6) [236-238, 269]. Im ENS wird die Besiedelung des Enddarms durch neuronale Vorläuferzellen und das Wachstum von Axonen durch Semaphorin 3A gesteuert [270].

Im Magen-Darm-Trakt werden Guidance-Moleküle nicht nur von neuronalen Zellen des ENS exprimiert, sondern auch von mesenchymalen Zellen. Da die Enterosphären, die für die Versuche verwendet wurden, neben neuronalen Vorläuferzellen auch andere Zelltypen z.B. auch des Mesenchyms enthielten, konnte in dem gezeigten *in vitro*-Modell die Expression verschiedenster Guidance-Moleküle gezeigt werden [60, 245, 270, 271].

Neben den Genen, von denen bekannt ist, dass sie bei der Steuerung der Differenzierung mitwirken, konnten Regulationen auch bei einer Gruppe von Genen gezeigt werden, die eine Rolle bei der Proliferation von Vorläuferzellen spielen. So wurden z.B. 11 Gene reguliert, die zur Gruppe der Wnt3a-Signalproteine gehören; 9 von 11 dieser Gene wurden in entgegengesetzter Richtung durch T3 reguliert, bei der in der

Literatur von einer Aktivierung oder Verstärkung der Proliferation berichtet wurde. Dies deutet darauf hin, dass Wnt3a in Proliferationsprozesse von ENS-Vorläuferzellen involviert sein könnte. Tatsächlich konnte bereits in nicht veröffentlichten Vorversuchen ein stimulierender Einfluss des Wnt-Signalweges auf die Proliferation von ENS-Progenitorzellen gezeigt werden.

In dieser Dissertation wurde zum ersten Mal der Einfluss des Schilddrüsenhormons T3 auf das enterische Nervensystem untersucht. Die durchgeführten Versuche zeigten, dass T3-Rezeptoren in den Zielzellen vorhanden sind und dass, vermutlich durch Rezeptorbindung von T3, die Proliferation und Differenzierung von ENS-Progenitorzellen beeinflusst wird. Durch Microarray-Analyse konnten vielversprechende Gene identifiziert werden, die potentiell für die beobachteten Effekte verantwortlich sind. Von besonderem Interesse ist dabei die Regulierung einiger Gene durch T3, die in direktem Zusammenhang mit für die ENS-Entwicklung wichtigen Signalwegen stehen und von denen teilweise bereits gezeigt werden konnte, dass bei Mutationen schwere Nervenentwicklungsstörungen ausgelöst werden können.

Die beobachteten genetischen Regulierungen, die auch einige für die ENS-Entwicklung sehr relevante und damit gut charakterisierte Gene betreffen, legen den Schluss nahe, dass T3 eine Rolle bei der Entwicklung des ENS spielen könnte und dass damit in Zukunft auch ein Einsatz bei der ENS-Zellkultivierung bzw. einer Stammzelltherapie möglich sein könnte. Zur Abklärung des möglichen Potentials müssen jedoch weitere Experimente durchgeführt werden, die eine genauere Untersuchung der genetischen Regulation durch T3 zum Ziel haben. Weitere Versuche mit *in vitro*-Darmgewebemodellen, die in den letzten Jahren etabliert wurden, könnten darüber hinaus weitere Aufschlüsse über den Einfluss von T3 auf die Bildung des ENS-Netzwerks während der Besiedelung des Darms mit Neuralleistenzellen zeigen.

## **4.2 Vergleichende Genexpressionsanalyse von Enterosphären in Proliferation und Differenzierung**

Die verschiedenen Stadien der ENS-Entwicklung wie die Migration der Neuralleistenzellen in das Darmrohr, die Proliferation der Zellen und die Differenzierung in die zahlreichen neuronalen und glialen Zelltypen des Nervensystems unterliegen komplexen Regulationen, die von einer großen Anzahl unterschiedlicher Faktoren gesteuert werden [12, 43, 272]. Von der Norm abweichende Genexpressionen während der Ausbildung der ENS-Strukturen führen oftmals zu Erkrankungen bzw. Fehlbildungen des Gastrointestinaltraktes. So konnten vor allem bei Studien der Entwick-

lungsstörung Morbus Hirschsprung aber auch durch Studien mit genveränderten Tiermodellen eine Reihe von Genen entschlüsselt werden, die für eine gesunde Entwicklung des Nervensystems im Magen-Darm-Trakt essentiell sind [265, 273]. Während sich die ersten Analysen meist noch auf die Untersuchung von murinen Säugtieren beschränkten, konnten nachfolgende Fortschritte auch durch Mutationsanalysen im Zebrafisch erlangt werden [272, 274]. Trotz der Kenntnisse, die durch diese Studien gewonnen werden konnten, sind nach wie vor nicht alle genregulatorischen Abläufe geklärt.

Mit Hilfe des in dieser Arbeit durchgeführten Experiments sollte als weiterer Schritt auf dem Wege zur Entschlüsselung dieser Vorgänge ein Überblick über die Gene erstellt werden, die in Enterosphären beim Übergang von der Proliferation in die Differenzierung auftreten. Dazu wurden mittels eines Affymetrix-Genchips die Genexpressionen in proliferierenden Enterosphären und Enterosphären nach Einleitung der Differenzierung detektiert und durch Vergleich der beiden Gruppen die regulierten Gene identifiziert.

Der Fokus der Analyse lag auf Genregulationen, die in neuronalen Vorläuferzellen des ENS auftreten. Die für diesen Versuch verwendeten dreidimensionalen Enterosphärenkonstrukte setzten sich jedoch nicht nur aus neuronalen ENS-Vorläuferzellen zusammen, sondern auch aus anderen Zelltypen wie Gliazellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen. Da die nicht-neuronalen Zelltypen der Enterosphären eine geringere Adhärenz zum Zellkulturboden aufweisen, als die neuronalen Zellen, wurden die freischwimmenden Enterosphären mehrmals in neue Zellkulturplatten überführt, um einen höheren Anteil der neuronalen Zellen in der Zellkultur zu erreichen. Mit dieser Methode kann zwar eine Anreicherung von ENS-Vorläuferzellen erreicht werden, jedoch werden andere Zelltypen nicht vollständig aus der Zellkultur entfernt. Enterosphären stellen damit gegenüber einer reinen neuronalen Zellkultur eine wirklichkeitsgetreuere Abbildung der Regulationen dar, die bei der Entwicklung des ENS *in vivo* auftreten, da es im Organismus auch zu Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Zelltypen wie den Neuronen, den Gliazellen und den Muskelzellen kommt.

Die Analyse ergab einen Unterschied der Expression von 1333 Genen in Zellen proliferierender und Zellen differenzierender Enterosphären, von denen die gebildeten Proteine bereits bekannt sind. Die größte funktionale Gruppe beinhaltete 154 regulierte Gene, deren synthetisierte Proteine Aufgaben bei der Steuerung des Zellzyklus und beim Auf- und Abbau der dafür benötigten Zellorganellen übernehmen. Unter

den regulierten Genen befanden sich mehrere Cycline (*CCNA2*, *CCNB1*...) und Cyclin-abhängige Kinasen (*CDK1*, *CDK5R1*). Cycline werden essentiell für die Aufrechterhaltung des Zellzyklus benötigt [275, 276]. Während der Proliferation unterliegt ihre Expression in den verschiedenen Zellstadien phasenabhängigen Schwankungen [277]. Bei Übergang in die Differenzierung wird die Expression von Cyclinen normalerweise verringert, jedoch konnte in manchen Fällen auch eine gegensätzliche Regulation nachgewiesen werden, wie z.B. bei Cyclin D1 während der Entwicklung des Rückenmarks [278].

Eng verknüpft mit den Cyclinen ist die Gruppe der Zellteilungszyklusgene (*CDC*; „cell division cycle“; *CDC6*, *CDC20*...). Sie konnten vor allem durch Mutationsanalysen in Hefestämmen wie z. B. *S. cerevisiae* identifiziert werden [279]. Während des Zellzyklus besteht die hauptsächliche Aufgabe von CDCs darin, cyclinabhängige Kinasen (CDK; „cyclin dependent kinase“) zu aktivieren oder zu inaktivieren. So benötigt die cyclinabhängige Kinase Cdk1 (*Cdc2*) eine Dephosphorylierung durch *Cdc25*, um aktiv zu werden [280]. Eine Beteiligung an dieser Regulation konnte auch der Kinase *Wee1* nachgewiesen werden. *WEE1* wird meist genau in gegensätzlicher Richtung wie *CDC25* reguliert; während *Cdc25* in der Mitose die Funktion eines Aktivators darstellt, tritt *Wee1* als Inhibitor der Mitose auf [281]. Nicht eindeutig zu erklären ist, warum im vorliegenden Experiment die Expression beider Gene negativ reguliert wurde.

Eine Veränderung der Expression konnte auch bei einer Reihe von Kinesinen (*KIF*) festgestellt werden. Kinesine sind Motorproteine, die Transporte intrazellulärer Moleküle durchführen. Eine sehr wichtige Funktion erfüllen sie bei der Mitose, bei der sie am Aufbau und Abbau des Spindelapparates und an der Teilung der Chromosomen beteiligt sind [282]. Im vorliegenden Experiment konnte bei allen regulierten Kinesin-Typen eine Reduktion der Expression nach Einleitung der Differenzierung detektiert werden.

Es traten auch noch Regulationen bei einer ganzen Reihe andere Gene auf, die am Auf- und Abbau des Spindelapparates, des Kinetochors und des Zentromers beteiligt sind. So wurde die Expression von insgesamt 9 Zentromerproteinen (*Cenp-A*, *Cenp-E* ... [283]) nach Einleitung der Differenzierung verringert. Ebenso wurde die Syntheserate des Kinetochorproteins *Nsl1* nach Eintritt in die Differenzierung verringert. *Nsl1* verbindet sich mit *Mis12* zu einem Komplex, der die Bildung des Kinetochors vorantreibt [284]. Eng verknüpft mit diesem Komplex ist auch der *NDC80*-Komplex, der sich u.a. aus den Proteinen zusammensetzt, die von *NDC80*, *NUF2* und *SPC25*

exprimiert werden [285]. Der dritte in Zusammenhang mit der Zentromerbildung erwähnenswerte Komplex ist der SKA-Komplex. Er setzt sich aus den 3 Proteinen zusammen, die von *SKA1-3* kodiert werden [286].

Außer den Genen, die Proteine für die Steuerung des Zellzyklus und des Auf- und Abbaus des Spindelapparates kodieren, konnte auch eine negative Regulation bei einem Gen festgestellt werden, dessen Produkt Ki-67 (MIK67) auch als Proliferationsmarker dient. Ki-67 ist während der gesamten Interphase im Zellkern und während der Mitose an den Chromosomen im Zytoplasma nachweisbar; nach Eintritt in die G<sub>0</sub>-Phase (Ruhephase) wird Ki-67 nicht mehr exprimiert [287].

Zusammenfassend kann über die Gruppe der Zellzyklus-Proteine gesagt werden, dass bei der überwiegenden Anzahl der analysierten Gene (136 von 152 Genen) die Regulation in die Richtung erfolgte, bei der in der Literatur von einem Stopp oder einer Verlangsamung des Zellzyklus berichtet wurde. Die Regulation von gerade einmal 11 Genen deutete auf einen Start bzw. auf die Fortsetzung des Zellzyklus hin, bei 5 der regulierten Gene ist die Art des Einflusses auf den Zellzyklus noch nicht eindeutig geklärt. Eine unerwartete Regulation wurde bei Betacellulin (*BTC*) festgestellt. Von Betacellulin weiß man bereits, dass es neuronale Stammzellen im Hirn zur Proliferation anregt [288]. Im vorliegenden Experiment wurde es jedoch nach Einleitung der Differenzierung fast 6-fach (+5,946) hochreguliert.

Eine Unterbrechung oder Verlangsamung des Zellzyklus, wie sie beim vorliegenden Experiment zu beobachten war, kann jedoch nicht nur beim Eintritt der Zellen in die Differenzierungsphase auftreten. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass Zellen, die einem erhöhten Stress ausgesetzt sind, einen programmierten Zelltod (Apoptose) starten, was ebenfalls Regulationen bei einigen der Zellzyklusproteine zur Folge haben könnte [289]. Viele der Gene, die einen Start der Apoptose auslösen bzw. den Ablauf beeinflussen können, üben außerdem auch eine Funktion während des regulär ablaufenden Zellzyklus aus, wie z. B. *CDK1* [290]. Einen weiteren wichtigen Aktivierungsfaktor der Apoptose stellt P53 dar [291]. Mit *PIDD1* konnte nur 1 reguliertes Gen identifiziert werden, dass in direktem Zusammenhang mit P53 steht [292]. Weitere Aktivatoren schließen sich in der E2F-Transkriptionsfaktorfamilie zusammen [293]. Zwei der E2F-Subtypen (*E2F7*, *E2F8*) konnte eine Expressionsänderung nachgewiesen werden. Insgesamt traten im Experiment jedoch nur in geringem Maße Regulationen von Genen auf, die in naher Verbindung zur Apoptose stehen. Dabei wurden gerade einmal 3 von 12 dieser identifizierten Gene in die Richtung reguliert, die auf einen Eintritt in die Apoptose hindeutet. Neuere durchgeführte zellbiolo-

gische Versuche zeigten außerdem, dass Apoptose keine bedeutende Rolle bei der Zellproliferation spielte. Eine mögliche Verfälschung der Ergebnisse des gesamten Experiments durch Apoptose kann damit praktisch ausgeschlossen werden.

Durch die bis zu diesem Punkt erfolgten Analysen konnte bereits eine gute Übersicht über die allgemeinen Regulationen erlangt werden, die den Zellzyklus in Enterosphären betreffen. In einem weiteren Schritt wurde der Fokus auf spezifische Zelltypen wie neuronale Vorläuferzellen oder glatte Muskelzellen gelegt.

Expressionsänderungen traten bei 8 Genen auf, von denen bereits bekannt ist, dass sie dem Erhalt der Stammzellnischen im ZNS dienen. Die Regulationsrichtung der meisten dieser Gene stützte die Beobachtung der erfolgreichen Einleitung der Differenzierung, die bereits bei der Analyse der Zellzyklusproteine gewonnen werden konnte. Von *Etv4* und *Etv5* ist bekannt, dass sie in undifferenzierten embryonalen Stammzellen exprimiert werden [294]. Eine negative Regulation fand bei ihnen ebenso statt, wie bei der Expression des ABC-Transporters *Abcg2*, der bereits Anwendung als Stammzellmarker findet; er spielt eine wichtige Rolle bei der Erhaltung des proliferativen Zustandes von humanen neuronalen Stammzellen [295].

Ebenso ließ sich bei einer ganzen Reihe von Differenzierungsfaktoren für neuronale Vorläuferzellen eine positive Regulation feststellen. Darunter befanden sich sowohl Faktoren, die eine Rolle bei der Differenzierung zu neuronalen Zellen spielen (*NEUROD4* [296], *S1PR1* [297]), wie auch Faktoren, die wichtig für die Spezifizierung zu Gliazellen sind (*OLIG1* [298]). Der Transkriptionsfaktor *KLF9*, der im ersten Versuchsteil dieser Dissertation auch positiv durch T3 reguliert wurde und der als möglicher Verursacher für das verlängerte Wachstum der Zellfortsätze von  $\beta$ -Tubulin-positiven Zellen identifiziert wurde, wurde ebenfalls verstärkt exprimiert.

Interessant ist, dass auch Gene eine positive Regulation aufweisen, die in die Myelinisierung von Zellen involviert sind, wie der Transkriptionsfaktor *MYRF* [299]. Es könnte sich um einen ähnlichen Effekt handeln, wie er schon bei anderen Myelinproteinen beobachtet wurde: Das Myelinprotein P0 wird während der Entwicklung des ENS in der Ratte verstärkt gebildet [300]. Eine mögliche Erklärung ist, dass Myelinproteine als Adhäsionsmoleküle an der frühen Entwicklung von Gliazellen beteiligt sind und im späteren Verlauf der Entwicklung die Expression wieder gestoppt wird.

Der Genchip detektierte auch einige Marker, die spezifisch an Neurone binden, wie  $\beta$ -Tubulin III (*TUBB3*) oder Calbindin (*CALB* [301]). Ebenso erfolgte eine positive

Regulation spezifischer Gliazellmarker (GFAP [302]). Der Gliazellmarker S100 $\beta$  (*S100B*) wurde negativ reguliert, was sich jedoch mit anderen Studien deckt, die zeigen, dass S100 $\beta$  bei Mäusen im ENS erst spät in der Entwicklung (E14,5) gebildet wird [303].

Eine Regulation konnte erwartungsgemäß auch bei einigen Genen festgestellt werden, die an der Verknüpfung des neuronalen Netzwerks und der Signalweiterleitung beteiligt sind. Eine verstärkte Expression erfolgte bei Rezeptoren für die Neurotransmitter Acetylcholin (*CHRNA2,3* [304], *CHRNA7* [305]), Adrenalin/Noradrenalin (*ADRA1D*, *ADRA2A* [182]) und Serotonin (*HTR2B* [186]). Ebenso wurden verstärkt Synapsenproteine (*LRRTM2* und *LRRTM3* [306], Neurotrimin [307]) und SNARE-/Vesikelproteine gebildet (*STXBP2* [308], *SV2C* [309], *SYT6* [310]). Mehrere der regulierten Gene sind darüber hinaus bekannt, das Auswachsen neuronaler Zellausläufer zu fördern. Darunter befanden sich mehrere Semaphorine (*SEMA3B*, *SEMA3E*, *SEMA4F* [311]), das „Repulsive Guidance“-Molekül A (RGMA) [245] und das neuronale Zelladhäsionsmolekül (*NRCAM*) [312].

Wie zuvor bereits beschrieben setzten sich die für den Versuch verwendeten Enterosphären neben neuronalen Zellen auch aus anderen Zelltypen wie glatten Muskelzellen zusammen. Es war daher zu erwarten, dass auch die Expression von Genen reguliert wurde, die für die Entwicklung von glatten Muskelzellen und Schrittmacherzellen der glatten Muskulatur benötigt werden.

Typische muskuläre Entwicklungsfaktoren, die im ENS bereits entschlüsselt wurden, sind Afap1 [313], Calponin (*CNN1* [314]) und Enpp2 [315]. Es wurden außerdem mehrere Gene identifiziert, die die Differenzierung zu glatten Muskelzellen einleiten, wie *ARID5B* und *FOSL2* [316]. Außerdem wurden mehrere Actine (*ACTA2*, *ACTG2*) wie auch Myosine (*MYO1E*, *MYO5A*, *MYO7B*, *MYO18A*) verstärkt exprimiert [317]. Während die bis hierhin genannten Gene nach Einleitung der Differenzierung hochreguliert worden waren, wurden ebenso Gene mit einer negativen Regulation identifiziert wie Actinin 1 (*ACTN1* [317]) und Nucleoporin 210 (*NUP210* [318]).

Neben den Regulationen, die glatte Muskelzellen betreffen, konnten auch Regulationen bei 4 Genen gefunden werden, die ICCs, die Schrittmacherzellen der Muskulatur, kodieren. Alle 4 Gene unterlagen nach Einleitung der Differenzierung einer negativen Regulation.

Die positiven und negativen Regulationen einer großen Anzahl von Matrixproteinen wie Collagenen, Integrinen, Laminin und Keratin deuten an, dass nach Einleitung der

Differenzierung nicht nur neuronale und muskuläre Zelltypen einem starken Umbau unterliegen, sondern dass dies auch in der extrazellulären Matrix stattfindet. Studien zeigen, dass die extrazelluläre Matrix dabei die Entwicklung der neuronalen Vorläuferzellen während der Differenzierung beeinflussen kann [172].

Besonders interessant sind auch die Regulationen mehrerer Gene des Wnt-Signalweges. Bereits bei der Untersuchung des Einflusses von T3 konnte eine Regulation einiger dieser Gene gezeigt werden, und es ist wahrscheinlich, dass sie mit an der gesunkenen proliferativen Kapazität der Zellen nach T3-Zugabe beteiligt sind. Der Einfluss des Wnt-Signalweges auf Stammzellnischen war auch bereits Gegenstand einiger Studien [319].

Ein Abgleich der beiden durchgeführten Genexpressionsanalysen der vorliegenden Arbeit zeigte auch, dass es sich bei einigen der Gene, deren Expression während der frühen Differenzierung reguliert wurde, um Gene handelt, die auch durch T3 beeinflusst werden. So wurden die Gene *Adra2a*, *Gfra3*, *Gldn*, *Htr2b* und *Klf9* nicht nur beim Eintritt in die Differenzierungsphase verstärkt exprimiert, sondern unterlagen im anderen Versuch ebenso einer positiven Regulation durch T3. *MET*, *Neurod4*, *Ntm* und *Opalin* hingegen wurden zwar während der frühen Differenzierung verstärkt exprimiert, waren jedoch im späteren Versuch negativ reguliert durch T3. Bei *Chrm3* handelte es sich um das einzige Gen, dessen Expression in der frühen Differenzierungsphase weniger exprimiert, durch T3 jedoch positiv reguliert wurde.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch die Analyse der Genexpressionen in proliferierenden Enterosphären und in Enterosphären nach Einleitung der Differenzierung ein breiter Überblick über die Gene gewonnen werden konnte, die essenzielle zelluläre Vorgänge während der Proliferation wie auch der Differenzierung im ENS steuern. Dabei wurden nicht nur Entwicklungsfaktoren neuronaler Zellen, sondern auch anderer Zelltypen wie glatter Muskelzellen oder Schrittmacherzellen der Muskulatur identifiziert.

Die erhaltenen Daten bilden die Basis für weitere Studien, die zu einem noch besseren Verständnis der während der Entwicklung des ENS auftretenden genetischen Regulationen führen können.

## 5 Zusammenfassung

Das Schilddrüsenhormon 3,5,3'-Trijodthyronin (T3) spielt eine große Rolle bei der Regulierung des Stoffwechsels und bei der Embryonalentwicklung. Vor allem während der Reifung des zentralen Nervensystems kann eine Störung des Schilddrüsenhormonhaushalts schwere bleibende Schäden verursachen. Während der Einfluss auf die Bildung der Nervengewebe im zentralen Nervensystem und in Teilen des peripheren Nervensystems bereits Thema zahlreicher Studien war, sind die Auswirkungen von T3 auf das enterische Nervensystem des Magen-Darm-Trakts (ENS) bis heute nahezu unerforscht.

Das primäre Ziel der vorliegenden Doktorarbeit bestand darin, erstmalig mögliche Einflüsse von T3 auf die Entwicklung des ENS zu untersuchen. Zur Gewinnung des hierzu benötigten Zellmaterials wurde eigens die Präparation und die Kultivierung muriner ENS-Vorläuferzellen etabliert. In Kultur bildeten sich hierbei sogenannte Enterosphären; Zellkonstrukte, die ENS-Vorläuferzellen, jedoch auch andere Zellen wie glatte Muskelzellen und Fibroblasten enthalten. Die Enterosphären wurden anhand immunhistochemischer Versuche und durch eine Genexpressionsanalyse charakterisiert. Die Suche zielte auf Gene ab, deren Expression bei Eintritt in die Differenzierungsphase reguliert wird. Es konnten 1333 Gene identifiziert werden, darunter sowohl eine große Anzahl an Faktoren, die für die Aufrechterhaltung des Zellzyklus benötigt werden, als auch Faktoren, die die Differenzierung in die einzelnen Zelltypen wie Neurone, Gliazellen oder Muskelzellen vorantreiben. Ebenso konnten Regulationen in einer größeren Anzahl von Genen gezeigt werden, die essentielle Proteine für die Ausbildung von Synapsen und Neurotransmittern kodieren.

Da die Wirkung von T3 mittels Rezeptorbindung erfolgt, wurde im nächsten Schritt mittels RT-PCR analysiert, ob Schilddrüsenhormonrezeptoren in den Zielzellen exprimiert werden. Die Analyse ergab, dass sowohl  $Tr\alpha$ - als auch  $Tr\beta$ -Rezeptortypen in Enterosphären *in vitro* und in ENS-Geweben *in vivo* exprimiert werden. Ob T3 einen Einfluss auf Proliferation oder Differenzierung von Enterosphären ausübt, wurde in Zellkulturassays getestet. Es konnte gezeigt werden, dass T3 die Proliferation in Enterosphären hemmt und die Differenzierung neuronaler ENS-Vorläuferzellen beeinflusst: In BrdU-Inkorporationsassays besaßen Enterosphären unter T3-Einfluss eine verminderte Proliferationskapazität, während unter Differenzierungsbedingungen T3 stimulierend auf das Längenwachstum neuraler Zellausläufer wirkte. In weiter folgenden *in vivo*-Experimenten sollte das ENS von KO-Mäusen, bei de-

nen unterschiedliche Schilddrüsenhormonrezeptortypen deaktiviert worden waren, mittels immunhistochemischer Methoden untersucht werden. Hierbei war von vordergründigem Interesse, in wieweit die Deaktivierung der Rezeptoren eine Änderung der ENS-Struktur zur Folge hat. Die *in vivo*-Versuche mit KO-Mäusen blieben ohne Ergebnis. Die Whole mount-Färbungen des ENS-Netzwerks konnten erfolgreich etabliert werden, jedoch zeigten sich keine optisch erkennbaren Unterschiede der ENS-Struktur zwischen  $Tr\alpha 1^{-/-}$ -Mäusen,  $Tr\beta^{-/-}$ -Mäusen und Wildtyp-Mäusen. Da die Analyse der einzelnen Explantate eine sehr hohe Varianz ergab, war eine statistische Auswertung dieses Versuchs leider nicht möglich.

Mit Hilfe eines Affymetrix-Microarray Genchips wurden im nächsten Schritt die durch T3 ausgelösten Genregulationen analysiert, die möglicherweise verantwortlich für die in den Zellkulturexperimenten beobachteten Effekte sind. Dabei konnte eine Reihe von T3-regulierten Genen identifiziert werden, von denen man weiß, dass sie in der Nervenentwicklung eine Rolle spielen. Von besonderem Interesse waren Gene, die zur Gruppe der Guidance-Moleküle gehören. Einige dieser Gene sind im Zusammenhang mit dem ENS bereits hinreichend charakterisiert, da sie eine wichtige Rolle bei der Embryonalentwicklung spielen und da bekannt ist, dass Mutationen in diesen Genen für Dysganglionosen des Magen-Darm-Trakts verantwortlich sind. Zu diesen Genen zählen Endothelin 3 oder der GDNF-Rezeptor  $Gfra3$ . Die Microarray-Analyse zeigte außerdem die Regulation einer Gruppe von Wnt-Genen, von denen man weiß, dass sie wichtig für die Proliferation der ENS-Zellen sind. Die Regulation durch T3 erfolgte meist entgegengesetzt der Richtung, wie sie in anderen Studien für die Proliferation beschrieben ist. Wnt-Gene könnten damit zumindest am Effekt der durch T3 ausgelösten verringerten Proliferations-Kapazität beteiligt sein.

Mit den in dieser Dissertation erzielten Ergebnissen konnten neue Grundlagen für das Verständnis des Ablaufs der ENS-Entwicklung geschaffen werden. Der Einfluss des Schilddrüsenhormons T3 auf Vorläuferzellen des ENS wurde erstmals nachgewiesen. Außerdem konnten durch die Genexpressionsanalysen neue Einblicke in die Genetik der ENS-Entwicklung geschaffen werden. Weitere Untersuchungen der einzelnen Gen-Gen-Interaktionen sind in Zukunft notwendig, um die Gene und Signalwege weiter zu spezifizieren, die für die Steuerung der beobachteten Effekte von T3 wie auch die allgemeinen Abläufe bei der Differenzierung von ENS-Vorläuferzellen verantwortlich sind.

## 6 Literatur

- [1] S.A. SKEAFF: Iodine deficiency in pregnancy: the effect on neurodevelopment in the child. In: *Nutrients*. 3 (2011), S. 265-273.
- [2] F.A. ASHKAR, E. SEMPLE, C.H. SCHMIDT, J.E. ST, P.M. BARTLEWSKI, W.A. KING: Thyroid hormone supplementation improves bovine embryo development in vitro. In: *Hum.Reprod.* (2009).
- [3] D.B. KING, J.D. MAY: Thyroidal influence on body growth. In: *J.Exp.Zool.* 232 (1984), S. 453-460.
- [4] M.B. ZIMMERMANN: Iodine deficiency. In: *Endocrine reviews* 30 (2009), S. 376-408.
- [5] A.R. MANSOURIAN: A review on the metabolic disorders of iodine deficiency. In: *Pak.J.Biol.Sci.* 14 (2011), S. 412-424.
- [6] I. BARAKAT-WALTER: Role of thyroid hormones and their receptors in peripheral nerve regeneration. In: *J.Neurobiol.* 40 (1999), S. 541-559.
- [7] M.V. RASTOGI, S.H. LAFRANCHI: Congenital hypothyroidism. In: *Orphanet journal of rare diseases* 5 (2010), S. 17.
- [8] J.B. FURNESS, M. COSTA: *The Enteric Nervous system*. New York, Churchill Livingstone, 1987.
- [9] M.D. GERSHON, A. CHALAZONITIS, T.P. ROTHMAN: From neural crest to bowel: development of the enteric nervous system. In: *J.Neurobiol.* 24 (1993), S. 199-214.
- [10] A. BENNINGHOFF, D. DRENCKHAHN: *Anatomie: Band 1, 16. Auflage*. Urban & Fischer Verlag, München, 2003. - ISBN 978 3\_437\_42340\_1
- [11] M.D. GERSHON: The enteric nervous system. In: *Annu.Rev.Neurosci.* 4 (1981), S. 227-272.
- [12] D. NEWGREEN, H.M. YOUNG: Enteric nervous system: development and developmental disturbances--part 1. In: *Pediatr.Dev.Pathol.* 5 (2002), S. 224-247.
- [13] J.B. FURNESS, M. COSTA: Types of nerves in the enteric nervous system. In: *Neuroscience* 5 (1980), S. 1-20.
- [14] M. SCHEMANN: Control of gastrointestinal motility by the "gut brain"--the enteric nervous system. In: *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 41 Suppl 1 (2005), S. S4-S6.

- [15] S.L. JONES, A.T. BLIKSLAGER: Role of the enteric nervous system in the pathophysiology of secretory diarrhea. In: *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* 16 (2002), S. 222-228.
- [16] K. UCHIDA, Y. KAMIKAWA: Muscularis mucosae - the forgotten sibling. In: *Journal of smooth muscle research = Nihon Heikatsukin Gakkai kikanshi* 43 (2007), S. 157-177.
- [17] J.B. FURNESS, K.C. LLOYD, C. STERNINI, J.H. WALSH: Evidence that myenteric neurons of the gastric corpus project to both the mucosa and the external muscle: myectomy operations on the canine stomach. In: *Cell Tissue Res.* 266 (1991), S. 475-481.
- [18] J.P. TIMMERMANS, J. HENS, D. ADRIAENSEN: Outer submucous plexus: an intrinsic nerve network involved in both secretory and motility processes in the intestine of large mammals and humans. In: *The Anatomical record* 262 (2001), S. 71-78.
- [19] D. GRUNDY, M. SCHEMANN: Enteric nervous system. In: *Curr.Opin.Gastroenterol.* 21 (2005), S. 176-182.
- [20] J.D. WOOD, D.H. ALPERS, P.L. ANDREWS: Fundamentals of neurogastroenterology. In: *Gut* 45 Suppl 2 (1999), S. ii6-ii16.
- [21] J.D. WOOD: Enteric nervous system: reflexes, pattern generators and motility. In: *Curr.Opin.Gastroenterol.* 24 (2008), S. 149-158.
- [22] H.M. YOUNG: Embryological origin of interstitial cells of Cajal. In: *Microscopy research and technique* 47 (1999), S. 303-308.
- [23] J.D. HUIZINGA, S. MARTZ, V. GIL, X.Y. WANG, M. JIMENEZ, S. PARSONS: Two independent networks of interstitial cells of cajal work cooperatively with the enteric nervous system to create colonic motor patterns. In: *Front Neurosci.* 5 (2011), S. 93.
- [24] W.M. BAYLISS, E.H. STARLING: The movements and innervation of the small intestine. In: *J.Physiol* 24 (1899), S. 99-143.
- [25] N. MEI: Recent studies on intestinal vagal afferent innervation. Functional implications. In: *J.Auton.Nerv.Syst.* 9 (1983), S. 199-206.
- [26] A. BREHMER, F. SCHRODL, W. NEUHUBER: Morphological classifications of enteric neurons--100 years after Dogiel. In: *Anat.Embryol.(Berl)* 200 (1999), S. 125-135.
- [27] A. BREHMER: Structure of enteric neurons. In: *Adv.Anat.Embryol.Cell Biol.* 186 (2006), S. 1-91.

- [28] S. NISHI, R.A. NORTH: Intracellular recording from the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. In: *J.Physiol* 231 (1973), S. 471-491.
- [29] G.D. HIRST, H.C. MCKIRDY: A nervous mechanism for descending inhibition in guinea-pig small intestine. In: *J.Physiol* 238 (1974), S. 129-143.
- [30] A.E. LOMAX, P.P. BERTRAND, J.B. FURNESS: Electrophysiological characteristics distinguish three classes of neuron in submucosal ganglia of the guinea-pig distal colon. In: *Neuroscience* 103 (2001), S. 245-255.
- [31] A.E. LOMAX, J.B. FURNESS: Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon. In: *Cell Tissue Res.* 302 (2000), S. 59-72.
- [32] S.J. BROOKES: Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. In: *Anat.Rec.* 262 (2001), S. 58-70.
- [33] J.B. FURNESS: Types of neurons in the enteric nervous system. In: *J.Auton.Nerv.Syst.* 81 (2000), S. 87-96.
- [34] C.L. YNTEMA, W.S. HAMMOND: The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo. In: *J.Comp Neurol.* 101 (1954), S. 515-541.
- [35] N.M. LE DOUARIN, M.A. TEILLET: The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. In: *J.Embryol.Exp.Morphol.* 30 (1973), S. 31-48.
- [36] N.M. LE DOUARIN, M.A. TEILLET: [Studies on the determination of neural crest-cell migration]. In: *C.R.Acad.Sci.Hebd.Seances Acad.Sci.D.* 277 (1973), S. 1929-1932.
- [37] H.M. YOUNG, D.F. NEWGREEN, H. ENOMOTO, In: Johnson L. ed. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, Elsevier, Burlington, MA, 2012.
- [38] R.B. ANDERSON, D.F. NEWGREEN, H.M. YOUNG: Neural crest and the development of the enteric nervous system. In: *Adv.Exp.Med.Biol.* 589 (2006), S. 181-196.
- [39] V. SASSELLI, V. PACHNIS, A.J. BURNS: The enteric nervous system. In: *Dev.Biol.* 366 (2012), S. 64-73.
- [40] N. NAGY, K.C. BREWER, O. MWIZERWA, A.M. GOLDSTEIN: Pelvic plexus contributes ganglion cells to the hindgut enteric nervous system. In: *Dev.Dyn.* 236 (2007), S. 73-83.

- [41] C. NISHIYAMA, T. UESAKA, T. MANABE, Y. YONEKURA, T. NAGASAWA, D.F. NEWGREEN, H.M. YOUNG, H. ENOMOTO: Trans-mesenteric neural crest cells are the principal source of the colonic enteric nervous system. In: *Nature neuroscience* 15 (2012), S. 1211-1218.
- [42] A.J. BURNS, N.M. DOUARIN: The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut: spatiotemporal analysis of the development of the enteric nervous system. In: *Development* 125 (1998), S. 4335-4347.
- [43] T.A. HEANUE, V. PACHNIS: Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. In: *Nat.Rev.Neurosci.* 8 (2007), S. 466-479.
- [44] S. TARAVIRAS, C.V. MARCOS-GUTIERREZ, P. DURBEC, H. JANI, M. GRIGORIOU, M. SUKUMARAN, L.C. WANG, M. HYNES, G. RAISMAN, V. PACHNIS: Signalling by the RET receptor tyrosine kinase and its role in the development of the mammalian enteric nervous system. In: *Development* 126 (1999), S. 2785-2797.
- [45] L.F. LIN, D.H. DOHERTY, J.D. LILE, S. BEKTESH, F. COLLINS: GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. In: *Science* 260 (1993), S. 1130-1132.
- [46] H. SAARMA M FAU - SARIOLA, H. SARIOLA: Other neurotrophic factors: glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). In: (1999).
- [47] M.S. AIRAKSINEN, M. SAARMA: The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. In: *Nature reviews. Neuroscience* 3 (2002), S. 383-394.
- [48] J. AMIEL, S. LYONNET: Hirschsprung disease, associated syndromes, and genetics: a review. In: *J.Med.Genet.* 38 (2001), S. 729-739.
- [49] M. ANGRIST, M. BOLK S FAU - HALUSHKA, P.A. HALUSHKA M FAU - LAPCHAK, A. LAPCHAK PA FAU - CHAKRAVARTI, A. CHAKRAVARTI: Germline mutations in glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and RET in a Hirschsprung disease patient. In: (1996).
- [50] G. CACALANO, L.C. FARINAS I FAU - WANG, K. WANG LC FAU - HAGLER, A. HAGLER K FAU - FORGIE, M. FORGIE A FAU - MOORE, M. MOORE M FAU - ARMANINI, H. ARMANINI M FAU - PHILLIPS, A.M. PHILLIPS H FAU - RYAN, L.F. RYAN AM FAU - REICHARDT, M. REICHARDT LF FAU - HYNES, A. HYNES M FAU - DAVIES, A. DAVIES A FAU - ROSENTHAL, A. ROSENTHAL: GFR $\alpha$ 1 is an essential receptor component for GDNF in the developing nervous system and kidney. In: (1998).
- [51] J.G. PICHEL, H.Z. SHEN L FAU - SHENG, A.C. SHENG HZ FAU - GRANHOLM, J. GRANHOLM AC FAU - DRAGO, A. DRAGO J FAU - GRINBERG, E.J. GRINBERG A FAU - LEE, S.P. LEE EJ FAU - HUANG, M. HUANG SP FAU - SAARMA, B.J. SAARMA M FAU - HOFFER, H.

HOFFER BJ FAU - SARIOLA, H. SARIOLA H FAU - WESTPHAL, H. WESTPHAL: Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. In: (1996).

[52] A. SCHUCHARDT, L. D'AGATI V FAU - LARSSON-BLOMBERG, F. LARSSON-BLOMBERG L FAU - COSTANTINI, V. COSTANTINI F FAU - PACHNIS, V. PACHNIS: Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. In: (1994).

[53] L. MARUCCIO, C. LUCINI, F. RUSSO, R. ANTONUCCI, L. CASTALDO: The development of avian enteric nervous system: distribution of artemin immunoreactivity. In: *Acta histochemica* 110 (2008), S. 163-171.

[54] R.O. HEUCKEROTH, H. ENOMOTO, J.R. GRIDER, J.P. GOLDEN, J.A. HANKE, A. JACKMAN, D.C. MOLLIVER, M.E. BARDGETT, W.D. SNIDER, E.M. JOHNSON, JR., J. MILBRANDT: Gene targeting reveals a critical role for neurturin in the development and maintenance of enteric, sensory, and parasympathetic neurons. In: *Neuron* 22 (1999), S. 253-263.

[55] B. DOUSSET, C. JACOB: [Endothelin, a peptidic vasoconstrictor]. In: (1992).

[56] R.M. TOUYZ, E.L. SCHIFFRIN: Role of endothelin in human hypertension. In: (2003).

[57] M. YANAGISAWA, H. KURIHARA, S. KIMURA, Y. TOMOBE, M. KOBAYASHI, Y. MITSUI, Y. YAZAKI, K. GOTO, T. MASAKI: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. In: *Nature* 332 (1988), S. 411-415.

[58] A. INOUE, M. YANAGISAWA, S. KIMURA, Y. KASUYA, T. MIYAUCHI, K. GOTO, T. MASAKI: The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (1989), S. 2863-2867.

[59] L. STANCHINA, V. BARAL, F. ROBERT, V. PINGAULT, N. LEMORT, V. PACHNIS, M. GOOSSENS, N. BONDURAND: Interactions between Sox10, Edn3 and Ednrb during enteric nervous system and melanocyte development. In: *Developmental biology* 295 (2006), S. 232-249.

[60] M.A. LEIBL, T. OTA, M.N. WOODWARD, S.E. KENNY, D.A. LLOYD, C.R. VAILLANT, D.H. EDGAR: Expression of endothelin 3 by mesenchymal cells of embryonic mouse caecum. In: *Gut* 44 (1999), S. 246-252.

[61] A. BARLOW, E. DE GRAAFF, V. PACHNIS: Enteric nervous system progenitors are coordinately controlled by the G protein-coupled receptor EDNRB and the receptor tyrosine kinase RET. In: *Neuron* 40 (2003), S. 905-916.

- [62] D. XU, N. EMOTO, A. GIAID, C. SLAUGHTER, S. KAW, D. DEWIT, M. YANAGISAWA: ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. In: *Cell* 78 (1994), S. 473-485.
- [63] M.N. WOODWARD, E.L. SIDEBOTHAM, M.G. CONNELL, S.E. KENNY, C.R. VAILLANT, D.A. LLOYD, D.H. EDGAR: Analysis of the effects of endothelin-3 on the development of neural crest cells in the embryonic mouse gut. In: *J.Pediatr.Surg.* 38 (2003), S. 1322-1328.
- [64] N. BONDURAND, D. NATARAJAN, A. BARLOW, N. THAPAR, V. PACHNIS: Maintenance of mammalian enteric nervous system progenitors by SOX10 and endothelin 3 signalling. In: *Development* 133 (2006), S. 2075-2086.
- [65] S. BRITSCH, D.E. GOERICH, D. RIETHMACHER, R.I. PEIRANO, M. ROSSNER, K.A. NAVE, C. BIRCHMEIER, M. WEGNER: The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. In: *Genes & development* 15 (2001), S. 66-78.
- [66] R.P. KAPUR: Early death of neural crest cells is responsible for total enteric aganglionosis in Sox10(Dom)/Sox10(Dom) mouse embryos. In: *Pediatric and developmental pathology : the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society* 2 (1999), S. 559-569.
- [67] J. KIM, L. LO, E. DORMAND, D.J. ANDERSON: SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. In: *Neuron* 38 (2003), S. 17-31.
- [68] F. GUILLEMOT, A.L. JOYNER: Dynamic expression of the murine Achaete-Scute homologue Mash-1 in the developing nervous system. In: *Mechanisms of development* 42 (1993), S. 171-185.
- [69] E. BLAUGRUND, T.D. PHAM, V.M. TENNYSON, L. LO, L. SOMMER, D.J. ANDERSON, M.D. GERSHON: Distinct subpopulations of enteric neuronal progenitors defined by time of development, sympathoadrenal lineage markers and Mash-1-dependence. In: *Development* 122 (1996), S. 309-320.
- [70] A. PATTYN, C. GORIDIS, J.F. BRUNET: Specification of the central noradrenergic phenotype by the homeobox gene Phox2b. In: *Molecular and cellular neurosciences* 15 (2000), S. 235-243.
- [71] H.M. YOUNG, D. CIAMPOLI, J. HSUAN, A.J. CANTY: 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. In: *Dev.Dyn.* 216 (1999), S. 137-152.
- [72] M.R. HIRSCH, M.C. TIVERON, F. GUILLEMOT, J.F. BRUNET, C. GORIDIS: Control of noradrenergic differentiation and Phox2a expression by MASH1 in the central and peripheral nervous system. In: *Development* 125 (1998), S. 599-608.

- [73] A. PATTYN, X. MORIN, H. CREMER, C. GORIDIS, J.F. BRUNET: The homeobox gene *Phox2b* is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. In: *Nature* 399 (1999), S. 366-370.
- [74] V. CACHEUX, F. DASTOT-LE MOAL, H. KAARIAINEN, N. BONDURAND, R. RINTALA, B. BOISSIER, M. WILSON, D. MOWAT, M. GOOSSENS: Loss-of-function mutations in SIP1 Smad interacting protein 1 result in a syndromic Hirschsprung disease. In: *Human molecular genetics* 10 (2001), S. 1503-1510.
- [75] C. ZWEIER, B. ALBRECHT, B. MITULLA, R. BEHRENS, M. BEESE, G. GILLESSEN-KAESBACH, H.D. ROTT, A. RAUCH: "Mowat-Wilson" syndrome with and without Hirschsprung disease is a distinct, recognizable multiple congenital anomalies-mental retardation syndrome caused by mutations in the zinc finger homeo box 1B gene. In: *American journal of medical genetics* 108 (2002), S. 177-181.
- [76] T. VAN DE PUTTE, M. MARUHASHI, A. FRANCIS, L. NELLES, H. KONDOH, D. HUYLEBROECK, Y. HIGASHI: Mice lacking ZFH1B, 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. In: *American journal of human genetics* 72 (2003), S. 465-470.
- [77] L. STANCHINA, T. VAN DE PUTTE, M. GOOSSENS, D. HUYLEBROECK, N. BONDURAND: Genetic interaction between *Sox10* and *Zfhx1b* during enteric nervous system development. In: *Developmental biology* 341 (2010), S. 416-428.
- [78] K.F. BERGERON, D. SILVERSIDES, N. PILON: The developmental genetics of Hirschsprung's disease. In: *Clin. Genet.* (2012).
- [79] E.L. GOLDBERG: An epidemiological study of Hirschsprung's disease. In: *International journal of epidemiology* 13 (1984), S. 479-485.
- [80] N. WAKAMATSU, Y. YAMADA, K. YAMADA, T. ONO, N. NOMURA, H. TANIGUCHI, H. KITO, N. MUTOH, T. YAMANAKA, K. MUSHIAKE, K. KATO, S. SONTA, M. NAGAYA: Mutations in SIP1, encoding Smad interacting protein-1, cause a form of Hirschsprung disease. In: *Nat. Genet.* 27 (2001), S. 369-370.
- [81] S.W. MOORE, A.G. JOHNSON: Hirschsprung's disease: genetic and functional associations of Down's and Waardenburg syndromes. In: *Semin. Pediatr. Surg.* 7 (1998), S. 156-161.
- [82] M.A. PARISI: Hirschsprung Disease Overview. In: (1993).
- [83] D.R. MOWAT, G.D. CROAKER, D.T. CASS, B.A. KERR, J. CHAITOW, L.C. ADES, N.L. CHIA, M.J. WILSON: Hirschsprung disease, microcephaly, mental retardation, and characteristic facial features: delineation of a new syndrome and identification of a locus at chromosome 2q22-q23. In: *Journal of medical genetics* 35 (1998), S. 617-623.

- [84] M.C. OU-YANG, S.N. YANG, Y.M. HSU, M.H. OU-YANG, H.C. HAUNG, S.Y. LEE, W.S. HSIEH, Y.N. SU, C.A. LIU: Concomitant existence of total bowel aganglionosis and congenital central hypoventilation syndrome in a neonate with PHOX2B gene mutation. In: *Journal of pediatric surgery* 42 (2007), S. e9-11.
- [85] K. O'DELL, E. STAREN, A. BASSUK: Total colonic aganglionosis (Zuelzer-Wilson syndrome) and congenital failure of automatic control of ventilation (Ondine's curse). In: *J.Pediatr.Surg.* 22 (1987), S. 1019-1020.
- [86] D.D. BURKARDT, J.M. GRAHAM, JR., S.S. SHORT, P.K. FRYKMAN: Advances in Hirschsprung disease genetics and treatment strategies: an update for the primary care pediatrician. In: *Clinical pediatrics* 53 (2014), S. 71-81.
- [87] F. NOUIRA, A.Y. BEN, N. SARRAI, S. GHORBEL, S. JLIDI, R. KHEMAKHEM, A. CHARIEG, B. CHAOUACHI: Surgical management of recto-sigmoid Hirschsprung's disease. In: *Acta Chir Belg.* 112 (2012), S. 126-130.
- [88] H. TSUJI, L. SPITZ, E.M. KIELY, D.P. DRAKE, A. PIERRO: Management and long-term follow-up of infants with total colonic aganglionosis. In: *J.Pediatr.Surg.* 34 (1999), S. 158-161.
- [89] R. HOTTA, D. NATARAJAN, A.J. BURNS, N. THAPAR: Stem cells for GI motility disorders. In: *Curr.Opin.Pharmacol.* 11 (2011), S. 617-623.
- [90] E.M. SANTSCHI, A.K. PURDY, S.J. VALBERG, P.D. VROTSOS, H. KAESE, J.R. MICKELSON: Endothelin receptor B polymorphism associated with lethal white foal syndrome in horses. In: *Mamm.Genome* 9 (1998), S. 306-309.
- [91] G.B. VON BOYEN, H.J. KRAMMER, A. SUSS, C. DEMBOWSKI, H. EHRENREICH, T. WEDEL: Abnormalities of the enteric nervous system in heterozygous endothelin B receptor deficient (spotting lethal) rats resembling intestinal neuronal dysplasia. In: *Gut* 51 (2002), S. 414-419.
- [92] S.F. GILBERT: *Developmental Biology*. Sinauer Associates, Inc., 2000. - ISBN 0-87893-243-7
- [93] S. TEMPLE, A. ALVAREZ-BUYLLA: Stem cells in the adult mammalian central nervous system. In: *Current opinion in neurobiology* 9 (1999), S. 135-141.
- [94] C.P. LEBLOND, C.E. STEVENS: The constant renewal of the intestinal epithelium in the albino rat. In: *The Anatomical record* 100 (1948), S. 357-377.
- [95] E. MARSHMAN, C. BOOTH, C.S. POTTEN: The intestinal epithelial stem cell. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 24 (2002), S. 91-98.

- [96] N. BARKER, M. VAN DE WETERING, H. CLEVERS: The intestinal stem cell. In: *Genes & development* 22 (2008), S. 1856-1864.
- [97] A. HAEGEBARTH, H. CLEVERS: Wnt signaling, *Igr5*, and stem cells in the intestine and skin. In: *The American journal of pathology* 174 (2009), S. 715-721.
- [98] N. BONDURAND, D. NATARAJAN, N. THAPAR, C. ATKINS, V. PACHNIS: Neuron and glia generating progenitors of the mammalian enteric nervous system isolated from foetal and postnatal gut cultures. In: *Development* 130 (2003), S. 6387-6400.
- [99] M. METZGER, P.M. BAREISS, T. DANKER, S. WAGNER, J. HENNENLOTTER, E. GUENTHER, F. OBERMAYR, A. STENZL, A. KOENIGSRAINER, T. SKUTELLA, L. JUST: Expansion and differentiation of neural progenitors derived from the human adult enteric nervous system. In: *Gastroenterology* 137 (2009), S. 2063-2073.
- [100] T.A. HEANUE, V. PACHNIS: Prospective identification and isolation of enteric nervous system progenitors using *Sox2*. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 29 (2011), S. 128-140.
- [101] S. ALMOND, R.M. LINDLEY, S.E. KENNY, M.G. CONNELL, D.H. EDGAR: Characterisation and transplantation of enteric nervous system progenitor cells. In: *Gut* 56 (2007), S. 489-496.
- [102] R.M. LINDLEY, D.B. HAWCUTT, M.G. CONNELL, S.L. ALMOND, M.G. VANNUCCHI, M.S. FAUSSONE-PELLEGRINI, D.H. EDGAR, S.E. KENNY: Human and mouse enteric nervous system neurosphere transplants regulate the function of aganglionic embryonic distal colon. In: *Gastroenterology* 135 (2008), S. 205-216.e206.
- [103] A.J. BURNS, N. THAPAR: Neural stem cell therapies for enteric nervous system disorders. In: *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 11 (2014), S. 317-328.
- [104] J. BELKIND-GERSON, R. HOTTA, M. WHALEN, N. NAYYAR, N. NAGY, L. CHENG, A. ZUCKERMAN, A.M. GOLDSTEIN, J. DIETRICH: Engraftment of enteric neural progenitor cells into the injured adult brain. In: *BMC neuroscience* 17 (2016), S. 5.
- [105] K. TAKAHASHI, S. YAMANAKA: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. In: *Cell* 126 (2006), S. 663-676.
- [106] K. OKITA, T. ICHISAKA, S. YAMANAKA: Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. In: *Nature* 448 (2007), S. 313-317.
- [107] I.H. PARK, R. ZHAO, J.A. WEST, A. YABUUCHI, H. HUO, T.A. INCE, P.H. LEROU, M.W. LENSCH, G.Q. DALEY: Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. In: *Nature* 451 (2008), S. 141-146.

- [108] K. TAKAHASHI, K. TANABE, M. OHNUKI, M. NARITA, T. ICHISAKA, K. TOMODA, S. YAMANAKA: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. In: *Cell* 131 (2007), S. 861-872.
- [109] J. YU, M.A. VODYANIK, K. SMUGA-OTTO, J. ANTOSIEWICZ-BOURGET, J.L. FRANE, S. TIAN, J. NIE, G.A. JONSDOTTIR, V. RUOTTI, R. STEWART, SLUKVIN, II, J.A. THOMSON: Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. In: *Science* 318 (2007), S. 1917-1920.
- [110] M. NAKAGAWA, M. KOYANAGI, K. TANABE, K. TAKAHASHI, T. ICHISAKA, T. AOI, K. OKITA, Y. MOCHIDUKI, N. TAKIZAWA, S. YAMANAKA: Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. In: *Nature biotechnology* 26 (2008), S. 101-106.
- [111] K. OSAFUNE, L. CARON, M. BOROWIAK, R.J. MARTINEZ, C.S. FITZ-GERALD, Y. SATO, C.A. COWAN, K.R. CHIEN, D.A. MELTON: Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. In: *Nature biotechnology* 26 (2008), S. 313-315.
- [112] T. UEDA, T. YAMADA, D. HOKUTO, F. KOYAMA, S. KASUDA, H. KANEHIRO, Y. NAKAJIMA: Generation of functional gut-like organ from mouse induced pluripotent stem cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 391 (2010), S. 38-42.
- [113] A.J. VAN HERLE, G. VASSART, J.E. DUMONT: Control of thyroglobulin synthesis and secretion. (First of two parts). In: *N.Engl.J.Med.* 301 (1979), S. 239-249.
- [114] R. SCHMIDT, F. LANG, G. THEWS, *Physiologie des Menschen*, 2005, pp. 460-489.
- [115] S. REFETOFF, N.I. ROBIN, V.S. FANG: Parameters of thyroid function in serum of 16 selected vertebrate species: a study of PBI, serum T4, free T4, and the pattern of T4 and T3 binding to serum proteins. In: *Endocrinology* 86 (1970), S. 793-805.
- [116] J.H. OPPENHEIMER: Role of plasma proteins in the binding, distribution and metabolism of the thyroid hormones. In: *The New England journal of medicine* 278 (1968), S. 1153-1162.
- [117] O. KARAPANOU, A. PAPADIMITRIOU: Thyroid hormone transporters in the human. In: *Hormones.(Athens.)* 10 (2011), S. 270-279.
- [118] G.R. WILLIAMS, J.H. BASSETT: Deiodinases: the balance of thyroid hormone: local control of thyroid hormone action: role of type 2 deiodinase. In: *J.Endocrinol.* 209 (2011), S. 261-272.
- [119] S.Y. CHENG, J.L. LEONARD, P.J. DAVIS: Molecular aspects of thyroid hormone actions. In: *Endocr.Rev.* 31 (2010), S. 139-170.

- [120] D. FORREST, L.C. ERWAY, L. NG, R. ALTSCHULER, T. CURRAN: Thyroid hormone receptor beta is essential for development of auditory function. In: *Nat.Genet.* 13 (1996), S. 354-357.
- [121] D. FORREST, B. VENNSTROM: Functions of thyroid hormone receptors in mice. In: *Thyroid* 10 (2000), S. 41-52.
- [122] J.L. LEONARD, A.P. FARWELL, P.M. YEN, W.W. CHIN, M. STULA: Differential expression of thyroid hormone receptor isoforms in neurons and astroglial cells. In: *Endocrinology* 135 (1994), S. 548-555.
- [123] C.B. HARVEY, G.R. WILLIAMS: Mechanism of thyroid hormone action. In: *Thyroid* 12 (2002), S. 441-446.
- [124] D.J. BRADLEY, H.C. TOWLE, W.S. YOUNG, III: Spatial and temporal expression of alpha- and beta-thyroid hormone receptor mRNAs, including the beta 2-subtype, in the developing mammalian nervous system. In: *J.Neurosci.* 12 (1992), S. 2288-2302.
- [125] S.Y. CHENG: Multiple mechanisms for regulation of the transcriptional activity of thyroid hormone receptors. In: *Rev.Endocr.Metab Disord.* 1 (2000), S. 9-18.
- [126] G.R. WILLIAMS: Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. In: *Mol.Cell Biol.* 20 (2000), S. 8329-8342.
- [127] I. JONES, L. NG, H. LIU, D. FORREST: An intron control region differentially regulates expression of thyroid hormone receptor beta2 in the cochlea, pituitary, and cone photoreceptors. In: *Mol.Endocrinol.* 21 (2007), S. 1108-1119.
- [128] O.E. JANSSEN, A.E. HEUFELDER, K. MANN, in: D. Ganten, K. Ruckpaul (Eds.), *Molekularmedizinische Grundlagen von Endokrinopathien*, Springer, Berlin, 2001, pp. 45-100.
- [129] G.A. BRENT: Mechanisms of thyroid hormone action. In: *The Journal of clinical investigation* 122 (2012), S. 3035-3043.
- [130] J. BERNAL: Thyroid hormones and brain development. In: *Vitam.Horm.* 71 (2005), S. 95-122.
- [131] V.J. POP, J.L. KUIJPENS, A.L. VAN BAAR, G. VERKERK, M.M. VAN SON, J.J. DE VIJLDER, T. VULSMA, W.M. WIERSINGA, H.A. DREXHAGE, H.L. VADER: Low maternal free thyroxine concentrations during early pregnancy are associated with impaired psychomotor development in infancy. In: *Clinical endocrinology* 50 (1999), S. 149-155.
- [132] R. SINHA, P.M. YEN, in: L.J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan, K.R. Feingold, A. Grossman, J.M. Hershman, C. Koch, M. Korbonits, R. McLachlan, M. New, J.

Purnell, R. Rebar, F. Singer, A. Vinik (Eds.), Endotext, MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA), 2000.

[133] R. MULLUR, Y.Y. LIU, G.A. BRENT: Thyroid hormone regulation of metabolism. In: *Physiological reviews* 94 (2014), S. 355-382.

[134] M.K. CHO: Thyroid dysfunction and subfertility. In: *Clinical and experimental reproductive medicine* 42 (2015), S. 131-135.

[135] S. SILBERNAGL, A. DESPOPOULOS: *Taschenatlas der Physiologie*. 286-287. Georg Thieme Verlag, 2001. - ISBN 3135677052

[136] R. KLINKE, S. SILBERNAGL, Lehrbuch der Physiologie, 2003, pp. 478-485.

[137] J. POHLENZ, S. REFETOFF: Mutations in the sodium/iodide symporter (NIS) gene as a cause for iodide transport defects and congenital hypothyroidism. In: *Biochimie* 81 (1999), S. 469-476.

[138] Z.P. CHEN, B.S. HETZEL: Cretinism revisited. In: *Best.Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab* 24 (2010), S. 39-50.

[139] B. DAVIDSON, M. SOODAK, J.T. NEARY, H.V. STROUT, J.D. KIEFFER, H. MOVER, F. MALOOF: The irreversible inactivation of thyroid peroxidase by methylmercaptoimidazole, thiouracil, and propylthiouracil in vitro and its relationship to in vivo findings. In: *Endocrinology* 103 (1978), S. 871-882.

[140] A.M. LEUNG, L.E. BRAVERMAN: Consequences of excess iodine. In: *Nature reviews. Endocrinology* 10 (2014), S. 136-142.

[141] J.J. DE VIJLDER: Primary congenital hypothyroidism: defects in iodine pathways. In: *European journal of endocrinology* 149 (2003), S. 247-256.

[142] B.M. LUTTRELL, I.B. HALES: Thyroid stimulating immunoglobulin in Graves' disease. In: *Australian and New Zealand journal of medicine* 11 (1981), S. 293-298.

[143] S. DE LEO, S.Y. LEE, L.E. BRAVERMAN: Hyperthyroidism. In: *Lancet (London, England)* 388 (2016), S. 906-918.

[144] H.K. SHIM, S.G. KIM, T.S. KIM, S.K. KIM, S.J. LEE: Total Thyroidectomy in the Mouse: the Feasibility Study in the Non-thyroidal Tumor Model Expressing Human Sodium/Iodide Symporter Gene. In: *Nuclear medicine and molecular imaging* 45 (2011), S. 103-110.

[145] M. TRAJKOVIC, T.J. VISSER, J. MITTAG, S. HORN, J. LUKAS, V.M. DARRAS, G. RAIVICH, K. BAUER, H. HEUER: Abnormal thyroid hormone metabolism in mice lacking

the monocarboxylate transporter 8. In: *The Journal of clinical investigation* 117 (2007), S. 627-635.

[146] K. GAUTHIER, O. CHASSANDE, M. PLATEROTI, J.P. ROUX, C. LEGRAND, B. PAIN, B. ROUSSET, R. WEISS, J. TROUILLAS, J. SAMARUT: Different functions for the thyroid hormone receptors TRalpha and TRbeta in the control of thyroid hormone production and post-natal development. In: *The EMBO journal* 18 (1999), S. 623-631.

[147] A. MANSOURI, K. CHOWDHURY, P. GRUSS: Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. In: *Nature genetics* 19 (1998), S. 87-90.

[148] D. MANNA, G. ROY, G. MUGESH: Antithyroid drugs and their analogues: synthesis, structure, and mechanism of action. In: *Accounts of chemical research* 46 (2013), S. 2706-2715.

[149] A.M. DUMITRESCU, X.H. LIAO, R.E. WEISS, K. MILLEN, S. REFETOFF: Tissue-specific thyroid hormone deprivation and excess in monocarboxylate transporter (mct) 8-deficient mice. In: *Endocrinology* 147 (2006), S. 4036-4043.

[150] A.M. DUMITRESCU, X.H. LIAO, T.B. BEST, K. BROCKMANN, S. REFETOFF: A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene. In: *American journal of human genetics* 74 (2004), S. 168-175.

[151] C.E. SCHWARTZ, R.E. STEVENSON: The MCT8 thyroid hormone transporter and Allan-Herndon-Dudley syndrome. In: *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* 21 (2007), S. 307-321.

[152] F. FLAMANT, J. SAMARUT: Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. In: *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 14 (2003), S. 85-90.

[153] A. FRAICHARD, O. CHASSANDE, M. PLATEROTI, J.P. ROUX, J. TROUILLAS, C. DEHAY, C. LEGRAND, K. GAUTHIER, M. KEDINGER, L. MALAVAL, B. ROUSSET, J. SAMARUT: The T3R alpha gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production. In: *The EMBO journal* 16 (1997), S. 4412-4420.

[154] L. WIKSTROM, C. JOHANSSON, C. SALTO, C. BARLOW, B.A. CAMPOS, F. BAAS, D. FORREST, P. THOREN, B. VENNSTROM: Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor alpha 1. In: *EMBO J.* 17 (1998), S. 455-461.

[155] S. GOTHE, Z. WANG, L. NG, J.M. KINDBLOM, A.C. BARROS, C. OHLSSON, B. VENNSTROM, D. FORREST: Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary-thyroid axis, growth, and bone maturation. In: *Genes & development* 13 (1999), S. 1329-1341.

- [156] C. SALTO, J.M. KINDBLOM, C. JOHANSSON, Z. WANG, H. GULLBERG, K. NORDSTROM, A. MANSEN, C. OHLSSON, P. THOREN, D. FORREST, B. VENNSTROM: Ablation of TRalpha2 and a concomitant overexpression of alpha1 yields a mixed hypo- and hyperthyroid phenotype in mice. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 15 (2001), S. 2115-2128.
- [157] D. FORREST, E. HANEBUTH, R.J. SMEYNE, N. EVERDS, C.L. STEWART, J.M. WEHNER, T. CURRAN: Recessive resistance to thyroid hormone in mice lacking thyroid hormone receptor beta: evidence for tissue-specific modulation of receptor function. In: *EMBO J.* 15 (1996), S. 3006-3015.
- [158] E.D. ABEL, M.E. BOERS, C. PAZOS-MOURA, E. MOURA, H. KAULBACH, M. ZAKARIA, B. LOWELL, S. RADOVICK, M.C. LIBERMAN, F. WONDISFORD: Divergent roles for thyroid hormone receptor beta isoforms in the endocrine axis and auditory system. In: *The Journal of clinical investigation* 104 (1999), S. 291-300.
- [159] G.W. ANDERSON: Thyroid hormone and cerebellar development. In: *Cerebellum.* 7 (2008), S. 60-74.
- [160] F. CHATONNET, T. FAUQUIER, F. PICOU, R. GUYOT, F. FLAMANT: [Thyroid hormone and cerebellum development: direct and indirect effects?]. In: *Ann.Endocrinol.(Paris)* 72 (2011), S. 99-102.
- [161] J. PATEL, K. LANDERS, H. LI, R.H. MORTIMER, K. RICHARD: Thyroid hormones and fetal neurological development. In: *J.Endocrinol.* 209 (2011), S. 1-8.
- [162] G. MCISAAC, J.A. KIERNAN: Acceleration of neuromuscular re-innervation by triiodothyronine. In: *J.Anat.* 120 (1975), S. 551-560.
- [163] F. GUNSAR, S. YILMAZ, S. BOR, K. KUMANLIOGLU, S. CETINKALP, T. KABALAK, O.A. OZUTEMIZ: Effect of hypo- and hyperthyroidism on gastric myoelectrical activity. In: *Dig.Dis.Sci.* 48 (2003), S. 706-712.
- [164] J. ISKAROS, M. PICKARD, I. EVANS, A. SINHA, P. HARDIMAN, R. EKINS: Thyroid hormone receptor gene expression in first trimester human fetal brain. In: *J.Clin.Endocrinol.Metab* 85 (2000), S. 2620-2623.
- [165] I. MASCANFRONI, M.M. MONTESINOS, S. SUSPERREGUY, L. CERVI, J.M. ILARREGUI, V.D. RAMSEYER, A.M. MASINI-REPISO, H.M. TARGOVNIK, G.A. RABINOVICH, C.G. PELLIZAS: Control of dendritic cell maturation and function by triiodothyronine. In: *FASEB J.* 22 (2008), S. 1032-1042.
- [166] L.S. BATISTA, M. DENYER, S. BRITLAND, F.A. JAVID: Development of an intestinal cell culture model to obtain smooth muscle cells and myenteric neurones. In: *J.Anat.* 211 (2007), S. 819-829.

- [167] B. ROSATI, F. GRAU, A. KUEHLER, S. RODRIGUEZ, D. MCKINNON: Comparison of different probe-level analysis techniques for oligonucleotide microarrays. In: *BioTechniques* 36 (2004), S. 316-322.
- [168] T. UESAKA, M. NAGASHIMADA, H. ENOMOTO: GDNF signaling levels control migration and neuronal differentiation of enteric ganglion precursors. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33 (2013), S. 16372-16382.
- [169] S. FLEIGE, M.W. PFAFFL: RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. In: *Mol.Aspects Med.* 27 (2006), S. 126-139.
- [170] R. PERRIS, D. PERISSINOTTO: Role of the extracellular matrix during neural crest cell migration. In: *Mechanisms of development* 95 (2000), S. 3-21.
- [171] C.S. BARROS, S.J. FRANCO, U. MULLER: Extracellular matrix: functions in the nervous system. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3 (2011), S. a005108.
- [172] S. RAGHAVAN, R.R. GILMONT, K.N. BITAR: Neuroglial differentiation of adult enteric neuronal progenitor cells as a function of extracellular matrix composition. In: *Biomaterials* 34 (2013), S. 6649-6658.
- [173] P.H. NECKEL, R. MOHR, Y. ZHANG, B. HIRT, L. JUST: Comparative Microarray Analysis of Proliferating and Differentiating Murine ENS Progenitor Cells. In: *Stem cells international* 2016 (2016), S. 9695827.
- [174] Y. SATOH, Y. KOBAYASHI, A. TAKEUCHI, G. PAGES, J. POUYSSEGUR, T. KAZAMA: Deletion of ERK1 and ERK2 in the CNS causes cortical abnormalities and neonatal lethality: Erk1 deficiency enhances the impairment of neurogenesis in Erk2-deficient mice. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31 (2011), S. 1149-1155.
- [175] A.S. PERSSON, E. WESTMAN, F.H. WANG, F.H. KHAN, C. SPENGER, C. LAVEBRATT: Kv1.1 null mice have enlarged hippocampus and ventral cortex. In: *BMC.Neurosci.* 8 (2007), S. 10.
- [176] M. IIZUKA, I. TSUNENARI, Y. MOMOTA, I. AKIBA, T. KONO: Localization of a G-protein-coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel, CIR, in the rat brain. In: *Neuroscience* 77 (1997), S. 1-13.
- [177] S. JACOBS, E. RUUSUVUORI, S.T. SIPILA, A. HAAPANEN, H.H. DAMKIER, I. KURTH, M. HENTSCHKE, M. SCHWEIZER, Y. RUDHARD, L.M. LAATIKAINEN, J. TYYNELA, J. PRAETORIUS, J. VOIPIO, C.A. HUBNER: Mice with targeted Slc4a10 gene disruption have small brain ventricles and show reduced neuronal excitability. In: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105 (2008), S. 311-316.

- [178] K. NAKAJIMA, H. MIYAZAKI, N. NIISATO, Y. MARUNAKA: Essential role of NKCC1 in NGF-induced neurite outgrowth. In: *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 359 (2007), S. 604-610.
- [179] J.M. GEORGE: The synucleins. In: *Genome Biol.* 3 (2002), S. REVIEWS3002.
- [180] E. RYBNIKOVA, I. KARKKAINEN, M. PELTO-HUIKKO, A.P. HUOVILA: Developmental regulation and neuronal expression of the cellular disintegrin ADAM11 gene in mouse nervous system. In: *Neuroscience* 112 (2002), S. 921-934.
- [181] N. GAO, H.Z. HU, S. LIU, C. GAO, Y. XIA, J.D. WOOD: Stimulation of adenosine A1 and A2A receptors by AMP in the submucosal plexus of guinea pig small intestine. In: *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 292 (2007), S. G492-G500.
- [182] J. SCHEIBNER, A.U. TRENDELENBURG, L. HEIN, K. STARKE, C. BLANDIZZI: Alpha 2-adrenoceptors in the enteric nervous system: a study in alpha 2A-adrenoceptor-deficient mice. In: *Br.J.Pharmacol.* 135 (2002), S. 697-704.
- [183] A. CHAKRABARTY, A. BLACKLOCK, S. SVOJANOVSKY, P.G. SMITH: Estrogen elicits dorsal root ganglion axon sprouting via a renin-angiotensin system. In: *Endocrinology* 149 (2008), S. 3452-3460.
- [184] A.M. HARRINGTON, J.M. HUTSON, B.R. SOUTHWELL: Cholinergic neurotransmission and muscarinic receptors in the enteric nervous system. In: *Prog.Histochem.Cytochem.* 44 (2010), S. 173-202.
- [185] A. GARZA, L.Z. HUANG, J.H. SON, U.H. WINZER-SERHAN: Expression of nicotinic acetylcholine receptors and subunit messenger RNAs in the enteric nervous system of the neonatal rat. In: *Neuroscience* 158 (2009), S. 1521-1529.
- [186] E. FIORICA-HOWELLS, L. MAROTEAUX, M.D. GERSHON: Serotonin and the 5-HT(2B) receptor in the development of enteric neurons. In: *J.Neurosci.* 20 (2000), S. 294-305.
- [187] T. HOKFELT, D. STANIC, S.D. SANFORD, J.C. GATLIN, I. NILSSON, G. PARATCHA, F. LEDDA, S. FETISSOV, C. LINDFORS, H. HERZOG, J.E. JOHANSEN, R. UBINK, K.H. PFENNINGER: NPY and its involvement in axon guidance, neurogenesis, and feeding. In: *Nutrition* 24 (2008), S. 860-868.
- [188] L. BUENO, J. FIORAMONTI: Action of opiates on gastrointestinal function. In: *Baillieres Clin.Gastroenterol.* 2 (1988), S. 123-139.
- [189] G. HERMEY, N. PLATH, C.A. HUBNER, D. KUHL, H.C. SCHALLER, I. HERMANS-BORGMAYER: The three sorCS genes are differentially expressed and regulated by synaptic activity. In: *J.Neurochem.* 88 (2004), S. 1470-1476.

- [190] S. SELIG, H.G. LIDOV, S.A. BRUNO, M.M. SEGAL, L.M. KUNKEL: Molecular characterization of Br-cadherin, a developmentally regulated, brain-specific cadherin. In: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94 (1997), S. 2398-2403.
- [191] O. RIVERO, S. SICH, S. POPP, A. SCHMITT, B. FRANKE, K.P. LESCH: Impact of the ADHD-susceptibility gene CDH13 on development and function of brain networks. In: *Eur.Neuropsychopharmacol.* (2012).
- [192] D. KRIZSAN-AGBAS, T. PEDCHENKO, P.G. SMITH: Neurotrimin is an estrogen-regulated determinant of peripheral sympathetic innervation. In: *J.Neurosci.Res.* 86 (2008), S. 3086-3095.
- [193] H.F. SHU, F.Y. GAO, C.Q. ZHANG, S.Y. LIU, Z.Y. ZHANG, Y.C. SONG, K.J. QIU, H. YANG: Rat Dlx5 is expressed in the subventricular zone and promotes neuronal differentiation. In: *Braz.J.Med.Biol.Res.* 43 (2010), S. 176-185.
- [194] A. CORRADI, L. CROCI, V. BROCCOLI, S. ZECCHINI, S. PREVITALI, W. WURST, S. AMADIO, R. MAGGI, A. QUATTRINI, G.G. CONSALEZ: Hypogonadotropic hypogonadism and peripheral neuropathy in Ebf2-null mice. In: *Development* 130 (2003), S. 401-410.
- [195] A.M. BECKMANN, P.A. WILCE: Egr transcription factors in the nervous system. In: *Neurochem.Int.* 31 (1997), S. 477-510.
- [196] J. LIVET, M. SIGRIST, S. STROEBEL, P.V. DE, S.R. PRICE, C.E. HENDERSON, T.M. JESSELL, S. ARBER: ETS gene Pea3 controls the central position and terminal arborization of specific motor neuron pools. In: *Neuron* 35 (2002), S. 877-892.
- [197] G.B. POTTER, G.M. BEAUDOIN, III, C.L. DERENZO, J.M. ZARACH, S.H. CHEN, C.C. THOMPSON: The hairless gene mutated in congenital hair loss disorders encodes a novel nuclear receptor corepressor. In: *Genes Dev.* 15 (2001), S. 2687-2701.
- [198] R.J. DENVER, K.E. WILLIAMSON: Identification of a thyroid hormone response element in the mouse Kruppel-like factor 9 gene to explain its postnatal expression in the brain. In: *Endocrinology* 150 (2009), S. 3935-3943.
- [199] R. OHSAWA, T. OHTSUKA, R. KAGEYAMA: Mash1 and Math3 are required for development of branchiomotor neurons and maintenance of neural progenitors. In: *J.Neurosci.* 25 (2005), S. 5857-5865.
- [200] A. GHOOCHANI, K. SHABANI, M. PEYMANI, K. GHAEDI, F. KARAMALI, K. KARBALAEI, S. TANHAIE, A. SALAMIAN, A. ESMAEILI, S. VALIAN-BORUJENI, M. HASHEMI, M.H. NASR-ESFAHANI, H. BAHARVAND: The influence of peroxisome proliferator-activated receptor gamma(1) during differentiation of mouse embryonic stem cells to neural cells. In: *Differentiation* 83 (2012), S. 60-67.

- [201] M.R. HOJJATI, G.M. VAN WOERDEN, W.J. TYLER, K.P. GIESE, A.J. SILVA, L. POZZO-MILLER, Y. ELGERSMA: Kinase activity is not required for alphaCaMKII-dependent presynaptic plasticity at CA3-CA1 synapses. In: *Nat.Neurosci.* 10 (2007), S. 1125-1127.
- [202] M. ANLAUF, M.K. SCHAFER, L. EIDEN, E. WEIHE: Chemical coding of the human gastrointestinal nervous system: cholinergic, VIPergic, and catecholaminergic phenotypes. In: *J.Comp Neurol.* 459 (2003), S. 90-111.
- [203] C.Y. TSENG, B.L. FIRESTEIN: The role of PSD-95 and cypin in morphological changes in dendrites following sublethal NMDA exposure. In: *J.Neurosci.* 31 (2011), S. 15468-15480.
- [204] B.R. NELSON, K. CLAES, V. TODD, M. CHAVERRA, F. LEFCORT: NELL2 promotes motor and sensory neuron differentiation and stimulates mitogenesis in DRG in vivo. In: *Dev.Biol.* 270 (2004), S. 322-335.
- [205] S. STRACK: Overexpression of the protein phosphatase 2A regulatory subunit Bgamma promotes neuronal differentiation by activating the MAP kinase (MAPK) cascade. In: *J.Biol.Chem.* 277 (2002), S. 41525-41532.
- [206] R.B. MACCIONI, N.W. SEEDS: Transglutaminase and neuronal differentiation. In: *Mol.Cell Biochem.* 69 (1986), S. 161-168.
- [207] M. EIRAKU, Y. HIRATA, H. TAKESHIMA, T. HIRANO, M. KENGAKU: Delta/notch-like epidermal growth factor (EGF)-related receptor, a novel EGF-like repeat-containing protein targeted to dendrites of developing and adult central nervous system neurons. In: *J.Biol.Chem.* 277 (2002), S. 25400-25407.
- [208] Z. AHMED, S.J. JACQUES, M. BERRY, A. LOGAN: Epidermal growth factor receptor inhibitors promote CNS axon growth through off-target effects on glia. In: *Neurobiol.Dis.* 36 (2009), S. 142-150.
- [209] E.D. RABINOVSKY: The multifunctional role of IGF-1 in peripheral nerve regeneration. In: *Neurol.Res.* 26 (2004), S. 204-210.
- [210] D. NATARAJAN, C. MARCOS-GUTIERREZ, V. PACHNIS, G.E. DE: Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis. In: *Development* 129 (2002), S. 5151-5160.
- [211] Y. YAKUBCHYK, H. ABRAMOVICI, J.C. MAILLET, E. DAHER, C. OBAGI, R.J. PARKS, M.K. TOPHAM, S.H. GEE: Regulation of neurite outgrowth in N1E-115 cells through PDZ-mediated recruitment of diacylglycerol kinase zeta. In: *Mol.Cell Biol.* 25 (2005), S. 7289-7302.

[212] A. FERREIRA, L.S. CHIN, L. LI, L.M. LANIER, K.S. KOSIK, P. GREENGARD: Distinct roles of synapsin I and synapsin II during neuronal development. In: *Mol.Med.* 4 (1998), S. 22-28.

[213] A. MAXIMOV, O.H. SHIN, X. LIU, T.C. SUDHOF: Synaptotagmin-12, a synaptic vesicle phosphoprotein that modulates spontaneous neurotransmitter release. In: *J.Cell Biol.* 176 (2007), S. 113-124.

[214] M. CRAXTON, M. GOEDERT: Synaptotagmin V: a novel synaptotagmin isoform expressed in rat brain. In: *FEBS Lett.* 361 (1995), S. 196-200.

[215] J. XU, T. MASHIMO, T.C. SUDHOF: Synaptotagmin-1, -2, and -9: Ca<sup>2+</sup> sensors for fast release that specify distinct presynaptic properties in subsets of neurons. In: *Neuron* 54 (2007), S. 567-581.

[216] S. DUTTING, S. BRACHS, D. MIELENZ: Fraternal twins: Swiprosin-1/EFhd2 and Swiprosin-2/EFhd1, two homologous EF-hand containing calcium binding adaptor proteins with distinct functions. In: *Cell Commun.Signal.* 9 (2011), S. 2.

[217] Y. ESHED, K. FEINBERG, D.J. CAREY, E. PELES: Secreted gliomedin is a perinodal matrix component of peripheral nerves. In: *J.Cell Biol.* 177 (2007), S. 551-562.

[218] J. LAUREN, M.S. AIRAKSINEN, M. SAARMA, T. TIMMUSK: A novel gene family encoding leucine-rich repeat transmembrane proteins differentially expressed in the nervous system. In: *Genomics* 81 (2003), S. 411-421.

[219] C.C. TSUI, N.G. COPELAND, D.J. GILBERT, N.A. JENKINS, C. BARNES, P.F. WORLEY: Narp, a novel member of the pentraxin family, promotes neurite outgrowth and is dynamically regulated by neuronal activity. In: *J.Neurosci.* 16 (1996), S. 2463-2478.

[220] D. RENGARAJ, B.R. LEE, K.J. PARK, S.I. LEE, K.S. KANG, J.W. CHOI, S.J. KANG, G. SONG, J.Y. HAN: The distribution of neuron-specific gene family member 1 in brain and germ cells: Implications for the regulation of germ-line development by brain. In: *Dev.Dyn.* 240 (2011), S. 850-861.

[221] F. YOSHIKAWA, Y. SATO, K. TOHYAMA, T. AKAGI, T. HASHIKAWA, Y. NAGAKURA-TAKAGI, Y. SEKINE, N. MORITA, H. BABA, Y. SUZUKI, S. SUGANO, A. SATO, T. FURUICHI: Opalin, a transmembrane sialylglycoprotein located in the central nervous system myelin paranodal loop membrane. In: *J.Biol.Chem.* 283 (2008), S. 20830-20840.

[222] A. BULFONE, C. CACCIOPPOLI, C. PARDINI, A. FAEDO, S. MARTINEZ, S. BANFI: Pcp411, a novel gene encoding a Pcp4-like polypeptide, is expressed in specific domains of the developing brain. In: *Gene Expr.Patterns.* 4 (2004), S. 297-301.

- [223] U. RAUCH, M. KLOTZ, S. MAAS-OMLOR, E. WINK, A. HANSGEN, C. HAGL, S. HOLLAND-CUNZ, K.H. SCHAFFER: Expression of intermediate filament proteins and neuronal markers in the human fetal gut. In: *J.Histochem.Cytochem.* 54 (2006), S. 39-46.
- [224] B.T. HELFAND, M.G. MENDEZ, J. PUGH, C. DELSERT, R.D. GOLDMAN: A role for intermediate filaments in determining and maintaining the shape of nerve cells. In: *Mol Biol Cell* 14 (2003), S. 5069-5081.
- [225] C.H. CHEN, S.M. WANG, S.H. YANG, C.J. JENG: Role of Thy-1 in in vivo and in vitro neural development and regeneration of dorsal root ganglionic neurons. In: *J.Cell Biochem.* 94 (2005), S. 684-694.
- [226] A. HO, W. MORISHITA, D. ATASOY, X. LIU, K. TABUCHI, R.E. HAMMER, R.C. MALENKA, T.C. SUDHOF: Genetic analysis of Mint/X11 proteins: essential presynaptic functions of a neuronal adaptor protein family. In: *J.Neurosci.* 26 (2006), S. 13089-13101.
- [227] Y.Q. WU, X. LIN, C.M. LIU, M. JAMRICH, L.G. SHAFFER: Identification of a human brain-specific gene, calneuron 1, a new member of the calmodulin superfamily. In: *Mol.Genet.Metab* 72 (2001), S. 343-350.
- [228] S.M. BURDEN-GULLEY, S.M. BRADY-KALNAY: PTPmu regulates N-cadherin-dependent neurite outgrowth. In: *J.Cell Biol.* 144 (1999), S. 1323-1336.
- [229] D. SPANO, I. BRANCHI, A. ROSICA, M.T. PIRRO, A. RICCIO, P. MITHBAOKAR, A. AFFUSO, C. ARRA, P. CAMPOLONGO, D. TERRACCIANO, V. MACCHIA, J. BERNAL, E. ALLEVA, L.R. DI: Rhes is involved in striatal function. In: *Mol.Cell Biol.* 24 (2004), S. 5788-5796.
- [230] L. MU, L. BERTI, G. MASSERDOTTI, M. COVIC, T.M. MICHAELIDIS, K. DOBERAUER, K. MERZ, F. REHFELD, A. HASLINGER, M. WEGNER, E. SOCK, V. LEFEBVRE, S. COUILLARD-DESPRES, L. AIGNER, B. BERNINGER, D.C. LIE: SoxC transcription factors are required for neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis. In: *J.Neurosci.* 32 (2012), S. 3067-3080.
- [231] I.E. BONILLA, K. TANABE, S.M. STRITTMATTER: Small proline-rich repeat protein 1A is expressed by axotomized neurons and promotes axonal outgrowth. In: *J.Neurosci.* 22 (2002), S. 1303-1315.
- [232] J. NEIDHARDT, S. FEHR, M. KUTSCHE, J. LOHLER, M. SCHACHNER: Tenascin-N: characterization of a novel member of the tenascin family that mediates neurite repulsion from hippocampal explants. In: *Mol.Cell Neurosci.* 23 (2003), S. 193-209.
- [233] B. ANLAR, A. GUNEL-OZCAN: Tenascin-R: Role in the central nervous system. In: *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 44 (2012), S. 1385-1389.

- [234] C.I. ONOCHIE, L.M. KORNGUT, J.B. VANHORNE, S.M. MYERS, D. MICHAUD, L.M. MULLIGAN: Characterisation of the human GFRalpha-3 locus and investigation of the gene in Hirschsprung disease. In: *J.Med.Genet.* 37 (2000), S. 674-679.
- [235] J.C. LIN, W.H. HO, A. GURNEY, A. ROSENTHAL: The netrin-G1 ligand NGL-1 promotes the outgrowth of thalamocortical axons. In: *Nat.Neurosci.* 6 (2003), S. 1270-1276.
- [236] M. SHELLY, L. CANCEDDA, B.K. LIM, A.T. POPESCU, P.L. CHENG, H. GAO, M.M. POO: Semaphorin3A Regulates Neuronal Polarization by Suppressing Axon Formation and Promoting Dendrite Growth. In: *Neuron* 71 (2011), S. 433-446.
- [237] M.A. WOLMAN, Y. LIU, H. TAWARAYAMA, W. SHOJI, M.C. HALLORAN: Repulsion and attraction of axons by semaphorin3D are mediated by different neuropilins in vivo. In: *J.Neurosci.* 24 (2004), S. 8428-8435.
- [238] J.P. DUGAN, A. STRATTON, H.P. RILEY, W.T. FARMER, G.S. MASTICK: Midbrain dopaminergic axons are guided longitudinally through the diencephalon by Slit/Robo signals. In: *Mol.Cell Neurosci.* 46 (2011), S. 347-356.
- [239] L.I. DI: Thyroid hormones and the central nervous system of mammals (Review). In: *Mol.Med.Report.* 1 (2008), S. 279-295.
- [240] T. REMER, S.A. JOHNER, R. GARTNER, M. THAMM, E. KRIENER: [Iodine deficiency in infancy - a risk for cognitive development]. In: *Dtsch.Med.Wochenschr.* 135 (2010), S. 1551-1556.
- [241] C.L. LAI, R.T. LIN, C.K. LIU, C.T. TAI, S.L. HOWNG: [The changes of central and peripheral nerve conduction and the effect of thyroxine replacement in thyroidectomized rats]. In: *Gaoxiong.Yi.Xue.Ke.Xue.Za.Zhi.* 11 (1995), S. 589-598.
- [242] A. GRUTERS, H. KRUDE: Detection and treatment of congenital hypothyroidism. In: *Nat.Rev.Endocrinol.* 8 (2012), S. 104-113.
- [243] E.C. EBERT: The thyroid and the gut. In: *J.Clin.Gastroenterol.* 44 (2010), S. 402-406.
- [244] M. METZGER, P.M. BAREISS, I. NIKOLOV, T. SKUTELLA, L. JUST: Three-dimensional slice cultures from murine fetal gut for investigations of the enteric nervous system. In: *Dev.Dyn.* 236 (2007), S. 128-133.
- [245] M. METZGER, S. CONRAD, T. SKUTELLA, L. JUST: RGMa inhibits neurite outgrowth of neuronal progenitors from murine enteric nervous system via the neogenin receptor in vitro. In: *J.Neurochem.* 103 (2007), S. 2665-2678.
- [246] B.C. FREITAS, B. GEREKEN, M. CASTILLO, I. KALLO, A. ZEOLD, P. EGRI, Z. LIPOSITS, A.M. ZAVACKI, R.M. MACIEL, S. JO, P. SINGRU, E. SANCHEZ, R.M. LECHAN, A.C. BIANCO:

Paracrine signaling by glial cell-derived triiodothyronine activates neuronal gene expression in the rodent brain and human cells. In: *J.Clin.Invest* 120 (2010), S. 2206-2217.

[247] C. CHEN, Z. ZHOU, M. ZHONG, M. LI, X. YANG, Y. ZHANG, Y. WANG, A. WEI, M. QU, L. ZHANG, S. XU, S. CHEN, Z. YU: Excess thyroid hormone inhibits embryonic neural stem/progenitor cells proliferation and maintenance through STAT3 signalling pathway. In: *Neurotox.Res.* 20 (2011), S. 15-25.

[248] N. HADJ-SAHRAOUI, I. SEUGNET, M.T. GHORBEL, B. DEMENEIX: Hypothyroidism prolongs mitotic activity in the post-natal mouse brain. In: *Neurosci.Lett.* 280 (2000), S. 79-82.

[249] S.C. LEMA, G.A. NEVITT: Evidence that thyroid hormone induces olfactory cellular proliferation in salmon during a sensitive period for imprinting. In: *J.Exp.Biol.* 207 (2004), S. 3317-3327.

[250] I.B. WALTER: Triiodothyronine exerts a trophic action on rat sensory neuron survival and neurite outgrowth through different pathways. In: *Eur.J.Neurosci.* 8 (1996), S. 455-466.

[251] H. HEUER, C.A. MASON: Thyroid hormone induces cerebellar Purkinje cell dendritic development via the thyroid hormone receptor alpha1. In: *J.Neurosci.* 23 (2003), S. 10604-10612.

[252] H.J. KRAMMER, S.T. KARAHAN, E. RUMPEL, M. KLINGER, W. KUHNEL: Immunohistochemical visualization of the enteric nervous system using antibodies against protein gene product (PGP) 9.5. In: *Ann.Anat.* 175 (1993), S. 321-325.

[253] A. TANANO, Y. HAMADA, S. TAKAMIDO, Y. KATAOKA, J. WATANABE, Y. KAMIYAMA, H. YAMADA: Structural development of PGP9.5-immunopositive myenteric plexus in embryonic rats. In: *Anat.Embryol.(Berl)* 209 (2005), S. 341-348.

[254] R. RIEHL, K. JOHNSON, R. BRADLEY, G.B. GRUNWALD, E. CORNEL, A. LILIENBAUM, C.E. HOLT: Cadherin function is required for axon outgrowth in retinal ganglion cells in vivo. In: *Neuron* 17 (1996), S. 837-848.

[255] F. BRODERS-BONDON, P. PAUL-GILLOTEAUX, C. CARLIER, G.L. RADICE, S. DUFOUR: N-cadherin and beta1-integrins cooperate during the development of the enteric nervous system. In: *Dev.Biol.* 364 (2012), S. 178-191.

[256] R.J. DENVER, L. OUELLET, D. FURLING, A. KOBAYASHI, Y. FUJII-KURIYAMA, J. PUYMIRAT: Basic transcription element-binding protein (BTEB) is a thyroid hormone-regulated gene in the developing central nervous system. Evidence for a role in neurite outgrowth. In: *J.Biol.Chem.* 274 (1999), S. 23128-23134.

[257] P. BAGAMASBAD, K.L. HOWDESHELL, L.M. SACHS, B.A. DEMENEIX, R.J. DENVER: A role for basic transcription element-binding protein 1 (BTEB1) in the autoinduction of thyroid hormone receptor beta. In: *J.Biol.Chem.* 283 (2008), S. 2275-2285.

[258] C.C. THOMPSON: Thyroid hormone-responsive genes in developing cerebellum include a novel synaptotagmin and a hairless homolog. In: *J.Neurosci.* 16 (1996), S. 7832-7840.

[259] O.D. GIL, G. ZANAZZI, A.F. STRUYK, J.L. SALZER: Neurotrimin mediates bifunctional effects on neurite outgrowth via homophilic and heterophilic interactions. In: *J.Neurosci.* 18 (1998), S. 9312-9325.

[260] F. MAINA, M.C. HILTON, C. PONZETTO, A.M. DAVIES, R. KLEIN: Met receptor signaling is required for sensory nerve development and HGF promotes axonal growth and survival of sensory neurons. In: *Genes Dev.* 11 (1997), S. 3341-3350.

[261] I.T. SHEPHERD, J.A. RAPER: Collapsin-1/semaphorin D is a repellent for chick ganglion of Remak axons. In: *Dev.Biol.* 212 (1999), S. 42-53.

[262] Y. JIANG, M.T. LIU, M.D. GERSHON: Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas. In: *Dev.Biol.* 258 (2003), S. 364-384.

[263] J. ROSSI, K. LUUKKO, D. POTERYAEV, A. LAURIKAINEN, Y.F. SUN, T. LAAKSO, S. EERIKAINEN, R. TUOMINEN, M. LAKSO, H. RAUVALA, U. ARUMAE, M. PASTERNAK, M. SAARMA, M.S. AIRAKSINEN: Retarded growth and deficits in the enteric and parasympathetic nervous system in mice lacking GFR alpha2, a functional neurturin receptor. In: *Neuron* 22 (1999), S. 243-252.

[264] H.M. YOUNG, R.B. ANDERSON, C.R. ANDERSON: Guidance cues involved in the development of the peripheral autonomic nervous system. In: *Auton.Neurosci.* 112 (2004), S. 1-14.

[265] J. AMIEL, E. SPROAT-EMISON, M. GARCIA-BARCELO, F. LANTIERI, G. BURZYNSKI, S. BORREGO, A. PELET, S. ARNOLD, X. MIAO, P. GRISERI, A.S. BROOKS, G. ANTINOLO, P.L. DE, M. CLEMENT-ZIZA, A. MUNNICH, C. KASHUK, K. WEST, K.K. WONG, S. LYONNET, A. CHAKRAVARTI, P.K. TAM, I. CECCHERINI, R.M. HOFSTRA, R. FERNANDEZ: Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. In: *J.Med.Genet.* 45 (2008), S. 1-14.

[266] A.G. BAYNASH, K. HOSODA, A. GIAID, J.A. RICHARDSON, N. EMOTO, R.E. HAMMER, M. YANAGISAWA: Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons. In: *Cell* 79 (1994), S. 1277-1285.

[267] H.L. ARCHER, J.C. EVANS, D.S. MILLAR, P.W. THOMPSON, A.M. KERR, H. LEONARD, J. CHRISTODOULOU, D. RAVINE, L. LAZAROU, L. GROVE, C. VERITY, S.D.

WHATLEY, D.T. PILZ, J.R. SAMPSON, A.J. CLARKE: NTNG1 mutations are a rare cause of Rett syndrome. In: *Am.J.Med.Genet.A* 140 (2006), S. 691-694.

[268] C. PRIOR, A. NUNES, M. RIOS, J. SEQUEIROS, P. MACIEL, L. GOMES, T. TEMUDO: [Nutrition and gastrointestinal disorders in Rett syndrome: Importance of early intervention]. In: *An.Pediatr.(Barc.)* 72 (2010), S. 191-198.

[269] G.K. WONG, M.L. BAUDET, C. NORDEN, L. LEUNG, W.A. HARRIS: Slit1b-Robo3 signaling and N-cadherin regulate apical process retraction in developing retinal ganglion cells. In: *J.Neurosci.* 32 (2012), S. 223-228.

[270] R.B. ANDERSON, A.J. BERGNER, M. TANIGUCHI, H. FUJISAWA, A. FORRAI, L. ROBB, H.M. YOUNG: Effects of different regions of the developing gut on the migration of enteric neural crest-derived cells: a role for *Sema3A*, but not *Sema3F*. In: *Dev.Biol.* 305 (2007), S. 287-299.

[271] E.M. RATCLIFFE, L. FAN, T.J. MOHAMMED, M. ANDERSON, A. CHALAZONITIS, M.D. GERSHON: Enteric neurons synthesize netrins and are essential for the development of the vagal sensory innervation of the fetal gut. In: *Dev.Neurobiol.* 71 (2011), S. 362-373.

[272] J. KUHLMAN, J.S. EISEN: Genetic screen for mutations affecting development and function of the enteric nervous system. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 236 (2007), S. 118-127.

[273] M.D. GERSHON: Lessons from genetically engineered animal models. II. Disorders of enteric neuronal development: insights from transgenic mice. In: *The American journal of physiology* 277 (1999), S. G262-267.

[274] S. ELWORTHY, J.P. PINTO, A. PETTIFER, M.L. CANCELA, R.N. KELSH: *Phox2b* function in the enteric nervous system is conserved in zebrafish and is *sox10*-dependent. In: *Mechanisms of development* 122 (2005), S. 659-669.

[275] D. GONG, J.E. FERRELL, JR.: The roles of cyclin A2, B1, and B2 in early and late mitotic events. In: *Molecular biology of the cell* 21 (2010), S. 3149-3161.

[276] D.G. JOHNSON, C.L. WALKER: Cyclins and cell cycle checkpoints. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 39 (1999), S. 295-312.

[277] C. NORBURY, P. NURSE: Animal cell cycles and their control. In: *Annual review of biochemistry* 61 (1992), S. 441-470.

[278] A.I. LUKASZEWICZ, D.J. ANDERSON: Cyclin D1 promotes neurogenesis in the developing spinal cord in a cell cycle-independent manner. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (2011), S. 11632-11637.

- [279] J. DHAWAN, S. LAXMAN: Decoding the stem cell quiescence cycle - lessons from yeast for regenerative biology. In: *Journal of cell science* 128 (2015), S. 4467-4474.
- [280] O. TIMOFEEV, O. CIZMECIOGLU, F. SETTELE, T. KEMPF, I. HOFFMANN: Cdc25 phosphatases are required for timely assembly of CDK1-cyclin B at the G2/M transition. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (2010), S. 16978-16990.
- [281] J.A. PERRY, S. KORNBLUTH: Cdc25 and Wee1: analogous opposites? In: *Cell division* 2 (2007), S. 12.
- [282] J.P. WELBURN: The molecular basis for kinesin functional specificity during mitosis. In: *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 70 (2013), S. 476-493.
- [283] Y. OGIYAMA, K. ISHII: The smooth and stable operation of centromeres. In: *Genes & genetic systems* 87 (2012), S. 63-73.
- [284] A. PETROVIC, S. PASQUALATO, P. DUBE, V. KRENN, S. SANTAGUIDA, D. CITTARO, S. MONZANI, L. MASSIMILIANO, J. KELLER, A. TARRICONE, A. MAIOLICA, H. STARK, A. MUSACCHIO: The MIS12 complex is a protein interaction hub for outer kinetochore assembly. In: *The Journal of cell biology* 190 (2010), S. 835-852.
- [285] E.M. KUDALKAR, E.A. SCARBOROUGH, N.T. UMBREIT, A. ZELTER, D.R. GESTAUT, M. RIFFLE, R.S. JOHNSON, M.J. MACCOSS, C.L. ASBURY, T.N. DAVIS: Regulation of outer kinetochore Ndc80 complex-based microtubule attachments by the central kinetochore Mis12/MIND complex. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (2015), S. E5583-5589.
- [286] A.A. YE, T.J. MARESCA: Cell division: kinetochores SKAdaddle. In: *Current biology : CB* 23 (2013), S. R122-124.
- [287] T. SCHOLZEN, J. GERDES: The Ki-67 protein: from the known and the unknown. In: *Journal of cellular physiology* 182 (2000), S. 311-322.
- [288] M.V. GOMEZ-GAVIRO, C.E. SCOTT, A.K. SESAY, A. MATHEU, S. BOOTH, C. GALICHET, R. LOVELL-BADGE: Betacellulin promotes cell proliferation in the neural stem cell niche and stimulates neurogenesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (2012), S. 1317-1322.
- [289] B. PUCCI, M. KASTEN, A. GIORDANO: Cell cycle and apoptosis. In: *Neoplasia (New York, N.Y.)* 2 (2000), S. 291-299.
- [290] L. SHI, W.K. NISHIOKA, J. TH'NG, E.M. BRADBURY, D.W. LITCHFIELD, A.H. GREENBERG: Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. In: *Science* 263 (1994), S. 1143-1145.
- [291] J.S. FRIDMAN, S.W. LOWE: Control of apoptosis by p53. In: *Oncogene* 22 (2003), S. 9030-9040.

- [292] C. WAN, J. JIANG, H. MAO, J. CAO, X. WU, G. CUI: Involvement of upregulated p53-induced death domain protein (PIDD) in neuronal apoptosis after rat traumatic brain injury. In: *Journal of molecular neuroscience : MN* 51 (2013), S. 695-702.
- [293] E. LAZZERINI DENCHI, K. HELIN: E2F1 is crucial for E2F-dependent apoptosis. In: *EMBO reports* 6 (2005), S. 661-668.
- [294] T. AKAGI, S. KUURE, K. URANISHI, H. KOIDE, F. COSTANTINI, T. YOKOTA: ETS-related transcription factors ETV4 and ETV5 are involved in proliferation and induction of differentiation-associated genes in embryonic stem (ES) cells. In: *The Journal of biological chemistry* 290 (2015), S. 22460-22473.
- [295] M.O. ISLAM, Y. KANEMURA, J. TAJRIA, H. MORI, S. KOBAYASHI, M. HARA, M. YAMASAKI, H. OKANO, J. MIYAKE: Functional expression of ABCG2 transporter in human neural stem/progenitor cells. In: *Neuroscience research* 52 (2005), S. 75-82.
- [296] E. ABRANCHES, M. SILVA, L. PRADIER, H. SCHULZ, O. HUMMEL, D. HENRIQUE, E. BEKMAN: Neural differentiation of embryonic stem cells in vitro: a road map to neurogenesis in the embryo. In: *PloS one* 4 (2009), S. e6286.
- [297] J.H. LEE, S. JANG, H.S. JEONG, J.S. PARK: Effects of sphingosine-1-phosphate on neural differentiation and neurite outgrowth in neuroblastoma cells. In: *Chonnam medical journal* 47 (2011), S. 27-30.
- [298] V. BALASUBRAMANIYAN, N. TIMMER, B. KUST, E. BODDEKE, S. COPRAY: Transient expression of Olig1 initiates the differentiation of neural stem cells into oligodendrocyte progenitor cells. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 22 (2004), S. 878-882.
- [299] B. EMERY, D. AGALLIU, J.D. CAHOY, T.A. WATKINS, J.C. DUGAS, S.B. MULINYAWE, A. IBRAHIM, K.L. LIGON, D.H. ROWITCH, B.A. BARRES: Myelin gene regulatory factor is a critical transcriptional regulator required for CNS myelination. In: *Cell* 138 (2009), S. 172-185.
- [300] M.J. LEE, E. CALLE, A. BRENNAN, S. AHMED, E. SVIDERSKAYA, K.R. JESSEN, R. MIRSKY: In early development of the rat mRNA for the major myelin protein P(0) is expressed in nonsensory areas of the embryonic inner ear, notochord, enteric nervous system, and olfactory ensheathing cells. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 222 (2001), S. 40-51.
- [301] M.I. MORRIS, D.B. SOGLIO, A. OUIOMET, A. ASPIROT, N. PATEY: A study of calretinin in Hirschsprung pathology, particularly in total colonic aganglionosis. In: *Journal of pediatric surgery* 48 (2013), S. 1037-1043.
- [302] K.R. JESSEN, R. MIRSKY: Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. In: *Nature* 286 (1980), S. 736-737.

- [303] H.M. YOUNG, A.J. BERGNER, T. MULLER: Acquisition of neuronal and glial markers by neural crest-derived cells in the mouse intestine. In: *The Journal of comparative neurology* 456 (2003), S. 1-11.
- [304] M. MATSUI, Y. ARAKI, H. KARASAWA, N. MATSUBARA, M.M. TAKETO, M.F. SELDIN: Mapping of five subtype genes for muscarinic acetylcholine receptor to mouse chromosomes. In: *Genes & genetic systems* 74 (1999), S. 15-21.
- [305] M.L. SINKUS, S. GRAW, R. FREEDMAN, R.G. ROSS, H.A. LESTER, S. LEONARD: The human CHRNA7 and CHRFA7A genes: A review of the genetics, regulation, and function. In: *Neuropharmacology* 96 (2015), S. 274-288.
- [306] T.J. SIDDIQUI, R. PANCAROGLU, Y. KANG, A. ROOYAKKERS, A.M. CRAIG: LRRTMs and neuroligins bind neurexins with a differential code to cooperate in glutamate synapse development. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30 (2010), S. 7495-7506.
- [307] S. CHEN, O. GIL, Y.Q. REN, G. ZANAZZI, J.L. SALZER, D.E. HILLMAN: Neurotrimin expression during cerebellar development suggests roles in axon fasciculation and synaptogenesis. In: *Journal of neurocytology* 30 (2001), S. 927-937.
- [308] Y. HATA, T.C. SUDHOF: A novel ubiquitous form of Munc-18 interacts with multiple syntaxins. Use of the yeast two-hybrid system to study interactions between proteins involved in membrane traffic. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (1995), S. 13022-13028.
- [309] R. JANZ, T.C. SUDHOF: SV2C is a synaptic vesicle protein with an unusually restricted localization: anatomy of a synaptic vesicle protein family. In: *Neuroscience* 94 (1999), S. 1279-1290.
- [310] B. MARQUEZE, F. BERTON, M. SEAGAR: Synaptotagmins in membrane traffic: which vesicles do the tagmins tag? In: *Biochimie* 82 (2000), S. 409-420.
- [311] B.C. JONGBLOETS, R.J. PASTERKAMP: Semaphorin signalling during development. In: *Development* 141 (2014), S. 3292-3297.
- [312] P. ZELINA, H.X. AVCI, K. THELEN, G.E. POLLERBERG: The cell adhesion molecule NrCAM is crucial for growth cone behaviour and pathfinding of retinal ganglion cell axons. In: *Development* 132 (2005), S. 3609-3618.
- [313] J.M. BAISDEN, Y. QIAN, H.M. ZOT, D.C. FLYNN: The actin filament-associated protein AFAP-110 is an adaptor protein that modulates changes in actin filament integrity. In: *Oncogene* 20 (2001), S. 6435-6447.
- [314] S.J. WINDER, B.G. ALLEN, O. CLEMENT-CHOMIENNE, M.P. WALSH: Regulation of smooth muscle actin-myosin interaction and force by calponin. In: *Acta physiologica Scandinavica* 164 (1998), S. 415-426.

- [315] L.E. PERI, K.M. SANDERS, V.N. MUTAFOVA-YAMBOLIEVA: Differential expression of genes related to purinergic signaling in smooth muscle cells, PDGFRalpha-positive cells, and interstitial cells of Cajal in the murine colon. In: *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 25 (2013), S. e609-620.
- [316] J.M. SPIN, S. NALLAMSHETTY, R. TABIBIAZAR, E.A. ASHLEY, J.Y. KING, M. CHEN, P.S. TSAO, T. QUERTERMOUS: Transcriptional profiling of in vitro smooth muscle cell differentiation identifies specific patterns of gene and pathway activation. In: *Physiological genomics* 19 (2004), S. 292-302.
- [317] S.B. MARSTON, C.W. SMITH: The thin filaments of smooth muscles. In: *Journal of muscle research and cell motility* 6 (1985), S. 669-708.
- [318] M.A. D'ANGELO, J.S. GOMEZ-CAVAZOS, A. MEI, D.H. LACKNER, M.W. HETZER: A change in nuclear pore complex composition regulates cell differentiation. In: *Developmental cell* 22 (2012), S. 446-458.
- [319] A. RING, Y.M. KIM, M. KAHN: Wnt/catenin signaling in adult stem cell physiology and disease. In: *Stem cell reviews* 10 (2014), S. 512-525.

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Gliederung des Verdauungsapparates.....	2
<b>Abb. 2:</b> Aufbau der Dünndarmwand im Säugetier.....	3
<b>Abb. 3:</b> Ursprung und Migration der Neuralleistenzellen.....	7
<b>Abb. 4:</b> Wanderung von ENS -Vorläuferzellen vom Neuralrohr zum Darm.....	8
<b>Abb. 5:</b> Genexpression während der Entwicklung des enterischen Nervensystems	10
<b>Abb. 6:</b> ENS -Entwicklungsstörungen in Mausmodellen.....	18
<b>Abb. 7:</b> Strukturformeln von Trijodthyronin (a) und Thyroxin (b).....	23
<b>Abb. 8:</b> Topografie der Schilddrüse .....	24
<b>Abb. 9:</b> Schilddrüsenhormonsynthese .....	25
<b>Abb. 10:</b> Regelkreis der Schilddrüsenhormone.....	28
<b>Abb. 11:</b> Zeitlicher Ablauf des Proliferationsassays (Schema).....	38
<b>Abb. 12:</b> Zeitlicher Ablauf des Differenzierungsassays (Schema) .....	39
<b>Abb. 13:</b> Ablauf der Affymetrix - Genchip -Analyse .....	49
<b>Abb. 14:</b> Präparation muriner Darmmuskelschichten.....	62
<b>Abb. 15:</b> ENS -Zellkultur in Proliferation. ....	64
<b>Abb. 16:</b> Differenzierte Enterosphären.....	65
<b>Abb. 17:</b> Immunhistochemische Doppelfärbung differenzierter ENS -Neurone .....	66
<b>Abb. 18:</b> Ablauf der Zellkulturphase vor vergleichender Genexpressionsanalyse (Proliferation gegenüber Differenzierung von Enterosphären). ....	67
<b>Abb. 19:</b> Messung der RNA -Qualität vor Durchführung der Genchip -Analyse.....	68
<b>Abb. 20:</b> Schematische Darstellung der Genregulationen im Wnt -Signalweg in Enterosphären nach Einleitung der Differenzierung.....	87
<b>Abb. 21:</b> RT -PCR -Analyse von Schilddrüsenhormonrezeptoren .....	88

---

<b>Abb. 22:</b> Einfluss von T3 auf die Proliferationskapazität von Enterosphären.....	90
<b>Abb. 23:</b> Immunhistochemische Färbung einzelliegender $\beta$ -Tubulin III (TUJ1)-positiver ENS-Zellen nach 7 Tagen Differenzierung. ....	91
<b>Abb. 24:</b> Analyse des T3-Einflusses auf Länge der Zellfortsätze und Anzahl der primären Verzweigungen $\beta$ -Tubulin III (TUJ1)-positiver neuraler Vorläuferzellen des ENS. ....	92
<b>Abb. 25:</b> Immunhistochemische Whole mount-Färbungen des murinen ENS. ....	94
<b>Abb. 26:</b> Immunhistochemische Vergleichsaufnahmen des murinen ENS von WT-, $Tr\alpha 1^{-/-}$ -KO- und $Tr\beta^{-/-}$ -KO-Mäusen. ....	95
<b>Abb. 27:</b> Ablauf der Zellkulturphase der vergleichenden Genexpressionsanalyse (Differenzierung ohne gegenüber Differenzierung mit T3-Zugabe). ....	96
<b>Abb. 28:</b> Messung der RNA-Qualität vor Durchführung der Genchip-Analyse.....	97
<b>Abb. 29:</b> Funktionelle Analyse von T3-regulierten Genen in differenzierenden Enterosphären.....	99

## 7.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> T3-Rezeptor-Knockout-Mausmodelle: Auswirkungen auf Phänotyp, Fertilität und Lebensfähigkeit; RTH: „Resistance to thyroid hormone“ .....	32
<b>Tabelle 2:</b> Regulation von Genen während der Differenzierung von Enterosphären, die direkt an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt sind; Teil 1 von 4.....	71
<b>Tabelle 3:</b> Regulation von Genen während der Differenzierung von Enterosphären, die direkt an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt sind; Teil 2 von 4.....	73
<b>Tabelle 4:</b> Regulation von Genen während der Differenzierung von Enterosphären, die direkt an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt sind; Teil 3 von 4.....	75
<b>Tabelle 5:</b> Regulation von Genen während der Differenzierung von Enterosphären, die direkt an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt sind; Teil 4 von 4.....	76
<b>Tabelle 6:</b> Regulation von Apoptose-Genen während der Differenzierung von Enterosphären.....	77
<b>Tabelle 7:</b> Regulation von Genen während der Differenzierung von Enterosphären, von denen ein Einfluss auf neuronale Differenzierung bekannt ist. ....	79
<b>Tabelle 8:</b> Regulation von Genen während der Differenzierung von Enterosphären, die an der Ausbildung von Synapsen und Zellausläufern der Neurone und den für die Reizübertragung benötigten Transmittern beteiligt sind. ....	81
<b>Tabelle 9:</b> Expressionsregulation von Wachstumsfaktoren während der Differenzierung von Enterosphären, die an der Nervensystementwicklung beteiligt sind. ....	82
<b>Tabelle 10:</b> Regulation von Genen während der Differenzierung von Enterosphären, die Einfluss auf glatte Muskelzellen oder Schrittmacherzellen ausüben.....	83
<b>Tabelle 11:</b> Regulation der Genexpression von extrazellulären Matrixproteinen während der Differenzierung von Enterosphären. ....	85
<b>Tabelle 12:</b> Genexpressionsänderungen von Genen des Wnt-Signalwegs, die bei der frühen Differenzierungsphase in Enterosphären auftreten. ....	87
<b>Tabelle 13:</b> T3-regulierte Gene in differenzierenden Enterosphären, ausgewählt nach Funktion in neuronaler Entwicklung, Synapsenübertragung oder aufgrund einer hohen Expression in sich entwickelnden neuronalen Geweben. ....	102

---

<b>Tabelle 14:</b> T3-regulierte Gene in differenzierenden Enterosphären, spezifisch ausgewählt nach ihrer Funktion als Guidance-Moleküle und einer wichtigen Funktion bei Neuritenwachstum.....	103
<b>Tabelle 15:</b> 11 Gene, die durch T3 und Wnt3a reguliert werden.....	104
<b>Tabelle 16:</b> Vergleichende Analyse ausgesuchter T3-regulierter Gene durch Microarray und qRT-PCR.....	104

### 7.3 Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
bFGF	basischer Fibroblasten - Wachstumsfaktor (engl. <i>basic fibroblast growth factor</i> )
bp	Basenpaare
bidest.	zweifach destilliert
BrdU	5 - Brom - 2' - Desoxyuridin
BSA	Albumin aus Rinderserum (engl. <i>Bovine serum albumine</i> )
Bzw.	Beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
ca.	Circa
cDNA	komplementäre DNA (engl. <i>complementary DNA</i> )
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6 - Diamidin - 2 - Phenylindol
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Deoxynucleosid Triphosphat
ECM	Extrazelluläre Matrix (engl. <i>extracellular matrix</i> )
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (engl. <i>epidermal growth factor</i> )
ENCC	Enterische Neuralleistenzellen (engl. <i>enteric neural crest cells</i> )
engl.	aus dem Englischen
ENS	Enterisches Nervensystem
EschG	Embryonenschutzgesetz
ES - Zellen	embryonale Stammzellen

---

EtOH	Ethanol
FCS	Fötale Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i> )
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. <i>forward scatter</i> )
g	Gramm
<i>g</i>	<i>g</i> -Kraft; Erdbeschleunigung
H <sub>2</sub> O	Wasser
HBSS	Hanks gepufferte Salzlösung (engl. <i>Hank`s buffered salt solution</i> )
HSCR	Morbus Hirschsprung
Hu	human
<i>in vitro</i>	Organische Vorgänge außerhalb des Organismus (lat. „Im Glas“)
<i>in vivo</i>	Organische Vorgänge innerhalb des Organismus (lat. „Im Lebendigen“)
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
iPS	induzierte pluripotente Stammzellen
IPAN	intrinsisch primär afferentes Neuron (engl. <i>intrinsic primary afferent neuron</i> )
l	Liter
Lsg	Lösung
MACS	Magnetische Zellsortierung (engl. <i>magnetic cell sorting</i> )
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
min	Minute
ml	Milliliter
ms	Maus
MW	Mittelwert
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid
NCC	Neuralleistenzelle (engl. <i>neural crest cell</i> )
p.a.	zur Analyse geeignet (lat. <i>pro analysis</i> )
P0	Erster Lebenstag
P75	Neurotrophin Rezeptor p75
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl.; <i>Phosphate buffered solution</i> )

PCR	Polymerase - Kettenreaktion (engl. <i>Polymerase chain reaction</i> )
PNS	Peripheres Nervensystem
RNA	Ribonukleinsäure
RXR	Retinoid X Receptor
RT	Raumtemperatur
SSC	seitliche Lichtstreuung (engl. <i>side scatter</i> )
StAbw	Standardabweichung
Std	Stunde
T3	3,5,3' - Trijodthyronin
T4	Thyroxin
TBS	Trisgepufferte Salzlösung (engl. <i>tris buffered saline</i> )
TRE	Thyroid Response Element
TRH	Thyreotropin - Releasing-Hormon
TSH	Thyreoidea - stimulierendes Hormon
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 7.4 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich fachlich und auch persönlich bei der Erstellung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Lothar Just. Nicht nur für die Vergabe des spannenden Themas, sondern vor allem auch für die hervorragende fachliche und auch persönliche Unterstützung.

Ich danke außerdem Herrn Prof. Dr. Rolf Reuter für die Vertretung meiner Arbeit als Zweitgutachter an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Tübingen.

Ein herzliches Dankeschön auch an alle Angestellten der Anatomie, die mir in den Jahren mit Rat und Tat und auch mit jeglicher sonstiger Unterstützung ans Herz gewachsen sind und immer ein offenes Ohr für mich hatten: Dr. Jürgen von der Ruhr, Peter Neckel, Karin Seid, Dr. Andrea Wizenmann, Dr. Corinna Gleiser, Dr. Andreas Mack, Dr. Petra Bareiß, Dr. Ying Zhang, Ulrike Kohler, Leokadia Macher, Susanne Stachon.

Vielen Dank auch für die Aufzucht und das Handling der Versuchstiere an Dr. Adrian Krestel.

Danke auch an Frau Dr. Marlies Knipper in der HNO-Klinik Tübingen für die Bereitstellung der KO-Mäuse und an die Allgemeine Chirurgie in Tübingen für die Bereitstellung des adulten humanen Gewebes und die Abteilung der Kinderchirurgie für die Bereitstellung des kindlichen humanen Darmmaterials.

Ein weiterer Dank geht an die Mitarbeiter der ehemaligen Microarray Facility Tübingen, Dr. Michael Bonin, Dr. Karin Schäferhoff und Sven Poths, für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung und der Auswertung der Genexpressionsanalysen.

Abschließend möchte ich auch noch einen großen Dank an meine Eltern Prof. Dr. Friedemann Mohr und Birgitta Mohr und an meine Frau Ricarda Mohr aussprechen, die mich in allen Phasen meiner Arbeit immer mit viel Verständnis und Liebe unterstützt haben.

## 7.5 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Roland Alexander Mohr  
Geboren: 05.12.1979 in Leonberg  
Nationalität: Deutsch  
Familienstand: verheiratet mit Ricarda Mohr  
1 Tochter (Lilli Alexandra)

### Ausbildung und Beruf:

1986 – 1990 Friedrich - Schiller - Grundschule Renningen  
1990 – 1999 Gymnasium Renningen  
29.06.1999 Abitur  
09/1999 – 07/2000 Zivildienst im Jugendhaus Renningen  
10/2000 – 05/2003 Grundstudium der Biologie, Universität Tübingen  
04/2003 – 09/2006 Hauptstudium der Mikrobiologie, Universität Tübingen.  
Nebenfächer Humanphysiologie und Parasitologie  
07/2005 – 06/2006 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen. Thema der Diplomarbeit: „Finding Cheating Gene(s) in *Myxococcus xanthus*“  
12/2006 – 01/2007 Praktikum am Hertie - Institut für klinische Hirnforschung  
04/2007 – 01/2010 Mitarbeiter am Institut für klinische Anatomie und Zellanalytik, Universität Tübingen.  
02/2010 – 2016 Promotionsprojekt am Institut für klinische Anatomie und Zellanalytik, Universität Tübingen. Thema der Dissertation: „Einfluss des Schilddrüsenhormons 3,5,3'-Trijodthyronin auf Vorläuferzellen des enterischen Nervensystems“  
09/2015 – Wissenschaftlicher Außendienst Firma Santis GmbH (AstraZeneca AG)

## 7.6 Tagungen und Publikationen:

### Tagungen:

14. – 17.03.2008 Innsbruck: 103. Tagung der Anatomischen Gesellschaft.  
Posterpräsentation: "*The influence of 3,5,3'-triiodothyronine on progenitor cells of the enteric nervous system*"
29. – 31.10.2009 Leipzig: World conference on regenerative medicine.  
Posterpräsentation: "*The influence of 3,5,3'-triiodothyronine on progenitor cells of the enteric nervous system*"

### Publikationen:

**R. Mohr**, P. Neckel, Y. Zhang, S. Stachon, K. Nothelfer, K. Schaeferhoff, F. Obermayr, M. Bonin, L. Just. Molecular and cell biological effects of 3,5,3'-triiodothyronine on progenitor cells of the enteric nervous system in vitro. *Stem Cell Res.* 2013; 11(3):1191-205.

P.H. Neckel, **R. Mohr**, Y. Zhang, B. Hirt, L. Just. Comparative microarray analysis of proliferated and differentiated murine ENS progenitor cells. *Stem Cells Int.* Epub 2015, Nov 30. Die beiden erstgenannten Autoren haben zu gleichen Teilen zur Publikation beigetragen

H.M. Dettmann, Y. Zhang, N. Wronna, U. Kraushaar, E. Guenther, **R. Mohr**, P.H. Neckel, A. Mack, J. Fuchs, F. Obermayr. Isolation, expansion and transplantation of postnatal murine progenitor cells of the enteric nervous system. *PLoS One.* 2014 May 28;9(5):e97792